

(2):85-87.

[36] 金成兵,朱辉,王智彪,等.肋骨切除术在 HIFU 联合 TA-CE 治疗中晚期肝癌中的临床价值[J].重庆医科大学学报,2009,34(4):475-478.

[37] Zhu H,Zhou K,Zhang L,et al. High intensity focused ul-

• 综 述 •

trasound (HIFU) therapy for local treatment of hepatocellular carcinoma;role of partial rib resection[J]. Eur J Radiol,2009,72(1):160-166.

(收稿日期:2012-08-03 修回日期:2012-11-10)

胶体金免疫层析技术在临床疾病诊断中的研究进展

林一民¹,王云龙¹综述;胡永芳^{2△},吴立翔^{1▲}审校

(1.重庆市肿瘤研究所临床检验科,重庆 400030;2.重庆市公共卫生医疗救治中心,重庆 400036)

关键词:胶体金;免疫学技术;诊断技术和方法;层析技术

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.034

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)01-0091-03

胶体金免疫层析(colloidal-gold immunochromatography assay,GICA)技术是一种将胶体金标记技术、免疫检测技术和层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记免疫检测技术,具有简便、省时便捷、采样随意、用量少、结果易判读等特点,在感染性疾病、心血管疾病、风湿病、自身免疫疾病等的抗原、抗体的检测、诊断中有广泛的应用,也可用于各种蛋白质、激素及药物的检测。自 1971 年 Faulk 和 Taylor 创立胶体金标记技术以来,GICA 技术已成为继荧光标记、酶标记和放射性免疫标记之后的又一重要的免疫标记技术。本文就该技术在临床疾病诊断中的应用进行如下综述。

1 GICA 技术及其发展史

胶体金也称金溶胶,是由金盐被还原成原子金后形成的金颗粒悬液。胶体金具有胶体性质、呈色性及光吸收性。以胶体金为标记物的 GICA 技术是以硝酸纤维素膜为固相载体,利用微孔滤膜的可滤过性,通过毛细管作用使含金标记的抗原或抗体与特异性配体的反应在膜上进行,通过可目测的标记物而得到呈色的阳性信号,而游离标记物通过层析作用越过检测带,与结合标记物自动分离^[1]。

1857 年英国物理学家、化学家迈克尔法拉第发现胶体金由红色变为蓝色,奠定了胶体金制备和应用的科学基础;1971 年人们以此作为一种新型的有色标记物应用于免疫学领域,建立起一种信号显示技术,此后,免疫胶体金技术在医学免疫检验领域广泛应用;1974 年建立了间接免疫金染色法;1989 年建立了斑点金免疫渗滤法;1990 年建立了简易快速的 GICA 法。通过不断发展和改进,近 10 年来,GICA 法在检测项目种类和检测能力上都取得了很大进步,相应的检测项目都有商品试剂盒供应。

2 GICA 技术特点

胶体金具有纳米材料所特有的三大效应:表面效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应,具有很大的比表面积,独特的光学、导电、导热等物理特性以及良好的生物相容性^[2-4],可与蛋白质、核酸等结合。GICA 技术操作方便,成本低廉,不需仪器,样本(可以是组织液、血清、血浆、全血或排泄物等)用量少,基本不需前处理;检测试纸条体积小,结果判断直观、快速。特

