

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.20.009

组合抗原金标渗滤法与影像学诊断两型包虫病的对比研究*

张萍¹, 邓勇², 樊海宁², 王海久², 乜国雁³, 王花¹, 张朝霞¹, 刘芳¹

(1. 青海卫生职业技术学院, 西宁 810000; 2. 青海大学附属医院肝胆胰外科, 西宁 810000; 3. 青海省人民医院泌尿外科, 西宁 810007)

摘要:目的 对比研究组合抗原金标渗滤(DIGFA)法与影像学对两型包虫病的诊断价值。方法 对病理检查确诊的包虫病患者 167 例, 分别行 DIGFA 诊断(DIGFA 组)和影像学诊断(影像学组), 然后进行对比研究。结果 囊型包虫病(CE)中 DIGFA 组确诊率为 74.60%, 影像学组确诊率为 90.48% ($P < 0.01$); 泡型包虫病(AE)中 DIGFA 组确诊率为 92.68%, 影像学组确诊率为 73.17% ($P < 0.05$)。在包囊小于 5 cm 时, DIGFA 组 AE 和 CE 的检出率分别为 91.67% 和 61.11% ($P < 0.05$), 在包囊为 5~<10 cm 时, DIGFA 组 AE 和 CE 的检出率分别为 94.12% 和 71.43% ($P < 0.05$); DIGFA 组 CE 在包囊大于或等于 10 cm、<5 cm 和 5~<10 cm 的检出率为 94.12%、61.11% 和 71.43% ($P < 0.05$); DIGFA 组 AE 和 CE 总确诊率分别为 92.68%、74.60% ($P < 0.05$)。结论 影像学对 CE 确诊率高; DIGFA 对 AE 确诊率高, 特别是对 AE 早期诊断更加有临床意义。在影像学诊断的基础上, 辅以 DIGFA 有益于准确判断两型包虫病。

关键词:包虫病/棘球蚴病; 组合抗原金标渗滤诊断法; 影像学诊断

中图分类号: R532.32

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)20-2569-03

Comparative research of multiple antigens dot immunogold filtration assay and imaging diagnosis for two kinds of echinococcoses*

Zhang Ping¹, Deng Yong², Fan Haining², Wang Haijiu², Nie Guoyan³, Wang Hua¹, Zhang Zhaoxia¹, Liu Fang¹

(1. Qinghai Professional and Technical Health College, Xining, Qinghai 810000, China; 2. Department of Hepato-pancreatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai 810000, China; 3. Department of Uropoiesis Surgical, Qinghai Province People's Hospital, Xining, Qinghai 810007, China)

Abstract: Objective To compare and study the value of multiple antigens dot immunogold filtration assay (DIGFA) and imaging diagnosis for rapid diagnosis of two kinds of echinococcoses. **Methods** 167 cases of hydatid patients diagnosed by pathological examination were divided into the DIGFA group for diagnosis of DIGFA and the control group for imaging diagnosis. **Results** The diagnosis rate of cystic echinococcosis(CE) in the DIGFA group was 74.60% and control group was 90.48% ($P < 0.01$); the diagnosis of alveolar echinococcosis(AE) in the DIGFA group was 92.68% and the control group was 73.17% ($P < 0.05$); when the cystica < 5 cm, the diagnosis rate of AE and CE in the DIGFA group was 91.67% and 61.11% ($P < 0.05$), when the cystica 5~<10 cm, the detection rate of AE and CE in the DIGFA group was 94.12% and 71.43% ($P < 0.05$). When the cystica ≥ 10 cm, <5 cm or between 5~<10 cm, the detection rate of CE in DIGFA group was 94.12%, 61.11%, 71.43, respectively ($P < 0.05$); The total detection rates of the AE and CE in DIGFA group were 92.68% and 74.60% ($P < 0.05$). **Conclusion** Imaging diagnosis for the CE was higher and the DIGFA diagnosis for the AE was higher and the DIGFA also had clinical significance especially applied to the early diagnosis of AE. With the help of the imaging diagnosis, the DIGFA could diagnose two kinds of echinococcoses correctly and it provided the benefits of specificity and sensitivity and performed easily.

