

- practice[J]. J Clin Lipidol, 2015(9):247-255.
- [13] Mora S, Buring JE, Ridker PM. Discordance of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol with alternative LDL-related measures and future coronary events[J]. Circulation, 2014, 129(5):553-561.
- [14] Master SR, Rader DJ. Beyond LDL cholesterol in assessing cardiovascular risk: apo B or LDL-P[J]. Clin Chem, 2013, 59(5):723-725.
- [15] Hopewell JC, Seedorf U, Farrall M, et al. Impact of lipoprotein(a) levels and apolipoprotein(a) isoform size on risk of coronary heart disease[J]. J Intern Med, 2014, 276(3):260-268.
- [16] Jacobson TL, Cardiovascular D. And contemporary management[J]. Mayo Clinic Proceedings, 2013, 88(11):1294-1311.

• 综述 •

血吸虫病实验诊断的研究现状

王雪峰 综述, 蔡爱玲, 周明莉[△] 审校

(湖北省血吸虫病诊疗中心, 湖北荆州市 434000)

关键词: 血吸虫病; 病原学检测; 免疫学检测; 核酸检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.13.030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)13-1824-03

血吸虫病是一种人畜共患寄生虫病。血吸虫感染引起的肝脏纤维化, 最终可导致患者继发门脉高压症等严重后果, 使患者丧失劳动能力、生活自理能力、甚至死亡^[1-3]。据报道, 全球 76 个国家和地区有血吸虫病流行, 受到不同程度感染的人群达 2 亿^[4]。血吸虫病的控制和消灭是一项长期而艰巨的任务, 需进一步加大传染源控制力度^[5-6], 提高诊断能力。目前血吸虫病实验诊断可分三大类, 分别为病原学诊断、免疫学诊断和核酸诊断。本文就近几十年来发展的血吸虫实验室诊断的研究现状介绍如下。

1 病原学检测

1.1 粪便检查 从粪便中查见虫卵或孵出毛蚴, 是确诊的依据。

1.1.1 直接涂片法 直接涂片后在显微镜下检查有无血吸虫虫卵。其检出率低, 在急性血吸虫患者的黏液便内较易查到虫卵。

1.1.2 加藤厚涂片法和改良加藤厚涂片法 其检出率高于直接涂片法, 可计算每克粪便中的虫卵数。在人群感染率 5% 以上的地区, 可用作常规查病方法和考核防治效果。

1.1.3 自然沉淀法 利用血吸虫卵比重较大、易于沉淀的特点, 将粪便沉淀一定时间后, 将沉淀在显微镜下涂片镜检观察有无血吸虫虫卵。此法检出率高于直接涂片法。

1.1.4 尼龙袋集卵法 将粪便调浆后置于上方的 40~60 目尼龙绢袋和下方的 260 目尼龙绢袋中, 淋水冲洗袋内粪渣, 使血吸虫虫卵集中在下方尼龙绢袋中, 在显微镜下镜检观察沉淀中有无血吸虫虫卵。其检出率与自然沉淀法相近或稍高。操作简单, 可缩短集卵时间, 便于现场查病及大规模检查。

- [17] Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status[J]. Eur Heart J, 2010, 31(23):2844-2853.
- [18] Erqou S, Thompson A, Di Angelantonio E, et al. Apolipoprotein(a) isoforms and the risk of vascular disease: systematic review of 40 studies involving 58,000 participants[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(19):2160-2167.
- [19] Sniderman AD, Williams K, Contois JH, et al. A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk[J]. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2011, 4(3):337-345.

(收稿日期:2016-03-05 修回日期:2016-05-15)

1.1.5 毛蚴孵化法 常用三角烧瓶孵化法。由于成熟日本血吸虫卵内的毛蚴在适宜温度、光线下, 在孵化水中可以很快孵出, 并在水中游动, 根据毛蚴的水中运动特征观察结果。但应区分孵化水中的原生动物、其他微生物或离子, 导致假性实验结果或干扰结果判定^[7], 从而得出假阳性结果。用自然沉淀法、尼龙袋集卵法收集的沉淀作孵化实验可提高检出率。在血吸虫低感染度地区, 主要采用毛蚴孵化法。目前, 普遍结合使用, 称为沉淀孵化法和尼龙袋集卵孵化法, 其检出率明显高于粪便查血吸虫卵的各种方法。2011 年起, 在《全国血吸虫病监测方案》中, 首次将尼龙绢集卵孵化法作为全国监测点病原学检查的标准方法之一^[8]。

1.2 肠黏膜活组织检查 通过直肠镜或乙状结肠镜夹取可疑含虫卵结节的黏膜组织, 压片镜检。根据形态或组织化学染色法鉴别虫卵死活。肠黏膜组织内查见活卵、近期变性卵可作为治疗的依据。但肠黏膜活组织检查有创伤性, 具有一定的危险, 无疗效考核价值。

