

計畫編號：DOH99-DC-1005

行政院衛生署疾病管制局 99 年度科技研究發展計畫

製備廣東住血線蟲及犬蛔蟲感染的診斷試劑

研究報告

執行機構：高雄醫學大學

計畫主持人：顏全敏

研究人員：蔡宏津、鍾麗玉、吳宗聲

執行期間：99 年 1 月 1 日至 99 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

	頁 碼
封面	
目 錄	
中文摘要	(2)
英文摘要	(3)
一、前言	(4)
二、材料與方法	(6)
三、結果	(10)
四、討論	(13)
五、結論與建議	(17)
六、計畫重要研究成果及具體建議	(17)
七、參考文獻	(17)
八、圖、表	(23)
	共 (32) 頁

中文摘要

C57BL/6 小鼠感染廣東住血線蟲後，以 ELISA 檢查感染後 7、28 及 42 天血清抗青年期蟲體抗體，顯示抗體自感染後 7 天開始增加，至感染後 42 天達最高值，西方點墨分析顯示感染後 7 天至 42 天抗體均能與蟲體 204kD 的成份發生反應，因此該成份為選定的標的抗原。

BALB/c 小鼠感染廣東住血線蟲後 12 天，腹腔注射蟲體抗原 3 天後，無菌摘取脾臟細胞與 NS-1 腫瘤細胞融合，篩選 80 孔抗體效價較高者進行單株化培養，在 53 株單株抗體中有 5 株專一性高的單株抗體與蟲體 204kD 成份反應，選取 AcJ 84 單株抗體(分泌 IgG1)進行以 ELISA 及 immuno-PCR 偵測蟲體抗原敏感性的比較，結果後者的敏感性為前者的 1000 倍，實測病人血清的比較，以 ELISA 檢查結果，雖然 predictive value of a positive test 及 specificity 有達 0.9 的標準，但 overall accuracy、predictive value of a negative test 及 sensitivity 均未達 0.9 的標準，而以 immuno-PCR 檢查結果信賴度五項指標均達 0.9 的標準，因此以 AcJ 84 單株抗體藉 immuno-PCR 技術對廣東住血線蟲感染的分子免疫診斷是一值得信賴的方法。

關鍵詞：廣東住血線蟲、免疫診斷、分子免疫診斷

英文摘要

Sera antibody of C57BL/6 mice after infection with *Angiostrongylus cantonensis* were detected by ELISA using young-adult worm antigens. The antibodies increased at day 7 and were up to the high levels at day 42 after infection. Antibodies reacted with the antigen with a molecular weight of 204kD from the worms in western blot analysis. BALB/c mice were infected with *A. cantonensis* for 12days. Spleen cells were fused with NS-1 cells 3 days after peritoneal boost injection. Five clones of 53 monoclonal antibody recognized the component of 204kD of the worms. The detection of 204kD component of young-adult worm antigens using AcJ 84 McAb by immune-PCR was 1000 sensitive than that of the ELISA examination. In spite of the values of predictive value of a positive test and specificity in detection serum specimens of patients by ELISA were higher than 0.9, the values of overall accuracy, predictive value of a negative test and sensitivity were less than 0.9. However, the values of those evaluation items for reliability in detection sera of patients were all higher than 0.9. Thus, the results in the molecular-immunodiagnosis for patients with *A. cantonensis* infection by immune-PCR using AcJ 84 McAb were reliable.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*, imunodiagnosis, molecular immunodiagnosis.

一、前言

廣東住血線蟲(*Angiostrongylus cantonensis*)感染人體後，僅在腦中樞發育為青年期成蟲(young-adult)，然後蟲體死亡，但感染過程會引起嗜伊紅性腦膜炎及腦腦炎(eosinophilic meningitis and meningoencephalitis) (Kittimongkolma et al., 2007)，Hsieh (1959)即指出廣東住血線蟲為台灣最重要的人畜共通寄生蟲之一，而 Yii et al., (1975)最早發表一百多名廣東住血線蟲病患的流行病學調查，之後相繼有許多病例數較多的流行病學及病害相關的研究報告(Cheng et al., 1984；Hung & Chen, 1988；Hwang et al., 1994)，累計本土病例達數百名之多，近年來由於外籍勞工的引進，也曾暴發數次外勞的集體感染(Tsai et al., 2001a；Tsai et al., 2001b；Tsai et al., 2004)。廣東住血線蟲感染傳統的診斷方法為採集腦脊髓液檢查是否有嗜伊紅性白血球及蟲體，但腦脊髓液穿刺除了有些許風險外，腦脊髓液嗜伊紅性白血球增多並非廣東住血線蟲特異的免疫病理反應，而即使以改良式腦脊髓液採集法檢查蟲體，病人正確的診斷率也僅達約 50%(Hwang et al., 1994)，最近也有應用核磁共振診斷廣東住血線蟲病例(Tsai et al., 2003；Jin et al., 2008)，但診斷的正確率仍有待評估。

免疫診斷最早被發展用於輔助廣東住血線蟲感染的診斷，但廣東住血線蟲各發育期的蟲體抗原在 SDS-PAGE 的分析，顯示成份很複雜，而且與犬蛔蟲(*Toxocara canis*)、中華肝吸蟲(*Clonorchis sinensis*)、犬心絲蟲(*Dirofilaria immitis*)、豬蛔蟲(*Ascaris suum*)、海獸胃線蟲(*Anisakis simplex*)及糞小桿線蟲(*Strongyloides stercoralis*)之間有交差反應性，因此免疫診斷結果常發生偽陽性反應(Anderson et al., 1962；Bouthemy et al., 1972；Kamiya et al., 1972；Suzuki et al., 1975)即使用膠過濾技術(Gel filtration)(Yen & Chen, 1991)或免疫吸附技術(immuno- adsorbent technique)(Sato et al., 1974)純化免疫診斷用抗原，但用於廣東住血線蟲感染免疫診斷的敏感性及特異性仍無法令人滿意(Welch & Dobson, 1978；Chen, 1986；Yen & Chen, 1991；Eamsobhana et al., 2003；Eamsobhana et al., 2006)，雖然利用單株抗體純化青年期蟲體 204kD 的抗原成份，用於檢查病人血清抗體的敏感性及特異性分別達 91%及 98%(Chye et al., 2000)，但偵測抗體的模式，可能有抗體空窗期時偵測不到抗體及曾經感染過而抗體可長期存在體內的缺點，因此藉單株抗體偵測病人腦脊髓液蟲體抗原的模式是一正確的方向(Eamsobhana & Yong, 2009)。

