

文章编号: 1000-7423(2012)-02-0090-05

【论著】

# 快速诊断多房棘球蚴病胶体金免疫层析试条方法的建立与评价

高春花, 石锋, 汪俊云\*, 杨玥涛, 朱慧慧

**【摘要】** 目的 建立快速、简便诊断多房棘球蚴病的胶体金免疫层析试条方法。方法 提取多房棘球蚴原头节总 RNA, 通过 RT-PCR 获得编码 *Em18* 基因片段并克隆入 pGEX-3X 表达载体, 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达得到重组蛋白; 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 标记抗人 IgG 单克隆抗体; 将重组 *Em18* 抗原包被于硝酸纤维素膜适当位置, 制成检测特异抗体的胶体金免疫层析试条。用该试条检测多房棘球蚴病 (56 份)、细粒棘球蚴病 (87 份)、囊尾蚴病 (30 份)、日本血吸虫病 (10 份) 和弓形虫病 (10 份) 患者血清, 以及健康人 (50 份) 血清, 以评价其检测的敏感性和特异性, 同时用 ELISA 法进行平行检测, 以评价该试条的诊断性能。结果 以重组蛋白 *Em18* 为抗原胶体金免疫层析试条检测多房棘球蚴病患者血清, 敏感性为 92.9%(52/56)。与细粒棘球蚴病和囊尾蚴病患者血清分别存在 9.2%(8/87) 和 3.3%(1/30) 的交叉反应, 与健康人血清存在 8.0%(4/50) 的假阳性率, 与日本血吸虫病和弓形虫病患者血清则无交叉反应, 特异性为 93.0%(174/187)。ELISA 法检测的敏感性和特异性分别为 94.6%(54/56) 和 92%(172/187), 与试条法比较两者差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。kappa 分析结果显示, 试条法与 ELISA 法检测多房棘球蚴病患者血清的结果高度一致 ( $\kappa=0.98$ )。结论 以重组 *Em18* 抗原建立的快速诊断胶体金免疫层析试条, 检测多房棘球蚴病的敏感性和特异性均较高。

**【关键词】** 多房棘球蚴病; 重组 *Em18* 抗原; 免疫层析试条; ELISA; 诊断

中图分类号: R532.32 文献标识码: A

## Establishment and Evaluation of Colloid Gold Labeled Immunochromatographic Strip Test for Rapid Diagnosis of Alveolar Echinococcosis

GAO Chun-hua, SHI Feng, WANG Jun-yun\*, YANG Yue-tao, ZHU Hui-hui

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Public Health; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

**【Abstract】** **Objective** To establish and evaluate a colloid gold immunochromatographic strip test for the diagnosis of alveolar echinococcosis. **Methods** Total RNA was prepared from *Echinococcus multilocularis* protoscoleces collected from Xinjiang Uygur Autonomous Region. *Em18* gene was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR product was sequenced and cloned into pGEX-3X vector. The recombinant plasmid was expressed and induced by isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to obtain recombinant protein. The anti-human IgG monoclonal antibodies was conjugated with colloid gold as detecting reagent; the recombinant *Em18* antigen and goat anti-mouse IgG were immobilized on nitrocellulose in proper position. The prepared immunochromatographic strip was evaluated using serum samples from patients with alveolar echinococcosis (56), cystic echinococcosis (87), cysticercosis (30), schistosomiasis japonica (10), toxoplasmosis (10) and healthy subjects (50). Comparison between the immunochromatographic strip test and ELISA was made by kappa statistics. **Results** Sensitivity detected by the immunochromatographic strip test was 92.9%(52/56). The cross-reactivity to cystic echinococcosis and cysticercosis was 9.2%(8/87) and 3.3%(1/30), respectively. There was no cross reactivity with schistosomiasis japonica and toxoplasmosis. 4 samples out of 50 healthy

基金项目: 国家科技部重大专项 (No. 2009ZX10004-201)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

\* 通讯作者, E-mail: wangjy0@yahoo.com.cn

people showed false positive reaction. The overall specificity was 93.0%(174/187). Sensitivity and specificity both showed no statistical difference between immunochromatographic strip test and ELISA. High degree of agreement was observed between the strip test and ELISA ( $\kappa=0.98$ ). **Conclusion** The developed immunochromatographic strip test using recombinant *Em18* antigen as coated antigen is a sensitive, specific, simple and rapid assay for diagnosing alveolar echinococcosis.

