

• 论 著 •

# 聚合纳米金棒应用于广州管圆线虫感染诊断的研究\*

张文梅<sup>1</sup>, 孔玉方<sup>2</sup>, 马顺高<sup>3</sup>, 沈经纬<sup>4</sup>, 左秀华<sup>5</sup>, 杨毅梅<sup>1△</sup>

1. 大理大学基础医学院, 云南大理 671000; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 3. 大理州人民医院检验科, 云南大理 671000; 4. 大理州人民医院输血科, 云南大理 671000; 5. 大理大学第一附属医院检验科, 云南大理 671000

**摘要:**目的 基于纳米金棒聚合技术构建广州管圆线虫感染早期诊断的检测方法。方法 用金种生长法合成质量稳定的纳米金棒, 标记不同浓度巯基化的广州管圆线虫幼虫和成虫的粗抗原、纯化抗原, 及其排泄分泌抗原, 通过紫外-可见光(UV-Vis)分光光度计扫描稳定的纳米金棒纵向表面等离子体共振(LSPR)的位移变化, 筛选最佳标记抗原, 用于检测大鼠感染广州管圆线虫后不同感染时间(5、7、14、21 d)的血清抗体及系列稀释梯度的阳性血清, 同时设立酶联免疫吸附试验(ELISA)进行检测, 采用 Kappa 检验比较两种检测方法的一致性。结果 纳米金棒标记 10  $\mu\text{g/mL}$  的成虫纯化抗原具有最大的 LSPR 位移(40 nm), 最早能检测出轻、中、重度感染广州管圆线虫后 5 d 的大鼠血清抗体, 以及最大稀释度为 1:600 的阳性血清。ELISA 能检测出轻度感染 14 d 和中度、重度感染 7 d 后的大鼠血清抗体, 以及最大稀释度为 1:200 的大鼠阳性血清抗体。两种方法 Kappa 值为 0.750( $P < 0.01$ ), 两种方法检测结果具有较强的一致性。结论 成功构建一种能早期快速诊断广州管圆线虫感染的聚合纳米金棒检测方法。

**关键词:** 广州管圆线虫; 纳米金棒; 广州管圆线虫抗原; 标记技术; 感染诊断

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2025.15.003 **中图法分类号:** R532.1

**文章编号:** 1673-4130(2025)15-1807-07 **文献标志码:** A

## Polymerized gold nanorods applied to the diagnosis of *Angiostrongylus cantonensis* infection\*

ZHANG Wenmei<sup>1</sup>, KONG Yufang<sup>2</sup>, MA Shungao<sup>3</sup>, SHEN Jingwei<sup>4</sup>,  
ZUO Xiuhua<sup>5</sup>, YANG Yimei<sup>1△</sup>

1. School of Basic Medicine, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China; 2. China Academy of Inspection and Quarantine Science, Beijing 100176, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Dali People's Hospital, Dali, Yunnan 671000, China; 4. Department of Blood Transfusion, Dali People's Hospital, Dali, Yunnan 671000, China; 5. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

**Abstract:** **Objective** To construct an assay for early infection diagnosis of *Angiostrongylus cantonensis* based on gold nanorod polymerization. **Methods** Stable gold nanorods were synthesized by the gold seed growth method, and labeled with different concentrations of sulfhydrylated crude and purified antigens of larvae and adults of *Angiostrongylus cantonensis*, and their excretory and secretory antigens, and then scanned the longitudinal surface plasmon resonance (LSPR) of the stable gold nanorods by ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometry, and screened for the optimal labeled antigens for the detection of different infection time after infection of rats with *Angiostrongylus cantonensis*. The displacement changes were screened to select the best labeled antigens for the detection of serum antibodies and positive sera of series of dilution gradients at different infection times (5, 7, 14, 21 d) after infection with *Angiostrongylus cantonensis* in rats, and at the same time, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was set up for the same test. Kappa test was used to compare the consistency of the two assays. **Results** Gold nanorods with stable aspect ratio were successfully prepared. The gold nanorods labeled with 10  $\mu\text{g/mL}$  of adult purified antigen had a maximum LSPR shift of 40 nm, and were able to detect serum antibodies in rats 5 d after mild, moderate and severe infection

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81460316)。

作者简介: 张文梅, 女, 硕士研究生在读, 主要从事免疫学研究。△ 通信作者, E-mail: yimeiy@dali.edu.cn。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20250710.1309.002.html\(2025-07-10\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20250710.1309.002.html(2025-07-10))

with *Angiostrongylus cantonensis*, as well as positive sera at a maximum dilution of 1 : 600. The ELISA was able to detect serum antibodies in rats after 14 d of mild infection, and 7 d of moderate and severe infection, as well as positive sera at a maximum dilution of 1 : 200. The ELISA detected positive serum antibodies in rats after 14 d of mild infection and 7 d of moderate and severe infection, as well as in rats at a maximum dilution of 1 : 200. The Kappa value of the two methods was 0.750 ( $P < 0.01$ ), and the results of the two methods had strong consistency. **Conclusion** A polymerized gold nanorod assay for early and rapid diagnosis of *Angiostrongylus cantonensis* infection is successfully constructed.

