

寄生虫感染的免疫诊断

发展中的诊断方法有助于防治折磨九亿多人的寄生虫病

John B. Castelino

寄生虫感染是世界上引起人类疾病和痛苦的主要原因之一。病症表现从疟疾的发烧到身体的变形，例如某些丝虫感染造成的“河盲”和象皮病。寄生虫病削弱了人的劳动生产能力。在这些疾病已成为地方病的地区内遇到的人情淡漠，也可直接归因于这类病的传染。在极端情况下，人们或者直接因寄生虫感染而死亡，或者由于寄生虫感染而受摧残致弱的身体因病毒、细菌、营养不良或其它原因引起的疾病而死亡。

Castelino先生是机构生命科学处工作人员。

人们愈来愈认识到健康和生命质量在社会经济发展中的重要性。因此，对于热带疾病的研究，国际上日益关注，值得一提的是联合国开发计划署（UNDP）、世界银行及世界卫生组织（WHO）关于热带疾病研究与人员培训的专门计划。在该专门计划内指定须加重视的六种疾病中，有五种是寄生虫病——丝虫病、利什曼病、疟疾、血吸虫病和锥虫病。

尽管寄生虫病是研究的重点，但它的流行看来仍然很严重。约2.5亿人患丝虫病，相同数目的人患血吸虫病，约4亿人居住在疟疾流行区，而每年有5千万疟疾患者，其中1百万人死亡。可以预料，要是不对寄生虫感染采取有效的防治措施，那么开发项目的扩大，例如灌溉和重新定

肯尼亚生物医学研究中心的一位医师在为患者抽血作寄生物抗原测定。
(来源：KBRC，内罗毕)



居规划,以及热带人口密度的不断增长,将使这种情况进一步恶化。

显然需要有一些临床诊断寄生虫感染的技术,以便实施防治措施。还需要用这些技术来研究寄生虫感染的流行病学,即在公众中的传播方式,和查出过去患过寄生虫病的人或正在传播寄生虫病而又没有什么临床症状的人。

传统的诊断一直基于用显微镜检查粪便、尿、血液或人体活组织中的寄生虫或虫卵。但就诊断和流行病学来说,人们愈来愈认为这种方法不切合实际。当受检查的体液或粪便中即使查出也只是很少几个寄生虫或虫卵时,例如轻度感染、潜伏期的早期、慢性感染的晚期或寄生虫仅一天中的特定时间才出现在体液中的那些感染,如丝虫感染,情况尤其如此。

诊断方法

人体抗寄生虫的防御系统之一是人体的免疫系统。在寄生虫身上或寄生虫体内,以及在它们的分泌物或排泄物中,有许多蛋白质。为了抵抗其中一些蛋白质(抗原),人体能产生另一些复杂的蛋白质分子(抗体),这种抗体通过与抗原结合而中和抗原。测定这些抗体或抗原的技术提供了另一种诊断方法。这种利用抗体和抗原免疫结合反应的诊断方法叫做免疫诊断。测定这些抗体或抗原的分析方法叫做免疫测定法。

60年代,免疫测定法在寄生虫病研究中的作用得到公认。人们不仅看到免疫测定法在实验室中的作用,而且也看到它在免疫诊断和流行病学领域中的作用。最常用的技术是基于抗体和抗原之间产生肉眼可见的凝集物或沉淀物的反应。人们发现这些技术是有用的,但有时灵敏度不够。近来,用放射性核素、酶或荧光物质标记的试剂的免疫测定法已经很普遍了,因为它们在探测抗原和抗体方面有潜在的高灵敏度。

放射免疫测定法(RIA)及有关步骤能够提供代替经典的寄生虫学检查的诊断方法。这种新的测定法应当经济、快速、技术上简便,并完全适合大规模流行病学普查的需要,尤其是适合对不同的国家和国际防治规划效果进行评价。

在鉴定化学治疗的疗效和检查用显微镜查不出寄生虫的寄生虫感染时,特别需要免疫测定法。在这方面,检查抗体的适宜的测定法还很很成熟。不过,抗体测定具有能给出受感染宿主免疫反应迹象的优点。在特异抗体明显参与免疫防御的那些寄生虫感染中,如疟疾和血吸虫病,抗体的免疫测定法可以鉴别机体的防御反应。这是寄生虫感染免疫学防治研究战略的一条重要线索。

