

文章编号: 1000-7423(2007)-06-0513-03

【研究简报】

卫氏并殖吸虫感染循环抗原检测方法的建立与应用

陈韶红, 李浩, 周晓农

【摘要】 用 CAg-dot-ELISA 法和 CAb-ELISA 法分别对并殖吸虫病临床诊断患者、并殖吸虫病流行区人群、卫氏并殖吸虫早期感染者及其他寄生虫感染者进行循环抗原和抗体检测。用 CAg-dot-ELISA 检测 70 份卫氏并殖吸虫病临床诊断患者血清, 阳性 29 份, 敏感性为 41.5%(29/70), 与华支睾吸虫病和日本血吸虫病患者血清分别有 25%(5/20) 和 20%(4/20) 的交叉反应, 与其他寄生虫感染者血清和健康人血清(60 份)均为阴性, 特异性为 93.6%。CAb-ELISA 检测 70 例卫氏并殖吸虫病临床诊断患者血清阳性 67 份, 敏感性为 95.7%(67/70), 与华支睾吸虫病和日本血吸虫病患者血清分别有 25%(5/20) 和 20%(4/20) 的交叉反应, 对其他寄生虫感染者血清和健康人血清的特异性为 92.1%。CAg-dot-ELISA 和 CAb-ELISA 分别检测并殖吸虫病流行区人群 220 份血清, 阳性率分别为 0 和 3.2%(7/220)。CAg-dot-ELISA 法对辅助诊断并殖吸虫早期感染有一定价值。

【关键词】 卫氏并殖吸虫; 多克隆抗体; 循环抗原; ELISA; dot-ELISA

中图分类号: R532.221, R446.61

文献标识码: B

Establishment and Application of Circulating Antigen Detection in *Paragonimus westermani* Infection

CHEN Shao-hong, LI Hao, ZHOU Xiao-nong

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Circulating antigen and antibody were detected by CAg-dot-ELISA & CAb-ELISA respectively on the clinically confirmed patients of paragonimiasis, people in paragonimus endemic area, cases with early infection of *P. westermani*, and cases with other parasitic infections. Circulating antigen was detected in 29 out of 70 cases with paragonimiasis with a sensitivity of 41.5%. The rate of cross reaction in cases with clonorchiasis sinensis and schistosomiasis was 25% (5/20) and 20% (4/20), respectively, and it was negative in 60 cases with other parasitic infections and healthy subjects, with an overall specificity of 93.6%. Specific antibody was detected in 67 of 70 cases with paragonimiasis with a sensitivity of 95.7%. The cross reaction rate in cases of clonorchiasis sinensis and schistosomiasis was 25%(5/20) and 20%(4/20), but negative in 60 cases with other parasitic infections and healthy subjects, with a specificity of 92.1%. 220 persons from paragonimus endemic area were all negative in antigen detection and 7(3.2%) showed antibody positive. Dot-ELISA for circulating antigen detection may be helpful in diagnosing early infection of *P. westermani*.

【Key words】 *Paragonimus westermani*; Polyclonal antibody; Circulating antigen; Dot-ELISA

并殖吸虫病是一种危害人体健康的食源性寄生虫病^[1]。由于并殖吸虫虫种繁多, 分布广泛, 临床症状表现复杂多变, 误诊、漏诊率较高^[2-7], 并殖吸虫病的确诊和疗效考核已成为临床学、流行病学、寄生虫学的重要难题之一。制备抗成虫抗原的多克隆抗体来检测循环抗原, 是探索利用血清学检测方法来减少临床上误诊和漏诊的新途径。因此, 作者等建立多抗(PW-IgG)检测并殖吸虫感染者循环抗原的 dot-ELISA 法, 对临床确诊的并殖吸虫病患者、并殖吸虫病流行区人群及其他寄生虫病患者进行循环抗原的检测, 同时运用 ELISA 法检测并殖吸虫病患者、并殖吸虫病流行区人群血清中的特异性抗体, 从