Key words: hydatidosis/echinococcosis; multiple antigens dot immunogold filtration assay; imaging diagnosis

棘球蚴病又称包虫病是一种严重危害健康和生命的人畜共患寄生虫病。我国仅有两型包虫病即囊型包虫病(cystic echinococcosis, CE)和泡型包虫病(alveolarechinococcosis, AE)。青藏高原南部是全球包虫病危害最为严重的流行区之一^[1]。青海、甘肃、西藏、宁夏、新疆、四川等地是两型包虫病的高流行区^[2-3]。CE 多见, AE 仅占包虫病的 3.3%^[4], 但 AE 晚期可发生全身转移, 手术和药物治疗效果欠佳, 病死率高, 预后极差, 这被视为最致命的蠕虫感染, 故有“虫癌”之称^[5], 故早期诊断临床意义重大。因两型包虫病治疗和预后不同, 故鉴别诊断十分重要。由于两型包虫共具多种抗原组分, 在免疫诊断中

有不同程度的交叉反应^[6], 使两型包虫病的鉴别困难, 因而也是目前包虫病在免疫诊断方面的难点。现今影像学技术能对包虫病做出脏器占位的诊断, 但无法对一些非典型影像和早期或尚未发展成可见大小的病灶进行鉴定^[7]。新疆研制的组合抗原金标渗滤(DIGFA)法可快速检测人体两型包虫病感染的情况。现对 3 年来收集的 167 例经病理学确诊的包虫病患者进行 DIGFA 与影像学诊断的对比, 并结合 DIGFA 对两型包虫病不同大小包囊的检出率进行研究, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 9 月至 2013 年 9 月经青海大学

* 基金项目: 青海省卫生厅 2012 年立项课题项目(2010DFA31360)。 作者简介: 张萍(1969—), 教授, 硕士, 主要从事肝胆外科疾病研究及外科学教学。

附属医院和青海省人民医院病理诊断的包虫病患者 167 例,其中 CE 126 例,AE 41 例。男 71 例,女 96 例,年龄 8~76 岁,平均 37.8 岁。藏族 138 例,汉族 15 例,蒙古族 9 例,回族 5 例;病灶位于肝脏 137 例,盆腔 7 例,肺脏 6 例,脾脏 5 例,胰腺 1 例,胸椎 1 例,肝、腹腔联合包虫病 6 例,肝、肺、腹腔、盆腔联合包虫 4 例。将病理确诊的这 167 例包虫病患者经 DIGFA 诊断作为 DIGFA 组。167 例包虫患者也经影像学方法(B 超和 CT)诊断的作为影像学组。试剂稳定性对照:取临床确诊的 39 例非包虫病患者,其中肝血管瘤 12 例,肝癌 11 例,肺癌 6 例,肺结核 6 例,肝囊肿 4 例;47 例来自西宁市区,无犬羊接触史的非流行区体检者。

1.2 方法

1.2.1 DIGFA 法 试剂盒选用新疆研制的“包虫病体外快速诊断试剂盒(定性)”。试剂盒的构成:(1)DIGFA 法测定装置由 3 部分组成:塑料小盒分盒底与盒盖两部分(盖上有 1 圆孔),吸水填料,硝酸纤维素膜。(2)A 液:稀释液;B 液:洗液;C 液:胶体金标记的二抗,土豆凝集素。各种试剂均采用定量滴瓶分装,直接滴加使用。将采集的血清及试剂盒复温至室温(不低于 20~25℃),将 A 液 5 滴加血清 20 μ L 于小离心管中混匀,取 100 μ L 上清液滴于反应板上,经 B 液 3 滴,C 液 3 滴,3 min 左右即得到检测结果。所有反应板中间的阳性控制点均显色,为质量合格。囊液抗原(EgCF)、头节抗原(EgP)用于包虫病初筛试验;囊液半纯化抗原(EgB)用于 CE 确诊试验;泡球蚴抗原(Em2)用于 AE 确诊试验。阳性结果:淡红色,红色,紫红色;阴性结果:4 个测试点无红色斑点或只出现痕迹者判为阴性。

