

狂犬病病毒抗体胶体金检测试纸的制备

王铁成¹, 张涛², 杨松涛¹, 王化磊³, 高玉伟¹, 孙玮³, 靳晓霞¹, 赵平森², 冯娜¹,
黄耕¹, 邹啸环¹, 夏咸柱¹

1 中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所 吉林省人兽共患病预防与控制重点实验室, 长春 130122

2 中国医学科学院 北京协和医院实验动物研究所, 北京 100021

3 吉林大学 畜牧兽医学院, 长春 130062

摘要: 通过胶体金免疫层析技术建立一种特异、便捷、快速的狂犬病病毒抗体检测方法, 对犬等动物免疫狂犬病疫苗后的抗体水平监测提供参考。用醋酸锌沉淀法沉淀狂犬病病毒 CVS₁₁, Sepharose 4FF 进行层析纯化。用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金, 标记纯化的狂犬病病毒, 喷于试纸的结合释放垫 (金标垫), 将 SPA (葡萄球菌表面 A 蛋白) 和纯化的兔抗狂犬病病毒 IgG 分别喷于试纸的 T (检测线) 处和 C (对照线) 处, 组装试纸条。用制备的试纸条对 261 份犬血清进行检测, 与快速荧光灶抑制试验 (RFFIT) 检测的结果一致; 对已知效价的犬狂犬病毒中和抗体 (VNA) 大于 0.5 IU, 结果为阳性; 对狂犬病病毒中和抗体 (VNA) 小于 0.5 IU/mL 的血清, 结果为阴性。制备的狂犬病病毒抗体胶体金检测试纸检测犬血清抗体, 具有特异、便捷、快速的特点, 能够检测出狂犬病病毒中和抗体大于 0.5 IU 的血清, 适用于临床犬血清抗体水平监测, 具有良好的应用前景。

关键词: 胶体金, 狂犬病病毒, 中和抗体, CVS₁₁

Preparation and application of a colloidal gold strip to detect the rabies antibody

Tiecheng Wang¹, Tao Zhang², Songtao Yang¹, Hualei Wang³, Yuwei Gao¹, Wei Sun³, Xiaoxia Jin¹,
Pingsen Zhao², Na Feng¹, Geng Huang¹, Xiaohuan Zou¹, and Xianzhu Xia¹

1 Key Laboratory of Jilin Province for Zoonosis Prevention and Control, Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Science, Changchun 130122, China

2 Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

3 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China

Abstract: To develop a specific, rapid, and convenient immunochromatography assay (ICA) to detect the rabies antibody in

Received: December 22, 2010; **Accepted:** March 22, 2011

Supported by: National Science and Technology Ministry (No. 2006BAD06A09), Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 200803014).

Corresponding author: Xianzhu Xia. Tel/Fax: +86-431-86985869; E-mail: xia_xzh@yahoo.com.cn

Songtao Yang. E-mail: yst610223@yahoo.com.cn

国家科技部支撑计划 (No. 2006BAD06A09), 农业公益性行业项目 (No. 200803014) 资助。

clinical sample from immuned dogs by rabies vaccine. Colloidal gold particles labeled with purified rabies virus (CVS₁₁) were used as the detector reagent. The staphylococcal protein A (SPA) and pured rabbit anti-rabies virus IgG were blotted on the test and control regions of nitrocellulose membrane. Then the strip was assembled with sample pad, absorbing pad, and dorsal shield. The assay samples (261 dog's serum) were collected from Wildlife Rabies Disease Diagnostic Laboratories of Ministry of Agriculture in China, Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences and other six provinces, including rabies virus positive and negative serum. The performance of the strip was compared to fluorescent antibody virus neutralization test. The neutralizing antibody titer could be detected above 0.5 IU. The strip did not change of performance when stored at room temperature for 12 months. It may offer reference of neutralizing antibody titer level after dogs immuned rabies vaccine and determin whether the dogs need to be immuned again.

