

· 基础研究 ·

棘球蚴感染的检测分析

付丽琴¹, 赵海龙², 李雪梅³

(1. 青海省西宁市城东区疾病预防控制中心 810000; 2. 青海大学, 西宁 810001;

3. 青海大学附属医院, 西宁 810001)

摘要:目的 探讨动物宿主棘球蚴感染的检测方法, 为绦虫感染的治疗与预防提供参考。方法 选择泡状棘球蚴病羊血清和囊型棘球蚴病羊血清各 100 份, 建立 AgB 原核表达体系, 采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析及酶联免疫吸附测定(ELISA)进行血清学诊断评价。结果 联合表达抗原 AgBs 对囊型棘球蚴病羊血清的敏感性和特异性均为 90.0%, 明显高于 AgB1 对囊型棘球蚴病羊血清的敏感性和特异性(分别为 70.0%、56.0%)($P < 0.05$)。结论 联合表达抗原 AgBs 对囊型棘球蚴病的诊断价值优于 AgB1。

关键词:棘球蚴病; 敏感性与特异性; 诊断技术和方法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.09.013

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)09-0867-02

Detection analysis of echinococcus infection

Fu Liqin¹, Zhao Hailong², Li Xuemei³

(1. East Region Center for Disease Control and Prevention of Xining City, Xining, Qinghai 810000,

China; 2. Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China; 3. Affiliated

Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China)

Abstract:Objective To explore the detection methods of echinococcus infection in animal host and provide a reference for prevention and treatment of tapeworm infection. **Methods** Serum samples of goats with cystic echinococcosis and with alveolar echinococcosis (each of 100) were collected. AgB prokaryotic expression system was established. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) was employed to analyze AgB expression and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was adopted to evaluate the serological diagnosis. **Results** Sensitivity and Specificity of co-expression antigen AgBs to sera of goats with cystic echinococcosis were both 90.0%, which were higher than those of AgB1(70.0% and 56.0%, respectively)($P < 0.05$). **Conclusion** The diagnostic value of co-expression antigen AgBs in cystic echinococcosis is prior to that of antigen AgB1.

Key words: echinococcosis; sensitivity and specificity; diagnostic techniques and procedures

棘球蚴病又称包虫病, 囊型棘球蚴病(cystic echinococcosis, CE)及泡状棘球蚴病(alveolar echinococcosis, AE)是分别由细粒棘球绦虫(echinococcus granulosus, EG)的幼虫及多房棘球绦虫(echinococcus multilocularis, EM)的续绦期幼虫寄生于人体引起的严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病^[1]。棘球蚴病免疫诊断的发展主要体现在特异性抗原方面, 特异性抗原的确定对于提高免疫诊断方法的敏感性和特异性极为关键^[2]。其中, 抗原 B(antigen B, AgB)在细粒棘球蚴囊液中含丰富, 并被认为是目前用于免疫诊断试验中具有较高敏感性和特异性的抗原之一。本文探讨了动物棘球蚴感染 AgB 的检测诊断意义, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 泡状棘球蚴病羊感染血清 100 份及囊型棘球蚴病羊感染血清 100 份均源自中国疾病预防控制中心基础研究所。

1.2 AgB 的原核表达 从 GenBank 中获得 AgB1(参考序列 Z26336)和 AgB2(参考序列 U15001)2 个亚单位的完整基因序列, 设计引物中包含的酶切位点使 2 个基因片段可进行衔接。原核表达的具体步骤见参考文献^[2], 包括基因表达、载体构建、载体转移、蛋白诱导与表达。

1.3 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 使用 Bio-Rad 公司生产的 Mini Protean-III 型电泳系统, 不连续缓冲

