

口蹄疫病毒 O、A、Asia I 型定型诊断胶体金免疫层析方法的建立

蒋 韬, 梁 仲, 陈 涓, 何继军, 吕 律, 马维民, 刘在新, 刘湘涛

(中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室/农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 兰州 730046)

摘要: 【目的】建立一种从田间样品中快速、灵敏、简便检测 O、A、Asia I 型口蹄疫病毒抗原的胶体金免疫层析方法 (GICA)。【方法】采用柠檬酸三钠还原制备胶体金颗粒, 标记纯化的标准株 O、A、Asia I 型口蹄疫抗体。将纯化的口蹄疫流行株 O/China99, A/AF72 and Asia I /China05 抗体和羊抗豚鼠抗体分别包被在硝酸纤维素膜上, 作为检测带与质控带。经试验条件优化, 组装形成胶体金定型诊断试剂盒。【结果】本试验研制的口蹄疫定型试剂盒具有良好的灵敏度, 可检测到 7.8×10^4 LD₅₀ (1 : 128 倍稀释乳鼠毒) 的病毒量。同时对阳性及阴性样品进行 3 次重复检测结果完全相同, 说明其有较好的重复性; 特异性试验证实该方法在检测口蹄疫临床症状相似病原, 如猪水疱病抗原 (SVD)、水泡性口炎 (VS)、水泡性疹 (VES) 等病毒时无交叉反应; 试剂盒对 206 份已知血清型田间及实验室样品的符合率试验, O、A、Asia I 型和阴性样本的符合率分别为 92.45%、91.66%、92.75%、100% 定型准确率 94.58%。试剂盒在 4℃ 下可保存 6 个月。【结论】本试验研发的口蹄疫病毒胶体金定型诊断试剂盒是一种快速、灵敏、特异的 FMD 抗原检测方法, 对基层现场具有广泛应用价值。

关键词: O、A、Asia I 型口蹄疫病毒; 胶体金; 免疫层析法

Development of a Rapid Gold Immunochromatographic Strip Test for the Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease Virus O, A and Asia I Type

JIANG Tao, LIANG Zhong, CHEN Juan, HE Ji-jun, LÜ Lü, MA Wei-min, LIU Zai-xin, LIU Xiang-tao

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture/State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046)

Abstract: 【Objective】To develop a sensitive, rapid and simple gold immunochromatography assay (GICA) for determination of foot-and-mouth disease virus (FMDV) O, A, Asia I type from the field samples. 【Method】The purified anti-FMDV O, A, Asia I type Guinea pig antibody were coupled with the colloidal gold, and it was obtained by reducing the gold chloride with sodium citrate. The purified anti-FMDV strain O/China99, A/AF72 and Asia I /China05 rabbit antibody and the goat anti- Guinea pig IgG were wrapped onto nitrocellulose membrane as the test line (T line) and the control line (C line). The FMDV serotyping diagnosis kit was then performed by further optimization of the labeling and the conditions were determined. 【Result】The seriate results indicated that the sensitivity of the test kit reached 7.8×10^4 LD₅₀. (1 : 128 dilution mouse tissue virus) and it had the same results for positive and negative specimens tested in three times. No cross reaction was found with Swine vesicular disease (SVD), VS, VES antigen by cross tests. In the clinic test, a total of 206 field samples were comparatively detected with GICA. The corresponding rate of gold immunochromatographic strip test kit for FMDV O, A, Asia I type and negative sample was 92.45%, 91.66%, 92.75% and 100%. The correct rate of detected FMDV serotype was 94.58%. This strip could be stored at 4℃ for 6 months. 【Conclusion】In this study, the established gold immunochromatographic strip test kit is simple, rapid, sensitive and specific for detecting FMDV O, A, Asia I type, and is potentially useful for the first time and on-the-spot diagnosis.

Key words: FMDV O, A, Asia I type; Colloidal gold; Immunochromatography test

收稿日期: 2007-06-21; 接受日期: 2007-12-12

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD06A11)

作者简介: 蒋 韬 (1975-), 女, 江苏武进人, 博士研究生, 研究方向为分子病毒学与免疫学。E-mail: pcrjiang@163.com。通讯作者刘湘涛 (1942-), 男, 湖南祁东人, 研究员, 研究方向为动物病毒病分子流行病学。Tel: 0931-8342710; E-mail: hnxiangtao@hotmail.com