2 免疫学检测

2.1 间接红细胞凝集试验(IHA) 将血吸虫可溶性虫卵抗原吸附于绵羊红细胞或人 O 型红细胞表面, 使其成为致敏红细胞, 致敏红细胞与患者血清中抗体相遇时, 在适宜条件下, 红细胞表面吸附的抗原和特异性抗体相结合, 形成肉眼可见的红细胞凝集现象。

2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA) 血清内含特异性抗体或抗原与载体上抗原或抗体特异性结合的试验方法, 其敏感性高、特异性强, 阳性符合率为 97.6% 左右, 假阳性率约为 2.6%, 是现今检查血吸虫病的主要免疫诊断方法。由于血吸虫循环抗

原没有种属特异性,因此这些方法不能区分感染的虫种^[9]。

2.3 胶体染料试纸条法试验(DDIA) 利用胶体染料标记虫卵抗原(SEA),通过层析法进行检测。具有高度敏感性,与其他寄生虫病的交叉反应率很低。该法适合于大规模的血吸虫患者群的筛选,操作方便易行。

2.4 环卵沉淀试验(COPT) COPT 为血吸虫病检测的特有方法,此法的缺点为反应时间较长,需在 48~72 h 后才能观察结果。在低度流行区的曼氏血吸虫病检测中,COPT 被认为是诊断血吸虫病的“金标准”^[10]。

2.5 斑点金免疫渗滤试验 该检测方法以硝酸纤维膜为载体,红色胶体金为标记物,定性检测人血清中的血吸虫虫卵抗体。其方法具有较高的敏感性,操作简便快捷,整个试验不需要特殊的仪器设备,适用于大规模的流行病学调查,又能作为个别病例单份检测的免疫学诊断工具^[11-12]。

2.6 皮内试验 皮内试验属 I 型或 IV 型变态反应,当受试者皮内注射少量血吸虫抗原后,如受试者感染血吸虫,抗原抗体发生特异性结合,血管活性物质释放,局部组织呈现红肿反应,即该试验为阳性。该法具有早期诊断价值,但无疗效考核价值,适用于流行病学调查的现场筛选。

2.7 间接荧光抗体试验(IFA) 先制作成切片抗原,将血吸虫病鼠的肝组织切片后附在载玻片上,−20 ℃ 条件下保存,试验前先将抗原片在室温下复温至少 30 min,将荧光素与抗免疫球蛋白抗体结合,制备成荧光素标记的第二抗体。利用抗原抗体特异性结合的特点,在荧光显微镜下观察试验结果。该方法特异性好且敏感性高。

3 核酸检测

3.1 普通聚合酶链反应(PCR) 使用 PCR 技术直接探查针对病原体来源的核酸片段,可确定有无病原体感染,该法特异、敏感、快速、简便、重复性好,易自动化,是一种较理想的基因诊断技术。

3.2 降落 PCR 降落 PCR 是一种改良 PCR,包括变性和退火两个步骤,Suzuki 等^[13]报道:应用降落 PCR 进行扩增,与其他感染人的血吸虫无交叉反应。在小鼠感染模型中,6 周 ELISA 才能在血清中检测到抗成虫及抗虫卵 IgG 抗体,感染 8 周后粪便中才能查到虫卵,而降落 PCR 于感染 2 周后血清中就可以检测到,具有很好的早期诊断价值,同时由于该方法直接用血清标本作为模板进行 PCR 扩增,无需血清标本 DNA 的抽取,使其更具有实用价值。

3.3 多重 PCR 多重 PCR 又称多重引物 PCR 或复合 PCR,是在同一反应体系里加入两对或多对引物,同时扩增出多个针对病原体的核酸片段,具有高效、高产率、能降低实验成本、加速实验进程等优点^[14]。Gobert 等^[15]曾报道:该方法与病原学检测方法高度相关,敏感性和特异性可分别达到 87.7% 和 100%。

3.4 巢式 PCR 巢式 PCR 试验中有两对引物,对第一对外引物进行第一轮扩增,其扩增片段与普通相似,将第二对内引物结合在第一轮扩增的 PCR 产物内部,这样第二轮 PCR 扩增片段短于第一轮扩增产物。由于使用了两对引物进行了两轮 PCR 扩增,这样增加了检测的敏感性和可靠性^[16]。刘爱平等^[17]报道:该方法具有极高的敏感性,在仅存在 3~5 对成虫感染的家兔血清中就能扩增到特异性目的条带,感染后 3 d 就可检测到。可用于日本血吸虫低感染度宿主血清的检测,具有

