

胶体金免疫层析试纸条 在禽病检测方面的应用与展望

秦立得, 南文龙, 陈义平

(中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

摘要: 胶体金免疫层析试纸条作为检测工具, 具有特异性强、使用方便、结果易于判断等优点, 被广泛应用于基层和现场检测。目前, 已研发出多种应用于禽病抗原和抗体检测的胶体金免疫层析试纸条。本文从胶体金免疫层析试纸条的技术原理、研究进展及发展方向等方面进行简要综述。

关键词: 胶体金免疫层析试纸条; 禽病; 研究进展; 展望

中文分类号: S851.34 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X (2016) 08-0078-05

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2016.08.022

The Application and Expectation of Using Immunochromatographic Strip in Detection of Avian Diseases

Qin Lide, Nan Wenlong, Chen Yiping

(China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032)

Abstract: Immunochromatographic strip (ICS), with high specificity, convenience and conspicuous results, is extensively applied in grassroots level and on-site testing. Various kinds of ICS have been developed and used in detection antigen or antibody of certain avian disease. The principle research advance and expectation of ICS were discussed in this paper.

Key words: ICS; avian disease; research advance; expectation

胶体金免疫层析试纸条(Immunochromatographic Strip, ICS/Colloid Gold Strip, CGS), 通常简称为胶体金试纸条, 是通过胶体金免疫层析技术制备的, 可以准确、快速、低成本检测抗原或抗体的试纸。1857年, 法拉第最早用还原法制备出胶体金溶液。1971年, Faulk 和 Taylor^[1] 用与胶体金结合的兔抗沙门氏菌血清, 检测沙门氏菌表面抗原的分布, 首次将胶体金应用于免疫分析领域。1990年, Osikowicz 和 Beggs 等建立了胶体金免疫层析技术, 并应用于人类绒毛膜激素的定性检测。目前, 胶体金试纸条

在病原、抗生素、农药残留等检测方面已得到了广泛应用。

在禽病检测方面, 胶体金试纸条作为一种检测工具, 应用于疾病的诊断、流行病学调查、免疫方案制定、检验检疫等方面。与其他免疫学和分子生物学检测方法相比, 胶体金试纸条具有无需专业仪器, 检测耗时短, 通过肉眼观察即可判定结果, 较好的特异性和敏感性, 易于运输和保存, 适用于基层和现场检测。

1 检测原理

胶体金试纸条以胶体金为标记物, 利用特异性抗原抗体反应, 通过反应后产生的肉眼可直接观察的颜色变化来判定结果。在禽病检测方面, 大部分

项目基金: 种禽场疾病综合防控与净化技术体系评估、论证和推广研究(2016YFD0501609)

胶体金检测试纸条采用双抗夹心法检测病原或双抗原夹心法检测抗体。这两种方法基本原理相同,均以条状的纤维层材料为固相载体,以玻璃纤维膜来容纳金标抗体或抗原,将已知的特异性抗原或者抗体固定于硝酸纤维素膜上作为检测线,同时在检测线附近固定可与金标物相结合的抗原或抗体作为质控线。进行样品检测时,在样品垫上滴加待检测样品后,玻璃纤维膜中的胶体金标记抗体或抗原会与待检测目的抗原或抗体结合形成金标复合物,当金标复合物泳动至检测线时,构成检测线的无色检测物与胶体金标记复合物结合,检测线颜色变为红色或紫红色;若样品中不含目的抗原或抗体,则检测线不变色。

2 禽病检测方面的应用

2.1 禽流感

禽流感由禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)感染所致,对禽养殖业及人类健康构成了严重威胁。根据AIV囊膜上血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)不同,可分为16个HA亚型和10个NA亚型^[2]。

在AIV抗体检测方面,崔尚金等^[3]用灭活的H5N1禽流感病毒和杆状病毒表达HA蛋白研制了检测H5亚型AIV抗体的胶体金试纸条,使用该试纸条和血凝抑制实验同时检测830份H5N1 AIV免疫鸡血清样品,与血凝抑制实验结果相比,该试纸条检测灵敏度为88.8%,符合度为97.6%;其中检测免疫60天后血清样品时,该试纸条灵敏度和特异性与血凝抑制实验相同。Cheng Yuling等^[4]用兔抗鸡IgG和H6N1型AIV制备胶体金标物,以检测鸡抗AIV核蛋白与基质蛋白抗体作为检测线,研制出检测所有亚型AIV抗体的胶体金试纸条,使用该试纸条和血凝抑制实验检测326份样品,试纸条检测结果与血凝抑制结果不存在显著差异($P < 0.001$),灵敏度和特异性分别为95.2%和94.3%。

