

## 广州管圆线虫 $M_r$ 32 000抗原的免疫诊断效果评价

广州管圆线虫(*Angiostrongylus canonensis*, AC)是太平洋岛屿与东南亚地区嗜酸粒细胞增多性脑膜炎或嗜酸粒细胞增多性脑膜脑炎(eosinophilic meningitis or meningoencephalitis, EM)的重要病原体。该病病原学检测的敏感性极低,据不完全统计,3000多例病人中仅56例找到虫体[1],因此,免疫学检测成为重要辅助诊断手段。由于广州管圆线虫抗原与其他寄生虫抗原存在交叉反应性[2],用虫体粗抗原来诊断广州管圆线虫病时存在一定的假阳性。我们通过对不同发育阶段的广州管圆线虫抗原分析发现 $M_r$ 32 000与感染3周后大鼠血清出现强烈反应,具有潜在的早期诊断价值[3]。为进一步了解该抗原的临床诊断价值,本文从广州管圆线虫成虫抗原中纯化出AC32,并用Western blotting 和 ELISA检测对其诊断效能进行评价。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器及试剂

电泳仪、半干转印槽和SmartSpecTM3000核酸蛋白质浓度测定仪和Model-550 酶标检测仪均为美国Bio-Rad公司产品,凝胶分析系统系珠海Hema公司产品,Tris、L-甘氨酸等电泳试剂为进口分装,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗大鼠IgG为美国Jackson ImmunoResearch公司产品(鼎国生物技术有限公司分装),HRP标记羊抗人IgG为美国ICN Biomedicals公司产品,低相对分子质量标准蛋白质为中国科学院上海生物化学研究所产品,其余试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 动物及血清

SD实验大鼠由广州医学院实验动物研究中心提供,感染大鼠血清由广州医学院病原生物学教研室提供,急性血吸虫病病人血清购自华中科技大学同济医学院,广州管圆线虫病人血清和其它寄生虫感染病人血清由本室收集及中山大学中山医学院病原生物学教研室詹希美教授惠赠。

#### 1.3 广州管圆线虫成虫抗原的制备

从广州管圆线虫的中间宿主褐云玛瑙螺中分离3期幼虫,经腹腔接种SD大鼠(每只50条),在接种后第6周处死大鼠,分离的虫体经生理盐水洗涤3次后,加入虫体5倍体积的10 mmol/L pH7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS),冰浴下匀浆使虫体完全裂解,12 000 g 4 °C离心15 min,上清即为广州管圆线虫粗抗原。

#### 1.4 广州管圆线虫 $M_r$ 32 000抗原(AC32)的纯化

将上述粗抗原按文献[4]进行12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,将凝胶浸入预冷的10 mmol/L的KCl溶液,4 °C放置10 min后,根据标准分子量蛋白准确切取 $M_r$ 32 000蛋白带,将含目的蛋白的胶块装入孔径 $M_r$ 14 000的透析袋,加0.5倍Tris-甘氨酸电泳缓冲液(不含SDS),于水平电泳槽200 v电渗1 h,反转电极电渗1 min,袋内渗液经12 000 g 4 °C离心15 min,取上清对pH 7.2 10 mmol/L PBS透析,袋内液体即为纯化的AC32。

#### 1.5 纯化AC32的纯度及免疫活性鉴定

纯化的AC32按上述条件进行SDS-PAGE,并电转印到PVDF膜上,按文献[3]进行免疫印迹(Western blotting)。其中,感染后不同时期的大鼠和正常大鼠血清的最终稀释度为1:200,HRP标记的羊抗大鼠IgG最终稀释度为1:10 000。

#### 1.6 ELISA检测

用pH9.6 0.1 mol/L碳酸盐缓冲液稀释广州管圆线虫成虫粗抗原和AC32,按预试验的最佳包被浓度(分别为15和5  $\mu$ g/ml)每孔加100  $\mu$ l包被ELISA反应板,参照文献[5]进行血清检测。其中大鼠血清的最终稀释度为1:200,人血清的最终稀释度为1:100,HRP标记的羊抗大鼠IgG、羊抗人IgG和羊抗兔IgG的最终稀释度均为1:10 000。

