

文章编号:1000-7423(2007)-05-0415-04

【实验研究】

快速诊断疟疾胶体金免疫层析试条方法的建立与评价

汪俊云*, 石峰, 杨玥涛, 高春花, 包意芳, 汤林华

【摘要】目的 建立一种能区分恶性疟的快速、简便诊断疟疾的胶体金免疫层析试条方法, 并对其评价。**方法** 筛选基于恶性疟原虫乳酸脱氢酶制备的单克隆抗体对, 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 标记筛选到的单克隆抗体 F4H12、G4C9 和 D8F7, 并将其吸附于样品垫; 将单克隆抗体 B2G10 (针对恶性疟原虫与间日疟原虫) 和 D6A7 (只针对恶性疟原虫) 分别划线包被于同一硝酸纤维素膜适当位置, 制成免疫层析检测试条。用该试条检测疫区非疟疾发热病人血样 (107 份) 和内脏利什曼病患者血样 (17 份) 以评价其特异性, 检测确诊的疟疾患者血样 (间日疟 110 份, 恶性疟 54 份) 以评价其敏感性。均用单盲法检测。**结果** 检测 107 份疫区非疟疾发热病人血样和 17 份内脏利什曼病患者血样, 有 119 份显示为阴性, 特异性约为 96.0%; 其中 17 份内脏利什曼病患者血样全部为阴性。检测 164 份疟疾患者血样, 阳性 153 份, 敏感性为 93.3%, 其中间日疟检出率为 92.7% (102/110), 恶性疟检出率为 94.4% (51/54)。**结论** 研制出的快速诊断疟疾胶体金免疫层析试条敏感性、特异性均较高。

【关键词】 疟疾; 免疫层析试条; 诊断

中图分类号:R531.3

文献标识码:A

Establishment and evaluation of Colloid Gold Labeled Immunochromatographic Strip Test for Rapid Diagnosis of Malaria

WANG Jun-yun*, SHI Feng, YANG Yue-tao, GAO Chun-hua,
BAO Yi-fang, TANG Lin-hua

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Objective To establish and evaluate a gold immunochromatographic strip test for detection and differentiation of *Plasmodium vivax* and *P.falciparum*. **Methods** The monoclonal antibodies, F4H12, G4C9 and D8F7, were conjugated with colloid gold as detecting reagent; monoclonal antibody B2G10 (against *P.vivax*/*P.falciparum*) and D6A7 (only against *P.falciparum*) were immobilized on nitrocellulose in proper position. Blood samples from 107 febrile patients from endemic area of malaria and 17 patients with visceral leishmaniasis were used for evaluating the specificity. Blood samples of malaria patients (110 with *P.vivax* and 54 with *P.falciparum*) were used for evaluating the sensitivity. **Results** 5 samples out of 107 febrile patients and 17 patients with visceral leishmaniasis showed false positive reaction with a specificity of 96.0% (119/124), all the 17 samples from patients with visceral leishmaniasis were negative. 164 blood samples of malaria patients showed a sensitivity of 92.3% (153/164), 92.7% (102/110) and 94.4% (51/54) for patients infected with *P.vivax* or *P.falciparum*, respectively. **Conclusion** The immunochromatographic strip test based on antigen-capturing is a sensitive, specific, simple and rapid assay for malaria diagnosis.

【Key words】 Malaria; Immunochromatographic strip; Diagnosis.

Supported by the Science and Technology Development Fund of the Ministry of Science and Technology (No. 2003EG150182)

* Corresponding author, E-mail: wang_junyun@yahoo.com

疟疾是世界性的严重威胁人类生命和健康的公共

基金项目: 科技部科研院所技术开发研究专项基金 (No. 2003-EG150182)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: wang_junyun@yahoo.com

卫生问题, 发展准确有效的诊断方法对于疟疾的有效控制具有重要意义。世界卫生组织将发展准确、快速诊断疟疾的技术视为防治疟疾优先考虑的对策之一^[1]。近年来在综合应用单克隆抗体技术、胶体金或染料标记技术和层析技术基础上发展起来的免疫层析试条技