寄生虫的抗原测定是近来代替抗体测定的一种方法,

几个研究组正在研制通常以标记的抗体为基础的测定系统。现在来看,测定宿主血清和尿中寄生虫放出的抗原量是可行的,原子能机构通过合作计划帮助评价这种测定方法。

由于酶和荧光物示踪剂可供使用,须考虑示踪剂的选择。利用放射性核素示踪剂容易提供被测抗体或抗原的数量。此外,由于放射性测量中非特性信号低,放射性核素示踪剂在抗原检查测定法的发展阶段特别有价值。测定法一经建立,非同位素标记(如酶)同样适合于常规应用。确实,这类示踪剂在很多情况下具有一些优点,因此放射性核素在该领域的作用逐渐减少。

尽管如此,放射性核素示踪剂还会继续使用。测定非同位素示踪剂的精密设备的费用不比放射性计数器的费用低,而且放射性核素计数装置已经广泛应用。多年来机构在利用放射性核素作免疫测定方面所积累的专门知识也直接适用于其它示踪剂,这种专门知识不仅在发展灵敏的测定方法方面,而且在把技术转移给不发达成员国方面,将继续发挥作用。

放射免疫测定法的重要作用

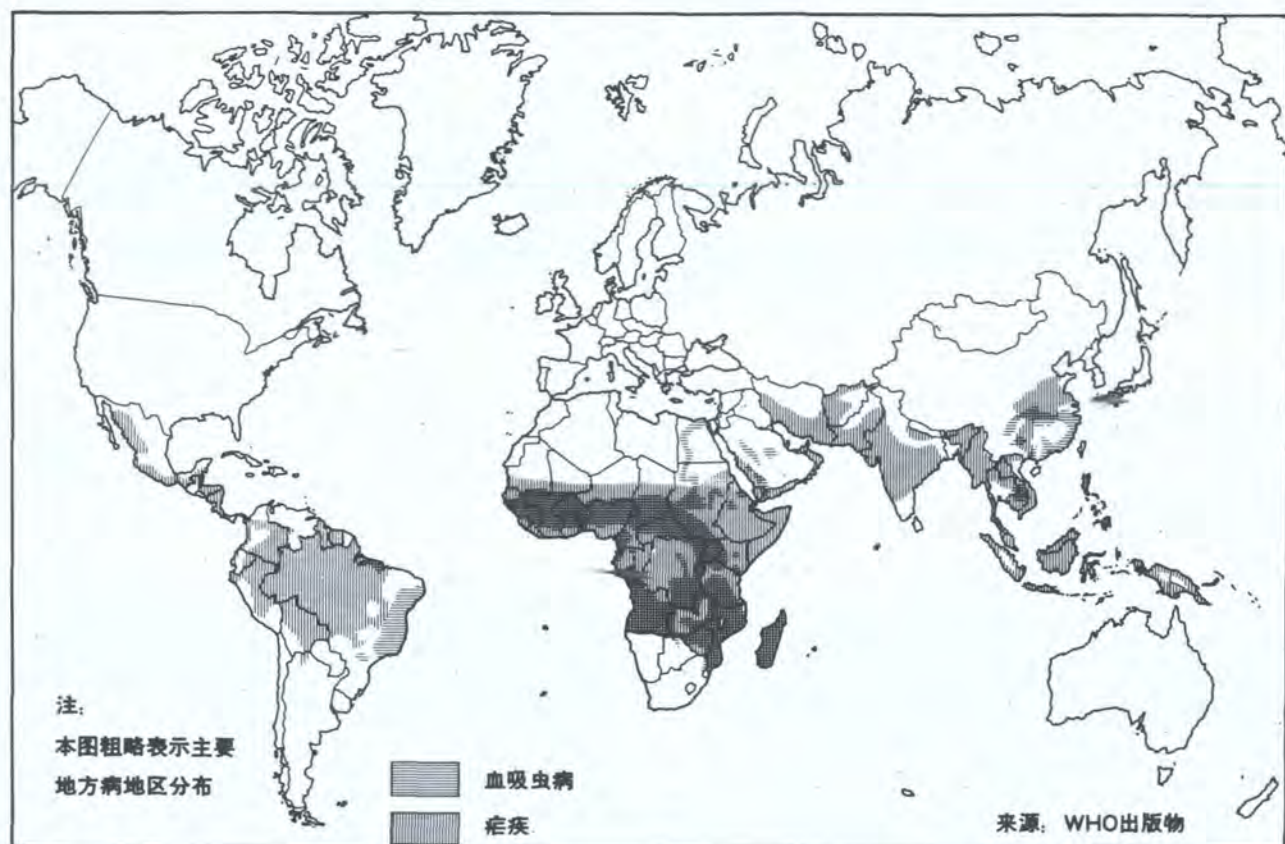
免疫测定的基本原理,是约30年前在放射性标记的胰岛素与胰岛素抗体(抗胰岛素抗体)相结合的研究中所建立的。^{*}放射免疫测定法的基础是通过观察奠定的,即在测定中观察标记的胰岛素如何被未标记的胰岛素所代替。标记的和未标记的胰岛素在与抗胰岛素抗体相结合的过程中,它们之间的竞争(可以预测,竞争的结果取决于不同试剂的相对浓度)导致竞争性结合测定法的形成。这些方法已经被用在不同情况下对体液中存在的痕量物质作定量测定。