**【Key words】** Alveolar echinococcosis; Recombinant *Em18* antigen; Immunochromatographic strip; ELISA; Diagnosis

Supported by the National Science & Technology Major Program (No. 2009ZX10004-201)

\* Corresponding author, E-mail: wangjy0@yahoo.com.cn

多房棘球蚴病 (alveolar echinococcosis, AE) 也称泡型包虫病, 是由多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*, *Em*) 的幼虫寄生引起的一种危害严重的人兽共患寄生虫病。多房棘球蚴病患者由于病灶呈渐进性浸润生长, 早期无明显症状; 一旦症状显现, 已不适合手术治疗。早期漏诊的多房棘球蚴病患者因失去较佳治疗时机而危及生命, 不能作手术切除的病例, 10 年内死亡率高达 90% [1]。多房棘球蚴病的早期诊断是降低死亡率的关键。目前该病的诊断主要依靠影像学, 但影像学方法不能有效识别较小和非典型病灶, 且不易与脓肿和肿瘤病灶区别。因此, 对免疫学检测方法的研究显得尤为重要, 可应用于早期对多房棘球蚴病的诊断[24]。多房棘球绦虫 *M. 18 000* 抗原 (*Em18*) 应用于 ELISA 法和蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测该病取得了良好效果[57]。但这些方法耗时, 需要特殊的材料和设备, 难于广泛使用, 而免疫层析试条法更为简便、快捷可靠。本文从多房棘球绦虫原头节 cDNA 中扩增了 *Em18* 基因片段, 克隆表达重组蛋白 *Em18*, 将该蛋白作为包被抗原, 以抗 IgG 抗体标记胶体金作为检测试剂, 制备胶体金免疫层析试条, 评价该试条检测多房棘球蚴病患者血样的敏感性和特异性。

## 材料与方 法

### 1 主要试剂和仪器

Trizol 和羊抗人 IgG 辣根过氧化物酶 (HRP-IgG) 结合物购自美国 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司, 琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, 内切酶 *EcoR I* 和 *BamH I* 购自立陶宛 Fermentas 公司, pGEX-3X 载体和蛋白酶 Factor Xa 购自德国 Fermentas 公司, 大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞、BL21 (DE3) 感受态细胞和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺购自天根生化科技(北京)有限公司, 质粒抽提试剂盒购自美国 Omega 公司, 谷胱甘肽琼脂糖 4B 树脂购自美国 GE healthcare 公司, 鼠抗人 IgG 单克隆抗体购自美国 BD 公

司, 硝酸纤维素膜 (NC)、交联释放垫 (GFCP203000)、吸水垫 (CFSP223000) 和样品垫购自美国 Millipore 公司, 氯金酸 ( $\text{HAuCl}\cdot\text{Cl}_3\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 购自上海国药集团化学试剂有限公司, 喷膜机 (XZ1000 型) 购自美国 Bio-Dot 公司。

### 2 血清和原头节来源

2.1 血清 手术确诊的多房棘球蚴病患者血清 56 份, 分别由宁夏回族自治区疾病预防控制中心(43 份) 和甘肃省疾病预防控制中心(13 份) 提供。手术确诊的细粒棘球蚴病患者血清 87 份, 分别由新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心(44 份) 和甘肃省疾病预防控制中心 (43 份) 提供。囊尾蚴病患者血清 30 份、日本血吸虫病患者血清 10 份和弓形虫病患者血清 10 份为中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所健康教育中心提供, 健康人血清 50 份由上海市血站提供。-70  $^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

