维普资讯 http://www.cqvip.com

泡球蚴病诊断抗原的研究进展

临床学院传染科 李淑萍* 综述 陈雅棠 审校

中图分类号 R444.6

泡球蚴病(Alveolar echinococcosis AE)是由棘球绦虫属的多房棘球绦虫(Echinococcus multicularis Em)幼虫寄生所致的人畜共患寄生虫病。地理分布主要见于北半球。在我国的西南、西北、东北及北部8省、市、自治区已发现有AE的存在,迄今已有近500例病例报告[1]。AE被认为是最致命的蠕虫感染,患者肝部呈多泡状、肿瘤样浸润生长病灶,极易被误诊为肝癌。AE生长缓慢,早期无明显症状,发现时常已无法手术。AE的治疗尤为困难,早期或病灶较为局限的病例,手术后疗效较好,但术后复发率较高,此类型患者的比例不足30%[2]。近年报道大剂量、长疗程阿苯达唑对部分AE患者有效,但似乎只能抑制虫体发育,而不能杀死泡球蚴[2]。晚期患者预后往往较差。所以早期诊断对改善患者预后尤为重要。寻找敏感性、特异性高的诊断抗原在AE的早期诊断上具有非常重要的作用。本文就近年来国内外对AE诊断抗原的研究现况综述如下。

1 异种抗原

早期的AE免疫诊断多采用CE(囊型包虫病,Cystic echinococcosis)囊液粗抗原,如EgHF、抗原B等。由于CE是由棘球绦虫属内的细粒棘球绦虫(Echinococcus granulosus,Eg)幼虫寄生所致,故这类抗原具属特异性,但不具备种特异性。也不能用来考核疗效。由于EgHF抗原大多数是从自然感染动物体内寄生的包虫中提取的,存在宿主种属、个体差异,因而抗原活性不易稳定,检测所得的结果变化较大[3]。

Oriol等从CE囊液中获得的另一种分子量为12Kda的属特异性抗原B,对AE的敏感性只有39%[4]。异种抗原在AE血清学检测研究的初期曾起过一定的作用,但因为与CE及囊虫病血清的交叉反应率较高等缺点,目前已渐被淘汰。

2 同种抗原

2.1 粗抗原 目前见于文献的粗抗原主要有两类:一是从Em原头节所得的粗提物,如EmP;另一是继绦期幼虫各组分,包括板状层、原头节、囊液等混合成分匀浆的抽提物,如EmC、EmCH[5]。

Hadni等同时使用EmC和另一种特异性较好的抗原Em2对欧洲一AE流行区7,884人进行流行病学调查,经过两次血清筛选共检出48例EmC-ELISA阳性、49例Em2-ELISA阳性、55例两法均阳性病例,后经临床证实13例为AE患者,其中8例AE活动性患者均为EmC-ELISA阳性,但该8例中Em2-ELISA则有2例呈阴性反应。Craig等分别于1990、1991年对中国甘肃漳县AE流行区随机人群以Em-P-ELISA及Em2-ELISA进行筛查,结果EmP-ELISA敏感性86%(24/28)、特异性78%(29/37),相同条件下Em2-ELISA的敏感性和特异性分别是71%(20/28)、97%(36/37)。可见AE粗抗原敏感性较好,将其与特异性高的抗原如Em2联合应用,可提高AE的检出率,避免漏诊。

免疫印迹分析显示[6]AE血清总IgG或IgG1、IgG4抗体可识别粗抗原EmP、EmCH中的分子量为44、35、27、21、17.5和16.5Kda的六条区带。IgG与EmP的21、17.5Kda带反应特异性可达95%、97%,EmP的免疫诊断特异性似优于EmCH。

这些从AE原头节或续绦期幼虫抽提获得的粗抗原,都存在种间或属内不同程度的交叉反应、不同来源的虫株免疫特性也不尽一致,缺乏统一的衡量标准,降低了其应用价值。

2.2 Em2抗原

Em2的分离和鉴定是泡球蚴病免疫诊断抗原研究的一大进步。Em2是通过亲和层析法从Em续

* 女,1971－02出生博士研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

绦期幼虫粗抗原分离到的一种纯化组分，分子量约54KDa，PI4.8，诊断AE敏感性为94%。Em2与CE血清交叉反应率较高，但与其它蠕虫病人血清无明显交叉反应[6]。

Em2抗体在虫体已自然死亡、病灶钙化的AE患者血清中仍可阳性，提示Em2抗原似与虫体存在有关，而与其活力关系不大。其原因可能与Em2的存在部位有关，Deplazes提出Em2是棘球蚴板状层的主要成分[7]。用抗Em2的单抗MAbG11借助直接免疫荧光法检查也显示Em2位于紧邻生发层的板状层结构，或存在于体外培养13天后的六钩蚴表面。但从虫卵内刚孵育出的六钩蚴或成虫表面则未见Em2的存在。

