

检测日本血吸虫感染兔尿中循环抗原的研究*

薛纯良 娄文娴 吴琛耘 张恩英 谢艳辉

上海第二医科大学寄生虫学教研室 上海 200025

提要 目的: 建立检测尿液中血吸虫循环抗原的方法。方法: 从感染家兔尿中提取血吸虫循环抗原, 并用所提取的抗原制备和筛选抗该抗原的特异性单克隆抗体。用单抗二抗一步法酶联免疫试验检测感染家兔中的日本血吸虫循环抗原。结果: 22 只家兔感染前尿液中的循环抗原全部阴性; 感染后尿液中循环抗原的阳性率与感染度及感染时间有关。感染 25 条尾蚴的家兔在感染后 3 wk 未能测到循环抗原, 而感染 200 条尾蚴的家兔在感染 3 wk 和 6 wk 的尿循环抗原阳性率分别为 40% 和 100%。结论: 用感染兔尿中提取的循环抗原所制备的单抗作为探针, 可用于检测感染动物尿液中血吸虫循环抗原。

关键词 日本血吸虫 尿循环抗原检测 单抗二抗一步法酶联免疫试验

检测血中的日本血吸虫循环抗原 (CSA), 用于血吸虫病诊断和疗效考核的研究, 国内已有不少报道。而测定尿液中的 CSA 可不抽血, 无损伤性, 受到不少学者的重视。自建立克隆技术后, 国外曾运用尿液中趋阴级循环抗原 (CCA) 检测对曼氏血吸虫流行区进行流行病学研究^[1], 国内陆萍等^[2]用荷兰莱登大学提供的两株曼氏血吸虫杂交瘤分泌的特异单抗为探针, 检测日本血吸虫病患者尿液中的 CCA, 表明有属的特异性, 但检出率较低。为此, 我们设想, 用感染日本血吸虫的兔尿中的抗原免疫小鼠, 制备抗兔尿液中血吸虫循环抗原的特异单抗, 并以该单抗为探针检测感染日本血吸虫尾蚴兔尿中的循环抗原, 以期获得针对性更直接更特异的结果。

材料与方 法

1 单克隆抗体制备

按常规方法进行细胞融合, 筛选阳性克隆, 几次亚克隆后, 将阳性克隆扩大培养, 诱生腹水。所获阳性单克隆抗体进行特性鉴定。

2 单克隆抗体特性分析

2.1 琼脂双向扩散试验用于分析单抗与有关抗原的关系。所用抗原如下: 血吸虫成虫 TCA 可溶性抗原 (AW-TCA), 血吸虫虫卵 TCA 可溶性抗原 (SEA-TCA), 并殖吸虫可溶性抗原 (PAA), 华支睾吸虫可溶性抗原 (CSAA), 感染血吸虫兔尿循环抗原 (Ru-CA g)。

2.2 ELISA 测定单抗滴度。分别用 Ru-CA g、AW-TCA 和 SEA-TCA 包被反应板, 羊抗鼠 IgG-HRP 为第二抗体。

2.3 单克隆抗体免疫球蛋白类别鉴定。阳性克隆细胞培养液浓缩 20 倍, 羊抗鼠 IgG1、IgG2、IgG3、IgM、IgA (系 Sigma 公司产品) 用琼脂糖双扩散法进行类别及亚类鉴定。

