

· 综述 · 抗隐孢子虫超免疫牛初乳研究进展

王建平¹ 综述 徐臻荣² 付德润² 审校

1 新疆兵团卫生防疫站 乌鲁木齐 830002

2 新疆医科大学公共卫生学院 乌鲁木齐 830054

微小隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*, 以下称隐孢子虫) 广泛寄生于人和动物体内, 主要在宿主消化道上皮细胞表面完成生活史。自 1976 年 Nime 和 Meisel 首次报道 2 例人体隐孢子虫病 (cryptosporidiosis) 以来, 世界各地报道的病例数迅速增加。本病以腹泻为主要特征。免疫功能正常者患病后, 腹泻是自限性的。免疫缺陷患者, 尤其是艾滋病患者伴发隐孢子虫感染时, 常引起难治的持续性腹泻, 导致营养不良, 极度消瘦, 甚至死亡。至 80 年代中期, 已有数十种药物用于隐孢子虫病的治疗, 但均未取得满意效果。于是, 人们开始探索用含有抗隐孢子虫抗体的超免疫牛初乳 (hyperimmune bovine colostrum, HBC) 治疗隐孢子虫病, 同时, 与之相关的动物试验及抗原识别等研究也随之开展起来。HBC 是用纯化的隐孢子虫卵囊 (oocyst) 免疫怀孕母牛后产生的含有特异性抗隐孢子虫抗体的初乳。本文就 HBC 在隐孢子虫抗原识别、定位, HBC 的免疫保护作用及其临床应用方面的研究进展综述如下。

HBC 抗体用于隐孢子虫抗原定位及识别

1 抗原定位

Doyle 等^[1]用放射性碘标记法定位隐孢子虫孢子抗原。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 试验结果显示, 放射性碘标记的孢子表面蛋白与保护性抗隐孢子虫 HBC 抗体反应, 出现多条免疫沉淀带。SDS 和 Triton X-100 溶解的孢子膜在凝胶电泳中形成免疫沉淀的蛋白带数量不同, Triton X-100 溶解的膜蛋白与 HBC 抗体形成 13 条免疫沉淀带, SDS 提取的膜蛋白为 19 条; 而三氯乙酸处理的孢子胞质部分不被 HBC 抗体所识别, 提示隐孢子虫孢子抗原位于膜表面。Petersen 等^[2]用 HBC 免疫球蛋白首次检测出一种分子量大于 900 000 的隐孢子虫抗原 (GP900)。经免疫荧光试验发现, 抗 GP900 单克隆抗体 (McAb) 10C6, TB3, E6 以及亲和法提取的 HBC 抗体与丙酮固定的孢子发生反应, 而与未固定的孢子则不出现反应, 并且在孢子整个前部观察到

荧光, 证实大多数 GP900 位于细胞质内, 并广泛分布于孢子的前部。在此基础上, 再通过去糖基试验、免疫印迹、放射性碘标记和 DNA 基因分析, 揭示 GP900 是糖蛋白, 溶于 Triton X-100, 去糖基后的蛋白质部分分子量小于 190 000。GP900 是由单拷贝基因编码的, 编码 GP900 的基因位于隐孢子虫最大的染色体上, 该染色体长约 1 400 kb。Fayer 等^[3]采用胶体金标记隐孢子虫抗原并结合 HBC 抗体的超薄切片, 在电镜下观察抗原分布情况。结果显示, 裂殖体、大配子体表面及深部均有很高的金标记密度, 而发育的小配子体仅在表面有较高的标记密度。说明除小配子体抗原可能较严格分布于膜上外, 其他各发育阶段的隐孢子虫抗原不仅存在于膜上, 也分布于胞质中。

