

【论著】

狂犬病抗体免疫金标检测试纸的研制

黄江山¹, 张孟璋², 陈仲德², 黄亚萍¹, 张长弓³, 黄印尧²

【摘要】 目的 应用酶联免疫原理和胶体金层析技术, 研制狂犬病抗体免疫金标检测试纸。方法 采用特殊的生产工艺, 在玻璃纤维膜包被胶体金标记狂犬病抗原, 在硝酸纤维素膜上检测线和对照线处分别包被狂犬病抗原和兔抗狂犬病抗体, 制成狂犬病抗体免疫金标检测试纸 (人用)。结果 当待检样品阳性时, 在检测线处形成抗原抗体的免疫复合物而凝聚显色; 当待检样品阴性时, 检测线处不形成抗原抗体免疫复合物不显色。整个试验过程只需 15 min。试纸与 ELISA 试剂比较, 两者都具有微量、特异、准确的优点, 且金标试纸独具操作方便、快速和结果直观、容易判定的优点。结论 应用胶体金免疫层析技术建立的“狂犬病抗体免疫金标检测试纸”, 可以准确地检测出被检样品是否带有狂犬病抗体, 同时还可以通过检测线颜色的深浅判定抗体的含量高低。

【关键词】 狂犬病; 免疫; 胶体金试纸

中图分类号: R512.99

文献标识码: A

文章编号: 1008-7850(2009)04-0241-04

Study of Colloidal Gold Strip in Detecting the Antibody of Rabies

HUANG Jiang-shan^{*}, ZHANG Meng-zhang, CHEN Zhong-de et al.

(* The First Hospital of Xiamen, Fujian Medical University, Xiamen, Fujian 361003, China)

【Abstract】 Objective To develop the colloidal gold strip in detecting the antibody of rabies. **Methods** With special product techniques, colloidal gold strip was prepared and applied to detect the anti-rabies antibody. Rabies antigen and anti-rabies antibody were coated on the test region and control zone, respectively. **Results** The color was appeared on the test region because of the compound of antigen-antibody when the sample was positive. There was no color appeared when the sample was negative. The whole experimentation merely needed fifteen minutes. The test result showed this strip had the same merits as that of ELISA test in microanalysis: high speciality and accuracy. No special instrument was needed and the test could be completed easily in a short time. **Conclusion** The colloidal gold strip in detecting the antibody of rabies based on the principle of colloidal gold immuno-chromatography can detect the antibody of rabies truly when the sample is positive. And this strip also can determine the content of antibody based on the color of test line.

【Key words】 Rabies; Immunity; Immuno-gold labeling

狂犬病 (rabies) 又称恐水症 (hydrophobia), 为狂犬病病毒引起的一种人畜共患的中枢神经系统急性传染病, 该病常见于狗、狼、猫等食肉动物, 而人类多因被病兽咬伤而感染, 一旦发病, 死亡率几乎 100%^[1,2]。近年因养狗逐渐增多, 狂犬病发病率有上升的趋势。卫生部最新公布的全国法定报告传染病疫情, 狂犬病仍居传染病报告死亡数首位, 自 2006 年 5 月份起狂犬病已连续多年位居我国报告死亡数最高的传染病病种。

狂犬病病毒属核糖核酸型弹状病毒。狂犬病病毒具有两种主要抗原: 一种为病毒外膜上的糖蛋白抗

原, 能与乙酰胆碱受体结合使病毒具有神经毒性, 并使体内产生中和抗体及血凝抑制抗体, 中和抗体具有保护作用; 另一种为内层的核蛋白抗原, 可使体内产生补体结合抗体和沉淀素, 无保护作用^[1,2]。

