

• 临床检验研究论著 •

金标免疫层析法测定唾液中丙型肝炎病毒抗体的研究^{*}

梁 脉¹, 张名均^{2△}, 谢国明¹

(1. 重庆医科大学 400016; 2. 重庆市九龙坡区第一人民医院 400050)

摘 要:目的 研制一种能快速检测唾液中丙肝 IgG、IgM 抗体的胶体金免疫层析试纸条。方法 采用夹心法, 将丙肝重组抗原与胶体金链接形成金标抗原, 与金标兔抗体以 2:1 的比例混合制成金标垫。将鼠抗人 IgG、鼠抗人 IgM 抗体混合包被于检测线位置; 将羊抗兔抗体置于质控线位置; 在样品垫上滴加 10 μ L 唾液和 1 滴 PBS 溶液(约 45 μ L)展开。并对试纸条的特异性、重复性等进行测试。结果 对 217 份血清抗-HCV 阳性样品和 189 份阴性样品进行了测试, 与血清抗-HCV ELISA 检测方法的一致性高(Kappa=0.99)。结论 本技术能在无创条件下, 5 min 时间内可读取结果, 可用于体检大量筛查和群众的自主筛查而推广。

关键词:肝炎, 丙型; 胶体金; 唾液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)14-1789-03

Study on anti HCV in saliva by colloid gold-based immunochromatographic assay

Liang Mo¹, Zhang Mingjun^{2△}, Xie Guoming¹

(1. Key Laboratory of Medical Diagnostics of Ministry of Education, Department of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. the First People's Hospital of Jiulongpo District, Chongqing 400050, China)

Abstract: Objective To triturate a gold immunochromatography test strip for detecting anti-Hepatitis C Virus (HCV) in saliva. Methods Colloid-gold was prepared according to the sodium citrate method, and then conjugated to HCV recombination antigen and rabbit antibody. Mouse anti-human IgG and IgM mixture antibodies were coated on a porous nitrocellulose membrane as the detection line and goat anti-rabbit IgG was coated as the control line. Results The developed colloid-gold immunochromatography assay was used to detect 217 positive samples and 189 negative samples, and kappa factor between serum ELISA and new technology was 0.99. And the developed technology exhibited an excellent stability and specificity. Conclusion A new colloid-gold immunochromatography strip for the detection of anti-HCV in saliva has been successfully developed. This method is sensitive, rapid (the detection procedure can be completed in 5 min) and suitable for crowd screening.

Key words: hepatitis C; gold colloid; saliva

丙型肝炎病毒(HCV)显示出世界发展趋势, 在各个年龄段、性别、种族和地区均广泛感染^[1]。大多数急性 HCV 感染显示亚临床状态, 并导致慢性的肝脏疾病, 患者常在无意识的情况下延误了治疗, 进一步导致肝硬化和肝细胞癌的发生^[1]。更为严重的是, HCV 感染不仅目前没有可以彻底治愈的办法, 而且尚没有疫苗可以对其进行有效预防感染的发生。因此对筛查阳性后确诊的患者进行早期干预, 可提高生活质量, 防止病情的进一步恶化^[2]。

目前, HCV 感染者的实验室诊断中, 以静脉外周血标本的 HCV 抗体(抗-HCV)检测为主要手段。外周血抗-HCV 检测虽具有灵敏度高、特异性好等优点, 且已广泛应用于血站献血员及医院输血前和手术前患者的血液筛查, 以保证安全输血。然而该方法是有创检测, 现在主要用于就诊的疑似患者和手术前、输血前的常规检查; 且在静脉抽血过程中存在一定的损伤和交叉感染的危险性。近 30 年来, 利用患者唾液、尿液等标本作为外周血的代替品进行病原体分析的研究屡有报道^[3]。苏格兰以及英国的其他区域已经通过在高危人群的唾液检测来确定人类免疫缺陷病毒的传播^[4], 自 1998 年开始, 唾液中抗-HCV 的存在和检测也被受关注^[5]。

