

Preparation and Application of IHNV and IPNV Immunochromatographic Test Strip

Bin Wu¹, Liang Zhao¹, Hong Wang², Lin Zhang¹, Peng Guan¹

¹Liaoning Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian Liaoning

²The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian Liaoning

Email: wubin69@163.com

Received: Sep. 2nd, 2017; accepted: Sep. 20th, 2017; published: Sep. 28th, 2017

Abstract

In this paper, the colloidal gold strips of IHNV and IPNV for rapid detection was prepared, and their performance was tested. Citric acid three sodium was treated as deoxidizer to prepare gold particle, Label IHNV and IPNV monoclonal antibodies and coat on the NC membrane with the Goat anti mouse IgG, Goat anti rabbit IgG, Rabbit anti rat IgG, as the test line and control line to detect IHNV and IPNV. Test results showed that the specificity of Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) was good. Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV), Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus (EHNV) and other common pathogens tested without cross reaction; The sensitivity was to 105CFU/mL and only the reaction time of 5 min to 10 min. They could be used to detect ascites in diseased fish by the above 2 pathogens on the spot.

Keywords

Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV), Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV), Colloidal Gold, Immunochromatographic, Test Strip

IHNV与IPNV免疫层析试纸条的制备及应用

吴斌¹, 赵亮¹, 王红², 张琳¹, 关鹏¹

¹辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连

²大连医科大学附属第一医院, 辽宁 大连

Email: wubin69@163.com

收稿日期: 2017年9月2日; 录用日期: 2017年9月20日; 发布日期: 2017年9月28日

摘要

本文制备传染性造血器官坏死病毒(Infectious haematopoietic necrosis virus, IHNV)、传染性胰脏坏死

病毒(Infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)胶体金快速检测试纸, 并对其性能进行检测。以柠檬酸三钠作为还原剂制备胶体金颗粒, 标记IHNV、IPNV单克隆抗体, 将羊抗鼠IgG、羊抗兔IgG、兔抗鼠和纯化后的2种单克隆抗体包被于NC膜上, 作为质控线和检测线来检测样品中的IHNV和IPNV。结果表明所研制的试纸特异性良好, 分别对鲤春血症病毒(SVCV)、病毒性出血性败血症病毒(VHSV)、流行性造血器官坏死病毒(EHNV)等常见病原菌进行测试, 未出现交叉反应; 敏感度达到 10^5 CFU/mL, 反应时间仅需5 min~10 min, 可以用于感染上述2种病原的病鱼腹水现场检测。

关键词

传染性造血器官坏死病毒, 传染性胰脏坏死病毒, 胶体金, 免疫层析, 试纸条

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

传染性造血器官坏死(Infectious haematopoietic necrosis, IHN)是严重危害我国鲤、鳙鱼苗种业的一种病毒性疾病[1]。而传染性胰脏坏死(Infectious pancreatic necrosis, IPN)是一种由传染性胰脏坏死病毒引起鲑科鱼类的病毒性传染病, 以前称其为急性卡他性肠炎, 分为急性、亚急性和慢性 3 种[2]。IHN、IPN 被世界动物卫生组织(OIE)列为必须申报的动物疫病, 被我国列为二、三类动物疫病[3]。为了预防和控制 IHN、IPN 的流行, 对它们进行流行病学监测和诊断是十分重要的。因此, 建立快速简便的 IHN、IPNV 检测方法, 有利于对疫病爆发进行及时的监测、预防和控制, 也是保证国内水产养殖业健康发展及促进出口贸易的有效手段。

1. 材料与方法

1.1. 实验所用的材料

氯金酸、碳二亚胺、兔抗鼠二抗购自 Sigma 公司, 柠檬酸三钠(分析纯)、BSA 购自上海惠世有限公司。硝酸纤维素膜、玻璃纤维、玻璃棉、吸水纸、支持板: 德国 S.S 公司产品。实验用水均为经超纯水装置净化的二次去离子水, 电阻率 ≥ 18.2 M Ω 。IHNV、IPNV、SVCV、VHSV、EHNV、KHV 等病毒均由本实验室保存

1.2. 主要溶液的配制[4]

见 2.1 中的溶液名称。

1.3. 主要仪器设备

分析天平、直流(数显)无级调速搅拌器、恒温数显加热套、紫外可见光分光光度仪、透射电子显微镜、粒度测定仪。

1.4. 临床样本

临床 62 份鱼类样本: 2014~2016 年期间辽宁地区采集;

