

一种快速检测弗氏柠檬酸杆菌免疫层析试纸条的研制

孙智同¹, 章礼平^{1,2}, 李登峰^{1,3*}

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315832; 2. 宁波海洋研究院, 浙江 宁波 315832;
3. 宁波大学 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江 宁波 315832)

摘要: 为了制备弗氏柠檬酸杆菌快速检测试纸条, 联合卵黄抗体技术和胶体金免疫层析技术, 采用弗氏柠檬酸杆菌抗原免疫母鸡, 制备抗弗氏柠檬酸杆菌卵黄抗体(IgY); 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 用以标记 IgY; 在结合垫上包被用胶体金标记的 IgY, 硝酸纤维素膜上包被弗氏柠檬酸杆菌抗原和羊抗鸡 IgY 作为检测线和质控线; 将样品垫、金标结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组装成试纸条, 测试其灵敏度、特异性、稳定性, 并与 ELISA 结果进行比较. 结果表明: 该试纸条检测线为 10^5 cfu·mL⁻¹; 试纸条与恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌、迟钝爱德华菌、哈维氏弧菌和溶藻弧菌均无交叉反应; 该试纸条在 4℃ 保存 4 个月后依然十分稳定; 具有易操作, 特异性、灵敏度高, 不需要专业的操作人员和特殊的仪器设备, 5~10 min 即可获得结果等优势, 适合弗氏柠檬酸杆菌的现场检测.

关键词: 弗氏柠檬酸杆菌; 卵黄抗体; 胶体金; 免疫层析试纸; 检测

中图分类号: Q93-331

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2019) 03-0015-06

弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)是一种革兰氏阴性短杆菌, 需氧或兼性厌氧, 是柠檬酸杆菌属的代表种^[1]. 该菌为条件致病菌^[2], 是“人-兽-鱼”共患病病原, 可引起腹泻、尿路感染、胰腺炎、腹膜炎、脑膜炎、关节炎等, 是院内感染的主要原因^[3-5], 死亡率与发病率较高^[6-14]. *C. freundii* 可以存在于食物中, 导致食物中毒的发生^[15]. 因此, 建立一种快速、简便的 *C. freundii* 检测方法至关重要.

胶体金免疫层析技术是一种以胶体金为示踪物的快速免疫分析技术, 具有简便快速, 无需专门仪器和人员, 仅凭肉眼判断即可获得结果等优势, 能满足现场检测的要求.

卵黄抗体技术是近 20 年发展的一种生物技术. 卵黄抗体(Immunoglobulin of Yolk, IgY)是针对特定抗原的抗体. 禽类(如鸡)和部分爬行类、两栖类的机体受到外来抗原刺激后, 分泌大量特异性抗体进入血液循环, 当血液流经卵巢时, 抗体(主要是 IgG)转移、富集到卵黄中, 形成 IgY^[16]. IgY 是一种

具有持续效价的高亲和力抗体. 本文采用卵黄抗体技术和胶体金免疫层析技术, 研发了一种快速检测弗氏柠檬酸杆菌的免疫层析试纸条.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂和仪器

弗氏完全佐剂、不完全佐剂购自北京索莱宝科技有限公司; 羊抗鸡-HRP IgY 购自博奥生物有限公司; 氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、羊抗鸡 IgY(二抗)购自美国 Sigma 公司; 苯甲基磺酰氟(Phenylmethylsulfonyl Fluoride, PMSF)、柠檬酸三钠、牛血清白蛋白(BSA)以及海藻糖均购自北京全式金生物有限公司; 其他化学试剂均为分析纯. 硝酸纤维素膜购自美国 Millipore 公司; 样品垫(玻璃纤维素膜 RB45)、结合垫(玻璃纤维素膜 SR62)、PVC 底板(PVC 胶板 SM31-25)、吸水垫(吸水纸 CH27)均购自上海金标生物科技有限公司. 超纯水由 Milli-Q

收稿日期: 2018-07-10.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家海洋局开放基金(HY201602); 宁波大学王宽诚幸福基金.