Keywords: colloidal gold, rabies virus, neutralizing antibody, CVS₁₁

狂犬病病毒属于弹状病毒科狂犬病毒属，外形呈子弹状，核衣壳呈螺旋对称，表面具有包膜，内含有单链 RNA，是引起狂犬病的病原体^[1]。狂犬病对生命安全的危害非常严重，一旦狂犬病发作，尚无法医治^[2]。据中国疾病预防控制中心 (CDC) 统计，2000-2006 年全国共报告狂犬病病例 13 104，仅 2006 年全年发病人数就达 3 385 例。多数病例由犬、猫等带毒动物传染。预防狂犬病的发生，最有效的方法是对动物进行狂犬病疫苗的免疫接种。按照世界卫生组织 (WHO) 及国际兽疫局 (OIE) 的要求，人或动物接种狂犬病疫苗后，其血清 RV 中和抗体效价大于 0.5 IU/mL 时，才能达到有效保护作用，否则应予加强免疫，直至达到保护水平^[3-4]。免疫过程中，由多种因素可能使机体产生的中和抗体达不到保护水平，因此，对狂犬病的预防及抗体水平监测显得尤为重要。检测狂犬病病毒血清的方法主要有小鼠血清中和试验(NMT)^[5-6]、快速荧光灶抑制试验 (RFFIT)^[7]、荧光抗体病毒中和试验 (FAVNT) 等，但均需要较长时间和专业技术人员操作，不利于临床快速检测。胶体金免疫层析技术近年来在生物各领域得到了越来越多的应用。其优点包括特异、快速、便捷、不需专业技术人员操作和贵重仪器设备等，特别适合临床现场检测。本试验制备的狂犬病病毒抗体胶体金检测试纸条，为注射 RV 疫苗后的犬的抗体水平监测提供了便捷的方法，该试纸条具有较高的特异性、敏感性，而且操作简单，具有很好的临床应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清样本、抗原及抗体

犬 RV 阳性血清样本由吉林省公安厅警犬基地 (赵德江警官) 提供、农业部狂犬病及野生动物与人共患传染病诊断实验室涂长春研究员惠赠、中国医学科学院实验动物研究所秦川教授惠赠；狂犬病病毒 (CVS₁₁) 由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制研究所唐青研究员惠赠，纯化的兔抗 RV IgG 由本室制备；SPA 为以色列 Megapharm 公司产品。

1.1.2 试剂

琼脂糖凝胶 4FF (Sephacrose 4FF 层析柱填料) 柱、Protein G 柱为 GE 公司产品；EDTA 购自联星生物公司；β-丙内酯、吐温-20 购自上海西宝生物有限公司；二水合柠檬酸三钠购自天津市光复精细化工研究所；氯金酸 (HAuCl₄·4H₂O) 为 Sigma 产品；牛血清白蛋白 (BSA) 为 Jackson 产品；硝酸纤维素膜 (NC 膜)、玻璃纤维、吸水纸、背板购自上海金标生物科技有限公司；其他试剂为国产分析纯。

1.1.3 仪器

XYZ3000 Dispensing Platform 和 CM4000 Cutter 为美国 Bio-Dot 产品；UV-2800 紫外分光光度计购自 Sigma 公司；Thermo electron corporation D37520 Osterode 离心机购自德国；90-2 型定时控温磁力搅拌器购自金坛市大地自动化仪器厂；电脑紫外检测仪购自上海青浦沪西仪器厂；低温真空干燥箱购自上海一恒科技有限公司。

1.2 狂犬病毒的纯化

收获 Vero 细胞培养 84 h 的狂犬病毒 CVS₁₁ 株上清, 4 °C、380×g 离心 30 min, 取上清, 按照 β-丙内酯与上清 1:4 000 (V/V) 的比例灭活狂犬病病毒; 1 mol/L 醋酸锌与灭活的狂犬病病毒液按 1:50 (V/V) 比例沉淀病毒, 边加边搅拌, 4 °C 沉淀 2 h 以上; 4 °C、400×g 离心 30 min, 去上清, 沉淀用饱和 EDTA 悬浮至澄清, 过 Sepharose 4FF 层析柱, 收集第 1 峰; 将纯化的病毒过 Protein G 柱, 以去除培养病毒过程中的 IgG, 4 °C 保存备用^[8-9]。以上试验操作均在生物安全三级实验室中进行。