2.2 多房棘球蚴原头节 在新疆额敏县屠宰场取感染多房棘球蚴的绵羊肝脏, 收集多房棘球蚴组织, 剪碎、过筛、分离洗涤原头节, 显微镜下取有活力的原头节, 液氮冻存。

### 3 *Em18* 亚基片段的克隆表达

取多房棘球蚴原头节, 按 Trizol 说明书提取总 RNA, 应用反转录试剂盒进行反转录合成 cDNA 第一链。根据文献 [6] 设计引物, 为便于定向克隆, 在引物中分别引入了 *BamH I* (上游引物) 和 *EcoR I* (下游引物) 酶切位点 (斜体字母)。引物序列如下: *Em18F*: 5'-GCGGATCCAAGGAGTCTGACTTAGCGGA-3'和 *Em18R*: 5'-GCGAATTCTTTGAGGTTGCCAGCTTC-3', 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。以 cDNA 第一链为模板, RT-PCR 扩增目的基因片段。PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)有限公司测序。序列正确的 PCR 产物用 *BamH I*/*EcoR I* 双酶切后经琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒纯化, 与相应酶切纯化后的 pGEX-3X 载体连接, 连接产物转化至 *E. coli*

DH5 $\alpha$  感受态细胞, LB 平板 (含 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素) 挑取白色菌落进行 PCR 鉴定, 阳性克隆送生工生物工程 (上海) 有限公司进行测序。将含有正确插入片段的重组质粒分别转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 经 16 h 培养后, 随机挑选菌落, 于 LB (含 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素) 培养基培养至吸光度 ( $A_{600}$  值) = 0.6 时, 加入 1 mmol/L 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 28  $^{\circ}$ C 诱导 4 h。用谷胱甘肽琼脂糖 4B 树脂亲和纯化重组蛋白。用蛋白酶 Factor Xa 将融合蛋白的 GST 切下, 测目的蛋白浓度后, -30  $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 4 免疫层析试条的制备和评价

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 并用抗人 IgG 单克隆抗体标记胶体金。将重组 *Em18* 抗原 (检测线) 和羊抗鼠 IgG (对照线) 分别喷涂在 NC 膜上适当位置制成胶体金免疫试条<sup>[89]</sup>。取 20  $\mu$ l 待检血清或 40  $\mu$ l 待检全血滴于试条样品垫上, 1 min 后在试条样品垫上滴一滴 (约 50  $\mu$ l) 磷酸盐缓冲液 (PBS)。只要检测带出现红色条带, 不论强弱即判为阳性, 否则为阴性。检测结果均在 15 min 内判断。

用制备的试条对多房棘球蚴病、细粒棘球蚴病、囊尾蚴病、日本血吸虫病和弓形虫病患者血清, 以及健康人血清采取单盲法进行检测, 记录结果, 评价该试条检测的敏感性和特异性。分别制备 3 批试条对同血样进行检测。

#### 6 ELISA 检测

参照文献[6]以重组 *Em18* 抗原包被 96 孔酶标板 (0.3  $\mu$ g/孔)。待测血清样品的稀释度为 1 : 200。以羊抗人 HRP-IgG (1:30 000) 作为二抗, 加入 3,3', 5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物显色后测  $A_{450}$  值。以 50 份健康人血清的  $A_{450}$  均值加 3 个标准差 ( $\bar{x}+3s$ ) 为阳性阈值, 每份血清样品做 2 个孔, 受检样品的  $A_{450}$  值平均值大于或等于阈值者判为阳性。

#### 7 统计学分析

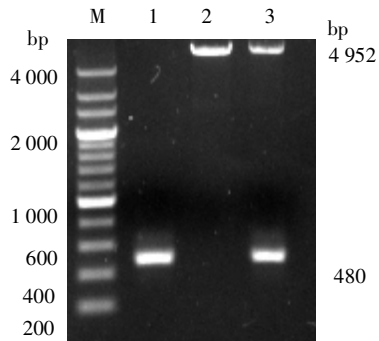
采用 SPSS11.0 进行四格表资料的  $\chi^2$  检验和 kappa 一致性检验。

