

口蹄疫 O、Asia 1 分型彩色胶乳试纸条诊断方法的建立

蒋 韬^{1,2},任维维^{2,3},梁 仲²,智晓莹^{2,3},祁光宇^{2,3},刘湘涛²,才学鹏^{2*}

(1. 甘肃农业大学 动物医学院,兰州 730070;

2. 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 国家口蹄疫参考实验室,兰州 730046;

3. 中农威特生物科技股份有限公司,兰州 730046)

摘要: 为建立一种快速、简便、直观的口蹄疫 O、Asia 1 分型彩色胶乳免疫层析的方法,作者选择 2 种不同颜色的单分散胶乳,将纯化的 Asia 1/China/05 流行毒株兔抗体制备蓝色免疫胶乳;将纯化的 O/China/99 流行毒株兔抗体制备红色免疫胶乳。将 2 种免疫胶乳分别喷涂于不同玻璃纤维上,晾干叠加制成彩色胶乳反应垫。再分别将纯化的 Asia 1/YN/BSh/58/B 和 AV99(L) 标准毒株的豚鼠抗体固定于同一硝酸纤维素膜的不同区域上作为 2 条检测带。最后组装成口蹄疫 O、Asia 1 分型彩色胶乳试纸条。通过对阳性参考样品的检测,结果显示试纸条有很好的灵敏度,可检测到病毒含量为 3.90×10^4 LD₅₀;在检测与口蹄疫临床症状相似病原,如猪水泡病病毒(SVDV)、水泡性口炎(VS)、水泡性疹(VES)抗原时无交叉反应,特异性好;不同批次间、同一批次内的试纸条,在检测阴、阳性参考样品时,结果完全一致,说明试纸条重复性好;试纸条对检测已知血清型的 74 份田间样品的符合性试验中,O 型、Asia 1 型样品的阳性符合率分别为 95.24%、96.30%,阴性样品符合率为 100%。本试验研发的口蹄疫 O、Asia 1 分型彩色胶乳试纸条具有很好的灵敏度、特异性、重复性和符合性,而且可以通过不同颜色进行定型检测,适合国内流行的口蹄疫病原型别的分型检测。

关键词: 口蹄疫病毒;彩色胶乳;免疫层析;分型检测

中图分类号:S852.659.6

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2011)06-0815-08

Development of a Rapid Colour Latex Particles Immunochromatographic Strip Test for the Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease Virus O and Asia 1 Type

JIANG Tao^{1,2},REN Wei-wei^{2,3},LIANG Zhong²,

ZHI Xiao-ying^{2,3},QI Guang-yu^{2,3},LIU Xiang-tao²,CAI Xue-peng^{2*}

(1. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture/State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China; 3. China Agricultural Vet. Blo. Science and Technology Co. LTD, Lanzhou 730046, China)

Abstract: To develop a sensitive, rapid and simple colour latex particles immunochromatography assay for determination of foot-and-mouth disease virus(FMDV) O, Asia 1 type from the field samples, Monodispersed polystyrene Microspheres with two distinct dyes and carboxyl group in the size rang of 380 nm were prepared with seed polymerization and swelling. The purified anti-FMDV strain Asia 1/China 05, O/China99 rabbit antibody were coupled with blue and red latex particles. The purified anti-FMDV Asia 1, O type guinea pig antibodies were wrapped on to nitrocel-

收稿日期:2010-09-11

基金项目:甘肃省科技厅资助项目;甘肃科技重大技术专项(1002NKDA037)

作者简介:蒋 韬(1975-),女,江苏武进人,副研究员,博士生,主要从事病原与血清学快速诊断技术研究,Tel: 0931-8343931,E-mail:perjiang@163.com

* 通讯作者:才学鹏,E-mail:caixp@vip.163.com

lulose membrane as two test line. The FMDV serotype diagnosis kit was then performed and conditions were determined. The seriate results indicated that sensitivity of the test kit reached $3.90 \times 10^4 LD_{50}$. No cross reaction was found with SVD, VS, VES antigen by cross tests. In the clinic test, a total 74 field samples were detected with the test list. The corresponding rate between the strip test kit and traditional methods of positive samples for FMDV Asia 1, O type and negative samples were 96.30%, 95.24%, 100%, respectively. In this study, the established color latex particles immunochromatographic strip test kit is sensitive, specific for detecting FMDV Asia 1, O type and is potentially useful for the high throughput screening, the test for the diagnosis of food-and-mouth disease virus O and Asia 1 type.