### 2 结果

## 2.1 SDS-PAGE结果

切胶纯化的AC32经SDS-PAGE，银染后在 $M_r$  32 000处可见单一条带，而成虫抗原出现多条蛋白条带(图1)。

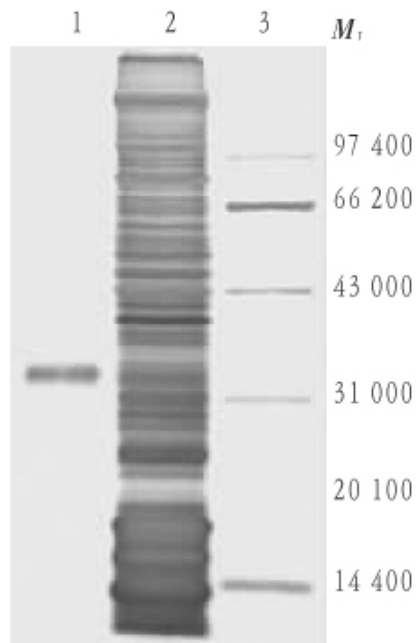


图1 纯化AC32与广州管圆线虫成虫抗原的凝胶电泳

Fig.1 SDS-PAGE of AC32 and the adult worm antigen of *A. cantonensis*

Lane 1: AC32 purified by electroelution from SDS-polyacrylamide gels Lane 2: Adult worm antigen of *A. cantonensis*; Lane 3: Standard molecular weight marker

## 2.2 Western blotting 结果

AC32和成虫抗原经SDS-PAGE后转印至PVDF膜，与广州管圆线虫感染大鼠血清进行Western blotting，结果AC32仅在 $M_r$  32 000处出现单一反应带，而成虫抗原与感染大鼠血清出现多条反应条带(图2)。AC32与广州管圆线虫感染3和6周大鼠血清均在 $M_r$  32 000处出现单一反应带，与健康人血清、正常大鼠血清、旋毛虫免疫兔血清、血吸虫感染兔血清、弓形虫免疫兔血清、囊虫病人血清和裂头蚴病人血清均未见明显的反应带(图3)。成虫抗原与感染大鼠血清和广州管圆线虫病人血清除在 $M_r$  32 000处出现反应带外，在 $M_r$  30 000以下和 $M_r$  35 000以上都出现了一些反应带；除正常大鼠外，成虫抗原与健康人血清、旋毛虫免疫兔血清、血吸虫感染兔血清、弓形虫免疫兔血清、囊虫病人血清和裂头蚴病人血清在 $M_r$  30 000以下和 $M_r$  35 000以上的分子质量范围内也出现了一定的反应带(图4)。

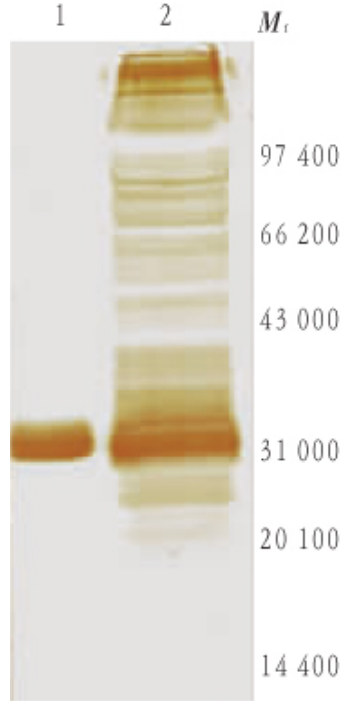


图2 纯化AC32和广州管圆线虫粗抗原与感染大鼠血清的免疫印迹

Fig.2 Western blotting of AC32 and adult worm antigen of *A. cantonensis* versus the infected rat sera

Lane 1: AC32 purified by electroelution from SDS-polyacrylamide gels; Lane 2: Adult worm antigen of *A. cantonensis*

