

几种实验/探针系统对日本血吸虫循环抗原 检出效果的比较观察*

裘丽姝¹ 张永红¹ 李 浩¹ 薛海筹¹ 娄文娴²
许东红² 钱宗立² 陆 萍³ Andrew Deelder³

1 中国预防医学科学院寄生虫病研究所** 上海 200025

2 上海第二医科大学寄生虫学教研室 上海 200025

3 荷兰 莱登大学

提要 目的: 比较5种试验/探针系统检测感染兔血清中循环抗原(SCA)的效果。方法: 用单雄性和单雌性尾蚴分别感染9只家兔, 以复性尾蚴感染7只家兔作对照; 感染后定期采血。另15兔分3组感染250条尾蚴, 1, 2组于感染后19 d和45 d分别开始给予丙烯基硫脲(295- 590 mg/kg)以抑制虫卵形成, 第3组作对照; 均定期采血。检测方法计5种: 1 斑点-EL ISA /抗成虫表膜单抗(8SE₄), 2 斑点-EL ISA /抗CCA 单抗(3D₁₀), 3 夹心斑点-EL ISA /抗虫卵单抗(M G₂), 4 夹心法-EL ISA /抗虫卵单抗(2H₁₀), 5 夹心法-EL ISA /抗CAA 单抗(B₁₀)。结果: 9只单雄性尾蚴和9只单雌性尾蚴感染兔血清1法均为阴性, 2法仅1只检出雄虫133条的家兔出现阳性反应, 5法单雌性感染均阴性, 单雄性感染3/9兔阳性。服药抑制虫卵形成的兔血清, 19 d开始服药5兔1法及3法均未检出SCA, 46 d开始服药组在感染后6- 7 wk 二法均检出SCA。4法服药与未服药兔均为阴性, 5法感染后6 wk的血清服药与未服药兔均呈阳性反应。结论: 不同的试验/探针系统的检测效果不同, 但所试3种方法(1, 2, 5种)都不能检出单雌性感染。抑制虫卵形成试验表明抗成虫表膜8SE₄单抗检出循环抗原与虫卵成熟似有关系。

关键词 血吸虫循环抗原 单性感染 抑制虫卵形成 斑点-EL ISA 夹心斑点-EL ISA 夹心法-EL ISA

近年来, 通过检测循环抗原来诊断血吸虫病的研究受到国内外普遍重视。国内一些实验室已建立了检测循环抗原的方法。各家采用的试验方法和抗体系统不尽相同, 检测的靶抗原也各异, 它们的敏感性和特异性已有报道^[1- 5]。为了进一步评价不同试验/探针系统检测循环抗原的效果, 我们用感染单性日本血吸虫尾蚴的兔血清及感染复性尾蚴后用药物抑制虫卵形成的感染兔血清比较不同试验/探针系统的检测效果, 获得以下结果。

材料与amp;方法

单性尾蚴感染兔血清

自阳性钉螺中分检出逸放单雌性及单雄性尾蚴的钉螺, 分别将逸放尾蚴接种家兔两

批25只, 接种尾蚴数10- 300条不等; 以后定期采血, 分离血清保存于- 20 备用。

用药物抑制虫卵形成的感染兔血清

15只家兔按常规方法接种尾蚴250条, 分为3组。第1, 2组分别于感染后19 d及46 d开始口服丙烯基硫脲295- 590 mg/kg^[6], 每周连续给药3 d, 直至感染后第8 wk止。家兔于感染前及感染后逐周采血, 分离血清保存于- 20 备用。第3组兔不服药, 作对照。

循环抗原检测方法

1 斑点-EL ISA 法

待测血清直接点于NC膜上, 约1 μl, 干

* 八五攻关课题资助项目

** 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心

燥后经洗涤与HRP-标记的单抗反应,并用4-氯-1-萘酚及3,3'-二氨基联苯胺混合底物显色。出现较阴性对照深的棕色斑点即为阳性,操作按裘丽姝等方法^[1]进行。试用的结合物有HRP-8SE₄(抗成虫表膜单抗,属IgG₁亚类)及HRP-3D₁₀(抗CCA单抗,属IgG_{2b}亚类)^[2]。

2 夹心斑点-ELISA

NC膜先用单抗M G₂^[3](抗虫卵单抗,属IgM类)浸泡,干后将待测标本点于膜上,烘干并洗涤后与HRP-M G₂结合物反应,并用3,3'-二氨基联苯胺显色,操作按娄文娴等方法^[4]进行。

3 夹心法-ELISA

分别以抗肠相关抗原(CAA)的单抗IB₁₀(IgG₁亚类)和卵相关抗原的单抗2H₁₀(IgM亚类)包板,待检血清1:10稀释,孵育后,IB₁₀系统直接加碱性磷酸酶(AKP)标记的单抗,而2H₁₀系统则加经BACH(Biotin Amiocaryl Hydrazide)标记的单抗,然后加入strepavidin-AKP,两个系统均以PNPP

