

检测日本血吸虫感染者血清中特异性IgG4的诊断价值*

王越¹ 施晓华¹ 汤益^{1,2} 叶丽萍³ 干小仙^{1**}

(1. 浙江省医学科学院寄生虫病研究所, 杭州 310013; 2. 杭州市疾病预防控制中心, 杭州 310006; 3. 宁波市疾病预防控制中心, 浙江宁波 315010)

摘要 为评价日本血吸虫感染者血清中特异性IgG4的诊断和疗效价值, 本研究以SEA为抗原, 胶体金-抗人IgG4单抗结合物为检测标记物, 以金标免疫渗滤法(DIGFA)检测急性和慢性血吸虫病患者治疗前后血清中特异性IgG4抗体。结果显示, 急性和慢性血吸虫病人血清中IgG4阳性率分别为90.9% (30/33)和98.0% (98/100); 检测非疫区健康者血清及其他寄生虫(包括肺吸虫、华支睾吸虫、囊虫等)感染者血清共235人份, 未有阳性出现(特异性为100%); 检测急性血吸虫病人治疗后6个月和12个月血清, IgG4抗体的阴转率分别为52.0% (13/25)和87.5% (21/24), 均明显高于IgG阴转率; 检测血吸虫病人治后6个月血清, 慢性病人与急性病人IgG4抗体阴转率无差异。结果表明DIGFA法检测病人血清特异性IgG4诊断血吸虫病敏感性高, 与IgG相比有更高的特异性, 具有一定的疗效考核价值。

关键词 日本血吸虫; IgG4; 金标免疫渗滤法; 诊断; 疗效考核

目前我国血吸虫病免疫学诊断仍然以检测病人血清中特异性IgG抗体为主, 虽然其敏感性高, 但是患者经有效治疗后其体内IgG抗体能持续存在很长时间, 因此IgG检测不能区别现症感染和既往感染, 不能用于考核疗效。国内外学者对不同病期的血吸虫病患者血清中特异性抗体亚型和亚类进行较多分析研究, 发现IgG4是血吸虫病慢性期优势抗体, 并且治疗后下降较快, 能较好地反映机体感染状态(Jassi *et al.*, 1987; Boctor and Peter, 1990)。不同研究小组用ELISA检测血清中血吸虫特异性IgG4时均获较高的敏感性和特异性, 但治后阴转率差异较大。李永等(1997)研究结果显示治后病人血清IgG4阴转率较高, 可作为疗效考核指标, 但另一些研究显示治后IgG4明显下降, 但阴转率较低(冯正等, 2000; Abd El Aal *et al.*, 2005)。本研究以胶体金标记抗人IgG4单抗为检测标记物, 采用垂直流渗滤法快速检测血清中特异性IgG4抗体, 观察其在血吸虫病诊断及疗效考核中的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

鼠抗人IgG4Fc单抗(IgG3K)为CALTAG公司产品。羊抗人IgG购于华美生物公司。

1.2 日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)制备

从人工感染血吸虫的家兔肝脏取得虫卵, 经反复淘洗纯化后, 用丙酮脱脂, 研成粉末。再用生理盐水配制成1%悬液, 反复冻融3次, 冷浸3天, 超声粉碎, 10 000 r/min高速离心30 min, 收集上清液即为SEA。测蛋白含量为3.5 ng/mL, 分装后-20℃冰箱保存备用。

1.3 血清

急性血吸虫病人血清33份、慢性血吸虫病人血清100份, 采自湖南省、江西省血吸虫病流行区, 均为粪检虫卵阳性者; 肺吸虫病人血清30份, 采自皮试和抗体检测阳性并有生食溪蟹史的门诊病人; 华支睾吸虫病人血清50份, 采自粪检虫卵阳性者, 由广东省疾控中心提供; 囊虫病人血清30份由河南省囊虫病治疗中心提供;

收稿日期: 2008-02-28

* 基金项目: 浙江省钱江人才基金项目(No. 2006R10015); 浙江省医药卫生科技项目(No. 2005B001)