金标免疫层析技术由于价格低廉、携带方便、结果肉眼可

见、操作简单和稳定性好等优点, 已经广泛应用于临床、食品安全、环境卫生等各个方面的定性检测^[6]。随着金标免疫层析技术的检测灵敏度和特异性的提高, 已广泛应用于检测浓度较低的无创性体液标本。如检测尿 HCG 用于怀孕的筛查, 阴道分泌物中检测细菌性阴道病的诊断筛查等。以色列科学家 Salem Elsana 指出: 唾液可替代血清来进行 HCV 抗体的检测, 丙型肝炎病毒抗体血清阳性和唾液有着显著相关性^[7]。然而利用金标试纸条检测唾液中的 HCV 抗体在国内未见报道, 本研究旨在研制一种金标免疫层析试纸条检测唾液中抗-HCV 抗体, 达到无创筛查大量人群是否感染 HCV 的目的。

1 材料与方法

1.1 样品收集 本实验的全部阳性样品来自九龙坡区第一人民医院住院或门诊患者, 通过血清抗-HCV 酶联免疫吸附分析法(ELISA)检测阳性确诊以后的患者唾液。取得唾液标本后, 进行隐血检测, 所有样品均显示隐血阴性, 在 -20 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.2 试剂 HCV 重组混合抗原、鼠抗人 IgG 和鼠抗人 IgM (深圳市菲鹏生物股份有限公司); 兔抗体和羊抗兔抗体、硝酸纤维素膜、玻纤、PVC 板(天津博奥赛斯生物科技有限公司); 氯金酸、牛血清清蛋白(BSA, Sigma-Aldrich)。实验中使用到的

^{*} 基金项目: 2010 年重庆九龙坡科委科技项目; 临床检验诊断学国家重点学科基金资助(2010303)。 作者简介: 梁脉, 硕士, 临床检验技师, 主要从事病原生物学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: 532192998@qq.com。

其他试剂均为分析纯。本实验中的使用水均为新鲜制备的超纯水。所使用到的磷酸盐缓冲(PBS)溶液浓度为 10 mmol/L, pH 7.4。实验过程均在室内温度(20±2)℃,空气湿度低于 20%的环境中操作。

1.3 仪器 紫外可见分光光度计(UV-6000,上海元析仪器有限公司),划线工作采用 BIODOT 公司的 ZX 1010 设备,本研究中烘干机使用 DHG-9240A 型电热鼓风干燥箱(工作温度为 37℃),超低温离心机采用 HITACHI(日立)CR21GIII 型。旋涡混合器、电磁电热加热套、裁纸机等其他设备均为实验室常用设备。

1.4 方法

1.4.1 纳米金溶液的制备 采用柠檬酸三钠还原法^[8]制备胶体金。主要步骤如下:在充分清洗干净的圆底烧瓶内加入原子水 200 mL,放入搅拌子,在电磁电热套的作用下加热至沸腾,加入 2 mL 1%的氯金酸溶液后等到沸腾,加入现配的 1%的柠檬酸三钠 7 mL。反应至 6 min 时,溶液颜色发生突变,继续加热至 10 min 时,溶液显示橙红色,停止加热,继续搅拌至金纳米溶液降至室温。

1.4.2 金标垫的制备 (1)用 10% K₂CO₃ 溶液将金纳米溶液的 pH 值调整到 8.0;(2)用 PBS 溶液将重组 HCV 抗原稀释到 1.0 mg/mL;(3)15 μL 稀释后 HCV 重组抗原加入 10 mL pH 8.0 的金纳米溶液里,用漩涡混合器混合 20 s,静置于室温中 1 h,使金纳米粒子和抗原进行充分结合;(4)1 mL 1% BSA 溶液加入上述溶液,充分混匀,再次静置 1 h,使得 BSA 充分封闭未结合抗原的位点;(5)将溶液置于高速冷冻离心机内,4℃ 11 000 r/min 下离心 0.5 h,弃去上清液 10 mL,将留下来的溶液在旋涡混合器上混合均匀,重新混悬制成 HCV 重组抗原标记金纳米溶液;(6)兔 IgG 抗体用同等方法制备成兔 IgG 抗体标记金纳米溶液,两种纳米金标记溶液储存于 4℃中备用;(7)涂金标垫前,将金标 HCV 重组混合抗原和金标兔抗体以 2:1 的比例充分混合,将 75 μL 的混合液加入 225 μL 的 PBS 溶液混合均匀,30 cm×5 mm 的金标垫上均匀涂抹 300 μL 的上述金标混合溶液;(8)将金标垫置于纱网上,放入 37℃的鼓风干燥箱内干燥 4 小时,取出备用。