潜在的应用前景。

3.5 实时荧光定量 PCR 该法能对起始模板定量及定性分析,是 PCR 技术基础上发展起来的高度灵敏的核酸定量检测技术,因其实时、准确、定量、高度重复性、无需进行凝胶电泳的特点,在疾病检测方面颇受关注^[18],至今在其他领域行业中得到广泛应用。

3.6 PCR-ELISA PCR-ELISA 是一种在 PCR 扩增后借用 ELISA 的原理,使用酶标抗体,通过固相或液相杂交来实现定量检测的一种技术,具有 PCR 技术的高敏感性、核酸探针的特异性、酶标仪直接读取结果的客观性等优点,在生物医学领域方面得到了广泛的应用。该技术主要包括 3 个部分:PCR、扩增产物与探针的杂交、常规的 ELISA 酶标显色。Comes 等^[19]报道:最小检测限可达 1.3 pg 的基因组 DNA,且与其他种属的血吸虫基因组不发生交叉反应,其检测的敏感性和特异性分别可达 97.4% 和 85.1%。

3.7 环介导等温扩增技术(LAMP) LAMP 是一种新颖的恒温核酸扩增方法,不需要模板的热变性、温度循环、电泳等过程,利用一种链置换 DNA 聚合酶,在等温(60~65 ℃)条件下进行核酸扩增,1 h 左右完成,可直接肉眼判读结果。LAMP 具有简单快速、检测成本低、灵敏度高、特异性强的特点,且与曼氏血吸虫、肝吸虫无种属交叉反应。该技术不依赖任何专门的仪器设备,不同于其他核酸检测方法,可以实现现场高通量快速检测。现已被应用于非洲锥虫病、恶性疟原虫、甲型肝炎和一些鱼类寄生虫或病毒的诊断,从而为 LAMP 在日本血吸虫病的诊断和疗效考核中的应用提供了一种新的有效方法^[20-22]。

4 3 种实验室检测方法的比较

4.1 病原学检测方法 病原学检测方法敏感性低、漏检率高,但为血吸虫病诊断的金标准,是确诊血吸虫病的重要依据。粪便直接涂片法操作简单,但虫卵检出率低;毛蚴孵化法可提高急性血吸虫病感染的检出率;直肠镜活组织检查主要针对慢性特别是晚期血吸虫病感染者,有助于发现沉积于肠黏膜内的虫卵。

4.2 免疫学检测方法

4.2.1 抗体检测 如 COPT、IHA、ELISA、胶体金试纸条法(DDIA)等,虽具有较高的敏感性和特异性,但不能区分现症感染和既往感染,因此抗体检测用于血吸虫感染的临床诊断和疗效考核并不理想^[23],不能作为血吸虫病确诊依据,常出现过度治疗的状况,但可用于大规模的流行病学调查、防治效果评价和消除验证。

4.2.2 抗原检测 从理论上讲可以作为确定现症感染的理想方法,但是从已发展的应用单克隆抗体检测血吸虫循环抗原的诸多方法的应用效果来看,并不理想,对慢性患者的检出率低、特异性差,无法满足血吸虫病诊断的需求。

4.3 核酸检测方法 近年发展了多种核酸检测方法,如核酸分子杂交技术、PCR 技术、基因芯片技术等,均具有很好的敏感性和特异性,显示了广泛的应用前景,但因靶序列的选择、实验场所和专业仪器设备的限制暂未得到现场大规模普及应用。血吸虫的成虫寄生在宿主肠系膜静脉中,其不断排出的虫卵沉积在肝脏门静脉系统及肠系膜静脉中,死亡的成虫或虫卵的崩解产物及虫体生长发育过程中表膜脱落物将不断释放其核酸片段,可出现在宿主的粪便、血液、尿液及其他一些标本中。因

此,通过检测这些核酸片段即可诊断血吸虫的感染。迄今为止,国内外研究人员已进行了很多的研究。

临幊上因为血吸虫病的症状不典型,缺乏特异性的检测手段,如特异性血清学检查和影像学检查,早期粪便虫卵检测亦可为阴性,故临幊上早期确诊率低、误诊率高^[24],应引起临幊医师的重视。目前,经过多年有效防治我国的血防工作取得了举世瞩目的成绩,大部分血吸虫病流行区已经被消灭或控制,但形势依然严峻^[25-27]。目前我国许多血吸虫病流行地区处于低度传播或低度流行状态,这种流行态势对目前流行区常用诊断方法的可靠性提出了挑战,并对现有诊断方法的改进或新诊断方法的研发提出了新的需求。现阶段需要更高敏感性、特异性的诊断方法,为血吸虫病的诊断、治疗和疗效考核提供依据,为及时修订与出台相应的防控策略提供保障。