**Key words:** *Angiostrongylus cantonensis*; gold nanorods; *Angiostrongylus cantonensis* antigen; labeling technology; infection diagnosis

广州管圆线虫病是一种由广州管圆线虫引起的食源性人畜共患寄生虫病,是热带及亚热带地区许多国家重视的公共卫生疾病之一<sup>[1]</sup>。该病早期较为罕见,但随着人们生活质量的提升及饮食结构的多样化,广州管圆线虫感染引起的食品安全问题日益突出,在我国浙江、海南、福建、广西、广东、云南等地均出现过因食用福寿螺而引起广州管圆线虫病的暴发流行。现随着全球气候变化等环境因素影响,在非广州管圆线虫流行地区也相继出现多起输入性广州管圆线虫感染的病例<sup>[2]</sup>。人作为广州管圆线虫的非适宜宿主,主要通过摄入含Ⅲ期幼虫的中间宿主如螺、鱼、虾或被幼虫污染的蔬果、生水而发生感染<sup>[3-4]</sup>。幼虫在人体器官中移行并寄生于各个部位,常累及中枢神经系统造成颅内感染。该病临床症状缺乏特异性,主要表现为以头痛、发热、呕吐等症状为主的嗜酸性粒细胞性脑膜炎,严重者可导致视力下降、肢体麻痹、昏迷甚至死亡<sup>[5-6]</sup>。在广州管圆线虫流行地区,临床医师常结合特定的饮食习惯、严重头痛及嗜酸性粒细胞性脑膜炎等做出推定诊断;但在非流行地区,临床医师对该病大多缺乏经验,常被误诊为“神经性头痛”“脑膜炎”或“病毒性脑膜炎”,或贻误患者的最佳治疗时机,张榕燕等<sup>[7]</sup>报道在福建省地区该病误诊率曾高达 58.6%。因此广州管圆线虫病的早期快速诊断对该病的防控治疗及改善预后尤为重要。

病原检测技术是广州管圆线虫感染诊断的金标准,以从寄生部位如脑脊液中查到虫体作为确诊依据,但在用于检测的有限体积的脑脊液中通常难以发现蠕虫,其检出率极低。免疫学方法由于操作简便、反应迅速且成本低廉,是目前最广泛开展的诊断方式。酶联免疫吸附试验(ELISA)常用于检测血清或脑脊液中的特异性抗体,但灵敏度常常受限于感染后抗体延迟出现及低水平的血清抗体浓度;免疫印迹也是一种常用且简单的方法,但在检测中与多种有寄生虫感染患者的血清存在交叉反应,特异性不佳<sup>[4,8]</sup>。宏基因组二代测序能够无创、快速、精准识别特定寄生虫的 DNA 片段,具有较高的灵敏度和特异度,但其价格昂贵,在基层医院尚无法普及和常规开展<sup>[9]</sup>。因此,推动更加经济便捷

且快速灵敏的检测方法发展势在必行。

近年来,纳米金材料凭借其独特的光化学性质、高生物相容性、表面易修饰等优点,在设计、合成及生物标记等方面得以不断扩展创新,在病原体的半定量和定性检测中应用愈发广泛<sup>[10]</sup>。以纳米金作为免疫标记物的检测方法简单快捷、灵敏度高、样品用量少,或可满足临床对广州管圆线虫病进行早期快速诊断的需求。因此,本文在实验室纳米金棒聚合技术的研究基础上<sup>[11-12]</sup>,制备多种广州管圆线虫虫体抗原,通过聚合纳米金棒与巯基化抗原结合,根据表面等离子体共振(SPR)吸收峰的特点,优选出最佳诊断抗原,对广州管圆线虫感染大鼠的血清抗体进行检测,为广州管圆线虫感染的早期快速检测奠定实验基础。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** 本研究实验动物均购自大理大学动物实验中心,实验按照动物伦理要求进行,伦理批准文号:2023-PZ-205,不涉及患者知情同意。主要仪器:超声细胞破碎仪购自 DR. Hielscher 公司,紫外-可见光(UV-Vis)分光光度计购自上海元析仪器有限公司,电泳仪、小型垂直电泳槽购自 Bio-Rad 公司,高速离心机购自 Sigma 公司。常规试剂:氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )、乙二胺四乙酸(EDTA)、抗坏血酸(AA)和重力型去盐柱购自生工生物工程(上海)股份有限公司,硝酸银( $\text{AgNO}_3$ )购自广东光华科技有限公司,硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ )购自国药集团化学试剂有限公司,Trout's 试剂购自阿拉丁控股集团有限公司,PEG-6000 购自 BBI 生命科学有限公司,青霉素链霉素、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、考马斯亮蓝 G250、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,广州管圆线虫大鼠血清 ELISA 试剂盒购自上海联硕生物科技有限公司。

## 1.2 广州管圆线虫抗原的制备

**1.2.1 幼虫和成虫粗抗原制备** 将被广州管圆线虫Ⅲ期幼虫感染 21 d 的 SD 大鼠处死,取其大脑置于 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液中,收集从脑内钻出的幼虫,生理盐水冲洗后于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存,取幼虫 2 000 条