由于Em2有较高的敏感性和特异性，因此被广泛用于AE的免疫诊断，特别被推荐用于AE流行区人群普查和早期诊断以及AE鉴别诊断。目前，Em2-ELISA已被WHO确认为AE免疫诊断的参照指标。

与EgCH相比较，Em2的敏感性尚不理想，与CE也存在一定的交叉反应。且Em2-ELISA既不能反映病情的动态变化，也不能作为区别活动性和非活动性病灶的指标。此外，从绦绦期虫体抽提Em2，需要大量人力物力，Em2抗原制备又难以实现标准化，因此近年来人们开始寻找新一代敏感性、特异性更高的诊断抗原，重组抗原即是研究重点之一。

2.3 重组抗原

EmⅡ/3抗原是从多房棘球绦虫绦绦期幼虫构建的λgt11 cDNA文库中筛选出的阳性克隆Ⅱ/3所编码的融合蛋白，分子量为31/33kDa。该抗原可与AE病人血清呈特异性反应，用44份AE患者血清和77份其它蠕虫病患者血清经免疫印迹法评价其免疫诊断价值，结果敏感性为98%，总特异性为96%[8]。由于EmⅡ/3抗原存在基因工程表达效率低、菌体蛋白混杂难以纯化等缺点，Müler等将Ⅱ/3(1.0kb)片段中的0.6kb的一个小片段DNA亚克隆入质粒pAR3038，得到抗原EmⅡ/3-10[26]。以88例AE血清和220例其它各种蠕虫病患者血清进行EmⅡ/3-ELISA检测，其诊断敏感性和特异性分别为90%，99%。用抗EmⅡ/3-10抗体进行免疫印迹分析提示EmⅡ/3-10的分子量为65kDa，Northern杂交分析显示EmⅡ/3-10在Em幼虫和成虫均有存在，免疫荧光法可见该抗原位于绦绦期生发层和育囊囊壁上，Em不同地理株感染的AE病人血清与EmⅡ/3-10的免疫印迹试验显示相同的带型，提示EmⅡ/3-10基因具保守性。

Em10抗原[9]是PEM10基因编码的分子量为65/55kDa，pI7.27的重组蛋白，免疫荧光法提示Em10为表面抗原，存在于早期幼虫及成熟原头节表面。免疫印迹试验检测18份AE病人血清抗体均呈阳性反应，而5例健康对照血清和55份CE患者血清、10份其它蠕虫病人血清则均为阴性，提示Em10具较高的特异性。经核苷酸序列分析表明Ⅱ/3和Ⅱ/3-10为PEm10基因的一部分，后两者均编码65kDa重组蛋白，表明Ⅱ/3-10和PEM10具有同源性。

Hemmings等从λgt11 cDNA基因文库中筛选到的另两种基因EM4和EM2，前者编码62、49、44KDa蛋白，后者仅编码70KDa蛋白，后来他们用Southern杂交等分析证实EM4实际编码分子量为66KDa的前体蛋白，该前体蛋白经后翻译过程(Post-translational processing)产生前面所描述的三种小分子量蛋白[10]。这两种基因所编码的抗原只与AE患者血清呈阳性反应，表现出较好的特异性。上述抗原在Eg、Em原头节和猪囊尾蚴中虽都有自然存在，但在Eg囊液中却未能检出，似可部分解释CE病人血清与这些抗原无反应的原因。EM4基因编码抗原可能属于分泌/排泄物抗原，基因序列分析证实EM4是PEM10的一个同源片段，但不包括PEM10 N端编码重组蛋白的部分。

Em13抗原是从λZAPⅡ cDNA文库中筛选的PEM13基因编码产物。免疫电镜提示该抗原位于幼虫表面微绒毛。兔抗Em13抗血清在Em原头节中可检出该抗原，但Eg原头节及囊液中则未能检出。Em13抗原的敏感性为82%，特异性为100%。和其它重组抗原一样，也显示出很好的免疫诊断特性。

2.4 Em2 plus抗原

为降低与囊虫病和CE的交叉反应率和消除

维普资讯 http://www.cqvip.com

因不同地理株感染而致的假阴性,Gottstein[11]把两种具相似免疫特性的抗原Em2和EmⅡ/3-10混合得到Em2 plus抗原。在相同实验条件下,Ⅱ/3-10和Em2的敏感性分别为86.4%(121/140)、89.3%(125/140)。Em2、Em2 plus的总特异性分别为98.4%、100%、98.9%。可见Em2 plus优于单独的EmⅡ/3-10或Em2抗原,大大提高了免疫诊断价值。国外已有商品化的Em2 plus试剂盒供应,但Em2 plus与CE的交叉反应仍高达25.8%(32/124),与其它蠕虫病人血清亦有一定的交叉反应1.4%(2/144),故Em2 plus仍非完全满意的AE诊断抗原。