参考文献

- [1] 罗雪平,陈殿慧,谢红艳,等.日本血吸虫感染小鼠肠系膜淋巴结 Th17 细胞的免疫应答[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2012,30(4):258-261.
- [2] Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, et al. Helminth infections: the great neglected tropical diseases[J]. J Clin Invest, 2008, 118(4):1311-1321.
- [3] Gryseels B, Polman K, Clerinx J, et al. Human schistosomiasis[J]. Lancet, 2006, 368(9541): 1106-1118.
- [4] Engels D, Chitsulo L, Montresor A, et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research[J]. Acta Trop, 2002, 82(2): 139-146.
- [5] 郭家钢.中国血吸虫病综合治理的历史与现状[J].中华预防医学杂志,2006,40(4):225-228.
- [6] 陈红根,曾小军,熊继杰,等.鄱阳湖区以传染源控制为主的血吸虫病综合防治策略研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2009,21(4):243-249.
- [7] 朱蓉,秦志强,冯婷,等.全国血吸虫病监测点现场病原学检测效果及质控评估[J].中国血吸虫病防治杂志,2013, 25(1):11-15.
- [8] 张利娟,朱蓉,党辉,等.2011 年全国血吸虫病监测点疫情分析[J].中国血吸虫病防治杂志,2012,24(6):627-631.
- [9] Agnew A, Fulford AJ, De Jonge N, et al. The relationship between worm burden and levels of a circulating antigen (CAA) of five species of Schistosoma in mice[J]. Parasitology, 1995, 111(1):67-76.
- [10] Noya O, Alarcón De Noya B, Losada S, et al. Laboratory diagnosis of Schistosomiasis in areas of low transmission: a review of a line of research[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002, 97(1):167-169.
- [11] 蒋守富,邱倩雯,刘静,等.微量快速检测血吸虫抗体的斑点免疫金渗滤法试剂盒研制[J].中国血吸虫病防治杂志,2009,21(6):500-502.
- [12] 鞠川,冯正,胡薇.日本血吸虫病免疫诊断方法的研究进展[J].国际医学寄生虫病杂志,2006,33(5):250-255.
- [13] Suzuki T, Osada Y, Kumagai T, et al. Early detection of Schistosoma mansoni infection by touchdown PCR in a mouse model[J]. Parasitol Int, 2006, 55(3):213-218.
- [14] Caliendo AM. Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(4):326-330.
- [15] Gobert GN, Chai M, Duke M, et al. Copro-PCR based detection of Schistosoma eggs using mitochondrial DNA markers[J]. Mol Cell Probes, 2005, 19(4):250-254.
- [16] 戴洋,朱荫昌.血吸虫病核酸诊断技术的研究进展[J].国际医学寄生虫病杂志,2011,38(6):375-380.
- [17] 刘爱平,杨巧林,郭俊杰,等.巢式 PCR 法检测日本血吸虫低感染度宿主血清 DNA 的研究[J].苏州大学学报(医学版),2010,30(5):915-917.
- [18] O'connor L, Glynn B. Recent advances in the development of nucleic acid diagnostics[J]. Expert Rev Med Devices, 2010, 7(4):529-539.
- [19] Comes LI, Dos Santos ML, Enk MJ, et al. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of Schistosoma infection in feces[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(4):664.
- [20] Thekisoe OM, Kuboki N, Nambota A, et al. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis[J]. Acta Trop, 2007, 102(3):182-189.
- [21] Poon LL, Wong BW, Ma EH, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting Plasmodium falciparum DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification[J]. Clin Chem, 2006, 52(2):303-306.
- [22] Yoneyama T, Kiyohara T, Shimasaki N, et al. Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. J Virol Methods, 2007, 145(2):162-168.
- [23] Lin DD, Xu JM, Zhang YY, et al. Evaluation of IgG-ELISA for the diagnosis of Schistosoma japonicum in a high prevalence, low intensity endemic area of China[J]. Acta Trop, 2008, 107(2):128-133.
- [24] 柳斌,陈美玲,韩继,等.社区卫生机构急性血吸虫病误诊 14 例分析[J].中外医疗,2010,29(29):149.
- [25] 郝阳,郑浩,朱蓉,等.2009 年全国血吸虫病疫情通报[J].中国血吸虫病防治杂志,2010,22(6):521-527.
- [26] 雷正龙,郑浩,张利娟,等.2010 年全国血吸虫病疫情通报[J].中国血吸虫病防治杂志,2011,23(6):599-604.
- [27] 苏川.我国常用血吸虫病诊断方法面临的问题与展望[J].中华地方病学杂志,2013,32(6):593-594.