

宿主的免疫状态等有关。除肌肉和脑，猪的肝脏也是链状带绦虫囊尾蚴的寄生部位^[12]。虫卵在小肠内经消化液作用后胚膜破裂，六钩蚴逸出，钻入肠壁，进入血循环，可经肠壁静脉和门静脉进入肝脏，加之肝脏富含窦腔，血流丰富，营养物质充足，适宜六钩蚴滞留和生长。随着囊尾蚴的生长，除了对周围组织形成挤压，还不断排泄毒性代谢产物和释放抗原物质，对宿主造成不同程度的损害^[12]，以及引起虫体周围炎性细胞和炎症介质聚集。由于肝脏血流丰富，囊尾蚴寄生导致的炎性反应较严重，使其发育受到宿主免疫反应的制约，导致囊尾蚴坏死或钙化。本研究发现链状带绦虫囊尾蚴也可寄生在猕猴的肝脏，与在家猪肝脏的寄生^[12]相似，表现为炎性细胞浸润、纤维化和肝细胞变性等病理特征的粟粒样占位病变，提示链状带绦虫幼虫感染人亦可能引起肝囊尾蚴病，其危害性有待深入的研究。

致谢 标本的采集得到云南省大理州血吸虫病防治研究所刘宏坤等同志的大力协助。

参 考 文 献

[1] Fang W. Epidemiology analysis of human *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis during 1986-1998 in Dali District[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis Control, 2001, 14(2): 114-115. (in Chinese)
(方文. 1986-1998 年大理州人群猪带绦/囊虫病流行病学分析[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2001, 14(2): 114-115.)

[2] Chen T, Zhao GH, Ning CS, et al. Progress in epidemiological studies of cysticercosis in China[J]. Shanghai J Anim Husb Vet Med, 2006, (5): 18-20. (in Chinese)
(陈同, 赵光辉, 宁长申, 等. 我国囊虫病流行病学研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006, (5): 18-20.)

[3] Yamasaki H, Allan JC, Sato MO, et al. DNA differential diagnosis of taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR[J]. J Clin

Microbiol, 2004, 42(2): 548-553.

[4] Chen PH, Kong DF, Li HZ, et al. Experimental Technology on Human Parasitology[M]. Beijing: Science Press, 1988: 76-78. (in Chinese)
(陈佩惠, 孔德芳, 李惠珠, 等. 人体寄生虫学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 76-78.)

[5] Chen ZH, Lang SY, Wu XJ, et al. The distinction of *Taenia asiatica* from *Taenia saginata* by PCR of mitochondrial *cox1* gene fragment[J]. Acta Guiyang Med Univ, 2009, 34(3): 239-241. (in Chinese)
(陈峰宏, 郎书源, 吴小娟, 等. 用 *cox1* 基因片段的 PCR 鉴别亚洲带绦虫和牛带绦虫[J]. 贵阳医学院学报, 2009, 34(3): 239-241.)

[6] Zhao YB. Comparison on the *in vitro* hatching methods for *Taenia solium* eggs[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24(1): 75-76. (in Chinese)
(赵艳兵. 猪带绦虫卵体外孵化方法的比较[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(1): 75-76.)

[7] Chen LH, Bao HE, Rong JQ. Laboratory investigation on the immunosuppressive mice infected with *Taenia saginata asiatica*[J]. Chin J Zoonoses, 2005, 21(7): 602-604. (in Chinese)
(陈利红, 包怀恩, 戎聚全. 都匀亚洲带绦虫感染免疫抑制小鼠的实验研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(7): 602-604.)

[8] Proctor EM. Identification of tapeworms[J]. S Afr Med J, 1972, 46(9): 234-238.

[9] Wang S, Luo E. Cestodes[M]//Wang SP, Ye SY. Textbook of Medical Microbiology and Parasitology. Beijing: Science Press, 2006: 518-539.

[10] Bao HE. Tapeworm[M]//Zhao WX. Human Parasitology. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994: 561-595. (in Chinese)
(包怀恩. 绦虫[M]//赵慰先. 人体寄生虫学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 561-595.)