2 抗原识别

Fayer 等^[3]采用免疫金技术用纯化的 HBC 免疫球蛋白同种型识别隐孢子虫抗原, 主要步骤为: 用 HBC 乳清多价抗体与感染隐孢子虫的小鼠回肠超薄切片共孵, 再与兔抗牛 IgA、IgM、IgG1 和 IgG2 第 2 抗体反应, 最后用羊抗兔胶体金结合物电镜观察免疫染色标本。结果显示, 暴露于各种兔抗牛免疫球蛋白第 2 抗体的裂殖体、裂殖子 (merozoite)、雄配子体、小配子和大配子体均标记上金颗粒, 而未加第 2 抗体的对照样本未能标记金颗粒。这一研究结果表明, HBC 乳清中 IgA、IgM、IgG1 和 IgG2 同种型抗体均识别了无性和有性繁殖阶段的隐孢子虫抗原, 并且在稀释度很高的情况下显示出较高的金标记密度。Fayer 与 Tilley 等合作用 HBC 乳清免疫球蛋白识别隐孢子虫的卵囊和孢子抗原并测定出这些抗原的分子量^[4]。免疫印迹中 IgA、IgG1、IgG2 和 IgM 等 4 种同种型免疫球蛋白均识别了多种隐孢子虫抗原, 但 IgA 和 IgG1 反应较强, 识别的带数较 IgG2 和 IgM 多。4 种免疫球蛋白识别卵囊抗原区带的数目分别为 IgA 36 条, IgG1 30 条, IgG2 22 条及 IgM 21 条; 识别孢子抗原区带的数目为 IgA 27 条, IgG1 30 条, IgG2 18 条及 IgM 18 条。HBC 免疫球蛋白只是与完整的卵囊抗原反应时才出现几条新的高分子量蛋

白带 (211、223、227、235 和 240 kDa), 提示孢子子中不含这些高分子量蛋白质。唯有 IgA 识别了分子量为 9- 10 kDa 的区带, 该蛋白分子的免疫学特性尚不明确。其中分子量为 14.5- 16.5 kDa 的蛋白带可能相当于 Fayer 后来另一项研究中出现的 15 kDa 的区带^[5]。

由于试验方法上的差异, 超免疫制剂的不同以及其他因素的影响, 不同作者用 HBC 识别隐孢子虫抗原的种类和区带范围不尽相同。Flanigan 等^[6]测得与 HBC 乳清反应的孢子子/卵囊抗原分子量在 20- 180 kDa 之间, 分子量为 110 和 140 kDa 的两种抗原 (区带) 特别明显。Riggs 等^[7]采用免疫印迹技术用 HBC 抗体识别裂殖体、孢子子和卵囊抗原, 区带数分别为 27、33 和 29 条。有趣的是超免疫抗体识别了孢子子分子量为 29、30、31.5、39.4、47 和 116 kDa 的抗原, 而经过超声处理的含有孢子子的卵囊则无这些抗原, 说明这些抗原可能是在脱囊过程中产生的, 此时, 孢子子处于代谢旺盛期。如是, 则这些抗原可能与孢子子的感染性有关, 值得进一步研究。Jenkins 等^[8]制备出编码隐孢子虫孢子子中 15 和 60 kDa 蛋白质抗原决定簇的 cDNA 并在大肠杆菌菌体内表达。重组抗原简称为 rCP15/60, 是一种分子量为 40 kDa 的融合蛋白。采用免疫印迹法用 HBC 探查 rCP15/60, 并以普通牛初乳 (normal bovine colostrum, NBC) 作对照, 观察到 HBC 明显识别了 rCP15/60, 而 NBC 识别带非常微弱。这种重组抗原可能成为有应用潜力的功能性抗原, 比如用 rCP15/60 免疫奶牛以产生抗隐孢子虫 HBC, 再将其用于人体被动免疫、预防和治疗隐孢子虫病。

HBC 的保护性免疫作用

1 体外试验

Flanigan 等^[6]在隐孢子虫感染粘性肠道上皮细胞 (HT29.74) 的体外试验中, 发现 HBC 及其乳清处理的卵囊感染 HT29.74 细胞的能力明显减弱, 感染率分别降低 82% 和 69%。Doyle 等进行的体外试验结果显示, 隐孢子虫经 HBC IgG 处理后, 入侵马-达氏犬肾细胞 (Madin-Darby canine kidney cell, MDCK) 系的能力显著降低。随着 IgG 浓度 (100- 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的升高, MDCK 细胞感染隐孢子虫的数量呈下降趋势, 但是当 IgG 浓度小于 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 对隐孢子虫的抑制作用非常弱, 与对照组比较差异无显著性意义。Perrym an 等^[9]的试验