别适用于基层单位,并能作现场的检测和诊断,可在医院、住宅、办公场所甚至野外进行各种疾病的检测,大部分检测结果可长期保存,很易让患者接受。

3 GICA 技术在疾病病原体检测中的应用

3.1 病原微生物的检测

3.1.1 细菌的检测 葡萄球菌广泛存在,人们通常在进食了含有金黄色葡萄球菌及其肠毒素污染的食品 2~4 h 后可出现临床症状。Huang 等^[5]研制的金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 GICA 试纸条,检测时间短,灵敏性强,适用于现场检测。沙门菌是一种肠道致病菌,可引起人和动物多种沙门菌病,使用免疫层析法为基础的诊断试剂盒对沙门菌进行检测,测试时分析灵敏度为 $10^4 \sim 10^5$ /mL,能够检测出 22 种沙门菌中的 19 种,显示了该法具有较高的特异性及灵敏度^[6]。肠出血性大肠杆菌 O157:H7 引起的肠道感染性疾病已是一个严重的全球公共卫生问题,在许多国家导致多起爆发流行,采用 GICA 技术检测大肠杆菌 O157,检测限为 500 个细菌,表现出特异性好、快速,对使用者无害等优点^[7]。Chisholm 等^[8]采用 3 种方法对粪便中幽门螺杆菌进行检测,GICA 法的敏感性为 87.8%,低于酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)的 95.9%;特异性为 89.4%,低于 ELISA 法的 100%,但 ELISA 法复杂,步骤较多,且对操作人员有一定要求,不如 GICA 法的方便、快捷,GICA 法能进行规模性检测^[9]。阴道念珠菌导致的阴道炎的临床症状无特异性,常常会出现误诊而导致抗真菌治疗的延误;Marot-Leblond 等^[10]人采用 GICA 法进行检测,检测原理为免疫球蛋白 M 抗体与阴道念珠菌细胞壁中抗原表位的结合,结果敏感性为 100%,特异性为 82%,优于传统革兰染色镜检和微生物培养,易于进行诊断,有助于临床医师对妇女阴道炎的治疗^[11]。

3.1.2 病毒的检测 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)血清标志物的检测以 ELISA 法最常用,但操作繁琐、耗时。用 GICA 法与 ELISA 法检测 HBV 表面抗原^[12],显示 GICA 法操作简便、快速、特异性较好;临床上也作为筛查丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,HCV)抗体的重要手段^[13],可对丙型肝炎的早期发现及预防控制有重要参考价值 and 意义。获得性免疫缺

陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的免疫缺陷性疾病, HIV 抗体的检测结果是 HIV 感染者和 AIDS 患者重要的诊断依据, GICA 试纸条因其快速、便捷、省时、准确、无需特殊仪器的特点^[14], 非常适用于基层医疗单位的使用和对人群的筛查。Cui 等^[15]建立了检测 H5 亚型禽流感病毒的 GICA 法。Sithigorngul 等^[16]建立了检测日本脑炎病毒的 GICA 法。Zhang 等^[17]建立了检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的 GICA 法。已经研制出的检测试纸条还包括新城疫病毒、细小病毒^[18]检测试纸条等。

3.1.3 寄生虫的检测 文献报道用 rK39 试纸条诊断黑热病现症患者具有快速、简便、敏感性和特异性高的特点^[19]; 可用金标免疫渗滤法检测肺吸虫、华支睾吸虫、囊虫、贾第鞭毛虫和隐孢子虫等^[20]; 阴道滴虫试纸条适宜临床应用。

3.1.4 其他病原体的检测 梅毒螺旋体胶体金快速诊断试纸条具有良好的特异性和敏感性, 可以快速、准确诊断梅毒螺旋体的感染^[21]。衣原体胶体金检测法简便快速, 仅 0.5 h 就可获得检测结果^[22]。此外, 关于旋毛虫病、唾液中肺炎足衣虫属病原、尿液中淋病双球菌、腺病毒、利什曼原虫等的胶体金检测也有报道。

3.2 人体激素、肿瘤标记物、疾病相关蛋白的检测 目前通过检测血液或尿液中人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)以辅助诊断早期妊娠的检验方法有 GICA、ELISA、化学发光、放射免疫分析法等, 其中 GICA 法应用最为广泛, 便于患者家庭使用^[23], 早早孕试纸条在医院和家庭使用极为普遍。肝癌诊断中, 采用胶体金法检测甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)含量是近年来发展起来的新型快速检测技术^[24]。人心肌肌钙蛋白 T(cardiac Troponin T, cTnT)是诊断心肌缺血、坏死的高敏感性、高特异性的血清学指标, 其定量、定性测量方法已在国内、外临床心血管领域广泛应用^[25]。此外关于类风湿因子、尿微量蛋白、促甲状腺素等也有报道, 市场上已有相关产品^[26]。

3.3 其他 在医学检验中广泛应用 GICA 技术的还有大便隐血测试卡、血清铁质测试条、免疫球蛋白血清测试条、免疫球蛋白全血测试板、前列腺抗原血清测试条、杀虫剂、军团菌属等。美国 Pan Probe Biotech 公司生产的快速一步法胶体金尿测试条可检测吗啡、海洛因、鸦片、可卡因、苯丙胺、甲基苯丙胺等毒品, 检测的标本类型包括血清、血浆、全血、尿液、粪及唾液等^[27]。