16 份 IHNV 与 IPNV 的阳性样本: 由本实验室分离、鉴定、保存。

1.5. 方法

1.5.1. 胶体金标记单克隆抗体的制备[5]以及检测线和对照线的制备

用 Bio-Dot XYZ-3050 自动喷膜机分别将 2 mg/mL 纯化的多抗和 1 mg/mL SPA 点在硝酸纤维膜上检测线和对照线位置, 点样速度为 0.75 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存备用。

1.5.2. 胶体金试纸条的组装及试验结果判定

将背衬、样品垫、吸水垫、硝酸纤维膜、金标垫粘在一起, 利用 Bio-Dot CM4000 切条机将其切成 3.5 mm 宽的试纸条, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 干燥保存备用。用试纸条检测, 如果对照线和检测线均显色, 则为阳性, 如果仅对照线显色, 而检测线不显色, 则为阴性, 如果对照线不显色, 则检测无效, 应换用另一根试纸条再次检测。

2. 结果与讨论

2.1. 抗体纯化

将制备好的抗体用 20 mM PBS PH7.0 的缓冲液进行 10 倍稀释, 稀释后的样品过 0.45 μm 的针头滤器和 Mabselect 5 ml 的预装柱(平衡 Buffer: 20 mM PBS PH7.0、洗脱 Buffer: 100 mM Gly-HCL PH3.0)。制备出的目的蛋白加入 1 M Tris-HCL PH 9.0 的溶液进行中和, 中和后的目的蛋白再过 G 25 的柱子进行脱盐, 置换溶液是 20 mM PBS PH7.0。最后跑电泳, 用 BCA 的方法测蛋白浓度。结果见图 1。

2.2. 抗体标记

1m 胶体金中加入 20 μg 的待标记抗体, 包被多克隆抗体, 包被浓度为 1.5 mg/mL, 样稀主要成分为 10 mM PBS PH = 7.3。

经图 2 数据, 得出结论: IHN、IPN 抗体配对结果较好, 符合使用要求。

2.3. 重复性试验

对实验室保存的 16 份 IHN、IPN 阳性样本进行检测显示试纸条具有较好的重复性; 稳定性实验结果显示(见图 3), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存的试纸条, 在保存 3 个月后反应, 结果无明显差异, 置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 保