而评价检测循环抗原方法的实用性, 以达到早期诊断并殖吸虫病的目的。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂 体重(5.0±0.1) kg 的实验家兔和 5 月龄、体重为(10.0±0.1) kg 的实验犬, 均购自上海动物医学中心。

福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂、邻苯二胺(OPD)和 4-氯-1-萘酚购自美国 SIGMA 公司, 辣根过氧化物酶(HRP.RZ=3.0, 活力>2500/mg)购自上海生物制品所, 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所, 饱和硫酸铵、过碘酸钠和 3,3-二氨基邻苯胺购自杭州华美生物工程有限公司, 硝酸纤维薄膜购自上海医药工业研究院。卫氏并殖吸虫多克隆抗体(PW-IgG)由本实验室制备。

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

1.2 血清来源 并殖吸虫病临床诊断患者血清 70 份(其中 56 份为金标准病原学检测痰卵阳性患者, 14 份为临床诊断患者) 采自浙江永嘉县, 并殖吸虫病流行区人群血清 220 份采自浙江永嘉县; 并殖吸虫早期感染者血清 6 份采自湖南省; 华支睾吸虫病、血吸虫病患者血清各 20 份, 旋毛虫病、囊尾蚴病、曼氏裂头蚴病、弓形虫病患者血清各 10 份来自本所血清库; 60 份健康人血清采自上海交通大学医学院体检学生。

1.3 并殖吸虫病诊断标准 参照卫生部颁布的国家标准: 有食生、半生溪蟹史, 具有并殖吸虫病的不同临床表现, 如咳嗽、咳血(呈铁锈色)或有不同程度的胸痛、胸腔积液、皮下游走性包块的肺外型等, 痰或粪便查见并殖吸虫虫卵, 免疫学抗体检测阳性, 活检发现并殖吸虫或表现为嗜酸性肉芽肿或隧道样改变, 影像学检查: 磁共振(MIR)或 CT 检查有结节状、棉絮状及条索状阴影, 吡喹酮(PQT)治疗疗效显著, 外周血或胸水检查嗜酸性粒细胞(EOS)明显增高(>5%)。以上第、为必备条件, 兼有其他 1 项或多项者可诊断为并殖吸虫病。

1.4 多抗的制备 从感染卫氏并殖吸虫囊蚴的家犬肺部分离成虫, 制备成虫可溶性抗原, 测得蛋白含量为 18.8 mg/ml。采用背部皮下多点注射免疫家兔, ELISA 法测得家兔免疫后的抗体水平为 1 400 000。采用盐析法^[8]纯化多抗(PW-IgG)。ELISA 测得多抗的效价为 1 40 000。采用过碘酸盐标记法标酶^[8]。

1.5 斑点酶联免疫吸附实验检测循环抗原(CAg-dot-ELISA) 被检血清(并殖吸虫病、华支睾吸虫病、旋毛虫病、囊尾蚴病、棘球蚴病、弓形虫病和曼氏裂头蚴病患者血清, 及健康人的血清)原液约 1 μ l 在硝酸纤维膜上点样, 37 $^{\circ}$ C 2 h, 4 冰箱备用[同时设空白(PBS)和健康人血清对照], 用 PBS/T 或 1%小牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h, 加多抗(PW-IgG)酶结合物(HRP-IgG)工作浓度 1 40, 室温摇床反应 2 h, PBS/T 洗涤 15 min, 加底物(4-氯-1-萘酚与 3, 3-二氨基联苯胺等量混合), 蒸馏水终止反应。判断标准: 出现黄蓝色斑点判断为阳性, 不出现则为阴性。

