

• 临床检验研究论著 •

胶体金免疫法对手足口病分型检测的研究^{*}

张永顶, 彭丽梅, 惠朝晖, 赵言兵

(广东省深圳市西丽人民医院检验科 518055)

摘要:目的 建立胶体金免疫法(CGIA)对手足口病(HFMD)分型的检测方法。方法 用双抗体夹心检测原理建立 CGIA 对 HFMD 分型检测方法, 分别检测 136 例 HFMD 患儿和 30 例健康儿童粪便中柯萨奇病毒 A16 型(CA16)和肠病毒 71 型(EV71), 以逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)为金标准, 评价 CGIA 检测性能。结果 CGIA 与 RT-PCR 检测 136 例 HFMD 患儿粪便 EV71 阳性率分别为 27.2% 和 28.6%; CGIA 与 RT-PCR 检测 136 例手足口病患儿粪便 CA16 阳性率分别为 33.8% 和 35.3%; 以 RT-PCR 为金标准, CGIA 检测手足口病患儿粪便 EV71 的敏感性 89.7%, 特异性 89.7%, 阳性预测值 94.5%, 阴性预测值 95.9%, 准确度 95.5%; CGIA 检测手足口病患儿粪便 CA16 的敏感性 85.4%, 特异性 94.3%, 阳性预测值 89.1%, 阴性预测值 92.2%, 准确度 91.1%。结论 CGIA 法操作简单、方便、快速, 特异性和敏感性好, 为 HFMD 病原学早期分型诊断提供了一个有效的检测手段。

关键词:胶体金免疫法; 手足口病; 肠病毒 71 型; 柯萨奇病毒 A16 型; 分型检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.14.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)14-1682-03

Classification testing of hand foot and mouth disease by using colloidal gold immunoassay^{*}

Zhang Yongding, Peng Limei, Hui Zhaohui, Zhao Yanbing

(Department of Clinical Laboratory, the Xili People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

Abstract: **Objective** To establish colloidal gold immunoassay(CGIA) for the classification of pathogens causing hand, foot and mouth disease(HFMD). **Methods** Double antibody sandwich detection principle was used to build CGIA classification test methods for HFMD. Coxsackievirus A16 type(CA16) and enterovirus71 (EV71) were detected in feces samples from 136 cases of HFMD patients and 30 cases of healthy children. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) was performed as gold standard method to evaluate the detection performance of CGIA. **Results** Positive rates of EV71 in 136 cases of HFMD patients, detected by CGIA and RT-PCR were 27.2% and 28.6%, respectively, and those of CA16 were 33.8% and 35.3%. Taking RT-PCR as gold standard method, the sensitivity, specificity, positive predictive values, negative predictive values and accuracy rate of CGIA to detect EV71 in HFMD patients were 89.7%, 89.7%, 94.5%, 95.9% and 95.5%, respectively, and those of CGIA to detect CA16 in HFMD patients were 85.4%, 94.3%, 89.1%, 92.2% and 91.1%, respectively. **Conclusion** The method of CGIA could be simple, convenient and fast, with fine specificity and sensitivity. The establishment of this method could provide an effective means for early etiology classification diagnosis of HFMD.

Key words: colloidal gold immunoassay; hand foot and mouth disease; enterovirus 71; coxsackievirus A16; classification test

手足口病(HFMD)是一种以手足皮肤和口腔黏膜疱疹为主要症状的小儿急性传染病^[1]。本病在国外 1957 年已有报道, 1981 年中国上海首次报告了手足口病疫情。近年来, EV71 病毒的流行在亚太地区呈上升趋势, 引发 HFMD 的肠道病毒有 20 多种(型), 其中柯萨奇病毒 A16 型(CA16)和肠病毒 71 型(EV71)最为常见。通常情况下, CA16 感染引起的 HFMD 在临床症状等方面与 EV71 感染所引起的 HFMD 难以区别。不同的是 CA16 感染所致的患者可引发心肌炎、心包炎等并发症, 而 EV71 感染容易引起无菌性脑膜炎、脑干脑炎及由此引发急性弛缓性瘫痪、肺水肿和出血等严重并发症, 死亡率较高。为了能对 HFMD 做到早发现、早分型诊断、早治疗, 积极预防并发症, 建立 HFMD 快速分型检测方法尤为重要。目前较常用的仍为病毒培养分离及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)^[2], 但因受实验室条件限制, 这两种方法仅限在疾