1.3 兔抗 RV IgG 纯化

用纯化的狂犬病毒按常规方法免疫家兔后, 收集血清; 用硫酸铵方法进行纯化, 用 0.01 mol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液 (PB) 透析, -20 °C 保存备用^[10]。

1.4 胶体金制备

用柠檬酸三钠法制备 20 nm 的胶体金。用控温磁力搅拌器将 100 mL 0.01% 氯金酸水溶液加热至沸腾, 迅速加入 1.5 mL 新配制的柠檬酸溶液, 边加边搅拌, 溶液由淡黄色变为深褐色, 加热至颜色稳定变为紫红色后, 自然冷却至室温, 保存备用。此次制备的胶体金溶液其可见光吸收峰在 522 nm 处的值为 1.38^[11]。

1.5 最小蛋白含量测定及标记

取 8 孔聚苯乙烯微量反应管一条, 各孔先加 30 μL 二馏水, 再向第 1 孔内加入 30 μL 纯化的狂犬病病毒, 倍比稀释至最后一孔, 向各孔加入 125 μL pH 8.0 的胶体金溶液, 室温静置 15 min; 向各孔加入 125 μL 10% NaCl 溶液, 观察各孔颜色变化, 以不变色一孔为最小蛋白浓度; 按测得的最小蛋白浓度的比例将纯化的狂犬病毒加至 pH 8.0 的胶体金溶液中, 边加边搅拌, 室温静置 30 min; 加入 10% 牛血清白蛋白(BSA), 使其在溶液中的终浓度为 1%, 室温静置 15 min; 4 °C、8 778×g 离心 30 min, 吸去上清, 用重悬液 I (含 BSA 等) 悬浮至原体积, 4 °C、8 778×g 离心 30 min, 去上清, 沉淀用重悬液

II (含蔗糖、BSA、吐温-20 等) 1/5 体积悬起, 4 °C 保存备用^[12-13]。

1.5.1 试纸条 T 线包被浓度的确定

用浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL 的 SPA 分别喷于 NC 膜的 T 处, C 线喷纯化的兔抗 RV, 浓度为 0.8 mg/mL。

1.5.2 金标垫、样品垫预处理

将含 BSA、蔗糖的溶液和含吐温-20、PEG20 000 的溶液分别喷于玻璃纤维处, 作为试纸条的金标垫和样品垫, 将玻璃纤维置于 42 °C 热空气消毒箱中烘干 2 h 以上, 待完全烘干后, 密封备用。

1.6 试纸的组装及检测

1.6.1 试纸的组装

将已确定 T 线和 C 线浓度的 SPA 和兔抗 RV IgG 的 NC 膜、金标垫 (结合释放垫, 标记 CVS₁₁ 的胶体金已按确定浓度低温干燥其上)、样品垫、吸水纸按顺序粘于背板上, 按所需宽度切割后, 安放于塑料卡内, 密封保存备用^[14]。

1.6.2 试纸条结果判定标准

在 T 和 C 处出现紫红色线和浅紫红色线分别判为阳性和弱阳性; 在 T 处未出现色线而只在 C 处出现红线判为阴性; 在 C 处未出现紫红色线, 则判定试纸条无效。

1.6.3 试纸条特异性检测

用制备的检测试纸条分别用犬瘟热病毒 (CDV) 阳性血清、细小病毒 (CPV) 阳性血清、犬腺病毒 (CAV) 犬阳性血清、犬标准阴性血清、犬 RV 阳性血清 (VNT>0.5 IU) 进行检测。

1.6.4 试纸条灵敏度检测

用试纸条对 68 份阳性样品 (VNT≥1.0 IU/mL)、16 份弱阳性样品 (0.5 IU/mL≤VNT<1.0 IU/mL) 和 5 份标准阴性犬血清进行检测。

1.6.5 试纸条稳定性检测

分别于常温和 4 °C 保存制备的检测试纸, 经过 3、6、12 个月后检测已知犬 RV 阳性和阴性血清, 与最初制备时的结果比较。

1.6.6 试纸条对比试验

RFFIT 是世界卫生组织及世界动物卫生组织推荐的用于狂犬病抗体检测的方法,因此本试纸条检测选用 RFFIT 进行结果对比。选用狂犬病病毒 ($VNT \geq 1.0$ IU/mL)、(0.5 IU/mL \leq VNT), 分别用 RFFIT 法和试纸条法进行检测, 并进行结果对比。