### 结 果

#### 1 *Em18* 基因片段的克隆表达

以多房棘球蚴 cDNA 为模板扩增出基因片段长度为 500 bp 左右, 与预期大小一致。经测序该基因片段长度为 480 bp, 推测其编码 160 个氨基酸。将双酶切的 PCR 产物纯化后定向克隆于表达载体 pGEX-

3X, 酶切产物电泳鉴定 (图 1) 和序列分析表明目的片段克隆成功, 且阅读框正确。重组质粒 pGEX-3X-*Em18* 在 BL21 (DE3) 中成功表达。经电泳分析, 表达的融合蛋白和酶切后的蛋白组分相对分子质量 ( $M_r$ ) 大小与预计值一致, 分别为  $M_r$  44 000 和 18 000 (图 2)。

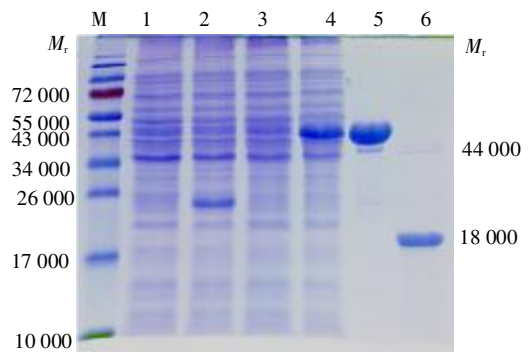


M: DNA 标志物; 1: *Em18* 基因扩增产物; 2: pGEX-3X 空质粒/*Bam*H I 单酶切; 3: pGEX-3X-*Em18* *Eco*R I/*Bam*H I 双酶切。

M: DNA marker; 1: RT-PCR product of *Em18*; 2: pGEX-3X digested by *Bam*H I; 3: pGEX-3X-*Em18* digested by *Eco*R I and *Bam*H I.

图 1 *Em18* 基因 PCR 扩增产物及重组质粒双酶切鉴定

Fig.1 RT-PCR product of *Em18* and double restriction enzymes digestion identification of recombinant plasmid of *Em18* gene

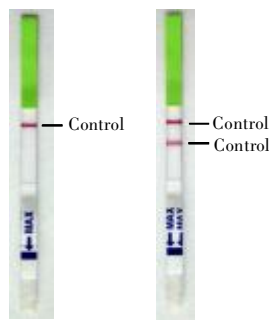


M: 标准蛋白分子量; 1: 未诱导的 pGEX-3X 空质粒; 2: 经 IPTG 诱导的 pGEX-3X 空质粒; 3: 未诱导的 pGEX-3X-*Em18*; 4: 经 IPTG 诱导的 pGEX-3X-*Em18*; 5: pGEX-3X-*Em18* 融合蛋白经谷胱甘肽琼脂糖 4B 树脂纯化后; 6: pGEX-3X-*Em18* 融合蛋白经蛋白酶 Factor Xa 消化后。M: Molecular marker; 1: pGEX-3X empty vector before induction; 2: pGEX-3X empty vector after induction; 3: pGEX-3X-*Em18* whole cell without IPTG induction; 4: soluble fractions of pGEX-3X-*Em18* with IPTG induction after cellular disruption; 5: purified pGEX-3X - *Em18* fusion protein; 6: pGEX-3X-*Em18* after digestion by Factor Xa.

图 2 pGEX-3X-*Em18* 融合蛋白表达及纯化的 14%SDS-PAGE 鉴定  
Fig.2 SDS-PAGE (14%) analysis of pGEX-3X-*Em18* expressed in *E. coli* BL21 cells

#### 2 试条法和 ELISA 检测结果

用制备的 3 批次试条对多房棘球蚴病、囊尾蚴病、细粒棘球蚴病、日本血吸虫病和弓形虫病患者血清, 以及健康人血清进行检测, 批次间检测结果完全符合 (图 3)。



1: 健康人血清; 2: 多房棘球蚴病患者血清; Control: 质量控制带; Test: 检测带。

1: Normal serum; 2: Serum of patient with alveolar echinococcosis; Control: Quality control band; Test: Detection band.