近年來分子免疫診斷技術的發展，immuno-PCR 被廣泛的應用(Zhang et al., 2008)，本研究擬藉信賴度(reliability)的五項指標(Giorup, 1997)評估 immuno-PCR 用於廣東住血線蟲感染者分子免疫診斷的可行性。

二、材料與方法

1. 青年期蟲體粗抗原(whole worm extract)的製備：

以人工消化液將感染廣東住血線蟲第三期幼蟲(L3)的螺(*Biomphalaria glabrata*)消化後，在解剖顯微鏡下收集蟲體，每隻小鼠經口感染 50 隻 L3，感染後 21 天，小鼠經麻醉至死，腦置於含 0.15M PBS，pH7.2 的培養皿內，收集的青年期蟲體於組織研磨器內加入 4°C 10ml PBS 於冰浴內研磨萃取抗原，萃取液以等量乙醚混合，離心去除脂質層後，抗原液再以 30,000rpm 於 4°C 離心 30 分鐘，吸取上清液以 Bio-Rad 蛋白質呈色劑定量蛋白質含量後，分裝於-70°C 冷凍保存。

2. 腦脊髓液的收集

C57BL/6(B6)小鼠感染 30 隻 AcL3 後，分別於第 7、28、42 天犧牲，經乙醚麻醉後心臟採血，在 4°C 以 3,000rpm 離心 5 分鐘，吸取血清於-70°C 冷凍待檢。

3. 西方點墨分析：

如 Chang et al., (1990)所述，抗原與 sample buffer 混合煮沸 3 分鐘後以含 0.1% sodium dodecyl sulfate 的 12.5% polyacryamide 膠電泳，然後依分子量大小展開的抗原成份再以半乾式轉漬器轉漬到 NC-strip，將此 NC-strip 在 4°C 浸於含 5% 脫脂奶粉的 0.15M, pH7.2 PBS 隔夜，然後分別以感染小鼠的血清或單株抗體培養液與之反應，洗去未反應的成份，再加入含酵素的抗小鼠免疫球蛋白的二次抗體，(HRP-conjugated goat anti-mouse IgS)，洗去未反應的二次抗體，最後加入受質液 3,3'-diaminobenzidine 使反應部位呈色，即可知道受檢檢體和蟲體抗原那些成份發生反應。

4. 單株抗體製備

BALB/c 小鼠感染 30 隻 AcL3，感染後第 12 天腹腔注射全蟲萃取抗原液，3 天後無菌分離脾臟細胞與 NS-1 myeloma cells 混合藉 poly- ethylene glycol 進行融合，先以含 HAT 及 15% FCS 的 RPMI 1640 培養基篩選融合瘤，10 天後以 ELISA 挑選抗體效價較高的融合瘤，藉單一化培養技術(limiting dilution)製備單株抗體，最後與標的抗原及其他在文獻探討所述會引起交叉反應的蟲體抗原進行 ELISA 檢測，保留僅對標的抗原專一反應的融合瘤，進一步以免疫球蛋白種類檢測套

組檢測該單株抗體的 immunoglobulin isotypes 及 IgG subclass

5. 單株抗體收集及純化

取 6 至 8 週大之 BALB/c 小鼠，腹腔注射 0.5ml Pristane，7 天後取所製備之融合瘤細胞配成 2×10^7 cell /ml，每隻小鼠打入 0.5ml，1 至 2 週後，小白鼠腹部腫大，以針頭抽取腹水。去紅血球及細胞碎屑之後的腹水存放在 -20°C 以待進一步純化。

腹水可利用 Chye et al., (2000)的方法純化抗體，首先 Protein A Sepharose CL4B 浸於 0.1M PBS (pH8.0)以 4:1 比例混合的腹水，當腹水緩慢通過管柱後所收集到未與膠結合的抗體即是 IgM 抗體，而以 0.1M citrate buffer, pH6.0 洗出的抗體即是 IgG1 抗體。

6. Immuno-PCR 檢測

先取蛋白質濃度分別為 $500\mu\text{g}$ 的純化單株抗體和 $50\mu\text{g}$ biotinamido hexanoic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester (BAC- sulfoNHS)混合後，室溫繼續混合 1 小時，使單株抗體接上 biotin，然後在 ELISA plate 孔內加入 $50\mu\text{l}$ 純化的單株抗體($10\mu\text{g}/\text{ml}$)， 4°C 隔夜後，以 TBS 洗液(150mM NaCl, 20mM tris-HCl, pH7.5)洗去未吸附的抗體，隨後加入含 1% BSA 及