1.7 试纸条临床应用

对吉林省公安厅警犬基地惠赠的 12 份、农业部狂犬病及野生动物与人共患传染病诊断实验室的 105 份、中国医学科学院实验动物研究所惠赠的 3 份 RV 疫苗免疫的犬血清样本, 以及军事兽医研究所收集的犬 141 份 RV 免疫血清样本进行检测, 同时用 FAVN 方法进行比对。

2 结果与分析

2.1 胶体金制备及标记结果和分析

电镜下, 制备的胶体金较均一、分散; 胶体金与纯化的狂犬病病毒结合稳定。将制备的金标记狂犬病病毒 4°C 放置 10 d 后, 未见胶体金结合物有明显变化, 如果制备的胶体金颗粒电镜下聚集在一起, 标记后的胶体金通常放置 2 d 以上就会在保存管底部出现沉淀, 这样会对试纸的保存期和灵敏性产生影响。若要制备均匀、分散的胶体金颗粒, 在操作时一定要迅速加入柠檬酸三钠溶液, 而且要不断搅匀, 如图 1~2 所示。

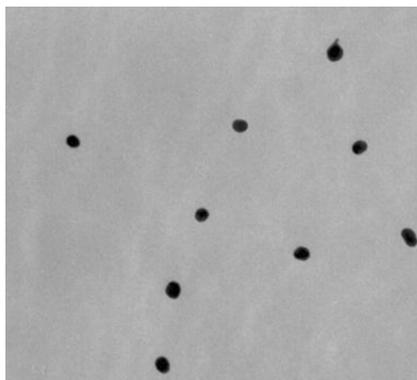


图 1 电镜下的胶体金 (20 000 \times)

Fig. 1 Colloidal gold particle by electron microscope (20 000 \times).

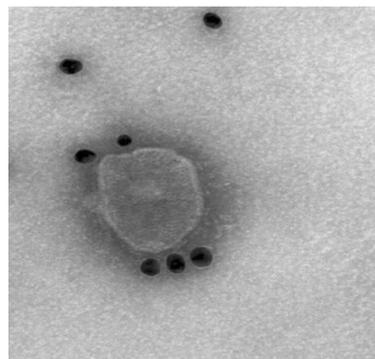


图 2 电镜下的金标狂犬病毒 (20 000 \times)

Fig. 2 Rabies virus labeled with gold (20 000 \times).

2.2 试纸条 T 线包被浓度的确定

选用浓度为 1.5 mg/mL 的 SPA 包被 T 线, 0.5 、 1.0 mg/mL 的 SPA 检测时显色偏弱, 选用浓度为 2.0 mg/mL 的 SPA 容易出现非特异性结果。

2.3 试纸条特异性检测结果

对已知犬 CDV、CPV、CAV 阳性血清和犬 RV 标准阴性血清进行检测结果为阴性, 见图 3; 对犬 RV 阳性血清 ($VNT > 0.5$ IU) 检测结果为阳性。

2.4 试纸条灵敏性检测

随着犬 RV 血清效价的高低, 检测线显色由深变浅; 0.5 IU 以下的血清结果为阴性, 如图 4 所示。

2.5 试纸条稳定性检测结果

试纸在不同环境下保存 3、6、12 个月时对已知效价的 RV 阳性和阴性血清进行检测与最初检测结果对比, 未见明显差异, 故该试纸有效期至少 12 个月。

2.6 试纸条对比试验结果

胶体金检测试纸对 0.5 IU 以上的犬阳性血清均能显示阳性结果, 低于 0.5 IU 则只出现阴性结果灵敏度略低于 RFFIT (图 5), RFFIT 检测 0.5 IU 以下的犬 RV 阳性血清仍能看到较清晰的荧光。

2.7 试纸条临床应用结果

对吉林省公安厅警犬基地、农业部狂犬病及野生动物与人共患传染病诊断实验室、中国医学科学院实验动物研究所从全国各省市收集免疫 RV 疫苗的犬血清以及军事兽医研究所收集的犬血清进行检测, 结果与 FAVN 方法检测的符合率为 98%, 其中