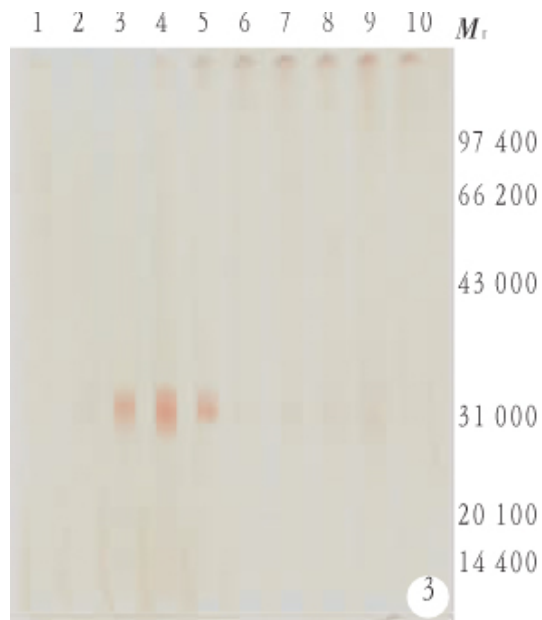


图3 AC32与不同血清的免疫印迹结果

Fig.3 Western blotting of AC32 versus the sera from different sources

Lane 1: Healthy human; Lane 2: Normal rats; Lane 3, 4: Rats infected with *A. cantonensis*; Lane 5: Patients with *Angiostrongylus cantonensis*; Lane 6: Rabbit immunized with *ricinella spiralis*; Lane 7: Rabbit infected with *Schistosoma japonicum*; Lane 8: Rabbit immunized with *Toxoplasma gondii*; Lane 9: Patients with cysticercosis; Lane 10: Patients with sparganosis

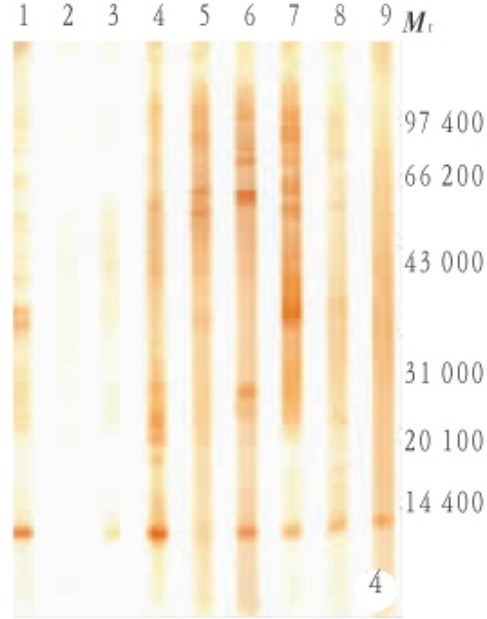


图4 广州管圆线虫成虫粗抗原与不同血清的免疫印迹结果

Fig.4 Western blotting of the adult worm antigen of *A. cantonensis* versus the sera from different sources

Lane 1: Rats infected with *A. cantonensis*; Lane 2: Normal rats; Lane 3: Healthy human; Lane 4: Rabbit immunized with *Toxoplasma gondii*; Lane 5: Rabbit immunized with *Trichinella spiralis*; Lane 6: Rabbit infected with *Schistosoma japonicum*; Lane 7: Patients with *Angiostrongylus cantonensis*; Lane 8: Patients with cysticercosis; Lane 9: Patients with sparganosis

### 2.3 ELISA结果

AC32和广州管圆线虫成虫抗原均以各自的最佳浓度包被，以常规ELISA检测血清中的IgG抗体，结果：AC32和成虫抗原与40份广州管圆线虫感染3周大鼠血清和21份感染4~6周大鼠血清全部阳性，一例临床确诊的广州管圆线虫病人血清呈强阳性反应。AC32与5例正常大鼠血清和50例献血员血清未出现假阳性反应，与20例急性血吸虫病人血清、1例旋毛虫免疫兔血清、5例华支睾吸虫病人血清、11例弓形虫病人血清、6例裂头蚴病患者血清和3例囊虫病人血清均未出现交叉阳性反应；而成虫抗原除与华支睾吸虫病人血清外，与健康人血清和其他寄生虫抗体阳性患者血清均出现了一定的假阳性或交叉阳性反应。另外，用AC32和成虫抗原检测40例嗜酸粒细胞增多患者血清，分别有4例(10%)和7例(17.5%)出现阳性(表1)。