Key words: FMDV; colour latex particles; immunochromatography test; the test for the diagnosis virus type.

口蹄疫(foot and mouth disease, FMD)是偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性传染病,是全球最重要的动物健康问题之一,世界大部分地区时有发生,常在牛群及猪群中大范围流行。口蹄疫在长期进化过程中,产生了许多血清型、基因型和突变株,这种特性给口蹄疫的防治带来技术上的难题。因此,快速和准确的口蹄疫分型诊断一直是口蹄疫研究中的重点问题之一。1999—2009年,国内部分省市相继发生了数起O、Asia 1型口蹄疫疫情,国家口蹄疫病防控形势非常严峻。如何利用有限样本进行分型检测成为现阶段追踪疫源,控制口蹄疫疫情蔓延的重要环节。目前,在国家口蹄疫参考实验室已发展了多种分型诊断的方法,其中常规方法有反向间接血凝、夹心ELISA、分型-PCR等,这些方法操作复杂,成本高,用时长,需要一定仪器和技术人员才能开展检测;而口蹄疫免疫胶体金定型试纸条^[1-3],虽然快速、简便,但由于胶体金仅显示单一红色,在一次层析反应中不能直观分析口蹄疫的多种血清型别;染色乳胶颗粒是近年来发展较快的新技术,在生物领域中得到广泛应用^[4-5],由于可以制备成红、蓝等多种颜色的胶乳颗粒,将其作为标记物可实现对不同血清型样本进行一步化定型分析,满足口蹄疫多种血清型的检测需要。本试验利用彩色胶乳标记技术,将直径范围0.1~1 μm彩色胶乳与含有羧基、氨基、羟基等基团的蛋白质(抗原/抗体)结合,当此彩色胶乳标记蛋白与检测样本中相应配体结合后形成胶乳标记复合物,并在检测膜上显示出肉眼可见,不同颜色的条带^[6-7]。并且本试验针对口蹄疫型别多,现有的技术难以在基层、田间口蹄疫病原诊断中推广的现状,利用国内流行的O、Asia 1型口蹄疫标准株和流行株病原制备标记抗体,结合

免疫胶乳技术首次建立口蹄疫O、Asia 1分型彩色胶乳试纸条的检测方法,为口蹄疫病毒的快速分型诊断提供新的手段。

1 材料与方法

1.1 毒种、病毒样品

FMDV/Asia 1/China/05、O/China/99 流行毒株细胞抗原;阳性参考样品:FMDV/O、Asia 1型标准毒株乳鼠组织抗原;阴性参考样品:猪水泡病病毒(SVDV)、水泡性口炎(VS)、水泡性疹(VES)抗原;田间及试验样品(74份包括水疱皮、水疱液、乳鼠组织毒、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 试纸条

090301批、090312批、090404批口蹄疫O、Asia 1分型彩色胶乳试纸条,由本实验室研制。

1.3 试剂

HiTrap Desalting、DEAE-Sepharose 层析柱:Amersham Pharmacia Biotechnology 公司产品;蔗糖、羊抗兔抗体、牛血清白蛋白(BSA):Sigma 公司产品;聚乙二醇 20000(PEG):日本进口分装;红色和蓝色彩色胶乳:上海捷宁公司产品;三氯乙烯、氯化钠、脱氧胆酸钠等试剂均为国产分析纯;FMDV/Asia1/YN/BSh/58/B、AV99(L)标准毒株抗体,FMDV/O、Asia 1型琼扩抗原:兰州兽医研究所口蹄疫参考实验室提供。

1.4 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;XY3000 喷膜仪、CM3000 切条机:美国 Bio-Dot 公司产品;CARY50

紫外可见光光度仪:日本岛津;超速离心机:日立;Pharmacia FPLC 纯化系统:瑞典 Pharmacia 公司产品;TGL216G 台式高速冷冻离心机:上海安亭科学仪器厂出品;超声机:国产;电镜:Jem1230。

