

陈芷珊, 陈滢锴, 陈中婷, 等. 猪流行性腹泻病毒荧光免疫层析检测试纸条的研制和应用 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 95-100.

CHEN Z S, CHEN Y K, CHEN Z T, et al. Development and application of fluorescence immunochromatography test strips for PEDV detection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 95-100.

猪流行性腹泻病毒荧光免疫层析检测试纸条的研制和应用

陈芷珊^{1,2}, 陈滢锴^{1,2}, 陈中婷^{1,2}, 蒙淑玲^{1,2}, 江明生^{1,3*}, 陈海兰^{1,2,3,4*}

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004;

2. 广西壮族自治区兽用生物制品工程研究中心, 广西 南宁 530004;

3. 广西畜禽繁育与疾病防控重点实验室, 广西 南宁 530004;

4. 广西高校动物疫病预防与控制重点实验室, 广西 南宁 530004)

摘要: 为了建立一种快速、高效且灵敏的猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 的现场快速检测技术, 本研究以荧光量子点标记鼠抗 PEDV 单克隆抗体并喷涂到结合垫上, 将鼠抗 PEDV 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体固定到 NC 膜上, 分别作为检测线和质控线制备荧光免疫层析试纸条, 并对其敏感性、特异性及临床样品检测性能进行考察。结果: 所制备的荧光试纸条可在 20 min 内完成临床样品中 PEDV 的现场检测, 最低检测限为 3.3×10^3 TCID₅₀/mL, 与猪轮状病毒、猪丁型冠状病毒、猪圆环病毒、伪狂犬病病毒、沙门菌、金黄色葡萄球菌等常见病原无交叉反应, 对 50 份粪便、粪便拭子和肠道组织等临床样品进行检测, 与 RT-PCR 检测结果的符合率为 84.0%。本试验表明该试纸条具有较高的灵敏度和较强的特异性, 检测时间短, 操作简便, 可用于 PEDV 的现场快速筛查。

关键词: 荧光免疫层析; 量子点; 猪流行性腹泻病毒; 快速检测

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)04-0095-06

Development and application of fluorescence immunochromatography test strips for PEDV detection

CHEN Zhishan^{1,2}, CHEN Yingkai^{1,2}, CHEN Zhongting^{1,2}, MENG Shuling^{1,2},

JIANG Mingsheng^{1,3*}, CHEN Hailan^{1,2,3,4*}

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Engineering Research Center of Veterinary Biologics, Nanning 530004, China;

3. Guangxi Key Laboratory of Animal Reproduction, Breeding and Disease Control, Nanning 530004, China;

4. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Prevention and Control of Animal Diseases, Nanning 530004, China)

Abstract: In order to effectively deal with the harm of porcine epidemic diarrhea to the pig industry, a fluorescent immunochromatography was developed for the rapid, efficient and sensitive detection of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). In this study, mouse anti-PEDV monoclonal antibodies were labeled with fluorescent quantum dots and were immobilized on the conjugate pad. Mouse anti-PEDV monoclonal antibodies and goat anti-mouse IgG polyclonal antibodies were immobilized on the NC membrane as the detection line and the control line, respectively. The sensitivity, specificity and feasibility for clinical sample detection were evaluated. The results showed that the prepared fluorescent test strip could complete the on-site detection of PEDV in clinical samples within 20 minutes. The limit of detection for PEDV was 3.3×10^3 TCID₅₀/mL, and there was no cross-reaction with common pathogens, such as rotavirus virus, δ -coronavirus, porcine circovirus, pseudorabies virus, *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus*. The agreement rate of 50 clinical stool, fecal swabs and intestinal tissue samples between the developed PEDV test strips and the reverse transcription PCR (RT-PCR) was 84.0%. In conclusions, the developed fluorescent test strip showed high sensitivity, strong specificity and simple operation capabilities, and may be used for rapid screening of PED in the

收稿日期: 2023-04-23; 修回日期: 2024-01-27

基金项目: 广西自然科学基金面上项目 (2022GXNSFAA035562); 巴马人才科技专项 (巴人科 20210016)

第一作者: 陈芷珊, 女, 壮族, 本科生

* 通信作者: 陈海兰, 博士, 硕士生导师, 研究方向为兽医学, E-mail: hlchen319@163.com。

field.