1.4.3 样品垫的制备 首先,PBS 溶液和 1%的 BSA 溶液以 10:1 的体积比混合均匀制成样品垫处理液;然后,将裁剪成 30 cm×2 cm 的样品垫浸入样品垫处理液中,充分浸润;最后,将浸泡过的样品垫小心放在纱网上,转移到鼓风干燥箱内干燥至少 4 h,放入干燥剂密封后室温下储存备用。

1.4.4 金标免疫层析试纸条的组装 (1)将 4 mg/mL 鼠抗人 IgG、4.15 mg/mL 鼠抗人 IgM 分别用 PBS 溶液稀释成 2 mg/mL 的溶液,再等体积混合制成 1 mg/mL 的鼠抗人抗体(IgG 和 IgM)混合溶液;(2)轻柔准确地将 NC 膜贴在 PVC 板的检测区,用三维划膜喷金仪将 1 mg/mL 的羊抗兔 IgG 抗体包被于质控线(C 处)位置,将鼠抗人混合抗体包被于检测线(T 处)位置;(3)将包被好的 NC 膜板放入干燥箱中至少干燥 4 h;(4)样品垫、金标垫和吸水纸的固定在 PVC 板上;(4)固定好的试纸条,用微电脑自动裁纸机切割为 3 mm 宽度的均匀的试纸条,在使用前,加干燥剂密封进行保存。

1.4.5 金标免疫层析试纸条的使用 将 10 μL 唾液标本滴加在样品垫位置,将 1 滴(或者准确量取 45 μL)PBS 溶液滴在试纸条上用于延展唾液样品,5 min 时肉眼读取实验结果,在检测线(T 处)和控制线(C 处)分别出现红色清晰的线条为阳性,只在控制线(C 处)出现红色清晰的线条为阴性,在 T 处和 C 处不出现红色的线条为无效。

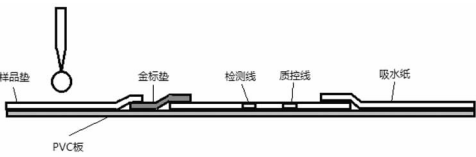


图 1 免疫层析试纸条组装图

1.4.6 金标免疫层析试纸条性能评价

1.4.6.1 与 ELISA 的比对试验 取临床经 ELISA 法证实血液中的抗 HCV IgM、IgG 阳性的 217 例患者和 189 例阴性健康体检者的唾液,用自制的金标试纸条测定唾液中的抗 HCV IgM 和 IgG。

1.4.6.2 稳定性 取 3 批金标试纸条,分别加干燥剂封装后置于 4℃、18~25℃、37℃条件保存,每 30 天分别测定 10 个阳性和阴性标本,观察 90 d。

1.4.6.3 特异性 分别取人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者(20 例)、单纯乙型肝炎病毒(HBV)感染者(30 例)、HCV/HBV 混合感染者(20 例)和 HCV 单纯感染者(20 例)的唾液进行测定。

2 结果

2.1 胶体金质量鉴定 为了使金纳米粒子负载更多量的重组混合抗原,我们制备较小的纳米粒子。用肉眼观察所制备的胶体金溶液清澈透明,呈现透亮的橙红色,无杂质。将其冷却至室温后转移到比色皿中,利用紫外可见分光光度计测定金颗粒的吸收峰,在 400~600 nm 扫描,只在 517 nm 处有窄而尖的吸收峰,OD 值为 1.5,参阅相关文献^[8]得到金纳米颗粒的粒径大部分为 15 nm,说明制备的纳米金颗粒粒径均一,可以用于后续的标记。