加液氮研磨,经超声波粉碎虫体,反复冻融后 4 ℃ 离心取上清液即为幼虫粗抗原。从被Ⅲ期幼虫感染 50 d 后的大鼠的心脏、肺动脉血管内分离成虫,生理盐水洗净后于 -20 ℃ 冻存,取成虫加液氮研磨,丙酮脱脂 3 次,4 ℃ 放置 3 d 后 4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min,取上清液即为成虫粗抗原。

**1.2.2 幼虫和成虫纯化抗原制备** 取 1.2.1 制备的幼虫和成虫粗抗原分别经 SDS-PAGE,用考马斯亮蓝 G250 染色、脱色过夜后,切下蛋白分子表达量大的条带,研磨后放入分子量为 Mr 14 000 的透析袋,用水平电泳槽洗脱纯化抗原,将洗脱液移入新透析袋,PBS 缓冲液 4 ℃ 透析过夜,PEG-6000 浓缩,用 SDS-PAGE 检测浓缩效果,收集浓缩液即为纯化抗原。

**1.2.3 排泄分泌粗抗原的制备** 将广州管圆线虫幼虫用 PBS 清洗后置于含双抗 RPMI-1640 培养液中进行培养(青霉素、链霉素各 1 000 U/mL),取培养液离心后收集上清液,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤至透析袋,在 4 ℃ 条件下透析 24 h,PEG-6000 浓缩后收集浓缩液,用冷冻干燥机高度浓缩为排泄分泌粗抗原冻干粉备用。

**1.3 广州管圆线虫感染大鼠血清抗体收集** 按照轻、中、重度(分别为 50、100、200 条/鼠)将被广州管圆线虫Ⅲ期幼虫灌胃感染的 SD 大鼠,分别在感染后 5、7、14、21 d 于大鼠内眦静脉丛取血,离心收集上清液于 -80 ℃ 保存备用。

#### 1.4 纳米金棒的合成与纯化

**1.4.1 金晶种子液的配制** 将  $\text{HAuCl}_4$  溶液稀释至 2 mmol/L,冰超纯水配制  $\text{NaBH}_4$  溶液(0.01 mol/L),取  $\text{HAuCl}_4$  625 μL、CTAB(0.2 mol/L)1.88 mL、纯水 1.37 mL,充分混匀,加入 450 μL 预冷的  $\text{NaBH}_4$ ,剧烈混匀 2 min,观察溶液颜色由黄色变为浅棕色后,于 27 ℃ 孵育 2 h。

**1.4.2 增长媒质的制备及纳米金棒聚合** 取 11.875 mL CTAB(0.2 mol/L)、7.71 mL 纯水、5 mL  $\text{HAuCl}_4$ (2 mmol/L)充分混匀,再依次加入 150 μL  $\text{AgNO}_3$ (10 mmol/L)、160 μL AA(100 mmol/L),混匀后溶液变为无色。取 108 μL 1.4.1 中制备好的金晶种子液加入上述增长媒质中,充分混合,27 ℃ 恒温箱孵育 12 h。用 UV-Vis 分光光度计扫描纳米金棒纵向表面等离子体共振(LSPR)吸收峰位移变化情况。

**1.4.3 纳米金棒的提纯** 将合成好的纳米金棒溶液分装后于 28 ℃ 8 500 r/min 离心 30 min,弃去上清液,向沉淀中加入一半体积的纯水,重新分散后于 14 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加入等体积的 0.5 mmol/L CTAB,得到最终浓度为 0.8 mmol/L 的纳米金棒溶液,放置 27 ℃,用于后续抗原包被。

**1.5 抗原巯基化及诊断抗原筛选** 用 BCA 蛋白定

量试剂盒测定上述制备的 5 种抗原浓度,分别稀释至 10、20、30、40、50 μg/mL,取 0.2 mL 抗原加入 0.8 mL 含 2 mmol/L EDTA 的 PBS 缓冲液中,加入 10 μL 5mg/mL Traut's 试剂充分混匀,27 ℃ 放置 1 h 后进行重力型去盐柱脱盐。分别取各浓度的抗原 100 μL 加入 2 mL 的纳米金棒溶液,静置 3 min 后,逐滴加入 1 mL PEG-6000,27 ℃ 孵育 2 h,即得到抗原标记的功能化纳米金棒。用 UV-Vis 分光光度计检测纳米金棒标记抗原前后 LSPR 的位移变化,根据位移大小筛选最佳标记抗原和最适包被浓度。

**1.6 纳米金棒检测感染大鼠血清抗体** 制备批量最佳诊断抗原标记的纳米金棒,以 PBS 作为空白对照,分别检测收集到的 36 份感染血清及等量份数的阴性对照血清,每份血清同时做 3 次重复检测,取平均值。同时检测不同稀释度倍数(100、200、400、600、800 倍)的大鼠阳性血清抗体,均取 40 μL 血清加入 2 mL 功能化纳米金棒内,反应 5 min 后检测 LSPR 位移变化。