病控制中心和少数研究和大型医疗机构开展, 大多数医院均无条件开展。本课题利用胶体金免疫法(CGIA)双抗体夹心技术将柯萨奇病毒 A16 型膜壳蛋白 1(CA16VP1)和肠病毒 71 型膜壳蛋白 1(EV71VP1)的抗体包被于硝酸纤维素膜中, 用于检测 HFMD 患者粪便中不同类型的手足口病病毒抗原: CA16VP1 阳性则为柯萨奇病毒 A16 型感染, 而 EV71VP1 阳性则为肠病毒 71 型感染。CGIA 为目前国际上流行的即时检测方法, 用于 HFMD 的抗原检测在国内尚未见报道。本方法的建立为临床 HFMD 病原学早期分型诊断提供了一个方便、快速的检测手段。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HFMD 患者来源于本院感染科按照卫生部《手足口病预防控制指南(2008 年版)》标准临床诊断的 HFMD 患者 136 例(男 79 例, 女 57 例), 年龄 6 个月至 8 岁; 健康对照

^{*} 基金项目: 广东省深圳市科技计划资助项目(201003298)。

30 例来源于本院健康体检的儿童,其中男 17 例,女 13 例;年龄 6 个月至 7 岁,近 2 周无发热和腹泻病史。

1.2 标本采集和保存 对临床诊断 3 d 内的 HFMD 患者和健康对照儿童取大便 2 g(花生米大小)置含 3 mL Hanks 液的试管 4 ℃ 保存。

1.3 胶体金免疫法 HFMD 分型检测方法的建立

1.3.1 材料来源 重组肠病毒 71 膜壳蛋白 1(EV71VP1)、柯萨奇病毒 A16 型膜壳蛋白 1(CA16VP1)和 EV71VP1、CA16VP1 抗体来源于深圳市伯劳特生物制品有限公司;氯金酸(HAuCl₄)购自美国 Sigma 公司产品;硝酸纤维素膜(NC)来自美国伯乐(BIO-RAD)公司;EV71 和 CA16 抗体阳性血清来源于本院感染科经 RT-PCR 鉴定后证实为 EV71 或 CA16 感染的 HFMD 恢复期患者。

1.3.2 金标 EV71VP1、CA16VP1 抗体制备 在 0.01%氯金酸水溶液 100 mL 中加入 1%枸橼酸三钠 1 mL,加热煮沸 15~30 min,溶液由蓝色变为红色,即为胶体金溶液,调配成 0.01%胶体金分别与 0.5 mg/mL EV71VP1、CA16VP1 抗体按 10:1 比例混合,电磁搅拌 30 min,确定终体积,加 10%BSA 至终浓度为 1%,继续搅拌 30 min。4 ℃ 静置 2 h,4 ℃ 下以 1 500 r/min 离心 15 min,弃沉淀后再以 10 000 r/min 离心 1 h,吸弃上清液,沉淀物用 0.01 mol/L PB(1%BSA,0.02%PEG 和 0.05%NaN₃)重新悬浮至原体积的 1/10,用孔径为 0.45 μm 的滤膜过滤,收集金标 EV71VP1、CA16VP1 抗体,置 4 ℃ 避光保存备用。