(乙酰乙酸荧光素反应) 表明隐孢子虫孢子子与 HBC 乳清共孵后, 生活力下降 40%。Riggs 等^[7]在倒置相差显微镜下观察孢子子与 HBC 共孵后的形态变化, 发现共孵 8 min 时孢子子膜表面即有膜鞘形成, 随后逐渐增大, 最终从孢子子上脱落; 膜鞘位于孢子子后部, 伴有孢子子的膨胀肿大。免疫电镜观察, 在孢子子表面、膜鞘及脱落的膜物质中存在特异性结合的抗隐孢子虫抗体。孢子子膜鞘的形成在形态上类似于抗体介导的 CSP 反应。孢子子与 HBC 共孵后大多数均独立存在。因此, 孢子子被中和的原因不是凝集作用^[7,9], 可能与 CSP 样反应有关。

2 动物试验

抗隐孢子虫 HBC 免疫保护作用的动物试验研究以 Fayer 等^[10]的报道为早。结果显示, 经口饲入 HBC 乳清的 BALB/c 小鼠感染隐孢子虫的数量显著少于饲入 NBC 乳清的小鼠和对照小鼠。孢子子与 HBC 乳清孵育后, 则完全失去了感染小鼠的能力。喂饲 HBC 的犊牛, 感染隐孢子虫卵囊后腹泻 0- 4 d (\bar{X} = 2.3 d), 卵囊排出 4- 9 d (\bar{X} = 6.2 d); 而喂饲 NBC 的犊牛感染隐孢子虫卵囊后腹泻 4- 6 d (\bar{X} = 5.0 d), 卵囊排出 7- 11 d (\bar{X} = 8.5 d)。前者腹泻天数和排出卵囊天数显著少于后者^[11]。作者认为上述研究中使用的是全初乳或全乳清, 其结果只是提示 HBC 及其乳清中存在抑制隐孢子虫感染的因子, 但这些因子是免疫球蛋白还是其他生物活性物质尚未确定。Fayer 等^[12]将新生 BALB/c 小鼠随机分为 6 组, 经口饲入卵囊液, 24 h 后各组小鼠经口给予乳清、IgG1、IgG2、IgM、IgA 和 HBSS 液, 于感染后 26、42、48 及 66 h, 通过直肠给每只小鼠注射同样的受试液, 感染 72 h 后处死, 取小肠切成小段, 固定, 染色, 电镜观察小肠纵切面。结果 HBSS 液处理的对照组小鼠回肠、盲肠和结肠 3 个部位均严重受到感染, 平均累积感染分^[13]为 7.5, 相比之下, 乳清、IgG1、IgG2、IgM 及 IgA 各组平均累积感染分分别为 2.00、1.43、4.13、3.67 和 1.38, 显著低于对照组, 而且 IgG1 和 IgA 处理组小鼠受感染的严重程度比 IgG2 和 IgM 组轻, 本结果与免疫印迹试验结果一致^[4], 表明纯化的 4 种免疫球蛋白均具有抗隐孢子虫活性, 但研究未涉及乳清中是否存在其他抗隐孢子虫活性因子问题。