Keywords: fluorescence immunochromatography; quantum dot; porcine epidemic diarrhea virus; rapid detection

猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 属于冠状病毒科冠状病毒属的单股正链 RNA 病毒, 可感染各日龄各品系的猪, 引发猪流行性腹泻 (PED)。PED 是一种以腹泻、呕吐、脱水为主要特征的高度接触性肠道传染病, 对哺乳仔猪危害最大, 死亡率可高达 100%^[1]。猪流行性腹泻在 1971 年首次发现于英国, 随后在欧洲和亚洲的部分国家相继流行, 各地的哺乳仔猪大量被感染并发生死亡^[2]。2007 年在泰国暴发 PED, 给当地的养猪业造成了巨大损失^[3]。2004 年杜坚等^[4]首次用血清学方法证实了广西猪场存在 PEDV 感染, 但未出现大规模疫情暴发。2010 年, 中国首先于南方地区出现 PED 暴发, 随后遍及全国各地, 给中国的养猪企业造成了重大经济损失和影响^[5]。近几年的调查结果表明, PEDV 在广西的平均检出率最高为 58.26%, 表明 PED 在广西生猪养殖场中的危害不容忽视^[6]。对 PEDV 感染的早期筛查是控制该病毒传播和 PED 疫情蔓延的关键, 因此, 建立一种 PEDV 现场快速检测方法对 PED 的防制有着重要意义。

常用的 PEDV 检测方法主要包括病原学检测方法和血清学检测方法, 其中病原学检测方法包括常规反转录 PCR (RT-PCR)、荧光定量 PCR 和环介导等温扩增技术 (RT-LAMP), 而血清学检测方法主要有间接免疫荧光 (IFA)、病毒中和检测 (VN)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和免疫层析技术等^[7]。RT-PCR 和荧光定量 PCR 检测方法有较好的特异性和灵敏度, 但是需要较高水平的专业能力和昂贵的设备支持, 不适用于养殖场的现场快速检测。RT-LAMP 具有引物特异性强, 反应条件简单和时间短等优点, 但由于反应需要多条引物, 且相关试剂价格较高, 限制了该方法在基层检测的普及^[8]。VN 检测试剂盒操作简便且无需专用设备, 但检测结果的判断具有主观性, 并且检测的重复性易受影响^[9]。ELISA 可用于大规模临床检测, 但仍需要严格的操作技术和昂贵的仪器, 不适用于 PEDV 急性感染的一线临床检测^[10-11]。免疫层析技术具有检测快速、价格低廉、操作简单、携带方便、安全无污染等特点, 适用于临床快速检测, 但传统胶体金免疫层析技术的准确性和灵敏度有待提高^[12]。荧光免疫层析技术 (LFIA) 是以荧光物质为信号源, 建立在层析膜上的基于抗原抗体特异性免疫反应的新型膜检测技术。该检测技术将免疫荧光和免疫层析技术相结合, 克服了传统胶体金免疫层析技术灵敏度较低的不足, 且保留了快捷简便、价格低廉、不依赖仪器设备和专业技术人员等优点, 被广泛

运用于疾病检测、食品安全监测、环境监测等方面^[13-16]。

本研究以羧基化量子点微球为标记材料, 建立了一种用于 PEDV 现场快速检测的荧光免疫层析检测技术, 可由养殖人员在现场直接完成 PEDV 感染的快速筛查, 对及时制定正确有效的疫病防控措施具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