0 引言

【研究意义】口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (FMDV) 引起的偶蹄类动物共患的急性、热性、接触性传染病。世界动物卫生组织 (Office International des Epizooties, OIE) 将其列为 A 类传染病之首^[1]。从口蹄疫参考实验室 (OIE/FAO World Reference Laboratory for Foot-and-mouth disease, WRL for FMD) 对疫情通报统计, O 型的流行最为广泛 (世界范围内), 其次为 Asia I 和 A 型, C 型和南非三型非常罕见, 通常只在特定区域流行^[2]。快速、准确的病原学诊断是控制口蹄疫疫情蔓延和追踪疫源的重要环节。它可使一线防疫人员在疫情暴发时对现场做出正确的诊断, 及时确定病原、切断传播途径、采取有效的防范措施。【前人研究进展】目前, 在世界口蹄疫参考实验室口蹄疫病毒检测及定型的常规方法仍是 ELISA、病毒分离、RT-PCR 等方法^[1,3]。这些方法不仅需要一定的仪器设备和有实验技能的人员操作。而且操作复杂, 过程繁多, 检测用时长, 成本高。胶体金免疫层析技术 (a gold immunochromatographic assay GICA)^[4,5]是 20 世纪 90 年代以来在胶体金标记技术、免疫层析技术和新材料技术基础上发展起来的一项新型体外诊断技术。由于运用可目测的标记物 (胶体金或染色乳胶) 而得到直观的实验现象 (显色), 使得这种分析技术具备操作快速简便, 无须仪器, 结果准确、灵敏, 可常温下运输保存等优点, 已广泛应用于生物医学等各个领域。该技术在动物医学领域应用起步较晚, 已报道的口蹄疫快速诊断技术研究, 主要与口蹄疫抗体^[5]和病原定性^[6,7]诊断有关, 而将胶体金免疫层析技术应用于口蹄疫病原多血清型诊断的研究尚未见报道。【本研究切入点】本研究针对现今 FMDV 定型技术操作繁复, 难以应用于基层、田间口蹄疫病原的确诊, 同时根据国际口蹄疫流行状况, 选择 O、A、Asia I FMDV 标准株和流行株抗体, 利用免疫胶体金技术建立了口蹄疫病原定型诊断方法, 首次研发了具有自己知识产权的 FMDV 定型快速诊断试剂盒。【拟解决的关键问题】试剂盒的应用为口蹄疫的病原定型诊断提供一种快速、简便、特异、实用的检测方法, 解决现有诊断技术确诊时间长, 难以推广的现状, 为 FMDV 的快速诊断提供了新的手段。

1 材料与方 法

1.1 血清、病毒标本

口蹄疫多抗血清: FMDV/O、A、Asia I/Russia58/ (标准株) 豚鼠高免血清和 FMDV/O/China99、A/AF72、Asia I/China05 流行株兔高免血清; 阳性参考样本: FMDV/O、A、Asia I、C/标准株乳鼠组织抗原; 阴性参考样本: 猪水泡病病毒 (SVDV)、水泡性口炎 (VS)、水泡性疹 (VES) 抗原和健康乳鼠组织; 田间及试验样品标本 (206 份包括水疱皮、水疱液、乳鼠组织、O/P 液、细胞培养毒); 均由兰州兽医研究所口蹄疫参考实验室提供。

1.2 试剂

HiTrap Desalting、DEAE-Sephrose 层析柱: Amersham Pharmacia Biotech 公司产品; 兔抗豚鼠二抗、氯酸金 ($H_4AuCl_4 \cdot 4H_2O$)、牛血清白蛋白 (BSA): Sigma 公司产品; 聚乙二醇 20000 (PEG): 日本进口分装; 柠檬酸三钠 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) 等试剂均为国产分析纯。FMDV/O、A、Asia I 琼扩抗原: 兰州兽医研究所口蹄疫参考实验室提供。

1.3 材料及仪器

硝酸纤维素膜 (NC 膜)、吸水纸、玻璃纤维: Schleicher&Schuell 公司产品; XY 3000 喷膜机、CM 3000 切条机: 美国 Bio-Dot 公司产品; CARY50 紫外 2 可见分光光度仪: 产自日本岛津; Pharmacia FPLC 纯化系统: 瑞典 Pharmacia 公司; TGL216G 台式高速冷冻离心机: 上海安亭科学仪器厂产品。

1.4 口蹄疫多抗血清的纯化

将标准株和流行株 O、A、Asia I 口蹄疫高免血清首先用硫酸铵盐析粗提, 再用 DEAE-Sepharose 离子交换层析柱进一步纯化^[8], SDS-PAGE 法鉴定纯度^[9], 紫外分光光度法确定蛋白的含量, 双相免疫扩散法测定纯化抗体效价^[10]。

1.5 胶体金的制备

采用柠檬酸钠还原法^[11]制备胶体金。透射电镜 (TEM 像) 观察金颗粒大小, 检测 OD_{523nm} 吸收值确定胶体金浓度。

1.6 免疫胶体金制备

1.6.1 IgG 最适用量的选择 按照文献[12]进行, 确定 FMDV/O、A、Asia I/标准株/豚鼠 IgG 最适标记量分别为 45、40、60 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 。

1.6.2 IgG 最优 pH 的选择 取胶体金 5 ml, 用 0.1 $mol \cdot L^{-1}$ K_2CO_3 调节金溶胶 pH, 分别为 6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5 后, 按最佳标记量分别加入 FMD 标准株豚鼠纯化抗体, 搅拌 10~15 min。加入 5%BSA 至终浓度为 1%, 搅拌 5~15 min, 制成不同 pH 的金标

FMDV 抗体,并在检测波长 $OD_{523\text{ nm}}$ 下,取其光吸收值最高时的 pH 做为胶体金与 FMD 标准株豚鼠纯化抗体的最佳结合 pH。确定 O、A、Asia I 型标准株豚鼠 IgG 最适 pH 分别为 7.5、9.0、8.0。