1.5 免疫抗原的制备

将灭活细胞毒冻融 3 次,4 ℃ 6 000 r · min⁻¹ 离心 40 min,上清加 8%(w / v)PEG-6000 和 0.15 mol · L⁻¹ NaCl 搅拌过夜,同上离心,上清液用三氯乙烯脱脂后,45 000 r · min⁻¹ 离心 150 min。沉淀用 pH7.2,0.05 mol · L⁻¹ PBS 重悬,再经 15%~45%蔗糖密度梯度,25 000 r · min⁻¹ 离心 150 min,收集 146S 级分,合并后测定 OD。用蛋白质浓度(mg · mL⁻¹) = 1.45A_{280 nm} - 0.74A_{260 nm} (A_{280 nm} 和 A_{260 nm} 分别为蛋白质溶液在 280 nm 和 260 nm 处测得的吸光度值)公式计算蛋白含量。

1.6 高免血清的制备

将纯化的 FMDV/Asia 1/China/05, FMDV/O/China/99 流行毒株抗原分别加等量的弗氏完全佐剂初次免疫按 100 μg · mL⁻¹ (兔子)分别皮下注射(多部位),一个月后按初免同等剂量加不完全弗氏佐剂加强免疫,3 周后分别采血,收集免疫血清。制备的血清用免疫琼脂糖双扩散法进行鉴定。

1.7 高免血清中抗体的纯化

将 FMDV/Asia 1/China/05, FMDV/O/China/99 流行毒株兔血清首先分别用硫酸铵盐析提纯,再用 DEAE-Sephrose 离子交换层析柱进一步纯化,SDS-PAGE 法鉴定纯度,紫外分光光度法确定蛋白的含量,双向免疫扩散法测定纯化抗体效价。

1.8 免疫彩色胶乳的制备

1.8.1 彩色胶乳的预处理 分别取红色、蓝色胶乳溶液,用 80 Hz 的超声波处理 5 min 后,再用超纯水 200 倍稀释,10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取沉淀用 0.1 mol · L⁻¹, pH 5.6 的柠檬酸缓冲液溶解,再用 80 Hz 超声波处理 5 min。

1.8.2 FMDV/O/China/99 流行毒株兔抗体最佳标记量的选择 分别取上述红色胶乳用磁力搅拌器搅拌,并分别缓慢以 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg · mL⁻¹ 加入抗体,搅拌 2 h 后缓慢加入 50 g · L⁻¹ BSA 使其终浓度为 10 g · L⁻¹,继续搅拌 1 h 后,10 000 r · min⁻¹, 10 min 离心,沉淀用 0.1 mol · L⁻¹ PBS 溶解,80 Hz 超声波 5 min 处理后,反复洗涤 3 次,最终沉淀用 0.1 mol · L⁻¹ PBS 溶解为

原体积的 1 / 20。将其涂于玻璃纤维制成试验用的反应垫,与已确定的 NC 反应膜匹配检测阳性和阴性参考样品,以阴性参考样品不显色,阳性参考样品显示清晰可见一条红色条带为标准来确定 FM-DV/O/China/99 流行毒株抗体最佳标记量。

1.8.3 FMDV/Asia 1/China/05 流行毒株兔抗体最佳标记量的选择 取蓝色胶乳溶液,按 1.8.2 操作,确定 FMDV/Asia 1/China/05 流行毒株兔抗体最佳标记量。

1.8.4 免疫彩色胶乳最适浓度的搭配 分别取已确定最佳标记量的红色和蓝色免疫胶乳,用 0.1 mol · L⁻¹ PBS 分别作倍比稀释,喷涂于玻璃纤维上,制成一系列红色、蓝色反应垫。然后不同浓度的红色、蓝色反应垫进行叠加匹配,与已确定的 NC 反应膜搭配制成试纸条试验品。检测阳性参考样品,以检测 O 型阳性参考样品时只显色一条红色条带,检测 Asia 1 型阳性参考样品时只显色一条蓝色条带为标准确定最终的红色和蓝色免疫胶乳的最适浓度搭配。

1.9 免疫彩色胶乳反应垫的制备

1.9.1 红色(O 型)、蓝色(Asia 1 型)反应垫的制备 将最终确定的红色、蓝色彩色免疫胶乳,分别用喷膜仪按 15、12 μL · cm⁻¹ 喷涂于玻璃纤维上,制成红色、蓝色 2 种反应垫,干燥后储存备用。