图 3 胶体金免疫层析试纸条检测结果

Fig. 3 Results of colloid gold immunochromatographic strip test

试条法和 ELISA 法检测多房棘球蚴病患者血清的敏感性分别为 92.9%(52/56) 和 94.6%(54/56), 与细粒棘球蚴病患者血清均存在 9.2%(8/87) 的交叉反应, 与囊尾蚴病患者血清分别存在 3.3%(1/30) 和 6.7%(2/30)。但两法与日本血吸虫病和弓形虫病患者血清均无交叉反应。试条法和 ELISA 法总的特异性分别为 93%(174/187) 和 92%(172/187), 诊断效能均为 93%。

试条法和 ELISA 法敏感性和特异性差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。kappa 分析结果显示, 试条法和 ELISA 法检测多房棘球蚴病患者血清的结果高度一致 ( $\kappa=0.98$ ) (表 1)。

表 1 试条法和 ELISA 法检测寄生虫病患者和健康人血清  
Table 1 Detection results of the sera from different patients and control subjects using immunochromatographic strip test and ELISA

血清样品 Serum	检测例数 No. cases	阳性数(%) No. positives(%)	
		试条法 Immunochromatographic strip test	ELISA 法 Enzyme-linked immunosorbent assay
多房棘球蚴病 Alveolar echinococcosis	56	52 (92.9)	54 (94.6)
细粒棘球蚴病 Cystic echinococcosis	87	8 (9.2)	8 (9.2)
囊尾蚴病 Cysticercosis	30	1 (3.3)	2 (6.7)
日本血吸虫病 Schistosomiasis japonica	10	0	0
弓形虫病 Toxoplasmosis	10	0	0
健康人 Healthy person	50	4 (8.0)	5 (10.0)

## 讨 论

Ito 等<sup>[12]</sup>用免疫印迹法从多房棘球蚴原头节组织抗

原中鉴定出 *Em18* 抗原, 初步研究认为是种特异性抗原。随后多项研究证实, *Em18* 抗原具有较好的敏感性和特异性, 还能在一定程度上区别活动性和非活动性病灶<sup>[13]</sup>, 是一种具有鉴别诊断价值和免疫随访意义的诊断抗原<sup>[14,15]</sup>。早期是通过观察免疫印迹反应中原头节组织粗抗原  $M_r$  18 000 条带的反应<sup>[12,16]</sup>, 操作复杂, 不便推广应用。纯化的 *Em18* 天然抗原用于 ELISA 检测显示较高的诊断价值和实用性<sup>[17]</sup>, 但从自然或人工感染的棘球蚴原头节中提取  $M_r$  18 000 抗原难度大、得率少, 不能满足诊断的需要。重组抗原可以高效表达, 易于大量制备并标准化, 可以满足诊断的需要。有报道, 多房棘球蚴重组 *Em18* 抗原应用于免疫印迹试验和 ELISA 均显示较高的敏感性和特异性<sup>[5,6,18]</sup>, 但这两种方法因费时费力或需要特殊的仪器和设备, 在基层和现场应用受到限制。本文从中国新疆源 *Em* 原头节 cDNA 中扩增了 *Em18* 基因片段, 克隆和表达了重组 *Em18* 抗原, 并将其作为包被抗原, 以抗 IgG 抗体标记胶体金作为检测试剂, 建立了诊断多房棘球蚴病的胶体金免疫层析试条, 敏感度和特异度分别为 92.9%(52/56) 和 93.0%(174/187)。与 ELISA 法检测结果相比, 敏感性和特异性之间的差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 试条法与 ELISA 法检测多房棘球蚴病患者血清的结果高度一致 ( $\kappa=0.98$ )。

本研究研制的快速诊断多房棘球蚴病的胶体金免疫层析试条的检测性能与 ELISA 检测方法相当, 但试条法操作快速、简便, 不需任何仪器设备, 结果判断客观, 尤其适合现场和基层应用, 为大规模筛查工作提供了方便。

