

## · 实验研究 ·

## 鼠疫菌免疫胶体金快速检测方法的建立

朱虹 张春华 檀华 何君 赵斌 端青

**【摘要】** 目的 利用免疫胶体金技术建立一种简便、快速并适用于基层人员使用的鼠疫菌抗原检测方法。方法 将抗鼠疫菌 F1 抗原的抗体致敏硝酸纤维素膜,用于捕获鼠疫抗原,然后用免疫胶体金颗粒进行标记。结果 应用鼠疫菌免疫胶体金快速检测法最低可检出不同鼠疫菌(EV 和 Evp 株) $1.56 \times 10^5$  CFU/ml,检测鼠疫菌 F1 抗原最低可检出 1 ng/ml,与鼠疫反向间接血凝法的检测结果一致;并且不与假结核小肠结肠炎等耶尔森菌以及其他相关细菌发生交叉反应。结论 鼠疫菌免疫胶体金快速检测法具有较好的特异性、敏感性和简便快速的特点。

**【关键词】** 鼠疫菌;鼠疫菌 F1 抗原;胶体金;免疫层析

**Development of an immunochromatography assay method for the detection of *Yersinia pestis*** ZHU Hong\*, ZHANG Chun-hua, TAN Hua, HE Jun, ZHAO Bin, DUAN Qing. \*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Corresponding author: DUAN Qing, Email: duanq@nic.bmi.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To develop a method of immunochromatography assay(ICA) with sensitive, specific, rapid, simple and suitable for the detection of *Yersinia pestis* antigen at the local laboratories. **Methods** Colloidal gold labeled with the anti-F1 antibody of *Yersinia pestis*, was connected with the anti-F1 antibody of *Yersinia pestis* to pyroxylin membrane and assembled them to the dipstick of ICA. **Results** Results showed that the rates of sensitivity for F1 antigen and *Yersinia pestis* were 1 ng/ml and  $1.56 \times 10^5$  CFU/ml respectively. However, *Yersinia pseudotuberculosis* et al could not be detected by dipstick of ICA. **Conclusion** The method of ICA appeared to be consistent to those of r-IHA with better specificity and sensitivity but was simple and rapid for the detection of *Yersinia pestis* and F1 antigen.

**【Key words】** *Yersinia pestis*; F1 antigen; Colloidal gold; Immunochromatography assay

鼠疫菌的检测是鼠疫防治工作的重要内容之一。但突发现场的鼠疫病原体检测仍然存在不少困难,适合基层快速筛查的方法也不多。用免疫胶体金法快速检测鼠疫菌抗原,是近年来发展起来的新方法。本文报道军事医学科学院微生物流行病学研究所应用免疫胶体金技术检测鼠疫菌抗原的快速检测方法。

### 材料与方 法

1. 菌株来源:鼠疫菌种(EV 和 Evp 株)由中国疾病预防控制中心(CDC)鼠疫布鲁氏菌病预防控制基地(鼠布基地)提供。其他菌株包括假结核耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌、土拉弗朗西斯菌、布鲁氏菌、嗜肺军团菌、大肠埃希菌、痢疾志贺菌、沙门菌、

绿脓杆菌和霍乱弧菌 10 种菌株,均由军事医学科学院全军微生物检验研究中心提供。

2. 主要试剂:氯化金( $\text{HAuCl}_4$ )购自成都化学试剂厂;样品垫和吸水滤纸等购自 Milipore 公司;硝酸纤维素膜为美国 Millipore 公司产品;玻璃纤维膜为上海良信公司产品;塑料背板购自北京燕华公司;鼠疫菌 F1 抗原购于长春生物制品研究所,由中国 CDC 鼠布基地保存;反向间接血凝鼠疫测定药盒由鼠布基地提供(Lot No. 200306)。

3. 鼠疫菌免疫胶体金法快速检测试剂的制备:采用柠檬酸盐还原法制备胶体金颗粒,用  $28 \mu\text{g/ml}$  抗鼠疫菌 F1 抗原抗体与胶体金颗粒偶联,制备免疫胶体金探针溶液。用 PBS( $0.01 \text{ mol/L}$ , pH 值 7.2)稀释抗鼠疫菌 F1 抗原的抗体,用点样仪喷膜包被硝酸纤维素膜,室温晾干备用。将包被抗鼠疫菌 F1 抗原抗体的硝酸纤维素膜与浸有免疫胶体金探针的玻璃纤维膜和吸水纸垫按所需大小切割,装入塑料层析盒中,即为鼠疫菌胶体金法快速检测试剂。