118 为阳性血清, 5 份疑似阳性, 43 份阴性。疑似阳性结果均为血清效价较低 (低于 0.5 IU), 试纸检测较长时间 T 线处才出现一很弱色线, 所以结果判定为疑似阳性。

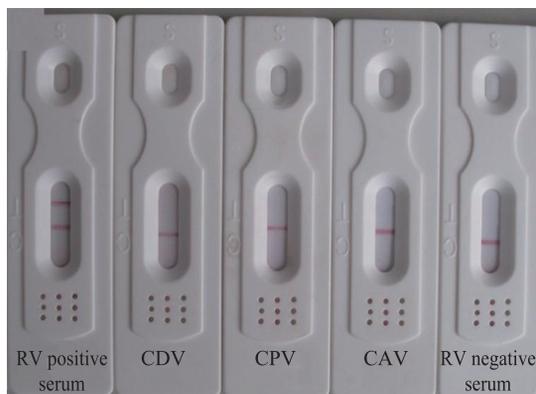


图 3 试纸条特异性检测结果

Fig. 3 Specificity of the immunochromatographic strip. CDV: canine distemper virus antibody; CPV: canine parvovirus antibody; CAV: canine adenovirus antibody.



图 4 试纸条灵敏度检测结果

Fig. 4 Sensitivity of the immunochromatographic strip.

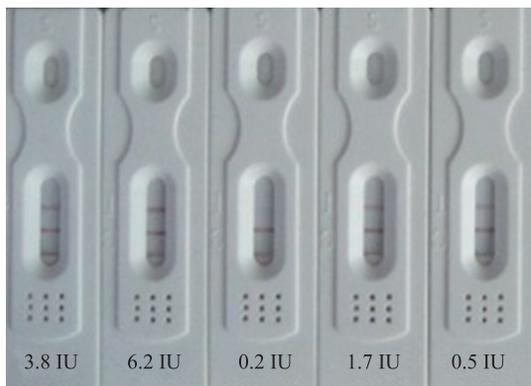


图 5 试纸条对比试验结果

Fig. 5 Results of contrast test.

3 讨论

本试验选用醋酸锌方法沉淀狂犬病病毒, 沉淀样本选用的是接种狂犬病病毒细胞的上清液, 保证了收获的狂犬病病毒多数为装配完整的病毒粒子, 同时纯化后经电镜观察验证 RV 病毒粒子完整。选用 CVS₁₁ 标准毒作为标记蛋白, 病毒粒子表面的糖蛋白未被破坏, 能够与 RV 中和抗体有效发生免疫学反应, 从而避免了纯化狂犬病病毒糖蛋白的繁琐工作, 而且用完整病毒粒子标记的胶体金, 在检测免疫 RV 疫苗的犬产生中和抗体的过程中, 验证了其结果的正确性和可行性。笔者在开始试验过程中, 未对纯化病毒进行处理, 直接作为标记蛋白, 在试纸条使用过程中出现非特异现象, 给试验带来了影响。后经分析, 试纸的检测线为 SPA, 其可与多种动物血清中的 IgG Fc 片段结合^[16], 在培养狂犬病病毒过程中使用的是小牛血清, 产生的非特异极可能是病毒粒子中未除去的牛血清中的 IgG 造成的, 将病毒过 Protein G 柱后, 再重新标记, 制备检测试纸, 对犬 RV 标准阴性血清进行检测, 结果去除了非特异现象。用 SDS-PAGE 对病毒进行检测, 可见一极弱与分子量相当的 IgG 条带, 证实纯化后的 RV 病毒中含有少量小牛血清中的 IgG。

试纸条样品垫和金标垫的预处理也十分重要。本试验样品垫中包含 PEG20 000, 其无毒、无刺激性, 具有良好的水溶性, 并具有优良的保湿性、粘接剂、抗静电等特点。但其用量过大也易出现假阳性, 控制其用量能够起到增加试纸灵敏性的作用^[17]。在金标垫 (结合释放垫) 中我们加入了蔗糖, 因其具有极好的水溶性, 因而能够使标记的胶体金完全释放出来使反应更能充分进行, 同时金标垫处中的 BSA 能够有效保护标记抗原, 延长了试纸的有效期。