2.4 免疫荧光抗试验 (IFA)。日本血吸虫成虫和肝卵组织冰冻切片, 荧光标记抗羊鼠 IgG 或 IgM 作靶

抗原定位。

3 实验动物血清和尿样收集

新西兰兔 (雌性) 22 只, 感染前分别采集血样和尿样。然后, 感染日本血吸虫尾蚴 (中国预防医学科学院寄生虫病研究所提供): 1 号~ 5 号兔, 每兔感染 200 条尾蚴; 6 号~ 12 号, 每兔感染 100 条尾蚴; 13 号~ 16 号, 每兔感染 50 条尾蚴; 17 号~ 22 号, 每兔感染 25 条尾蚴。感染后 3 wk、4 wk、6 wk 和 7 wk 各取血 1 次, 并同时收集尿样。感染后第 8 wk, 用吡喹酮 200 mg/kg 单剂胃饲治疗。15 号、20 号、21 号和 22 号不予治疗作为对照; 治后 2 wk、4 wk、6 wk 和 8 wk 各取血和尿样 1 次。治后 8 wk 剖杀收集虫体, 1 号、3 号、4 号和 5 号各检获雄虫 1 条, 对照组中 15 号检获雌雄合抱 5 对虫体和雄虫 5 条, 20、21 和 22 号分别检获合抱 2 对虫体和雄虫 3 条, 合抱 1 对和雄虫 7 条及合抱 1 对和雄虫 8 条。所有血清均冻存于 -18℃, 尿样则每 10 ml 加 1% 硫柳汞 5 滴防腐, 储存于 4℃。

4 尿液检测方法

4.1 Dot-ELISA (单抗二抗一步法)。

4.1.1 尿液预处理: 尿液于 70℃ 烘箱浓缩 5 倍, 离心, 待测。

4.1.2 硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose-1, Gibco BRL), 画成 0.5 cm × 0.5 cm 方格, 将浓缩尿液 2 μl 点于其中, 37℃ 烘干, 0.1% BSA 封闭 30 min。

4.1.3 组合单抗 (D2、A10、H11) 1: 1000 加等量羊抗鼠 IgG-HRP (Sigma 公司产品) 1: 2000 混匀, 立即将点好的 NC 膜浸入, 室温振摇 30 min, 用 PBS-Tween 20 摇洗 3 次, 加底物 DAB 1~ 2 min, 水洗终止反应。干燥后判读结果。斑点深于阴性对照者判为阳性。

4.2 夹心-ELISA 用单抗 H11 腹水 1: 500 包被聚

* 本研究为国家自然科学基金资助课题 No. 39570644 和上海市科委自然科学基金资助课题 No. 954119010

聚乙烯软板, 1%BSA 封闭, 原尿液 1:2 稀释, 每孔 50 μl (复孔), 37℃ 30 min, 洗 3 次, H11-HRP 1:1500, 每孔 50 μl, 37℃ 30 min, 洗 3 次, 加底物 OPD 5 min, 用 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 酶标检测仪 (BD-TEK Instruments NC) 490 nm 读取结果, OD 值大于阴性对照 OD 值 x+ 2SD 的判为阳性。

5 血液检测方法

Dot-ELISA, 按本室常规方法, 硝酸醋酸混合

纤维微孔滤膜 (上海医药工业研究院)。将血清 2 μl 点于膜上, 37℃ 烘干, 用 PBS-Tween 浸泡 30 min, 加酶标记单抗 (A9-HRP 或 DHC-HRP) 振摇 30 min, 洗 3 次, 加底物 OPD 显色, 水洗终止反应。

结 果

1 单克隆抗体特性

1.1 5 种单克隆抗体的免疫球蛋白类别、抗体滴度和环沉率见表 1。

表 1 5 种单克隆抗体的特性
Table 1 Characterization of five McAbs

单克隆抗体 McAb	SEA-TCA	单克隆抗体滴度 Titer of McAb		IHA	环沉率 (%) COPT rate (%)	Ig 类别 Ig type
		ELISA Aw-TCA	Ru-CAg	SEA		
A ₉	12 × 10 ⁶	1 × 10 ⁴	3.2 × 10 ³	1:1280	0	IgG3
D ₂	2.5 × 10 ⁵	8 × 10 ³	2.5 × 10 ⁵	1:320	0	IgG3
A ₁₀	4 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁴	2.5 × 10 ⁵	-	0	IgG1
C ₈	8 × 10 ⁴	8 × 10 ³	6.4 × 10 ³	-	0	IgG1
H ₁₁	1 × 10 ⁶	1 × 10 ⁶	4 × 10 ³	1:160	37	IgM

1.2 单克隆抗体对各类抗原的反应 在琼脂双向扩散试验中, 单克隆抗体与有的抗原能形成清晰的

沉淀线(+), 有的则不出现(-); IFA 定位, 示所针对的靶抗原。结果见表 2。

表 2 5 种单克隆抗体对各类抗原的反应结果
Table 2 Results of McAb against different kinds of antigens