体系进行 SDS-PAGE, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 14%。凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色, Marker 为 Pharmacia 公司产品。上样样本为泡状棘球蚴病羊血清、囊型棘球蚴病羊血清。配置好分离胶后, 用移液枪将其注入 2 层玻璃板间, 用双蒸水封胶, 以保证制好的分离胶平整, 在室温条件下聚合 40 min。待分离胶凝固以后, 倾去表面的双蒸水, 吸水纸吸干。配制浓缩胶, 灌入分离胶上方, 插入梳子, 在室温下聚合 40 min。浓缩胶凝固后小心拔出梳子, 保证点样孔平整, 若有堵塞现象, 可用针头疏通。倒入 SDS 电极缓冲液, 使其漫过前端玻璃板, 再用针管吸去表面的泡沫。用微量加样器吸取蛋白质样品上清液 20 μ L 加入加样孔。电泳温度为 4 $^{\circ}$ C 左右, 先将电压稳定在 120 V, 当溴酚兰指示剂进入分离胶后, 将电压加至 150 V, 整个电泳时间为 4 h。电泳结束后先关闭电泳仪, 将电泳槽内的电极缓冲液倒出, 取下电泳板, 小心将玻璃板间的胶片取出, 用 10% 氯乙酸固定胶片, 固定一夜后进行染色, 染色 30 min, 用清水冲洗 1~2 次, 用脱色液进行脱色。待背景颜色脱去或变淡后进行照相。结果显示上述样品的蛋白检测均符合标准, 见图 1。

1.4 血清学评价 血清学评价采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法, 以多份泡状棘球蚴病、囊型棘球蚴病和健康羊血清等量混合, 分别配制成泡状棘球蚴病、囊型棘球蚴病阳性和健康羊混合血清, 作为对照

血清。抗原保存液按倍比稀释后包被,做单向滴定试验,确定抗原的工作浓度分别为囊液粗抗原(对照)10 $\mu\text{g/mL}$ 、重组抗原 AgB1 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、联合重组抗原 AgBs (包括 AgB1 和 AgB2) 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。待检血清 1 : 100 稀释,抗人 IgG 辣根过氧化物酶标记物工作浓度 1 : 25 000。碱性磷酸酶底物显色,测光密度值。以血清阳性对照(positive,P)和阴性对照(negative,N)的吸光度值之比(P/N) ≥ 2.5 作为阳性临界值。

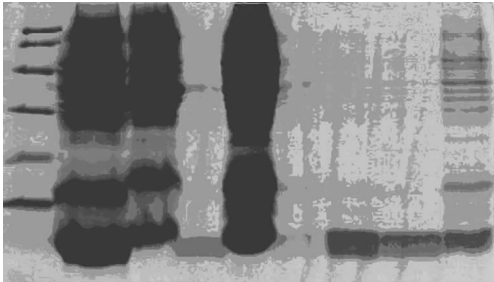


图 1 AgB 原核表达的 SDS-PAGE 电泳

1.5 统计学处理 使用 SPSS18.0 软件进行统计学分析。不同抗原检测血清计数资料的统计学比较用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

结果显示联合表达抗原 AgBs 对囊型棘球蚴病羊血清的敏感性和特异性均为 90.0%,明显高于 AgB1 对囊型棘球蚴病羊血清的敏感性和特异性(分别为 70.0%、56.0%)($P < 0.05$),见表 1。

表 1 AgB1 与 AgBs 检测囊型棘球蚴病及泡状棘球蚴病羊血清的敏感性和特异性分析

血清	n	AgB1 阳性	AgBs 阳性
囊型棘球蚴病(n)	100	70	90
泡状棘球蚴病(n)	100	22	10
敏感性(%)	—	70.0	90.0
特异性(%)	—	56.0	90.0

—:表示此项目无数据。

3 讨 论

动物患棘球蚴病后,由于包囊生长缓慢,通常无明显症状。50%的棘球蚴病动物无临床症状,而是因其他疾病进行检查时偶然发现^[3-4]。随着科技的发展,诊断仪器的不断进步,应用超声波探查、核素扫描、CT 扫描及核磁共振成像等物理诊断方法,能对病变部位、大小和物理性状等做出较为明确的判断,但在一些非典型影像的病例中通常对于病变性质难以做出准确的判断^[4-6]。

分子生物学工具主要用于从手术切除或活组织检测样本中对寄生虫的鉴定,也用于化疗或其他治疗后对寄生虫样本活力的评估^[7-9]。有研究将来源于 pAL1 探针序列的 3 个引物 BG1、BG2、BG3 用 PCR 扩增,其中 BG1/BG2 引物对扩增出多房棘球蚴种特异性的 2.6 kb 产物,BG1/BG3 引物对扩增出多房棘球蚴种特异性的 0.3 kb 产物。这些引物已用于不同中间宿主(包括啮齿类和人类)病变肝脏多房棘球蚴 DNA 的检测。PCR 不仅用于检测寄生虫,还用来测定寄生虫活力和抗寄生虫治疗的效果评价^[10-11]。有研究选择 EM 10 基因的种特异性