鼠抗 PEDV 单克隆抗体 (货号: JN1401, 批号: M20201109) 购于北京金诺百泰生物技术有限公司; 羊抗鼠 IgG 多克隆抗体 (货号: D111024, 批号: H318AA0001) 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 硝酸纤维素膜 (NC 膜, 货号: 500774047, 批号: S019110264) 由德国 Sartorius 公司提供; 羧基化量子点微球购于北京纳晶生物科技有限公司; 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES), 碳二亚胺 (EDC), N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 牛血清白蛋白 (BSA), 硼酸钠和硼酸由美国 Sigma 公司生产; 样品垫、结合垫、吸水纸和聚氯乙烯 (PVC) 底板等购于上海金标生物科技有限公司。

PEDV、猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 和伪狂犬病毒 (PRV), 由广西大学动物科学技术预防兽医实验室分离保存; 肠炎沙门菌 (ATCC 14028) 购于北京保藏生物科技有限公司; 大肠杆菌 (CMCC (B) 44102) 和金黄色葡萄球菌 (CMCC (B) 26003), 由中国微生物菌种保藏中心提供; 副溶血弧菌由广西大学水产病害实验室分离保存; 猪轮状病毒 (PoRV) 和猪丁型冠状病毒 (PDCoV) 强阳性粪便样品, 由广西兽医研究所收集和提供。

1.2 主要仪器和设备

ZQ2002 微电脑自动斩切机、CTS300XYZ 数控裁条机和 HM3035 三维化膜喷金仪由上海金标生物科技有限公司生产; 荧光试纸条读值仪由北京纳诺金生物科技有限公司研制。

1.3 荧光免疫层析试纸条的制备和优化

1.3.1 量子点微球标记抗体的制备

取 25 μL 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的羧基化量子点微球, 加入 25 μL 20 mmol/L MES (pH=6.0), 混匀后分别加入现配的 0.5 μL 20 mg/mL EDC 和 0.5 μL 20 mg/mL NHS, 混匀后超声 5 min, 再于 37 $^{\circ}\text{C}$ 活化 15 min。然后于 8 000 g 离心 20 min, 弃去上清液。

用 25 μL 10 mmol/L MES (pH=6.0) 重悬沉淀, 加入 10 μg PEDV 抗体, 混匀后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 1 h, 反应后用 0.1 mol/L 甘氨酸封闭 30 min。5 510 g 离心 15 min, 弃去上清液后, 用 50 μL 硼酸盐缓冲液 (BB) 重悬沉淀, 再次离心弃去上清液。用复溶液 (浓度为 10 mmol/L 的 Tris 缓冲液, pH=8.5, 添加有 10% 蔗糖、10% 海藻糖、0.5% BSA 和 0.2% 吐温 20) 重悬沉淀, 涂于结合垫上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 真空烘干 3 h。

1.3.2 荧光免疫层析试纸条的组装与样品检测

利用接触式自动划膜仪将鼠抗 PEDV 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体分别包被在 NC 膜上作为检测线及质控线, 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 3 h。然后将固定有 T 线和 C 线抗体的 NC 膜、喷涂有量子点微球标记抗体的结合垫、样品垫和吸水纸依次粘贴到 PVC 底板上, 并采用数控裁条机裁成 3.0 mm 宽的试纸条。

将 60 μL 样品滴加到样品垫上, 室温放置 10 min 后, 用波长为 365 nm 的紫外手电筒观察结果。若 T 线、C 线均有条带出现, 判定为阳性; 若 T 线没有条带, C 线有条带, 则判定为阴性; 若 C 线没有条带, 则判定试纸条无效, 需重新检测。

1.3.3 量子点微球标记抗体最佳复溶液体积的确定

将采用 25 μL 量子点微球体系标记好的抗体离心后, 分别用 150、300、600 和 900 μL 复溶液重悬后, 制备荧光试纸条, 并用于样品的检测, 根据试纸条显色程度确定最佳复溶液体积。