人一旦被犬、猫等动物咬伤或抓伤后, 需立即接种狂犬病疫苗, 并于接种后全程做狂犬病病毒抗体检测, 观察接种后的免疫效果。狂犬病抗体的检测方法很多, 一般采用间接免疫荧光法 (IFAT), 也有用酶联免疫法 (ELISA) 来检测; 但这两种方法需要时间较长 (2~3 d), 在实际工作中给检验者和被检者都带来不便^[3]。本文研究狂犬病抗体免疫金标试纸快速检测方法^[4], 该方法操作简便快速, 一般人均可操作, 非常适用于缺乏设备和技术力量的基层疾病预防控制中心使用, 这将对我国加快控制和消灭狂犬病的工作具有十分重要的现实意义。

作者单位: 1. 福建医科大学附属厦门市第一医院, 福建厦门 361003; 2. 厦门出入境检验检疫局; 3. 厦门大学医学院抗癌研究中心

作者简介: 黄江山, 本科, 副主任医师, 分院检验科主任, 主要从事临床免疫学研究工作

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 狂犬病抗原: 由福建省畜禽疾病诊断中心赠送; 硝酸纤维素膜, 德国 S & S 公司产品; 玻璃纤维, MILLIPORE 公司产品; 氯金酸, 上海试剂一厂产品; 底板, 吸水纸, 厦门市波生生物技术有限公司生产; 其他试剂, SIGMA 公司产品或上海试剂一厂产品, 均为分析纯。

1.1.2 狂犬病抗体快速检测试纸的制备

(1) 胶体金的制备: 用柠檬酸三钠还原法制备浓度为万分之四的胶体金溶液。

(2) 胶体金的标记: 量取胶体金 50 ml 将胶体金调节 pH 值至 7.3 搅拌下加入狂犬病抗原 1.3 mg 进行偶联, 继续搅拌 30 min 加入 20% 的 PEG 终止反应, 10 000 r/min 离心 10 min 取沉淀, 用金标缓冲液复溶至 50 ml 备用。

(3) 冷冻干燥: 将胶体金标记的狂犬病抗原溶液均一喷涂在玻璃纤维纸上, 并冷冻干燥备用。

(4) 抗原、抗体包被: 把狂犬病抗原和兔抗狂犬病抗体分别包被在硝酸纤维素膜的检测线 T 及对照线 C 干燥备用。

(5) 试纸的组装: 把用胶体金包被好的硝酸纤维素膜、吸水纸、加样区玻璃纤维膜按顺序贴到不干胶底板上, 切割成条, 分装铝箔袋, 袋内装入干燥剂, 密封, 常温保存。

1.1.3 对比检测试剂: 对比检测试剂是珠海经济特区海泰生物制药有限公司生产的狂犬病抗体酶联免疫吸附试剂盒。

1.1.4 检测样品

(1) 检测血清样品: 厦门、泉州等医院和省疾病预防控制中心提供血清样品 35 份、自采鸡血清 1 份、鸭血清 1 份、兔血清 1 份、犊牛血清 1 份。

(2) 对照血清: 狂犬病标准阳性血清、人艾滋病阳性血清、人甲肝阳性血清、人乙肝阳性血清、人丙肝阳性血清、结核病阳性血清、健康人血清、兔抗猪瘟 (HC) 血清 1 份、兔抗口蹄疫 (FMD) 血清 1 份、兔抗猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 血清 1 份、兔抗猪伪狂犬病 (PR) 血清 1 份、兔抗猪细小病毒血清 1 份、兔抗猪乙型脑炎血清 1 份、犬瘟热阳性抗体、犬细小病毒阳性抗体、犬传染性肝炎阳性抗体; 上述血清样品均由本实验室和福建省畜禽疾病诊断中心提供。

1.2 方法

1.2.1 检测方法: 取出“狂犬病抗体免疫金标检测试纸”袋, 撕开铝箔袋, 取出检测卡, 平放于桌面,

在加样孔 (S) 加入检测样品 (血清或血液) 100 μl 室温中静置 15 min, 观察结果。

1.2.2 判定标准: 判定标准分为无效、阴性、阳性。

(1) 无效: 检测线 (T) 和对照线 (C) 均不出现紫红色线, 说明本试纸已失效。

(2) 阴性: 检测线 (T) 不出现紫红色线, 对照线 (C) 出现一条颜色较深的紫红色线, 说明样品无狂犬病抗体。

(3) 阳性: 检测线 (T) 和对照线 (C) 都出现一条颜色较深的紫红色线, 说明检测样品中含有可以抵抗狂犬病强毒攻击的抗体, 检测线的颜色与抗体含量呈正比, 检测线颜色越深, 说明样品中的抗体含量越多, 反之, 说明样品中的抗体含量越少, 如图 1。