** 通讯作者: E-mail: xiaoxian-gan@hotmail.com

钩/蛔/鞭虫感染者血清 25 份由华中科技大学同济医学院寄生虫学教研室提供;健康人血清 100 份,为本院健康职工的血清。

1.4 DIGFA 检测

1.4.1 胶体金标记物制备: 0.01% 氯化金 (HAuCl₄) 溶液 100 mL 加热煮沸,加入 1% 柠檬酸钠 2 mL,继续加热至溶液呈酒红色。冷却后,用新鲜配制的 0.1 mL/L K₂CO₃ 溶液调整 pH 值至 7.5;加入 0.2 mg 鼠抗人 IgG4Fc 单抗混匀结合,加少量 PEG 20000,4~10℃ 高速离心浓缩胶体金标记物,4~20℃ 保存。

1.4.2 抗原点样: 在垂直流检测盒中央圆孔 NC 膜左侧点加 SEA (1 mg/mL) 0.5 μL,此为检测点 (T),右侧点加 0.2 mg/mL 人 IgG4 或 IgG 0.5 μL,此为质控点 (C),4~20℃ 保存备用。

1.4.3 检测操作流程: 取检测盒置一平面上,中央圆孔中加洗脱液 (PBST, pH 7.6) 2 滴,使加样孔上的 NC 膜湿润;加待检血清 25 μL,待完全渗入后加洗脱液 1 滴,洗去未结合抗体;再加胶体金标记物 1 滴,待渗入后加洗脱液 2 滴,肉眼判读结果。

1.4.4 结果判读: 中央圆孔 NC 膜上检测点

(T)、质控点 (C) 均出现红色圆点为阳性;仅有质控点 (C) 出现红色圆点、检测点 (T) 未出现红色圆点为阴性;质控点 (C) 未出现红色圆点仅留白色或淡粉色背景为检测无效。

2 结果

2.1 敏感性和特异性检测结果

DIGFA 检测急性血吸虫病人血清 33 人份, IgG4 阳性率为 90.9%, IgG 阳性率为 100%;检测慢性血吸虫病人血清 100 份, IgG4、IgG 的阳性率均为 98% (98/100),两者对血吸虫病患者血清的检出率差异无显著性意义 ($\chi^2 = 1.320$, $P > 0.05$)。检测肺吸虫、华支睾吸虫、囊虫、钩/蛔/鞭虫感染者及健康人血清共 235 人份,未检出 IgG4 阳性者,特异性为 100%;IgG 阳性共 10 人份,特异性为 95.7% (225/235),两者差异有显著性意义 ($\chi^2 = 10.217$, $P < 0.05$);在肺吸虫、华支睾吸虫、囊虫病人血清中, IgG 的阳性率 (交叉反应率) 分别为 13.3%、4% 和 3.3%,见表 1。

表 1 人血清中血吸虫特异性 IgG4、IgG 抗体检测
Tab.1 Detection of specific IgG4 and IgG in human sera

血清样本 Sera samples	样本数 No.	IgG ⁴		IgG	
		阳性数 No. of positive	阳性率 (%) Positive rate	阳性数 No. of positive	阳性率 (%) Positive rate
急性血吸虫病人 Acute schistosomiasis	33	30	90.9	33	100
慢性血吸虫病人 Chronic schistosomiasis	100	98	98	98	98
肺吸虫病人 Paragonimiasis	30	0	0	4	13.3
华支睾吸虫病人 Clonorchiasis	50	0	0	2	4
囊虫病人 Cysticercosis cellulosae	30	0	0	1	3.3
钩/蛔/鞭虫感染者 Ancylostomiasis/ascariasis/trichuriasis	25	0	0	0	0
健康人体检血清 Healthy people	100	0	0	3	3

2.2 治疗后血清中特异性 IgG4 和 IgG 阴转率比较

DIGFA 检测急性血吸虫病人治疗后 6 个月血清 25 份和治疗后 12 个月血清 24 份, IgG4 抗体

的阴转率分别为 52.0% 和 87.5%, IgG 抗体的阴转率分别为 16.0% 和 58.3%, 治疗后 6 个月和 12 个月 IgG4 阴转率均显著高于 IgG, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 结果见表 2。

表 2 治疗后 6 个月和 12 个月血清中血吸虫特异性 IgG4、IgG 检测

Tab .2 Detection of specific IgG4 and IgG in patient sera on 6 and 12 months post treatment

血清样本 Sera samples	样本数 No .	IgG4		IgG		χ^2 值 χ^2 value	P 值 P value
		阴转数 No . of antibody negative conversion	阴转率 (%) Antibody negative conversion rate	阴转数 No . of antibody negative conversion	阴转率 (%) Antibody negative conversion rate		
治疗后 6 个月 6 months post treatment	25	13	52.0	4	16.0	4.396	0.036
治疗后 12 个月 12 months post treatment	24	21	87.5	14	58.3	4.800	0.028

