

# 布鲁氏菌血清 IgM, IgG 抗体胶体金免疫层析检测方法的建立及初步临床应用

刘涵轩<sup>1</sup>, 伍波<sup>1</sup>, 赵正春<sup>1</sup>, 陈超<sup>1</sup>, 韩露<sup>1</sup>, 梁辰<sup>2</sup>, 薛辉<sup>2</sup>, 冯杰<sup>2</sup>, 颜光涛<sup>2</sup>

(1. 北京中检安泰诊断科技有限公司, 北京 102600; 2. 解放军总医院第一医学中心医学检验中心, 北京 100853)

**摘要:** **目的** 应用胶体金免疫层析技术建立一种快速检测布鲁氏菌 IgM, IgG 抗体的方法, 并进行初步的性能验证。**方法** 采用枸橼酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 标记纯化的抗重组布鲁氏菌抗原, 将鼠抗人 IgG 抗体、鼠抗人 IgM 抗体和兔抗布鲁氏菌抗体喷在硝酸纤维素膜上作为检测线和质控线, 对 pH 值和抗体浓度等条件优化; 评估试剂盒灵敏度、特异度、交叉反应、准确度、精密度和干扰实验; 用该方法对临床的 400 份血清进行检测, 试管凝集试验验证其准确性。**结果** 该试纸条最佳胶体金标记的 pH 值为 7.5, 标记重组抗原质量浓度为 30 μg/ml。方法的灵敏度和稳定性较好且与其他病原菌无交叉反应。血清总胆红素、血脂和血红蛋白浓度的增高会使试纸条显色结果减弱。对 400 份临床样本进行检测, 其结果与试管凝集试验的符合率为 93.75%。**结论** 该试验建立的布鲁氏菌 IgM/IgG 抗体的胶体金免疫层析检测方法具有较好的特异度和稳定性, 整个检测过程可在 15min 内完成, 能够快速检测样品血清, 适用于现场快速检测。

**关键词:** 胶体金; 布鲁氏菌; 快速检测; 性能验证

中图分类号: R378.5; R446.61 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-102-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.025

## Preliminary Clinical Application of Colloidal Gold Immunochromatographic Detection of *Brucella* IgM, IgG Antibodies

LIU Han-xuan<sup>1</sup>, WU Bo<sup>1</sup>, ZHAO Zheng-chun<sup>1</sup>, CHEN Chao<sup>1</sup>, HAN Lu<sup>1</sup>, LIANG Chen<sup>2</sup>,  
XUE Hui<sup>2</sup>, FENG Jie<sup>2</sup>, YAN Guang-tao<sup>2</sup>

(1. Beijing Zhongjian Antai Diagnostic Technology Co., Ltd., Beijing 102600, China; 2. Center for Clinical Laboratory Medicine, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**Abstract:** **Objective** A rapid detection method of IgM, IgG antibody against *Brucella* was established by colloidal gold immunochromatography, and the preliminary performance verification was carried out. **Methods** Colloidal gold particles were prepared by trisodium citrate reduction method, and the purified anti-recombinant *Brucella* antigen was labeled. A mouse anti-human IgG antibody, a mouse anti-human IgM antibody, and a rabbit anti-*Brucella* antibody were sprayed on a nitrocellulose membrane as a detection line and a quality control line, and optimized for pH, antibody concentration, and other conditions. Assessed the kit sensitivity, specificity, cross-reactivity, accuracy, precision, and interference experiments. This method was used to test 400 clinical serums, and the tube agglutination test verified its accuracy. **Results** The test strip had an optimum pH of 7.5 and a labeled recombinant antigen concentration of 30 μg/ml. The method had good sensitivity and stability. It had no cross-reaction with other pathogens, and the increase of serum total bilirubin, blood lipid and hemoglobin concentration would weaken the coloration of test strips. For 400 clinical samples, the coincidence rate with the tube agglutination test was 93.75%. **Conclusion** The colloidal gold immunochromatographic assay for *Brucella* IgM, IgG antibody established in this experiment has good specificity and stability. The whole detection process can be completed within 15min, which can quickly detect sample serum and is suitable for rapid detection on site.