表 2 包囊大小与 DIGFA 的检出情况比较

包囊大小(cm)	CE 检出情况			AE 检出情况			P
	n	阳性(n)	检出率(%)	n	阳性(n)	检出率(%)	
<5	36	22	61.11	12	11	91.67	<0.05
5~<10	56	40	71.43	17	16	94.12	<0.05
≥ 10	34	32	94.12	12	11	91.67	>0.05
合计	126	94	74.60	41	38	92.68	<0.05

2.2 流行病学调查 两型包虫病地域分布均以青藏高原南部为主,牧区发病率显著高于农业区和城镇,以牧民发病率最高,女性患者多于男性,藏族发病率明显高于其他民族,中青年发病率最高,基本情况同相关文献^[9]。

2.3 重现性试验 取确诊包虫病患者血清标本 20 份分批先后重复 5 次,结果阳性标本均为阳性,阴性标本均为阴性。

2.4 稳定性试验 将试剂盒 2~8℃保存,每隔 1 个月检测一次,观察显色情况,观察 12 个月,测定结果没有变化,说明该试剂盒在 2~8℃可以保存 1 年。

3 讨论

DIGFA 是近年从固相免疫测定法发展起来的新技术。其特点是以微孔滤膜作为载体用胶体金代替酶标记物,胶体金标记物制备简单、价格低廉,保存期长而稳定,省却底物反应步骤,阳性反应呈红色斑点,肉眼清晰可见,操作简便快速,整个实验过程在数分钟内完成^[10]。与其他免疫方法相比,DIGFA

1.2.2 影像学诊断法 CE 可见各种囊性占位,外囊壁完整,边界清晰,囊肿光滑,内无回声区,也可呈“双层壁”“蜂窝征”“水上浮莲征”及“弧状钙化影”等。AE 共发现 9 项具有特异性诊断意义的图像特征,即晕带征、钙化征、年轮征、内陷征、空腔征、岩洞征、半岛征、小泡征与地图征,只要确认为其中 1 项,即可确诊^[8]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析,两组中确诊者列为阳性,对可疑及误诊者均列为阴性。计数资料采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DIGFA 组与影像学组检出率 影像学组总确诊率与 DIGFA 组总确诊率之间无统计学意义($P>0.05$),但在 CE 患者中影像学组确诊率高于 DIGFA 组确诊率($P<0.01$),而在 AE 中 DIGFA 组确诊率高于影像学组确诊率($P<0.05$),见表 1。DIGFA 对 CE 检出率在小于 5 cm、5~<10 cm 差异无统计学意义($P>0.05$),但与大于或等于 10 cm 相比差异有统计学意义($\chi^2=6.81, P<0.01$),见表 2。

表 1 两种方法确诊率比较[n(%)]

组别	n	确诊总数	CE(n=126)	AE(n=41)
DIGFA 组	167	132(79.04)	94(74.60)	38(92.68)
影像学组	167	144(86.23)	114(90.48)	30(3.17)
χ^2		3.00	11.02	4.37
P		>0.05	<0.01	<0.05

没有内源性酶的干扰和过氧化氢处理对抗原的破坏作用,而且也避免了酶法中致癌物或放射免疫中放射性物质对人体的影响。胶体金能与多种物质如免疫球蛋白、多糖、多肽、酶、SPA 及凝集素等以非共价键的静电吸引结合,而不影响其生物活性^[11]。