**1.7 ELISA 检测** 用 ELISA 试剂盒检测 1.6 中大鼠血清抗体;阴性对照孔吸光度(A)值  $\leq 0.20$ ,阳性对照孔  $A > 0.20$ ,表明实验结果有效;当  $A_{\text{阳性对照}} / A_{\text{阴性对照}} \geq 2.1$  时,结果判为阳性。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS26.0 软件进行统计学分析,不呈正态分布的计量资料以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,组间比较采用曼-惠特尼检验;采用 Kappa 检验对 ELISA 和建立的稳定的纳米金棒法检测结果的一致性进行分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 合成长径比稳定的纳米金棒** 电子显微镜下纳米金棒呈细长、均匀的棒状结构,见图 1。UV-Vis 分光光度计光谱显示纳米金棒横向 SPR 吸收峰在 520 nm 左右,LSPR 吸收峰在 800 nm 左右,符合纳米金棒的特征,见图 2,可用于后续抗原标记与检测。

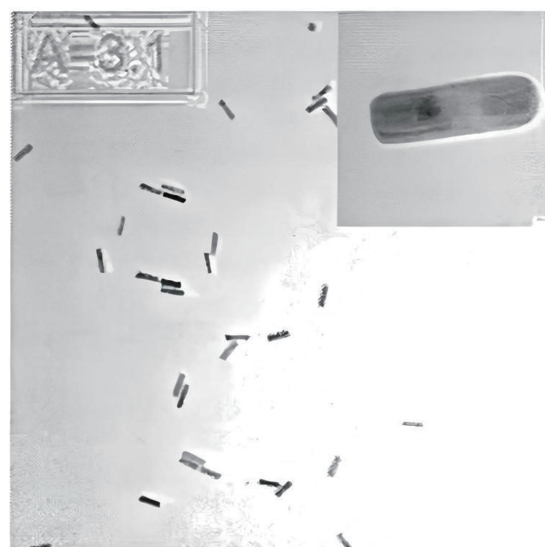


图 1 纳米金棒电镜扫描图( $\times 200\ 000$ )



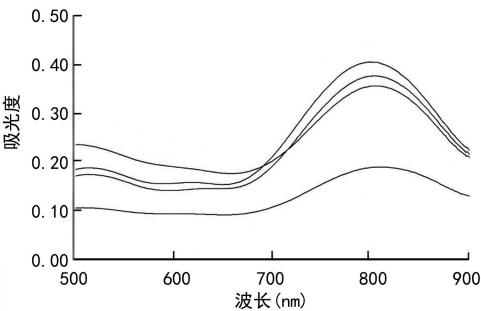


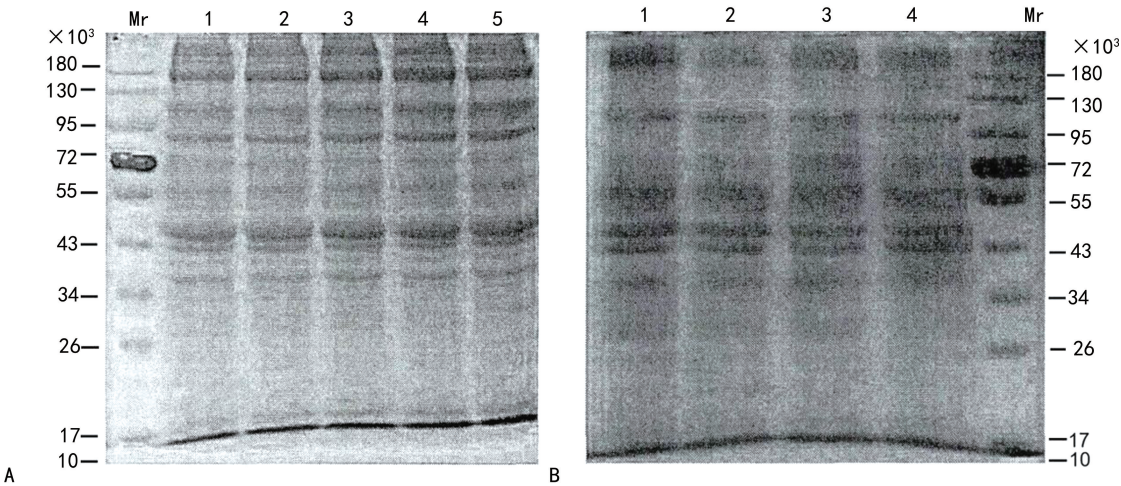
图 2 纳米金棒 UV-Vis 扫描光谱图

**2.2 纯化抗原的筛选** 成虫和幼虫粗抗原经 SDS-PAGE 后分离出多个蛋白条带,依据张鑫等<sup>[13]</sup>进行的广州管圆线虫虫体蛋白的免疫印记结果,本实验选择表达量较多且被证实具备诊断价值的成虫  $45 \times 10^3$  和幼虫  $43 \times 10^3$  的纯化抗原作为候选抗原,见图 3。