表 3 急、慢性血吸虫病人治疗后 6 个月血清中 IgG4、IgG 抗体阴转率比较

Tab .3 Detection of IgG4 and IgG in sera of patients with acute/chronic schistosomiasis on 6 months post treatment

血清样本 Sera sample	样本数 No .	IgG4		IgG	
		阴转数 No . of antibody negative conversion	阴转率 (%) Antibody negative conversion rate	阴转数 No . of antibody negative conversion	阴转率 (%) Antibody negative conversion rate
急性血吸虫病人 Acute schistosomiasis	25	13	52.0	4	16.0
慢性血吸虫病人 Chronic schistosomiasis	20	11	55.0	2	10.0

IgG4: $\chi^2=0.040, P=0.841$; IgG: $\chi^2=0.346, P=0.556$

检测慢性血吸虫病人治疗后 6 个月血清中特异性 IgG4 和 IgG 抗体，阴转率分别为 55% 和 10%。其结果与急性患者的阴转率比较，两者之间差异无显著性意义 ($P>0.05$)，结果见表 3。

3 讨论

本研究以 SEA 为抗原，采用 DIGFA 法检测血吸虫病人血清中特异性 IgG4，结果显示慢性病人阳性率为 98% (98/100)，与 ELISA 法检测结果相似 (Jassi m *et al.*, 1987; Hu *et al.*, 1999; 冯正等, 2000)，表明采用 DIGFA 法检测特异性 IgG4 也具有很高的敏感性。结果还发现，急性血吸虫病患者阳性率为 90.9% (30/33)，略低于慢性患者的阳性率，推测可能与感染过程中特异性 IgG4 上升较迟有关 (Kirinoki *et al.*, 2003)。

交叉反应是蠕虫病免疫诊断中的常见问题。蠕虫存在丰富的多糖抗原和磷酸胆碱 (PC) 抗原，是引起交叉反应的主要因素。IgG1、IgG2、IgG3 的可变区均有结合多糖抗原和 PC 抗原的决定簇，但 IgG4 较链区短小而缺乏柔韧性，其可变区不识别多糖和 PC 抗原，因此 IgG4 不与这些抗原产生反应 (Hamilton, 1987; Scott *et al.*, 1987)。用 SEA 抗原检测血清中总 IgG 时，与其他蠕虫间交叉反应率通常较高，而 IgG4 可避免

这样的非特异性反应。本研究检测了 235 份其他蠕虫感染者及健康人血清中的特异性 IgG4，未检出交叉反应，显示检测 IgG4 可以提高免疫诊断的特异性水平。

魏泉德和石佑恩 (1999) 用间接 ELISA 检测慢性病人血清 IgG4 的敏感性为 62.7%，治疗后 12 个月病人血清阴转率高达 97.7%；舒新华等 (2000) 应用 ELISA 比较不同发育期抗原检测 IgG4 的诊断效果，发现成虫膜抗原 (AMA) 检测的敏感性和治疗后阴转率最高，分别为 80% 和 95%。但冯正等 (2000) 用单抗 ELISA 检测 27 例慢性患者治疗前后 IgG4 水平，发现治疗后无明显阴转。不同研究者用 ELISA 检测治疗后病人血清中特异性 IgG4 时，敏感性和阴转率差异较大，其主要原因可能与不同研究者检测的灵敏度和阳性阈值确定有关。低感染度患者和治疗后病人的 IgG4 水平通常较低，如果检测方法灵敏并且选择的阳性阈值较低时，则治疗后病人和一些低感染度患者均示阳性，出现敏感性高、治疗后阴转率较低。反之，检测方法不够灵敏或设定阳性阈值较高时，治疗后阴转率虽然较高，但易漏检一些低感染度病人，导致敏感性较低。本研究采用 DIGFA 方法检测 IgG4，灵敏度和阳性阈值适中，不仅敏感性高 (96.2%)，而且治疗后 12 个月阴转率也较高 (87.5%)。提示血吸虫特异性 IgG4 检测，既有较好的诊断价值又有一定的疗效考核