1.9.2 彩色胶乳反应垫的制备 将 1.9.1 制备的红色、蓝色 2 种反应垫叠加成一套彩色反应垫,干燥后储存备用。

1.10 NC 膜的制备

1.10.1 检测带的最适浓度确定 分别将 FM-DV/Asia 1/YN/BSh/58/B、AV99(L) 标准毒株豚鼠抗体倍比稀释,固定于 NC 膜上,将 NC 膜与 1.8.1、1.8.2 的反应垫分别匹配,制成试纸条试验品,分别检测阳性、阴性参考样品。根据检测带显色深度,来确定 FMDV/Asia 1/YN/BSh/58/B、AV99(L) 标准毒株豚鼠抗体最适浓度。

1.10.2 最终 NC 反应膜的制备 将 1.10.1 已确定最终浓度的 FMDV/Asia 1/YN/BSh/58/B、AV99(L) 标准毒株豚鼠抗体用喷膜仪按 1.5、1.0 μL · cm⁻¹ 分别喷涂于同一条 NC 膜上的不同区域, FMDV/Asia 1/YN/BSh/58/B、AV99(L) 标准毒株豚鼠抗体反应线相距 5 mm,用 0.1% BSA 封闭 NC 反应膜,再用 0.1 mol · L⁻¹ PBS 洗脱,然后室温晾干备用。

1.11 彩色胶乳试纸条的的组装

将 1.9.2 的彩色胶乳反应垫和 1.10.2 的 NC 反应膜、样品垫、吸水滤纸按顺序装配在 PVC 底板上,然后用切条机切割成 2.5 cm,制成口蹄疫 O、Asia 1 分型彩色胶乳试纸条。

1.12 样品的检测及结果判定

1.12.1 待测样品的处理 口蹄疫疑似动物组织(舌皮、水泡皮)或乳鼠组织按常规口蹄疫病料处理方法进行。即:用 pH7.5 0.05 mol·L⁻¹ PBS 缓冲液洗 2~3 次,并用消毒滤纸吸去水分称重,加少许玻璃砂研磨,制成 1:10(w/v)的悬液,4℃浸毒 2~3 h。振摇后以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清于 58℃水浴中灭活 40 min;水泡液直接置于 58℃水浴中灭活 40 min。

1.12.2 样品检测 用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 进行样品的倍比稀释,将 1 条试纸条有标志线的一端插入样品中,样品液面不可超过标志线。当液体全部浸湿 NC 膜后,15~20 min 内判定结果。

1.12.3 结果判定

1.12.3.1 试纸条的一条检测线显示红色条带,另一条检测线不显示蓝色条带,说明样品中含有 O 型口蹄疫病毒,红色显色越深,说明 O 型口蹄疫病毒含量较高。

1.12.3.2 试纸条的一条检测线显示蓝色条带,另一条检测线不显示红色条带,说明样品中含有 Asia 1 型口蹄疫病毒,蓝色显色越深,说明 Asia 1 型口蹄疫病毒含量较高。

1.12.3.3 试纸条的两条检测线均不显色,即:一条检测线不显示红色条带,另一条检测线不显示蓝色条带,说明样品中不含 O 型和 Asia 1 型口蹄疫病毒。

1.13 试纸条适用性的评价

1.13.1 敏感性试验 取国家口蹄疫参考实验室提供的已知 LD₅₀ FMDV/O 型、Asia 1 型阳性参考样品,用稀释液做倍比稀释后,用试纸条进行检测,按照 1.12 操作判定,将试纸条检测到的阳性参考样品的最低病毒量定为试纸条的灵敏度。

1.13.2 特异性试验 取国家口蹄疫参考实验室提供的阴性参考样品,用试纸条检测,按照 1.12 操作判定。

1.13.3 重复性试验 用 3 批不同批次的试纸条重复检测阳、阴性参考样品,按照 1.12 操作判定。

1.13.4 符合率试验 检测国家口蹄疫参考实验

室已确定血清型的 74 份田间样品(O 型 21 份,A 型 6 份,Asia 1 型 27 份,阴性 20 份)。通过对已知血清型别的参考样品以及阴性参考样品的检出数来评价试纸条的符合率。