引物用逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction,RT-PCR)检测肝穿刺物中微量的 mRNA。RT-PCR 阳性提示续缘期虫体有活力,抗寄生虫治疗失败;但 RT-PCR 阴性并不能证明其有效,因为活检样本不可能代表整个病灶,而泡状棘球蚴病病变组织具有活性区、坏死区和退行性变性区等不均一的组织结构^[12-13]。

免疫学诊断对辅助临床确诊是必要的,同时在棘球蚴病的流行病学调查中,免疫学诊断也具有不可替代的特殊作用^[14-15]。20 世纪 20 年代首次将包囊液抗原皮内注射引起速发型超敏反应用于动物棘球蚴病诊断以来,已应用于棘球蚴病诊断的方法有补体结合试验、间接凝集试验、间接抗体标记试验及沉淀试验等。不同的试验方法之间在诊断敏感性和特异性上存在很大的差异^[16-17]。传统的棘球蚴病免疫诊断试验通常是以虫体抗原为基础,包括包囊液和原头节提取物,其中包囊液的 2 个主要抗原成分——A95 和 AgB,与动物棘球蚴病的诊断密切相关。AgB 是相对分子质量约为 $120 \times 10^3 \sim 160 \times 10^3$ 的热稳定脂蛋白,是由相对分子质量约为 8×10^3 的最小亚单位组成的规律的空间组合,AgB 降解产物的相对分子质量呈渐进性递增,分别为 8×10^3 、 16×10^3 、 24×10^3 、 32×10^3 。由于 AgB 组成的复杂性,不同研究报告的来源于细粒棘球蚴囊液的天然粗抗原或纯化 AgB 在诊断敏感性和特异性存在较大差异。分别用青海和新疆绵羊肝细粒棘球蚴的囊液粗抗原检测青海省流行病学调查中确诊的 206 份棘球蚴病人血清,结果青海抗原的敏感性为 90.4%,新疆抗原为 75.9%,两者有显著差异。本文结果显示联合表达抗原 AgBs 对囊型棘球蚴病羊血清的敏感性和特异性均为 90.0%,明显高于 AgB1 对囊型棘球蚴病羊血清的敏感性和特异性(分别为 70.0%、56.0%)($P < 0.05$)。

总之,AgB 是目前公认在囊型棘球蚴病与泡状棘球蚴病诊断中特异性较好的抗原,但是联合表达抗原 AgBs 对囊型棘球蚴病的诊断价值优于单基因表达抗原 AgB1。

参考文献:

[1] González-Sapientza G, Lorenzo C, Nieto A. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, Echinococcus granulosus antigen B[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(11): 3979-3983.

[2] Rott MB, Fernández V, Farias S, et al. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from Echinococcus granulosus: gene sequences, expression in Escherichia coli and serological evaluation[J]. Acta Trop, 2000, 75(3): 331-340.

[3] Sako Y, Nakao M, Nakaya K, et al. Alveolar echinococcosis: characterization of diagnostic antigen Em18 and serological evaluation of recombinant Em18[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(8): 2760-2765.

[4] Yap KW, Thompson RC, Pawlowski ID. The development of nonradioactive total genomic probes for strain and egg differentiation in taeniid cestodes[J]. Am J Trop Med Hyg, 1988, 39(5): 472-477.

(下转第 871 页)

的新型可视化吸痰系统,由于超微光导纤维直径较小,除了能整合吸痰管进行可视化引导吸痰外,还可以进一步整合其他医学技术,如使用超微型光导纤维成像系统对不育男性的输精管病变进行诊断,通过胃管、尿管及胆总管等分别对胃、膀胱、胆总管等病变进行诊断。如今,本项目组已完成了可视吸痰系统的研制及离体实验,与传统吸痰系统比较,它具有迅速、高效、易操作的优点,值得在各级医院推广。

参考文献:

[1] 尹利华,王建荣,张利岩,等. 密闭式吸痰研究进展[J]. 南方护理学报,2005,12(4):13-15.

[2] Barnes CA,Kirchhoff KT. Minimizing hypoxemia due to endotracheal suctioning: a review of the literature[J]. Heart Lung,1986,15(2):164-176.

[3] Johnson KL,Kearney PA,Johnson SB,et al. Closed versus open endotracheal suctioning: costs and physiologic Consequences[J]. Crit Care Med,1994,22(4):658-666.