**Keywords:** colloidal gold; *Brucella*; rapid detection; performance verification

布鲁氏菌病 (*Brucellosis*) 是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 引起的一种人畜共患的自然疫源性传染病。该病在 160 多个国家和地区有存在和流行<sup>[1]</sup>。在我国, 2005~2016 年布鲁氏菌病疫情总体呈上升趋势,

2014 年全国疫情达到历史记载的最高水平<sup>[2]</sup>。布鲁氏菌病的明确诊断依赖于可疑患者体液中致病细菌的证明, 通常通过培养鉴定<sup>[3]</sup>。快速准确的诊断是控制该疾病的关键步骤。目前常用的实验室方法不

基金项目: 国家科技支撑计划 (2015BAK45B01)。

作者简介: 刘涵轩 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 临床检验诊断学, E-mail: lhxwf5566@126.com。

通讯作者: 颜光涛, 男, 研究员, 博士生导师, E-mail: yan301@263.net。

能同时具备检测过程快速灵敏、使用环境多样、操作要求简单以及高性价比等特点<sup>[4]</sup>。胶体金免疫层析法具有样本用量少、易于操作、检测速度快、准确度较高等优点,可在实验室和应用现场进行疾病的快速诊断和筛查<sup>[5]</sup>。

研究表明,IgM 抗体检测对布鲁氏菌病急性期诊断有意义,而 IgG 抗体检测对慢性布鲁氏菌病诊断有较高的参考价值<sup>[6]</sup>。本文建立了一种可同时测定布鲁氏菌病 IgM 抗体和 IgG 抗体胶体金免疫层析分析方法,为布鲁氏菌病的早期诊断提供了新的技术工具,有一定的临床应用前景。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 400 份被检血清来自内蒙古地区医院,200 份阴性血清来自非布鲁氏菌病流行区医院体检健康人群。高总胆红素、高血脂和溶血阳性血清均来自北京中检安泰诊断科技有限公司保存质控品。

### 1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器设备:XYZ3060 三维喷点平台、CM4000 切条机购自 Biodot 公司;MK3 酶标仪购自美国热电公司。

1.2.2 主要试剂:重组布鲁氏菌抗原、鼠抗人 IgG 单克隆抗体、鼠抗人 IgM 单克隆抗体、兔抗布鲁氏菌多克隆抗体、硝酸纤维素膜 CNC、金标垫购自某生物原料公司;布鲁氏菌试管凝集试验抗原购自青岛中创生物科技有限公司;布鲁氏杆菌 IgG 和 IgM 抗体检测试剂盒(ELISA 法)购自美国 DRG 公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 研究方法

#### 1.3.1 试剂盒检测方法的建立

1.3.1.1 胶体金颗粒的选择目标:选择制备粒径大小为 30 nm 的胶体金,在 100ml 纯化水中加入 4ml 1g/dl 氯金酸煮沸、在搅拌条件下加入 1.6ml 的 4g/dl 枸橼酸三钠溶液,煮沸 5 min。放置于室温环境自然冷却,应用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后定容到原体积,室温避光保存备用。观察胶体金溶液的物理性状,取 10ml 溶液在波长 400nm~700nm 范围内进行扫描,测定其最大吸收峰。

1.3.1.2 胶体金标记最适 pH 值的选择:取若干个 1.5ml 试管,分别加入 1ml 胶体金;用 0.1mol/L  $K_2CO_3$  或 5 mol/L 盐酸将 pH 分别调为 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10。分别取不同 pH 值的胶体金溶液 100  $\mu$ l 加到酶标孔内,3  $\mu$ l 浓度为 1mg/ml 的重组布鲁氏菌抗原,混匀,室温放置 15min;每孔分别加入 20  $\mu$ l 10g/dl NaCl 溶液,混匀,室温放置 2 h,在酶标仪上读取 522nm 波长下吸光度值;记录吸光度值变化最小的 pH 值(X)。再将 pH 值按梯度调

为 X-1.0, X-0.5, X, X+0.5, X+1, 重复上述步骤,保持吸光度值变化最小的 pH 值为最佳 pH 值<sup>[7]</sup>。

1.3.1.3 胶体金标记重组:布鲁氏菌抗原标记量的确定首先采用盐沉淀法选择重组布鲁氏菌抗原的最低标记量,然后用交叉配比法选出重组布鲁氏菌抗原的最佳标记量。取 8 支试管,分别加入的胶体金溶液 1ml;各试管依次加入不同质量浓度的重组抗原(0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 和 35  $\mu$ g/ml),混匀,室温放置 40min;加入 20  $\mu$ l 10g/dl NaCl,室温下放置 2h;颜色仍保持红色的为标记的最低重组抗原用量。通常在此基础上增加 20% 的重组抗原量即为标记时所需重组抗原的最佳量。