2 结果

2.1 免疫抗原 146S 含量及抗体效价的测定

通过蛋白质浓度(mg·mL⁻¹) = 1.45A_{280 nm} - 0.74A_{260 nm} (A₂₈₀ 和 A₂₆₀ 分别为蛋白质溶液在 280 nm 和 260 nm 处测得的吸光度值)公式计算蛋白含量,结果:O 型、Asia 1 型 146S 含量分别为 205.92、212.31 mg·mL⁻¹。

将纯化的 FMDV/Asia 1/China/05、FMDV/O/China/99 流行毒株兔抗体用 SDS-PAGE 电泳方法测定,其纯度大于 95%,用紫外分光光度法测定抗体浓度,含量大于 2 mg·mL⁻¹;琼脂糖双扩散法测定抗体效价 Asia 1 型 ≥ 1:32, O 型 ≥ 1:8。

2.2 彩色胶乳的鉴定

经电镜检测直径为 380 nm,颗粒大小均匀,变异系数(CV) < 10% C.V.,如图 1 显示。

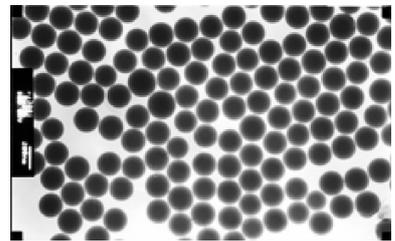


图 1 彩色微球电镜图

Fig. 1 TEM image of latex particles

2.3 免疫彩色胶乳的制备

以分别检测 FMDV/O、Asia 1 型阳性参考样品时,检测线显色深,只需 10~15 min 就能观察到显色线,检测阴性参考样品时,检测线不显色,由表 1 可知 FMDV/Asia 1/China/05, FMDV/O/China/99 流行毒株兔抗体最适标记量分别为 0.6、0.8 mg·mL⁻¹ (总体积为原胶乳溶液体积)。

用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 洗涤免疫彩色胶乳,洗剂次数越少,特异性越差,洗剂次数越多,对特异性结果无影响,为无效操作,所以确定最佳洗剂次数为 3 次。

以检测 O 型阳性参考样品时只显色红色条带,检测 Asia 1 型阳性参考样品时只显色蓝色条带,确定最终的红色和蓝色免疫胶乳的最适浓度搭配,由

表 2 可知最适浓度组合为 0.15、0.2 mg · mL⁻¹ (总体积为原胶乳溶液体积)。

表 1 抗体标记最适浓度的确定

Table 1 The selected optimal IgG conjugated with colour latex particles

抗体标记浓度/ (mg · mL ⁻¹) The density of IgG for conjugating	Asia 1 型/标准株乳鼠组织抗原 FMDV Asia 1 type guinea pig antigens	O 型/标准株乳鼠组织抗原 FMDV O type guinea pig antigens	阴性参考样品 Negative sample	
	蓝色 A blue line	红色 A red line	蓝色 A blue line	红色 A red line
0.1	—	—	—	—
0.2	—	—	—	—
0.4	—	—	—	—
0.6	—	+	—	—
0.8	+	++	—	+
1.0	++	++	+	+

—. 不显示红色或蓝色线(阴性);+. 显示肉眼可见的红色或蓝色线(阳性);++. 显示十分深的红色或蓝色线(强阳性)

—. Not showing the red line or blue line (Negative); +. Showing the obvious red line or blue line (Positive); ++. Showing the very thick red line or blue line (Hard positive)

表 2 免疫彩色胶乳最适浓度的确定

Table 2 The selected optimal density of colour latex particles

红色免疫胶乳浓度/ (mg · mL ⁻¹) The density of red immunity latex particles	蓝色免疫胶乳浓度/ (mg · mL ⁻¹) The density of blue immunity latex particles	O 型/标准株乳鼠组织抗原 FMDV O type guinea pig antigens	Asia 1 型/标准株乳鼠组织抗原 FMDV Asia 1 type guinea pig antigens
0.60	0.80	紫色(两条) Two purple lines	紫色(两条) Two purple lines
0.30	0.40	紫色(两条) Two purple lines	紫色(两条) Two purple lines
0.15	0.20	红色(一条) A red line	蓝色(一条) A blue line
0.08	0.10	不显色(两条) Negative result of two lines	不显色(两条) Negative result of two lines

