

检测血清和脑脊液中囊尾蚴循环抗原 诊断脑囊虫病的研究

蔺心敬 李桂苹 霍海英 徐风全
李庆山 赵中平
指导者 葛凌云

山东省寄生虫病防治研究所 济宁 272033

提要 目的: 用抗血清检测脑囊虫病患者的血清和脑脊液(CSF)中囊尾蚴循环抗原(CA_g)诊断脑囊虫病。方法: 用 SDS-PAGE 提纯的蛋白质分子量为 64 kDa、53 kDa、32 kDa~ 30 kDa 的囊尾蚴抗原分别免疫家兔, 制备相应的抗血清, 以双夹心 ELISA 检测患者血清和 CSF 中 CA_g。结果: 抗 53 kDa 抗原抗血清对 32 例脑囊虫病活动型患者血清和 CSF 中 CA_g 的检出率分别为 93.8% 和 91.7%, 16 例脑囊虫病非活动型患者仅 1 例 CSF CA_g 阳性。CA_g 检出率明显高于用抗 64 kDa、32 kDa~ 30 kDa 囊尾蚴抗原抗血清检测的结果 ($P < 0.05$)。结论: 抗 53 kDa 囊尾蚴抗原抗血清检测活动型脑囊虫病患者的血清和 CSF 中的 CA_g 敏感性较高, 特异性较强, 可用于活动型脑囊虫病的诊断和疗效考核。

关键词 脑囊虫病 循环抗原 SDS-PAGE ELISA

Groggle 等报道^[1], 猪囊尾蚴中分子量为 64 kDa、53 kDa、32 kDa~ 30 kDa 的囊尾蚴抗原存在于所有囊虫病患者的血清中, 不被对照血清识别, 是诊断脑囊虫病的适宜抗原。参照 Groggle 等的方法, 我们从猪囊尾蚴中提取上述 3 种囊尾蚴抗原免疫家兔, 制备相应抗血清, 对脑囊虫病患者的血清和 CSF 中的 CA_g 进行了检测。

材料与方 法

脑囊虫病患者的血清和 CSF 由山东省囊虫病治疗中心提供, 根据脑 CT 显示图象分为脑囊虫活动型(低密度囊状病灶伴灶性脑炎或脑水肿)和非活动型(病灶点状钙化提示囊尾蚴已死亡)。其它寄生虫病患者血清采自粪检钩虫、蛔虫虫卵阳性者, 对照血清采自我所粪检阴性志愿者, 非囊虫病患者 CSF 由济宁市第一人民医院提供。

抗原制备

粗抗原按照 Groggle 等方法^[1]制备。取上清液用双光束光谱扫描仪测蛋白质含量为 11.05 mg/ml, 分装, -40℃ 低温保存。

纯化囊尾蚴抗原制备参照 Hanaoka 等方法^[2]。将粗抗原进行 SDS-PAGE 电泳, 每次电泳所加样本量为 200 μl 上清液及等量样本处理液, 浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 12%, 两者电压分别为 100 V 和 200 V, 电泳 3 h, 溴酚蓝近凝胶底部约 0.5 cm 处, 终止电泳。切下蛋白质分子量为 64 kDa、53 kDa、32 kDa~ 30 kDa 处的凝胶作为免疫用抗原。

免疫程序

采用多点免疫法。先在家兔两后脚掌各注射福氏完全佐剂 0.5 ml, 进行基础免疫, 1 wk 后, 待 μ 窝淋巴结肿大, 再进行抗原免疫。免疫前, 将含 64 kDa、53 kDa、32 kDa~ 30 kDa 抗原的凝胶加入少量无菌生理盐水充分研匀, 再加入等量福氏完全佐剂, 继续研磨至乳化进行多点免疫(双侧 μ 窝淋巴结、颈背部多点皮内注射)。每兔每次注射两板凝胶所提抗原乳化液(每板凝胶含粗抗原 200 μl), 每 wk 免疫 1 次, 共 4 次。于第 4 次加强免疫后, 心脏抽血, 分离抗血清, 分装, -40℃ 低温保存。

样本检测

在检测前, 将受检血清 1:20 稀释, CSF 1:5 稀释后, 按李莹等方法^[3], 加热 75℃ 2 min 预处理。

用 ELISA 法滴定抗血清效价、工作滴度, 用双抗夹心-ELISA 检测受试者血清和 CSF。

判断标准

以受试样本的 OD 值大于或等于阴性对照平均 OD 值的 1.5 倍为阳性。

结果与讨论

1 血清效价的滴定结果

用 ELISA 法测定 3 种抗血清效价。抗 64 kDa 抗原抗血清(简称 64 kDa A S)效价为 1:6400, 抗 53 kDa 与 32 kDa~ 30 kDa 抗原抗血清(53 kDa A S 与 32 kDa~ 30 kDa A S)的效价均为 1:12800。三者工作滴度分别为 1:3200、1:6400 和 1:6400。

2 血清及脑脊液检查结果

用 3 种抗血清分别检测活动型脑囊虫病患者、

非活动型脑囊虫病患者和对照组人群的血清及其脑脊液的结果见表 1。

表 1 3 种抗血清检测脑囊虫病患者血清和脑脊液中 CA_g

Table 1 Results of detection of CA_g in serum and CSF from cerebral cysticercosis patients using three antisera

