广州管圆线虫 M_r32 000 抗原的免疫诊断效果评价

李 华[1],陈晓光[1],沈浩贤[2],陈代雄[2],裘玉蓉[3],胡小佳[3](南方医科大学[1]寄生虫学教研室,[3]南方医院检验科,广东 广州 510515;[2]广州医学院病原生物学教研室,广东 广州 510182)

摘要:目的 评价广州管圆线虫 M_r32 000 抗原(AC32)的诊断价值。**方法** 利用切胶纯化法从广州管圆线虫成虫抗原中获取 AC32,用 Western blotting 和 ELISA 方法检测 61 例广州管圆线虫感染大鼠血清、5 例正常鼠血清、1 例广州管圆线虫病人血清、50 例其他寄生虫体阳性患者血清和 50 例献血员血清。**结果** AC32 和成虫粗抗原包被的 ELISA 检测 61份感染大鼠血清和 1 例临床诊断为广州管圆线虫病人血清均为阳性;AC32-ELISA 检测的 50 例献血员、20 例急性血吸虫病人、11 例弓形虫病人和所检测的其他寄生虫抗体阳性患者血清均为阴性。**结论** AC32 在广州管圆线虫病的血清学诊断中具有较高的敏感性和特异性。

关键词:广州管圆线虫;抗原 / 纯化;免疫诊断

中图分类号:R383.19; R446.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-2588(2005)04-0380-04

Value of the antigen with molecular mass of 32 000 in immunodiagnosis of *Angiostrongylus cantonensis*

LI Hua[1], CHEN Xiao-guang[1], SHEN Hao-xian[2], CHEN Dai-xiong[2], QIU Yu-rong[3], HU Xiao-jia[3]

Department of Parasitology[1], Clinical Laboratory, Nanfang Hospital[3], Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; [2]Department of Pathologenic Biology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China

Abstract: Objective To evaluate the specificity and sensitivity of immunodiagnosis with the antigen with molecular mass of 32 000 of *Angiostrongyliasis cantonensis*(AC32). **Methods** The major antigenic protein AC32 was purified from the antigens of *A.cantonensis* adult worm by electroelution from SDS-polyacrylamide gels. AC32-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and adult worm antigen (AWA)-ELISA were used to detect the specific IgG in the sera of normal rats (n=5) and rats with angiostrongyliasis (n=61), sera of healthy individuals (n=50) and patients (n=50) with angiostrongyliasis, schistosomiasis and otherparasitosis. **Results** The positivity rate in AC32-ELISA of the sera from rats with angiostrongyliasis was 100% without false positive results or cross reaction between AC32 and the sera of the normal control and patients infected with parasites other than *A.cantonensis*. **Conclusion** AC32 of *A.cantonensis* is a valuable candidate antigen for immunodiagnosis of angiostrongyliasis with high sensitivity and specificity.

Key words: *Angiostrongylus cantonensis*; antigen/purification; immunodiagnosis

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,3 000 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_r32 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

收稿日期:2004-11-06

基金项目:国家科技部十五重大科技攻关项目(2003BA712A03-07)

Supported by the Key Science and Technology Research Development Programs of the State Ministry of Science and Technology (2003BA712A03-07)

作者简介:李 华(1968-),男,在读博士,电话:020-61640114-89122

通讯作者:陈晓光,教授,南方医科大学寄生虫学教研室,电话:020-61648308, E-mail:xgchen@fimmu.com

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 ℃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_r32 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 ℃放置 10 min 后,根据标准分子量蛋白准确切取 M_r32 000 蛋白带,将含目的蛋白的胶块装入孔径 M_r14 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 ℃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 bloting)。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 μg/ml)每孔加 100 μl 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_r32 000 处可见单一条带,而成虫抗原出现多条蛋白条带(图 1)。