1.6.3 O、A、Asia I 免疫胶体金的制备 根据各型抗体要求,调节胶体金溶液至所需最佳 pH,按最适标记量分别加入 O、A、Asia I 标准株豚鼠 IgG,磁力搅拌 10~15 min。加入 5%BSA 至终浓度为 1%,搅拌 10~15 min,依次将制备好的 O、A、Asia I 3 种免疫胶体金溶液离心纯化,2 000 r/min,20 min 弃沉淀;10 000 r/min,60 min,小心吸去上清液(切忌倾倒)。将 3 种沉淀分别悬浮于金胶缓冲液中,悬浮溶解,制成 O、A、Asia I 免疫胶体金,检测 $OD_{523\text{ nm}}$,置 4℃ 保存。

1.7 标记物工作浓度的确定

1.7.1 金标 FMD O、A、Asia I /标准株豚鼠抗体使用浓度的确定(以 O 型为例) 将金标 FMD O/标准株豚鼠抗体作系列稀释,使 $OD_{523\text{ nm}}$ 分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 等 6 个浓度,将不同浓度的金标 FMD O/标准株豚鼠抗体分别喷涂于玻璃纤维上,将标记的抗体 NC 膜分别与上述不同玻璃纤维粘帖与 PVC 底板上,制备试纸条初品,并用它们分别检测阳性与阴性参考样本。根据检测带显色深度与显色时间、NC 膜背景等指标确定金标抗体使用浓度。金标 FMD A、Asia I /标准株抗体使用浓度的确定方法与 O 型相同。

1.7.2 检测带 FMD O、A、Asia I /流行株兔抗体浓度的确定(以 O 型为例) 将金标抗体浓度固定,标记于 NC 膜检测带上 FMD O/流行株兔抗体作对倍稀释后,抗体浓度分别为 0.4、0.8、1.6、3.2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$,将玻璃纤维分别与上述几种 NC 膜粘帖与 PVC 底板上,制备试纸条初品,并用它们分别检测阳性与阴性参考样本。根据检测带显色深度与显色时间确定检测带抗体使用浓度。检测带 FMD A、Asia I /流行株抗体使用浓度的确定方法与 O 型相同。

1.7.3 质控带羊抗豚鼠 IgG 抗体浓度的确定 将检测带 FMD O、A、Asia I /流行株兔抗体与金标 FMD O、A、Asia I /标准株豚鼠抗体浓度固定,加于 NC 膜上的质控带羊抗豚鼠 IgG 抗体作对倍稀释后,浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$,将玻璃纤维分别与上述几种 NC 膜粘帖于 PVC 底板上,制备试纸条初品,将其放置于 37℃ 4 周后检测 O、A、Asia I 阳性参考样本,根据检测带与质控带的显色情况确定质控带羊抗豚鼠 IgG 抗体浓度。

1.8 试剂盒的制备

1.8.1 制备含有检测带和质控带的硝酸纤维素膜 将纯化的流行株 O、A、Asia I 型 FMDV 兔 IgG 和羊抗豚鼠 IgG 调整至工作浓度,分别喷涂于 NC 膜上,形成各型试纸条的检测带和质控带。3 种硝酸纤维素膜置于封闭液中封闭、洗脱,室温晾干,保存备用。

1.8.2 制备胶体金垫 取玻璃纤维纸,用喷膜机按 $15\ \mu\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$,将胶体金标记的标准株 O、A、Asia I 型 FMDV 豚鼠 IgG,分别喷涂于玻璃纤维纸上,干燥后贮存备用。

1.8.3 试纸条的组装 将上述方法制备的硝酸纤维素膜、胶体金垫与样品垫、吸收垫按图 1 顺序装配,裁成宽度为 2.5 mm 的条状,即制成 O、A、Asia I 型 FMDV 诊断试纸条。

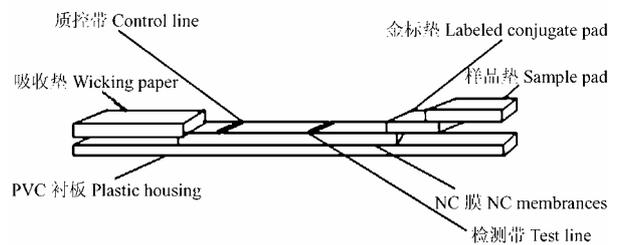


图 1 免疫层析试纸条结构

Fig. 1 The sketch map of the gold immunochromatographic strip

1.8.4 试剂盒的组装 口蹄疫 O、A、Asia I 型 3 种试纸条作为一个包装装入铝塑袋中即为口蹄疫胶体金定型诊断试剂盒。O、A、Asia I 型试纸条分别为蓝色、红色、绿色包装。

1.9 使用方法与结果判定

1.9.1 待检样品的处理 将待检水疱皮或乳鼠组织用缓冲液冲洗,制成 1:5 (W/V) 的悬液,4℃ 冰箱内浸毒一夜,振摇后以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为待检样品。水疱液可直接作为待检样品。

1.9.2 样品检测 将 3 种不同型的试纸条全部插入到样品中。注意将试纸条有标志线的一端插入待检样品中,样品液面不可超过标志线。当液体全部浸湿硝酸纤维素膜后,5~15 min 内观察结果。