在AIV病原检测方面,Yoshimi Tsuda等^[5]以两株AIV H5亚型血凝素单克隆抗体制备了检测H5亚型AIV的胶体金试纸条,该试纸条检测灵敏度可达 $10^{3.5} \sim 10^{5.5}$ EID₅₀;使用该试纸条检测H5N1 AIV感染

鸡,感染后48小时气管拭子检测呈阳性。彭伏虎等^[6]用AIV H9亚型血凝素单克隆抗体和鸡抗AIV IgG分别作为标记物和检测线,制备了检测H9亚型AIV胶体金试纸条,该试纸条可检测到0.25血凝单位的病毒,较血凝实验灵敏度提高4倍;使用该试纸条和病毒分离方法检测157份泄殖腔和气管拭子样品,该试纸条检测出26份H9阳性样品,与病毒分离实验一致。徐一鸣等^[7]以AIV H3和H7型血凝素蛋白单克隆抗体与马抗H3和H7型AIV多克隆抗体分别作为待标记物和检测线,制备了可同时检测H3和H7型AIV胶体金检测试纸条,灵敏度与血凝实验相当。

2.2 新城疫

新城疫是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的,长期以来对禽养殖业造成重大危害。在NDV抗体检测方面,李希友等^[8]用胶体金标记新城疫病毒,制作了检测NDV抗体的免疫胶体金试纸条,使用IDEXX公司标准NDV阴性和阳性血清测定,该试纸条检测血凝抑制抗体最低滴度为4log₂;使用该试纸条和血凝抑制方法同时检测60份样品,试纸条检测结果与血凝抑制试验法检测结果符合率为93.8%。

在NDV检测方面,高玲美等^[9]以鸡抗NDV抗体制备金标抗体,兔抗鸡IgG作为检测线,研制出检测NDV的胶体金试纸条,用该试纸条和病毒分离法共同检测已知血清和临床样品共计100份,试纸条阳性检出率为94%,病毒分离法阳性检出率为96%,两者符合度为93%,表明该试纸条与病毒分离结果有较高的符合度。2009年李蓓蓓等^[10]以两株NDV单克隆抗体作为免疫标记物和检测线,制备了检测NDV的胶体金试纸条,灵敏度比HA试验结果提高8倍。

2.3 传染性法氏囊病

传染性法氏囊病是由传染性法氏囊病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV)引起的,主要感染幼鸡的急性高度接触性传染病。在IBDV抗体检测方面,2011年Isa Nurulfiza等^[11]以鸡抗IBDV血清和灭活IBDV作为待标记物和检测线,研制出

检测 IBDV 抗体的胶体金试纸条, 使用该试纸条和 BioCheck 公司 ELISA 试剂盒检测已知阳性样品时, 该试纸条检测准确度与商品化 ELISA 试剂盒相同, 灵敏度高于商品化 ELISA 试剂盒, 最短仅 2 分钟即出结果。

在 IBDV 检测方面, 张改平等^[12]以 IBDV 单克隆抗体制备胶体金标记物, 研制出 IBDV 检测胶体金试纸条。该试纸条检测灵敏度高, 实验条件下以强毒感染鸡 36 h 后, 检测结果呈阳性。用该试纸条、琼扩实验和 ELISA 平行检测 40 份阳性样品, 结果显示该试纸条灵敏度与 ELISA 相当, 比琼扩试验提高了 32~64 倍; 用上述三种方法检测 238 份临床样品和 289 份阳性样品, 该试纸条与琼扩试验、ELISA 检测灵敏度相同, 阳性符合率为 100%。