(1,4-nitrophenyl phosphate)为底物,常温下作用2h后,在自动酶标仪的405nm波长处读取OD值,以正常兔OD均值+3SD作为阳性阈值。操作按陆萍等方法^[5]进行。

结 果

单性感染兔血清的检测结果

主要结果见表1。共检查尾蚴感染兔9只,检虫数15-133条(平均53.1);尾蚴感染兔9只,检虫数1-102条(平均36.1条)。感染0-8wk的兔血清用HRP-8SE₄进行斑点-ELISA检测循环表膜抗原,结果均为阴性,7只复性感染兔检虫4-161条(平均67.1条)于感染后6-10wk先后出现阳性反应。用HRP-3D₁₀斑点-ELISA检测循环CCA抗原,单尾蚴感染的家兔中各有1只在0wk时出现非特异反应,1只感染133条雄虫的家兔于感染后3wk开始出现较弱的阳性反应,5wk时出现明显阳性反应。7只复性感染兔中有6只于感染后6wk出现阳性反应,以抗CAA单抗IB₁₀包板,用夹心法-ELISA

表1 循环抗原检测结果
Table 1 Results of Circulating antigen detection

方法 Method	单抗 M c a b	靶抗原 Target antigen	同型 Iso type	单性感染兔血清 Serum from rabbits with monosexual infection			抑制排卵兔血清 Serum from rabbits with ovulation inhibition		
				单雄性 感染(9) Single ♂ infection	单雌性 感染(9) Single infection	对照(7) Control	感染19 d 后给药(5) Treated from 19 d p. i	感染46 d 后给药(5) Treated from 46 d p. i	对照(5) Control
斑点-ELISA Dot-ELISA	8SE ₄	成虫表膜抗原 Surface membrane antigen of adult worm	IgG ₁	阴性 (-)	阴性 (-)	阳性 (+)	阴性 (-)	阳性 (+)	阳性 (+)
斑点-ELISA Dot-ELISA	3D ₁₀	循环阴极抗原 CCA	IgG _{2b}	1/9阳性 1/9(+)	阴性 (-)	6/7阳性 6/7(+)	未测 N. D.	未测 N. D.	未测 N. D.
夹心斑点-ELISA Sandwich dot-ELISA	M G ₂	虫卵抗原 Egg antigen	IgM	未测 N. D.	未测 N. D.	未测 N. D.	阴性 (-)	阳性 (+)	阳性 (+)
夹心法-ELISA Sandwich-ELISA	2H ₁₀	虫卵抗原 Egg antigen	IgM	未测 N. D.	未测 N. D.	未测 N. D.	阴性 (-)	阴性 (-)	阴性 (-)
夹心法-ELISA Sandwich-ELISA	IB ₁₀	循环阳极抗原 CAA	IgG ₁	3/9阳性 3/9(+)	阴性 (-)	3/7阳性 3/7(+)	阳性 (+)	阳性 (+)	阳性 (+)

() 括弧内数为兔数 Figures in parentheses represent the number of infected rabbits
p. i 感染后 post infection

检测单性感染兔血清, 结果9只尾蚴感染兔中有3只于感染后5-7wk出现阳性反应; 此3兔分别检得虫15、50及86条。9只尾蚴感染兔均未出现阳性反应。在7只复性感染兔中仅3只出现阳性反应, 4只未出现阳性反应的家兔分别检虫4、36、51及103条。配对虫数仅1—3对。

药物抑制虫卵形成的感染兔血清中循环抗原检测结果

感染后19d开始投药组在感染后8wk的观察期内不论HRP-8SE₄(抗成虫表膜单抗)斑点-ELISA法或MG₂(抗虫卵抗原)的夹心斑点-ELISA法都不能检出循环抗原。感染后46d开始投药组在感染后6-7wk用2种方法均能检出循环抗原。不给药对照组在感染后6wk 2种方法检测结果均为阳性。以夹心法-ELISA检测结果与单抗种类有明显的相关。用抗虫卵相关抗原的单抗2H₁₀为检测系统时, 不论给药与否都不能检出循环抗原; 而用抗CAA的单抗1B₁₀为检测系统时, 各组家兔感染6wk的血清均呈阳性反应。

讨 论

从以上结果可见不同的试验/探针系统对循环抗原检测效果不同, 但所用的3种试验/探针系统都不能检出单雌性感染, 虽然可能与单性雌虫不能发育成熟有关, 但尚不能完全解释。因为单性雄虫可以发育成熟, 且虫体肥厚粗壮, 可是检出率亦不高, 而抗CAA单抗1B₁₀也只能检出1/3单雄性感染兔, 其确切原因有待进一步探讨。以抗CAA单抗1B₁₀进行夹心法ELISA检测, 感染250条尾蚴服药抑制虫卵形成的家兔均呈阳性结果, 而作为