1.9.3 单支试纸条结果判定(图 2)

阳性:质控带与检测带都出现清晰可见红色条带。样品中的口蹄疫病毒含量越高,检测带红色带颜色越深。(++: 强阳性清晰可见的红色;+: 肉眼可见的红色)

阴性：只有质控带出现清晰可见红色条带。

可疑：质控带出现一条颜色清晰可见的红色线，而在检测带出现一条颜色很浅，若隐若显的红色带。

无效：质控带不出现红色条带。

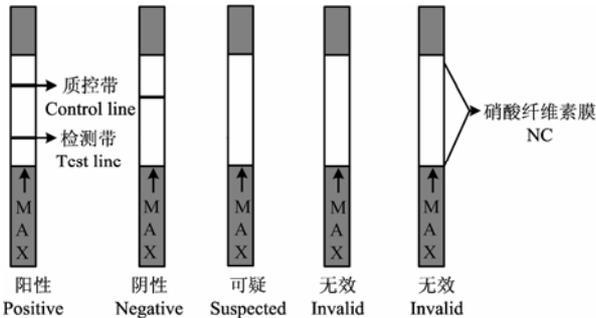


图 2 单支试纸条的结果判定

Fig. 2 Test results of one gold immunochromatographic strip

1.9.4 定型结果判定 (图 3)

O 型：O 型试纸条结果为阳性，Asia I、A 型试纸条结果为阴性或可疑。

Asia I 型：Asia I 型试纸条结果为阳性，O、A 型试纸条结果为阴性或可疑。

A 型：A 型试纸条结果为阳性，Asia I、O 型试纸条结果为阴性或可疑。

阴性：O、Asia I、A 型试纸条结果均为阴性。

可疑：O、Asia I、A 型试纸条结果均为可疑，或其中两种试纸条结果为可疑。

注意：当 3 种和两种试纸条对同一待检抗原显色结果均为阳性时，可将待检样品做倍比稀释 (1 : 2~1 : 8)，以同上方法进行结果判定。

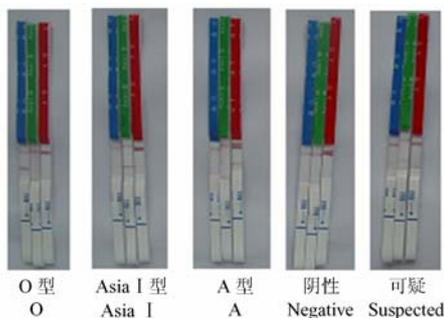


图 3 口蹄疫胶体金定型诊断试剂盒结果判定

Fig. 3 FMDV serotype diagnosis results of gold immunochromatographic strip test kit

1.10 评价试验

1.10.1 敏感性试验 国家口蹄疫参考实验室提供的已知半数致死量 (LD_{50}) FMDV/O、A、Asia I 阳性参考样本，用 PBS 作倍比稀释后，用口蹄疫胶体金定型诊断试剂盒对不同稀释度的抗原样品检测，每个稀释度重复 3 次。按照 1.9 法进行操作与判定，将各型试纸条检测到的 FMD 阳性参考样本的最高稀释倍数 (最小病毒量) 定为试剂盒的灵敏度。

1.10.2 特异性试验 取国家口蹄疫参考实验室提供的阳性与阴性参考样本，按照 1.9 法进行操作与判定。

1.10.3 重复性试验 用 3 批不同批次试剂盒重复检测口蹄疫参考实验室阳性与阴性参考样本，按照 1.9 法进行操作与判定。

1.10.4 保存期试验 取口蹄疫定型诊断试剂盒置于 $4^{\circ}C$ 12 个月后，每隔 1 个月，同时检测阴、阳性参考样本。

1.10.5 符合率试验 将国家口蹄疫参考实验室保存，由病毒分离、反向间接血凝、VP1 测序定型等方法确定 FMDV 血清型田间及实验室样品 206 份，其中 O 型 57 份，A 型 24 份，Asia I 型 69 份，阴性 53 份用定型诊断试剂盒进行检测。检测时按 1.9 法进行操作与判定，比较试剂盒与传统实验室诊断方法对 O、A、Asia I 型 FMDV 阳性样本及阴性样本鉴定的符合率。

2 结果与分析

2.1 抗体纯度及蛋白含量的测定

纯化的 FMDV/O、A、Asia I IgG 进行 SDS-PAGE 电泳分析，纯度可达到 98% 以上；紫外分析测定纯化 IgG 的含量均大于 $2.6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。琼脂糖双扩散法测定 IgG 效价 1 : 32。

2.2 胶体金均匀度检定

制备的胶体金通过冷却后加入一定的蒸馏水控制其浓度，合格可用的胶体金溶液检测波长 $OD_{523 \text{ nm}}$ 在 1.1~1.2 内。工作中所制备的胶体金直径通过在透射电镜 (TEM 像) 观察颗粒大小。测得 ($n=250$) 平均粒径为 $(40.06\pm 0.7) \text{ nm}$ ；测量 100 个以上的胶体金颗粒，用统计学处理，变异系数 $CV = 9.6\%$ 。符合标记用胶体金要求，结果如图 4 所示。