1.3.4 检测线和质控线抗体包被浓度的确定

分别采用 0.3、0.5 和 1.0 mg/mL 的鼠抗 PEDV 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体包被 T 线和 C 线, 并以 PBST 和稀释后的病毒液上样, 测试试纸条 T 线、C 线的显色程度。用不同浓度的抗体划膜, 以相同样品上样测试, 以试纸条显色程度确定 T 线、C 线的划膜抗体浓度。

1.4 荧光免疫层析试纸条的性能考察

1.4.1 敏感性考察

将载毒量为 1.0×10^4 TCID₅₀/mL 的 PEDV 病毒液以 1:10、1:20、1:30、1:35、1:40 和 1:50 的比例进行稀释后, 采用制备好的 PEDV 荧光试纸条对 PEDV 稀释液进行检测, 平行重复 5 次, 根据检测结果确定基于肉眼观察的最低检测限。采用荧光试纸条读值仪测定 T 线荧光值, 计算平均值 (\bar{X}) 和标准差 (SD), 以 $\bar{X}+3SD$ 为阈值, 大于及等于阈值判定为阳性, 小于则判定为阴性, 可配合滴滴快检设备进行分析。

1.4.2 特异性考察

利用荧光试纸条分别检测 PoRV (强阳性猪粪便

样品), PDCoV (强阳性猪粪便样品), PCV2 病毒液 (1.0×10^6 TCID₅₀/mL), PRV 病毒液 (1.0×10^6 TCID₅₀/mL), 沙门菌 (1.0×10^7 CFU/mL), 大肠杆菌 (1.0×10^7 CFU/mL), 金黄色葡萄球菌 (1.0×10^7 CFU/mL) 及副溶血球菌 (1.0×10^7 CFU/mL), 并设置 PEDV 阳性对照和阴性对照, 根据 T 线荧光信号判断试纸条的特异性。

1.4.3 临床样品检测

分别采用荧光试纸条和 RT-PCR 对 50 份样品 (肠道组织或肛门拭子, 由生猪养殖公司和第三方检测公司提供) 中的 PEDV 进行检测, 计算阳性符合率、阴性符合率和总符合率。使用试纸条进行检测时, 取临床样品 1 g, 加入 1 mL 的样品稀释液, 震荡混匀后离心, 取 60 μL 上清液滴于样品垫位置, 待 10 min 时观察 C、T 线显色结果及测定荧光值。对于 RT-PCR, 取临床样品 1 g, 加入 3 mL PBS, 反复冻融 3 后, 提取核酸, 反转录后分别以 5'-AAGGCTC-CATCATCTTTACG-3' 和 5'-ACTCCGATACGAG-TCTAGCG-3' 为上下游引物, 对 PEDV 的 N 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