2.4 鸡传染性支气管炎

鸡传染性支气管炎是由鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus, IBV) 引起的鸡的一种呼吸道传染性疾病, 在我国鸡群中广泛存在。Zhang Jinliang 等^[13]用鼠抗鸡 IgG 单克隆抗体和大肠杆菌表达 IBV 核衣壳蛋白分别制备了胶体金标记物和检测线, 研发出检测 IBV 抗体的胶体金试纸条。同时使用该试纸条、血凝抑制实验和 IDEXX 公司商品化 ELISA 试剂盒检测 120 份血清样品。结果显示, 与血凝抑制实验相比该试纸条检测敏感性为 92.11%, 阳性符合率为 85%; 与商品化 ELISA 试剂盒相比该试纸条检测敏感性为 92.31%, 阳性符合率为 95%。

2.5 禽白血病

禽白血病是由禽白血病病毒 (Avian leukosis virus, ALV) 引起的肿瘤性疾病。Qian Kun 等^[14]以两株 ALV 衣壳蛋白单抗研发出检测 ALV 的胶体金试纸条。该试纸最低可以检测出 600 pg 重组病毒衣壳蛋白或 70 个 TCID₅₀ 的病毒; 用该试纸条与 IDEXX 公司 ELISA 试剂盒检测 361 份泄殖腔拭子、76 份 1 日龄雏鸡胎粪和 663 份分离毒株等 3 种样品 (共 1 100 份), 与 ELISA 试剂盒相比, 该试纸条检测 3 种样品的符合率分别为 93.91%、93.42%、100%, 灵敏性分别为 93.44%、94.12%、100%, 特

异性分别为 94.00%、93.22%、100%; 使用该试纸条、IDEXX 公司 ELISA 试剂盒和 PCR 法共同检测 20 份疑似阳性样品, 结果显示 ICS 与商品化 ELISA 试剂盒检测结果一致 (19 份呈阳性), 与 PCR 方法符合率为 95% (PCR 检测结果为 20 份阳性)。

2.6 其它禽病

王爱华等^[15]制备了检测减蛋综合征病毒 (Egg drop syndrome virus, EDSV) 的胶体金试纸。该试纸条能检出浓度为 135 $\mu\text{g/mL}$ 的 EDSV。用该试纸条和血凝实验 (HA) 平行检测 135 份疑似阳性样品, ICS 检测阳性率为 52.6%, HA 检测阳性率为 58.5%, 与 HA 相比, ICS 检测阳性符合率为 89.9%。

Shen Chanjuan 等^[16]制备了检测鸭瘟病毒抗体的胶体金试纸条。使用该试纸条、高特异性 ELISA 试剂盒与中和实验平行检测 110 份临床血清样品。结果显示, 与 ELISA 试剂盒相比, ICS 阳性符合率为 85.37%, 阴性符合率为 82.61%; 与中和实验相比, ICS 阳性符合率为 19.51%, 阴性符合率为 75.36%; 统计分析显示, 该试纸条检测灵敏性与 ELISA 试剂盒无显著差异, 并显著高于中和实验。

陈素娟等^[17]制备了检测鸭里默杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 的胶体金试纸条。该试纸条可检测到 1、2、3、11 型 RA, 最低可检测到 6×10^3 CFU 的 RA。使用该试纸条与细菌分离法检测疑似阳性样品, 结果显示该试纸条检测灵敏度高于细菌分离实验, 病料中 RA 的检出率为 100%, 与细菌分离实验相比阳性符合率为 88.9%。

3 展望

3.1 提升检测灵敏度

与分子检测技术相比, 部分胶体金免疫层析试纸条存在着检测灵敏度低、假阴性结果等缺陷。胶体金银扩增免疫层析技术是基于摄影技术的免疫层析方法, 结合有抗体的胶体金颗粒会使银离子浓缩还原形成银原子, 并在胶体金微粒周围形成直径为 5~10 μm 的银簇, 使标记物的体积增加到胶体金微粒直径的 100 倍, 从而使检测能力大大提高。Mitamura K 等^[18]运用胶体金银扩增免疫层析技术制备了检测 H5N1 亚型禽流感病毒的试纸条, 与普通

的胶体金试纸条相比,其检测灵敏度提高了500倍。

3.2 区分野生型毒(菌)株与疫苗毒(菌)株

疫苗作为动物疫病防控的重要手段得到了广泛的应用,但疫苗的使用往往会干扰动物疫病诊断和监测。研制胶体金免疫层析试纸条时,可选用能区分野生型毒(菌)株与疫苗毒(菌)株的单克隆抗体或蛋白,从而获得能区分野毒(菌)株与疫苗毒(菌)株的胶体金试纸条。郭佃磊等^[19]选用一株能特异性识别伪狂犬病野生型毒株的单克隆抗体,制备了检测野生型伪狂犬病病毒抗体的试纸条,使用该试纸条和 IDEXX 公司 ELISA 试剂盒平行检测样品,统计发现该试纸条与商品化 ELISA 试剂盒检测结果相符。