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_r32 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_r32 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_r32 000 处出现反应带外,在 M_r30 000 以下和 M_r35 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_r30 000 以下和 M_r35 000 以上的分子质量范围内也出现了一定的反应带(图 4)。

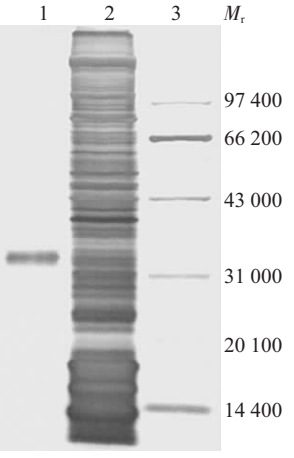


图 1 纯化 AC32 与广州管圆线虫成虫抗原的凝胶电泳

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

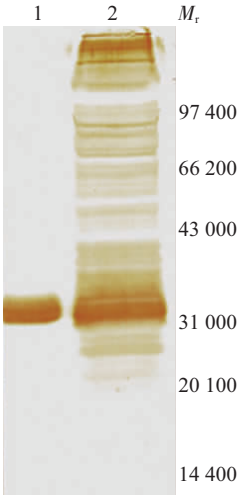
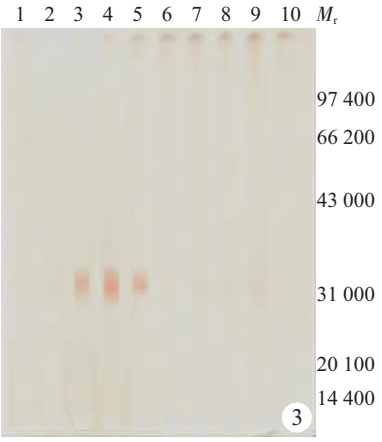


图 2 纯化 AC32 和广州管圆线虫粗抗原与感染大鼠血清的免疫印迹

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*



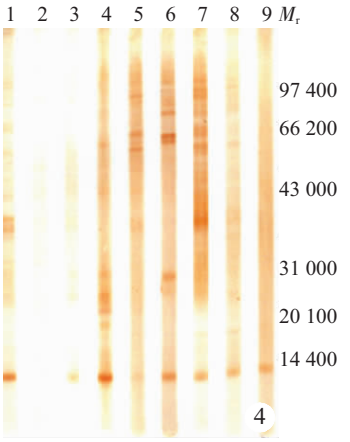


图 3 AC32 与不同血清的免疫印迹结果

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

Lane1: Healthy human; Lane 2: Normal rats; Lane 3, 4: Rats infected with *A. cantonensis*; Lane 5: Patients with *Angiostrongyliasis cantonensis*; Lane 6: Rabbit immunized with *Trichinella spiralis*; Lane 7: Rabbit infected with *Schistosoma japonicun*; Lane 8: Rabbit immunized with *Toxoplasma gondii*; Lane 9: Patients with cysticercarosis; 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 japonicun*; Lane 7: Patients with *Angiostrongyliasis cantonensis*; Lane 8: Patients with cysticercarosis; 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(%)
Angiostrongyliasis cantonensis	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 *A.cantonensis* infection for 3 weeks	40	40	100	40	100
Rats with *A.cantonensis* infection for 4-6 weeks	21	21	100	21	100
Normal rats	5	0	0	0	20
Rabbit immunized with *Trichinella spiralis*	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[6~10]。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 检测旋毛虫免疫兔血清时未出现阳性,但用成虫抗原包被的 ELISA 则出现阳性反应。从 Wentern 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_r35 000 以上区域, 而与 M_r32 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_r30 000 以下和 M_r35 000 以上的分子质量范围, 而在 M_r32 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, 可以避开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.关于广州管园线虫的概述[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园线虫抗原分析[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*. Immnodiagnosis of *Schitosomiasis 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 *Parastrongylus 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 angaint *Angiostrongylus cantonensis* by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Chin J Neuroimunol Neurol, 1999, 6(2):128-30.