1mg/ml salmon sperm DNA 的 ETBS (TBS+0.1mM EDTA)於 37 °C 1 小時，以 TETBS buffer(ETBS 及 0.1% Tween 20)洗 5 次後加入系列稀釋的蟲體抗原或受檢血清，37°C 1 小時後用 TETBS 洗 12 次後加入結合 biotin 的單株抗體，37°C 反應 1 小時後，再用 TETBS 洗 12 次，加入 1µg/ml 的 streptavidin 50µl，在 37°C 反應 1 小時，用 TETBS 洗 12 次，最後加入 biotinylated PUC 19 在室溫反應 30 分鐘，用 TETBS 洗 12 次後再用 TBS 洗 5 次，然後加入限制酶 Bam HI，2 小時後收集上清液進行 PCR，於 PCR 微量反應管內加入 3µl 上述獲得的 template DNA，再加入 deoxynucleoside triphosphate，primer (5'-CAGCAATAAACCAGCCAGCC-3')(5'-GCCAACTTACTTCTGACAAC-3') (Zhang et al., 2008)，polymerase synthesis buffer，MgCl₂，Ampli Taq DNA polymerase，加無菌水使總量為 30µl，先以 95°C 5 分鐘進行 initial denaturation，然後以 95 °C 30 秒的 denaturation，55°C 1 分鐘的 annealing 和 72°C 1 分鐘的 extension 經 30cycles，最後 72°C 5 分鐘的 final extension，PCR 產物以 2% agarose 電泳後經 ethidium bromide 呈色觀察。

7. ELISA 檢測

取單株抗體(10µg/ml)50µl 於 ELISA plate 孔內，4°C 隔夜

後以洗液(含 0.5% Tween 20 的 PBS)洗 3 次，加入系列稀釋的抗原液或受檢血清，室溫靜置 1 小時，洗液洗 3 次後，依次加結合 biotin 的單株抗體及結合 streptavidin 的過氧化氫酶素 (HRP)，最後洗液洗 5 次後加入 HRP 的受質液 tetramethylbenzidine (TMB)，20 分鐘在暗室呈色後，加入 2N 濃硫酸後以 405nm 波長測吸光度。

8. 信賴度分析

依 Gjorup (1997)所述信賴度的評估包括五項指標，此五項指標均大於 0.9(90%)才能顯示研發的診斷試劑及配合的免疫診斷技術對病人的檢查結果是可信賴的。五項指標如下：

Overall accuracy：(真陽性+真陰性)人數/總受檢人數

Predictive value of a positive test：真陽性人數/(真陽性+偽陽性)人數

Predictive value of a negative test：真陰性人數/(真陰性+偽陰性)人數

Sensitivity：真陽性人數/(真陽性+偽陰性)人數

Specificity：真陰性人數/(真陰性+偽陽性)人數

三、 結果

1. B6 小鼠血清抗體及西方點墨檢測

如圖 1.所示，B6 小鼠血清抗體從感染前 0.19 ± 0.06 逐漸上升，感染後 7 天，28 天及 42 天抗體值分別為 0.47 ± 0.18 、 0.81 ± 0.23 及 1.17 ± 0.35 ，西方點墨分析如圖 2.所示，顯示隨感

染時間的增加，血清抗體與蟲體抗原從高分子量成份逐漸至中分子量的成份反應，而分子量 204kD 的蟲體成份均呈現反應帶。

2. 單株抗體的篩選

經免疫廣東住血線蟲抗原 BALB/c 鼠的脾臟細胞與 NS-1 細胞融合形成的融合瘤，經抗體篩選後，取 80 孔抗原效價較高者進行單株化擴充培養，最後有 53 株單株融合瘤成功擴充培養，以西方點墨分析結果，如圖 3.所示，共有 5 株單株抗體與蟲體 204kD 標的成份成陽性反應帶。

3. 單株抗體特性分析

5 株與標的抗原呈陽性反應的單株抗體，以犬蛔蟲、中華肝吸蟲、犬心絲蟲、豬蛔蟲、海獸胃線蟲及糞小桿線蟲等蟲體抗原以 ELISA 檢測，結果均無交叉反應，至於分泌抗體的穩定性，如表 1.所示，在持續繼代培養的抗體偵測，分別在培養 63 天至 115 天抗體仍呈陽性反應，其分泌的抗體分別為 IgM、IgG 及 IgG2a。

4. 單株抗體純化

ACJ84 融合瘤在 BALB/c 小鼠所誘發的腹水，經 staphylococcal protein A-sepharose CL4B 膠管柱層析，分別收

集未吸附的洗出液及以 0.1M citrate buffer, pH6.0 的洗出液，以 SDS-PAGE 分析成份純度，如圖 4.所示，未吸附的層析液顯示複雜的成份，而單株抗體 IgG1 的洗出液，呈現典型的 heavy 和 light chain。

5. ELISA 與 Immuno-PCR 敏感度的比較

廣東住血線蟲抗原系列稀釋成 $1\mu\text{g/L}$ 至 $10^{-4}\mu\text{g/L}$ ，分別以 AcJ84 單株抗體藉 ELISA 及 Immuno-PCR 偵測，結果如圖 5. 所示，ELISA 方法可偵測至 $10^{-2}\mu\text{g/L}$ 的抗原濃度，而如圖 6. 所示，Immuno-PCR 可偵測至 $10^{-4}\mu\text{g/L}$ 的抗原濃度。

6. Immuno-PCR 對血清檢體的檢測

如圖 7.所示，感染廣東住血線蟲的病患血清檢體，經 immuno-PCR 檢測，在分子大小約 2.67kb 呈現陽性反應帶，而未感染對照呈陰性反應。

7. ELISA 與 Immuno-PCR 對受檢血清檢體檢查結果的評估

受檢檢體共有 45 名感染者血清，其中有 20 名腦脊髓液檢查發現蟲體，其餘 25 名則未發現蟲體，但臨床診斷均顯示嗜伊紅性腦膜炎，另外有 36 名未感染血清對照組，以 ELISA 檢查結果，若只將檢體分為感染者與未感染者，則如表 2.所示，Overall accuracy 值為 0.88，陽性反應預測值(Pv+)為 0.97，陰