1.3.3 抗原(重组 EV71VP1 和 CA16VP1)和抗体(EV71VP1、CA16VP1 抗体)的包被 分别在控制 A 区喷涂重组 2 ng/mL EV71VP1 和 CA16VP1 重组蛋白,在测试 B 区和 C 区喷涂 5 ng/mL EV71VP1 和 CA16VP1 抗体,置 37 ℃ 烘箱,30 min,取出后密封置 4 ℃ 保存。

1.3.4 检测卡组装 检测卡为长方形塑料小盒,大小为 4 cm×2 cm×0.7 cm,分为底和盖两部分,盖面有 2 cm×0.5 cm×0.3 cm 的反应槽,设有控制区 A 及测试区 B 和 C。盒内有 2 层,面向反应槽的为包被了抗原、抗体的 NC 膜:A 为 EV71VP1 和 CA16VP1 重组蛋白,B 为 EV71VP1 抗体,C 为 CA16VP1 抗体,NC 膜下为特制的吸水纸垫。

1.3.5 检测步骤 在检测卡反应槽中加入封闭液 100 μL,待渗入;加入稀释后待检粪便 100 μL,待渗入;加入洗涤液 200 μL,待渗入;加入金标记的 EV71VP1 和 CA16VP1 抗体 100 μL,待渗入;加入洗涤液 200 μL,洗去未结合的金标抗体,5 min 内观测结果。

1.3.6 结果判断 A 区应显示红色质控线,如未显色则本次测试无效;B 区出现红色线表示为 EV71VP1 抗原阳性,提示患者受 EV71 感染;C 区出现红色线表示为 CA16VP1 抗原阳性,提示患者受 CA16 感染;B 和 C 区均未显色表示本测试为阴性。

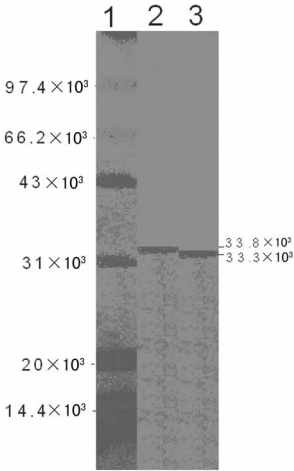
1.4 荧光定量 RT-PCR 检测 实时荧光 RT-PCR 检测仪(ABI7300);高速冷冻离心机(Eppendorf5417R);EV71 和 CA16 荧光定量 PCR 检测试剂盒由中山医科大学达安基因股份有限公司生产,按试剂盒说明书进行检测;结果判断:如检测标本扩增曲线无对数增长长期或 Ct≥37 为阴性;如检测标本 Ct<37 且扩增曲线有明显的对数增长长期为阳性。

1.5 统计学处理 用 SPSS13.0 软件包,以 RT-PCR 检测结

果为金标准,计算 CGIA 检测 EV71 和 CA16 感染的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和准确度。不同标本检测的阳性率差异采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组 EV71VP1 和 CA16VP1 验证 将重组 EV71VP1 和蛋白质相对分子质量标准同时进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝染色,根据 EV71VP1 区带的距离与蛋白质相对分子质量标准比较,通过半对数曲线,确定重组 EV71VP1 和 CA16VP1 的相对分子质量分别为 33.8×10^3 和 33.3×10^3 ,并经免疫印迹分析此区带能与 EV71 和 CA16 抗体阳性血清特异性反应,见图 1。



1:标准蛋白相对分子质量;2:EV71VP1;3:CA16VP1。

图 1 免疫印迹显示重组蛋白 EV71VP1 和 CA16VP1

2.2 CGIA 与 RT-PCR 检测结果 两种方法检测 136 例 HFMD 患儿粪便 EV71 阳性率分别为 27.2%和 28.6%;CGIA 与 RT-PCR 检测 136 例 HFMD 患儿粪便 CA16 阳性率分别为 33.8%和 35.3%;CGIA 与 RT-PCR 检测手足口病患儿粪便中 EV71 和 CA16 的阳性率差异无统计学意义($P>0.05$);粪便标本中 CA16 阳性率均高于 EV71($P<0.05$),见表 1。