1.6 酶联免疫吸附实验检测特异性抗体(CAb-ELISA) 用卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原包被 96 孔酶标板, 包被浓度 1 1 800 (10.4 μ g/ml), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 每孔 100 μ l。加待检血清 100 μ l (1 100), 37 $^{\circ}$ C 1 h, 用 PBS/T 洗涤 3 次, 加羊抗人-HRP 结合物 100 μ l (1 1 000), 37 $^{\circ}$ C 1 h, PBS/T 洗涤 3 次, 加底物 OPD 显色反应, 2 mol/L H_2SO_4 液终止反应, 用酶标仪(Thermo Multiskan MK3, 上海坤肯生物化工有限公司)测定吸光度(A_{490} 值)。同时设空白和健康人血清对照。判断标准: 多份健康人血清平均 A_{490} 值为阴性参考值, 患者血清检测值/阴性参考值(P/N) ≥ 2.0 为阳性临界值。

1.7 并殖吸虫 CAg 阳性患者和阴性患者血清中抗体水平比较 对 CAg-dot-ELISA 法检测的 29 例 CAg 阳性患者和 41 例 CAg 阴性患者血清进行 CAb-ELISA 法检测其抗体, 比较 A_{490} 值, 以观察患者的感染时间。

1.8 统计学分析 运用 Microsoft Office 2003 Excel 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 并殖吸虫病临床诊断患者病原学(金标准)检测结果 对 70 例并殖吸虫病临床诊断患者进行痰卵检查, 结果有 56 例阳性, 其中 14 例都有不同程度的胸水和皮下游走性包块, 且影像学检查符合并殖吸虫病诊断标准。

2 CAg-dot-ELISA 法的检测结果 用 CAg-dot-ELISA 法对 70 例临床确诊并殖吸虫病患者进行循环抗原检测, 阳性 29 例, 敏感性为 41.5%(29/70); 对 20 例确诊血吸虫病、20 例华支睾吸虫病患者血清检测, 结果交叉反应分别为 20%(4/20)和 25%(5/20); 对囊尾蚴病、旋毛虫病、曼氏裂头蚴病、弓形虫病患者血清及 60 份健康人血清检测结果均为阴性, 特异性为 93.6%。对并殖吸虫病流行区 220 人的血清进行循环抗原的检测(CAg), 结果均为阴性; 对 2 个月内曾食生醉蟹的 6 例(来自湖南的并殖吸虫早期感染者)检测其循环抗原, 其中 2 例阳性(滴度为 1 4), 其余 4 例为弱阳性。

3 CAb-ELISA 法的检测结果 用 CAb-ELISA 法对 70 例并殖吸虫病患者进行血清特异性抗体检测, 阳性 67 例, 敏感性为 95.7%(67/70)。与血吸虫病、华支睾吸虫病患者血清的交叉反应分别为 20%(4/20)、25%(5/20); 对囊尾蚴病、旋毛虫病、曼氏裂头蚴病、弓形虫病患者血清中抗体检测结果均为阴性; 60 份健康人血清有 2 份阳性, 特异性为 92.1%。对并殖吸虫病流行区 220 人的血清进行特异性抗体(CAb)检测, 结果 7 例阳性, 阳性率为 3.2%(7/220); 对 6 例早期并殖吸虫感染者进行特异性抗体检测, 有 5 例阳性, A_{490} 值为 0.33 ± 0.07 , 正常对照 A_{490} 值为 0.16 ± 0.02 。

4 并殖吸虫 CAg 阳性患者和阴性患者血清抗体水平比较 CAb-ELISA 法检测 29 例并殖吸虫 CAg 阳性患者血清抗体 A_{490} 值为 0.695 ± 0.09 , 41 例并殖吸虫 CAg 阴性患者血清抗体 A_{490} 值为 0.942 ± 0.12 , 两者差异有统计学意义($t=6.56$, $P<0.01$)。表明 29 例并殖吸虫 CAg 阳性患者处于感染早期。