在 Fayer 等研究基础上, 不少学者用不同方法和试验动物对 HBC 的免疫保护作用作了进一步研究。Perrym an 在中和隐孢子虫的动力学研究中发现

孢子与 HBC 孵育 10 min 后, 对 BALB/c 小鼠的感染力下降 90%^[9]。Naciri 等^[14]给经口感染隐孢子虫卵囊的羔羊喂饲 HBC, 观察期内未见其腹泻, 卵囊排出量少。Riggs 等^[7]和 Tzipori 等^[15]分别建立了重度联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠和免疫缺陷小鼠隐孢子虫感染模型, 试验证明 HBC 具有一定的免疫保护效果。Harp 等^[16]用含抗隐孢子虫抗体的混合牛初乳治疗犊牛隐孢子虫感染疗效欠佳。Tzipori 等还建立了小猪隐孢子虫感染模型, 用高剂量 HBC 免疫球蛋白治疗后, 除卵囊排出量明显减少外, 腹泻以及肠粘膜受感染和损伤的严重程度与未经治疗的对照组感染小鼠无显著性差异。Hoskins 等^[17]用寄生于豚鼠体内的隐孢子虫 (*Cryptosporidium wrairi*) 卵囊与微小隐孢子虫卵囊免疫奶牛产生的 HBC 共孵后, 经口感染豚鼠, 卵囊排出量显著少于对照组。 *Cryptosporidium wrairi* 卵囊未与 HBC 共孵, 直接经口感染豚鼠后再喂饲 HBC, 卵囊排出量与对照组无显著性差异。作者认为后者结果反映出 HBC 对已发生的隐孢子虫感染无效。

3 HBC 用于治疗免疫缺陷患者并发的隐孢子虫病

Tzipori 等^[18]用 HBC 治疗一位并发隐孢子虫病的先天性低丙种球蛋白血症儿童。通过鼻胃饲管, 每天给予 200 ml HBC, 共 12 d。5 d 后水样腹泻停止, 9 d 后粪便中卵囊完全消失。出院 6 个月后, 患者部分胆道梗阻, 从胆道吸出物中检出隐孢子虫。之后又用 HBC 治疗 2 例患隐孢子虫病的免疫抑制患者, 其中 1 例艾滋病患者治疗后腹泻停止, 但仍不断排出卵囊, 似乎 HBC 只能使隐孢子虫患者的症状得到缓解, 而不能使其治愈^[19-20]。Nord 等^[21]进行了 HBC 治疗艾滋病患者并发隐孢子虫腹泻的 5 例患者随机分成两组, HBC 治疗组 3 例中有 2 例腹泻次数、腹泻量以及卵囊排出量较治疗前减少, NBC 组 2 例腹泻次数及腹泻量较治疗前虽有减少, 但卵囊排出量变化不大。Nord 等^[21]认为, 该研究的缺点在于病例数少, 进入研究时两组病例卵囊排出量和疾病严重程度等重要配比变量不匹配。

Ungar 等^[22]报道, 一位并发隐孢子虫病的艾滋病患者用灭滴灵、四环素、次水杨酸铋、螺旋霉素、H₂-阻断药、非类固醇抗炎药和抗动力剂治疗后, 病情无好转, 每天腹泻 20 次 (6-12 L/d)。通过鼻胃饲管连续饲入 HBC 60 h (20 cm³/h), 治疗开始后

第 1 d, 大便量减至 2 L, 治疗停止 2 d 后, 大便完全成形。出院 3 个月无腹泻发生, 粪检卵囊阴性, 但 3 个月后感染复发。作者推测, HBC 是通过封闭隐孢子虫与肠道上皮细胞的结合点干扰其在细胞外的自身循环感染, 认为 HBC 将成为由于 CD⁺ 细胞活性减弱而缺乏的重要物质的替代物。

Shield 等^[23]用一种市售 HBC 浓缩制剂——乳汁素 R 成功治疗一位患隐孢子虫病的 4 岁男童 (艾滋病患者)。每天 50 g 乳汁素 R 溶于 500 ml 无菌注射用水, 通过鼻胃饲管 12 h 内给毕, 共 2 wk。治疗前, 患者空肠活组织检查, 见腺管和绒毛萎缩, 粘膜和腺管表面有隐孢子虫粘附。治疗 2 wk 后, 绒毛结构显著恢复, 隐孢子虫消失。治疗结束后 6 个月内, 患者大便量及其粘稠度均正常, 多次粪检隐孢子虫均阴性。不幸的是患者不久死于脑病, 尸检未见隐孢子虫。作者认为乳汁素 R 彻底清除了患者体内的隐孢子虫。Heaton^[24]认为, 这一结论是作者推测出来的, 如患者还活着, 有可能在将来某一时点发生再感染。