4 展 望

GICA 技术是目前发展较快的复合型免疫技术之一, 已作为诊断手段广泛应用于临床, 在许多方面具有明显优势, 但在实际应用中暴露出一些不足。GICA 试纸条结果判定易受环境、标本加样量多少、观察时间等因素影响; 一些病原体的检测存在交叉反应; 检测中可出现假阳性和假阴性反应, 存在前带现象, 其敏感性和特异性不如 ELISA 法和化学发光法; 多为单个测试, 批量使用不及 ELISA 法方便, 成本较高, 多数产品不能定量, 检测范围有待进一步拓宽; 在病原多项目联合检测方面还需提高与加强。随着新发传染病的出现, 针对新病原体的检测急待开发, 作者认为应在以下方面进行改进。

4.1 提高检测灵敏度和精度 研究新型标记材料或研究能与抗原-抗体复合物结合的第二抗体或噬菌肽等提高检测灵敏

度。取样器的改进可提高检测的精度, Toyokawa 等^[22]报道用微量取样管结合夹心免疫的生物传感器可检测前列腺特异性抗原, 达到 0.5 ng/mL 的精度。

4.2 提高试剂盒质量 胶体金颗粒大小和均匀性与其光的散射性密切相关, 并直接影响颜色变化。应建立统一的质量标准体系, 改善胶体金制备工艺, 选用试剂稳定, 对金标记物进行干燥处理, 防止试剂因受潮失效而影响结果判读。

4.3 定量和半定量检测 GICA 技术无法直接实现定量和半定量检测。但很多检测需要定量, 如监控临床指标的变化或确定特定分析物的相对或绝对浓度。间接实现的定量和半定量检测可分 3 类: (1)通过颜色深浅进行视觉比较, 提供半定量结果, 可分为阴性、弱阳性、中阳性和强阳性; (2)将检测部位结合胶体金的抗原或抗体设计为只能结合已知量的待测物, 任何过量的待测物将会与下一条检测线结合, 产生一个温度计式的条带梯度; (3)用便携式的 READER 来读取产生的条带, 将颜色浓度转化为数字指标。

4.4 拓宽检测范围 对捕获的信号进行放大, 采用新的标记物或引入生物素-亲和素系统, 有效增强信号的响应。结合生物传感器、电化学设备等手段来拓宽其检测范围。

4.5 实现多项联合检测 对于多元检测的实现可采用多膜复合、单膜多元受体固定 2 种方式, 这对于检测某些具有联合检测意义的物质具有很大的应用价值。如乙型肝炎、丙型肝炎、HIV 抗原或抗体的检测组合对筛选献血者会更方便, 而弓形虫、巨细胞病毒及风疹病毒等抗体的检测组合在围产期检查中极为有用。

4.6 生物芯片 生物芯片是以膜、玻璃、硅等固相介质为载体, 其优点在于高通量、并行化、微型化。包括基因芯片、蛋白质芯片、细胞芯片、组织芯片。一次实验可同时检测多种或多份生物样品。可用于大批量标本检测。

随着医学检验技术的不断更新和迅速发展, GICA 技术广泛运用于医院、住宅、办公场所甚至野外进行各种疾病的检测, 这种快速检测技术更能适应现代高效、快速的节奏, 并满足疾病的诊断要求, 特别适用于急诊标本或疫情现场的快速筛查, 对及时控制传染源, 确定疫情的性质有重大意义。实际运用中应选择灵敏度高、质量好的试纸条, 对低含量的检测标本, 应结合患者临床表现, 联合其他免疫方法定量测定, 相信 GICA 技术是未来即时检验的发展趋势, 必定会应用在越来越广的领域。

参考文献:

- [1] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 562-564.
- [2] Vial S, Pastoriza-Santos I, Perez-Juste J, et al. Plasmon coupling in layer-by-layer assembled gold nanorod films [J]. Langmuir, 2007, 23(8), 4606-4611.
- [3] Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, et al. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine[J]. J Phys Chem B, 2006, 110(14): 7238-7248.
- [4] Huang CC, Chiang CK, Lin ZH, et al. Bioconjugated gold nanodots and nanoparticles for protein assays based on