本研究用病理学结果验证 DIGFA 和影像学对两型包虫病的定性诊断。影像学总确诊率与 DIGFA 总确诊率之间差异无统计学意义($P>0.05$),但在 CE 中影像学确诊率高于 DIGFA 确诊率($P<0.05$),而在 AE 中 DIGFA 确诊率高于影像学确诊率($P<0.05$)。在 CE 中 DIGFA 4 个抗原测试点均阴性的 28 例,与病灶局限、坏死、钙化、实变等有一定的关系。包虫囊肿的变性、坏死、钙化一直是公认的影响抗体产生应答的原因之一^[12]。单房包虫囊肿外周有一完整的包囊,内部的抗原物质不向外泄漏,保持长期不再对宿主的免疫系统有所刺激,从而表现为假阴性^[13]。抗体反应强度也与包虫囊的所在

部位及囊壁厚度有关,其中有 6 例包虫囊肿位于肝脏深部,与周围组织紧密粘连,囊壁纤维钙化,构成特殊的免疫屏障,使寄生虫与宿主免疫系统隔离。3 例儿童包虫囊肿没有钙化及坏死实变,囊肿体积较大,但 DIGFA 诊断为阴性,这可能与儿童的免疫应答较成年人弱有关。影像学诊断中 12 例 CE 误诊为腹腔脓肿 3 例、肺结核 2 例、膈下脓肿 2 例、细菌性肺脓肿 1 例,卵巢囊肿 1 例、胰腺假性囊肿 1 例,胆结石 1 例,泡型棘球蚴病 1 例。DIGFA 在 AE 4 个抗原测试点均阴性的 3 例中,均为病灶钙化。在影像学诊断中 11 例 AE 误诊为肝癌 3 例,肝脓肿 3 例,肝血管瘤 2 例,腹腔结核 1 例,可疑 2 例。尽管由于包虫病在影像学检查时有其特殊的影像特征,但有相当病例误诊或发生鉴别诊断上的困难,极易与肝癌、肝血管瘤及肝脓肿相混淆^[14]。本实验结果显示,DIGFA 对 AE 的确诊率高,诊断优于影像学诊断。

DIGFA 就 CE 3 种不同大小小囊的检出率而言, $<5\text{ cm}$ 、 $5\sim<10\text{ cm}$ 差异无统计学意义($P>0.05$),但与大于或等于 10 cm 相比差异有统计学意义($P<0.05$),说明 DIGFA 对 CE 检出率随小囊增大而增高。囊虫数量多、体积大,分泌的抗原性物质多,在多个不同部位刺激宿主的免疫系统,免疫应答水平较单发、体积小的患者要高^[12]。DIGFA 对 AE 3 种不同大小小囊的检出率均在 90% 以上,差异均无统计学意义($P>0.05$),说明 DIGFA 对较小小囊的检出率同样高,利于 AE 的早期诊断。在包裹小于 5 cm 时,DIGFA 对 AE 和 CE 的检出率为 91.67% 和 61.11%,差异有统计学意义($P<0.05$);在包裹 $5\sim<10\text{ cm}$ 时,DIGFA 对 AE 和 CE 的检出率为 94.12% 和 71.43%,差异有统计学意义($P<0.05$);DIGFA 对 AE 和 CE 的总确诊率相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。通过本实验说明 DIGFA 对 AE 的检出率明显高于 CE,特别是 DIGFA 对于 AE 早期诊断更加有临床价值。AE 在人体生长方式特殊,囊壁外角皮层很薄且常不完整,囊体与周围组织间无明显界限,故血清中抗体水平较 CE 高,易于检测到特异性抗体^[15]。本实验发现部分 CE 患者亦对 Em2 有一定反应,但其反应程度比对 EgB 抗原反应来说一般要轻一些,可根据抗体反应梯度和显色程度,对 AE 做出鉴别诊断^[16]。同时,在研究过程中还发现,包虫病灶位于不同的脏器时,包虫病 DIGFA 敏感性亦有所不同,对肝包虫的敏感性最高,然后是腹腔、肺、盆腔包虫,而对骨包虫的敏感性则较差(手术证实的脑、眼等其他部位包虫病例在本研究中目前尚未收集到)。因目前除肝包虫以外其他部位的包虫病例较少,各部位间的统计学差异尚待进一步研究。