[11] Eom KS, Rim HJ. Morphologic descriptions of *Taenia asiatica* sp.n [J]. Korean J Parasitol, 1993, 31(1): 1-6.

[12] Liu YJ, Li QZ, Hao YH. Development of *Taenia solium* cysticercus and morphological observation[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2002, 20(5): 305-307. (in Chinese)
(刘永杰, 李庆章, 郝艳红. 猪带绦虫囊尾蚴的发育过程及形态观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20(5): 305-307.)
(收稿日期: 2009-08-27 编辑: 瞿麟平)

文章编号: 1000-7423(2010)-02-0112-03

【研究简报】

旋毛虫感染兔唾液中抗旋毛虫 IgG 抗体水平

刘俊琴^{1*}, 申丽洁²

【摘要】 将 28 只日本大耳兔随机分为实验组(20 只)和对照组(8 只), 实验组用旋毛虫脱囊幼虫经口灌胃日本大耳兔(3 000 条/只), 对照组不做任何处理。采集感染前和感染后 1~6 周兔唾液和血清以及对照组兔唾液和血清。建立旋毛虫肌肉幼虫排泄分泌抗原(MLESA)为诊断抗原的间接 ELISA, 测定兔唾液和血清中抗旋毛虫 IgG 抗体。结果显示, 感染后 1~6 周, 唾液阳性率分别为 10%、15%、40%、65%、85%和 95%; 血清阳性率分别为 35%、50%、80%、90%、100%和 100%。感染后 1~3 周, 唾液阳性率与血清阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2=3.58、5.23、6.67, P<0.05$), 感染后 4~6 周, 两者差异无统计学意义 ($\chi^2=0.12、1.03、1.03, P>0.05$)。提示在血清标本采集困难的情况下, MLESA 的间接 ELISA 法检测唾液中抗旋毛虫 IgG 抗体可作为旋毛虫病免疫诊断的辅助方法。

【关键词】 旋毛虫; 肌肉幼虫; 排泄分泌抗原; IgG; 唾液; 血清

中图分类号: R532.14

文献标识码: B

IgG Antibody Level in Saliva from Rabbits Infected with *Trichinella spiralis*

Liu Jun-qin^{1*}, Shen Li-jie²

(1 Department of Medical Laboratory, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China; 2 Department of Parasitology, Faculty of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] Twenty-eight Japanese big ear rabbits were randomly divided into control group and experimental group. Twenty rabbits in experimental group were each infected with 3 000 larvae of *Trichinella spiralis*. Serum and saliva samples were collected at pre-infection and every week after infection, and were examined for IgG antibody by indirect ELISA using *T. spiralis* muscle larvae excretory-secretory antigen (MLESA). At 1, 2, 3, 4, 5 and 6 weeks after infection, the positive rate in saliva samples was 10%, 15%, 40%, 65%, 85%, and 95%, respectively; and that of serum samples was 35%, 50%, 80%, 90%, 100%, and 100%, respectively. The positive rate was significantly different between saliva and serum samples at 1, 2 and 3 weeks post-infection ($\chi^2=3.58, 5.23, 6.67, P<0.05$), but no significant difference at 4, 5, and 6 weeks post-infection ($\chi^2=0.12, 1.03, 1.03, P>0.05$). The results indicate that the indirect ELISA using MLESA to detect IgG antibody in saliva may be helpful for clinical diagnosis of trichinellosis.

[Key words] *Trichinella spiralis*; Muscle larvae; Excretory-secretory antigen; IgG; Saliva; Serum

* Corresponding author, E-mail: junqinliu78@163.com

旋毛虫病是一种由旋毛形线虫(*Trichinella spiralis*)感染引起的、危害严重的人兽共患寄生虫病,主要通过病原学和免疫学诊断。病原学诊断以传统的肌肉组织活检为主,漏诊率较高,患者不易接受,在临床诊断和流行病学调查中受到限制^[1]。免疫学诊断以检测血清中旋毛虫特异性抗体和(或)循环抗原的ELISA法为主,然而,血清的采集也受一定条件的限制。故近年来采集尿液、唾液等体液用于旋毛虫病诊断受到一些研究者的关注^[24]。本研究用ELISA法检测日本大耳兔感染旋毛虫前和感染后1~6周的唾液和血清中抗旋毛虫IgG抗体水平变化,以初步探讨用唾液替代血清的可行性。