表1 AC32和广州管圆线虫成虫抗原包被的酶联免疫吸附试验检测不同血清的结果

Tab.1 Results of the AC32-ELISA and AWA-ELISA of the sera from different sources

Source of sera	Cases examined	AC32		Adult worm antigen	
		Positive case	Positivity rate(%)	Positive case	Positivity rate(%)
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	1	1	100	1	100
Eosinophilic pleocytosis	40	4	10	7	17.5
Blood donor	50	0	0	2	4
Clonorchiasis	5	0	0	0	0
Paragonimiasis	5	0	0	1	20
Acute schistosomiasis	20	0	0	2	10
Sparganosis	6	0	0	1	16.7
Toxoplasmosis	11	0	0	1	9
Cysticercosis	3	0	0	1	33.3
Rats with <i>A. cantonensis</i> infection for 3 weeks	40	40	100	40	100
Rats with <i>A. cantonensis</i> infection for 4-6 weeks	21	21	100	21	100
Normal rats	5	0	0	0	20
Rabbit immunized with <i>Trichinella spiralis</i>	1	0	0	0	100

### 3 讨论

研究表明,广州管圆线虫抗原与其他寄生虫抗原存在交叉反应性,单一组分抗原可以提高检测的特异性[2]。国外学者纯化的雌童虫29 000、幼虫204 000、成虫31 000和31 500等抗原均提高了对广州管圆线虫检测的敏感性和特异性[6][7][8][9][10]。AC32是广州管圆线虫的主要抗原带,经切胶纯化后在聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹中仅出现单一的蛋白条带和反应条带,说明其已达到电泳纯和免疫纯度。

潘长旺等[2]采用雌性成虫抗原构建的ELISA检测感染广州管圆线虫后不同时期的大鼠血清,发现其体内抗体含量在感染10 d后迅速上升,感染后20 d大鼠血清的检出率达90%,40 d左右达到高峰,因此提出适宜的检测时间是在感染20 d后,最佳检测时间是30~50 d。本试验用AC32和成虫抗原包被ELISA检测40份感染后23 d大鼠血清和21份感染4~6周大鼠血清全部阳性;一例临床确诊的广州管圆线虫病人血清呈强阳性反应。说明AC32和成虫抗原在广州管圆线虫的早期诊断和流行病学调查中均具有较高的敏感性,与上述文献报道的结果一致。

诊断性抗原不仅需要高度的敏感性,还需要具有较高的特异性。本文用AC32组建的ELISA检测5例正常大鼠血清和50例献血员血清均未见假阳性反应。在广州管圆线虫与旋毛虫等的交叉反应方面,黄绪强等[11]用免疫酶染色试验检测广州管圆线虫感染鼠血清抗体时发现5例旋毛虫感染鼠血清1:40以下全部呈阳性反应;潘长旺等[2]用雌性成虫抗原检测的10例旋毛虫抗体阳性血清出现2例阳性。本文用AC32-ELISA检测旋毛虫免疫血清时未出现阳性,但用成虫抗原包被的ELISA则出现阳性反应。从Western blotting结果可见旋毛虫与广州管圆线虫的交叉反应抗原带主要在 $M_r$ 35 000以上区域,而与 $M_r$ 32 000反应带并不明显(图3-lane 6,图4-lane5)。同样AC32与所检测的其他寄生虫抗体阳性患者血清均未出现明显的阳性反应,从Western blotting结果可见广州管圆线虫与所检测的其他寄生虫抗体阳性患者血清的交叉反应主要在 $M_r$ 30 000以下和 $M_r$ 35 000以上的分子质量范围,而在 $M_r$ 32 000附近未出现明显的交叉反应带。可见,选测AC32作为诊断抗原,可以避免其他寄生虫感染所引起的交叉反应,从而提高检测的特异性。