4. 鼠疫菌、鼠疫菌 F1 抗原的检测及与其他细

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所微生物检验研究中心(朱虹、檀华、何君、端青);中国疾病预防控制中心鼠疫布鲁氏菌病预防控制基地(张春华、赵斌)

通讯作者:端青,Email: duanq@nic.bmi.ac.cn

菌的交叉试验:鼠疫菌种(EV 和 Evp 株)和对照菌划板挑取单菌落,于小试管中用生理盐水制成菌悬液,比浊后用生理盐水从 $1 \times 10^7$  CFU/ml 做 2 倍比稀释作为样品检测液备用;鼠疫菌 F1 抗原用生理盐水从 1000  $\mu$ g/ml 做 10 倍比稀释后作为样品检测液备用。取鼠疫菌胶体金法快速检测盒 1 个,分别于圆形的样品孔中加入上述样品检测液 3 滴(约 150  $\mu$ l),5 min 后开始观察结果,15 min 观察终止,于层析观测窗“C”(对照)处出现 1 条红色沉淀线,报告为检测结果阴性,即无鼠疫菌(或鼠疫菌 F1 抗原)检出;于层析观测窗“C”(对照)处和“T”(检测)处出现 2 条红色沉淀线,报告为检测结果阳性,即有鼠疫菌(或鼠疫菌 F1 抗原)检出。反向间接血凝试验检测鼠疫菌及其 F1 抗原按常规法进行。

### 结 果

1. 鼠疫菌免疫胶体金法快速检测试剂对鼠疫菌及鼠疫菌 F1 抗原的检测结果:三批(批号 200401、200402、200403)鼠疫菌免疫胶体金法快速检测试剂对不同浓度鼠疫菌的 EV 株和 Evp 株的检测结果见表 1;应用鼠疫菌胶体金法快速检测盒检测不同菌株鼠疫菌,最低可检出 $1.56 \times 10^5$  CFU/ml。对鼠疫菌 F1 抗原的检测结果见表 2,最低可检出 1 ng/ml。

表1 3 批鼠疫菌胶体金法快速检测试剂对鼠疫 EV 和 Evp 株试验结果

稀释浓度 (CFU/ml)	EV 株检测试剂批号			Evp 株检测试剂批号		
	200401	200402	200403	200401	200402	200403
$5.0 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+
$2.5 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+
$1.25 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+
$6.25 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+
$3.125 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+
$1.56 \times 10^5$	-	-	-	+	+	+
$7.8 \times 10^4$	-	-	-	-	-	-

表2 3 批鼠疫菌胶体金法快速检测盒对鼠疫菌 F1 抗原试验结果

稀释浓度 ( $\mu$ g/ml)	检测试剂批号		
	200401	200402	200403
100	+	+	+
10	+	+	+
1	+	+	+
$10^{-1}$	+	+	+
$10^{-2}$	+	+	+
$10^{-3}$	+	+	+
$10^{-4}$	-	-	-
$10^{-5}$	-	-	-
$10^{-6}$	-	-	-

2. 鼠疫菌免疫胶体金法快速检测试剂交叉试验结果:该试剂不与假结核耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌、土拉弗朗西斯菌、布鲁氏菌、嗜肺军团菌、大肠埃希菌、痢疾志贺菌、沙门菌、绿脓杆菌和霍乱弧菌等相关细菌发生交叉反应,显示了较好的特异性。