紫色为蓝色和红色交叉色,表示非特异反应严重,此免疫胶乳浓度不是最适浓度

Absorbed the mixed blue and red latex particles, the test line show purple, the results indicate that this density of immunity latex particles can not be use for the test

2.4 NC 反应膜检测带的制备

检测 FMDV/O、Asia 1 型阳性参考样品时,检测线显色深,只需 10~15 min 就能观察到显色线,

检测阴性参考样品时,检测线不显色,由表 3 可知 FMDV/AV99(L)、Asia1/YN/BSh/58/B 标准毒株豚鼠抗体最适浓度分别为 0.20、0.30 mg · mL⁻¹。

表 3 标准毒株 O 型、Asia 1 型抗体检测带的最适浓度确定

Table 3 The selected optimal Asia 1, O type antibody density of the test line

O 型标准株抗体检测带浓度/ (mg · mL ⁻¹) The density of O type Guinea pig antibody	Asia 1 型标准株抗体检测带浓度/ (mg · mL ⁻¹) The density of Asia 1 type Guinea pig antibody	O 型/标准株 乳鼠组织抗原 FMDV O type antigens	Asia 1 型/标准 株乳鼠组织抗原 FMDV Asia 1 type antigens	阴性参考样品 Negative sample
0.80	1.20	紫色(两条) Two purple lines	紫色(两条) Two purple lines	紫色(两条) Two purple lines
0.40	0.60	紫色(两条) Two purple lines	紫色(两条) Two purple lines	紫色(两条) Two purple lines
0.20	0.30	红色(一条) A red line	蓝色(一条) A blue line	不显色(两条) Negative result of two lines
0.10	0.15	不显色(两条) Negative result of two lines	不显色(两条) Negative result of two lines	不显色(两条) Negative result of two lines

紫色为蓝色和红色交叉色,表示非特异反应严重,此抗体浓度不是制备检测带的最适浓度

Absorbed the mixed blue and red latex particles, the test line show purple, the results indicate that this density of immunity latex particles can not be use for the test line

2.5 试纸条适用性的评价

阳性参考样品用样品稀释液倍比稀释,由图 2 可知用试纸条可检测到 O 型样品病毒最低含量为 $3.90 \times 10^4 LD_{50}$, Asia 1 型样品检测病毒最低含量为 $1.95 \times 10^4 LD_{50}$ ($A_1 \sim A_7$ 是 Asia 1 型样品病毒含量为 $1.56 \times 10^5 LD_{50} \sim 2.44 \times 10^3 LD_{50}$; $B_1 \sim B_7$ 是 O 型样品病毒含量为 $1.20 \times 10^6 LD_{50} \sim 1.95 \times 10^4 LD_{50}$),说明试纸条的灵敏度为 $3.90 \times 10^4 LD_{50}$ 。

用试纸条检测国家口蹄疫参考实验室提供的阴性参考样品(SVDV、VS、VES),结果试纸条 2 条检

测线均不显色,即:一条检测线不显示红色条带,另一条检测线不显示蓝色条带,说明试纸条特异性好。

用 3 批试纸条重复检测阳、阴性参考样品,3 次检测结果完全一致,不同批次间、同一批次内检测结果完全一致,说明试纸条重复性好。

检测国家口蹄疫参考实验室已确定口蹄疫病毒血清型的样品 74 份(O 型 21 份, A 型 6 份, Asia 1 型 27 份, 阴性 20 份)。由表 4 可知: O 型、Asia 1 型、阴性样本的符合率分别为 95.24%、96.30%、100%。



$A_1 \sim A_7$ (Asia 1 型样品)



$B_1 \sim B_7$ (O 型样品)

$A_1 \sim A_7$. 1.56×10^5 , 7.80×10^4 , 3.90×10^4 , 1.95×10^4 , 9.75×10^3 , 4.88×10^3 , $2.44 \times 10^3 LD_{50}$; $B_1 \sim B_7$. 1.20×10^6 , 6.00×10^5 , 3.00×10^5 , 1.5×10^5 , 7.50×10^4 , 3.80×10^4 , $1.95 \times 10^4 LD_{50}$