采用免疫试剂(抗体或寄生虫抗原)和放射性核素、酶或荧光物的免疫测定法,有可能在免疫诊断和流行病学中起重要作用。它们的灵敏度高,所用的寄生虫抗原或患者的血清量少,适用于大规模普查并能够得出定量的结果。

免疫诊断的目标

寄生虫感染的免疫诊断研究目标,是建立快速、经济和技术上简单易行的测定方法。这些测定方法适用于流行病学普查,以评价各国的或国际的寄生虫感染流行区防治规划的效果。应当提供一些灵敏度高的、并是每种寄生虫感染特有的试验方法,这样,在直接用寄生虫学检查不出寄生虫时,就可以采用免疫诊断法。这是流行病学普查中应当考虑的一件重要的事情,因为一般公认,在寄生虫病流

^{*} S.A. Berson, R.S. Yallow, A. Bauman, M.A. Rothschild, and K. Newerly, *Journal of Clinical Investigation* 35 (1956).



疟疾和血吸虫病分布

行区受到感染的人中只有一部分人会出现临床症状。

免疫测定方面的研究还需要提供一些评价化学治疗或其它治疗的效果, 和从而可以对治疗进行监测的方法。最后, 还应当提供一些检验方法来鉴定那些对寄生虫感染产生免疫力的人。这类检验方法, 在将来实现接种抗寄生虫疫苗时, 对评价疫苗计划的效果将是有价值的。

鼓励新的研究

可是, 放射免疫测定法及有关步骤的发展还不能广泛代替常规技术。主要问题是商业上对研制成套测定仪器的压力很小, 同时也缺少良好的试剂。免疫测定法的特异性和灵敏度取决于技术和所用的试剂。目前, 由于缺少特定的试剂以及由此而造成的假阳性和假阴性反应, 免疫测定法还存在一些局限性。

人们已普遍认识到需要改进用于个别研究或流行病学研究的免疫诊断测定法的重要性。这体现在联合国开发计划署、世界银行和世界卫生组织的热带疾病研究和人员培训专门计划所确立的优先考虑项目中, 也体现在原子能机构关于寄生虫病分计划的优先考虑项目中。分离技术方面的新进展以及用遗传工程和生物工艺学生产抗原和抗体, 预示着经过改进的、采用放射性核素和其它示踪剂的血清免疫诊断测定法具有光明的发展前景。世界卫生组织和原子能机构正在促进这种发展。

选择免疫测定的抗原

抗寄生虫抗体的任何免疫测定法都将取决于抗原的质量。一种合适的抗原应当能同存在于所有受感染患者身上的抗体起反应。这种抗原应该是这类寄生虫特有的, 因此它不与其它种类寄生虫感染产生的抗体起反应。寄生虫具有一个十分复杂的抗原族, 其中许多抗原与其它寄生虫类的抗原相似。必须把这种特异抗原同其它寄生虫类的抗原分离开。此外, 抗原应当没有宿主物质。寄生虫与宿主组织紧密结合, 如疟原虫, 就是一个大问题。

还应当得到数量足够进行大规模普查而费用又合适的抗原。假定约1克曼氏裂体吸虫能制备1—3毫克纯净的特种抗原, 那么可以认为, 分析方法必须灵敏到足以测出微量(每次测定 10^{-9} 克)的纯抗原。放射免疫测定法及其有关步骤具有这种灵敏度。

随着生物化学和遗传工程技术的发展, 分析抗原物质混合物的新方法以及免疫学上重要的抗原验证和分离的新方法已逐步形成。大多采用放射性核素示踪剂来鉴别有关抗原。机构关于研制抗血吸虫病疫苗的计划促进着用血吸虫制备这类抗原的研究。