王小同等[12]用成虫粗抗原建立的ELISA检测了22例临床诊断为广州管圆线虫病患者的血清有13例阳性,40例健康人血清和11例其他颅内感染患者血清均为阴性。本文用AC32和成虫抗原检测1例临床确诊病例的血清和脑脊液均为阳性。另外,我们用AC32检测的40例嗜酸粒细胞增多患者血清,有4例出现阳性,是否有广州管圆线虫感染,有待进一步调查。

#### 参考文献:

- [1] 梁浩昆.关于广州管圆线虫的概述[J].广州医学院学报(Acta Guangzhou Med Coll),1988,16(1):95-101.
- [2] 潘长旺,凌洪博,梁韶晖,等.ELISA检测广州管圆线虫感染实验大鼠血清抗体[J].中国人兽共患病杂志,2000,16(1):79-80.
- [3] Pan CW, Ling HB, Liang SH, et al. Detection of antibodies in rats infected with *Angiostrongylus cantonensis* by ELISA[J]. Chin J Zoon, 2000, 16(1): 79-80.
- [4] 李华,陈晓光,沈浩贤,等.不同发育阶段广州管圆线虫抗原分析[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2005,23(1):2033-6.
- [5] Li H, Chen XG, Shen HX, et al. Antigen analysis of *Angiostrongylus cantonensis* in different development stages[J]. Chin J Parasitol Parasitic Dis, 2005, 23(1): 2033-6.
- [6] 李华,汪世平,曾宪芳,等.日本血吸虫未成熟虫卵67 kDa分子抗原诊断血吸虫病的研究[J].中国血吸虫病防治杂志,1998,(5):271-4.
- [7] Li H, Wang SP, Zeng XF, et al. Immunodiagnosis of *Schistosomiasis japonica* using 67 kDa antigenic molecule purified from soluble immature egg antigen[J]. Chin J Schistosomiasis Control, 1998, (5): 271-4.
- [8] 李华,易新元,曾宪芳,等.日本血吸虫成虫67 kDa分子抗原的纯化及其对血吸虫病的诊断和疗效考核[J].中国热带医学,2001,1(2):93-5.
- [9] Li H, Yi XY, Zeng XF, et al. The purification of 67 kDa antigen from AWA of *Schistosoma japonica* and its application in diagnosis and assessment of curative effect[J]. Chin Trop Med, 2001, 1(2): 93-5.
- [10] Maleewong W, Sombatsawat P, Intapan PM, et al. Immunoblot evaluation of the specificity of the 29-kDa antigen from young adult female worms *Angiostrongylus cantonensis* for immunodiagnosis of human angiostrongyliasis[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2001, 19(4): 267-73.

[7] Chye SM, Chang JH, Yen CM. Immunodiagnosis of human eosinophilic meningitis using an antigen of *Angiostrongylus cantonensis* L5 with molecular weight 204 kD[J]. *Acta Trop*, 2000, 75(1): 9-17.

[8] Eamsobhana P, Yoolek A, Suvouttho S, et al. Purification of a specific immunodiagnostic *Parastrostrongylus cantonensis* antigen by electroelution from SDS-polyacrylamide gels[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2001, 32(2): 308-13.

[9] Wongkham C, Maleewong W, Intapan P, et al. Partially purified antigens of *Paragonimus heterotremus* for serodiagnosis of human paragonimiasis[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1994, 25(1): 176-80.

[10] Nuamtanong S. The evaluation of the 29 and 31 kDa antigens in female *Angiostrongylus cantonensis* for serodiagnosis of human angiostrongyliasis[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1996, 27(2): 291-6.

[11] 黄绪强, 钟传昌, 何竟智. 免疫酶染色试验检测广州管圆线虫感染鼠血清抗体的敏感性和特异性[J]. *中国人兽共患病杂志 (Chin J Zoon)*, 1994, 10(1): 28-9.

[12] 王小同, 李方去, 黄汉津, 等. 酶联免疫吸附试验测定广州管圆线虫病患者的血清抗体的临床意义[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 1999, 6(2): 128-30.