2.3 胶体金标记 IgG 浓度检定

工作用胶体金标记标准株 O、A、Asia I 型口蹄疫豚鼠 IgG，在 523 nm 波长处的 OD 值不低于 2.0。

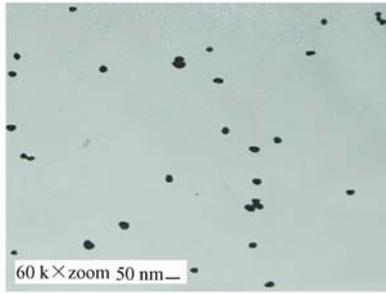


图 4 胶体金颗粒透射电镜照片 ($\times 60\,000$)

Fig. 4 TEM image of colloidal gold particles ($\times 60\,000$)

2.4 FMDV O、A、Asia I 型抗体最适 pH

根据不同 pH 条件下, 标记不同口蹄疫血清型抗体的胶体金在 $OD_{523\text{ nm}}$ 时的最高光吸收值, 可确定 O、A、Asia I 型标准株豚鼠 IgG 最适 pH 分别为 7.5、9.0、8.0 (图 5)。

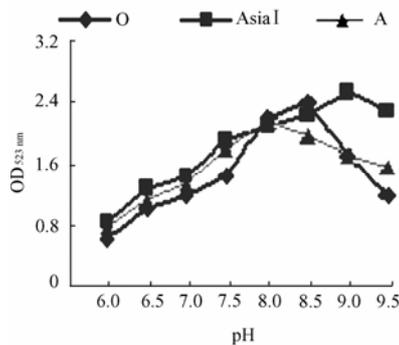


图 5 确定胶体金标记抗体的最佳 pH

Fig. 5 The selected optimal pH of IgG conjugated with colloidal gold

2.5 标记物工作浓度的确定

2.5.1 金标 FMD O、A、Asia I /标准株豚鼠抗体使用浓度的确定 检测阳性参考样本时, 当金标 FMD O/标准株豚鼠抗体浓度小于 2.0 时, 对照带和检测带显色较浅, 显色时间长; 当金标 FMD O/标准株豚鼠抗体浓度大于 2.0 时, 硝酸纤维素膜的背景加深发红, 检测阴性样品时检测带出现若隐若显的条带。当金标 FMD O/标准株豚鼠抗体浓度在 2.0 时, 硝酸纤维素膜背景与检测带显色对比强烈, 检测带上阳性与阴性结果成立, 显色时间在 10~15 min, 因此在金标抗体的制备中确定胶体金探针的浓度为 $OD_{523\text{ nm}}=2.0$ 。金标

FMD A、Asia I /标准株抗体使用浓度分别为 $OD_{523\text{ nm}}=2.0$ 和 $OD_{523\text{ nm}}=2.5$ 。

2.5.2 检测带上 FMD O、A、Asia I /流行株兔抗体浓度的确定 试纸条初品检测阳性参考样本时, 当 FMD O/流行株兔抗体浓度小于 $1.6\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时 NC 膜检测带显色较淡, 显色时间长; $1.6\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时, 检测带显色呈红色, 时间较短, 当抗体浓度大于 $1.6\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时, 显色深度与显色时间与 $1.6\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 无异, 因此层析膜检测带抗体浓度确定为 $1.6\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。检测带 FMD A、Asia I /流行株抗体使用浓度分别为 1.0 和 $2.0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

2.5.3 质控带上羊抗豚鼠 IgG 抗体浓度的确定 试纸条初品, 放置于 37°C 4 周后分别检测 O、A、Asia I 阳性参考样本, 质控带浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时, 检测带与质控带同时不显色, 质控带浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时, 检测带不显色, 质控带显示若隐若现红色带; 质控带浓度为 $2.0、4.0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时, 检测带不显色, 而质控带显色, 为保证检测带抗体与质控带羊抗豚鼠 IgG 抗体失效时间相同, 避免可能出现的假阴性结果, 将层析膜质控带羊抗豚鼠 IgG 抗体浓度确定为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

2.6 敏感性试验

阳性参考样本从 1:2~1:256 倍稀释的样品, 3 次重复试验, 同型试纸条检测结果均为阳性, O、Asia I 型可检测到的最高稀释倍数为 1:256, 最小病毒量为 $3.9\times 10^4\text{ LD}_{50}$ 的病毒量。A 型可检测到的最高稀释倍数为 1:128, 最小病毒量为 $7.8\times 10^4\text{ LD}_{50}$ 的病毒量。各型试纸条对上述样品检测的敏感性和重复性结果见图 6、7 和 8。

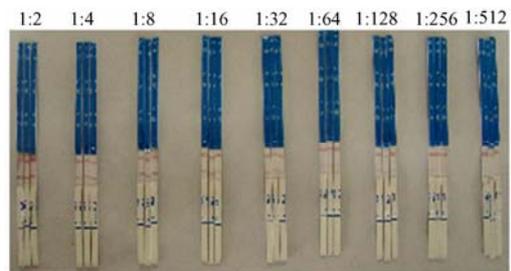


图 6 O 型试纸条灵敏度试验

Fig. 6 Sensitivity assay test results of FMD O type gold immunochromatographic strip