第一作者: 孙智同(1993—), 男, 浙江宁波人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物病害防治. E-mail: 1611075773@nbu.edu.cn

*通信作者: 李登峰(1976—), 女, 湖南双峰人, 副教授, 主要研究方向: 水产动物病害防治. E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn

超纯水系统制备(18.25 Ω)。所有玻璃和塑料器皿均用 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸浸泡 2 h, 再用 $7.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸浸泡 1 h, 之后用超纯水洗净, 烘干备用。

1.1.2 实验菌株和培养基

弗氏柠檬酸杆菌由李登峰课题组分离自患病的中华鳖, -80°C 甘油保存。

LB 液体培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 15 g, NaCl 5 g, 定容至 1 L, 调 pH 至 7.2, 高压灭菌。普通营养琼脂培养基: 含 2% 琼脂的 LB。

1.1.3 实验动物

母鸡: 白来航种母鸡, 15 周龄, 无特定病原体动物(Specific Pathogen Free, SPF), 采用单笼饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 弗氏柠檬酸杆菌抗原的制备

挑取 *C. freundii* 单菌落于 5 mL LB 液体培养基中, 28°C $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 12~18 h。取菌液 1:100 (V/V) 稀释到 LB 中, 30°C $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养至 OD_{600} 值达 0.4~0.6, 离心($5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 4°C), 弃上清。沉淀用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲盐溶液(Phosphate Buffer Saline, PBS)重悬, 再次离心, 如此洗涤 3 次, 最终得到的沉淀用 PBS 悬浮后, 添加甲醛至质量分数为 0.5%, 于 37°C 恒温水浴 24 h, 即得到灭活的 *C. freundii* 抗原。

1.2.2 卵黄抗体的制备和纯化

取抗原与佐剂乳化后对母鸡进行多点肌注免疫, 每只鸡剂量为 4×10^9 cfu, 初免用弗氏完全佐剂, 其后使用弗氏不完全佐剂。初免后第 15 天进行第 2 次免疫, 之后以 1 周为间隔进行 3 次加强免疫。完成免疫后第 10 天, 开始收集鸡蛋, 于 4°C 冰箱保存。收集未免疫母鸡的鸡蛋作为阴性对照。

参考文献[17], 联用弱酸稀释和硫酸铵沉淀法纯化 IgY: 取卵黄, 用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸-乙酸钠缓冲液($\text{pH}=5.0$)1:9(V/V)稀释、混匀后 4°C 过夜, $8300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min; 取上清加入饱和硫酸铵至饱和度为 40%, 4°C 搅拌 6 h 后, $9000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min; 取沉淀用双蒸水重悬至原体积, 加入饱和硫酸钠至饱和度为 40%, 4°C 搅拌过夜, $9000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min; 沉淀在 PBS 中充分透析后, 即得抗 *C. freundii* 卵黄抗体。IgY 的纯度经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)检测, 浓度用超微量核酸蛋白测定仪 Nanodrop

2000c (Thermo, USA)测定, 效价用 ELISA 法测定。

1.2.3 胶体金纳米颗粒的制备

用柠檬酸三钠还原法制备胶体金纳米颗粒^[18]。称取 1 g 氯金酸晶体, 用新制超纯水 100 mL 配制成 0.01% 的氯金酸溶液。煮沸快速加入 1% 的柠檬酸三钠溶液 1.2 mL, 快速搅拌, 溶液颜色稳定呈酒红色后继续煮沸 10 min, 冷却至室温, 补足失水至原体积, 4°C 避光保存备用。用透射电镜(Hitachi-7650, Japan)观测胶体金颗粒的形态; 用分光光度计于 400~700 nm 波长扫描胶体金溶液, 确定其最大吸收峰。