性反應預測值(Pv-)為 0.80，敏感值(Sensitivity)為 0.80，特異值(Specificity)為 0.97，若以 immuno-PCR 檢查，則如表 3.所示，五項值分別為 0.94、0.98、0.90、0.91、0.97，若將感染者血清檢體分別為腦脊髓液發現蟲體者及未發現蟲體者，則以 ELISA 檢查發現蟲體者的血清檢體，敏感值僅 0.80，其餘值均大於 0.90，而檢查未發現蟲體者的血清檢體，則有 3 項指標值均小於 0.90(表 2.)。以 immuno-PCR 檢查，僅在檢查未發現蟲體者的血清敏感值低於 0.90，其餘均高於 0.90(表 3.)。

四、討論

感染廣東住血線蟲病患的診斷，早期根據腦脊髓液發現大量嗜伊紅性白血球而診斷，隨後利用蟲體萃取液為抗原發展數種免疫診斷方法檢測病人血清抗體，但因蟲體成份複雜導致與其他感染交叉反應的發生(Bouthemy et al., 1972; Suzuki et al., 1975)，雖然有些學者嘗試膠層析法(gel filtration)製備部份純化的抗原，但免疫診斷的敏感性及特異性未達滿意程度(Kamiya et al., 1972; Chen, 1986)，也有學者嘗試藉 Sepharose 4B-CNBr 結合多株抗體來純化廣東住血線蟲抗原(Sato et al., 1974; Welch and Dobson, 1978)，但多株抗體的專一性也令人質疑，雖然 Chey et al., (2000)

發展單株抗體純化廣東住血線蟲青年期蟲體抗原分子量 204kD 的成份，用於檢測血清抗體獲得令人滿意的敏感性和特異性，但早期感染抗體的空窗期及治癒後抗體長期存在仍影響檢查結果的判讀。

為克服上述問題，檢測病人體內存在的病原體的循環抗原成份，被發展為一正確且可靠的免疫診斷方法(Smith et al., 1972; Phillips & Draper, 1975)，漸漸也被用於許多寄生蟲病患的免疫診斷(Reddy et al., 1984; Lutsch et al., 1988)，在大鼠感染廣東住血線蟲的實驗，也顯示血清中存在有廣東住血線蟲的循環抗原(Yamashita et al., 1979)，似乎用抗體檢查病患血清中廣東住血線蟲蟲體抗原成份是可行的，但隨後而來衍生一些問題有待克服，例如製備專一性高的抗體及對蟲體特定發育階段的抗體的製備。當融合瘤技術被開發後，單株抗體的製備克服了抗體專一性的難題，因此 Eamsobhana et al., (1972)及 Liang et al., (2005)發展抗廣東住血線蟲成蟲抗原 31kD 成份的單株抗體用於免疫診斷，Shih et al., (1991)也發展廣東住血線蟲第三期幼蟲 91kD 成份的單株抗體用於免疫診斷，但人體感染廣東住血線蟲後，開始產生臨床症狀就醫時，體內蟲體均發育為青年期的階段，因此成蟲及第三期幼蟲的抗原成份均非理想的標的成份。Chang et al., (1990)

發展廣東住血線蟲青年期 204kD 成份的單株抗體，應用於檢查病患腦脊髓液，獲得 97.6% 及 100% 的敏感性及特異性(Chey, et al., 1997)。

病人體內蟲體標的抗原的尋求，在單株抗體檢測此標的抗原占一極重要的角色，此標的抗原必須在感染早期即出現，才有早期診斷的效果，而且在發病過程仍能持續存在。廣東住血線蟲感染兔子的實驗，西方點墨分析兔子血清抗體，發現感染後 7 天，血清抗體即與青年期蟲體 204kD 成份發生反應，而且一直到慢性感染期均持續存在(Cheng et al., 1989)，本實驗在 C57BL/6 小鼠感染的實驗，與兔子的感染實驗有相同的結果，因此青年期蟲體 204kD 成份為一適當的標的抗原。

雖然以單株抗體藉 ELISA 檢測廣東住血線蟲病人脊髓液中 204kD 標的抗原，可獲令人滿意的檢查結果，但於血清檢查，敏感性僅達 81%(Chey et al., 1997)，採腦脊髓液送檢有一定的風險，因此檢測的檢體以血清為目標。Sano et al., (1992) 結合 ELISA 及 PCR 開發出敏感性及特異性極佳的 immuno-PCR 技術，本實驗先發展抗廣東住血線蟲青年期蟲體 204kD 成份的特異單株抗體，藉此來捕捉血清中此標的抗原，然後選取 PUC 19 plasmid DNA 為 reporter 分子，PUC 19 含 ampicillin resistance 基因，*lac Z*

和數種限制酶位置，先於 PUC 19 藉 primers 接上 biotin，其在免疫結合上單株抗體後，再用 BamHI 切下 PUC 19，最後藉 PCR 放大此 reporter 分子，因此預期可獲得極佳分子免疫診斷結果。

本實驗以 AcJ84 單株抗體及 biotinylated AcJ84 單株抗體藉 ELISA 來檢測含 1 μ g/L 及 10 倍系列稀釋的青年期蟲體抗原，結果可偵測到 10ng/L 的濃度，但以 immuno-PCR 檢查，結果可偵測到 0.1ng/L 的濃度，因此 immuno-PCR 的靈敏度為 ELISA 的 1000 倍。開發一免疫診斷技術用於疾病的輔助診斷，其信賴度受五項指標的評估，所有指標均須高於 0.9 為佳(Gjorup, 1997)，雖然藉 ELISA 檢查腦脊髓液發現蟲體的病人血清，五項指標僅感性未達 0.9，但仍不是一極佳的免疫診斷方訪，何況對整體送檢病人(含未發現蟲體者)的檢查，包括 overall accuracy、predictive value of a negative test 及敏感性均小於 0.9，但若藉 immuno-PCR 檢查這些相同的檢體，則僅在檢查未發現蟲體的病患敏感度小於 0.9(0.88)，其餘均達 0.9 以上，此三名病患可能為非廣東住血線蟲的其他蠕蟲類腦中樞的感染，或者感染蟲數極少，釋放的循環抗原先被體內抗體結合，導致體外檢測不到，以本實驗模式 immuno-PCR 仍為檢查廣東住血線蟲感染理想的分子免疫診斷方法。