在验证农业部狂犬病野生动物及人共患病实验室、吉林省公安厅警犬基地及中国医学科学院实验动物研究等单位收集的免疫狂犬病疫苗的犬血清实验中, 与 FAVN 试验结果进行对比, 符合率可达 98% 以上。

我国的狂犬病发病情况依然严重,在用狂犬病毒疫苗免疫犬等动物过程中,常出现动物机体产生的抗体滴度不高或不产生抗体,起不到免疫保护的作用,出现这种情况的原因可能有以下几种,疫苗保存不当而失效、动物个体原因、饲养环境等因素,这就对动物和人形成了潜在的危险,因此对犬等动物免疫狂犬病毒疫苗后的抗体滴度进行及时监测显得特别重要^[18]。但通常的检测方法需要专门的实验设备和技术人员操作,而且一般需要几天或更长时间才能出结果,不适合临床的快速诊断。胶体金检测试纸能在 20 min 内得出确定结果,且特异性、敏感性、稳定性较高,尤其适用于临床大批量样品检测。

REFERENCES

- [1] Mungro K, Mahabir R. The rabies epidemic in trinidad of 1923 to 1937: an evaluation with a geographic information system. *Wilderness Environ Med*, 2011, 22(1): 28–36.
- [2] Yu YX. *Rabies and Rabies Vaccine*. Beijing: China Medical Science Press, 2001: 5–30.
俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 5–30.
- [3] World Health Organization. Expert committee on rabies. Eight report. WHO Tech Rep Series, 1992: 8241–8284.
- [4] World Health Organization. Expert committee on rabies. 1st report. Geneva: World Health Organization Technical Report Series, 2005: 931.
- [5] Aoki FY, Rubin ME, Fast MV. Rabies neutralizing antibody in serum of children compared to adults following post-exposure prophylaxis. *Biologicals*, 1992, 20(4): 283–287.
- [6] Wunderli P, Shaddock JH, Schmid DS, et al. The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccine. *Vaccine*, 1991, 9(9): 638–642.
- [7] Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996: 88–95.
- [8] Yin Z, Liu JH. *Animal Virology*. Beijing: Science Press, 1997: 777–795.
殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1997: 777–795.
- [9] Redwan el-RM, Fahmy A, El Hanafy A, et al. Ovine anti-rabies antibody production and evaluation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32(1): 9–19.
- [10] Zhu LP, Chen XQ. *Immunology General All Purpose Method*. Beijing: People's Military Medical Press, 2000: 342–364.
朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000: 342–364.
- [11] Bassab C, Syamal R. Manufacturing high-quality gold sol. *IVD Technol*, 2001, 8: 46–54.
- [12] Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, et al. Preparation and characterization of Au colloid monolayers. *Anal Chem*, 1995, 67(4): 735–743.
- [13] Laderman EI, Whitworth E, Dumaul E, et al. Rapid, sensitive, and specific lateral-flow immunochromatographic point-of-care device for detection of herpes simplex virus type 2-specific immunoglobulin G antibodies in serum and whole blood. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(1): 159–163.
- [14] T Jiang, Z Liang, WW Ren, et al. A simple and rapid colloidal gold-based immunochromatographic strip test for detection of FMDV serotype A. *Virology*, 2011, 26(1): 30–39.
- [15] Saengseesom W, Kasempimolporn S, et al. Use of latex agglutination test to determine rabies antibodies in production of rabies antisera in horses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2010, 41(6): 1387–92.
- [16] Atkins KL, Burman JD, Chamberlain ES, et al. *S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Mol Immunol*, 2008, 45(6): 1600–1611.
- [17] Saengseesom W, Kasempimolporn S, et al. Use of latex agglutination test to determine rabies antibodies in production of rabies antisera in horses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2010, 41(6): 1387–92.
- [18] Xianjun Wang, Shujun Ding, Zhong Li, et al. Human rabies epidemiology in Shandong province, China. *Jpn J Infect Dis*, 2010, 63(5): 323–326.