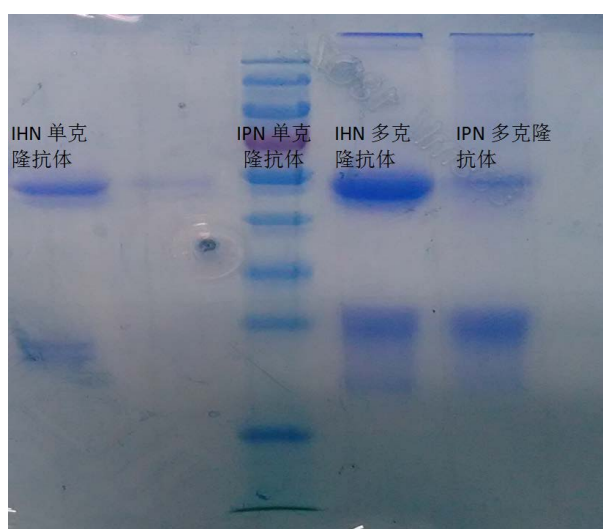


Figure 1. Electrophoresis identification results
图 1. 电泳鉴定结果

存的试纸条从第 2 个月开始，敏感性下降，质控线和检测线变得模糊不清。

2.4. 灵敏性试验

试纸条可检出滴度为 $10^{3.5}$ TCID₅₀/100 μ L 的病毒悬液，仅与 IHNV、IPNV 病毒悬液呈阳性反应，其余均为阴性，如图 4 所示。

2.5. 梯度加样测试

如图 5 所示，结果表明，样本加样量等差递减，然后补充样本稀释液后，产品显色成梯度变化。符合产品检测性能需求。

2.6. 特异性试验

特异性试验结果发现对相应抗原抗体的检测呈阳性，对 PFRV、HRV、IPNV、VNNV、YAV、GCRV、KHV 等病毒的检测均为阴性(表 1、表 2)。

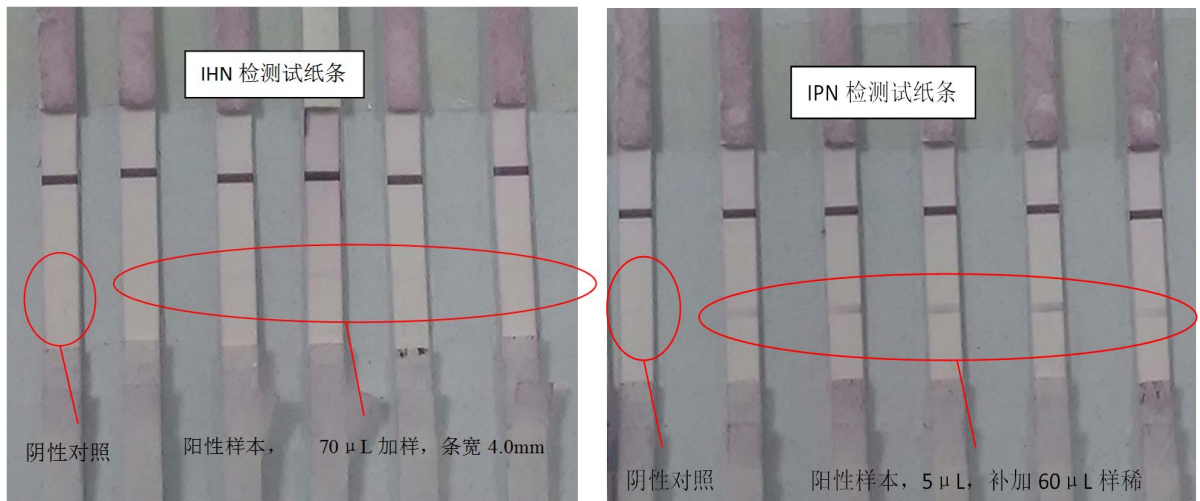


Figure 2. IHN and IPN test strips

图 2. IHN、IPN 试纸条

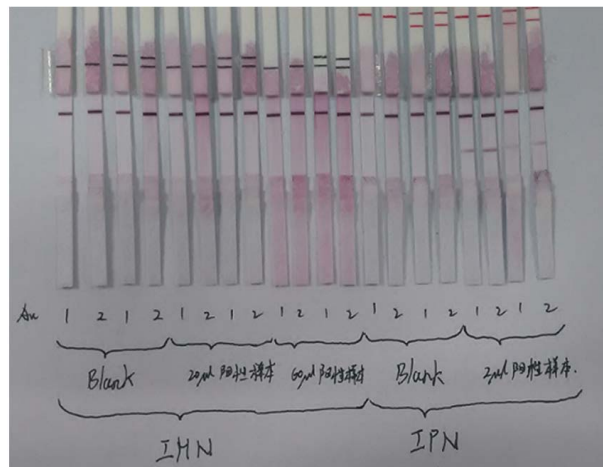


Figure 3. Results of repeated experiment

图 3. 重复性实验结果

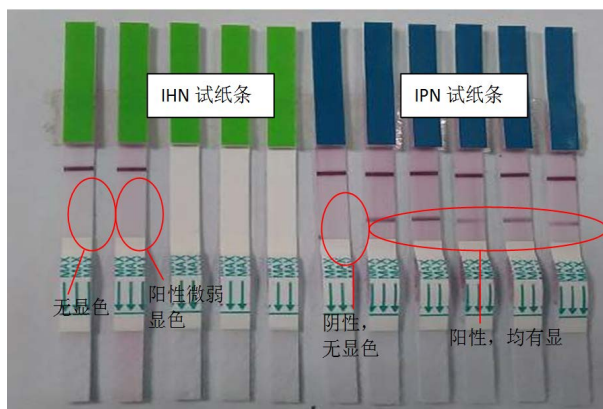


Figure 4. Sensitivity test results

图 4. 灵敏性试验结果

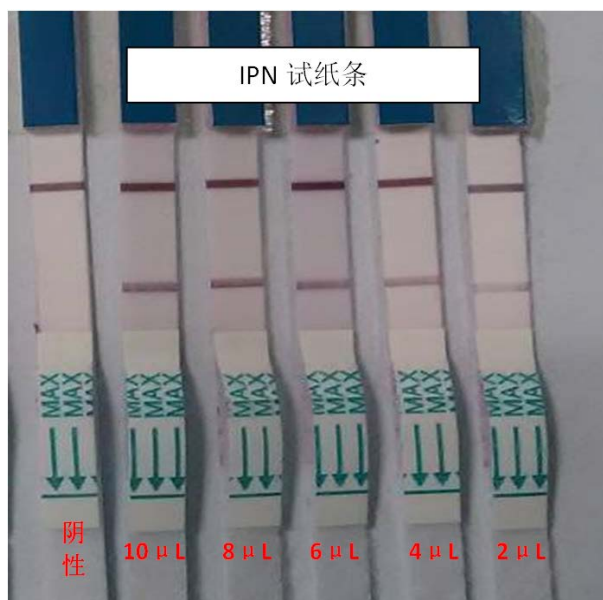


Figure 5. Gradient addition test IPN test strip

图 5. 梯度加样测试 IPN 试纸条

Table 1. Specific test results of IHNV colloidal gold test strip

表 1. IHNV 胶体金试纸条特异性试验结果

胶体金试纸条 IHNV	与各种病毒反应结果											
	IHNV	SVCV	VHSV	EHNV	PFRV	HRV	IPNV	VNNV	YAV	GCRV	KHV	PBS
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2. Specific test results of IPNV colloidal gold test strip

表 2. IPNV 胶体金试纸条特异性试验结果

胶体金试纸条 IPNV	与各种病毒反应结果											
	IPNV	SVCV	VHSV	EHNV	PFRV	HRV	IHNV	VNNV	YAV	GCRV	KHV	PBS
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 3. Results of clinical samples**表 3.** 临床样本检测结果

		PCR		总数
		阳性	阴性	
试纸条	阳性	12	1	13
	阴性	1	48	49
	总数	13	49	62

2.7. 临床样本检测