表 1 CGIA 和 RT-PCR 检测 HFMD 患儿粪便 EV71 和 CA16 结果比较[n(%)]

检测方法	EV71 阳性	CA16 阳性
RT-PCR	39(28.6)	48(35.3)
CGIA	37(27.2)	46(33.8)

2.3 RT-PCR 检测 30 例健康儿童粪便 EV71 和 CA16 阳性率分别为 6.7%和 10.0%;CGIA 检测 30 例健康儿童粪便 EV71 和 CA16 阳性率分别为 10.0%和 3.3%,提示健康儿童中可能存在少数 HFMD 隐性感染患儿,见表 2。

表 2 CGIA 和 RT-PCR 检测 30 例健康儿童粪便 EV71 和 CA16 结果比较[n(%)]

检测方法	EV71 阳性	CA16 阳性
RT-PCR	2(6.7)	3(10.0)
CGIA	3(10.0)	1(3.3)

2.4 以 RT-PCR 为金标准,CGIA 检测 HFMD 患儿粪便 EV71 的敏感性 89.7%,特异性 97.9%,阳性预测值 94.5%,

阴性预测值 95.9%，准确度 95.5%，见表 3。

表 3 CGIA 和 RT-PCR 检测 136 例患儿粪便 EV71 结果比较 (n)

组别	RT-PCR 阳性	RT-PCR 阴性	合计
CGIA 阳性	35	2	37
CGIA 阴性	4	95	99
合计	39	97	136

2.5 以 RT-PCR 为金标准,CGIA 检测 HFMD 患儿粪便 CA16 的敏感性 85.4%，特异性 94.3%，阳性预测值 89.1%，阴性预测值 92.2%，准确度 91.1%，见表 4。

表 4 CGIA 和 RT-PCR 检测 136 例患儿粪便 CA16 结果比较

组别	RT-PCR 阳性	RT-PCR 阴性	合计
CGIA 阳性	41	5	46
CGIA 阴性	7	83	90
合计	48	88	136

3 讨 论

HFMD 实验室的诊断目前主要以分离出病毒、病毒核酸阳性或病毒 IgM 抗体检测阳性,病毒 IgG 抗体 4 倍以上增高或阴性转为阳性为依据^[2]。病毒分离方法因条件限制很难在临床实验开展;RT-PCR 检测 EV71 和 CA16 的 RNA 是目前常用的 HFMD 诊断的金标准,但其必须在规范的 PCR 实验室中进行,限制了本方法在基层医院应用;EV71 和 CA16 病毒抗体检测多用于 HFMD 的回顾性诊断和流行病学调查^[3]。

CGIA 是 20 世纪 90 年代初建立的一种简易、快速、稳定的免疫学检测技术,最初由 Beggs 等首先应用于人绒毛膜促性腺激素(HCG)测定^[4]。现已广泛用于幽门螺杆菌、肝炎、梅毒、艾滋病等传染性疾病抗原抗体及激素、药物的检测^[5],Hoppley 等首次将此法用于粪便中轮状病毒和肠病毒抗原的检测^[6]。而 CGIA 用于 HFMD 的分型检测在国内尚未见报道。

EV71 是小 RNA 病毒科肠道病毒属的成员^[7],其病毒基因组编码 4 个外壳蛋白,即 VP1、VP2、VP3、VP4。这 4 个蛋白通过拼装成原聚体和亚单位,最终形成病毒外壳,VP1、VP2、VP3 暴露在病毒表面,VP4 则包埋在病毒内侧起连接作用,其抗原表位位于 VP1、VP2、VP3 上,而主要中和抗原决定簇则主要集中于外壳蛋白 VP1 上。CA16 是单股正链 RNA 病毒,毒粒为二十面立体对称,呈球形,直径 23~33 nm,核衣壳裸露,衣壳蛋白包括 VP1 到 VP4,其中 VP1 具有主要抗原决定簇,CA16VP1 和 EV71VP1 是病毒血清型的分型依据^[8-12]。