单克隆抗体

为了对一种特定的抗原作出反应, 人体通常产生各种

免疫测定系统

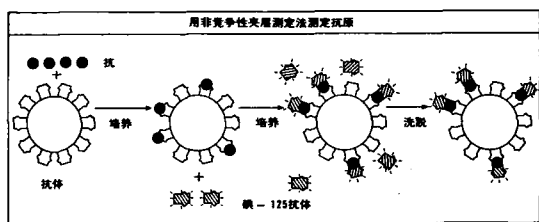
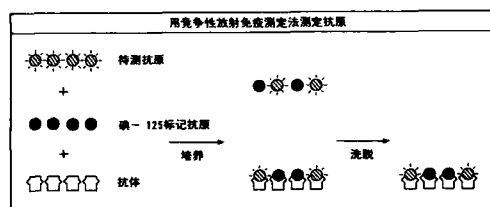
测定抗原、抗体和循环的抗体-抗原复合体的免疫测定系统基本上可分为两组:

●竞争性结合测定法。这种测定法取决于某一生物样品中的一种物质测定。其办法是让这种物质与一种类似的、但标记过的物质竞争,以同一限量的结合试剂起反应。

●非竞争性结合测定法。这种测定法是将待测物质(抗原或抗体)同大量的结合试剂(抗体或抗原)进行反应。结合试剂是用示踪剂直接标记或间接标记的。

这类试剂应是液相,经反应生成不可溶的复合体,而复合体可通过沉淀作用分离。另一方面,结合剂可以吸附在一种固体基体上,例如塑料基体,同时在这基体表面上发生反应。这种测定法称作“固相测定法”。被吸附到固体表面的结合剂与待测物质反应,然后分离出的物质同补充的结合试剂反应,这种测定法常称作“固相夹心测定法”。

下面是两个直观的例子。



各样的抗体。最近在生物工艺学方面的重大进展已有可能制成一些制剂,这些制剂中的单一成分的抗体可以分离出来。如果一种制剂中所有的抗体分子都相同,则称之为“单克隆抗体”或简称为“单克隆”。它们以相同的方式同一种抗原或一种抗原的一部分发生反应。

为验证寄生虫的抗原,一般在“固相夹心免疫测定法”

中采用单克隆抗体。在这种测定程序中,单克隆抗体被吸附到固相基体后同患者的血清起反应,同时从血清中分离出相应的抗原。这种夹心免疫测定是通过使这种被结合的抗原与同种抗体或与一种不同的单克隆抗体起反应才能完成,而不论同种抗体或不同的单克隆抗体,都是用一种放射性核素或其它示踪剂标记过的,并且也将与该抗原相结合。

抗体测定法

竞争性和非竞争性两种方法都已用来测定抗寄生虫抗体。抗体免疫测定法可以诊断寄生虫感染和验证免疫力,特别是用纯净的抗原作测定时。不过,人们公认,虽然抗体的免疫诊断可以反映现在或过去的寄生虫感染,但不能迅速区分二者,因为抗体在受治疗的患者体内持续存在。这就不能用抗体来评价化学治疗和其它治疗的疗效。而且,由于感染时间和抗体在血液循环中出现的时间之间有一个迟滞期,抗体免疫测定通常不能用来诊断早期感染。

这些不足促使人们研究用于测定循环寄生虫抗原的其它免疫测定法。目前,这些免疫测定法正用于许多寄生虫感染的调查研究。

循环寄生虫抗原免疫测定法

寄生虫抗原是由传染性的寄生虫释放到宿主体液中的,从理论上说,它们能提供感染活动期的一些标志,因为抗原的多少估计可以反映感染的程度。可是,多数循环抗原在患者体内诱发与此抗原相结合的抗体,并从血液循环中排除抗原。这些被结合的抗原被降解并排泄到尿中。某些寄生虫抗原由于很快从循环血液中排除或降解,可能不适合免疫诊断。另一些抗原可能在血液循环中的量很少,以致测定它们需要用非常灵敏的放射免疫测定法及有关步骤。

这种测定法的另一个困难是循环血液中有抗体存在。这些抗体有的是自由态,而另一些则完全地或部分地与循环的抗原相结合而变成抗原-抗体复合体。测试用的抗体试剂和患者身上的抗体之间将发生竞争。而且,在寄生虫感染期间血液中通常发现其它的非专一的抗体物质的存在,它们很可能干扰这种测定。此外,某些循环的寄生虫抗原可能不适用于免疫诊断,因为寄生虫抗原对一种寄生虫来说不是特有的。