五、 結論與建議

本實驗製備能與廣東住血線蟲青年期蟲體 204kD 成份專一反應的單株抗體 5 株，已知其中一株藉 immuno-PCR 檢測蟲體抗原，可偵測到 0.1ng/L 的濃度，敏感性高於 ELISA 的 1000 倍，實際應用於人體病例的檢查，信賴度的五項指標均大於 0.9，因此適合用於人體病例的分子免疫診斷。

六、 計畫重要研究成果及具體建議

如上述，本研究獲得 AcJ84 單株抗體，其特性為認識廣東住血線蟲青年期蟲體 204kD 成份，分泌的抗體為 IgG1，繼代培養持續 103 天仍穩定產生抗體，應用於 immuno-PCR 檢查蟲體抗原敏感性為 ELISA 的 1000 倍，實際用於人體病例的檢查，符合信賴度的五大指標，因此建議可以本實驗的模式做廣東住血線蟲感染病患的分子免疫診斷檢查。

七、 參考文獻

1. Anderson RI, Sadun EH, Rosen L, Weinstein PP, Sawyer T: The detection of antibodies in eosinophilic meningitis. *J Parasitol* 1962; 48: 15-16.
2. Bouthemy FA, Afchain D, Waattre P: Structure antigenique de nematode *Angiostrongylus cantonensis*; aspect immunologiques des relations

- host-parasite. *Ann Parasitol* 1972; 47: 531-50.
3. Chang JH, Yen CM, Chen ER: Characterization of monoclonal antibodies to young-adult worms of *Angiostrongylus cantonensis*. *Hybridoma* 1990; 9: 465-71.
 4. Cheng CW, Sato Y, Chen ER: Epidemiological and clinical observations on eosinophilic meningitis and meningoencephalitis of children caused by infection with *Angiostrongylus cantonensis* in southern Taiwan. *Ryuku Med J* 1984; 7: 1-9.
 5. Cheng CW, Sato Y, Chen ER, Otsuzu M: Application of ELISA on serodiagnosis of angiostrongyliasis, with special reference to the reactivity of the extracts from adult and young-adult worms. *Chin J Parasitol* 1989; 2: 32-46
 6. Chen SN: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Angiostrongylus cantonensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 398-405.
 7. Chye SM, Yen CM, Chen ER: Detection of circulating antigen by monoclonal antibodies for immunodiagnosis of Angiostrongyliasis. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 408-12.
 8. Chye SM, Chang JH, Yen CM: Immunodiagnosis of Human eosinophilic meningitis using an antigen of *Angiostrongylus cantonensis* L5 with molecular weight 204kD. *Acta Tropica* 2000; 75: 9-17.
 9. Eamsobhana P, Ongrotchanakun J, Yoolek A, Punthuprapasa P, Monkong N, Dekumyoy: Multi-immunodot for rapid differential diagnosis of eosinophilic meningitis due to parasitic infections. *J Helminthol* 2006; 80: 249-54.
 10. Eamsobhana P, Yoolek A, Kreethapon N: Blind multi-laboratory

- evaluation of an in-house dot-blot ELISA kit for diagnosis of human parastrongyliasis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34: 1-6.
- 11.Eamsobhana P, Yong HS: Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). *Int J Inf Dis* 2009; 13: 425-31.
 - 12.Eamsobhana P, Yong HS, Mak JW, Wattanakulpanich D: Detection of circulating antigens of *Parastrongylus cantonensis* in human sera by dot-blot ELISA and sandwich ELISA using monoclonal antibody. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28: 624-8.
 - 13.Gjorup T: Reliability of diagnostic tests. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 166(Suppl 76): 9-14.
 - 14.Hsieh HC: Outline of parasitic zoonoses in Taiwan. *Formosan Sci* 1959; 13: 99-108.
 - 15.Hung TP, Chen ER: Angiostrongyliasis (*Angiostrongylus cantonensis*). *Handbook of Clinic Neurol* 1988; 8: 545-561.
 - 16.Hwang KP, Chen ER, Chen TS: Eosinophilic meningitis and meningoencephalitis in children. *Acta Pediar Sinica* 1994; 35: 124-35.
 - 17.Jin EH, Ma Q, Ma DQ, He W, Ji AP, Yin CH: Magnetic resonance imaging of eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* following eating freshwater snails. *Chin Med J* 2008; 121: 67-72.
 - 18.Kamiya M, Klongkamnuankarn K, Tharavanji S: Fractionation study on haemagglutination antibodies in rats infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1972; 3: 397-402.

19. Kittimongkolma S, Intapan PM, Laemviteevanich K, Kanpittaya J, Sawanyawisuth K, Maleewong W: Eosinophilic meningitis associated with angiostrongyliasis: clinical features, laboratory investigations and specific diagnostic IgG and IgG subclass antibodies in cerebrospinal fluid. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38: 24-31.
20. Liang SH, Huang HC, Pan CW, Tan F: Detection of *Angiostrongylus cantonensis* circulating antigen by monoclonal antibodies. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 3057-61.
21. Lutsch C, Cesbron JY, Henry D, Dessaint JP, Wandji K, Ismail M, Capron A: Lymphatic filariasis: detection of circulating and urinary antigen and differences in antibody isotypes complexed with circulating antigen between symptomatic and asymptomatic subjects. *Clin Exp Immunol* 1988; 71: 253-60.
22. Phillips TM, Draper CC: Circulating immune complexes in schistosomiasis due to *Schistosoma mansoni*. *Br Med J* 1975; 2: 467-77.
23. Reddy MVR, Malhotra A, Harinath BC: Detection of circulating antigen in bancroftian filariasis by sandwich ELISA using filarial serum IgG. *J Helminthol* 1984; 58: 259-65.
24. Sano T, Smith CL, Cantor CR: Immuno-PCR: Very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 1992; 258: 120-2.
25. Sato Y, Suzuki T, Yamashita T, Sekikawa H, Otsuru T: Studies on immunodiagnosis of angiostrongyliasis 4. Purification of antigen by using immunoadsorbent. *Jpn J Parasitol* 1974; 23: 42-5.
26. Shih HH, Chen SN: Immunodiagnosis of angiostrongyliasis with monoclonal antibodies recognizing a circulating antigen of monoclonal