本文采用 CGIA 将 CA16VP1 和 EV71VP1 抗体包被于硝酸纤维膜中,用于检测手足口病患者粪便中的 HFMD 病毒抗原;CA16VP1 阳性则为柯萨奇病毒 A16 型感染,而 EV71VP1 阳性则为肠病毒 71 型感染。本文检测 HFMD 患者 136 例和

健康儿童 30 例,CGIA 与 RT-PCR 检测 136 例手足口病患者粪便 EV71 阳性率分别为 27.2%和 28.6%;检测 136 例手足口病患者粪便 CA16 阳性率分别为 33.8%和 35.3%;CGIA 与 RT-PCR 检测 HFMD 患儿粪便中 EV71 和 CA16 的阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。以 RT-PCR 为金标准,CGIA 检测 HFMD 患儿粪便 CA16 的敏感性 85.4%,特异性 94.3%,阳性预测值 89.1%,阴性预测值 92.2%,准确度 91.1%;检测 EV71 的敏感性 89.7%,特异性 97.9%,阳性预测值 94.5%,阴性预测值 95.9%,准确度 95.5%。本方法的建立是国内首创,为基层医院 HFMD 病原学早期分型诊断提供了一个简单、方便、快速,特异性和敏感性好的有效检测手段。

参考文献

[1] 谭洁,何雅青,杨洪. 深圳市 2004 年手足口病暴发疫情处理及病原学检测[J]. 实用预防医学,2005,12(6):1345-1346.

[2] 程献,徐咏书. 手足口病 EV71 的实验室诊断[J]. 实验与检验医学,2008,26(3):306.

[3] 田波,段海生,荣一兵,等. 肠道病毒 71 型分子流行病学研究进展[J]. 中国病毒学,2004,19(4):426-429.

[4] 徐长根,朱阳泉,李浩,等. 胶体金免疫层析法快速筛查献血者梅毒螺旋体抗体[J]. 临床输血与检验,2009,11(3):234-235.

[5] 贾克东,丁元军,刘东林,等. 标记人血清抗体 IgG 胶体金免疫法对不同标本幽门螺杆菌抗原的测定[J]. 中华实验和临床感染病杂志,2009,3(1):1-5.

[6] Hoppley JF,Doane FW. Development of a sensitive protein A-gold immunoelectron microscopy method for viral antigens in fluid specimens[J]. J Virol Methods,1985,12(1/2):135-147.

[7] 何雅青,何丽芸,姚相杰,等. 荧光定量 RT-PCR 快速检测手足口病病原研究[J]. 中国热带医学,2008,8(10):1675-1677.

[8] 李琳琳,何雅青,朱俊萍,等. 柯萨奇病毒 A 组 16 型中国分离株(Cox. A16SHZH00-1)全基因组序列测定及分析[J]. 病毒学报,2005,25(3):217-221.

[9] Yang SL,Chou YT,Wu CN,et al. Annexin II binds to capsid protein VP1 of enterovirus 71 and enhances viral infectivity[J]. J Virol,2011,85(22):11809-11820.

[10] Huang SW,Wang YF,Yu CK,et al. Mutations in VP2 and VP1 capsid proteins increase infectivity and mouse lethality of enterovirus 71 by virus binding and RNA accumulation enhancement [J]. Virology,2012,422(1):132-143.

[11] Solomon T,Lewthwaite P,Perera D,et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71[J]. Lancet Infect Dis,2010,10(11):778-790.

[12] Chen HL,Huang JY,Chu TW,et al. Expression of VP1 protein in the milk of transgenic mice: a potential oral vaccine protects against enterovirus 71 infection[J]. Vaccine,2008,26(23):2882-2889.

(收稿日期:2012-03-09)