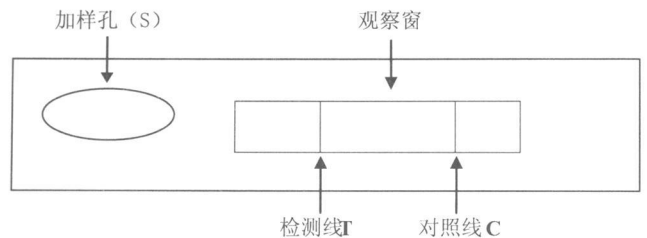


图 1 胶体金试纸条示意图

2 结果

2.1 特异性检测

取出金标试纸, 按照检测方法, 分别在各试纸卡的加样孔 S 中加入狂犬病标准阳性血清、人艾滋病阳性血清、人甲肝阳性血清、人乙肝阳性血清和兔抗乙型脑炎血清等 16 种血清。检测结果除狂犬病标准阳性血清显示阳性反应外, 其余均显示阴性反应, 见表 1。

表 1 特异性检测结果

血清	结果	血清	结果
狂犬病标准阳性血清	+	兔抗乙型脑炎血清	-
人艾滋病阳性血清	-	兔抗 PRRS 血清	-
人甲肝阳性血清	-	犬细小病毒阳性血清	-
人乙肝阳性血清	-	犬传染性肝炎阳性血清	-
人丙肝阳性血清	-	兔抗 PR 血清	-
兔抗 HC 血清	-	犬瘟热阳性血清	-
兔抗 FMD 血清	-	犊牛血清	-
正常人血清	-	结核病阳性血清	-

2.2 准确性 (敏感性) 检测

狂犬病抗体免疫金标试纸与狂犬病抗体 ELISA

试剂比较: 取 34 份人血清, 分别用上述金标试纸和 ELISA 试剂检测吸光度 (A) 值。ELISA 试剂的判定准是 $A_{450} \geq$ 临界对照 A 值平均值判定为阳性, $A_{450} <$ 临界对照 A 值平均值判定为阴性。金标试纸按上述标准判定。对狂犬病抗体水平测定, 结果见表 2。

表 2 狂犬病抗体水平测定结果

编号	血清	金标试纸结果	ELISA 试剂 (A 值)	ELISA 检测结果
1	狂犬病标准阳性血清	+	1.880	+
2	狂犬病标准阴性血清	-	0.086	-
3	血清样品 1	+	1.563	+
4	血清样品 2	+	1.179	+
5	血清样品 3	+	0.888	+
6	血清样品 4	+	0.485	+
7	血清样品 5	-	0.325	-
8	血清样品 6	-	0.203	-
9	血清样品 7	-	0.149	-
10	血清样品 8	-	0.134	-
11	血清样品 9	+	0.662	+
12	血清样品 10	+	1.249	+
13	血清样品 11	+	0.408	-
14	血清样品 12	+	1.606	+
15	血清样品 13	-	0.089	-
16	血清样品 14	+	0.986	+
17	血清样品 15	-	0.284	-
18	血清样品 16	-	0.097	-
19	血清样品 17	-	0.324	-
20	血清样品 18	+	0.458	+
21	血清样品 19	-	0.163	-
22	血清样品 20	+	0.782	+
23	血清样品 21	+	0.691	+
24	血清样品 22	-	0.237	-
25	血清样品 23	-	0.106	-
26	血清样品 24	-	0.337	-
27	血清样品 25	+	0.423	+
28	血清样品 26	+	0.684	+
29	血清样品 27	+	0.581	+
30	血清样品 28	-	0.097	-
31	血清样品 29	-	0.174	-
32	血清样品 30	+	0.537	+
33	血清样品 31	+	0.682	+
34	血清样品 32	-	0.337	-