3 讨论

由于病原体寄生部位以及虫体本身的特性, 用病原学检测并殖吸虫童虫的移行期(早期感染)、非肺型感染十分困难。因此, 临床上常用检测特异性抗体(Ab)作为辅助诊断。虽然检测特异性抗体具有较高的敏感性和特异性, 但缺点是抗体出现时间较迟(30 d 以上), 仅能表示既往有感染; 而检测循环抗原(CAg)能确定活动性感染和考核疗效的价值, 是较理想的血清诊断标志。

在寄生虫病的血清学诊断中, 曾有研究者运用多抗 ELISA 和试纸条法测定棘球蚴病患者血清和并殖吸虫病患者血清中的循环抗原(CAg)都获得较好的效果^[10-12]。本实验应用多抗检测 70 例并殖吸虫病患者血清中 CAg, 敏感性为 41.5%, 这与张耀娟等^[9]用 7 株单抗和混合单抗检测并殖吸虫病患者血清 CAg 38%敏感性和滤纸血 57%敏感性相似。同时发现 29 例 CAg 阳性患者血清的抗体水平明显低于 41 例 CAg 阴性患者的($P<0.01$)。也就证明 29 例 CAg 阳性患者正处于并殖吸虫感染早期(<60 d)。对于 6 例早期感染患者能在其血清中检测到循环抗原, 说明其感染时间也在 60 d 以内, 由此可认为循环抗原的出现具有明显的时间性。而另外 41 例患者可能是感染时间较

文章编号: 1000-7423(2007)-06-0515-03

【研究简报】

从噬菌体肽库中筛选弓形虫抗原模拟表位初探

何艳燕¹, 张述义¹, 朱民¹, 钱旻², 谭红岩²

【摘要】 以弓形虫感染兔血清免疫球蛋白(Ig)作为靶分子, 免疫筛选噬菌体随机 7 肽库和 12 肽库。经 3 轮筛选, 随机挑取 70 个噬菌体克隆用 ELISA 检测其特异性, 共获得 43 个阳性克隆。对 23 个 ELISA 反应较强的克隆进行测序, 根据序列分析选择有代表性的克隆 A7 作为模拟表位抗原进行 ELISA 检测。对 47 份弓形虫感染兔血清进行 ELISA 检测, 结果 32 份为阳性, 敏感性为 68.1%; 155 份健康人血清中弓形虫抗体呈阳性者 10 份, 特异性为 93.5%。从噬菌体随机肽库中能筛选到弓形虫抗原模拟表位有诊断弓形虫病的潜在价值。

【关键词】 弓形虫; 噬菌体; 肽库

中图分类号: R382.5

文献标识码: A

基金项目: 上海市卫生局基金 (No. 01419)

作者单位: 1 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336; 2 华东师范大学生命科学院, 上海 200062

长, 感染的虫量较少, 机体产生免疫应答后抗体与循环抗原不断中和, 产生免疫复合物, 使循环抗原逐渐在外周血中消失, 也可能是虫体到达肺部成为虫囊后, 封闭了虫体抗原的物质释放^[13]。这也提示 CAg 的检出率与感染程度和感染时间有关。

本研究建立了用多克隆抗体 (PW-IgG) 检测并殖吸虫感染者血清中 CAg 的 dot-ELISA 方法, 具有重复性较好、操作简便、不需要特殊仪器、费用少等优点, 并获得与用单抗检测并殖吸虫早期感染相似的效果。因此, 作者等认为该方法对辅助诊断早期并殖吸虫感染有较好的应用价值。但用多抗检测循环抗原方法还有一定局限性, 感染时间是捕获循环抗原的首要条件, 且多抗检测循环抗原与两种吸虫有交叉反应, 这与曾庆仁等^[14]报道的并殖吸虫与日本血吸虫存在共同抗原一致, 因此, 进一步筛选寻找多株单克隆抗体, 提高检测循环抗原的敏感性是今后改进的目标。

