维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol. 19 No. 3
1994 ACTA UNIVERSITATS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

隐孢子虫病，免疫诊断

247~250 隐孢子虫病免疫及免疫诊断研究进展

传染病寄生虫病研究所 马 良 综述 陈雅棠 审校

R531.9

中图分类号 R382.3；R392

隐孢子虫(Cryptosporidium)是一种主要寄生于消化道上皮引起人和动物腹泻的重要病原体。免疫功能健全的宿主感染本虫后一般表现为自限性的短期腹泻，而免疫功能缺陷者则通常表现为持久的、威胁生命的霍乱样腹泻。目前尚无特效治疗药物。因此免疫功能缺陷宿主，特别是AIDS病人感染本虫后，常预后不良。

隐孢子虫病的诊断，早年依靠肠组织活检或尸检，近年主要依靠粪便检查，包括各种浓缩和染色技术。但是，粪便检查检出率低，尤其是对于粪便中卵囊数量很少的患者及无症状带虫者，漏检率较高。随着人们对本病认识提高以及免疫化学技术向寄生虫病学的不断渗透，近几年来隐孢子虫病免疫诊断学研究进展颇快，国外已开展了本病的多种免疫诊断方法，为本病诊断和流行病学调查提供了有力手段。

免疫学研究

1. 卵囊与子孢子的纯化及其抗原分析

(1)卵囊与子孢子的纯化

粪便中隐孢子虫卵囊的分离纯化一般包括三个步骤：第一，粪便过滤。将含卵囊的新鲜粪便或2.5%重铬酸钾贮存的粪便经过多级不锈钢筛连续过滤(最后一级筛孔直径63μm)，除去部分粪渣。第二，卵囊浓缩。可采用漂浮法，如Sheather蔗糖漂浮法、饱和氯化钠漂浮法或硫酸锌漂浮法，也可采用沉淀法，如福尔马林——乙醚或乙酸乙酯沉淀法、PBS—乙醚沉淀法。第三，密度梯度离心。将浓缩后的卵囊经过蔗糖密度梯度、Percoll密度梯度或氯化铯密度梯度离心进行纯化[1,2]。值得注意，有学者发现卵囊经福尔马林、乙醚、Sheather溶液中含有的酚以及Percoll密度梯度离心前用的次氯酸钠处理后，其抗原性要发生改变，不适于免疫学研究[2,3]。

纯化的卵囊用含胰蛋白酶和牛磺胆酸钠的脱囊液处理，再经过等密度Percoll梯度离心或氯化铯密度梯度离心后，即可获纯化的子孢子[1,2]。

(2)卵囊及子孢子抗原组分分析

目前认为隐孢子虫属至少有3种，即微小隐孢子虫(Crytosporidium parvum，C. p.)，鼠隐孢子虫(Cryptosporidium muris，C. m.)和贝氏隐孢子虫(Cryptosporidium baileyi，C. b.)。感染人类引起隐孢子虫病的

维普资讯 http://www.cqvip.com

种为C. p.。隐孢子虫抗原主要分卵囊壁抗原和子孢子抗原。3种隐孢子虫之间、卵囊壁与子孢子之间的抗原组分不尽相同。

Tilley[14]用SDS－PAGE分析3种隐孢子虫的卵囊壁表面蛋白组分时发现，C. p.显示17条区带，C. m.显示18条区带，c. b.显示18条区带；3者相同的区带为290—285、148—145、120、57、32KD$_a$；C. p.特有40、22—21、21—20、15KD$_a$区带，C. m.特有19、35、14KD$_a$区带，C. b.特有240、86、73—72、37、27—25、16KD$_a$区带。该作者在另一研究中用同样方法发现C. p.卵囊电泳图谱有50多条区带，子孢子有40多条区带[15]。

不少研究者采用SDS—PAGE及Western blotting分离出23KD$_a$C. p.子孢子抗原(P_{23})，并证实此抗原能被大多数隐孢子虫感染者血清所识别[5,7,8,9,10]。血清对此抗原的识别可能与近期暴露于C. p.有关[7]。由于C. p.株别的不同以及抗原制备和电泳条件的不同，可能造成P_{23}分子量的变异[11]。从一些研究可以看出至少有两种C. p.子孢子抗原相互混淆：P_{23}能被碘弱标记[15]，具有高度免疫原性[5,7,8,9]；18—20KD$_a$分子通常指P_{20}，可被碘强标记[15]，免疫原性较P_{23}弱。在P_{20}上已检测出半乳糖或半乳糖胺残基，但P_{23}未表现出糖基化[15,11]。