### 讨 论

鼠疫菌检测技术主要有核酸检测法(如 PCR)和免疫学方法。PCR 方法特异性高,但敏感性较细菌培养和 F1 抗原检测低,不能作为鼠疫的常规诊断方法<sup>[1]</sup>。免疫学方法的基础仍然是鼠疫菌 F1 抗原。法国巴斯德研究所和马达加斯加卫生部研究人员用免疫胶体金法快速诊断鼠疫,用鼠疫 F1 抗原包被 NC 膜捕获标本中 F1 抗体,然后用 SPA 标记的免疫胶体金探针检测人和鼠 IgG 抗体。该试验参比人血清(35 份阳性和 37 份阴性)的敏感性为 94.3%,特异性为 89.2%;参比黑鼠血清(22 份阳性和 24 份阴性)的敏感性为 100%,特异性为 91.7%<sup>[2]</sup>。2004 年德国报道已研制出 F1 抗原捕获 ELISA 商业化试剂盒,最小检测浓度为 4 ng/ml 鼠疫 F1 抗原,检测血清和淋巴液的敏感性分别为 90.1% 和 100%,特异性为 98.4%~100%<sup>[3]</sup>。有作者比较了 F1 抗原捕获 ELISA 和免疫胶体金试纸条用于检测疑似鼠疫患者的淋巴液、血清和尿液标本中 F1 抗原的结果。两种检测方法的特异性均为 100%,F1 抗原捕获 ELISA 法在淋巴液、血清和尿液中的敏感性分别为 100%、52% 和 58%,试纸条在淋巴液中的敏感性为 98%。试纸条检测与 ELISA 检测的一致性为 97.5%(相关系数  $r = 0.90, P < 0.001$ )。F1 抗原捕获 ELISA 和免疫胶体金试纸条是监测鼠疫流行及早期诊断的有效方法<sup>[4]</sup>。

胶体金免疫层析技术用于临床疾病诊断近年来发展较快,其原理是将待检物的配对物(抗体)包被在硝酸纤维素膜上用于捕捉,然后用免疫胶体金探针检测,阳性样品 2 min 后出现肉眼可见的沉淀线,该技术的优势在于处理样品简单,不需要专门仪器和人员培训,非专业人员按照说明书即可操作,并可迅速观察结果,很适合现场和基层使用我们研制的免疫胶体金法快速检测鼠疫菌抗原试剂,实验室考核的结果显示,可检测标本中鼠疫菌 15 万个/ml~20 万个/ml,检测鼠疫 F1 抗原 1 ng/ml,敏感性高于国外同类产品并具有较好的特异性。

## 参 考 文 献

- 1 Spletstoeser WD, Rahalison L, Grunow R, et al. Evaluation of a standardized F1 capsular antigen capture ELISA test kit for the rapid diagnosis of plague FEMS. Immunol Med Microbiol, 2004, 41:149-155.
- 2 Thullier P, Guglielmo V, Rajerison M, et al. Short report: Serodiagnosis of plague in humans and rats using a rapid test. Am J Trop Med Hyg, 2003, 69:450-451.

- 3 Rahalison L, Vololonirina E, Ratsitorahina M, et al. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. J Clin Microbiol, 2000, 38:260-263.
- 4 Chanteau S, Rahalison L, Ratsitorahina M, et al. Early diagnosis of bubonic plague using F1 antigen capture ELISA assay and rapid immunogold dipstick. Int J Med Microbiol, 2000, 290:279-283.

(收稿日期:2005-03-21)

(本文编辑:孙强正)

## · 疾病控制 ·

## 宫颈糜烂危险因素的病例对照研究

徐又先 濮德敏 施侣元

宫颈糜烂是妇女常见病、多发病。近年来,随着经济发展和人们生活水平不断提高,生活模式的改变,宫颈糜烂发生的危险因素是否发生了变化?其危险因素具体有哪些?为此我们开展了关于目前妇女宫颈糜烂危险因素的病例对照研究。

1. 资料与方法:随机选取 2005 年 4-7 月同济医院妇科门诊病例,宫颈糜烂组 141 例,年龄 23~55 岁,对照组 137 例,年龄 22~53 岁。所有对象无盆腔炎症及肿物,并经宫颈细胞学检查除外宫颈癌及癌前病变。各组年龄、月经及是否绝经等情况相似,具有可比性。问卷内容包括个人基本资料、婚孕状况、性生活及生育史等,对于因教育程度较低而无法独立完成问卷的研究对象,在经过培训的调查员协助下完成问卷。妇科检查观察阴道分泌物颜色及性状,宫颈糜烂程度及类型,并取分泌物作相应的检查。病原微生物检测包括滴虫和细菌性阴道病,同时行金黄色葡萄球菌、放线菌、念珠菌、淋球菌培养和衣原体检测,宫颈脱落细胞行人乳头瘤状病毒(HPV)DNA 检测。