术是开发快速诊断疟疾技术的一个方向,并已显示出良好的发展前景^[2]。本研究在前期制备多株特异敏感的恶性疟原虫乳酸脱氢酶单克隆抗体的基础上,研制以抗原捕获法为基础的、能区分恶性疟的快速诊断疟疾的胶体金免疫层析试条,并对其检测效果进行评价。

材料与方 法

1 材料和设备

硝酸纤维素膜(NC)、交联释放垫(GFCP203000)、吸水垫(CFSP223000)和样品垫均为美国 Millipore 公司产品。氯金酸($\text{HAuCl}\cdot\text{Cl}_3\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (沪试牌)购于上海国药集团化学试剂有限公司。点膜器为美国 Bio-Dot 公司产品。疟原虫乳酸脱氢酶(pLDH)特异单克隆抗体由本课题组制备^[3]。

2 血样

从云南疟疾疫区勐腊、景洪、镇康和耿马等县医院门诊部采集 271 份发热病人血样,镜检确认 107 份为非疟疾患者,164 份为疟疾患者(110 份间日疟、54 份恶性疟患者)。取适量门诊发热病人的静脉血涂厚、薄血片各 2 张,镜检,鉴别虫种并计算原虫密度,余下血样注入管壁涂有乙二胺四乙酸(EDTA)-肝素的指管,充分混匀,置 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

17 份病原学方法确诊的内脏利什曼病患者血样采自甘肃省陇南市武都区。

3 单克隆抗体纯化

采用 G 蛋白层析柱(美国 GenScript 公司),按产品说明书纯化单克隆抗体。

4 胶体金的制备及单克隆抗体标记

胶体金的制备参照文献 [4] 进行。单克隆抗体标记胶体金作为检测试剂,标记方法参照文献 [5] 进行。

5 抗体配对实验

制备的单克隆抗体^[3]分别作标记抗体和包被抗体,与其他抗体进行配对,以筛选检测敏感性和特异性均佳的抗体对用于制备试条。

6 免疫层析试条的制备

将 NC 膜裁成 $30\text{ cm}\times 2.5\text{ cm}$,使用美国 Bio-DOT ZX-1 000 型喷点平台将只针对恶性疟原虫的单克隆抗体和既针对恶性疟原虫又针对间日疟原虫的单克隆抗体以区带形式分别包被在适当位置,作为检测带,在近

吸水垫端适当位置包被羊抗鼠抗体作为质控带;将包被好的 NC 膜置于鼓风干燥箱 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 2 h;再将吸水纸、NC 膜、交联释放垫、样品垫依次粘贴在 PVC 塑料底板上,用切纸机切条 ($4\text{ mm}\times 70\text{ mm}$)。将装配好的试条装入有干燥剂的包装袋内,密封保存备用。

7 检测条件选取

将适量溶胞液与适量待测血样加入 96 孔板的井中,反复吸吹数次,使红细胞充分溶胞;将制备的试条插入溶解的血样中,待溶解的血样全部吸收后,再滴加数滴溶胞液,适时观察并记录检测结果。

8 试条性能评价

对上述血样(包括疟疾患者血样、非疟疾发热病人血样和内脏利什曼病患者血样)重新进行编号,检测者(对血样不知情)对血样进行检测,记录结果。检测结束后将试条检测结果与病原学方法检测结果进行比较,统计试条检测的敏感性和特异性。分别制备 3 批试条对同样的血样进行检测。

结 果

1 单克隆抗体配对

制备的 15 株单克隆抗体分别作为包被抗体和标记抗体进行配对实验,共得到 33 对抗体,其中 9 对抗体只针对恶性疟原虫,24 对既能识别恶性疟原虫又能识别间日疟原虫(表 1)。经比较选择单克隆抗体 F4H12、G4C9 和 D8F7 标记胶体金作为检测抗体,选择 B2G10(针对恶性疟原虫和间日疟原虫)和 D6A7(只针对恶性疟原虫)作包被抗体,检测效果最佳。