2. 隐孢子虫感染者的免疫应答

(1)免疫应答的主要抗体

隐孢子虫病免度诊断主要基于患者的体液免疫。免疫功能健全和免疫功能缺陷的隐孢子虫病人血清中均可检测出特异性IgM或IgG抗体，前一类病人在病程早期IgM上升，迅即下降，随后IgG升高；后一类病人只有部分可测出IgM应答，但都可测出IgG应答[16,12]。Casemore[13]报告隐孢子虫感染者血清中IgA、IgE抗体也显著升高。Tilley[11]用Western blotting发现几种特异性抗体识别C. p.卵囊及子孢子抗原的情况有所不同；IgA、IgG$_1$识别抗原能力强于IgG$_2$、IgM，所有这几种Ig都能识别23、38－40、68－72KDa抗原，唯有IgA能识别9—10KDa抗原。

(2)保护性免疫

目前隐孢子虫病的保护性免疫机制尚不清楚。多数学者认为以细胞免疫为主。不少资料表明，凡是细胞免疫功能正常的隐孢子虫病人一般都表现为急性自限性腹泻，而细胞免疫功能受损者则为慢性持续性腹泻。切除胸腺而缺乏T淋巴细胞的小鼠，经实验感染隐孢子虫后不能清除卵囊，而胸腺机能正常的小鼠则表现为一过性感染[14]。Moon[7]发现乳源性抗隐孢子虫IgG、IgM不能保护小鼠抵抗隐孢子虫感染，因而认为隐孢子虫病的保护性免度主要依赖免疫细胞而非抗体。但也有持不同意见者，Chrisp[16]用豚鼠作动物模型，发现成鼠、幼鼠口服接种隐孢子虫卵囊后同样易感，并产生特异性体液免疫，已产生体液免疫的豚鼠再接种隐孢子虫卵囊，不发生再感染。Riggs[17]认为免度血清对识别及中和子孢子抗原具有一定作用。Laxer[18]通过检测儿童血清、粪便及十二指肠液中的特异性隐孢子虫IgA、IgM、IgG抗体，并以迟发型皮肤过敏反应检测细胞免疫功能，得出的结论为隐孢子虫病的免疫机制可能为抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)。

免疫诊断

1. IFAT

IFAT主要用于检测血清中的特异性隐孢子虫抗体和粪便中的卵囊，也可用于肠组织活检标本中虫体的检测和定位。单克隆抗体(MAb)的应用使IFAT的敏感性和特异性显著提高。

Campbell[19]用IFAT对免疫功能健全及缺陷的隐孢子虫病人血清特异性抗体检测发现，前者在感染恢复前后出现明显的血清转化，恢复后一年以上仍存在高效价(1：40—1：640)的特异性抗体；AIDS病伴持续

维普资讯 http://www.cqvip.com

性隐孢子虫感染者血清中也存在特异性抗体(1∶40—1∶640)；低丙球蛋白血症者和以前未暴露于隐孢子虫的人血清中未测出特异性抗体。IFAT 敏感性和特异性均较高，且与弓形虫、肉孢子虫及等孢子虫等几乎无交叉反应，为更准确评价人群中隐孢虫感染情况提供了基础。

Garcia[20]以卵囊壁 MAb 为第一抗体用 IFAT 检测人粪便中卵囊，敏感性和特异性均达 100%，仅含几个卵囊的涂片标本也能被检出，估计其敏感性至少是抗酸染色法的 10 倍，且与其它多种寄生原虫、蠕虫、酵母菌等无交叉反应。近年来随着 MAb—TFAT 诊断试剂盒(The Merifluor Cryptosporidium Kit)问世及其商品化，IFAT 的应用得到了推广[21,22,23]。

2 ELISA

与 IFAT 相比，ELISA 具有可定量分析，便于标准化，不需荧光显微镜，标本可长期保存等优点。主要用于检测血清中特异性隐孢子虫抗体和粪便中卵囊抗原。

Ungar[12]以卵囊作固相抗原，用 ELISA 检测血清抗隐孢子虫 IgG、IgM，在刚出现临床表现的 95%患者和发病 2 周内的 100%患者血清中均查到抗体。用 ELISA 对儿童的研究表明血清中有明显的抗隐孢虫抗体(IgA、IgM、IgG)应答[18]。有几位研究者用 ELISA 作血清学调查表明，50%以上无症状者有抗隐孢子虫 IgG 应答，提示近期曾感染过本虫[12,26]。

Robert[24]用抗卵囊 MAb-ELISA 检测牛粪中的卵囊抗原，敏感性、特异性分别为 96%、100%。此法被推荐为兽医检查隐孢子虫的常规方法。

3. Western blotting

本法综合了 SDS—PAGE 的高分辨力和 ELISA 的高特异性、高敏感性，为一种新型的免疫探针技术。它可从大分子多肽水平对隐孢子虫抗原组分及其免疫活性进行检测和分析，有利于提高隐孢子虫病免疫诊断效果，具有很大发展前途。