1.2.4 胶体金-IgY 复合物的制备

参考文献[19-20], 用滴定法确定胶体金标记抗弗氏柠檬酸杆菌 IgY 的最佳 pH 值及最小标记浓度。具体为: 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 K_2CO_3 调节胶体金溶液的 pH 值至 4.0、4.5、4.8、5.1、5.4、5.7、6.0、6.5 和 7.0。各取 1 mL, 分别加入 IgY 100 μL ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 振荡混匀后, 室温静置 15 min。每管加入 20 μL 的 10% NaCl 混匀, 室温静置 15 min。以胶体金溶液颜色稳定不变时的 pH 为最佳 pH 值。调节胶体金溶液 pH 至最佳值, 各取 1 mL 至一系列干净的 EP 管中, 分别加入 0、0.5、1、2、4、6、8、10、12、14 μg 的 IgY, 混匀后静置 5 min, 每管加入 50 μL 10% NaCl, 混匀后室温静置 2 h, 以胶体金颜色稳定不变的 IgY 量为最小标记蛋白量。在最小标记量基础上增加 20%~30% 作为最佳标记蛋白量。

取 100 mL 胶体金溶液, 调节至最适 pH, 加入最佳标记量的抗弗氏柠檬酸杆菌 IgY, 磁力搅拌 30 min 使其充分结合, 室温静置 15 min 后, 逐滴加入 10% BSA 至终浓度为 1% 进行封闭; 室温搅拌 30 min, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 去除未结合的金颗粒; 取上清 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 h, 去除未结合的卵黄抗体。将可流动的暗红色沉淀转移到新的离心管中, 用含 1% BSA 的 PBS 缓冲液重悬洗涤 2 次, 最终得到的沉淀用含 1% BSA、2.5% 蔗糖、1% 海藻糖、1% 吐温-20 的 PBS 重悬至原体积的 1/10, 加入 0.02% 的叠氮化钠作为防腐剂, 4°C 避光保存。用透射电镜及分光光度计检测胶体金结合状况。

1.2.5 样品垫与结合垫的前处理

将样品垫用含 1% BSA、1% 海藻糖、2.5% 蔗糖的 PBS 缓冲液浸泡 30 min; 结合垫用含 1% BSA、1% 海藻糖、2.5% 蔗糖、1% 吐温-20、0.02% 叠氮化

钠的 PBS 浸泡 30 min. 37 °C 干燥后 4 °C 密封保存.

1.2.6 检测线和质控线最佳包被量的确定

取 *C. freundii* 菌液, 超声波破碎后, 1 000 r·min⁻¹ 离心 2 min. 取上清, 用含 1 mmol·L⁻¹ PMSF、5% 海藻糖的 PBS 缓冲液进行梯度稀释至 5.0、4.5、4.0、3.5、3.0、2.5、2.0、1.0 mg·mL⁻¹. 羊抗鸡 IgY 二抗用 PBS 梯度稀释至 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 mg·mL⁻¹. 选择条带颜色适中, 且两条带颜色密度相似的浓度为最佳包被浓度.

1.2.7 免疫层析试纸条的组装

将标记好的胶体金-IgY 复合物以 40 μL·cm⁻² 均匀喷洒在结合垫上, 冷冻干燥 2 h, 即得金标结合垫. 用三维平面划膜喷金仪 HM3035(上海金标生物科技有限公司, 中国) 将 *C. freundii* 抗原和羊抗鸡 IgY 包被于硝酸纤维膜上形成检测线(T)和质控线(C), 二者间距 5 mm, 37 °C 干燥 30 min. 将样品垫、金标结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫依次粘贴在 PVC 底板上, 各毗邻部分重叠搭接 2 mm. 将组装好的层析试纸条用数控裁条机 CT300(上海金标生物科技有限公司, 中国)切成宽度为 4 mm 的纸条, 装入含干燥剂的锡箔袋中, 密封保存.

1.2.8 试纸条的灵敏度测试

用 PBS 缓冲液将 *C. freundii* 稀释成 10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸ cfu·mL⁻¹, 各取 100 μL 滴加于试纸条的样品垫上, 静置 5 min 后观察结果. 每个浓度重复 5 次. 用 PBS 为空白对照, 以检测线消失的最低浓度为其最低检测极限.