单克隆抗体 McAb	琼脂扩散试验 Agar diffusion test					IFA
	SEA-TCA	Aw-TCA	Ru-TCA	PAA	CSAA	
A ₉	+	-	+	-	-	虫卵 Egg
D ₂	+	-	+	-	-	虫卵 Egg
A ₁₀	-	-	-	-	-	表膜, 实质细胞 Tegument, parenchymal cells
C ₈	-	-	-	-	-	
H ₁₁	+	-	-	-	-	肠管, 虫卵 Gut, egg

2 不同单克隆抗体检测感染家兔血样和尿样中循环抗原

感染前, 22 只家兔检测循环抗原均呈阴性, 感染后, 不同单抗检测循环抗原的结果有所不同, 抗单一虫卵抗原的单抗 A₉ 检测血液时对早期 (3 wk 和 4 wk) 感染的家兔均未检测到循环抗原, 但三个抗

不同表位的单抗 (DHC) 组合, 则部分感染家兔可出现阳性反应。检测尿样时, 结果亦相似, 单一单抗的检出率低于组合单抗, 结果见表 3。

治疗后血样和尿样的阴转率随治疗时间而逐渐增加, 组合单抗检测循环抗原的阴转率较单个单抗为高 (表 3)。未治疗对照组均阳性。

表 3 不同感染时间感染家兔的血样和尿样中循环抗原检测结果
Table 3 Results of detection of circulating antigen in sera and urine of infected rabbits at different times after infection

检测时间 (wk) Time of detection (wk)	检测数 No. examined	阳性数 (%) No. positive (%)			
		血 样 Serum samples*		尿 样 Urine samples	
		A9-HRP	DHC-HRP	dot-ELISA	Sandwich-ELISA
感染后 After infection					
3	21	0(0)	4(19.0)	5(23.8)	2(9.5)
4	21	0(0)	5(23.8)	14(66.7)	5(23.8)
6	19	19(100)	17(89.5)	16(84.2)	11(57.9)
7	19	19(100)	19(100)	18(94.7)	13(68.4)
治疗后 After treatment					
2	14	14(100)	13(92.9)	12(85.7)	10(71.4)
4	13	12(92.3)	10(76.3)	10(76.3)	12(92.3)
6	13	11(84.6)	7(53.8)	10(76.9)	13(100)
8	13	9(69.2)	4(30.8)	7(53.8)	11(84.6)

* 用 dot-ELISA 检测

3 家兔感染度与循环抗原检测

组合单抗 dot-EL ISA 对不同感染度家兔的尿抗原检出时间, 在感染第 3 wk, 感染 50 条尾蚴以上的家兔已有少数可测得抗原, 感染 25 条的则均未测到抗原。第 4 wk, 阳性检出率则随感染尾蚴的数量而增加。至第 7 wk 除感染 100 条尾蚴组有 1 只兔阴性外, 其余全部出现阳性(图 1)。

4 血液和尿液中循环抗原的平行检测

以复合单抗 dot-EL ISA 分别检测血液和尿液中循环抗原, 结果发现两者有互补叠加作用(表 4)。

讨 论

图 1 感染家兔的感染度与尿液中循环抗原检出的关系
Fig 1 Correlations between infection intensity and circulating antigen detection in urine of infected rabbits

表 4 感染家兔血液和尿液中循环抗原的平行检测
Table 4 Parallel detection of the circulating antigen in sera and urine of infected rabbits

感染后时间(wk) Time after infection (wk)	检测例数 No. examined	阳性例数 (%) No. positive (%)			
		血液 Serum (+)	尿液 Urine	血液+ 尿液 Serum plus urine	
3	21	4(19.0)	5(23.8)	9(42.9)	
4	21	5(28.8)	14(66.7)	17(80.9)	
4	19	17(89.5)	16(84.2)	19(100)	
7	19	19(100)	18(94.5)	19(100)	