表 2 结果表明, 应用金标试纸检测结果, 阳性率为 53% (18/34), 用 ELISA 试剂检测结果, 阳性率为 50% (17/34), 两者比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 线性 (敏感性) 比较

将 3 号人血清用 PBS (pH 7.4) 进行倍比稀释成 1:2 (4号、) 1:4 (5号)、1:8 (6号)、1:16 (7号), 再用金标试纸和 ELISA 试剂进行狂犬病抗体水平测定, 结果显示金标检测线的颜色与抗体水平呈正比, 抗体水平越高, 检测线的颜色越深。

2.4 全血与血清检测结果

用金标试纸同时检测 10 份人全血和对应分离的血清, 结果完全一致, 见表 3。

表 3 人全血与血清金标试纸检测结果

编号	全血	血清	编号	全血	血清
1	-	-	6	+	+
2	-	-	7	-	-
3	-	-	8	-	-
4	弱阳	弱阳	9	弱阳	弱阳
5	+	+	10	+	+

3 讨论

3.1 制作原理

本试纸是将胶体金标记技术 (immunogold labeling technique) 与免疫层析技术 (immuno chromatographic assay) 有机结合, 组成胶体金标记免疫层析法 (immunogold chromatographic assay GCA) 检测试剂^[5,6]。具体做法是将抗原或抗体标记于胶体金上^[7], 与被测样品一起借助条状纤维膜上液体流动的毛细作用力移行至反应带, 利用抗原抗体特异性结合, 于反应带形成肉眼可见的颜色沉积, 以此指示被测定物的存在与否。检测阳性样品时, 样品中的狂犬病抗体将同胶体金标记的金标抗原结合物反应, 形成复合物, 借助毛细作用, 复合物沿层析条向前移行, 液体前行至检测线包被区时, 与预包被的狂犬病抗原形成抗原抗体复合物而凝聚显色。游离胶体金标记的狂犬病抗原则在对照线处与兔抗狂犬病抗体结合而富集显色; 对于阴性样品, 由于没有狂犬病抗体存在, 在检测线区将不会出现抗原抗体复合物而沉积显色, 仅在对照线处显色。本试验结果应在 15~25 min 内判定^[8-11]。

3.2 特异性试验

应用金标试纸检测狂犬病标准阳性血清、人艾滋病阳性血清、人甲肝阳性血清、人乙肝阳性血清、猪瘟阳性血清、健康人血清等 16 种人兽源性病毒、细菌标准血清, 结果显示, 仅标准的狂犬病阳性血清显示阳性反应外, 其余均显示阴性反应。说明本试纸特异性强。

3.3 准确性和敏感性试验

取相同的 34 份人血清, 分别用狂犬病抗体免疫金标试纸和狂犬病抗体 ELISA 试剂检测, 检测结果显示, 金标试纸阳性率 53% (18/34), ELISA 法阳性率为 50% (17/34), 两者差异无统计学意义。

本试验将 3 号人血清用 PBS (pH 7.4) 进行倍比稀释成 1:2 (4号)、1:4 (5号)、1:8 (6号)、1:16 (7号), 再用金标试纸剂进行狂犬病抗体水平测定, 结果显示, 检测线的颜色与抗体水平呈正比, 有明显的梯级效应, 抗体滴度越高, 检测线的颜色越深。

3.4 全血检测

应用金标试纸检测血液和对应分离的血清, 其结果完全一致, 说明金标试纸不仅可以检测血清, 同时可以检测血液, 在大量检测时可以免去分离血清的工作, 检测时显得更快更简便。

综上所述, 应用胶体金免疫层析技术建立的“狂犬病抗体免疫金标检测试纸”, 不需要实验室和任何器械, 只要将待检样品的血清或血液加入检测卡的加样孔内, 平放, 在室温下静置 15 min, 就可以准确地检测出被检样品是否带有狂犬病抗体, 同时还可以通过检测线颜色的深浅判定抗体的含量高低。本试纸与 ELISA 法一样, 都具有微量、准确、灵敏度高的优点, 但又比 ELISA 法操作简便、快速、结果直观、容易判定^[12, 13], 同时检测成本低廉, 很适用于基层卫生防疫部门和医院等检测机构使用。

参 考 文 献

[1] 周宗安, 翟春生. 人兽共患病 [M]. 福州: 福建科技出版

社, 1985. 47-49.