2 血样检测条件

每次检测取 $15\text{ }\mu\text{l}$ 血样加 $60\text{ }\mu\text{l}$ 溶胞液充分破碎红细胞。只要检测带出现,不论强弱即判为阳性,否则为阴性(图 1)。检测结果均在 10 min 内判断。

3 试条评价

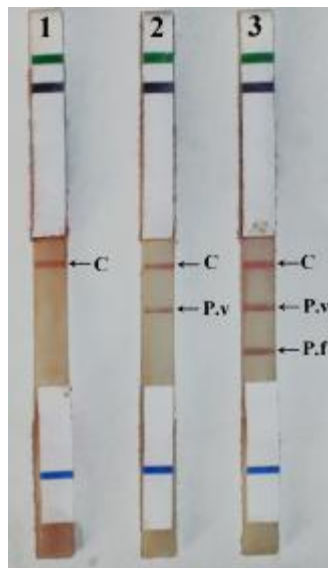
分别用 3 批制备的试条对疟疾患者血样、非疟疾发热病人血样和内脏利什曼病患者血样进行了检测,批次间检测结果完全符合。用研制的试条检测 107 份疫区非疟疾发热病人血样,102 份显示为阴性;17 份内脏利什曼病患者血样全部显示为阴性,总特异性约为 96.0%,检测了 164 份疟疾患者血样,153 份为阳性,敏感性为 93.3%,其中间日疟检出率为 92.72%(102/110),恶性疟检出率为 94.4%(51/54)(其中 2 份为恶性疟和间日疟混合感染)。

表 1 单克隆抗体配对结果
Table 1 Pairing of monoclonal antibodies

包被抗体 Immobilized antibodies	标记抗体 Labeled antibodies														
	A7B8	A7F4	B2G10	B7B5	B8A3	B8H8	D6A7	D6C7	D8F2	D8F7	F1C11	F4A5	F4H12	G4C9	H5F6
A7B8	-	-	-	-	-	-	-	-	Pv/Pf	Pv/Pf	-	-	-	Pv/Pf	-
A7F4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pf	Pf	-
B2G10	-	-	-	-	Pv/Pf	-	-	-	Pv/Pf	Pv/Pf	-	-	Pv/Pf	Pv/Pf	-
B7B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pv/Pf	Pv/Pf	-
B8H8	Pv/Pf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pv/Pf	Pv/Pf	-
D6A7	-	-	-	-	Pf	-	-	-	-	-	-	-	Pf	Pf	-
D6C7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pf	Pf	-
D8F2	Pv/Pf	-	-	-	-	-	-	-	Pv/Pf	Pv/Pf	-	-	Pv/Pf	Pv/Pf	-
D8F7	Pv/Pf	-	-	-	-	-	-	-	Pv/Pf	Pv/Pf	-	-	Pv/Pf	Pv/Pf	-
F1C11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	pf	pf	-
F4A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F4H12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4C9	Pv/Pf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5F6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“-”表示两单克隆抗体不能配对；“Pf”表示两单克隆抗体能配对，但仅识别恶性疟原虫；“Pv”表示两单克隆抗体能配对，既能识别恶性疟原虫又能识别间日疟原虫。

Note:“-”Two monoclonal antibodies can not paired;“Pf”Two monoclonal antibodies can pair, but only recognizes *P.falciparum*;“Pv” Two monoclonal antibodies can pair, recognizes not only *P.falciparum* but also *P.vivax*.



1: 非疟疾发热病人血样, 2: 间日疟患者血样, 3: 恶性疟患者血样, C: 质量控制带, Pv: 针对间日疟原虫/恶性疟原虫的条带, Pf: 只针对恶性疟原虫的条带。

1: Blood of febrile patients without plasmodial infection, 2: Blood of patients with *Plasmodium vivax* infection, 3: Blood of patients with *Plasmodium falciparum* infection, C: Control. Pf: Specific to *P. falciparum*. Pv: Specific to *P. vivax*.