1.2.9 试纸条的特异性测试

为了评估试纸条的特异性, 将几种常见水产动物病原包括恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*), 铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*), 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*), 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) 和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) 分别稀释至 10⁷ cfu·mL⁻¹, 用试纸条进行检测, 以 *C. freundii* 为阳性对照, 根据实验结果判定试纸条的特异性.

1.2.10 试纸条的稳定性实验

将同一批次的试纸条置于干燥器中 4 °C 保存, 第 1 个月每隔 1 周检测活性 1 次, 以后每个月检查 1 次, 考查其稳定性.

1.2.11 试纸条和 ELISA 比较

为评估试纸条的实用性, 从宁波当地采集 41

份样品, 其中水样直接检测, 鱼、虾、蟹则解剖后取内脏(肠、鳃、肝脏). 各称取 3 g 组织样品, 加入 5 mL PBS 匀浆, 3 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集上清液, 分别用试纸条和 ELISA 进行检测.

2 结果

2.1 卵黄抗体的效价

ELISA 检测所制备的抗弗氏柠檬酸杆菌 IgY 的效价为 128 000.

2.2 试纸条条件优化

胶体金标记 IgY 的最佳 pH 为 5.4. 最佳标记抗体质量浓度为 5 μg·mL⁻¹. *C. freundii* 抗原和羊抗鸡 IgY 的最佳包被的质量浓度分别为 3 mg·mL⁻¹ 和 0.4 mg·mL⁻¹, 包被量均为 2 μL·cm⁻².

2.3 胶体金和金标抗体的质量鉴定

制备的胶体金呈酒红色, 溶液澄清透明, 无漂浮物. 电镜下胶体金颗粒分散较均匀, 形状较规则, 大多呈圆形, 平均直径为 25 nm. 经分光光度计在可见光范围内扫描, 发现胶体金溶液仅在 524 nm 处有最大峰, 为胶体金的特征吸收峰, 表明所制备的胶体金质量优良. 电镜观察发现, 在抗体标记的胶体金颗粒外层有一白色晕圈(图 1). 扫描发现, 抗体标记的胶体金扫描图最大吸收峰为 529 nm, 相比于裸胶体金颗粒有红移过程(图 2). 这些结果说明胶体金与卵黄抗体结合成功.

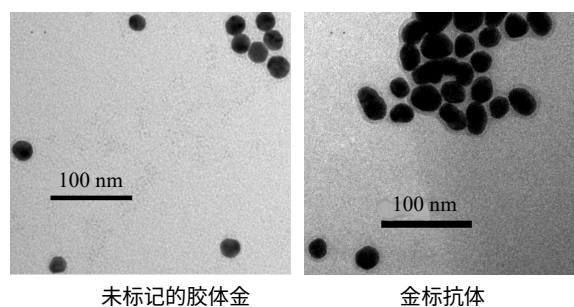


图 1 金标抗体的透射电镜照片

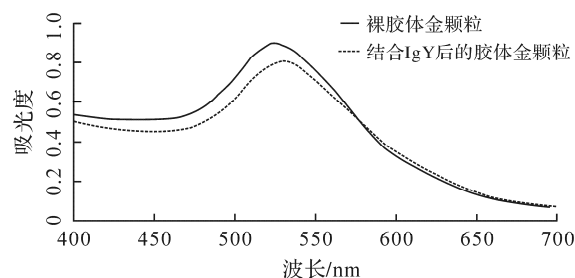
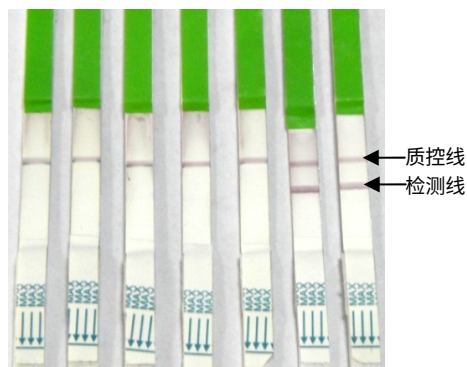