3.3 同一试纸条进行多疾病检测

疾病种类繁多,并且许多疾病临床症状相似,出现混合感染。将易发生混合感染或常见的多种抗体或病原胶体金检测方法整合到同一胶体金试纸条中,可有效扩大试纸条检测范围,提高检测效率。Li Jinfeng 等^[20]制备了可同时检测禽流感病毒和新城疫病毒的胶体金银扩增强免疫层析试纸条。该试纸条可同时检测 AIV 和 NDV 病毒,且检测灵敏度较商品化胶体金试纸条提高了100倍。

3.4 实现抗原或抗体定量检测

目前,大部分胶体金仅能做定性判断。而定量胶体金检测多根据胶体金试纸条检测已知不同浓度标准物时检测线存在的色差,来绘制标准物浓度与检测线颜色关系的标准曲线。当检测样品时,反应完成后将试纸条检测线颜色与标准曲线做比较,以确定待检样品中目的检测物含量。

参考文献:

[1] Faulk W P, Taylor G M. Communication to the editors: An immunocolloid method for the electron microscope[J]. *Immunochemistry*, 2010, 8 (8): 1081.
 [2] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 5版. 北京: 中国农业出版社, 2011: 80-83
 [3] Cui S, Chen C, Tong G. A simple and rapid immunochromatographic strip test for monitoring antibodies to H5 subtype Avian Influenza Virus[J]. *Journal of virological methods*, 2008, 152 (1/2): 102.

[4] Cheng Y L, Wang L C, Wang C H. Immunochromatographic strip assay development for avian influenza antibody detection[J]. *The Japanese journal of veterinary research*, 2015, 63 (4): 90-183.

[5] Tsuda Y, Sakoda Y, Sakabe S, et al. Development of an Immunochromatographic Kit for Rapid Diagnosis of H5 Avian Influenza Virus Infection[J]. *Microbiology & Immunology*, 2007, 51 (9): 903-907.

[6] Peng F, Wang Z, Zhang S, et al. Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of H9 subtype avian influenza viruses[J]. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 2008, 15 (3): 569-574.

[7] 徐一鸣, 金宁一, 杨振国, 等. 胶体金方法检测 H3 和 H7 亚型禽流感病毒[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29 (5): 580-583.

[8] 李希友, 田夫林, 张秀娥, 等. 半定量检测新城疫抗体胶体金试纸条的研制[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37 (12): 1373-1377.

[9] 高玲美, 田夫林, 牛钟相, 等. 新城疫快速诊断试纸条的研制及初步应用[J]. *中国动物检疫*, 2004, 21 (8): 22-24.

[10] 李蓓蓓, 张帆, 薛强, 等. 新城疫病毒胶体金免疫层析试纸条的制备[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36 (9): 122-125.

[11] Nurulfiza I, Hair-bejo M, Omar A R, et al. Immunochromatographic gold-based test strip for rapid detection of Infectious bursal disease virus antibodies[J]. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 2011, 23 (2): 320-324.

[12] 张改平, 李学伍, 杨艳艳, 等. 鸡传染性法氏囊病快速诊断试纸条的研制及特性测定[C]//中国畜牧兽医学会禽病学分会第十一次学术研讨会论文集. 成都: 中国畜牧兽医学会禽病学分会, 2002.

[13] Zhang J, Guo Y, Xiao Y, et al. A simple and rapid strip test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010, 72 (7): 883-886.

[14] Qian K, Liang Y Z, Yin L P, et al. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for rapid detection of capsid protein antigen p27 of avian leukosis virus[J]. *Journal of virological methods*, 2015, 221: 115-118.

[15] 王爱华, 王玉珠, 孙继国, 等. 胶体金快速诊断方法对鸡减蛋综合征病毒的检测[J]. *中国兽医科技*, 2005, 35 (11): 856-858.