2.2 胶体金标记结果 通过上述的方法标记的纳米金溶液,颜色透亮,没有沉淀现象。离心后,没有挂壁现象,重新混合的溶液澄清,可以用于金标垫的制作。

2.3 样品垫的处理 经样品垫处理液浸泡干燥后的样品垫在使用过程中,通过对样品的处理,可以获得 NC 膜背景洁白,检测线和质控线没有拖尾现象的效果。

2.4 试纸条性能评价

2.4.1 自制金标试纸条与 ELISA 比较 对 ELISA 证实的 217 例阳性标本和 189 例阴性标本进行检测,其结果如表 1。经一致性 Kappa 检验(κ=0.99),表明本实验制备的金标免疫层析试纸条与经典的 ELISA 法具有很好的一致性。

表 1 自制免疫金标试纸条与 ELISA 比较				
本研究	血清抗-hcv ELISA 检测		合计	率
	+	-		
+	215	0	215	0.53
-	2	189	191	0.47
合计	217	189	406	
率	0.534	0.466		

2.4.2 试纸条的稳定性 在 90 d 的范围内,结果稳定,对阴性和阳性标本可以区分。说明本研究所制备的试纸条可以长时间保存,具有良好的稳定性,见表 2。

2.4.3 特异性检测结果 本研究对特异性的评价如表 3 所示。说明试纸条对 HIV、HBV 没有交叉反应,可以进行 HCV 感染的定性检测,特异性强。

表 2 自制免疫金标纸条稳定性检测结果							
批号	测定日期	保存温度					
		4 ℃ (n=10)		18~25 ℃ (n=10)		37 ℃ (n=10)	
		阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
20121001	30 d	10	10	10	10	10	10
	60 d	10	10	10	10	10	10
	90 d	10	10	10	10	9	11
20121002	30 d	10	10	10	10	10	10
	60 d	10	10	10	10	10	10
	90 d	10	10	10	10	10	10
20121003	30 d	10	10	10	10	10	10
	60 d	10	10	10	10	10	10
	90 d	10	10	10	10	9	11

表 3 自制 HCV 金标层析试纸条特异性检测结果				
样本	HIV(n=20)	HBV(n=30)	HBV+HCV(n=20)	HCV(n=20)
结果	阴性	阴性	阳性	阳性

3 讨 论

目前检测 HCV 的方法包括 ELISA 检测、PCR 技术测定 HCV RAN 和金标免疫层析法,但主要集中于血清中的病原微生物的抗原、抗体检测^[9]。由于检测灵敏度和特异性的限制,目前国内金标免疫层析法还无检测唾液中的抗 HCV 抗体的报道。我们在检测线区域同时包被鼠抗人 IgG 和 IgM 抗体,同时检测唾液中 HCV IgG、IgM 抗体,显著提高了试纸条的检测灵敏度和选择特异性。

HCV 核心蛋白不同区段的亲/疏水性极不均衡,氨基端表现为亲水性,而羧基端表现为疏水性,N 端 1~154 个氨基酸包含了核心蛋白的大部分疏水区。HCV 核心蛋白的疏水性能其在被用作检测线的包被蛋白时,对检测液体流中的蛋白产生疏水结合,极易产生假阳性的现象^[10]。本研究经过探索,采用将鼠抗人混合抗体(不易产生疏水结合)包被于检测线的方法,避免了假阳性结果的产生。

样品垫的处理液配方中,BSA 溶液用于在液体流动过程中,封闭 NC 膜上的非特异性结合位点,防止在层析过程中,金标抗原和抗体与 NC 膜上的位点结合,NC 膜背景不净和拖尾的情况出现。PBS 缓冲液样品垫用于控制样品层析过程中的 pH,保证反应过程中的金标 HCV 重组抗原和兔抗体的结合稳定和生物活性状态。