2.5 Em18/16抗原

Ito1993年曾报道了两种Mr<20kDa的种特开性抗原Em18、Em16[12]。将Em续绦期幼虫提取的粗抗原经SDS-PAGE电泳后,用19份AE病人血清行免疫印迹试验,结果在18kDa处全部呈现阳性反应带,16kDa处则有14份呈现阳性反应。而一些与CE病人血清呈交叉反应的Em抗原成分与这两条带均无交叉反应。Em18、Em16与其它寄生虫病人及健康人血清均无交叉反应现象。其实际分子量分别为17.5Kda和16.5KDa[13]。Em16是续绦期幼虫主要抗原成分,而Em18存在于同期虫体的数量却很低。现已发现AE血清与Em18的反应强度明显高于Em16[14]。用Em2 plus-ELISA试剂盒中的弱阳性对照血清与Em粗抗原行免疫印迹分析[14]、除在约50-60kDa区检出两条阳性区带(EmⅡ/3-10抗原)外,还可在18kDa和16kDa处发现另外两条阳性区带,提示Em18和Em16可能是诊断AE的一个更为灵敏的指标。

免疫印迹分析显示Em18能被AE各期患者血清所识别,而Em16则表现更易被AE中晚期患者血清识别。Ito研究了病灶已钙化和非活动性AE患者血清与Em2抗原和Em18/Em16抗原的反应,结果发现这两类患者血清与Em2抗原反应可呈强阳性而对Em18/Em16的反应则为阴性[15]。在成功手术切除病灶或化疗的病人血清中Em18抗体明显下降[7],提示Em18是区别活动性和非活动性AE的可靠指标,并可用来评价疾病转归和疗效。与Em2 plus相比较,Em18在这一应用中更具优势。Em2 plus-ELISA阳性的非AE患者血清对PP-Em18/16(半纯化Em18/16富集组分)则为阴性[16],提示pp-Em18/16可用于AE和CE及囊虫病的鉴别诊断。但是,EM18/16抗原仍存在一定程度的种间交叉反应,Em18可与病灶呈多泡状的CE血清交叉反应[7,8]。Em16也已被证实是泡球蚴和细粒棘球蚴共有的抗原成分[7]。目前尚无报道可以把Em18和Em16分离开来的成熟方法。Em18单抗亲和层析或重组蛋白技术可能对制备纯化的Em18抗原有所帮助[16],纯化的Em18将具有更高的特异性和敏感性,对AE的诊断和疗效考核价值将会更高。

最近Nirmalan等[18]用CE抗原行免疫印迹分析18份来自AE非流区乌拉圭和英国的确诊CE患者血清和19份来自中国的确诊AE患者血清,结果7份AE血清在CE抗原的18KDa处出现一条阳性区带,并证实这条区带并非Leggatt等描述过的抗原B的16/17KDa片段[18]。他认为Em18抗原可同时存在于Eg和Em,但这个结论还有待基因水平研究结果进一步证实。

3 小结

目前用于AE免疫诊断的抗原各有其优缺点,在实际应用中可根据需要联合使用、如Em2-ELISA敏感性好、方法简便,可用于流行病学调查或临床初筛、阳性血清者再以特异性较好的Em18、Em18 plus、Em16免疫印迹试验或Em18—ELISA进行复证,以确诊活动性患者,或AE和CE的鉴别。鉴定和纯化特异敏感的AE诊断抗原的困难在于属内的种间交叉反应性抗原组分。Felleisen曾报道[19]Em和Eg核苷酸水平的同源性高达98.5%、氨基酸水平的同源性达98.6%,这似乎可从分子生物学角度解释Em和Eg间交叉反应的原因。各种重组蛋白抗原在基因水平上的同源性仍待探索。因此,运用分子生物学手段,寻找具更高特异性和敏感性的种特异性诊断抗原应是今后AE免疫诊断研究的方向。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 Jiang CP. Chin J Parasiti Disease Contro 1996; 9(4): 290
2 Vuitton DA, Hepatology 1990; 12:617
3 Shepherd JC, et al. Mole Biochem Parasitol 1991, 44:81
4 Oriol R, et al. Am J Trop Med Hyg 1971; 20:569
5 Wen H, et al. Ann Trop Med Parasitol 1995; 89: 485
6 Gottstein B. Parasite Immno.1985; 7: 201
7 Deplazes P, et al. Parasitol 1991; 103: 41
8 Vogel M, et al. Mole Biochem Parasitol 1988; 31: 117
9 Frosch PM, et al. Mole Biochem Parasitol 1991; 48: 121
10 Hemmings L, et al. Mole Biochem Parasitol 1991; 44: 53
11 Gottstein B, et al. J clinic micro 1993; 31: 373
12 Ito A, et al. Trans T Soc Trop Med Hyg 1993; 87: 170
13 Wen H, et al. Am J Trop Med Hyg 1994; 51: 41
14 Ito A, et al. J Helmin 1995; 69:369
15 Ito A et al, Am J Trop Med Hyg 1995; 52: 41
16 Ito A, et al. Clinic Diagno Labora Immuno 1997; 4:57
17 Nirmalan, N. et al, Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91:484
18 Leggatt GR, et al. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86: 189
19 Felleisen R, et al. Parasitol 1994; 109: 223

(收稿日期 1998－09－11)