Saxon 和 Weinstein^[25]用含有抗隐孢子虫抗体的牛初乳治疗 3 位免疫抑制患者 (其中, 2 例为艾滋病患者), 治疗 3-5 d 后, 3 例患者腹泻次数及卵囊排出量均未减少, 不久 2 例死亡, 1 例仍持续腹泻。据此, 作者推测隐孢子虫细胞内自身感染使初乳中抗体在肠道中难以发挥作用。

可见, 上述报道结果不同, 结论也不同, 且多为个案性质。Heaton 认为, 连续不断的单个病例报道无法对 HBC 的有效性等问题作客观评价^[24]。对 HBC 治疗艾滋病患者并发隐孢子虫病的疗效进行大规模的临床对照试验, 很有必要。研究中应涉及非抗体因子等问题。HBC 的大批量生产和选择足够的病例是影响这一试验能否进行的两个关键因素。总之, HBC 为包括艾滋病患者在内的免疫缺陷患者并发的隐孢子虫病的治疗提供了一种有益的手段^[20]。

参 考 文 献

- 1 Doyle PS, Crabb J, Petersen C. Anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies inhibit infectivity *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun* 1993; 61: 4079
- 2 Petersen C, Gut J, Doyle PS, et al. Characterization of a > 900 000 Mr *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostrum immunoglobulin. *Infect Immun* 1992; 60: 5132
- 3 Fayer R, Barta JR, Guidry AJ, et al. Immunogold labeling of stages of *Cryptosporidium parvum* recognized by immunoglobulins in hyperimmune bovine colostrum. *J Parasitol* 1991; 77: 487
- 4 Tilley M, Fayer R, Guidry A, et al. *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) oocyst and sporozoite antigen recognized by bovine colostrum antibodies. *Infect Immun* 1990; 5

2966

5 Fayer R, Tilley M, Upton SJ, et al Production and preparation of hyperimmune bovine colostrum for passive immunotherapy of cryptosporidiosis J Protozool 1991; 38 38S

6 Flanigan T, Marshall R, Redman D, et al In vitro screening of therapeutic agents against *Cryptosporidium* hyperimmune cow colostrum is highly inhibitory. J Protozool 1991; 38 225S

7 Riggs MW, Cama VA, Leary HL Jr, et al Bovine antibody against *Cryptosporidium parvum* elicits a circumsporozoite precipitate-like reaction and has immunotherapeutic effect against persistent cryptosporidiosis in SCID mice Infect Immun 1994; 62 1927

8 Jenkins MC, Fayer R, Tilley M, et al Cloning and expression of a cDNA encoding epitopes shared by 15- and 60-kilodalton proteins of *Cryptosporidium parvum* sporozoites Infect Immun 1993; 61 2377

9 Perryman LE, Riggs MW, Mason PH, et al Kinetics of *Cryptosporidium parvum* sporozoite neutralization by monoclonal antibodies immune bovine serum, and immune bovine colostrum. Infect Immun 1990; 55 2081

10 Fayer R, Perryman LE, Riggs MW. Hyperimmune bovine colostrum neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocyst challenge J Parasitol 1989; 751 151

11 Fayer R, Andrews C, Ungar BL, et al Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves J Parasitol 1989; 753 393

12 Fayer R, Guidry A, Blagburn BL. Immunotherapeutic efficacy of bovine colostrum immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice Infect Immun 1990; 58 2962

13 Riggs MW, Perryman LE. Infectivity and neutralization of *Cryptosporidium parvum* sporozoites Infect Immun 1987; 5 2081

14 Naciri M, Mancassola R, Reperant JM, et al Treatment of experimental ovine cryptosporidiosis with ovine or bovine hyperimmune colostrum. Vet Parasitol 1994; 53 173

15 Tzipori S, Rand W, Griffiths J, et al Evaluation of an animal model system for cryptosporidiosis, therapeutic efficacy of paromomycin and hyperimmune bovine colostrum-immunoglobulin Clin Diag Lab Immunol 1994; 1 450

16 Harp JA, Woodmansee DB, Moon HW. Effects of colostrum antibody on susceptibility of calves to *Cryptosporidium parvum* infection Am J Vet Res 1989; 12 2117