2.7 特异性试验

国家口蹄疫参考实验室提供的口蹄疫 C 型与 FMDV 病症相似的 SVDV、VS、VES 及健康乳鼠组织

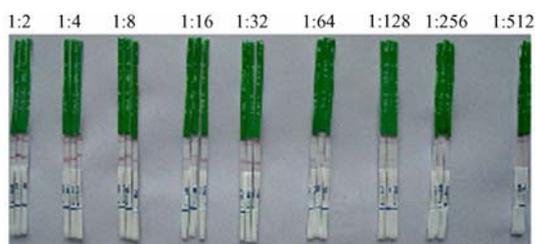


图 7 Asia I 型试纸条灵敏度试验

Fig. 7 Sensitivity assay test results of FMD Asia I type gold immunochromatographic strip

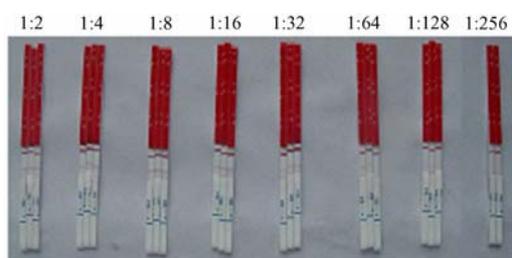


图 8 A 型试纸条灵敏度试验

Fig. 8 Sensitivity assay test results of FMD A type gold immunochromatographic strip

结果均为阴性；检测口蹄疫 O、A、Asia I 阳性参考样本，各型试纸条对应同型参考样本检测结果应为阳性；对异型参考样本检测结果为阴性，结果见图 9（即：O 型试纸条检测 O 型阳性参考样本，结果为阳性；检测

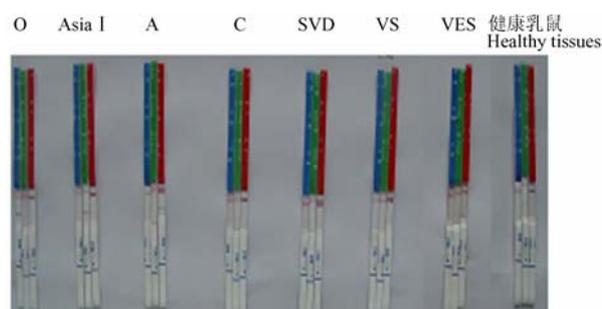


图 9 特异性试验

Fig. 9 Specified assay results of gold immunochromatographic strip test kit

A、Asia I 阳性参考样本，结果为阴性；其它两种试纸条相同判定），型特异性的符合率为 100%。

2.8 重复性试验

不同批次生产试剂盒对待检样品进行 3 次重复试验，3 次检验结果完全一致，符合率为 100%。型特异性判定符合率为 100%。

2.9 保存期间试验

试剂盒保存 6 个月内，取出后检测相同阴性、阳性样品，结果型特异性的符合率为 100%，且测试显色程度与显色时间无显著性差异，说明其稳定性较好，证实检测试剂盒的保存期为 4℃ 下 6 个月。

2.10 符合率试验

胶体金定型诊断试剂盒对已确证血清型的 206 份样品定型鉴定结果见表。

表 胶体定型诊断试剂盒符合率试验

Table The corresponding test of gold immunochromatographic strip test kit

口蹄疫病毒血清型 FMDV serotype	样品数 Sample sum	试剂盒检测结果 Test results of immunochromatographic strip kit	符合率 The corresponding rate (%)
O	53	49	92.45
A	24	22	91.66
Asia I	69	64	92.75
阴性样本 Negative sample	57	57	100
总计 Total	203	192	94.58

3 讨论

随着口蹄疫病毒不断变异，新的变异株和亚型的不断出现^[13]，给口蹄疫的预防和控制带来了极大的困难。由于口蹄疫病原的诊断首先要采集疫区发病动物尚未溃破的新鲜水泡皮和水泡液，由专人送至专门实验室后方可进行诊断，一方面运输过程中的不确定因

素往往会引起样品腐败，产生假阴性、漏检等结果，从而贻误确诊的时机，另一方面还存在因病料保存不善，引发散毒的危险。而现有的口蹄疫诊断方法中，病毒分离、中和试验、间接 ELISA、RT-PCR 等方法都必须在具备一定条件的实验室中才能完成。发展一种快速、简便、无需专业人员和仪器，可在野外、田间进操作的新型诊断方法已成为一项急需解决的问题。

本研究主要采用 FMDV 标准株与流行株两种多克隆抗体作为胶体金垫的捕获抗体和 NC 膜上的检测抗体。没有选用单克隆抗体是由于 FMDV 是一种多表位, 高变异的病毒, 没有一株单抗能识别同一血清型的所有毒株, 即便是用 3~5 株单抗配伍, 也不能覆盖同型的所有毒株^[14]。如果使用单抗, 只针对单一血清型的某一抗原决定簇, 可能会在检测中出现假阴性结果。同时本试验中采用的多克隆抗体, 一方面对前期免疫抗原型特异性进行了严格控制, 另一方面选择了适宜的抗体精细纯化方法, 使各型纯化抗体免疫琼扩的效价达到 1:32, 纯度达到 98% 以上, 有效保证了多抗的型特异性。试剂盒选用两种毒株制备的抗体, 这区别于传统的双抗体夹心法中, 抗体来源于同一抗原的不同动物种属。目的是想通过两种毒株的使用, 增加抗体对检测抗原捕获和特异性结合的优势表位, 扩大同型毒株抗原谱的筛选范围, 提高该方法的准确性和灵敏度, 减少漏检的发生机率。