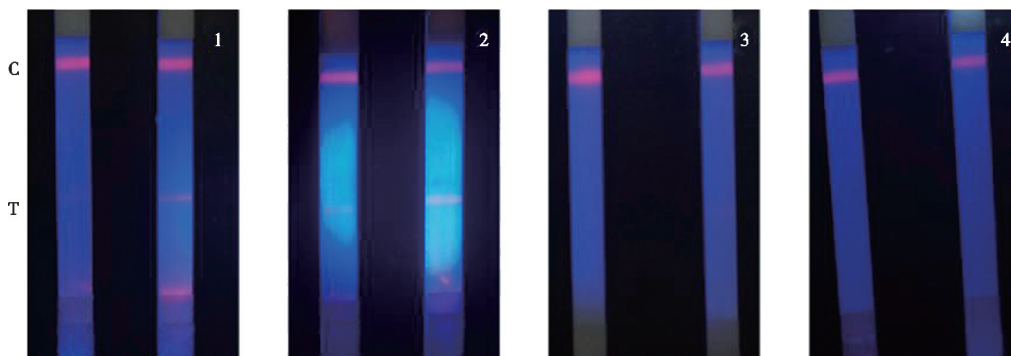
2 结果

2.1 量子点标记最佳复溶液体积的确定

将 25 μL 羧基化量子点体系标记的抗体分别用 150、300、600 和 900 μL 复溶液重悬后涂布于结合垫上制备试纸条, 检测 PEDV 阴性和阳性样品后根据试纸条显色程度确定最适复溶液体积。图 1 显示, 各试纸条的 C 线的荧光显色均清晰, 均无假阳性出现, 膜面干净。但从阳性样品检测结果发现, 用 600 μL 和 900 μL 体积的复溶液会导致 T 线不显色。用 150 μL 和 300 μL 复溶液重悬标记抗体制备的试纸条 T 线清楚, 但用 300 μL 体积复溶液的试纸条结合垫比用 150 μL 体积复溶液的释放更全, 可得出最佳复溶液体积为 300 μL 。

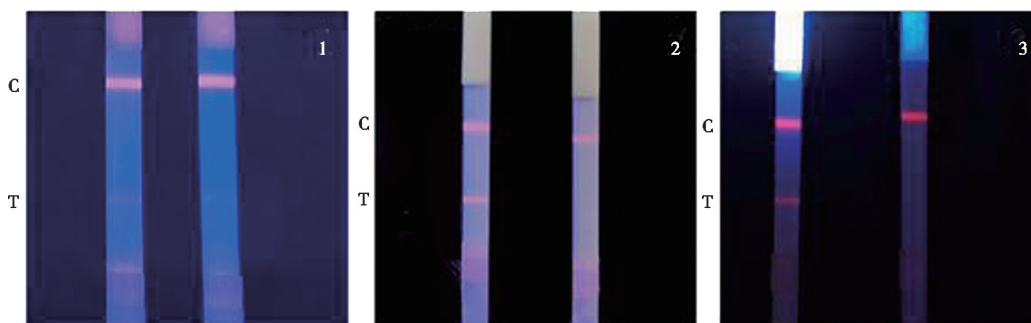
2.2 检测线和质控线抗体包被浓度的确定

采用不同浓度的鼠抗 PEDV 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG 多克隆抗体分别包被 T 线和 C 线, 并对阴性样品和阳性样品进行检测。由图 2 和图 3 可见, 当试纸条 T 线包被浓度为 0.5 mg/mL, C 线包被浓度为 0.3 mg/mL 时, 试纸条的显色清晰, 且所耗抗体量少。因此, 后续研究采用的 T 线包被浓度均为 0.5 mg/mL, C 线包被浓度均为 0.3 mg/mL。



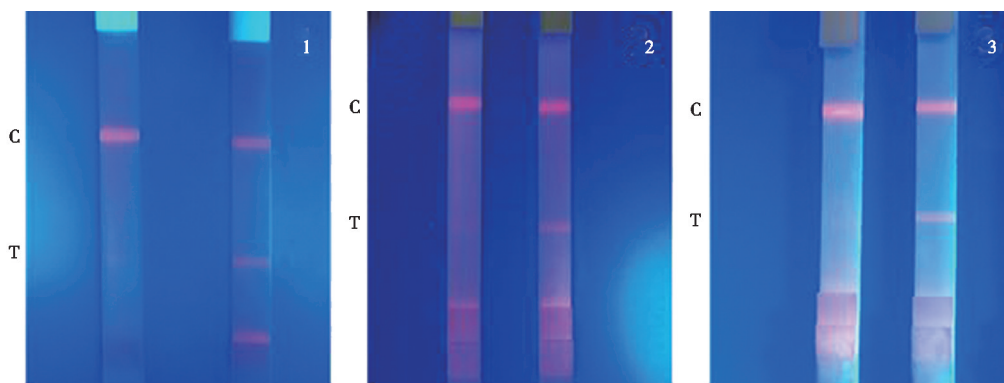
1~4. 复溶液体积分别为 150、300、600 和 900 μL 。

图 1 25 μL 量子点体系标记抗体最佳复溶液体积的确定



1. T 线包被浓度 0.3 mg/mL , C 线包被浓度 0.3 mg/mL ; 2. T 线包被浓度 0.5 mg/mL , C 线包被浓度 0.3 mg/mL ; 3. T 线包被浓度 1.0 mg/mL , C 线包被浓度 0.3 mg/mL 。