本研究结果显示, 以重组 *Em18* 抗原制备的试条与细粒棘球蚴病和囊尾蚴病患者血清存在一定的交叉反应, 与日本血吸虫病和弓形虫病患者血清均无交叉反应, 这与其他研究者的结果一致<sup>[19,20]</sup>。进一步研究和明确 *Em18* 抗原中特异性反应的主要功能性部分将有助于提高特异性和降低非特异性交叉反应, 从而进一步提高该抗原的诊断效率。

## 参 考 文 献

- [1] Gottstein B, Schantz PM, Wilson JE. Serological screening for *Echinococcus multilocularis* infections with ELISA [J]. Lancet, 1985, 1(8437): 1097-1098.
- [2] Carmena D, Benito A, Eraso E. The immunodiagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection [J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(5): 460-475.
- [3] Gottstein B. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis [J]. Clin Microbiol Rev, 1992, 5(3): 248-261.
- [4] Ito A, Nakao M, Sako Y. Echinococcosis: serological detection of patients and molecular identification of parasites [J]. Future Microbiol, 2007, 2(4): 439-449.

- [5] Ito A, Xiao N, Liance M, *et al.* Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with affinity-purified *Em18* and an ELISA with recombinant *Em18* for differential diagnosis of alveolar echinococcosis; results of a blind test [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(11): 4161-4165.
- [6] Sako Y, Nakao M, Nakaya K, *et al.* Alveolar echinococcosis; characterization of diagnostic antigen *Em18* and serological evaluation of recombinant *Em18* [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(8): 2760-2765.
- [7] Xiao N, Mamuti W, Yamasaki H, *et al.* Evaluation of use of recombinant *Em18* and affinity-purified *Em18* for serological differentiation of alveolar echinococcosis from cystic echinococcosis and other parasitic infections [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(7): 3351-3353.
- [8] Roe CD, Courtoy PJ, Baudhuin P. A model of protein-colloidal gold interaction [J]. *J Histochem Cytochem*, 1987, 35(11): 1191-1198.
- [9] Warchol JB, Brelińska R, Herbert DC. Analysis of colloidal gold methods for labelling proteins [J]. *Histochemistry*, 1982, 76(4): 567-575.
- [10] González-Sapienza G, Lorenzo C, Nieto A. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(11): 3979-3983.
- [11] Thomas EE, Puterman ML, Kawano E, *et al.* Evaluation of seven immunoassays for detection of rotavirus in pediatric stool samples [J]. *J Clin Microbiol*, 1988, 26(6): 1189-1193.
- [12] Ito A, Schantz PM, Kutsumi H, *et al.* *Em18*, serodiagnosis of alveolar hydatid disease by Western blotting [J]. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1993, 87(2): 170-172.
- [13] Ito A, Schantz PM, Wilson JF. *Em18*, A new serodiagnostic marker for differentiation of active and inactive cases of alveolar hydatid disease [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, 52(1): 41-44.
- [14] Jiang L, Wen H, Li X, *et al.* Evaluation of diagnostic value of 18 kDa antigen in alveolar echinococcosis [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 1999, 17(2): 78-80. (in Chinese) (江莉, 温浩, 李雄, 等. 18 kDa 抗原泡型包虫病的评价 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(2): 78-80.)
- [15] Jiang L, Wen H, Li X, *et al.* Establishment of ELISA test with 18 kDa purified antigen from echinococcosis granulosis protoscoleces and its diagnostic value for the differentiation of the two types of echinococcosis [J]. *Chin J Parasit Dis Control*, 2001, 14(2): 117-120. (in Chinese) (江莉, 温浩, 李雄, 等. 细粒棘球蚴原头节 18 kDa 纯化抗原 ELISA 的建立及其对两型包虫病鉴别诊断的意义 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2001, 14(2): 117-120.)
- [16] Nirmalan N, Craig PS. Immunoblot evaluation of the species specificity of *Em18* and *Em16* antigens for serodiagnosis of human alveolar echinococcosis [J]. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1997, 91(4): 484-486.
- [17] Jiang L, Wen H, Ito A. Immunodiagnostic differentiation of alveolar and cystic echinococcosis using ELISA test with 18-kDa antigen extracted from *Echinococcus* protoscoleces [J]. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 2001, 95(3): 285-288.
- [18] Bart JM, Piarrou M, Sako Y, *et al.* Comparison of several commercial serologic kits and *Em18* serology for detection of human alveolar echinococcosis [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 59(1): 93-95.
- [19] Jiang L, Feng Z, Xue HC, *et al.* Gene cloning, expression and serological evaluation of diagnostic antigen *Em18* for alveolar echinococcosis [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2004, 22(4): 193-198. (in Chinese) (江莉, 冯正, 薛海筹, 等. 多房棘球蚴病特异性诊断抗原 *Em18* 的基因克隆、表达和血清学评价 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22(4): 193-198.)
- [20] Sako Y, Fukuda K, Kobayashi Y, *et al.* Development of an immunochromatographic test to detect antibodies against recombinant *Em18* for diagnosis of alveolar echinococcosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(1): 252-254.