- weight 91,000 from *Angiostrongylus cantonensis*. Int J Parasitol 1991; 21: 171-7.
27. Smith AR, Karr LJ, Lykins JD, Ristic M: Serum-soluble antigens of malaria: a review. Exp Parasitol 1972; 31: 120-5.
28. Suzuki T, Sato Y, Yamashita T, Sekikawa H, Otsuru M: *Angiostrongylus cantonensis*: Preparation of a specific antigen using immunoabsorbent columns. Exp Parasitol 1975; 38: 191-201.
29. Tsai TH, Liu YC, Wann SR, Lin WR, Lee SJ, Lin HH, Chen YS, Yen MY, Yen CM: An outbreak of meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in Kaohsiung. J Microbiol Immunol Infect 2001a; 34: 50-6.
30. Tsai HC, Liu YC, Kunin CM, Lee SS, Chen YS, Lin HH, Tsai TH, Lin WR, Huang CK, Yen MY, Yen CM: Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. Am J Med 2001b; 111: 109-14.
31. Tsai HC, Liu YC, Kunin CM, Lai PH, Lee SS, Chen YS, Wann SR, Lin WR, Huang CK, Ger LP, Lin HH, Yen MY: Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* associated with eating raw snails: correlation of brain magnetic resonance imaging scans with clinical findings. Am J Trop Med Hyg 2003; 68: 281-5.
32. Tsai HC, Lee SS, Huang CK, Yen CM, Chen ER, Liu YC: Outbreak of eosinophilic meningitis associated with drinking raw vegetable juice in southern Taiwan. Am J Trop Med Hyg 2004; 71: 222-6.
33. Welch JS, Dobson C: Immunodiagnosis of parasitic zoonoses: comparative efficacy of three immunofluorescent test using antigen purified by affinity chromatography. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978; 72: 282-8.

34. Yamashita T, Saito Y, Sato Y, Takai A, Watanabe H, Otsuru M: Circulating antigens and immune complexes in the serum of rats infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Jpn J Parasitol* 1979; 28: 393-401.
35. Yen CM, Chen ER: Detection of antibodies to *Angiostrongylus cantonensis* in serum and cerebrospinal fluid of patients with eosinophilic meningitis. *Int J Parasitol* 1991; 21: 17-21.
36. Yip CY, Chen CY, Chen ER, Hsieh HC, Shih CC, Cross JH, Rosen L: Epidemiologic studies of eosinophilic meningitis in southern Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 1975; 24: 447-54.
37. Zhang W, Bielaszewska M, Pulz M, Becker K, Friedrich AW, Karch H, Kuczius T: New immune-PCR assay for detection of low concentrations of shiga toxin 2 and its variants. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1292-7.