单性感染对照组的复性感染兔7只中有4只检出虫数4-103条, (配对的虫数仅1-3对)均未检出循环抗原, 提示方法的敏感性是关键问题。抗虫卵相关抗原单抗2H₁₀在夹心法-ELISA用于检测病人血清中的循环抗原效果良好^[6], 但不能检出血吸虫感染兔血清中的循环抗原, 提示用从动物模型所获的结果推论至人需谨慎从事。从单性感染及抑制虫卵形成的实验结果进一步证实8SE₄ dot-ELISA检出的循环抗原与成虫排卵有关。成虫表膜为8SE₄单抗定位的靶抗原, 曾将该单抗与病兔肝脏切片进行IFA试验未见与虫卵出现阳性荧光反应, 对SEA抗原的ELISA试验也为阴性。虫卵与成虫表膜间的共同抗原成分有待进一步分析。

参 考 文 献

- 1 裴丽妹, 薛海筹, 张永红, 等. 应用单克隆抗体检测血吸虫患者的循环表膜抗原. 中华传染病杂志1992; 10: 220
- 2 娄文娟, 钱宗立, 俞安洲, 等. 单克隆抗体竞争性ELISA在日本血吸虫病诊断中的应用. 上海免疫学杂志1990; 10: 295
- 3 娄文娟, 许东红. 抗日本血吸虫虫卵抗原单克隆抗体的特性及其诊断意义. 上海免疫学杂志1992; 12: 274
- 4 娄文娟, 俞安洲. 组合单克隆抗体夹心斑点-ELISA检测日本血吸虫循环抗原的研究. 上海免疫学杂志1995; 15: 141
- 5 陆萍, 邱东川, 钱宗立, 等. 日本血吸虫病肠相关与卵相关抗原血症检测的诊断互补性初报. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志1995; 13: 13
- 6 裴丽妹, 张永红, 李浩, 等. 抑制血吸虫排卵对实验感染兔循环表膜抗原检测结果的影响. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志1997; 15: 84

1996年7月19日收稿 1997年8月27日修回

(编辑: 任燕芬)

COMPARATIVE OBSERVATION ON THE EFFICACY OF SEVERAL TEST/PROBE SYSTEMS FOR DETECTING SCHISTOSOME CIRCULATING ANTIGEN

Qiu Lishu¹, Zhang Yonghong¹, Li hao¹, Xue Haichou¹, Lou Wenxian²,
Xu Donghong², Qian Zhongli², Lu Ping², Andrew Deelder³

1 Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine, Shanghai 200025

2 Shanghai Second Medical University, Department of Parasitology 200025

3 Leiden University, Holland

ABSTRACT

AM: To compare the efficacy of 5 test/probe systems for the detecting of schistosomal circulation antigen (SCA) in sera from infected rabbits **METHODS:** Nine rabbits were infected with monosexual cercariae (either male or female), 7 rabbits were infected with bisexual cercariae as controls. Blood samples were collected periodically post infection (p. i). 15 rabbits were infected each with 250 bisexual cercaria and divided into 3 groups, 2 groups were treated with allyl thiourea (295- 590 mg/kg) from 19 d or 46 d respectively, to inhibit their egg formation. One untreated group was used as control. Blood samples were collected weekly until 8 wk post infection. SCA detecting methods include (1) dot-ELISA MCAb anti-surface membrane antigen of adult worms (8SE₄), (2) dot-ELISA MCAb anti-CCA (3D₁₀), (3) Sandwich dot-ELISA MCAb anti-egg antigen (MG₂), (4) Sandwich-ELISA MCAb anti-egg antigen (2H₁₀), (5) Sandwich-ELISA MCAb anti-CAA (1B₁₀). **RESULTS:** Using method (1) all of the 18 rabbits infected with monosexual cercariae were negative. Using method (2) only 1 rabbit harboured 133 male worms showed positive. Using method (5) no SCA were detected in sera from female cercariae-infected rabbits but 3 out of 9 male cercariae-infected rabbits showed positive reaction. SCA detecting results from rabbits treated with allyl thiourea: both method (1) and (3) showed negative in rabbits treated from 19 d (p. i) but all gave positive reaction in 6- 7 wk in rabbits treated from 46 d (p. i). There were all negative detected by using method (4) and all positive at 6 wk (p. i) detected by method (5) in rabbits of 3 groups whether treated or non-treated. **CONCLUSION:** Various test/probe systems have different efficacy in detecting SCA but (5) of the methods (1) (2) tests/probe systems could not detect SCA in rabbits with single female cercariae infection. From the egg formation inhibition study, the SCA detected by MCAb 8SE₄ dot-ELISA might be related to egg maturation. Whether the surface membrane antigen of adult worm has common antigenic component with egg antigen remains to be studied.

Key Words: Schistosome circulating antigen, single sexual infection, ovulation inhibition, dot-ELISA, sandwich dot-ELISA, sandwich-ELISA