[4] Reissmann H,Böhm SH,Suárez-Sipmann F,et al. Suctioning through a double-lumen endotracheal tube helps to prevent alveolar collapse and to preserve ventilation[J]. Intensive Care Med,2005,31(3):431-440.

[5] Brochard L,Mion G,Isabey D,et al. Constant-flow insufflation prevents arterial Oxygen desaturation during endotracheal suctioning[J]. Am Rev Respir Dis,1991,144(2):395-400.

(上接第 868 页)

[5] 王虎,曹得萍,马淑梅,等. 不同血清学方法对调查现场包虫病人血清的检测及评价[J]. 中国人兽共患病杂志,2000,16(6):67-69.

[6] 杨玉荣,张京元,魏燕琴. 泡球蚴病患者血清 Cab,CAG,CIC 检测评价[J]. 中国寄生虫病防治杂志,1995,9(2):151-152.

[7] 杨玉荣,魏燕琴,李燕宾,等. 泡球蚴血清不同存放的时间中循环抗体、循环抗原和循环免疫复合物检测结果比较[J]. 中国寄生虫病防治杂志,1997,10(3):238.

[8] 哈小琴,景涛,曹和洵. 包虫病患者循环抗原检测中血清不同处理方法的比较研究[J]. 中国人兽共患病杂志,1994,10(4):13-15.

[9] 江莉,冯正,薛海筹,等. 多房棘球蚴病特异性诊断抗原 Em18 的基因克隆、表达和血清学评价[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2004,22(4):193-198.

[10] Gottstein B. An immunoassay for the detection of circulating antigens in human echinococcosis[J]. Am J Trop Med Hyg,1984,33(6):1185-1191.

[11] Devi CS,Parija SC. A new serum hydatid antigen detection test for diagnosis of cystic echinococcosis[J]. Am J Trop Med Hyg,2003,69(5):525-528.

[12] Felleisen R,Gottstein B. Comparative analysis of full-

[6] Maggiore SM,Lellouche F,Pigeot J,et al. Prevention of endotracheal suctioning-induced alveolar derecruitment in acute lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med,2003,167(9):1215-1224.

[7] Shah S,Fung K,Brim S,et al. An in vitro evaluation of the effectiveness of endotracheal suction catheters[J]. Chest,2005,128(5):3699-3704.

[8] Pedersen CM,Rosendahl-Nielsen M,Hjerminnd J,et al. Endotracheal suctioning of the adult intubated patient——what is the evidence[J]. Intensive Crit Care Nurs,2009,25(1):21-30.

[9] 刘宏见. 机械通气患者气管内开放式与密闭式吸痰效果比较[J]. 当代护士:学术版,2008(2):84-85.

[10] Liu GY,Lu JS,Shen KW,et al. Fiberoptic ductoscopy combined with cytology testing in the patients of spontaneous nipple discharge[J]. Breast Cancer Res Treat,2008,108(2):271-277.

[11] 徐建如,李刚,尚云飞. 纤维支气管镜吸痰术在 ICU 中的应用[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2004,25(10):1126-1127.

[12] 张建,崔丽华,郝兴亮,等. 床边便携式纤维支气管镜在临床中的应用研究[J]. 临床肺科杂志,2011,16(4):519-520.

(收稿日期:2011-11-02 修回日期:2012-01-02)

length antigen II/3 from Echinococcus multilocularis and E. granulosus[J]. Parasitology, 1994, 109 (Pt 2): 223-232.

[13] Felleisen R,Gottstein B. Echinococcus multilocularis: molecular and immunochemical characterization of diagnostic antigen II/3-10[J]. Parasitology, 1993, 107 (Pt 3): 335-342.

[14] Hemmings L,Mcmanus DP. The diagnostic value and molecular characterisation of an Echinococcus multilocularis antigen gene clone[J]. Mol Biochem Parasitol, 1991,44(1):53-61.

[15] Welling GW,Weijer WJ,van der Zee R,et al. Prediction of sequential antigenic regions in proteins[J]. FEBS Lett, 1985,188(2):215-218.

[16] Hopp TP,Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1981,78(6):3824-3828.

[17] Lightowlers MW,Liu DY,Haralambous A,et al. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of Echinococcus granulosus[J]. Mol Biochem Parasitol,1989,37(2):171-182.

(收稿日期:2011-11-08 修回日期:2011-12-22)