- photoluminescence quenching[J]. *Anal Chem*, 2008, 80(5):1497-1504.
- [5] Huang SH. Gold nanoparticle-based immunochromatographic test for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical specimens[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 373(1/2):139-143.
- [6] Nguyen TA, Khamrin P, Takanashi S, et al. Evaluation of immunochromatography tests for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant[J]. *J Trop Pediatr*, 2007, 53(4):264-269.
- [7] Brunt J, Webb MD, Peck MW. Rapid affinity immunochromatography column-based tests for sensitive detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins and *Escherichia coli* O157[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(13):4143-4150.
- [8] Chisholm SA, Watson CL, Teare EL, et al. Non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in adult dyspeptic patients by stool antigen detection: does the rapid immunochromatography test provide a reliable alternative to conventional ELISA kits[J]. *J Med Microbiol*, 2004, 53(Pt 7):623-627.
- [9] Chisholm SA, Watson CL, Teare EL, et al. Non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in adult dyspeptic patients by stool antigen detection: does the rapid immunochromatography test provide a reliable alternative to conventional ELISA kits[J]. *J Med Microbiol*, 2004, 53(Pt 7):623-627.
- [10] Marot-Leblond A, Nail-Billaud S, Pilon F, et al. Efficient diagnosis of vulvovaginal candidiasis by use of a new rapid immunochromatography test [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(12):3821-3825.
- [11] Marot-Leblond A, Nail-Billaud S, Pilon F, et al. Efficient diagnosis of vulvovaginal candidiasis by use of a new rapid immunochromatography test [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(12):3821-3825.
- [12] 陈佑明, 黄敬, 刘京平, 等. 两种方法检测乙型肝炎病毒表面抗原的比较[J]. *检验医学与临床*, 2009, 6(7):495-496.
- [13] 吴超良. 胶体金法与酶联免疫法检测丙型肝炎病毒抗体的比较[J]. *临床医学工程*, 2011, 18(5):701-702.
- [14] Granade TC, Workman S, Wells SK, et al. Rapid detection and differentiation of antibodies to HIV-1 and HIV-2 using multivalent antigens and magnetic immunochromatography testing[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(6):1034-1039.
- [15] Cui S, Tong G. A chromatographic strip test for rapid detection of one lineage of the H5 subtype of highly pathogenic avian influenza[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2008, 20(5):567-571.
- [16] Sithigorngul W, Rukpratanporn S, Sittidilokratna N, et al. A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection in shrimp [J]. *J Virol Methods*, 2007, 140(1/2):193-199.
- [17] Zhang J, Guo Y, Xiao Y, et al. A simple and rapid strip test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus[J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(7):883-886.
- [18] Oh JS, Ha GW, Cho YS, et al. One-step immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(4):520-524.
- [19] El-Moamly A, El-Sweify M, Hafeez M. Performance of rK39 immunochromatography and freeze-dried direct agglutination tests in the diagnosis of imported visceral leishmaniasis[J]. *Parasitol Res*, 2012, 110(1):349-354.
- [20] Garcia LS, Shimizu RY, Novak S, et al. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(1):209-212.
- [21] Campos PE, Buffardi AL, Chiappe M, et al. Utility of the Determine Syphilis TP rapid test in commercial sex venues in Peru[J]. *Sex Transm Infect*, 2006, 82 Suppl 5:S22-25.
- [22] Toyokawa M, Kishimoto T, Cai Y, et al. Severe *Chlamydia psittaci*? pneumonia rapidly diagnosed by detection of antigen in sputum with an immunochromatography assay[J]. *J Infect Chemother*, 2004, 10(4):245-249.
- [23] Stenman UH, Tiitinen A, Alftan H, et al. The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG[J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(6):769-784.
- [24] 李娟, 贾志凌, 刘畅, 等. 胶体金法检测甲胎蛋白在肝癌临床诊断中的应用与研究[J]. *解放军医学杂志*, 2010, 35(8):1044-1045.
- [25] Adamcová M, Strba M, Simnek T, et al. Myocardial regulatory proteins and heart failure[J]. *Eur J Heart Fail*, 2006, 8(4):333-342.
- [26] Yuhi T, Nagatani N, Endo T, et al. Resin-based micropipette tip for immunochromatographic assays in urine samples[J]. *J Immunol Methods*, 2006, 312(1/2):54-60.
- [27] 李超伟, 黄进, 周彦, 等. 胶体金免疫层析技术在感染性疾病诊断和食品卫生检测中的应用[J]. *国际医学寄生虫杂志*, 2011, 38(1):58-61.

(收稿日期:2012-05-10 修回日期:2012-10-18)