1 材料与方 法

1.1 虫株与实验动物 旋毛虫为云南省大理猪源旋毛虫,由大理学院寄生虫学教研室昆明小鼠传代保种。28只日本大耳兔,体重2.0~2.5 kg;4只SD大鼠,体重180~250 g,均为清洁级,购自大理学院实验动物科。

1.2 主要试剂与仪器 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(HRP-IgG)、四甲基联苯胺(TMB)、牛血清白蛋白(BSA)和12联聚苯乙烯酶标条购自江苏省海门市碧云天生物技术研究所。匹鲁卡品(pilocarpinitras)由大理学院药学院药理教研室惠赠。RPMI 1640培养基购自北京索莱宝科技有限公司。吐温磷酸盐缓冲液(PBST)、磷酸盐-柠檬酸-TMB显色液和2 mol/L H₂SO₄均由本实验室配制。酶标仪(Power Wave XS)购自美国Bio-Tek公司,冷冻高速离心机(5804R)购自德国Eppendorf公司。

1.3 动物感染 断颈处死旋毛虫保种昆明小鼠,剥皮、剔除内脏和脂肪后,将全身肌肉剪碎。每只SD大鼠口服感染2~5 g剪碎肌肉,感染40 d后处死,按文献[5]方法收集活的、纯净

的旋毛虫脱囊幼虫。将28只日本大耳兔随机分成实验组(20只)和对照组(8只)。实验组用旋毛虫脱囊幼虫经口灌胃日本大耳兔(3 000条/只),对照组不做任何处理。

1.4 兔唾液和血清的收集 按文献[3]方法,分别于感染前、感染后每7 d采集实验组和对照组兔唾液和血清1次,共7次。用无菌生理盐水清洗兔口腔,取2%匹鲁卡品500 μl涂于兔口腔黏膜处,10 min后用无菌棉签收集唾液。将收集的唾液于4℃16 000×g离心30 min,取上清,-70℃保存备用。然后从兔耳缘静脉采血2~3 ml,常规方法分离血清,-70℃保存备用。

1.5 旋毛虫肌幼虫排泄分泌抗原(MLESA)的制备 用37℃预温的含500 U/ml青霉素、链霉素无菌生理盐水洗涤旋毛虫脱囊幼虫2~3次,按3 000~4 000条/ml移入37℃预温的10 ml无菌RPMI 1640培养液(含800 U/ml青霉素、链霉素),37℃5%CO₂培养箱内培养24 h,4℃3 000×g离心30 min,上清液经4℃去离子水透析2~3 d后,40%聚乙二醇浓缩,即为MLESA,紫外分光光度法测定蛋白含量,调整为6.0 μg/ml,-70℃分装保存。

1.6 间接ELISA检测兔唾液和血清中的抗体水平 按文献[6]方法,用6.0 μg/ml MLESA包被ELISA板,4℃放置24 h。用含0.15%BSA的PBST 4℃封闭24 h。以旋毛虫IgG抗体阳性血清为阳性对照,生理盐水为阴性对照,并设空白对照,阳性、阴性和空白对照各2孔。分别将旋毛虫感染前和感染后1~6周实验组和对照组兔唾液和血清(1:200)各100 μl,37℃放置30 min,蒸馏水洗涤3次;加入山羊抗兔HRP-IgG(1:2 500)100 μl,37℃放置30 min,蒸馏水洗涤3次;再加入磷酸盐-柠檬酸-TMB显色液100 μl,37℃显色10 min,用2 mol/L H₂SO₄终止反应,于酶标仪上读取吸光度(A₄₅₀值)。以待测样品A₄₅₀值大于阴性对照A₄₅₀值的2.1倍判为阳性。

1.7 统计学分析 用SPSS16.0软件进行统计学分析,A₄₅₀值用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用t检验和 χ^2 检验对数据进行分析,

作者单位:1 山西医科大学汾阳学院检验系,汾阳 032200;