本研究发现,影像学对 CE 确诊率高,DIGFA 对 AE 确诊率高,特别是 DIGFA 对 AE 的早期诊断具有重要的临床意义。本研究的临床应用和观察肯定了 DIGFA 对两型包虫病诊断和鉴别诊断价值,同时也提示在影像学诊断的基础上,辅以 DIGFA 有益于两型包虫病的确诊。通过本研究还发现,DIGFA 具有敏感性高、特异性及稳定性好,快速,可目测观察,不需特殊仪器设备(如酶标仪等),经济实用等优点,更适用于基层医院及地理位置偏远、交通不便、缺少仪器设备的包虫病高发流行区。但 DIGFA 对两型包虫病的诊断是否因地域虫株、成虫形态学等差别而不同有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Li TY, Qiu JM, Yang W, et al. Echinococcosis in tibetan populations, western Sichuan province, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(12): 1866-1873.
- [2] Craig PS. Epidemiology of human alveolar echinococcosis in China[J]. *Parasitol Int*, 2006, 55, Suppl: S221-225.
- [3] Ito A, Urbani C, Jiamin Q, et al. Control of echinococcosis and cysticercosis: a public health challenge to international cooperation in China[J]. *Acta Trop*, 2003, 86(1): 3-17.
- [4] 田文平, 辛维藩, 张冠新. 泡球蚴病 101 例临床分析[J]. *新医学*, 2008, 39(10): 648-649.
- [5] Bauder B, Auer H, Schilcher F, et al. Experimental investigations on the B and T cell immune response in primary alveolar echinococcosis [J]. *Parasite Immunol*, 1999, 21(8): 409-421.
- [6] Pinto PS, Vaz AJ, Germano PM, et al. Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of *taenia solium* and *taenia crassiceps* cysticerci[J]. *Vet Parasitol*, 2000, 88(1/2): 127-130.
- [7] Yang YR, Craig PS, Ito A, et al. A coelative study of ultrasound with serology in an area in China coendemic for human alveolar and cystic echinococcosis[J]. *Trop Med Int Health*, 2007, 12(5): 637-646.
- [8] 徐明谦, 戈小虎, 孔长青, 等. 肝泡性包虫病的影像学诊断[J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(4): 249-252.
- [9] 王虎, 张静霄, Schantz PM, 等. 1995~2005 年青海省棘球蚴病流行病学调查分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(12): 1129-1134.
- [10] 许欣, 王锋. 免疫胶体金技术及其在临床诊断上的研究进展[J]. *江西农业学报*, 2009, 21(6): 125-128.
- [11] 朱文钢, 孔繁德, 林祥梅, 等. 免疫胶体金技术的应用及展望[J]. *生物技术通报*, 2010(4): 81-87.
- [12] 陈新华, 温浩, 张朝霞, 等. 包虫病免疫误诊的原因分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2002, 20(2): 121-122.
- [13] 黄菱, 李正直, 李燕兵, 等. 两种特异抗体检测与 B 超诊断在包虫病流行病学调查中的应用[J]. *宁夏医科大学学报*, 2012, 34(6): 557-560, 568.
- [14] 宋茜, 唐桂波. 泡型肝包虫病的超声诊断再探讨——附 100 例分析[J]. *高原医学杂志*, 2007, 17(4): 21-24.
- [15] Charbonnet P, Bühler L, Sagnak E, et al. Long-term followup of patients with alveolar echinococcosis[J]. *Ann Chir*, 2004, 129(6/7): 337-342.
- [16] 张萍, 邓勇, 王海久, 等. 组合抗原金标渗滤快速诊断法对两型包虫病的诊断价值与评价[J]. *临床外科杂志*, 2011, 19(12): 832-834.