2. 结果:①宫颈糜烂与年龄关系:各年龄组间宫颈糜烂发生率以 26~30 岁组最高;31~35 岁组宫颈中、重度糜烂比例明显高于其他年龄组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。②宫颈糜烂与生殖道感染的关系:宫颈糜烂组与对照组比较发现,两组 HPV 感染阳性率差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),宫颈糜烂组且随着宫颈糜烂程度加重,HPV 感染率升高。而其他病原微生物感染率两组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。③婚育因素对宫颈糜烂影响的趋势分析:对宫颈糜烂发生的婚育危险因素分析发现,家庭经济状况差,文化程度低,不注意个人卫生,有妇科疾病史及手术史为该病发生的危险因素,而绝经为保护因素。与宫颈糜烂发生关系密切的因素有结婚年龄、首次发生性行为 and 孕育年龄、孕次、产次。④宫颈糜烂发生危险因素的多元 logistic 回归分析:最终引入回归方程的变量为年龄、首次性交发生年龄、分娩方式、产次和 HPV 感染(表 1)。

3. 讨论:宫颈糜烂是妇科常见病,在 15~66 岁妇女中发病率为 49.1%<sup>[1]</sup>。在本研究中,26~30 岁病例组发病率最高

(70.0%),其次为 31~35 岁,为 56.8%,随着年龄增加,发病率逐渐下降。中、重度糜烂以 31~35 岁发生率最高(35.1%),明显高于其他年龄组( $P < 0.05$ )。26~35 岁组发病率高,可能是由于该年龄组妊娠、分娩比例高,性活动旺盛有关。

宫颈糜烂的发生是多种因素综合作用的结果<sup>[2]</sup>。本研究显示,首次性交年龄、结婚年龄和首次怀孕年龄越小,孕、产次越多,宫颈糜烂发生的危险性越大,而首次性交年龄和产次均被引入了回归模型,可能是因为宫颈发育尚未成熟及对宫颈的机械性损伤,导致宫颈上皮组织抵抗力低,容易受病原微生物的侵袭。因此提示在宫颈糜烂的防治中,应加大对育龄女性生殖健康教育的力度,特别要注意对青少年的性健康教育。本研究还发现,宫颈糜烂患者 HPV 感染率较宫颈光滑者感染率明显增高,且随着糜烂的严重程度而上升。已有大量研究表明<sup>[3]</sup>:HPV 感染是宫颈癌发生的主要危险因素之一。由此推测可能是 HPV 感染导致宫颈糜烂癌变的最终结果。因此,防治宫颈糜烂,特别是防治和检测宫颈糜烂患者 HPV 感染,并治疗 HPV 感染是阻止其癌变的关键之一。但两组病例中宫颈其他病原微生物的感染差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),这与王建捷<sup>[4]</sup>报道结果一致,说明生殖道病原微生物的感染不是导致宫颈糜烂的主要因素。但还有待进一步研究。

表 1 宫颈糜烂发生因素的多元 logistic 回归分析

因素	$\beta$	$s_x$	OR 值(95% CI)	Wald $\chi^2$ 值	P 值
年龄	-0.673	0.249	0.510(0.313~0.832)	7.275	0.007
首次性交年龄	-0.695	0.252	0.499(0.305~0.818)	7.603	0.006
分娩方式	-1.150	0.363	0.317(0.155~0.645)	10.026	0.002
产次	0.830	0.285	2.293(1.312~4.008)	7.603	0.006
HPV 感染	1.080	0.444	2.887(1.209~6.895)	5.696	0.017

## 参 考 文 献

- 1 石一复,邱丽倩,姚琦玮,等.女性生殖道感染 1111 例调查分析.中国实用妇科与产科杂志,2001,17:419-422.
- 2 卢琰,林峰.慢性宫颈炎相关因素流行病学分析.中国妇幼保健,2003,18:625-626.
- 3 Monoz N, Bosch FX, De Sarjoses, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med, 2003, 348:518-527.
- 4 王建捷.宫颈糜烂与生殖道感染关系的研究.临床和实验医学杂志,2005,4:19-21.

(收稿日期:2005-10-27)

(本文编辑:张林东)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科(徐又先、濮德敏),同济医学院流行病教研室(施侣元)