在本检测方法的建立过程中, 采用磁力搅拌加热装置制备的胶体金, 可有效保证不同批次胶体金制备的试验条件, 包括反应容器、反应时间、搅拌速度等因素的一致性。电镜观察胶体金平均粒径为 (40.06 ± 0.7) nm, 颗粒外形均一, 尺寸变异系数小, 可在 NC 膜上自由流动。根据文献选择 40 nm 胶体金颗粒^[11,15], 因为这一尺寸的颗粒大小适中, 既易于辨识, 又不会影响蛋白质与颗粒表面的结合, 可使标记材料获得最佳性能。

标记物工作浓度的确定是保证试纸条灵敏度和特异性的关键因素, 根据制备的试纸条初品检测带与质控带对阳性及阴性参考样本的显色强弱与时间, 本试验确定了检测带检测带上 FMD O、A、Asia I / 流行株兔抗体浓度分别为 1.6、1.0 和 2.0 mg·ml⁻¹; 金标 FMD O、A、Asia I / 标准株豚鼠抗体胶体金探针的浓度为 OD_{523 nm}=2.0、1.5 和 2.5。质控带抗豚鼠 IgG 抗体浓度 3 种试纸条均为 0.5 mg·ml⁻¹。不同血清型抗体的使用工作浓度不同, 其中 Asia I 型抗体要求的工作浓度最高, A 型最低, O 型适中, 这可能与各型抗体对检测抗原的免疫反应能力有关。

敏感性试验结果显示, 各型试纸条在检测倍比稀释的同型阳性参考样本时, 随着稀释倍数的增加, 检测带的红色条带显色越浅, 说明随着病毒含量的不断减少, 试纸条的检测能力不断下降。同时各型试纸条在检测 1:256 倍稀释的标准株乳鼠抗原时稍有差异, O、Asia I 型试纸条显示了阳性或可疑的结果, A 型试纸条显示了阴性结果。说明 O、Asia I 型试纸条灵敏

度高于 A 型试纸。灵敏度的不均一性可能与不同毒株的抗原性差异相关。试纸条制备中, 虽然捕获抗体选用了相同的标准毒株, 但检测抗体并不相同, 这可能引发各型抗体与待检抗原反应强弱不同, 从而引发灵敏度差异。由于 1:256 稀释度对 3 种试纸条平行重复样本的检测结果并不一致, 非全阳性的结果, 因此不能将该稀释度定为其最高稀释度, 按照 5~15 min 内显色的时间要求, 检测带与因质控带显示肉眼可见红色条带的显色标准, 各型试纸条均可检测到 1:128 倍稀释的同型标准鼠抗原, 即 7.8×10^4 LD₅₀ 的病毒量。因此将此定为试剂盒的灵敏度。

在特异性试验中, 本研究将 FMD 与其它水泡性疾病, 特别是 SVD、水泡性口炎(VS)、水泡性疹(VES) 在临床症状上极为相似的几种病原一同检验, 检测结果显示, 非口蹄疫病料结果均为阴性, 而对 FMD 血清型的鉴定符合率为 100%, 由此证实该试剂盒检测口蹄疫病毒时, 与临床症状相似疾病的病原无交叉, 无假阳性反应, 具有很好的特异性。

试剂盒在符合率试验中, 试剂盒对各类田间及实验室样品定型准确率达 94.58%, 阴性样本鉴定符合率达 100%, 说明该方法可适用于水泡皮、水泡液、乳鼠组织等田间样本的检测, 并具有较好的灵敏度与特异性。同时试验中发现, 对于采集合格, 新鲜无污染的病料, 因其特异型病毒含毒量高, 试剂盒较容易确定其血清型。反之, 试剂盒将会受到非特异性物质干扰, 出现可疑结果, 因此田间样本的采集应严格按照相关操作规程进行^[14]。

GICA 常采用染色乳胶和胶体金作为标记物, 染色乳胶比胶体金颗粒大^[15]。层析试验中硝酸纤维素膜可一次容纳大量纳米颗粒。直径越小的颗粒与分析物沿着膜通过吸附线, 能够获得更佳的混合程度, 从而提高检测灵敏度。另外, 微小的纳米颗粒可致密地沉积在吸附线处, 产生更好的辨识效果。同时胶体金颗粒可以主动吸附蛋白质抗体。这种结合过程较为简单, 除蛋白质、稀释缓冲液和金颗粒外, 无需其它试剂。而染色乳胶则需要经过特殊处理, 才能与蛋白共价连接。由此可见, 胶体金相比染色乳胶更适合作为快速检测的标记物。最近许多新开发的快速检测^[12,16,17], 都选用胶体金颗粒作为标记物。

国外关于 FMDV 快速诊断试纸条的报道, 主要选用了一株针对 FMDV 的单克隆抗体作为检测用抗体, 标记物使用染色乳胶, 制备的试纸条只能对 FMD 和其症状相似的疾病进行鉴别诊断, 并不能区分 FMDV