图 2 T 线包被浓度的确定



1. T 线包被浓度 0.5 mg/mL , C 线包被浓度 0.3 mg/mL ; 2. T 线包被浓度 0.5 mg/mL , C 线包被浓度 0.5 mg/mL ; 3. T 线包被浓度 0.5 mg/mL , C 线包被浓度 1.0 mg/mL 。

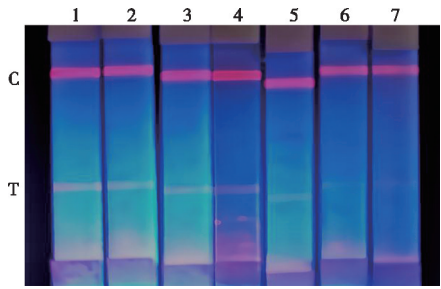
图 3 C 线包被浓度的确定

2.3 敏感性考察

将载毒量为 1.0×10^4 TCID₅₀/mL 的 PEDV 病毒液以 1 : 10、1 : 20、1 : 30、1 : 35、1 : 40 和 1 : 50 的

比例进行稀释后, 采用制备好的 PEDV 荧光试纸条对 PEDV 稀释液进行检测, 平行重复 5 次, 考察试纸条的灵敏度。根据图 4 试纸条显色程度, 可知当病毒以

1:10、1:20、1:30和1:35稀释时，T线均显色清晰；当病毒以1:40和1:50稀释时，T线显色不清晰，与阴性对照相似。采用荧光试纸条读值仪测定T线荧光值，结果如表1所示。对阴性样品重复检测的结果为294，故检测阈值确定为336。由表1可见，当病毒以1:50稀释时，T线荧光值为369，大于阈值。因此，所制备的荧光试纸条基于肉眼观察和荧光试纸条读值仪的检测限分别确定为 2.9×10^2 TCID₅₀/mL和 2.0×10^2 TCID₅₀/mL。



1~6. 病毒液稀释倍数为10、20、30、35、40、50；7. 阴性对照。

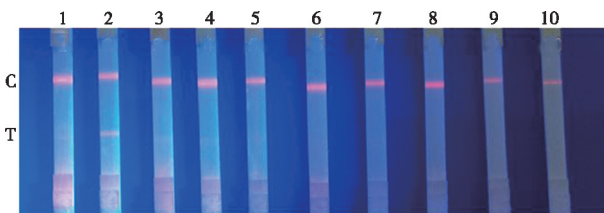
图4 试纸条灵敏度试验

表1 试纸条灵敏度试验荧光值

项目	稀释比						阴性对照
	1:10	1:20	1:30	1:35	1:40	1:50	
C线	18 532	17 871	18 601	16 658	14 880	13 372	24 105
T线	1244	952	740	616	405	369	294

2.4 特异性测定

使用所制备的荧光免疫层析试纸条对PoRV、PDCoV、PCV2、PRV、沙门菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及副溶血球菌进行检测，结果如图5所示。可见，只有检测PEDV阳性样品时，试纸条T线清晰可见；而检测其他病原时，结果如检测阴性样品一致，均无T线显示，说明试纸条特异性较好。



1~10. 分别为阴性样品、PEDV、PoRV、PDCoV、PCV2、PRV、沙门菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、副溶血球菌。

图5 试纸条特异性试验

2.5 临床样品检测

分别采用荧光试纸条和RT-PCR对50份临床样品进行检测，结果如表2所示。根据表2结果，计算得到的PEDV荧光免疫层析试纸条与RT-PCR的阳性符合率为76.2%，阴性符合率为89.7%，总符合率为90.0%，说明所制备的PEDV荧光试纸条具有较高的准确性。