2 大理学院基础医学院寄生虫学教研室,大理 671000

* 通讯作者, E-mail: junqinliu78@163.com

检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

ELISA 检测结果表明, 实验组感染前唾液和血清与对照组唾液和血清中旋毛虫 IgG 抗体全部为阴性, A_{450} 值分别为 0.13 ± 0.06 和 0.21 ± 0.07 , 0.12 ± 0.04 和 0.23 ± 0.06 。实验组感染后各周唾液 A_{450} 值分别为 0.22 ± 0.15 、 0.37 ± 0.18 、 0.55 ± 0.19 、 0.66 ± 0.17 、 0.78 ± 0.20 和 0.88 ± 0.18 , 血清 A_{450} 值分别为 0.43 ± 0.24 、 0.59 ± 0.22 、 0.74 ± 0.23 、 0.84 ± 0.25 、 0.89 ± 0.23 和 0.98 ± 0.20 。实验组感染前和感染后各周, 唾液 A_{450} 值均低于血清 A_{450} 值 ($t=3.70$ 、 4.38 、 3.78 、 3.73 、 3.37 、 2.88 、 2.70 , 均 $P < 0.05$); 但随感染时间的延长, 唾液 A_{450} 值和血清 A_{450} 值均逐渐增高, 唾液和血清的旋毛虫 IgG 抗体的阳性率也随着感染时间的延长逐渐增高。感染后 1~6 周, 实验组唾液抗体阳性率分别为 10%、15%、40%、65%、85% 和 95%, 血清抗体阳性率分别为 35%、50%、80%、90%、100% 和 100%; 感染后 1~3 周唾液和血清中抗体阳性率的差异有统计学意义 ($\chi^2=3.58$ 、 5.23 、 6.67 , 均 $P < 0.05$), 在第 4~6 周差异无统计学意义 ($\chi^2=0.12$ 、 1.03 、 1.03 , 均 $P > 0.05$)。

3 讨论

唾液是人体分泌的重要体液之一, 含有大量的蛋白质与肽类^[7]。其中含有多种免疫球蛋白, 主要为 IgG 和 IgA, 及少量的 IgM 与 IgE。唾液中的 IgA、IgG 和 IgM 分别为血清的 1/10、1/800 和 1/400, 但足够用于免疫学诊断^[8]。本研究结果表明唾液中抗旋毛虫 IgG 抗体水平低于血清, 其抗体水平随着血清抗体水平的增高而逐渐增高。Challacombe 等^[9]研究发现, 唾液中的 IgG 抗体可及时反映体内 IgG 的变化。可见, 感染旋毛虫兔的唾液中抗旋毛虫 IgG 抗体水平的变化可以反映血清中抗旋毛虫 IgG 抗体的变化情况。通常在临床或流行病学调查中, 旋毛虫感染的诊断一般在感染后 3~30 d, 而多数人或动物感染旋毛虫后 3~4 周血清抗体转为阳性^[10]。本研究中, 在旋毛虫感染初期 (1~3 周), 唾液的抗体阳性率与血清的相比, 差异有统计学意义; 在 4~6 周无差异。申丽洁等^[3]用市售试剂盒检测实验室感染兔唾液和血清中抗旋毛虫 IgG 抗体, 发现唾液敏感性较血清低, 但特异性一致; 经统计学分析, 抗体阳性率除第 2 周外差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。申丽洁等^[4]的另一实验结果显示, 患者唾液中 IgG 抗体水平明显低于血清中的, 敏感性较血清的低, 但该检测结果亦能反映血清抗体水平。结合唾液特异性抗体检测在病毒^[11,12]、细菌^[13,14]和其他寄生虫^[15-18]等的感染性疾病中的研究情况, 唾液作为一种方便、快捷、受检者易于接受的检测样品在临床诊断和流行病学调查中有潜在优势, 但唾液样品的采集和处理方法以及受检者的体液状况对唾液中抗体的含量影响较大, 因此以唾液作为诊断样品, 还有待于进一步探讨其执行标准。

参 考 文 献

[1] Moskwa B, Bieñ J, Cabaj W, et al. The estimation of different

ELISA procedures for serodiagnosis of human trichinellosis[J]. Wiad Parazytol, 2006, 52(3): 231-238.