参 考 文 献

- [1] Wu GL. Human Parasitology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005. 21-447. (in Chinese)
(吴观陵. 人体寄生虫学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 421-447.)
- [2] Imazu Y, Ashitani J, Imai K, et al. A case of paragonimiasis westermani with atypical change of CT findings[J]. Nihon Kokyoku Gakkai Zasshi, 2005, 43: 771-774.
- [3] Lei HX, Dai LZ, Fang GM, et al. Diagnosis and treatment of larva migrans due to Paragonimus westermani: 106 case in children[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 184-185. (in Chinese)
(雷后兴, 戴丽珍, 方国美, 等. 106 例儿童并殖吸虫幼虫移行症的诊治分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23: 184-185.)
- [4] Guan MS, Zhou XY. Analysis of clinical features and misdiagnosis of 18 patients with paragonimiasis[J]. J Pract Parasit Dis, 1995, 3(2): 60. (in Chinese)
(关明双, 周晓茵. 18 例肺吸虫病临床表现与误诊分析[J]. 实用寄生虫病杂志, 1995, 3(2): 60.)
- [5] Mizuki M, Mitch K, Miyazaki E, et al. A case of paragonimiasis westermani with pleural effusion eight months after migrating subcutaneous induration of the abdominal wall [J]. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi, 1992, 30: 1125-1130.
- [6] Doutsu Y, Taniguchi H, Ashitani J, et al. A case of paragonimiasis westermani diagnosed on the observation of parasitic ova in bronchial washing fluid and successfully treated with praziquantel[J]. Kansenshogaku Zasshi, 1993, 67: 491-495.
- [7] Sasaki M, Kamiyama T, Yano T, et al. Active hepatic capsulitis caused by Paragonimus westermani infection[J]. Intern Med, 2002, 41: 661-663.
- [8] Liu YH, Li YH. Clinical Immunology in Parasitic Diseases[M]. Chongqing: Chongqing Publishing House, 1993. 327-334. (in Chinese)
(刘约翰, 李允鹤. 寄生虫病临床免疫学[M]. 重庆: 重庆出版社, 1993. 327-334.)
- [9] Zhang YJ, Zhang ZH, Shi ZM, et al. Detection of Paragonimus circulating antigens in sera by double antibody sandwich ELISA with mixed and single monoclonal antibodies[J]. Chin J Parasit Dis Control, 1995, 8: 265-267. (in Chinese)
(张耀娟, 章子豪, 史志明, 等. 混合或单一单抗检测肺吸虫病人血清中循环抗原的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1995, 8: 265-267.)
- [10] Craig PS, Nelson GS. The detection of circulating antigen in human hydatid disease[J]. Ann Trop Med Parasitol, 1984, 78: 219-227.
- [11] Kwon OS, Lee JS, Rim HJ, et al. Antigenic localities in the tissues of the young adult worm of Paragonimus westermani using immunogold labeling method[J]. Kisaengchunghak Chapchi, 1991, 29: 31-41.
- [12] Lee SH, Sung SH, Chai JY. Immunohistochemical study on the antigenicity of body compartments of Paragonimus westermani[J]. Kisaengchunghak Chapchi, 1989, 27: 109-117.
- [13] Duan YN, Shao YQ, Zhu SX, et al. Dynamics of circulating antigen and circulating immune complex in sera from dogs infected with Paragonimus westermani[J]. Chin J Zoonoses, 1996, 12(5): 52-53. (in Chinese)
(段义农, 邵义群, 朱顺星, 等. 卫氏并殖吸虫感染犬循环免疫复合物和循环抗原的动态比较[J]. 中国人兽共患病杂志, 1996, 12(5): 52-53.)
- [14] Zeng QR, Zhang WC, Chen CE, et al. Common antigenic components in soluble antigens shared by Schistosoma japonicum eggs and Paragonimus westermani adult worms [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1991, 9: 31-34. (in Chinese)
(曾庆仁, 张悟澄, 陈翠娥, 等. 日本血吸虫卵与卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原内的共同抗原组分研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1991, 9: 31-34.)

(收稿日期: 2007-06-25 编辑: 盛慧锋)