(收稿日期: 2011-12-31 编辑: 衣凤芸)

文章编号: 1000-7423(2012)-02-0094-01

## 【病例报告】

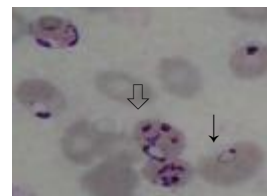
### 广东输入性恶性疟 1 例

于彦杰<sup>1</sup>, 曹红<sup>2</sup>, 陈淑如<sup>2</sup>, 李美玉<sup>1</sup>, 杨潇<sup>1</sup>, 詹希美<sup>1\*</sup>

中图分类号: R531.32 文献标识码: D

患者, 男, 36 岁, 广东省清远市人。2011 年 5 月 7 日因畏寒、寒战, 持续约 20 min 后出现发热, 到清远市人民医院就诊, 给予退热药治疗, 2~3 h 后体温降至正常, 伴出汗, 热退后头痛缓解。随后每天下午均出现发热, 持续约 3 h, 体温为 38~39℃, 最高时可达 40℃, 伴头痛、头晕。5 月 17 日, 患者至中山大学孙逸仙纪念医院, 入院后检查: 提示轻度贫血, 血红蛋白 87 g/L, 腹部 B 超提示肝脾肿大, 外周血涂片疟原虫阳性 (未分类), 拟诊断为疟疾。问诊得知患者于 2011 年 1 月份赴尼日利亚参与工程施工, 4 月 27 日回国, 同事中有出现反复高热者。为进一步诊治, 转至中山大学附属第三医院。入院查体: 体温 36.8℃; 肝掌、蜘蛛痣(+), 皮肤巩膜中度黄

染; 突眼, 睑结膜轻度苍白; 双侧甲状腺 I 度弥漫性肿大; 右上腹部压痛, 无反跳痛; 肝右肋下、剑突下 4 cm 可触及, 质硬, 未触及结节或包块; 脾肋下未触及, 肝区扣痛, 肝浊音界扩大。实验室检查提示: 血红蛋白(HGB) 69 g/L, 嗜酸性粒细胞  $1.08 \times 10^9/L$ 。天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)分别为 141 和 167 IU/L, 总胆红素为 110.37  $\mu\text{mol/L}$ , 结合胆红素为 76.52  $\mu\text{mol/L}$ 。全血涂片经吉氏染色, 油镜下可见红细胞中有恶性疟原虫, 每个视野下约有 30 个虫体, 以大滋养体和环状体为主(图 1)。



↑恶性疟原虫滋养体; ↑环状体  
图 1 患者血检结果(吉氏染色, ×400)

作者单位: 1 中山大学中山医学院, 广州 510080;  
2 中山大学附属第三医院, 广州 510630  
\* 通讯作者, E-mail: zhanximei@yahoo.com.cn

(下转第 99 页)