图 1 胶体金免疫层析试纸条检测结果

Fig.1 Detecting results of the blood samples by the strip

讨 论

疟疾仍严重威胁着人类生命和健康, 全球 40% 人口受威胁, 每年新感染人数为 3 亿~5 亿, 死亡约 200 万人^[6]。当前疟疾诊断仍依赖血片镜检方法, 费时

费力, 而且对镜检人员和设备的要求较高, 基层常常难以满足。

迄今已有多种快速诊断疟疾的免疫层析试纸条问世, 如 ParaSight™ F 试剂盒 (法国 Becton 公司)、M-malaquick 试剂盒 (澳大利亚 ICT 公司) 和 OptiMAL 试剂盒 (美国 Flow 公司) 等, 前两者检测的是疟原虫的富组蛋白-II, 只能诊断恶性疟, 且与类风湿因子有交叉反应, 后者检测疟原虫乳酸脱氢酶 (pLDH)。

乳酸脱氢酶 (LDH) 是糖酵解途径的末端酶, pLDH 在疟原虫的整个红内期均高效表达^[7,8]。资料表明 4 种感染人的疟原虫都有独特的 pLDH 活性, 且患者血样中 pLDH 活性与原虫血症水平一致^[7,9]。作为一个特殊的循环抗原疟原虫 LDH 与宿主 LDH 在物理与化学性质等方面有很大差异^[4], 具有诊断价值。本研究在前期克隆、表达恶性疟原虫乳酸脱氢酶基因, 并以此重组蛋白制备 pLDH 特异性单克隆抗体的基础上, 研制了快速诊断疟疾的免疫层析试纸条。

实验室检测证明, 制备的免疫层析试纸条性能稳定, 重复性好, 既能检测恶性疟和间日疟 (对这两型疟疾的检测均具有较高的敏感性和特异性) 又能区分恶性疟; 且具备其他诊断试条的一般共性, 即操作快速、简便, 不需任何仪器设备; 质量稳定, 结果判断客观, 样品不需冷藏, 具有广泛应用前景。

资料显示, ParaSight F 试纸条检测的敏感性为 77%~98%, 特异性为 83%~98%; OptiMAL 试纸条检测的敏感性为 88%~94%, 特异性可达 99%^[2]。本研究制备

的试条实验室检测的敏感性和特异性分别为 93.3%和 96%，接近上述两种试条的性能，以后还需在现场扩大测试，以作进一步评价。

参 考 文 献

[1] World Health Organization. New Perspectives: Malaria Diagnosis. Joint WHO/USAID informal consultation[M]. World Health Organization, Geneva, 2000. 1091.

[2] Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15: 66-78.

[3] Wang JY, Bao YF, Yang YT, et al. Preparation of monoclonal antibodies specific to lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 213-216. (in Chinese)

(汪俊云, 包意芳, 杨玥涛, 等. 恶性疟原虫乳酸脱氢酶特异性单克隆抗体的制备[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005,

23: 213-216.)

[4] Roe CD, Courtoy PJ, Baudhuin P. A model of protein-colloidal gold interaction[J]. J Histochem Cytochem, 1987, 35: 1191-1198.

[5] Li CW. Modern Immunochemic Technology[M]. Shanghai, Shanghai Press for Science and Technology, 1992. 165-181. (in Chinese)

(李成文. 现代免疫化学技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1992. 165-181.)

[6] World Health Organization. World malaria situation in 1994[J]. WKLY Epidemiol Rec, 1997, 72: 269-276.

[7] Van der Jagt DL, Hunsaker LA, Campos NM, et al. Dactate production in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*[J]. Mol Biochem Parasitol[J]. 1990, 42: 277-284.

[8] Sherman IW. Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites)[J]. Microbiol Rev, 1979, 43: 453-495.

[9] Bzik DJ, Fox BA, Gonyer K. Expression of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase in *Escherichia coli*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 59: 155-166.