本研究首次从感染家兔尿中提取日本血吸虫循环抗原(Ru-CAg)制备和筛选抗Ru-CAg单克隆抗体, 其中的D2和A9在琼脂双扩散试验中能与Ru-CAg形成沉淀线, 提示系抗重复表位单抗。用组合单抗二抗一步法检测尿中循环抗原, 感染后3wk, 有23.8%兔尿出现阳性反应, 随着感染时间的延长, 阳性检出率逐步升高, 至第7wk, 94.7%兔尿呈阳性反应, 用单个单抗夹心ELISA检测兔尿, 阳性率低于组合单抗, 其主要原因可能是组合单抗针对多种抗原表位(包括虫卵、肠管、表膜和实质细胞), 覆盖的抗原面广, 表明抗不同抗原表位的单抗组合应用可提高敏感性。兔尿中循环抗原的出现时间与感染度有关, 感染200条尾蚴组, 感染后3wk, 有40%兔尿出现阳性, 感染后4wk, 80%出现阳性, 感染后6wk, 100%阳性; 而感染25条尾蚴组, 感染后3wk, 无阳性出现, 感染后4wk, 33%呈阳性反应, 感染后6wk, 仅67%阳性, 提示轻感染者早期诊断易漏检。尿和血同时检测循环抗原, 有互补叠加效应, 可提高阳性检出率。Lieshout^[3]等实验结果也表明联合检测尿和血中循环抗原有互补作用。检测宿主尿中循环抗原, 近年国外学者作了许多探索, 已分别在埃及血吸虫、曼氏血吸虫和间插血吸虫感染宿主尿中测出血吸虫循环抗原CCA和CAA^[3-5], 其

敏感性和特异性不亚于血清循环抗原试验。国内陆萍等对日本血吸虫病患者尿中循环抗原检测的阳性率为43.1%, 可能与检测系统来源于曼氏血吸虫杂交瘤分泌的单抗有关, 亦可能与感染度较低有关, 表明检测尿中循环抗原有一定难度, 需要特异性强的探针, 但是检测尿液较方便, 而且是非损伤性的, 与血液联合检测尚可提高诊断的敏感性, 有必要进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Polman K, Steima FF, Gryseels B, et al. Epidemiologic application of circulating antigen detection in a recent *Schistosoma mansoni* focus in Northern Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 152
- 2 陆萍, 钱宗立, Van Etten L, 等. 试剂条双夹心酶联免疫吸附试验检测日本血吸虫感染者经尿液排泄的循环趋阳极抗原. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1996; 14: 253
- 3 Van Lieshout L, De Jonge N, Deelder AM, et al. Improved diagnostic performance of the circulating antigen in human schistosomiasis by parallel testing for circulating anodic and cathodic antigens in serum and urine. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47: 463
- 4 Ripert C, Vincendeau P, Macaigne F, et al. Detection with monoclonal antibody of a polysaccharide antigen, excreted in the urine, in the schistosomiasis intercalatum focus of Edea (Cameroon). *Trop Med Parasit* 1990; 41: 40
- 5 De clerq D, Sacko M, Vercuruyse J, et al. Circulating anodic and cathodic antigen in serum and urine of mixed *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* infections in Office du Neger, Mali. *Trop Med International Health* 1997; 2: 680

1998年7月6日收稿 1998年11月8日修回

(编辑: 任燕芬)

DETERMINATION OF CIRCULATING ANTIGEN IN URINE OF RABBITS INFECTED WITH SCHISTOSOMA JAPONICUM

XUE Chunliang, LOU Wenxian, WU Chenyun, ZHANG Enying, XIE Yanhui

Department of Parasitology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025

