

流行性出血病多克隆抗体 C-ELISA 检测方法的建立

朱建波, 杨振兴, 肖雷, 高林, 苗海生, 何于雯, 孟锦昕, 杨恒, 李华春*

(云南省畜牧兽医科学院, 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 昆明 650224)

摘要: 为能简便、快速地进行流行性出血病病毒(epizootic haemorrhagic disease virus, EHDV)抗体监测, 采用纯化的 6 型 EHDV 抗原包被 ELISA 板, 以豚鼠抗 EHDV-2 型多克隆抗体作为竞争抗体, 建立了检测 EHDV 群特异性抗体的竞争 ELISA(C-ELISA)方法。结果显示: 抗原最佳包被浓度为 $5.12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (1:10 000), 竞争抗体最佳稀释倍数为 1:10 000; 通过对各 270 份阴性和阳性的牛、羊血清检测, 确定该检测方法临界值为 50%; 特异性试验表明该 ELISA 方法仅能检测出不同血清型 EHDV 抗体, 具有较好的群特异性; 对已知抗体效价的阳性血清检测表明, 建立的 C-ELISA 方法敏感性好于血清中和试验(SNT)和琼脂扩散试验(AGID); 分别用 C-ELISA、SNT、RT-PCR 和病毒分离试验对监控动物采集的血清和抗凝血样品进行检测, ELISA 结果与其他 3 种方法检测结果对应一致。结果表明本研究建立的 C-ELISA 为 EHDV 抗体的检测提供了一种快速、敏感、稳定的方法。

关键词: 流行性出血病病毒; 多克隆抗体; 竞争 ELISA

中图分类号: S854.43

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)07-1440-11

Establishment of a Rapid Competitive ELISA for Detecting Antibodies against Epizootic Haemorrhagic Disease Virus

ZHU Jian-bo, YANG Zhen-xing, XIAO Lei, GAO Lin, MIAO Hai-sheng,

HE Yu-wen, MENG Jin-xin, YANG Heng, LI Hua-chun*

(Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Disease Laboratory,

Yunnan Veterinary and Animal Science Institute, Kunming 650224, China)

Abstract: The objective of this research was to establish a simple and fast operation method for detecting epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV) antibodies. In this research, a competitive ELISA (C-ELISA) method was developed, by using purified EHDV-6 coated ELISA plates and guinea pig anti-EHDV-2 antibody as a competitive antibody. The assay had a high specificity and reproducibility, with optimal dilution of the multi-clone antibody at 1:10 000 and virus antigen at $5.12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (1:10 000). The critical value of the detection method was 50%, through the serum testing of cows and sheep, including negative and positive 270 copies each. Specific tests showed that the ELISA method can only detect different serotypes of EHDV antibodies, with better group specificity. Positive serum tests on known antibody titers showed that the established C-ELISA method was more sensitive than the serum neutralization test (SNT) and Agar gel immunodiffusion test (AGID). While the serum and anticoagulant samples collected from monitoring animals were detected by C-ELISA, SNT, RT-PCR and virus isolation respec-

收稿日期: 2017-12-06

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500908); 国家公益性行业(农业)科研专项(201303035)

作者简介: 朱建波(1970-), 男, 云南红河人, 研究员, 硕士, 主要从事动物病毒学研究, E-mail: zhujb70@126.com; 杨振兴(1986-), 男, 云南昆明人, 助理研究员, 硕士, 主要从事牛、羊虫媒病毒研究, E-mail: s300yn@163.com。二人并列为第一作者

* 通信作者: 李华春, E-mail: Li_huachun@hotmail.com

tively, the results of ELISA were consistent with the other two methods. These results indicate that the C-ELISA is a rapid, sensitive and stable method for the detection of EHDV antibodies.