意义。研究还发现无论是急性血吸虫病患者还是慢性血吸虫病患者, 有效治疗后 50% 以上的人 IgG4 抗体阴转, 两组阴转率差异无统计学意义。

以 SEA 为抗原 DIGFA 法检测血吸虫特异性 IgG4 短程抗体, 敏感性可与 ELISA 法及 IgG 检测相比, 且特异性和治疗后阴转率明显优于 IgG, 操作简便, 不需特殊仪器设备, 适用于血吸虫病流行病学调查, 值得进一步开发应用。

参考文献

- 冯正, 裘丽妹, 张永红, 等. 2000. 血吸虫病患者治疗前后特异性 IgG4 抗体的观察. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 18 (5): 291-292.
- 李永, 曾宪芳, 易新元, 等. 1997. 应用日本血吸虫病患者血清特异性抗体亚类考核疗效. 湖南医科大学学报, 22 (5): 381-383.
- 舒新华, 易新元, 曾宪芳, 等. 2000. 日本血吸虫不同发育阶段抗原检测 IgG 及 IgG4 的疗效考核价值. 中国现代医学杂志, 10 (8): 6-8.
- 魏泉德, 石佑恩. 1999. 检测特异性抗体用于日本血吸虫病疗效

- 考核的研究. 中国寄生虫病防治杂志, 12 (4): 300-302.
- Abd El-Aal, A. A., M. H. El-Arousy, A. M. El-Gendy *et al.* 2005 Early post treatment immunoglobulin profile in human schistosomiasis. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 35 (1): 167-180.
- Boctor, F. N. and J. B. Peter. 1990 IgG subclasses in human chronic schistosomiasis: over production of schistosome specific and non-specific IgG4. *Clin. Exp. Immunol.*, 82 (3): 574-578.
- Hamilton, R. G. 1987 Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clin. Chem.*, 33 (10): 1707-1725.
- Hu, M., M. Kirinoki, H. Yokoi *et al.* 1999 Human antibody isotype responses to *Schistosoma japonicum* egg antigen. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 30 (1): 24-28.
- Jassi, A., K. Hassan and D. Catty. 1987 Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol.*, 9 (6): 627-650.
- Kirinoki, M., M. Hu, H. Yokoi, *et al.* 2003 Immunoblot analysis of *Schistosoma japonicum* egg antigens with sera from patients with acute and chronic schistosomiasis japonica. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 34 (4): 702-707.
- Scott, M. G., D. E. Biles, P. G. Shackelford *et al.* 1987 Human antibodies to phosphocholine. IgG anti PC antibodies express restricted numbers of V and C regions. *J. Immunol.*, 138 (10): 3325-3331.

DIAGNOSTIC VALUE OF RAPID DETECTION OF SPECIFIC IgG4 IN SERA OF PATIENTS WITH *SCHISTOSOMASIS JAPONICA*

WANG Yue¹ SHI Xiao-Hua¹ TANG Yi^{1,2} YE Li-Hong³ GAN Xiao-Xian^{1*}

(1. Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

2. Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310006, China;

3. Ningbo Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315000, Zhejiang, China)

Abstract In order to determine the value of Schistosome specific IgG4 in diagnosis and evaluation of chemotherapy efficacy of schistosomiasis, a simple field applicable assay, dot immunogold filtration assay (DIGFA), was developed for rapid detection of schistosome specific IgG4 in the sera of individuals. Soluble egg antigen (SEA) and monoclonal antibody of *S. japonica* against human IgG4 were used as diagnostic reagents. Total 437 sera from patients with acute or chronic schistosomiasis, other helminthiasis and healthy donors were detected by DIGFA IgG4. The results showed that the sensitivities for acute and chronic patients were 90.9% (30/33) and 98% (98/100) respectively. All of sera from healthy donors and patients infected with other helminthiasis such as paragonimiasis, clonorchiasis, cysticercosis and intestinal nematode showed negative result. 52.0% (13/25) and 87.5% (21/24) of cases showed SEA IgG4 negative on 6 months and 12 months post treatment respectively, and obviously higher than those of SEA IgG ($P < 0.05$). In conclusion, SEA IgG4 assay has higher specificity than SEA IgG assay with similar sensitivity. Moreover, antibody negative conversion rate of SEA IgG4 is obviously higher than that of SEA IgG post treatment. These results suggest that rapid detection SEA IgG4 with DIGFA will have an important role in the diagnosis and evaluation of efficacy of therapy of schistosomiasis japonica.

Key words *Schistosomiasis japonica*; IgG; IgG4; Immune gold filtration assay; Diagnosis; Therapy efficacy

* Author for correspondence