**2.3 最佳标记抗原及浓度** UV-Vis 分光光度计扫描光谱显示纳米金棒包被广州管圆线虫幼虫、成虫的

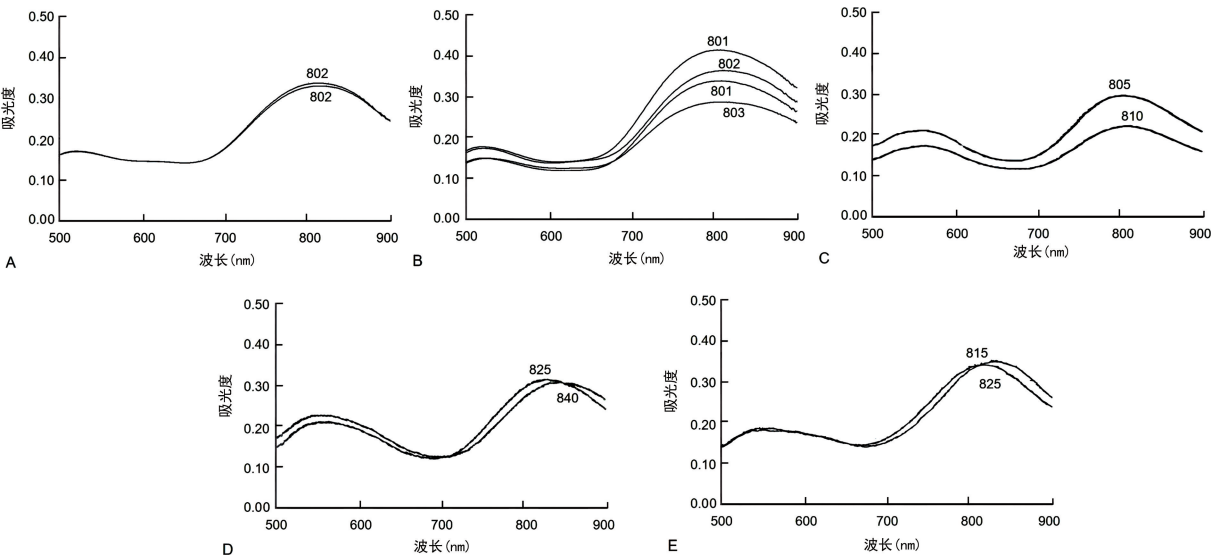
粗抗原和纯化抗原及排泄分泌粗抗原的最大红峰位移分别为 35、35、25、40、35 nm,最适包被浓度分别为 30、40、20、10、30  $\mu\text{g/mL}$ ,其中成虫纯化抗原标记纳米金棒的红峰位移最大,选择作为广州管圆线虫病的最适包被抗原进行后续研究,最适包被浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ 。

**2.4 大鼠血清抗体检测结果** 纳米金棒标记广州管圆线虫成虫纯化抗原检测 PBS 空白对照 LSPR 位移为 0 nm;检测阴性对照组血清 LSPR 位移均分布于 0~2 nm;检测感染组血清 LSPR 位移分布于 5~45 nm。感染组 LSPR 红移值 $[21.0(11.5,42.5)\text{nm}]$ 显著高于对照组 $[1.5(1.0,2.0)\text{nm}]$ ,差异有统计学意义( $Z=-7.366, P<0.05$ )。故后本实验按红移值 $\geq 5\text{ nm}$ 判定为阳性。检测轻度、中度、重度感染后 5 d 大鼠血清抗体 LSPR 位移均值分别为 5、15、10 nm,结果为阳性,见图 4。



注:A泳道1~5为成虫粗抗原;B泳道1~5为幼虫粗抗原;Mr为蛋白质相对分子质量标准。

图 3 粗抗原 SDS-PAGE 电泳图谱



注:A为空白对照;B为阴性对照;C为轻度感染5d;D为中度感染5d;E为重度感染5d。

图 4 稳定的纳米金棒血清抗体检测结果

不同程度感染后 5、7、14、21 d 的大鼠血清抗体检测结果均为阳性,检测轻度感染不同时间段的红峰位移分别为 5、10、20、20 nm;中度感染不同时间的红峰位移分别为 15、20、45、25 nm;重度感染不同时间段的红峰位移分别为 10、45、45、40 nm,见图 5。检测稀释度为 1:100、1:200、1:400、1:600、1:800 的阳性血清抗体红峰位移分别为 15、10、10、5、0 nm,其中稀释度为 1:800 的血清检测结果为阴性,其他均为阳性,见图 6。