对采自本溪、丹东、东港、营口、鲅鱼圈、抚顺、朝阳、沈阳等地的 62 份样品, 同时用试纸条和世界动物卫生组织所推荐的 PCR 方法进行检测。检测结果显示(表 3) 12 份样品使用 PCR 方法和试纸条检测均为阳性; 49 份样品均为阴性; 1 份样品 PCR 为阳性, 试纸条为阴性; 1 份样品 PCR 方法检测为阴性, 用试纸条检测为阳性。根据 OIE 手册中检测方法的确认一章所推荐的计算方法, 本试纸条灵敏度为 $12/(12 + 1) \times 100\% = 92.3\%$, 特异性为 $49/(49 + 1) \times 100\% = 98.0\%$, 与 PCR 方法的符合率为 $(12 + 49)/62 \times 100\% = 98.4\%$ 。该试纸条显示出较好的特异性, 适用于疾病爆发期间的诊断以及病毒分离产物的鉴定, 但不适用于 IHNV、IPNV 的监测和发病早期诊断。

3. 结论

本文制备了 IHNV 与 IPNV 得胶体金快速检测试纸, 并对其性能进行检测。结果表明所研制的试纸特异性良好, 分别对鲤春血症病毒(SVCV)、病毒性出血性败血症病毒(VHSV)、流行性造血器官坏死病毒(EHNV)等常见病原菌进行测试未出现交叉反应; 敏感度达到 10^5 CFU/mL, 反应时间仅为 5 min~10 min, 可以用于感染 2 种病原的病鱼腹水现场检测。免疫层析试纸条除操作简便和快速外, 还具备了灵敏度高、特异性强、重复性好等特点, 操作时也不需要特殊试验条件, 肉眼易于判断结果[6]。所以, 此法是一项适宜在广大基层单位推广和应用的检疫技术。

基金项目

国家质检公益项目(201410059)。

参考文献 (References)

- [1] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 水生动物疫病病种介绍: 传染性造血器官坏死[J]. 中国水产, 2011(2): 51-57
- [2] 徐立蒲, 王小亮, 杨丽文, 等. 传染性造血器官坏死病诊断及防控的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(3): 209-215.
- [3] 耿毅, 汪开毓, 范方玲, 等. 养殖黄颡鱼鮰爱德华氏菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(1): 61-67.
- [4] 王晓结. 对虾白斑症病毒快速检测试剂盒的研制及其应用[D]: [博士学位论文]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [5] 梁明龙. 温和气单胞菌单克隆抗体的制备及初步应用[D]: [硕士学位论文]. 南宁: 广西大学, 2006.
- [6] 何艳玲, 林松, 王陆迪, 等. 胶体金免疫层析法检测水产品中 O1 群霍乱弧菌方法的建立与优化[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2007, 30(1): 52-55.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：ojfr@hanspub.org