图 2 胶体金溶液和金标抗体的分光光度计扫描图

2.4 免疫层析试纸条的灵敏度

当 *C. freundii* 浓度低于 10^5 cfu·mL⁻¹ 时, 试纸条上同时出现检测线和质控线 2 条有色条带, 呈阴性结果; 而当菌浓度不小于 10^5 cfu·mL⁻¹ 时, 检测线消失, 仅留下 1 条质控线, 呈阳性结果(图 3)。因此该试纸条的可视检测极限为 10^5 cfu·mL⁻¹。

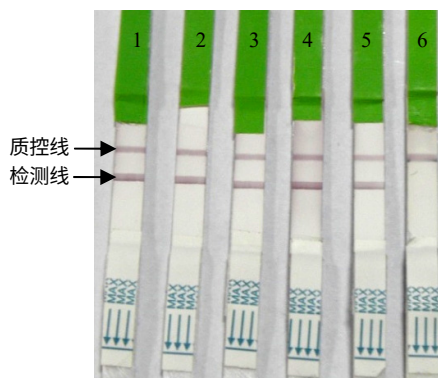


从右至左依次为空白对照、弗氏柠檬酸杆菌 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 cfu·mL⁻¹。

图 3 试纸条灵敏度的实验结果

2.5 免疫层析试纸条的特异性

用试纸条检测弗氏柠檬酸杆菌、恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌、迟钝爱德华菌、哈维氏弧菌和溶藻弧菌(图 4)。从图 4 可知, 在检测 *C. freundii* 时, 只出现 1 条质控线, 呈阳性结果; 而检测其余菌体时, 试纸条的检测线和质控线均出现有色条带, 呈阴性结果, 说明该试纸条在检测其他相关细菌时没有出现交叉反应, 试纸条具有高特异性。



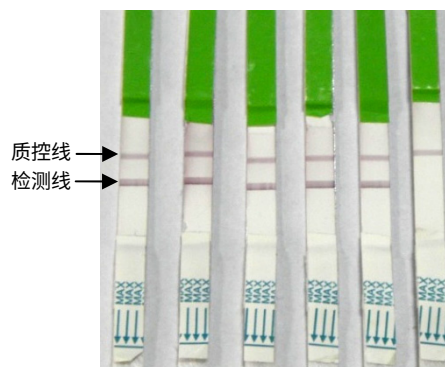
1 为恶臭假单胞菌; 2 为铜绿假单胞菌; 3 为迟钝爱德华菌; 4 为哈维氏弧菌; 5 为溶藻弧菌; 6 为弗氏柠檬酸杆菌。

图 4 试纸条特异性的实验结果

2.6 免疫层析试纸条的稳定性

试纸条在 4℃ 存储 4 个月, 其质控线颜色强度几乎没有改变; 保存 6 个月后, 用 PBS 为检测对

象时, 其检测线消失(图 5), 质控线减弱, 显示失效。即该试纸条 4℃ 保存, 有效期为 4 个月。



从左至右保存期为 1 星期、1 月、2 月、3 月、4 月和 6 月。

图 5 试纸条稳定性的实验结果

2.7 试纸条与 ELISA 的比较实验

用胶体金试纸条与 ELISA 法检测实际样品的结果见表 1。从表 1 可知, 用试纸条检测时, 41 份样品中除 1 份草鱼和 1 份鲫鱼样品结果呈阳性, 其余各样均为阴性; 所有样品 ELISA 检测结果均为阴性, 两者具有较高的一致性(95%)。从时间上比, 试纸条检测 5~10 min 即可获得结果, ELISA 至少需要 2 h。试纸条检测过程不需要专业仪器, 操作简便, 而 ELISA 需要酶标仪, 且操作繁琐。

表 1 胶体金试纸条与 ELISA 法的检测结果比较

检测样品	数量/份	试纸条 阳性/阴性	ELISA 阳性/阴性
虾	6	0/6	0/6
鲫鱼	6	1/5	0/6
草鱼	6	1/5	0/6
梭子蟹	8	0/8	0/8
中华绒螯蟹	8	0/8	0/8
池塘水样	7	0/7	0/7