1.3.1.4 免疫层析 NC 膜的制备:根据本试验前期研究,确定检测线包被浓度为鼠抗人 IgG 1.0mg/ml,鼠抗人 IgM 1.0mg/ml;质控线包被浓度为兔抗布鲁氏菌抗体 2.0mg/ml。用三维喷点平台分别在 NC 膜上进行划线,喷点量为 0.1  $\mu$ l/mm,相隔 0.5cm,37℃干燥 3h 备用。

1.3.1.5 胶体金免疫层析试剂条的组装:将样品垫(滤血膜和玻璃纤维)、胶体金结合垫、制备完成的 NC 膜和吸水垫依次贴上 PVC 板,切割为每条 0.36cm,装入有干燥剂的铝箔袋中密封,4℃保存。

1.3.1.6 检测方法和判定标准:选择血清/血浆加样量为 10  $\mu$ l,全血加样量为 20  $\mu$ l,加 100  $\mu$ l 样本稀释液,15 ~ 20min 为加样判读时间。若质控线和 IgG 检测线处均出现红色条带,表明样品 IgG 为阳性;若质控线和 IgM 检测线处均出现红色条带,表明样品 IgM 为阳性;若质控线、IgG 检测线和 IgM 检测线处出现 3 条红色条带,表明样品 IgM 和 IgG 均为阳性;若只有质控线处出现红色条带,表明样品为阴性;若质控线处不出现红色条带则说明该试纸条失效。

### 1.3.2 性能评估

1.3.2.1 分析灵敏度:取一个布鲁氏菌 IgG 最低检出限企业参考品原始血清(ELISA 检测结果 S/C 值为 3.85,复检误差小于 5%)和一个布鲁氏菌 IgM 最低检出限企业参考品原始血清(ELISA 检测结果 S/C 值为 3.33,复检误差小于 5%)。将两个血清分别用生理盐水梯度调整为:1:2, 1:4, 1:8, 1:16 和 1:32;以健康人的阴性血清作为对照,每个浓度样本用胶体金试剂盒检测三次。结果出现阳性信号的血清最高稀释度作为最低检出限。最低检出限可反映试剂盒的灵敏度。

1.3.2.2 特异度:收集 200 份健康人血清标本,经试管凝集试验检测布鲁氏菌抗体为阴性,用胶体金试剂盒进行复检。

1.3.2.3 干扰试验:通过干扰实验验证高胆红素、

溶血、高血脂对检测试剂盒的影响。准备3个浓度(S/C值分别为2.23, 3.25, 5.56; 编号P1, P2, P3)的布鲁氏菌IgG阳性标本一组, 3个浓度(S/C值分别为2.44, 3.33, 5.44; 编号N1, N2, N3)的布鲁氏菌IgM阳性标本一组, 每组设实验管和对照管各一个。①高胆红素干扰实验: 将各组血清分别用正常人血清、80  $\mu\text{mol/L}$  和 160  $\mu\text{mol/L}$  高总胆红素血清2倍稀释各组血清, 充分混匀后检测。②溶血干扰实验: 用正常人血清、10g/L 血红蛋白血清和20g/L 血红蛋白血清2倍稀释各组血清, 充分混匀后检测。③高血脂干扰实验: 用正常人血清、12mmol/L 高血脂血清和18mmol/L 高血脂血清2倍稀释各组血清, 充分混匀后检测。

1.3.3 初步临床应用: 用所制备的布鲁氏菌胶体金试纸条对采集自内蒙古牧区某医院的200份血清进行检测, 同时用试管凝集法做平行试验, 比较两者的符合率情况, 评价该方法的临床应用价值。

1.4 统计学分析 检测结果采用 SPSS Statistics 22.0 软件进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 检测方法的评价

2.1.1 胶体金溶液的鉴定: 肉眼观察胶体金溶液颜色鲜红、清亮, 无混浊及漂浮物, 由图谱可见其最大波峰出现在522nm处, 峰形狭窄(见图1)。说明制备的胶体金溶液颗粒大小分布均匀, 透光性和稳定性良好。

表1 胶体金最适标记重组抗原量的确定

编号	1	2	3	4	5	6	7	8
HRS-Ag ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	5	10	15	20	25	30	35
实验结果	变蓝	变蓝	变蓝	变蓝	变色	不变	不变	不变