**2.5 ELISA 检测结果** 以样品 A 值>截断值判为阳性。轻度感染第 14 天、中度和重度感染第 7 天后的血清抗体检测结果为阳性,见表 1。稀释度为 1:

100、1:200 的阳性血清抗体检测结果为阳性,见表 2。

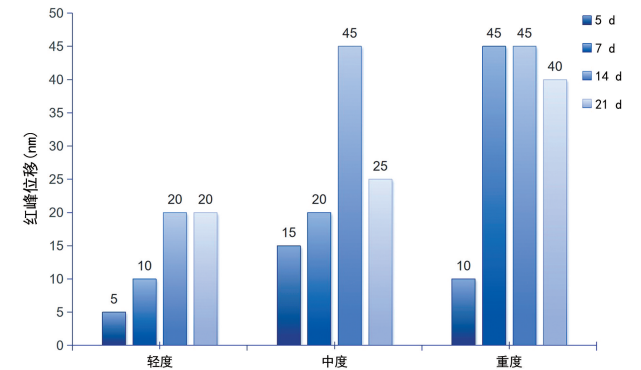
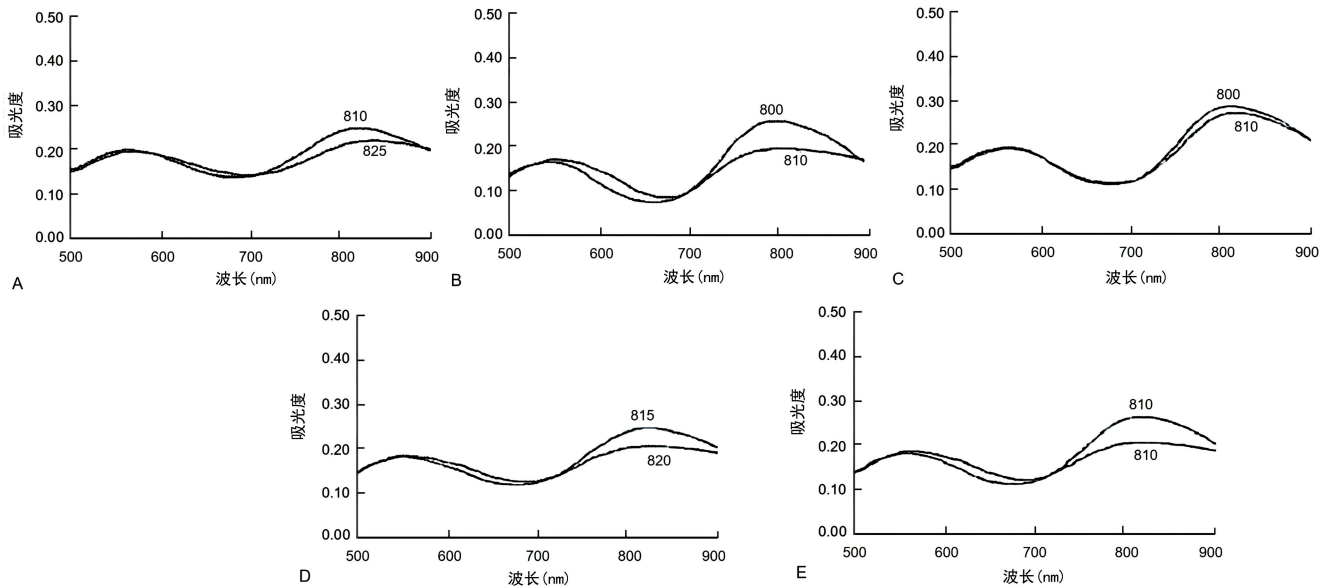


图 5 不同感染程度不同感染时间血清抗体检测红峰位移



注:A~E 分别为 1:100、1:200、1:400、1:600、1:800 阳性血清抗体检测结果。

图 6 不同稀释度阳性血清抗体检测结果

表 1 大鼠血清抗体 ELISA 试剂盒检测结果			
感染度	感染时间(d)	A <sub>450</sub>	结果
轻度	5	0.055 0	—
	7	0.061 9	—
	14	0.554 4	+
	21	0.512 3	+
中度	5	0.056 0	—
	7	0.476 5	+
	14	0.497 4	+
	21	0.546 5	+
重度	5	0.056 2	—
	7	0.453 5	+
	14	0.502 0	+
	21	0.590 5	+

注:本实验阴性对照孔 A 值为 0.055 4,计算截断值为 0.116 3;+ 为阳性,—为阴性。

**2.6 ELISA 和稳定的纳米金棒法检测结果的一致性分析** 两种方法同时检测所有大鼠血清样品,采用 Kappa 一致性检验得到 Kappa 值为 0.750, $P<0.01$ ,

认为两种检测方法结果具有较强的一致性,见表 3。

表 2 各稀释度阳性血清 ELISA 试剂盒检测结果		
稀释度	A <sub>450</sub>	结果
1:100	0.434 6	+
1:200	0.159 8	+
1:400	0.055 5	—
1:600	0.055 3	—
1:800	0.048 2	—

注: + 为阳性,—为阴性。

表 3 ELISA 和稳定的纳米金棒法检测结果的 一致性分析			
ELISA	稳定的纳米金棒法		
	阳性	阴性	合计
阳性	30	3	33
阴性	6	33	39
合计	36	36	72