图 2 敏感性试验

Fig. 2 Sensitivity assay test

表 4 试纸条符合率试验

Table 4 The corresponding rate results

口蹄疫病毒血清型 FMDV serotype	样品数 Sample number	试纸条结果	
		The results of the strip kit	
		符合数 The corresponding sum	符合率/% The corresponding rate
O 型 The FMDV of O type	21	20	95.24
Asia 1 型 The FMDV of Asia 1 type	27	26	96.30
阴性样品(含 A 型) Negative sample (Including A type sample)	26	26	100

3 讨论

乳胶标记技术是近年来发展较快的免疫新技术,标记过程中含羧基的胶乳与含氨基的抗原(抗体)呈共价键形式结合,结合量大且牢固,标记后生物大分子物质可保持活性不变^[8-9]。另外,检测过程无需特殊仪器,用目测法,简便快速直观地判断试验结果,因此在生物医学领域倍受青睐。

免疫乳胶技术应用时间最长,最广泛的是乳胶凝集试验(LAT)。此方法已成功应用于水牛巴贝斯虫病^[10]、猪粪轮状病毒^[11]、犊牛轮状病毒^[12]、猪伪狂犬病^[13]、羊传染性胸膜肺炎^[14]、家蚕浓核病毒^[15]等动物疫病的诊断中。然而在一些病原的早期诊断中,由于抗原含量较低,无色的胶乳与背景较难区分,胶乳凝集效果难以观察,诊断效果往往并不令人满意。随着近几年的发展,研究者将胶乳颗粒染成不同颜色,并均匀地分散在介质中形成彩色溶液,加入待测样品后,若有凝集发生,则胶乳聚集成较大的肉眼可见的彩色“云团”,可增大乳胶凝集反应的灵敏度。但由于凝集实验是在液相环境中进行,大颗粒的彩色胶乳容易聚集,使检测结果的非特异性反应加重,从而降低了检测特异性,因此给准确的检测病原带来了极大的困难。在 Reid 等^[16]关于口蹄疫病毒胶乳检测技术的报道中,是将乳胶标记技术和免疫层析技术结合,层析实验中硝酸纤维素膜能有效地分散胶乳颗粒,使胶乳颗粒沿膜均匀地通过吸附线,有效地防止胶乳聚集所带来的非特异性反应,从而提高了检测特异性。但由于该方法仅使用一种颜色的胶乳作为标记载体,进行与口蹄疫临床症状相似的疾病作鉴别诊断,并不能对多血清型的口蹄疫病毒进行分型检测。而目前国内针对口

蹄疫病毒胶乳检测技术尚未见报道。

最近蒋韬等^[3]建立的口蹄疫病毒定型胶体金检测技术,是以胶体金颗粒作为标记载体,由于其能够获得更佳的混合程度,从而获得较好的灵敏度。但由于胶体金仅显单一红色不能在一次层析反应中分析多种病原,需要借助不同型的试纸条配成一套才能完成定型检测。

本试验将彩色乳胶标记技术标记物色彩丰富、辨识度高、灵敏度好的优点,层析技术快速、简便、特异性好的优点相结合,首次建立了 O、Asia 1 型口蹄疫分型的乳胶层析检测试纸条诊断方法,实现了抗原分型一步化,满足了口蹄疫病毒多血清型的鉴别诊断需要。

彩色胶乳标记时,彩色胶乳与抗原或抗体共价结合不影响生物大分子的活性及免疫反应性,最终彩色胶乳过剩的羧基封闭至关重要,如果最终含有过剩羧基就严重影响特异性,因此胶乳和标记物工作浓度尤为关键^[6]。通过大量预试验研究最终确定了乳胶与抗体的最佳配比浓度:即用 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (原红色胶乳 200 倍稀释) 的红色胶乳以 $0.60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗体量标记为佳, $0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (原蓝色胶乳 200 倍稀释) 的蓝色胶乳以 $0.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗体量标记为佳。发现高于上述浓度的抗体和胶乳量都会严重影响特异性,低于上述浓度的抗体和胶乳量时,试纸条检测带的颜色浅,严重影响灵敏度。

彩色胶乳应用了双键彩色染料,彩色单体泄漏,是造成非特异性反应的主要原因。因此有效洗涤步骤的建立是解决特异性问题的关键,作者确定了最佳洗涤次数、超声波处理的方法。发现洗涤次数过少非特异反应越严重,洗涤次数过多对试验结果无