的血清型。本项工作的开展是胶体金层析技术在口蹄疫定型诊断上的首次尝试,研发具有自主知识产权试剂盒在各项评价试验中显示了良好的敏感性、特异性、重复性和稳定性,已获得相关技术专利受理。同时该试剂盒在部分地区的推广应用获得了良好的反馈与评价,这使其商业化的前景更加广阔,同时使中国在这一领域具备有力的国际竞争力。

4 结 论

本试验建立了口蹄疫病毒 O、A、Asia I 型胶体金定型免疫层析方法及定型诊断试剂盒试验品,通过评价试验证实:试剂盒具有良好的灵敏度和特异性,可检测到 7.8×10^4 LD₅₀ 标准株乳鼠组织病毒,与口蹄疫临床症状相似疾病无交叉反应;试剂盒对各类田间及实验室样品定型符合率达 94.58%;同时试剂盒在 4℃ 下可保存 6 个月,对同一样品的重复试验结果一致,说明其具有较好的稳定性。

References

- [1] Remond M, Kaiser C, Lebreton F. Diagnosis and screening of foot-and-mouth disease. *Comparative Immunology Microbiology Infectious Disease*, 2002, 25(5-6): 309-320.
- [2] Reid S M, Grierson S S, Ferris N P, Hutchings G H. Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virological Methods*, 2003, 107: 129-139.
- [3] 鲜思美,周碧君,文明,方英,王琛.口蹄疫实验诊断技术研究进展. *山地农业生物学报*, 2006, 25(1): 77-81.
- Xian S M, Zhou B J, Wen M, Fang Y, Wang C. Development of diagnostic techniques of foot and mouth disease. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2006, 25(1): 77-81. (in Chinese)
- [4] Tanaka R, Yuhi T, Nagatani N, Endo T, Kerman K, Takamura Y, Tamiya E. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 385(8): 1414-1420.
- [5] 张长弓,金颜辉,黄印堯,方莹,梁全顺.口蹄疫抗体免疫胶体金快速检测试纸法的建立. *福建畜牧兽医*, 2004, 26(1): 4-5.
- Zhang C G, Jin Y H, Huang Y R, Fang Y, Liang Q S. Establishment of colloidal gold-immunochromatographic assay test strip for FMDV antibody. *Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary*, 2004, 26(1): 4-5. (in Chinese)
- [6] Reid S M, Ferris N P, Bruning A, Hutchings G H, Kowalska Z, Akerblom L. Development of a rapid chromatographic strip test for the pen-side detection of foot-and-mouth disease virus antigen.

- Journal of Virological Methods*, 2001: 189-202.
- [7] Sugimura T, Suzuki T, Chatchawanchonteera A, Sinuwonkwat P, Tsuda T, Murakami Y. Application of latex beads agglutination test for the detection of the antibody against virus-infection-associated (VIA) antigen of foot-and-mouth disease (FMD) virus. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2000, 62(7): 805-807.
- [8] Bruck C, Drebin J A, Glineur C. Purification of mouse monoclonal antibodies from ascetic fluid by DEAE Affi-Gel Blue chromatography. *Methods in Enzymology*, 1986, 121: 587.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] 汪美先. 免疫学基础. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992: 182-185.
- Wang M X. *Immunology*. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1992: 182-185. (in Chinese)
- [11] Bassab C, Syamal R. Manufacturing high-quality gold sol. *IVD Technology*, 2001, 8: 46-54.
- [12] Sun X L, Zhao X L, Tang J. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B1. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 99(2): 185-194.
- [13] 高飞,孙国斌,张金凤. 国外口蹄疫流行现状分析及防治策略. *北京农学院学报*, 2006, 21(1): 76-81.
- Gao F, Sun G B, Zhang J F. Evaluation and prevention policy of epidemic. actuality of foot-and-mouth disease abroad. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2006, 21(1): 76-81. (in Chinese)
- [14] 谢庆阁. 口蹄疫. 北京: 中国农业出版社, 2004: 89-90.
- Xie Q G. *FMD*. Beijing: China Agricultural Press, 2004: 89-90. (in Chinese)
- [15] James C, Helen B, Joanna S, Emma W. Present and Future Applications of Gold in Rapid Assays. *China Medical Device Manufacturer*, 2006, July/August Features. [Http://www.cmdm.com/article.Php/ArticleID/2243](http://www.cmdm.com/article.Php/ArticleID/2243).
- [16] 吴锦雅,杨培良,周晓红,李华,陈晓光. 应用抗 Sjp38 的单克隆抗体建立血吸虫感染的胶体金免疫层析检测体系. *第一军医大学学报*, 2005, 25(5): 538-541.
- Wu J Y, Yang P L, Zhou X H, Li H, Chen X G. A colloidal gold immunochromatographic assay for detecting p38 antigen of *Schistosoma japonicum*. *Journal of First Military Medical University*, 2005, 25(5): 538-541. (in Chinese)
- [17] Lyoo Y S, Kleiboeker S B, Jang K Y. A simple and rapid chromatographic strip test for detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2005, 17(5): 469-473.