### 2.2 胶体金试纸条的性能评价结果

2.2.1 灵敏度结果: 本检测试剂检测不同稀释度的布鲁氏菌阳性血清最低检出限参考品血清, 当稀释度为1:8时检测线仍可显示清晰, 表明该检测试纸条具有良好的灵敏度。

2.2.2 特异度检测结果: 检测200份健康人血清标本, 其中195份样本结果为阴性, 本检测试剂特异度为97.5%。其中, 布鲁氏菌IgG抗体检测阳性例数为3份, 布鲁氏菌IgM抗体检测阳性例数为2份。

2.2.3 干扰试验结果: 见表2。实验结果发现高总胆红素、高血脂和溶血阳性血清与正常阴性血清差异较小, 并不干扰胶体金试剂卡对阴性样本检测的结果判定, 但干扰胶体金试剂卡对阳性样本检测的结果判定。血清总胆红素、血脂和血红蛋白浓度的增高均会使试纸条显色结果减弱。当血清总胆红素、血脂和血红蛋白浓度过高时, 会使试纸条出现假阴

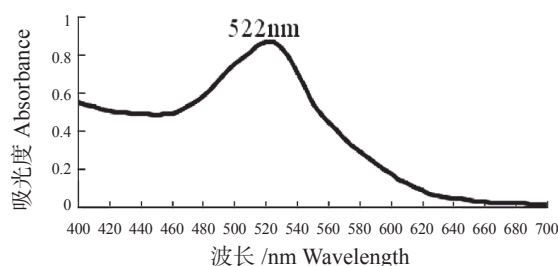


图1 胶体金溶液紫外-可见光谱图

2.1.2 最佳标记pH值的确定: 见图2。当pH值为7.5~9.0范围时其吸光度只有微小变化, 溶液保持红色, 无明显区别, 所以本试验最终确定胶体金标记抗体的最佳pH值为7.5。

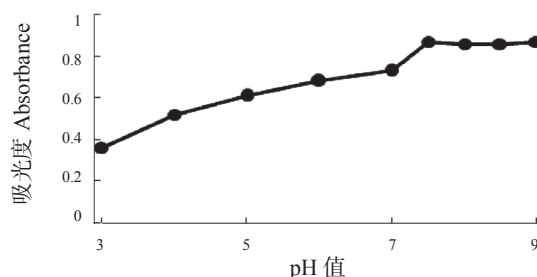


图2 标记重组抗原溶液的pH值测定曲线

2.1.3 重组布鲁氏菌抗原最佳标记量的确定: 见表1。从6号管后颜色基本趋于稳定, 溶液颜色没有明显变化。6号管所加标记用重组布鲁氏菌抗原标记量为25  $\mu\text{g/ml}$ 。在此基础上增加20%, 其抗原最适标记质量浓度为30  $\mu\text{g/ml}$ 。

性反应。

2.3 临床样品的检测 对采集自内蒙古牧区某医院的400份血清, 采用本方法制备的胶体金试纸条进行检测。结果检出IgG抗体阳性样本25份, 阳性率6.25%; IgM抗体阳性样本10份, 阳性率2.5%, IgG和IgM抗体均阳性样本5份。综上, 采用本方法制备的胶体金试纸条共检出阳性样本30份, 阳性率7.5%。试管凝集试验方法检出的阳性样本为32份, 阳性率8.0%, 二者的阳性符合率为93.75%。胶体金试纸条检出的阳性样本均来自试管凝集试验方法检出的阳性样本。

## 3 讨论

布鲁氏菌病是全球最常见的人畜共患病之一, 每年约有500 000例新病例, 对公众健康构成威胁。建立快速检测布鲁氏菌诊断方法具有非常重要的公共卫生学意义<sup>[8]</sup>。布鲁氏菌病的发病机制复杂, 潜

伏期最高可有5个月,其临床症状包括发烧、头痛、关节痛和背痛等,无法和伤寒、疟疾等疾病区分<sup>[9]</sup>。布鲁氏菌病诊断基于细菌培养和分子方法(直接测试),以及体外血清学和体内过敏性方法(间接测试)。

所有标准血清学测试均基于识别布鲁氏菌脂多糖(LPS)O抗原的抗体的检测<sup>[10]</sup>。应用胶体金免疫层析法检测人体内抗体,已广泛用于病毒、细菌及寄生虫病的免疫诊断<sup>[11-12]</sup>。