影响,为无效操作。并且在每次洗涤过程中,超声波处理能明显改善胶乳的单分散性,防止胶乳颗粒聚集,保证试验的可重复性。

根据我国口蹄疫疫情的流行情况,建立了 O、Asia 1 型口蹄疫分型的乳胶层析检测试纸条,在符合率试验中,试纸条对各类田间及实验室样品定型准确率达 95.24% 以上,对阴性样本的符合率为 100%,说明该方法可适用于水疱皮、水疱液、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。后续检测口蹄疫病毒 A 型的彩色乳胶层析技术已在研发过程中。

4 结 论

在国内外 FMDV 快速定型检测的报道中,主要以胶体金层析技术为主,而将彩色的胶乳标记技术用于多血清型口蹄疫的诊断中的报道尚未见到。本项工作的开展是彩色胶乳技术在口蹄疫定型诊断中的首次尝试,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、重复性和符合性,可为今后口蹄疫病毒样本多血清型的分型检测奠定理论与应用基础。

参考文献:

- [1] 蒋 韬,梁 仲,陈 涓,等. O 型口蹄疫病毒免疫层析试纸条检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(1):60-65.
- [2] 蒋 韬,梁 仲,陈 涓,等. 检测 Asia 1 型口蹄疫病毒的胶体金免疫层析法的建立及应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2007,23(11):1021-1024.
- [3] 蒋 韬,梁 仲,陈 涓,等. 口蹄疫病毒 O、A、Asia 1 型定型诊断胶体金免疫层析方法的建立[J]. 中国农业科学,2008,41(11):3801-3808.
- [4] 吴文兵,杨婉身. 免疫微球及其在生物化学领域中的应用[J]. 生命的化学,2006,26(5):457-459.
- [5] HOLMES D, SHE J, ROACH P, et al. Bead-based immunoassays using a micro-chip flow cytometer[J]. *Lab Chip*, 2007,7(8):1048-1056.
- [6] JOHNSON A J, CHESHER R C, COSENTINO G,

et al. Validation of a microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile virus and Anti-St. Louis Encephalitis Virus immunoglobulin M antibodies [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007,14(9):1084-1093.

- [7] AGRAWAL A, SATHE T, NIE S. Single-bead immunoassays using magnetic microparticles and spectral-shifting quantum dots [J]. *J Agric Food Chem*, 2007,55(10):3778-3782.
- [8] 赵小宁,刘有初,吴道澄. 细胞标记用新型彩色高分子微球的研制[J]. 生物医学工程学杂志,1994,11(3):247-251.
- [9] 徐迪惠,吕绳凯. 免疫胶乳颗粒对细胞表面抗原的标记[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,1981,1(2):214-216.
- [10] 邓干臻,刘钟灵. 胶乳凝集试验诊断水牛巴贝斯虫病的研究[J]. 华中农业大学学报,1993,12(3):265-274.
- [11] SANEKATA T, KISHIMOTO E, SOTO HONMA H, et al. Detection of porcine rotavirus in stools by a latex agglutination test [J]. *Vet Microbiol*, 1991,27:245-251.
- [12] 冯书章,刘晓明[译]. 用乳胶凝集试验快速诊断犊牛轮状病毒[J]. 国外兽医学—畜禽传染病,1991,11(2):54-55.
- [13] 何启盖,陈焕春,邱德新,等. 乳胶凝集试验检测猪伪狂犬病血清抗体的研究[J]. 中国兽医科技,1999,29(1):7-9.
- [14] RURANGIRWA F R, MCGUIRE T C, KIBOR A, et al. A latex agglutination test for field diagnosis of caprine pleuropneumonia[J]. *Vet Rec*, 1987,121:191-193.
- [15] 郭锡杰,钱元骏,胡雪芳. 胶乳凝集试验在家蚕浓核病毒检测中的应用[J]. 病毒学报,1989,5(4):388-391.
- [16] REID S M, FERRIS N P, BRÜNING A, et al. Development of a rapid chromatographic strip test for the pen-side detection of food-and mouth disease virus antigen[J]. *J Virol Methods*, 2001,96:189-202.

(编辑 白永平)