(收稿日期: 2007-05-24 编辑: 高石)

文章编号: 1000-7423(2007)-05-0418-01

【病例报告】

幼儿眼结膜吸吮线虫幼虫感染 1 例

王爱华

中图分类号: R532.18

文献标识码: D

结膜吸吮线虫主要寄生于犬、猫等动物眼结膜囊内，是一种动物源性疾病，偶可寄生于人眼结膜囊内，引起结膜吸吮线虫病。国内近年来对眼结膜吸吮线虫成虫所引起的病例报道较多^[1]，但对人体眼结膜吸吮线虫幼虫感染报道较少^[2]。现发现 1 例眼结膜吸吮线虫幼虫感染患者，报道如下。

患者，男性，3 岁。2006 年 8 月 3 日起左眼部发痒，有异物感、分泌物增多，8 月 6 日异物感加重，如同沙子存在眼内。并伴有眼刺痛、痒感、畏光、流泪、眼分泌物明显增多，于当日来本校附属医院眼科就医。经检查眼睑水肿，结膜充血、发炎，泪点外翻，眼睑结膜有散在的微溃疡病变。用 1%地卡因溶液 2 滴滴入眼内，3 min 后，随药液溢出的眼分泌物中发现 6 条白色小虫，放入生理盐水小瓶内，由其家属带来本校咨询鉴定。

光镜观察，虫体均为乳白色，测量其中较大的 1 条幼虫为 3.447 mm×0.134 mm；较小的 1 条幼虫为 3.165 mm×0.126 mm；平均为 3.306 mm×0.130 mm。体表环纹变浅，口囊壁不清晰，头端表面粗糙，在食道末端腹侧的生殖原基较感染期幼虫的更为清晰，肠管内含有大小不等的油滴样物，经参考文献[3]鉴定为结膜吸吮线虫 4 日龄童虫。

随后用无菌生理盐水冲洗患儿眼结膜囊，1 次/d，连续 3 d，并收集洗眼液沉淀，未发现虫体。为防止患儿眼结膜并发细菌感染，用环丙沙星眼药水滴眼 1 周，2~3 次/d。2 周后随访，患儿眼部症状消失，未见虫体排出。

结膜吸吮线虫感染以夏秋季为多，与蝇类的季节消长相吻合，近年已证实冈田绕眼果蝇(*Amiota okadaei*)是我国结膜吸吮线虫的主要中间宿主，是本病的传播媒介^[4]。传染源主要为终宿主家犬，其次是猫、兔等动物。该患者家居农村且家中养犬，加上幼童眼部不洁，易被当地果蝇吸吮眼分泌物，因而引起眼结膜吸吮线虫幼虫的感染。应加强对犬、猫等宠物的饲养管理，夏秋季节做好防蝇、灭蝇工作，搞好环境、家庭以及个人卫生，注意保持眼部清洁，以预防控制眼结膜吸吮线虫的感染。

参 考 文 献

[1] Jiang ZX, Xu LQ, Yu SH. Human thelaziasis in China[J]. Chin J Parasit Dis Control, 1991, 4: 48. (in Chinese)

(蒋则孝, 许隆祺, 余森海. 我国人体结膜吸吮线虫病[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1991, 4: 48.)

[2] Yin KX, Liu YB. Morphological observation on the eggs and larvae of *Thelazia callipaeda* from human eye[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 145. (in Chinese)

(尹克霞, 刘玉冰. 人眼结膜吸吮线虫卵及幼虫形态观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志. 2005, 23: 145.)

[3] Wu GL. Human Parasitology [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004. 713-718. (in Chinese)

(吴峻陵. 人体寄生虫学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 716-718.)

[4] Li YL. Human Parasitology [M]. 6rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004. 203-204. (in Chinese)

(李雍龙. 人体寄生虫学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 203-204.)

(收稿日期: 2007-03-30 编辑: 高石)

作者单位: 南阳医学高等专科学校, 南阳 473003