ABSTRACT

AM: To develop an immunoassay for the detection of circulating schistosome antigen (CSA) in host urine **METHODS:** CSA extracted from the urine of the rabbits infected with *Schistosoma japonicum* was used for preparing and selecting specific monoclonal antibody. A one-step dot-ELISA using this specific MAb and a 2nd antibody was used for detection of circulating schistosome antigen in the urine of infected rabbits **RESULTS:** No CSA was detected in urine from all of 22 rabbits before infection. The positive rate of CSA in infected rabbits was correlated with the intensity of infection and the time of infection. No CSA was detected in the urine rabbits of 3 weeks after infection with 25 cercariae while the positive rate of CSA in the urine from rabbits infected with 200 cercariae was 40% and 100% after 3 and 6 weeks, respectively. A combination of CSA detection in both urine and serum may increase the detectability. **CONCLUSION:** The specific MAb prepared by urine CSA of *Schistosoma japonicum*-infected rabbits can be used as a probe for detecting CSA in the urine of infected rabbits

Key words: *Schistosoma japonicum*, urine antigen detection, one-step dot-ELISA of MAb-2ndAb

* Supported by the National Natural Science Foundation of China No. 39570644 and the Natural Science Foundation of Shanghai No. 954119010

宁波市基本消灭丝虫病 10 年后监测结果

浙江省宁波市卫生防疫站 宁波 315010 叶丽萍 许国章 王仁元 李加成 祝传根 唐世苗 孙亚维

1986年,经省级考核全市11个县(市、区)均达到卫生部基本消灭丝虫病的标准。达标后,经过10年的系统监测,原有的微丝蚴血症阳性者逐渐转阴,蚊媒解剖均未发现幼丝虫感染蚊。1995~1997年又开展了基本消灭丝虫病10年后的监测。

监测指标和方法

1 监测点的选择 根据各县(市、区)历年丝虫病查治情况和不同地理方位及丝虫病流行程度,采用分层整群抽样方法以村为单位选点监测。

2 血检对象与方法 监测村内5岁以上人群,于21:00~02:00时,取受检者耳垂血6大滴(120 μ l),分别涂成厚血膜2张,常规染色,作微丝蚴阳性密度计数。

3 蚊媒监测 于丝虫病流行季节(5月~10月),捕捉人房内的中华按蚊1000只以上,当日逐只解剖,观察幼丝虫自然感染情况。

4 流动人口监测 凡从丝虫病流行区迁入本市定居半年以上的人员,均进行血检,发现微丝蚴血症者做个案调查,登记及病原学治疗。

5 慢性丝虫病调查

5.1 调查对象 在病原学监测点,20岁以上居民为本次调查对象。

5.2 方法 通过按门逐户的访问与体检,对发现的象皮肿、乳糜尿和鞘膜积液病人进行登记和仔细检查。

结果

1 病原学监测 在全市51个乡镇70个村进行病原学监测,

监测覆盖面达到流行乡(镇)数的17.8%;血检当地居民557人,血检率达流行乡总人口的1.3%。各县(市、区)监测结果1995年至1997年,分别监测11个、28个和12个乡镇,16个、36个和18个村,分别血检10747人,27956人和14854人,均未查见微丝蚴血症者。

2 蚊媒监测 全市共解剖人房内饱血中华按蚊11614只,致倦库蚊186只,均未查到幼丝虫感染蚊。

3 流动人口监测 对停留本市内半年以上的流动人口进行病原学监测,共血检4381人,均未发现微丝蚴血症者。

4 慢性丝虫病患病率调查共调查11个县(市、区)47229人,发现慢性丝虫病患者134人,均为下肢象皮肿病人,患病率为0.3%。基本消灭丝虫病后,无新的象皮肿患者发现,但29.9%的象皮肿患者近3年内有急性淋巴管(结)炎发作史。

讨论

经1995~1997年监测,全市未发现微丝蚴血症者;未发现蚊媒幼丝虫感染;询问20岁以上居民47229人,未见新临床症状病人。

血检流动人口4381人,虽未检出微丝蚴阳性者,但这些人中都有携带病原体的可能,加之,当地传播丝虫病适宜媒介依然大量存在,表明在消灭丝虫病地区,仍应加强对流动人口的监测。对慢性丝虫病患者调查结果表明,原有的象皮肿患者尚无特效治疗,29.9%的象皮肿患者继续发作急性淋巴管(结)炎,均有待于进一步探讨。

1997年12月31日收稿 1998年9月28日修回

(编辑:李雅卿)