3 讨 论

本研究基于实验室对纳米金棒聚合技术已有的研究基础,通过金晶种子生长法成功制备出长径比稳定且均一的纳米金棒。有研究表明,含巯基的化合物,由于其能通过形成 Au-S 配位键实现对纳米金棒表面的有效修饰<sup>[14]</sup>。利用这一特性,构建出标记广州管圆线虫诊断抗原的功能化纳米金棒。纳米金棒作为一种独特的纳米材料,具有横向和纵向两个 SPR 吸收峰,其中 LSPR 吸收峰具有高度灵敏的特性,能够随着纳米金棒长径比的微小变化,在可见光至近红外的波段内实现精准位移,而横向 SPR 基本保持不变<sup>[15-16]</sup>。通过 UV-Vis 扫描光谱测量并记录 LSPR 的位移变化,从而筛选出高度灵敏的广州管圆线虫抗原功能化纳米金棒,可用于血清抗体的检测。在实际检测过程中,当抗原标记的功能化纳米金棒与待测血清中的对应抗体发生特异性结合后,纳米金棒的长径比会随之增大。这一变化在光学上表现为 LSPR 的红峰移位,通过精细的紫外扫描光谱分析,可清晰捕捉到这一光学信号的变化,从而实现抗原-抗体反应信号的放大传导,这一检测机制确保了检测的灵敏度和特异度。通过这种高效率的信号传导方式,成功实现了对广州管圆线虫感染血清抗体的精确检测,从而为该疾病的早期诊断和灵敏检测奠定实验基础。

广州管圆线虫病的病原体主要是其幼虫或成虫,这些病原体在感染早期即能刺激机体产生体液免疫应答。因此在广州管圆线虫感染的免疫诊断中,通常采用粗抗原或排泄分泌产物进行检测。有研究表明,在分析广州管圆线虫虫体粗抗原蛋白质组分时,至少有 20 条蛋白带能被广州管圆线虫感染大鼠的血清所识别,其中这些蛋白带中包含有广州管圆线虫的特异性抗原成分,表明这些蛋白条带具有重要的免疫诊断价值<sup>[17]</sup>。此外,有研究通过对粗抗原进一步纯化,成功提取出多种特异性蛋白条带,免疫印迹结果显示成虫  $150\times10^3$ 、 $64\times10^3$ 、 $45\times10^3$ 、 $39\times10^3$ 、 $31\times10^3$  抗原与广州管圆线虫感染血清出现明显反应条带,幼虫  $108\times10^3$ 、 $43\times10^3$ 、 $41\times10^3$ 、 $32\times10^3$  抗原出现反应条带,这些条带均具有重要的免疫诊断价值,可显著提升免疫诊断的灵敏度和特异度<sup>[18]</sup>。因此在纯化抗原的筛选中,本研究选取了 SDS-PAGE 中分子表达量最多且被证实具备诊断价值的幼虫  $43\times10^3$  和成虫  $45\times10^3$  蛋白作为候选抗原,通过对比紫外扫描光谱红峰位移得出:成虫  $45\times10^3$  纯化抗原标记纳米金棒在浓度  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$  时红峰位移最大,为  $40\text{ nm}$ ,为最佳标记抗原,这与其抗原成分单一且表达量多有关;粗抗原由于成分复杂、纯度不佳,纳米金棒标记的有

效量减少;而幼虫纯化抗原红峰位移明显小于其他类抗原,这与幼虫纯化抗原分子量较小、表达量低有关<sup>[11]</sup>。且成虫纯化抗原在较低浓度时便可获得最佳标记效率,可有效节约样品,因此优选成虫纯化抗原作为诊断抗原。

对感染大鼠的血清抗体检测结果进行分析,结果显示成虫纯化抗原标记的纳米金棒在轻度、中度和重度感染后 5 d 的红峰位移均  $\geq 5\text{ nm}$ ,为阳性反应。这充分证明了功能化纳米金棒能够准确识别感染早期的微量抗体。随着感染时间的推移,所有大鼠在第 14 天时均检出较大的红峰位移,均值分别为 20、45、45 nm,这一现象与此时血清抗体滴度达到高峰的状态相吻合,清晰地反映了宿主体内抗体水平的动态变化。在感染第 21 天时红峰位移均保持不变或明显降低,与宿主免疫系统防御性清除感染幼虫导致血清抗体滴度下降有关,这与寄生虫感染后宿主抗体产生的普遍规律相契合。纳米金棒检测方法能检出最高稀释度为 1 : 600 的阳性血清抗体,可见该方法对血清里低水平的抗体具有较高灵敏度,为临床诊断和寄生虫感染的早期筛查提供了一种新的诊断思路。

目前,针对寄生虫感染的血清学诊断方法众多,而 ELISA 因其操作简单、成本较低而成为临床常规使用的方法。因此本研究同时用 ELISA 对所有大鼠的血清进行了检测。采用 Kappa 检验对 ELISA 和稳定的纳米金棒法进行一致性检验,统计学结果显示两种方法检测结果具有较强的一致性,说明本实验构建的稳定的纳米金棒法具备较强的诊断价值。且本研究表明 ELISA 仅轻度感染 14 d 和中度、重度感染 7 d 后的大鼠血清抗体为阳性,且最高可达 1 : 200 血清稀释度的抗体检测为阳性。相较之下,纳米金棒标记技术在广州管圆线虫病的早期识别上展现出更卓越的能力。尽管临床实验室普遍采用的 ELISA 在大规模样本检测中显示出其优越性,但更加适用于批量样本的检测,用于小样本检测时成本或有所增加,给患者带来经济负担。此外,ELISA 的灵敏度尚不能完全满足临床对寄生虫感染的早期检测需求,漏诊和误诊也时有发生。本研究所制备的纳米金棒标记技术则具有更高的灵敏度,同时在成本控制、操作简便性及微量检测方面均有显著优势,这为床旁检测及高通量快速检测奠定了实验基础。