组别 Group	阳性率(阳性例数/检测例数) Positive rate(N.o. cases positive/N.o. cases detected)%					
	血 清 Serum			脑脊液 CSF		
	64 kDa	53 kDa	32 kDa~ 30 kDa	64 kDa	53 kDa	32 kDa~ 30 kDa
活动型脑囊虫病患者 Cases with active cerebral cysticercosis	75.0 (24/32)	93.8 (30/32)	56.2 (18/32)	75.0 (18/24)	91.7 (22/24)	62.5 (15/24)
非活动型脑囊虫病患者 Cases with inactive cerebral cysticercosis	18.8 (3/16)	0 (0/16)	43.8 (7/16)	25.0 (4/16)	6.2 (1/16)	43.8 (7/16)
对照组 Control	12.5 (2/16)	0 (0/16)	18.8 (3/16)	6.2 (1/16)	0 (0/16)	12.5 (2/16)

16 例钩虫感染者血清除对 53 kDa A S 全部阴性外, 64 kDa A S 及 32 kDa~ 30 kDa A S 分别有 1 例(6.7%)及 2 例(13.3%)阳性; 17 例蛔虫感染者的血清对 64 kDa A S、53 kDa A S 及 32 kDa~ 30 kDa A S 的阳性率依次为 17.8%、5.9% 和 11.8%。

上述结果表明 53 kDa A S 的敏感性与特异性在上述 3 种抗血清中均较高。

血清和 CSF 中的 CA_g 检测, 对囊虫病的诊断、疗效评价和流行病学调查均有重要意义。我们用 SDS-PAGE 提纯的蛋白分子量为 64 kDa、53 kDa 和 32 kDa~ 30 kDa 的囊尾蚴抗原免疫家兔, 制备相应的抗血清, 以检测血清和 CSF 中的 CA_g。表明 53 kDa A S 对脑囊虫病活动型患者的血清和 CSF 的 CA_g 检出率明显较 64 kDa A S 和 32 kDa~ 30 kDa A S 为高, 而对非活动型患者的 CA_g 检出率则较低, 假阳性反应也低。

一般认为, 用囊尾蚴制备的抗血清对 CA_g 的检出率较低, 交叉反应率较高。Estrada^[4]用兔抗血清, 以 ELISA 检测脑囊虫病患者 CSF, CA_g 阳性率为 68.9%。雷均平等^[5]制备的抗囊虫抗原抗血清, 与包虫病患者和并殖吸虫病患者血清交叉反应率分别为 40% 和 10%。我们认为, 抗血清对 CA_g 检出率和交叉反应率的高低, 可能与制备抗血清所用抗原的纯度和靶抗原组分有关。Waterson 报道^[6], 若用粗抗原免疫实验动物, 会因靶抗原组分太低及抗原间的相互竞争, 导致特异性抗体效价降低。我们以 SDS-PAGE 纯化囊尾蚴蛋白免疫家兔, 提高了特异性, 显示出抗 53 kDa 抗原的抗体对宿主体液内的 CA_g 有

较大的亲和力。Vaz 等^[7]曾比较猪囊尾蚴的囊壁和囊液抗原特性, 发现囊壁多肽能为患者 CSF 识别的达 95.6%, 其中分子量为 98 kDa~ 92 kDa 组分最高(82.6%), 52 kDa~ 50 kDa 组分次之(65.2%), 32 kDa~ 30 kDa 最低(39.1%)。本研究 53 kDa A S 对脑囊虫病活动型患者血清和 CSF 的 CA_g 检出率分别为 93.8% 和 91.7%, 而对非活动型患者, 除 1 例 CSF 呈阳性反应外, 其余均为阴性。提示 53 kDa A S 可用于脑囊虫病现症病人的诊断且可能用于疗效考核。53 kDa A S 对脑囊虫病活动型患者血清和 CSF 中 CA_g 检出率间无显著性差异($P > 0.05$)。因此, 以检测血清 CA_g 取代 CSF, 更易为患者接受。

参 考 文 献

- 1 Grogan M, Estrada JJ, Macdonald G, et al. Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis. *J Parasitol* 1985; 17: 433~442
- 2 Hanaoka F, Shaw JL, Mueller GC. Recovery of functional proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal Biochem* 1979; 99: 170~174
- 3 李莹, 赵旭东, 郑合明, 等. 提高绦虫病人循环抗原检出率及临床价值的探讨. *中国寄生虫病防治杂志* 1993; 6: 103
- 4 Estrada JJ. Immunochemical detection of antigen of larval *Taenia solium* and antilarval antibody in the CSF of patients with neurocysticercosis. *J Neurol* 1985; 71: 39~48
- 5 雷均平, 张永浩, 张敏如, 等. 采用多克隆直接 ELISA 检测囊虫病患者血清和脑脊液中的循环抗原. *西安医科大学学报* 1995; 16: 279~281
- 6 Waterson RH. Antigen Competition: A Paradox. *Science* 1970; 170: 1108~1110
- 7 Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RMF, et al. Immunoblot with CSF from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57: 354~357

1998 年 8 月 24 日收稿 1999 年 1 月 5 日修回
(编辑 庄兆农)