国际原子能机构的协调研究计划

机构的免疫诊断计划集中在三种寄生虫感染上——丝虫病、疟疾和血吸虫病。丝虫病的诊断可能有困难，因为它的症状常同其它病的症状相混淆。再者，引起感染的丝虫不产生蚴；而这种蚴在循环血液中的存在，是用显微镜检查患者血样的传统诊断的基础。轻度、慢性感染或随后对这种感染治疗不彻底时，也存在类似的问题，尽管急性感染时这种情况较少。

机构的计划鼓励发展免疫测定法，这种方法能够有效地检查和测定血液、血清和尿中的寄生虫抗原。这项计划提供了合作研究的基础，通过研究筛选出几种针对寄生虫特种抗原而生产的单克隆抗体，以便利用地方病流行区内感染过和未感染过的人的血清和尿开展免疫诊断。然后把那些被认为合适的单克隆抗体，用于免疫诊断测定和有关步骤中，以评价免疫诊断在地方病流行区的适用性。通过这一计划，人们正在获得令人鼓舞的结果。

血吸虫病

在血吸虫病方面，本计划参加者已生产出许多具有免疫诊断价值的单克隆抗体，他们是荷兰莱顿大学、法国里尔巴斯德研究所及澳大利亚墨尔本的沃尔特—伊莱札·霍尔医学研究所。其中有些抗体已应用于夹层测定法。在夹层测定法中，同种抗体用作固相并作为标记抗体。这些抗体对血吸虫来说是特异的。利用这种抗体就能够检查受感染患者血清或尿中的血吸虫抗原。这是一项有意义的成果，因为在流行病普查中收集尿样比取血样容易。再者，预料验尿可以防止患者血清中常常存在的风湿病因子、免疫复合物、抗生物和抗抗体的干扰。

丝虫病和疟疾

里尔和墨尔本还制备出几种抗丝虫的单克隆抗体。把两种这样的抗体结合起来使用的夹层测定法可以测定病人血清中丝虫抗原。如血吸虫那样，尿样测定准确性较好，因为在受感染患者中和地方病防治中，没有发现误诊。

在疟疾方面，泰国曼谷马希多大学已制备成几种单克隆抗体。据初步评定，证明其中一种对诊断疟疾很有潜力。

除了人体寄生虫感染的免疫诊断外，机构还制订了一项检查疟疾媒介物计划。在认识上我们对各类蚊子在传播疟疾中所起的作用仍有未认识到的地方。

机构的计划鼓励应用免疫测定。免疫测定能够辨认在疟原虫传染期蚊中唾液腺中的孢子体。这项计划应用了一种能同孢子体抗原结合的单克隆抗体。这种抗体已由美国纽约大学医疗中心制备出来，并应用在夹层测定法中。据在冈比亚、布基纳法索和马里的初步鉴定，证明这种测定法在大范围内应用很有潜力。由于夹层测定法较快，并能对贮存几个月的蚊子干样品进行测定，预期这种测定法可以取代检查刚死的蚊子唾液腺的传统的显微镜的显检查法来确定疟疾孢子体是否存在。这种方法能够鉴别疟疾种类，并提供孢子体数量客观的定量估计。虽然以杀虫剂为基础的防治战略实施了几十年，但疟疾仍然存在，尤其是在非洲，必须加强这种夹层测定法的系统研究，以期更好地了解疟疾的动力学和流动病学。

最后，机构有一项在免疫测定法中鼓励应用放射技术以使抗寄生虫抗体固定在固体基体上的计划。法国里尔巴斯德研究所提供的抗血吸虫抗体已由日本东海村原子能研究所和美国华盛顿大学生物工程中心成功地固定在聚合物基体上。固定的抗体在室温下是稳定的，并保持大部分免疫诊断能力。

“汲条”在免疫测定领域的应用

流行病普查包括收集供感染免疫诊断用的血和尿，这些收集工作常常在远离实验室的地区进行。普查队在把样品送回中心实验室处理之前要花好几天时间收集样品。这一延误提出了如何将样品保持在冷冻条件下，以避免变质问题。机构计划试图研制用于象血吸虫病一类寄生虫感染的“汲条”。在这类寄生虫感染中，尿或血清中存在的特异寄生虫抗原耐热的。“汲条”可以是塑料条，其一端已聚合的一种稳定抗体能与现取的尿或血起反应以分离抗原。然后将塑料条干燥并送回中心实验室，等待用酶、发色物或放射性核素示踪剂作免疫测定。

原子能机构协调研究计划参加者正在学习用夹层测定法检查蚊体内的疟原虫孢子体。培训班设在纽约大学的医疗中心。人员来自尼日利亚、肯尼亚、泰国、埃及、苏丹、马里、塞拉利昂、荷兰和美国。