17 Hoskins D, Chrisp CE, Suckow MA, et al Effect of hyperimmune bovine colostrum raised against *Cryptosporidium parvum* on infection of guinea pigs by *Cryptosporidium wrairi* J Protozool 1991; 38 185s

18 Tzipori S, Robertson D, Chapman C. Remission of diarrhea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. Br J Med 1986; 293 1276

19 Tzipori S, Robertson D, Cooper DA, et al Chronic cryptosporidial diarrhea and hyperimmune cow colostrum. Lancet 1987; ii 244 (Letter)

20 Ritchie DJ, Becker ES Update on management of intestinal cryptosporidiosis in AIDS Ann Pharmacother 1994; 28 767

21 Nord J, Ma P, Djohn D, et al Treatment with bovine hyperimmune colostrum of cryptosporidial diarrhea in AIDS patients AIDS 1990; 4 581

22 Ungar BL, Ward DJ, Fayer R, et al Cessation of *Cryptosporidium*-associated diarrhea in an acquired immunodeficiency syndrome patient after treatment with hyperimmune bovine colostrum. Gastroenterology 1990; 98 486

23 Shield J, Melville C, Novelli V, et al Bovine colostrum immunoglobulin concentrate for cryptosporidiosis in AIDS Arch Dis Child 1993; 69 451

24 Heaton P. Bovine colostrum immunoglobulin concentrate for cryptosporidiosis in AIDS Arch Dis Child (letter comment) 1994; 70 356

25 Saxon A, Weinstein W. Oral administration of bovine colostrum anti-cryptosporidia antibody fails to alter the course of human cryptosporidiosis J Parasitol 1987; 73 413

1998年12月9日修回
1998年6月1日收稿 1998年12月9日修回
(编辑: 富秀兰)

4 例小儿旋毛虫病误诊原因分析

河南开封医专附属淮河医院儿科 开封 475000

张 岩

近期有4例小儿旋毛虫病患儿入院时按急性黄疸性肝炎收治, 报告如下:

一般资料

4例患儿, 男性3例, 女性1例, 年龄6-9岁。发热3例, 纳差、乏力伴腹泻4例, 呕吐2例, 巩膜及皮肤轻、中度黄染4例, 四肢肌肉疼痛4例, 腹泻3例, 咳嗽3例, 4例肝肋下均可及1-2cm, 压痛及叩击痛阳性。肝功能谷丙转氨酶96-170 μmol/L, 总胆红素20-30 μmol/L, 白细胞6.7-7.2 × 10⁹/L, 中性粒细胞0.56-0.70, 酸性粒细胞0.08-0.28。4例患儿在我院及外院开始均诊断为黄疸性肝炎给予保肝、退黄等治疗, 黄疸稍好转, 其余症状无明显减轻, 酸性粒细胞仍高。进一步检查抗HAV-IgM、HBsAg及丙肝抗体均阴性。旋毛虫抗体检查, 4例均为阳性, 确诊为小儿旋毛虫病。

治疗结果

4例确诊后均给予阿苯达唑辅以保肝、退黄等治疗, 体温于3-5d转为正常, 肌肉疼痛7d内消失, 半月后复查肝

功能及总胆红素均正常, 痊愈出院。

讨论

猪是旋毛虫病的主要传染源, 人生食或进食未煮熟的含有幼虫囊包的猪肉而患病^[1]。幼虫常寄生于胃肠道、肺、肌肉、心肌或神经系统, 而寄生于胆道者较少见。这也是本文4例最初均误诊为黄疸性肝炎的原因之一, 加上病史不详而误诊。4例患儿均来自同乡, 发病情况类似, 我们考虑可能与宿主带虫免疫性疾病有关, 遂进行旋毛虫抗体检查后方确诊。我们体会, 遇发热及酸性粒细胞升高者应多方寻找病因, 在排除变态反应性疾病后, 应考虑感染寄生虫的可能性而进行特异性抗体检查, 以免影响患者的治疗与预后。

参 考 文 献

1 诸福棠, 吴瑞萍, 胡亚美主编 实用儿科学(上册). 第4版 北京: 人民卫生出版社, 1991 1061-1063
1999年1月6日收稿 1999年4月6日修回
(编辑: 富秀兰)