[2] 蔡宝祥, 徐为燕. 实用家畜传染病学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989. 142-145.

[3] 王生育, 张长弓, 孔繁德, 等. 猪伪狂犬病血清抗体两种检测方法的比较 [J]. 福建畜牧兽医, 2004, 26 (4): 7-8.

[4] Baptosta P, Pereira E, Eaton P, et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods [J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391 (3): 943-950.

[5] 王凤强, 姜北宇, 刘明泽, 等. 免疫胶体金快速诊断技术在兽医诊断上的应用 [J]. 畜牧兽医杂志, 2005, 24 (6): 15-17.

[6] Dykman LA, Bogatyrev VA, Khlebtsov BN, et al. A protein assay based on colloidal gold conjugates with trypsin [J]. Anal Biochem, 2005, 341 (1): 16-21.

[7] Kaur J, Singh KV, Boro R, et al. Immunochromatographic dipstick assay format using gold nanoparticles labeled protein-hapten conjugate for the detection of atrazine [J]. Environ Sci Technol, 2007, 41 (4): 5028-5036.

[8] 黄印尧, 张长弓, 方莹, 等. 用于检测猪瘟抗体的免疫金标试纸条的研制与应用研究 [J]. 福建畜牧兽医, 2002, 24 (1): 3-4.

[9] 张长弓, 黄印尧. 猪瘟病毒抗原胶体金快速检测试纸的研究 [J]. 福建畜牧兽医, 2006, 28 (6): 1-3.

[10] 张长弓, 金颜辉, 黄印尧, 等. 口蹄疫抗体免疫金标快速检测试纸法的建立 [J]. 福建畜牧兽医, 2004, 26 (1): 4-5.

[11] 黄印尧, 张长弓, 孔繁德, 等. 猪伪狂犬病抗体免疫金标快速检测试纸法 [J]. 福建畜牧兽医, 2004, 26 (3): 8-10.

[12] 沈浩龙, 张长弓, 黄印尧, 等. 禽流感抗原快速检测试纸条的研究 [J]. 福建畜牧兽医, 2006, 28 (6): 11-12.

[13] 李军, 林继煌, 姜平, 等. 用免疫金技术检测猪繁殖与呼吸综合征病毒 [J]. 畜牧与兽医, 2001, 33 (2): 1-2.

(收稿日期: 2009-03-02)

(李川 编辑)

【临床报道】

经内镜套扎治疗食管小平滑肌瘤 33例临床分析

张正行, 田斌, 王鸿斌, 马景云

【关键词】 食管平滑肌瘤; 内镜; 套扎

中图分类号: R571.3

文献标识码: A

文章编号: 1008-7850 (2009) 04-0244-02

焦作市第二人民医院自 2000 年 1 月 ~ 2008 年 6 月行胃镜检查 31 210 例, 发现上消化道黏膜下平滑肌瘤 105 例, 检出率 0.34%。其中食管平滑肌瘤 65 例, 占 61.90%; 直径在 0.3~1.0 cm 之间的平滑肌

瘤 33 例, 占 31.42%; 33 例食管黏膜下平滑肌瘤行内镜下套扎术, 仅 1 例出现食管狭窄并发症, 占 3.03%, 取得较好疗效。现报道如下。

1 对象与方法

1.1 一般资料

患者均来源于门诊或住院, 所有患者均经电子胃

作者单位: 焦作市第二人民医院, 河南 454001
作者简介: 张正行, 本科, 副主任医师, 消化内镜室主任, 主要从事十二指肠镜下 ERCP 胆总管取石工作