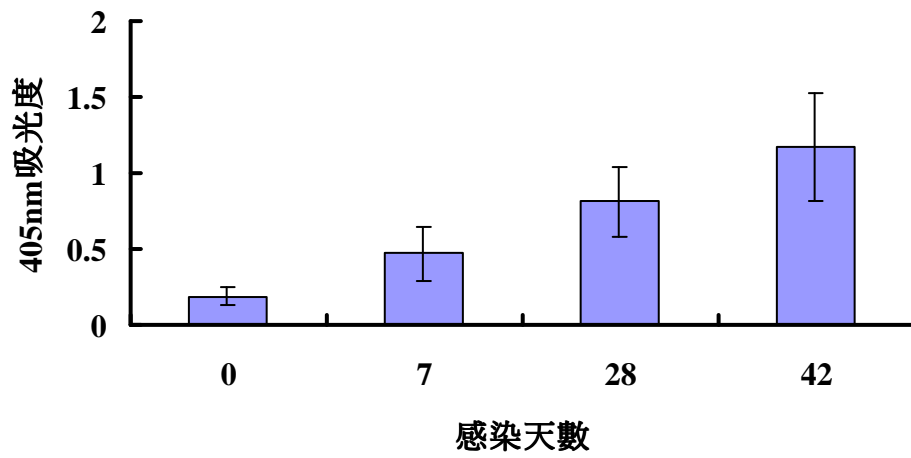


圖 1. 以廣東住血線蟲青年期蟲體抗原藉 ELISA 檢查 C57BL/6 小鼠感染 30 隻蟲體後，血清抗體的變化。

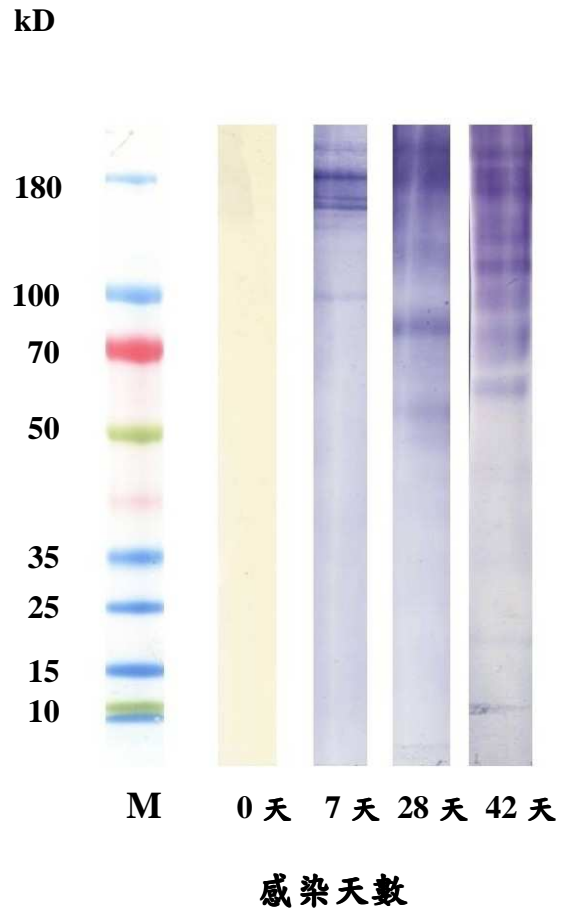


圖 2. 廣東住血線蟲青年期蟲體抗原經 SDS-PAGE 並轉漬至 NC-paper 後，感染不同天數 C57BL/6 小鼠血清西方點墨分析結果

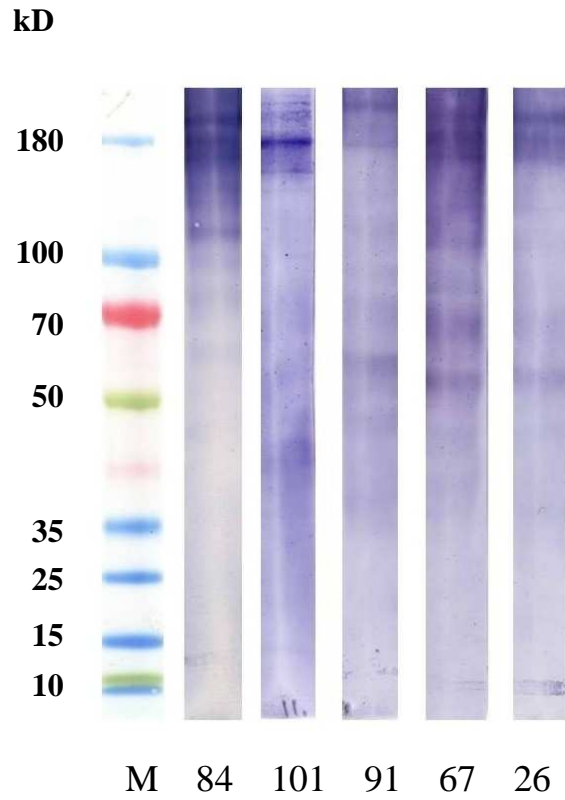


圖 3. 廣東住血線蟲青年期蟲體抗原經 SDS-PAGE 並轉漬至 NC-paper 後，5 株單株抗體西方點墨分析結果

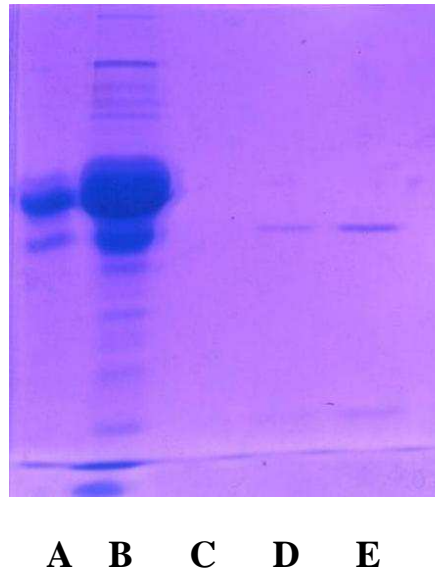


圖 4. AcJ 84 誘發 BALB/c 小鼠腹水抗體的純化。

腹水經 staphylococcal protein A-sepharose CL4B 膠管柱層析，Lane A 及 B 為未吸附層析液，Lane C 及 D 及 E 為 0.1M citrate buffer 洗出液，經 SDS-PAGE 證實純化出 IgG1 抗體。