综上所述,本研究构建的纳米金棒标记技术能够早期快速地检测广州管圆线虫感染血清抗体,为临床提供及时、准确的检测结果,助力临床医生及时发现感染病例,从而迅速开展相应治疗,对于提高诊断效率、减少治疗延误具有重要意义。这一技术操作简



便,无需复杂的实验设备或专业技术人员,可以成为寄生虫感染早期诊断的高效检测技术,具备广泛应用于临床实验室和基层医疗机构的潜力;且检测成本低廉,或可大规模应用于广州管圆线虫感染的筛查和监测工作,有助于大幅提升检测覆盖面与效率。同时,纳米金棒标记技术的原理和方法具有良好的扩展性,可进一步改进优化以适应其他疾病的早期诊断需求,为临床早期诊断提供更为多样化和精准化的技术支持<sup>[19]</sup>。该技术在临床医学中具有广阔的应用前景,有望为临床早期诊断提供重要的辅助手段。

## 参考文献

- [1] DELGADO-SERRA S, SOLA J, NEGRE N, et al. Angiostrongylus cantonensis nematode invasion pathway, Mallorca, Spain[J]. Emerg Infect Dis, 2022, 28(6): 1163-1169.
- [2] 李曰进, 闫燕, 申艳梅, 等. 山东省输入性广州管圆线虫病 1 例[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2024, 42(4): 554-556.
- [3] BARRATT J, CHAN D, SANDARADURA I, et al. Angiostrongylus cantonensis: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human-pathogen[I]. Parasitology, 2016, 143(9): 1087-1118.
- [4] 许靖云, 周宇晨, 黄硕, 等. 广州管圆线虫免疫调控机制及诊断技术研究进展[J]. 热带生物学报, 2023, 14(1): 60-70.
- [5] MCAULIFFE L, FORTIN ENSIGN S, LARSON D, et al. Severe CNS angiostrongyliasis in a young marine: a case report and literature review[J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(4): e132-e142.
- [6] CARVALHO M S N, CARVALHO M R, SANTOS J A O, et al. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of Angiostrongylus cantonensis infection: an integrative review[J]. Braz J Biol, 2022, 82: e262109.
- [7] 张榕燕, 谢贤良, 方彦炎. 福建省 58 例广州管圆线虫病分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2017, 23(1): 27-29.
- [8] 李曰进, 许艳, 郗夏颖, 等. 广州管圆线虫病的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(8): 978-981.
- [9] CHEN M X, HUANG D N, CHEN J X, et al. Genetic characterization and detection of Angiostrongylus cantonensis by molecular approaches[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2021, 21(9): 643-652.
- [10] SAKTHI DEVI R, GIRIGOSWAMI A, SIDDHARTH M, et al. Applications of gold and silver nanoparticles in theranostics[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2022, 194(9): 4187-4219.
- [11] 蔡子涵, 曹颖, 朱逢龙, 等. 纳米金棒标记技术应用于旋毛虫感染诊断的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2021, 39(5): 652-658.
- [12] 朱逢龙. 纳米金棒标记旋毛虫期抗原筛选及血清学检测研究[D]. 大理: 大理大学, 2020.
- [13] 张鑫, 刘敏, 吴雅欣, 等. 广州管圆线虫幼虫排泄分泌抗原及其诊断价值分析[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(4): 477-481.
- [14] VUKOMANOVIC M, CENDRA M D M, BAELO A, et al. Nano-engineering stable contact-based antimicrobials: chemistry at the interface between nano-gold and bacteria [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2021, 208: 112083.
- [15] 孔玉方. 广州管圆线虫功能化纳米金棒抗原筛选及血清学诊断的基础研究[D]. 大理: 大理大学, 2018.
- [16] FAN J, CHENG Y, SUN M. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, properties and biomedical applications [J]. Chem Rec, 2020, 20(12): 1474-1504.
- [17] 伍金满, 朱佩娴, 熊钟瑾, 等. 酶联免疫印迹技术分析广州管圆线虫雌虫抗原[J]. 中国人兽共患病杂志, 1996, (6): 26-28.
- [18] EAMSOBHANA P, TUNGTRONGCHITR A, WANACHIWANAWIN D, et al. Rapid single-step immunochromatographic assay for angiostrongylus cantonensis specific antigen detection[J]. Pathogens, 2023, 12(6): 762.
- [19] ZHENG J, CHENG X, ZHANG H, et al. Gold Nanorods: the most versatile plasmonic nanoparticles [J]. Chem Rev, 2021, 121(21): 13342-13453.

(收稿日期: 2024-10-25 修回日期: 2025-03-02)