3 讨论

C. freundii 威胁人畜健康和养殖产业的健康发展^[3-15]。2017 年至今已发生了 *C. freundii* 致婴儿快速死亡^[13], 致成年绵羊脑炎、死亡^[14], 致加州鲈鱼 (*Micropterus salmoides*)、棘胸蛙 (*Quasipaa spinosa*) 大量感染、死亡^[12] 的事件。目前, 对于细菌的检测方法多为微生物培养法和 PCR、ELISA 法, 这些方法均不适合现场检测。培养法操作复杂, 环境要求严格, 并且耗时长。PCR 和 ELISA 法虽然较为快速,

但是也至少需要 2~3 h, 而且需要专门的仪器以及专业人员操作. 因此, 研发一种快速简便的诊断 *C. freundii* 方法迫在眉睫. 本研究用金纳米颗粒标记特异性的卵黄抗体作为金标探针, 研制了一种快速检测 *C. freundii* 的免疫层析试纸条. 该试纸条易于操作, 不需要专业的操作人员和特殊的仪器设备, 5~10 min 即可用肉眼获得结果, 非常适合现场的检测.

在疾病的检测、诊断方面, IgY 因免疫学特性独特, 而被认为是一种较哺乳动物抗体 IgG 更加准确有效的免疫检测诊断工具^[21]. IgY 动物种系发生学距离远, 其特异性和针对性较哺乳动物抗体 IgG 更强, 可以减少交叉反应和干扰, 因此可以减少假阳性结果; IgY 不与类风湿因子、Fc 受体和蛋白 A 和 G 结合; 不激活人类补体系统; IgY 能识别更多的位点, 导致信号扩大^[21]. 此外, IgY 是一个疏水性更强的分子, 其与胶体金结合较哺乳动物 IgG 更加稳定^[22].

本研究基于 IgY 制备的胶体金免疫层析试纸条具有良好的灵敏性和特异性, 其最低检测极限为 10^5 cfu·mL⁻¹, 与其他多种水产细菌病原均无交叉反应, 试纸条在 4℃ 保存 4 个月后依然十分稳定. 在检测速度及便携性方面, 胶体金试纸条明显优于 ELISA, 非常适合现场检测. 利用试纸条可快速诊断出 *C. freundii* 感染, 即可对症下药, 及时防治, 防止疫情扩大, 减少损失; 也可以作为在苗种引进时的一种初步筛选工具. 同时, 由于 *C. freundii* 是一种“人-畜-鱼”共患病病原菌, 这种 *C. freundii* 检测试纸条也可以广泛应用于各大医院急诊诊断.

参考文献:

- [1] Guerrant R L, Dickens M D, Wenzel R P, et al. Toxigenic bacterial diarrhea: Nursery outbreak involving multiple bacterial strains[J]. Journal of Pediatrics, 1976, 89:885-891.
- [2] Badger J L, Stins M F, Kim K S. *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(8): 4208-4215.
- [3] Gupta N, Yadav A, Choudhary U, et al. *Citrobacter* bacteremia in a tertiary care hospital[J]. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2003, 35:765-768.
- [4] Bai L, Xia S L, Lan R T, et al. Isolation and characterization of cytotoxic, aggregative *Citrobacter freundii*[EB/OL]. [2018-05-10]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033054>.
- [5] Dervisoglu E, Yumuk Z I. *Citrobacter freundii* peritonitis and tunnel infection in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis[J]. Journal of Medical Microbiology, 2008, 57(1):125-127.
- [6] Tschape H, Prager R, Streckel W, et al. Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: Green butter as the infection source[J]. Epidemiology Infection, 1995, 114:441-450.
- [7] Warner R D, Carr R W, McCleskey F K, et al. A large nontypical outbreak of Norwalk virus. Gastroenteritis associated with exposing celery to nonpotable water and with *Citrobacter freundii*[J]. Archives of Internal Medicine, 1991, 151:2419-2424.
- [8] Parida S N, Verma I C, Deb M, et al. An outbreak of diarrhea due to *Citrobacter freundii* in a neonatal special care nursery[J]. Indian Journal of Pediatrics, 1980, 47: 81-84.
- [9] Nada T, Baba H, Kawamura K, et al. A small outbreak of third generation cephem-resistant *Citrobacter freundii* infection on a surgical ward[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2004, 57(4):181-182.
- [10] Galarneau J R, Fortin M, Lapointe J M, et al. *Citrobacter freundii* septicemia in two dogs[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2003, 15(3):297-299.
- [11] Joaquin A, Khan S, Russel N, et al. Neonatal meningitis and bilateral cerebellar abscesses due to *Citrobacter freundii*[J]. Pediatric Neurosurgery, 1991, 17:23-24.
- [12] 郑善坚. 弗氏柠檬酸杆菌引起鱼、蛙溃烂病的防治案例[J]. 科学养鱼, 2017(2):68-69.
- [13] Bae J Y, Kang C K, Choi S J, et al. Sudden deaths of neonates receiving intravenous infusion of lipid emulsion contaminated with *Citrobacter freundii*[EB/OL]. [2018-05-10]. <https://doi.org/10.3346/jkms.2018.33.e97>.
- [14] Liu H, Zhao Z, Xue Y, et al. Fatal cases of *Citrobacter freundii* septicemia and encephalitis in sheep[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2018, 30(2): 245-248.
- [15] 闫革彬, 隋吉林, 芦丹, 等. 一起弗氏柠檬酸杆菌所致食源性疾病调查[J]. 疾病检测, 2013, 28(3):247-248.
- [16] 王金洛, 徐福州. 卵黄抗体研究进展[J]. 农业新技术, 2003(6):36-38.
- [17] 周永强, 李登峰, 刘联合国, 等. 抗鳟利斯顿氏菌鸡卵黄抗体制备及其活性研究[J]. 宁波大学学报(理工版),

- 2012, 25(4):1-5.
- [18] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. Nature Physical Science, 1973, 241:20-22.
- [19] Zhang L P, Li D F, Liu L G, et al. A rapid immunochromatographic test strip for detecting swimming crab (*Portunus trituberculatus*) reovirus[J]. Disease of Aquatic Organism, 2015, 117:21-29.
- [20] Zhang L P, Li D F, Liu L G, et al. Development of colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 221:39-45.
- [21] Schade R, Calzado E G, Sarmiento R, et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine[J]. Atla-alternatives to Laboratory Animals, 2005, 33:129-154.
- [22] Davalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa J L, Bastos-Gonzalez D, et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles[J]. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2000, 11(6):657-673.

Development of a colloidal gold immunochromatographic test strip for detection of *Citrobacter freundii*

SUN Zhi-tong¹, ZHANG Li-ping^{1,2}, LI Deng-feng^{1,3*}

(1.Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2.Ningbo Institute of Oceanography, Ningbo 315832, China; 3.Collaborative Innovation Center of Zhejiang Marine

High-efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: The current study was aimed to establish a rapid test strip for *Citrobacter freundii* by using egg yolk antibody and colloidal gold immunochromatography assay. Hens were immunized with *C. freundii* antigen. Antibody against *C. freundii* was purified from the yolks. The colloidal gold particles combining with yolk antibodies (IgY) were prepared by citric acid three sodium reduction method. The labeled colloidal gold-IgY complex was wrapped on the binding pad, and the nitric acid fiber membrane was coated with *C. freundii* antigen and Sheep anti-chicken IgY as the test line and the control line respectively. The sample pad, gold conjugate pad, nitrocellulose membrane and absorbent pad were assembled into test strips and sealed with desiccant. The sensitivity, specificity and stability of the test strip were tested, and test results were compared with those from ELISA. The detection results can be obtained within 5-10 min. The sensitivity of the test strip was 10^5 cfu·mL⁻¹, and there was no cross reaction with *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio harveyi* and *V. alginolyticus*. The strip was stable and efficient after being stored at 4 °C for 4 months. As detection with the strip is easy to operate and does not require professional operator and special instrument, it is very suitable for the on-site detection of *C. freundii*.

Key words: *Citrobacter freundii*; IgY; colloidal gold; immunochromatographic strip; detection

(责任编辑 史小丽)