(下转第85页)

322aa 有 4 个半胱氨酸 (Cys)。这与文献报道的相同, 说明半胱氨酸位置与数目、N 蛋白的结构和功能有着十分密切的关系。它们的改变可能直接影响到 N 蛋白的结构和功能。另外, N 蛋白内部含 2 个潜在的糖基化位点。分离株与国内外 IBV 参考株的核苷酸序列同源性的为 83.8%~99.9%, 其中与 BJ 株的同源性最高, 为 93.3%, 与疫苗株 H120、H52 等的同源性较低, 在 97.2%~88.5% 之间。分离株与国内外 IBV 参考毒株氨基酸的同源性在 88.4%~99.6% 之间。本研究对 IBV 广西分离株的 N 糖蛋白的基因序列进行遗传发育进化树绘制, 表明 Guangxi1566 株与国内的 LX4、BJ 和 SD0612 株关系较近, 与其余 IBV 毒株的亲缘关系均较远, 表明分离株可能是国内流行的鸡肾型 IBV 的 1 个新变异株。本研究对 IBV 广西分离株 N 基因进行克隆和序列测定, 为 IBV 广西分离株遗传变异分析和分子流行病学调查提供了重要材料, 也为 IBV 综合防制措施的制订提供了依据。

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学技术出版社, 1997: 675-680.
- [2] Saif L J. Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome [J]. Rev Sci Technol, 2004, 23: 643-660.
- [3] 宋新宇, 刘兆霞, 窦小龙, 等. 2012—2014 年我国鸡传染性支气管炎分子流行病学调查 [J]. 中国动物检疫, 2016, 33 (1): 13-17.
- [4] Ignjatovic J, Ashton D F, Reece R, et al. Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus [J]. Comp. Pathol, 2002, 126: 115-123.
- [5] Zong X H, Chu Y S, Bao L Y, et al. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China [J]. Infect Genet Evol, 2011, 11 (1): 190-200.
- [7] B W 卡尔尼克. 禽病学 [M]. 高福, 苏敬良, 译. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [8] Williams A K, Wang L, Sneed L W, et al. Comparative analysis of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronavirus [J]. Virus Res, 1992, 25: 213-222.
- [9] 张庆霞, 陈建飞, 韩宗玺, 等. 1995-1999 年鸡传染性支气管炎病毒地方分离株核蛋白基因的遗传变异分析 [J]. 病毒学报, 2006, 22 (3): 225-229.
- [10] Park J Y, Pak S I, Sung H W, et al. Variations in the nucleocapsid protein gene of infectious bronchitisviruses isolated in Korea [J]. Virus Genes, 2005, 31 (2): 153-162.
- [11] Bochkov Y A, Tosi G, Massi P, et al. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination [J]. Virus Genes, 2007, 35 (1): 65-71.
- [12] 马德星, 刘胜旺, 李广兴. 鸡传染性支气管炎病毒 HN 株 N 基因的遗传变异分析 [J]. 中国兽医科技, 2005, 35 (5): 357-362.
- [13] 张庆霞, 陈建飞, 韩宗玺, 等. 中国 2000-2004 年鸡传染性支气管炎病毒地方分离株核蛋白基因的遗传变异分析 [J]. 中国病毒学, 2006, 21 (6): 575-580.

(责任编辑: 朱迪国)

(上接第 81 页)

- [16] Shen C, Cheng A, Wang M, et al. Development and evaluation of an immunochromatographic strip test based on the recombinant UL51 protein for detecting antibody against duck enteritis virus [J]. Virol J, 2010 (7): 268.
- [17] 陈素娟, 陈冰, 孙化露, 等. 鸭疫里默杆菌单克隆抗体的研制及免疫胶体金检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2012, 32 (11): 1651-1655.
- [18] Mitamura K, Shimizu H, Yamazaki M, et al. Clinical evaluation of highly sensitive silver amplification immunochromatography systems for rapid diagnosis of influenza [J]. Journal

of virological methods, 2013, 194 (1/2): 123-128.

- [19] Guo D L, Pan Q W, Li K P, et al. Development and clinical evaluation of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against field strains of pseudorabies virus [J]. Journal of virological methods, 2015, 222: 164-169.
- [20] Li J, Zou M, Chen Y, et al. Gold immunochromatographic strips for enhanced detection of avian influenza and Newcastle disease viruses [J]. Analytica chimica acta, 2013, 782: 54-58.

(责任编辑: 杜宪)