表2 试纸条和RT-PCR临床样品检测

检测方法	结果	RT-PCR		总计
		阳性	阴性	
荧光试纸条	阳性	16	3	19
	阴性	5	26	31
	总计	21	29	50

3 讨论

PED主要经粪-口传播，随粪便排出的病毒可形成气溶胶颗粒随空气进行远距离传播感染其他仔猪，最远传播距离可达10英里^[17-18]。PEDV感染后，猪可出现腹泻、呕吐、厌食、脱水和体重减轻等临床症状，哺乳仔猪大量死亡，给养猪业造成了巨大的经济损失^[19-20]。研究发现，PEDV感染早期的治愈率远高于后期，所以PEDV感染的早期诊断对PED的防控尤其重要^[21]。

量子点又称半导体纳米晶体，是一种稳定的纳米晶粒，具有发光率高、寿命长、光稳定性好等优势^[22]。近年来，量子点制备和表面修饰技术得到了快速发展，量子点作为荧光探针在生物医学、食品安全等领域中应用越来越广泛^[22-23]。PEDV荧光免疫层析将免疫荧光和免疫层析技术相结合，在保留胶体金免疫层析技术操作简单、不依赖专业实验室和设备、快速方便的优势的前提下，通过包含有大量量子点粒子的羧基化量子点微球作为标记材料，可有效提高试纸条的灵敏度和稳定性，实现生猪养殖场PEDV的现场快速准确检测。

量子点标记抗体时，使用不同体积的复溶液会导致单位体积内的量子点量标记抗体量的变化，进而使每根试纸条上所包含的量子点微球标记抗体的含量不同。量子点和标记抗体量较少时，会影响T、C线的显色程度，易产生假阴性；量子点和标记抗体量较多时，会影响量子点的扩散，导致较多的量子点留在结合垫或使膜面不清晰，造成量子点和抗体的浪费，甚至出现假阳性。因此，对复溶液的用量进行优化能使试纸条检测在耗费最少的情况下获得最优结果。本研

究发现, 在 25 μL 量子点微球标记体系下, 600 μL 以上的复溶液会导致 T 线不显色, 而 150 μL 以下的复溶液会造成释放不充分, 300 μL 复溶液重悬标记抗体制备的试纸条 T 线清楚, 释放完全, 膜面干净。

本研究制备的 PEDV 量子点荧光免疫层析试纸条, 基于肉眼观察和荧光试纸条读值仪的检测限分别为 2.9×10^2 TCID₅₀/mL 和 2.0×10^2 TCID₅₀/mL。边红芬等^[24]基于细胞表面荧光免疫吸附法制备单克隆抗体, 研制出一种用于 PEDV 现场检测的新型免疫层析方法, 最低检测限为 7.8×10^3 TCID₅₀/mL。王华俊等^[25]建立了一种快速、定量检测 PEDV 的时间分辨荧光免疫层析检测方法, 对 PEDV 的最低检测限为 3 896 997 TCID₅₀/mL。Lyoo 等^[26]开发了一种用于 PEDV 检测的胶体金免疫层析试纸条, 检测限为 1.0×10^4 TCID₅₀/mL。因此, 本研究制备的免疫层析试纸条具有更高的灵敏度, 有望用于 PEDV 的现场快速检测。

参考文献:

- [1] 吴中彬. 规模化猪场流行性腹泻综合性防控措施的探讨 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [2] SONG D, PARK B. Porcine epidemic diarrhoea virus; a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines [J]. *Virus genes*, 2012, 44 (2): 167-175.
- [3] 张梅. 猪流行性腹泻流行特点及防治措施 [J]. *中国畜禽种业*, 2021, 17 (8): 130-131.
- [4] 杜坚, 蒋玉雯, 白安斌, 等. 广西猪流行性腹泻流行病学调查 [J]. *动物科学与动物医学*, 2004 (6): 52-53.
- [5] 杨春杰, 秦毅斌, 陈樱等. 广西猪流行性腹泻病毒感染病例的确诊与病毒 S 基因变异分析 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53 (8): 86-93.
- [6] 赵武, 秦毅斌, 何颖, 等. 近年广西猪流行性腹泻的流行特点与防控存在问题分析 [J]. *广西畜牧兽医*, 2019, 35 (1): 24-27.
- [7] 杨微微. 猪流行性腹泻病毒检测方法研究进展 [J]. *今日畜牧兽医*, 2019, 35 (11): 28.
- [8] 陈秋慧, 李政志, 张海艳, 等. 环介导等温扩增技术改进及在动物病原检测中的应用 [J]. *中国兽医科学*, 2022, 52 (5): 633-639.
- [9] 谷长维, 胡博, 刘微. 应用高通量成像技术检测猪流行性腹泻病毒中和抗体 [J]. *国外畜牧学 (猪与禽)*, 2022, 42 (6): 102-106.
- [10] LI C H, LIANG J L, YANG D, et al. Visual and rapid detection of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method [J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12 (19): 2712.
- [11] 蔡杰, 潘浩波, 蒋永青, 等. 猪流行性腹泻病毒荧光免疫层析试纸条的研制与性能评价 [J]. *今日养猪业*, 2022, 131 (5): 33-38.
- [12] 肖璐, 谢晶, 曹冶, 等. 胶体金免疫层析技术在猪病毒病诊断中的应用与研究进展 [J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53 (1): 136-140.
- [13] BRUNT J, WEBB M D, PECK M W. 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.
- [14] SINGH J, SHARMA S, NARA S. Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water [J]. *Food Chem*, 2015, 170: 470-483.
- [15] 黄德滨, 黄亚兰, 王森, 等. 荧光定量免疫层析技术在诊断上的应用 [J]. *热带医学杂志*, 2018, 18 (10): 1390-1393.
- [16] 李慧杰. 新型冠状病毒抗体荧光免疫层析检测方法的建立 [D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- [17] 陈立刚. 猪流行性腹泻病的流行特征及疫苗研究进展 [J]. *中国猪业*, 2022, 17 (5): 83-86.
- [18] LI Y C, WU Q X, HUANG L L, et al. An alternative pathway of enteric PEDV dissemination from nasal cavity to intestinal mucosa in swine. [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 3811.
- [19] HAVE P, MOVING V, SVANSSON V, et al. Coronavirus infection in mink (*Mustela vison*). Serological evidence of infection with a coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus [J]. *Vet Microbiol*, 1992, 31 (1): 1-10.
- [20] 左媛媛, 徐天刚, 戈胜强, 等. 我国猪流行性腹泻病毒流行现状及分子遗传演化特征 [J]. *中国动物检疫*, 2022, 39 (9): 9-17.
- [21] 蔡杰, 潘浩波, 蒋永青, 等. 猪流行性腹泻病毒荧光免疫层析试纸条的研制与性能评价 [J]. *今日养猪业*, 2022, 131 (5): 33-38.
- [22] 蔡甜, 贾岩, 牛英波, 等. 一种基于量子点标记检测抗肺炎支原体 IgM 的免疫荧光层析法 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29 (24): 3742-3747.
- [23] 苏丹, 吴天琪, 杨雨, 等. 量子点标记免疫分析技术在食品安全检测中的应用现状 [J]. *食品研究与开发*, 2022, 43 (10): 210-216.
- [24] BIAN H F, XU F, JIA Y M, et al. A new immunochromatographic assay for on-site detection of porcine epidemic diarrhoea virus based on monoclonal antibodies prepared by using cell surface fluorescence immunosorbent assay [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15 (1): 32.
- [25] 王华俊, 赵雪丽, 闫若潜, 等. 猪流行性腹泻病毒时间分辨荧光免疫层析检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43 (1): 40-44.
- [26] LYOO K S, YEOM M, KIM J, et al. Development of rapid immunochromatographic strip test for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus [J]. *The Veterinary Record*, 2017, 181 (22): 596.