Wang XT, Li FQ, Huang HJ, et al. Clinical significance of the measurement of sera antibody against *Angiostrongylus cantonensis* by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Chin J Neuroimmunol Neurol*, 1999, 6(2): 128-30.

#### 参考文献:

[1] 梁浩昆. 关于广州管圆线虫的概述[J]. *广州医学院学报 (Acta Guangzhou Med Coll)*, 1988, 16(1): 95-101.

[2] 潘长旺, 凌洪博, 梁韶晖, 等. ELISA检测广州管圆线虫感染实验大鼠血清抗体[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(1): 79-80.

Pan CW, Ling HB, Liang SH, et al. Detection of antibodies in rats infected with *Angiostrongylus cantonensis* by ELISA[J]. *Chin J Zoon*, 2000, 16(1): 79-80.

[3] 李华, 陈晓光, 沈浩贤, 等. 不同发育阶段广州管圆线虫抗原分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2005, 23(1): 2033-6.

Li H, Chen XG, Shen HX, et al. Antigen analysis of *Angiostrongylus cantonensis* in different development stages[J]. *Chin J Parasitol Parasitic Dis*, 2005, 23(1): 2033-6.

[4] 李华, 汪世平, 曾宪芳, 等. 日本血吸虫未成熟虫卵67 kDa分子抗原诊断血吸虫病的研究[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 1998, (5): 271-4.

Li H, Wang SP, Zeng XF, et al. Immunodiagnosis of *Schistosomiasis japonica* using 67 kDa antigenic molecule purified from soluble immature egg antigen[J]. *Chin J Schistosomiasis Control*, 1998, (5): 271-4.

[5] 李华, 易新元, 曾宪芳, 等. 日本血吸虫成虫67 kDa分子抗原的纯化及其对血吸虫病的诊断和疗效考核[J]. *中国热带医学*, 2001, 1(2): 93-5.

Li H, Yi XY, Zeng XF, et al. The purification of 67 kDa antigen from AWA of *Schistosoma japonica* and its application in diagnosis and assessment of curative effect[J]. *Chin Trop Med*, 2001, 1(2): 93-5.

[6] Maleewong W, Sombatsawat P, Intapan PM, et al. Immunoblot evaluation of the specificity of the 29-kDa antigen from young adult female worms *Angiostrongylus cantonensis* for immunodiagnosis of human angiostrongyliasis[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2001, 19(4): 267-73.

[7] Chye SM, Chang JH, Yen CM. Immunodiagnosis of human eosinophilic meningitis using an antigen of *Angiostrongylus cantonensis* L5 with molecular weight 204 kD[J]. *Acta Trop*, 2000, 75(1): 9-17.

[8] Eamsobhana P, Yoolek A, Suvouttho S, et al. Purification of a specific immunodiagnostic *Parastrostrongylus cantonensis* antigen by electroelution from SDS-polyacrylamide gels[J]. *Southeast*

Asian J Trop Med Public Health, 2001, 32(2): 308-13.

[9] Wongkham C, Maleewong W, Intapan P, et al. Partially purified antigens of *Paragonimus heterotremus* for serodiagnosis of human paragonimiasis[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1994, 25(1): 176-80.

[10] Nuamtanong S. The evaluation of the 29 and 31 kDa antigens in female *Angiostrongylus cantonensis* for serodiagnosis of human angiostrongyliasis[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1996, 27(2): 291-6.

[11] 黄绪强, 钟传昌, 何竟智. 免疫酶染色试验检测广州管园线虫感染鼠血清抗体的敏感性和特异性[J]. 中国人兽共患病杂志 (Chin J Zoon), 1994, 10(1): 28-9.

[12] 王小同, 李方去, 黄汉津, 等. 酶联免疫吸附试验测定广州管园线虫病患者血清抗体的临床意义[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 1999, 6(2): 128-30.

Wang XT, Li FQ, Huang HJ, et al. Clinical significance of the measurement of sera antibody against *Angiostrongylus cantonensis* by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Chin J Neuroimmunol Neurol, 1999, 6(2):128-30.

---

[回结果列表](#)