表2 干扰试验结果

组别		IgG 检测				IgM 检测			
		对照组 1	P1	P2	P3	对照组 1	N1	N2	N3
总胆红素组	10 μ mol/L	-	+	++	+++	-	+	++	+++
	80 μ mol/L	-	-	+	++	-	+	+	++
	160 μ mol/L	-	-	+	++	-	-	+	++
血红蛋白组	0g/L	-	+	++	+++	-	+	++	+++
	10g/L	-	-	+	++	-	-	+	++
	20g/L	-	-	+	++	-	-	+	++
血脂组	4mmol/L	-	+	++	+++	-	-	+	+++
	12mmol/L	-	+	+	++	-	-	+	++
	18mmol/L	-	-	+	++	-	-	+	++

刘亚东等<sup>[12-14]</sup>研制的胶体金法快速诊断布鲁氏菌病诊断试剂,与酶联免疫吸附测定检测和临床诊断检测结果的一致性较好。目前现有的胶体金方法检测布鲁氏菌病只能检测IgG抗体,不能同时检测IgM抗体。IgG抗体是血清中含量最多的免疫球蛋白,IgM抗体是在感染或免疫后最早产生的免疫球蛋白。有研究报道,对于布鲁氏菌感染患者后,首先血清IgM抗体升高;IgG抗体随后呈低水平上升,持续近一年后下降;治疗后IgG抗体水平降低,当病情再次加重时,IgG可迅速再次升高<sup>[6]</sup>。IgM抗体检测对布鲁氏菌病的早期诊断是有益的,IgM和IgG抗体联合测定,可以区分疾病的急性期和慢性期。

本研究制得的胶体金溶液为澄清透明的紫色液体,状态稳定良好。根据文献和前期研究,我们选择了最小标记蛋白量的1.2倍为标记蛋白量,这样能够有效避免假阴性和假阳性的现象<sup>[15]</sup>。

本研究通过优化胶体金标记条件、样品稀释液、金标垫和样品垫的制备条件,使产品的灵敏度达到上市产品水平,特异度高,性能良好。

我们用胶体金试剂盒方法和试管凝集试验这两种方法同时对临床样本进行检测,结果两者的阳性符合率为93.75%。本试剂盒方法的检出率与标准方法之间仍然存在差距,这可能是由于血清样品中的抗体滴度低所致。但是,以此方法创建的试剂盒没有假阳性现象出现。同时,也提示牧区布鲁氏菌感染较多,应及时进行治疗和预防。

本试验方法相较于ELISA法和试管凝集法相比,不需要添加多种试剂和酶,操作时间和反应时

间均大大减少。同时该方法的特异度和灵敏度也较好。因此,胶体金免疫层析法是布鲁氏菌病的理想且快速的检测方法。

#### 参考文献:

- [1] 陈丹,柳晓琳,刘孝刚,等.布鲁氏菌病流行趋势及其防治措施的研究进展[J].中国地方病防治杂志,2011,26(1):26-28.  
CHEN Dan, LIU Xiaolin, LIU Xiaogang, et al. Research progress on *Brucellosis* epidemic trend and its prevention measures[J]. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 2011, 26(1):26-28.
- [2] 崔步云,姜海.2005-2016年全国布鲁氏菌病监测数据分析[J].疾病监测,2018,33(3):188-192.  
CUI Buyun, JIANG Hai. Surveillance data of *Brucellosis* in China, 2005-2016[J]. Disease Surveillance, 2018, 33(3):188-192.
- [3] MCALLISTER T A. Laboratory diagnosis of human *Brucellosis*[J]. Scottish Medical Journal, 1976, 21(3):129-131.
- [4] OKTAY G, ÖZLEM B, NEVZAT I Y. Rapid immunofiltration assay based on colloidal gold-protein G conjugate as an alternative screening test for bovine and ovine *Brucellosis*[J]. Trop Anim Health Prod, 2012, 44(2):213-215.
- [5] 朱明东,洪林娣.胶体金免疫层析法快速诊断牛布鲁氏菌病的研究[J].中国人兽共患病学报,2008,24(8):755-756,759.  
ZHU Mingdong, HONG Lindi. A new method of rapid diagnosis of *Brucellosis* in cows by colloidal gold immunochromatographic assay[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2008, 24(8):755-756,759.
- [6] 郭淑丽,李娟,苟荣.布鲁氏菌病患者血清免疫球蛋白的检测分析[J].中国热带医学,2016,16(3):288-289.

(下转第143页)