[2] Machnicka B, Prokopowicz D, Dziemian E, et al. Detection of *Trichinella spiralis* antigens in urine of men and animals[J]. Wiad Parazytol, 2001, 47(2): 217-225.

[3] Shen LJ, Li W, Luo ZY. Applied study on detection of salivary specific antibodies in trichinellosis immune diagnosis [J]. J Dali Univ, 2005, 4(3): 30-32. (in Chinese)
(申丽洁, 李伟, 罗志勇. 唾液特异性抗体的检测在旋毛虫病免疫诊断中的应用研究[J]. 大理学院学报, 2005, 4(3): 30-32.)

[4] Shen LJ, Zhou Q, Li W, et al. Studies on diagnosis of human trichinellosis by detecting saliva specific antibodies[J]. Int J Med Parasit Dis, 2006, 33(3): 116-118. (in Chinese)
(申丽洁, 周群, 李伟, 等. 检测唾液中特异性抗体诊断人体旋毛虫病的研究[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2006, 33(3): 116-118.)

[5] Liu JQ, Li KR, Shen LJ. Improved method of aseptis separation and *in vitro* culture of *Trichinella spiralis* adult[J]. Chin J Pathogen Biol, 2008, 3(8): 623-625. (in Chinese)
(刘俊琴, 李科荣, 申丽洁. 无菌分离和体外培养旋毛虫成虫方法的改进 [J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3 (8): 623-625.)

[6] Liu JQ, Shen LJ, Ma MW, et al. Establishment and evaluation of ELISA for detection of anti-*Trichinella* antibody IgG in sera and saliva[J]. Int J Med Parasit Dis, 2008, 35(3): 118-123.

[7] Nieuw Amerongen AV, Ligtenberg AJ, Veerman EC. Implications for diagnostics in the biochemistry and physiology of saliva [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1098: 1-6.

[8] Mandel ID. The diagnostic uses of saliva[J]. J Oral Pathol Med, 1990, 19(3): 119-125.

[9] Challacombe SJ, Russell MW, Hawkes JE, et al. Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys [J]. Immunology, 1978, 35(6): 923-931.

[10] Zhu XQ. Trichinellosis[M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 1993: 155. (in Chinese)
(朱兴全. 旋毛虫病[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1993: 155.)

[11] Zmuda JF, Wagoneer B, Liotta L, et al. Recognition of multiple classes of hepatitis C antibodies increases detection sensitivity in oral fluid[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2001, 8(6): 1267-1270.

[12] Chakravarti A, Matlani M, Jain M. Immunodiagnosis of dengue virus infection using saliva[J]. Curr Microbiol, 2007, 55(6): 461-464.

[13] Hooshmand B, Monsef A, Amirmadglesi M, et al. Oral fluid antibody detection in the diagnosis of gastric *Helicobacter pylori* infection[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2004, 3(3): 127-131.

[14] Chart H, Perry NT, Willshaw GA, et al. Analysis of saliva for antibodies to the LPS of *Escherichia coli* O157 in patients with serum antibodies to *E. coli* O157 LPS[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(7): 569-572.

[15] Stroehle A, Schmid K, Heinzer I, et al. Performance of a Western immunoblot assay to detect specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in human saliva[J]. J Parasitol, 2005, 91(3): 561-563.

[16] Borges AS, Figueiredo JF. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgG, IgM and IgA immunoglobulins in the serum, cerebrospinal fluid and saliva of patients with acquired immunodeficiency syndrome and neurotoxoplasmosis[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2004, 62 (4): 1033-1037.

[17] Abd-Alla MD, Jackson TF, Reddy S, et al. Diagnosis of invasive amebiasis by enzyme-linked immunosorbent assay of saliva to detect amebic lectin antigen and anti-lectin immunoglobulin G antibodies[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2344-2347.

[18] Wang ZJ, Xue CL, Lou WX, et al. Non-invasive immunodiagnosis of schistosomiasis japonica: the detection of specific antibody in saliva[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(10): 1460-1464.

(收稿日期: 2009-09-23 编辑: 高石)