Key words: epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV); multi-clone antibody; competitive ELISA (C-ELISA)

流行性出血病(epizootic haemorrhagic disease, EHD)是通过节肢昆虫库蠓传播流行性出血病毒(EHDV),引起的一种非接触传染病^[1]。该病能感染野生及家养反刍动物,特别是引起白尾鹿体温升高、黏膜和浆膜面广泛出血,并常于昏迷状态下死亡^[2]。牛感染发病,症状主要是发热、厌食、溃疡性口炎、呼吸疾病、一些组织器官特别是舌的出血坏死,茨城病由 EHDV-2 病毒型感染引起,可致牛消瘦、脱水,最后因肺炎而死^[3]。部分羊也能感染发病,症状主要表现为皮下水肿,心外膜、眼结膜和瘤胃及肠的浆膜表面出血,胸部和心包囊有黄色液体,鼻排带绿色黏质物^[4]。此病在流行期危害较大,严重影响着畜牧业和国际贸易的发展,世界动物卫生组织(OIE)已将 EHD 列为法定报告传染病^[5]。

近年来,云南、新疆、内蒙古、广西和广东等地进行的血清学调查均检出 EHDV 阳性血清,特别是存在对牛有较强致病力的 EHDV-2、6 和 7 型^[6-9]。2015 年曹颖颖等^[10]在广西分离到 EHDV-5 型毒株,2016 年吕敏娜等^[11]在广东分离到 EHDV-1 型毒株,本实验室自 2012 年至 2017 年间在云南牛体内分离到多株 EHDV-1、2、5、6 和 7 型毒株。以上结果表明 EHDV 在我国分布广泛,存在发生该病的风险,因此该病的血清学检测方法研究对我国进出口贸易及疫病防控具有重要意义。

目前,有学者用表达的 EHDV VP7 蛋白作包被抗原建立检测抗体的间接 ELISA 方法,或用 EHDV 群特异性单克隆抗体建立了 C-ELISA 检测方法,但均无商品化试剂盒^[12-14]。本实验室曾制备多株 EHDV 单克隆抗体,由于均未达到诊断检测要求,无法用于组装高质量 C-ELISA 试剂盒。所以本研究选择用纯化灭活后的 EHDV-6 型病毒作为 ELISA 检测用标准抗原,豚鼠抗 EHDV-2 型多克隆抗体作为竞争抗体与待检抗体竞争,通过抑制率大小来判断待检血清阴阳性,建立了检测 EHDV 抗体的 C-ELISA 方法。该方法具有较好的特异性和敏感度,同时具有快速诊断、使用方便等优点,为 EHDV 血清抗体普查提供了一种有效工具。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

高吸附 ELISA 板购自 COSTAR 公司,抗原保护剂购自 CANDOR 公司,羊抗豚鼠 HRP 标记二抗购自 Abcam 公司,TMB 购自 SurModics 公司,脱脂奶粉购自 BD difco 公司,BCA Protein Assay Kit 购自 TaKaRa 公司,二乙烯亚胺(BEI)、佐剂 206 由云南省保山疫苗厂提供, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 中加入 0.05% 的 Tween-20 配制成 PBST 洗液,PBST 中加入 1% 的脱脂奶粉配制成稀释液。

1.2 毒株、实验动物、血清及细胞

EHDV-2、6 型毒株由本实验室从 2012 年云南师宗牛血中分离获得,经病毒中和试验和基因序列分析鉴定定型。5 月龄豚鼠购自云南省昆明医科大学动物试验中心,健康无疾病,检验合格;黄牛和山羊购自云南牲畜交易市场,6 月龄,健康无病,经核酸 RT-PCR 及血清中和试验检测,证明未感染过 EHDV。不同血清型 EHDV 阳性血清及阴性血清,蓝舌病病毒(BTV)、山羊痘病毒(GPV)、中山病病毒(CHUV)和赤羽病病毒(AKAV)阳性血清,由本实验室保存;小反刍兽疫病毒(PPRV)阳性血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所惠赠;口蹄疫病毒(FMDV)、牛流行热病毒(BEFV)阳性血清由中国农业科学院兰州兽医研究所惠赠;BHK-21 细胞由本实验室保存。