检测的 217 例标本中,有 2 例假阴性结果,此结果的产生

可能是以下 2 个原因:(1)患者本人的因素,1 d 之内唾液的分泌情况不同,导致收集标本的时候唾液所含抗-HCV 量极少或者没有;(2)采用新的检测原理的金标免疫层析试纸条灵敏度还没有达到绝对满意的程度,以后的试验中还需要改进。

稳定性检测在 37 ℃ 保存 90 d 后的金标条产生了假阳性结果,可能由于试纸条在高温环境下蛋白质的生物活性变化,导致标记蛋白或者金纳米粒子在检测线发生部分聚沉显色。而室温 18~22 ℃ 和低温 4 ℃ 保存 90 d 稳定性好。

综上所述,本研究所制备的金标免疫层析试纸条能够运用于临床唾液样本的检测,并且在 5 min 可以产生肉眼可见的结果,稳定性、特异性和准确度较好,在无创情况下能够满足对人群中 HCV 感染者的快速筛查。

参考文献

[1] Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus[J]. Clin Microbial Infect, 2010, 17(2): 107-115.

[2] Ly K, Xing J, Klevens R, et al. The increasing burden of mortality from viral hepatitis in the united states between 1999 and 2007 [J]. Ann Intern Med 2012, 156(2): 271-279.

[3] 周东平, 杨宗平, 王磊, 等. 唾液中丙型肝炎病毒抗体的检测及应用[J]. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(7): 449-451.

[4] Balamane M, Winters M, Dalai S, et al. Detection of HIV-1 in saliva: implications for case-identification, clinical monitoring and surveillance for drug resistance[J]. Virol J, 2010, 4(3): 88-93.

[5] Elsana S, Sikuler E, Yaari A, et al. HCV antibodies in saliva and urine[J]. J Med Virol, 1998, 55(4): 24-27.

[6] Shyu R, Tang S, Chiao D. Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B[J]. Food Chemistry, 2010, 118(3): 462-466.

[7] Elsana S, Sikuler E, Yaari A, et al. Salivary HCV-antibodies; a follow-up cohort study of liver disease patients[J]. Clin Lab, 2001, 47(2): 335-338.

[8] Firdaus R, Saha K, Sadhukhan PC. Rapid immunoassay alone is insufficient for the detection of hepatitis C virus infection among high-risk population[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(4): 290-293.

[9] 张瑞, 李金明. 丙型肝炎病毒感染临床检测程序的建立及结果报告与解释[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(5): 990-992.

[10] He J, Xiu B, Wang G, et al. Double-antigen sandwich ELISA for the detection of anti-hepatitis C virus antibodies[J]. J Virol Methods, 2011, 171: 163-168.

(收稿日期: 2012-11-08)

(上接第 1788 页)

[10] Xia G, Nainan OV, Jia Z. Characterization and distribution of hepatitis B virus genotypes and subtypes in 4 provinces of China[J]. Zhonghua Liuxing Bingxue Zazhi, 2001, 22(4): 348-351.

[11] 徐红, 张跃新, 魏来, 等. 新疆汉族人群 HBV 基因型与临床病情的关系[J]. 实用肝脏病杂志, 2005, 1(6): 11-13.

[12] 张晓平, 邱丽影, 秦俊生, 等. 深圳地区乙型肝炎病毒基因型与核苷类药物[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 4.

[13] 覃羽华, 岑光旅. 桂西地区慢性乙型肝炎基因分型及其临床特点[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(2): 138-141.

[14] Fang SK, Chen HB, Fontana RJ, et al. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2006, 44(2): 283-290.

[15] 李卓, 李洪权, 李俊红, 等. 北京地区乙型肝炎病毒基因型与其感染临床表型的相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(24): 2823-2827.

[16] Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, et al. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during Lumivudine therapy[J]. Hepatology, 1999, 30: 567-577.

[17] 王虹, 冯妙芙, 周鹏辉, 等. 荧光分子信标探针检测拉米夫定耐药基因的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6): 90-93.

[18] 卜范峰, 鲁艳芹, 韩金祥, 等. 实时定量 PCR 检测乙型肝炎病毒拉米夫定耐药突变及其与临床指标的相关性[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(9): 806-810.

(收稿日期: 2012-11-28)