Ungar[16]采用 SDS—PAGE 分离出 23KD$_a$C. p. 子孢子抗原，用此抗原以 Western blotting 检测 40 份经粪检确诊的隐孢子虫病人血清，有 37 份可识别此抗原；另外 63 份经 ELISA 检测 IgM 或 IgG 阳性的血清，有 58 份可识别该抗原。作者认为，由于 23KD$_a$ 抗原能被大多数感染者包括 AIDS 病患者血清所识别，此抗原可能具有血清学诊断意义。此观点已为其他作者证实[4,7,8,9,10]。

4. MAb 在隐孢子虫病免疫诊断中的应用

目前已制备的隐孢子虫 MAb 将近有 10 株，在隐孢子虫抗原检测、识别与定位等方面均已获得成功。

(1)MAb 用于检测隐孢子虫抗原

Arrowood[21]比较了 MAbOW$_5$ 免疫荧光法、抗酸染色法、金胺一酚染色法检测粪便中卵囊的特异性和敏感性，结果发现三者的敏感性分别为 100%、40.6%、93.8%，特异性分别为 100%、52%、85.7%。另外还发现 MAb 能很灵敏地检出肠组织活检标本中的卵囊。随着抗隐孢子虫 MAb 制备技术的不断发展以及诊断试剂盒的推广应用，可以期待免疫检测方法不久将取代现在常用的化学染色法。

(2)MAb 用于隐孢子虫抗原的识别与定位

C. p. MAb[27]备的研究[25,27]表明，若用肠道途径免疫，有 4 种以上高分子量卵囊/子孢子抗原可被识别，其中一株 MAb(C_6B_6)能识别 20KD$_a$ 子孢子表面蛋白；另一株市售 IFAT 诊断试剂盒中的 MAbOW$_5$ 能识别卵囊壁抗原位点。最近，Bonnin[28]建立了两株 C. p. MAb(TOU)和 MAb(HAD)，这两株 MAb 在免疫荧光试验中与定位于子孢子和裂殖子前极的抗原起反应；在纯化卵囊的 Western blotting 上与 210—40KD$_a$ 之间的一系列区带起反应，其中几条区带与两株 MAb 均起反应，其余为特异性区带。其中一

维普资讯 http://www.cqvip.com

株 MAb(TOU)识别糖基抗原决定簇，并经免疫电镜证实此 MAb 不仅与子孢子和裂殖子的微线体反应，还能与滋养体和大配子的外质及纳虫空泡反应。另一株 MAb(HAD)识别肽类抗原决定簇，但未得到免疫电镜证实。

综上所述，隐孢子虫病免疫及免疫诊断学研究近几年取得了较大进展，已深入到大分子多肽水平，免疫诊断的敏感性和特异性不断提高，弥补了粪检之不足，为隐孢子虫病的诊断和流行病学调查提供了有力手段。

参 考 文 献

1 Arrowood MJ，et al. J Parasitol 1987；73：314
2 Kilani RT，et al. Am J Trop Med Hyg 1987；36：505
3 Heyman MB，et al. J clin Microbiol 1986；23：789
4 Tilley M，et al. Infect Immun 1990；58：252
5 Tilley M，et al. Can J Zool 1990；68：1513
6 Ungar BLP，et al. Infect Immun 1986；53：124
7 Mead JR，et al. J Parasitol 1988；74：135
8 Lumb R，et al. Immun Cell Biol 1988；66：369
9 Lumb R，et al. Immun Cell Biol 1989；67：267
10 Riggs MW，et al. J Immunol 1989；43：1340
11 Tilley M，et al. Infect Immun 1990；58：2966
12 Ungar BLP，et al，J Infect Dis 1986；153：570
13 Casemore DP，et al. J Infect 1987；14：125
14 Heine J，et al. Infect Immun 1984；43：856
15 Moon HW，et al. Infect IMMun 1988；56：649
16 Chrisp CE，et al. Infect Immun 1990；58：674
17 Riggs MW，et al. Infect Immun 1987；55：2081
18 Laxer MA，et al. Am J Trop Med Hyg 1990；42：131
19 Campbell PN，et al. J Clin Microbiol 1983；18：165
20 Garcia LS，et al. J Clin Microbiol 1987；25：119
21 Arrowood MJ，et al. J cllin Microbiol 1989；27：1490
22 Rusnank J，et al. Clin Microbiol 1989；27：1135
23 Baron EJ，et al. J Clin Microbiol 1989；27：223
24 Robert B，et al. Vet Parasitol 1990；37：1
25 Sterling CR，et al. Pediatr Infect Dis 1986；5：s139
26 Ungar BLP et al. J Infect Dis 1988；157：551
27 Garcia LS，et al. Diagn Microbiol Infect Dis 1989；11：25
28 Bonnin A，et al. Imfect Immun 1991；59：1703

（收稿日期 1992—10—06）