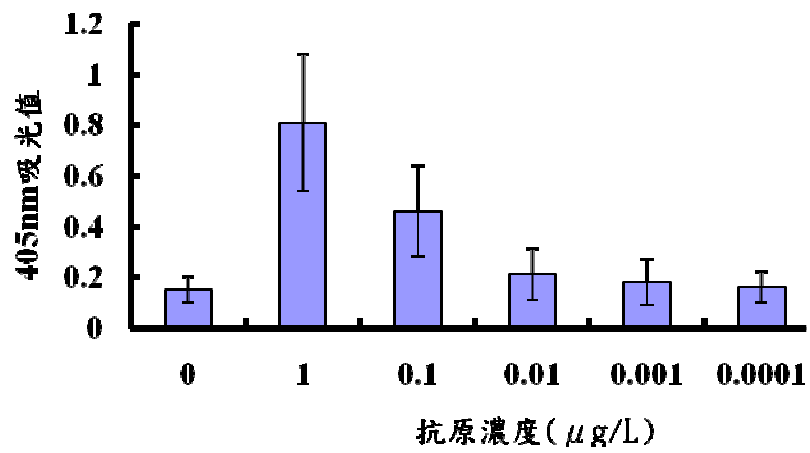


圖 5. 以 AcJ 84 藉 ELISA 檢測不同濃度青年期蟲體抗原

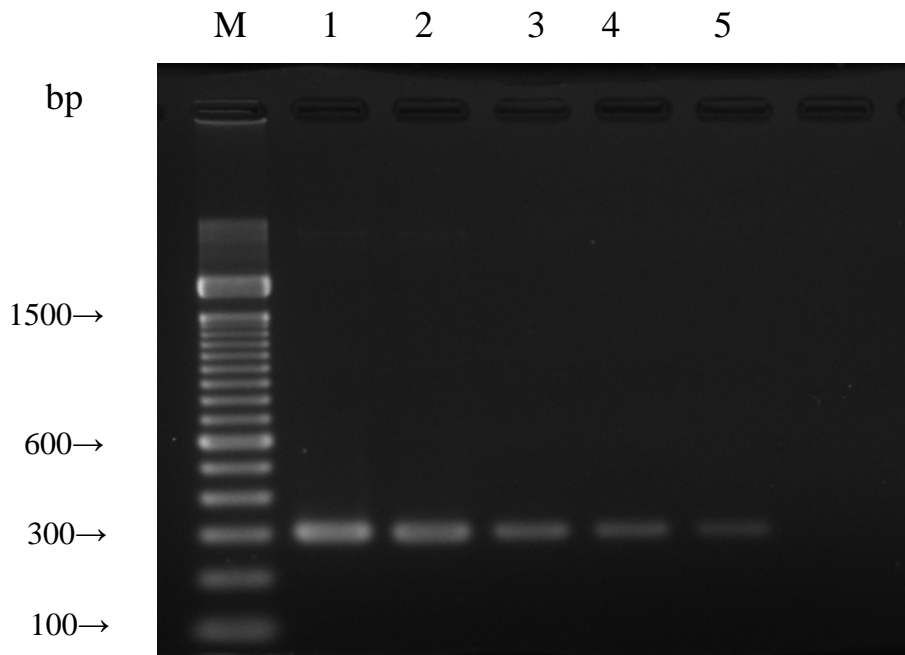


圖 6. 以 AcJ 84 藉 immuno-PCR 檢測不同濃度青年期蟲體抗原。

Lane 1 濃度為 $1\mu\text{g/L}$ ，Lane 5 為 $10^{-4}\mu\text{g/L}$ 。

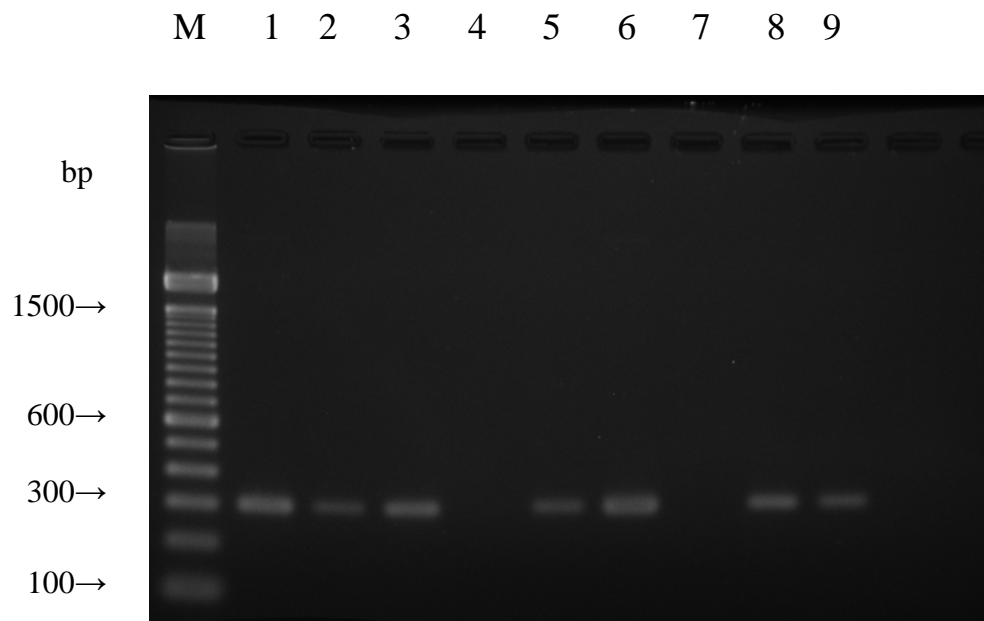


圖 7. 以 AcJ 84 藉 immuno-PCR 檢測感染者與未感染者血清檢體。

Lane 1, 2, 3, 5, 6, 8 及 9 為感染者，Lane 4 及 7 為未感染者。

表 1. 5 株分泌抗廣東住血線蟲青年期蟲體 204kD 抗原的單株抗體特性分析

單株抗體	交叉反應*	穩定性(天)@	免疫球蛋白
AcJ 84	—	103	IgG1
AcJ 26	—	91	IgM
AcJ 101	—	63	IgG2a
AcJ 67	—	115	IgG2a
AcJ 91	—	87	IgM

* 單株抗體藉 ELISA 與犬蛔蟲、中華肝吸蟲、犬心絲蟲、豬蛔蟲、海獸胃線蟲及糞小桿線蟲等蟲體抗原進行交叉反應。

@ 融合瘤隔天繼代培養，培養天數的培養液以 ELISA 測抗體。

表 2. 以 ELISA 檢查感染廣東住血線蟲病人及未感染對照者血清檢體
信賴度的分析

	檢體總數	發現蟲體病例	未發現蟲體病例
病人	45	20	25
對照者	36	-	-
True positives	36	16	19
True negatives	35	-	-
False +	1	-	-
False -	9	4	6
Overall accuracy	0.88	0.91	0.89
<i>Pv</i> +	0.97	0.94	0.95
<i>Pv</i> -	0.80	0.90	0.85
Sensitivity	0.80	0.80	0.76
Specificity	0.97	0.97	0.97

Pv + : Predictive value of a positive test

Pv - : Predictive value of a negative test

表 3. 以 immuno-PCR 檢查感染廣東住血線蟲病人及未感染對照者血清

檢體信賴度的分析

	檢體總數	發現蟲體病例	未發現蟲體病例
病人	45	20	25
對照者	36	-	-
True positives	41	18	22
True negatives	35	-	-
False +	1	-	-
False -	4	2	3
Overall accuracy	0.94	0.95	0.93
<i>Pv</i> +	0.98	0.95	0.96
<i>Pv</i> -	0.90	0.95	0.92
Sensitivity	0.91	0.90	0.88
Specificity	0.97	0.97	0.97

Pv + : Predictive value of a positive test

Pv - : Predictive value of a negative test