1.3 病毒纯化及抗血清制备

采用长成单层的 BHK-21 细胞培养 EHDV-2、6 型毒株,7 d 出现 100% 细胞病变效应(cytopathic effect,CPE)后收获病毒,冰水浴下超声波破碎处理 3 次,将上层液体置于 30%~70% 的蔗糖连续密度梯度上进行密度梯度离心, $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $35\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 h,在 40%~60% 结合处获得纯化的病毒带, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ BEI 灭活处理 12 h,6 型病毒作为包被抗原,2 型病毒经佐剂 206 乳化,按每只免疫 0.5 mL,免疫 4 只豚鼠,21 d 后加强免疫 1 次,每次免疫 7 d 后采血分离血清,进行血清中和试验测定抗体效价。

1.4 最佳抗原包被浓度和竞争抗体浓度的确定

用棋盘法筛选最佳抗原包被浓度和最佳竞争抗体使用浓度。将纯化灭活后的 6 型 EHDV 抗原用包被液按 1 : 4 000 ~ 1 : 14 000 倍稀释, 50 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被反应板; PBST 洗涤后用 5% 的马血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h; 拍干马血清, 每孔各加入 10 μL 的阴性(N)和阳性(P)血清后, 加入用稀释液按同样稀释倍数配制好的豚鼠抗 EHDV-2 型多克隆抗体(竞争抗体) 50 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 拍干液体后加入 HRP 酶标抗体 50 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; PBST 洗板 6 次, 加入 TMB 50 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$, 避光显色 12 min; 每孔加入 50 μL 1.5 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 溶液终止反应, 测定 OD_{450 nm} 值, 比较阴阳性对照 OD_{450 nm} 值(N/P 值), N/P 值最大的反应孔中使用的包被浓度和竞争抗体浓度即为最佳浓度。

1.5 临界值的确定

对 270 份(180 份牛血清和 90 份羊血清)阴性血清进行 C-ELISA 检测, 对所有的抑制率进行统计分析, 计算样本的平均抑制率和标准偏差(s)。根据公式: 临界值 = 阴性样品平均抑制率 + 3 $\times s$ ^[15], 计算出临界值。对 270 份(250 份牛血清和 20 份羊血清)阳性血清进行 C-ELISA 检测, 确定最小阳性血清抑制率(present inhabitation, PI), $PI = (\text{阴性对照 OD} - \text{样品 OD}) / \text{阴性对照 OD}$ ^[16]。综合阴性和阳性血清的检测结果, 确定试剂盒的判定标准。

1.6 特异性试验

对各 1 份 EHDV(1、2、5、6、7 和 8 型)和 BTV(1~24 型)阳性血清, 各 2 份 GPV、AKAV、CHUV、PPRV、FMDV、BEFV 阳性血清进行检测, 确定检测方法的特异性。

1.7 敏感性试验

将已知血清中和抗体效价的各 1 份 EHDV(1、2、5、6、7 和 8 型)阳性血清从 1 : 10 倍开始进行倍比稀释, 同时进行血清中和试验(SNT)、琼脂扩散试验(AGID)和 C-ELISA 检测, 比较三种方法检出阳性的血清最大稀释度, 验证试剂盒的敏感性。

1.8 临床样品测定试验

2014—2017 年间, 每年挑选 10 头牛和 5 头山羊作为监控动物, 经核酸及 SNT 检测, 证明未感染过 EHDV, 放养在云南师宗农户家中组成监控群。每年 4 月至 11 月每周采集一次血清和抗凝血, 11 月至次年 3 月每月采集一次, 次年 4 月更换监控动物, 分别用 C-ELISA、SNT 检测血清, RT-PCR 和

病毒分离试验检测抗凝血, 比较这 4 种方法的符合情况。

1.9 重复性试验

从同一批次(WH603-1W)及不同批次(WH603-2W、WH603-3W、WH603-4W 和 WH603-5W) C-ELISA 试剂盒中随机取 4 个, 分别检测 4 份阳性样品和 4 份阴性样品, 并设阳性对照和阴性对照, 每份样本重复 2 孔, 计算 PI 值的变异系数, 以检验批次内及批次间重复性。

1.10 再现性试验

将各 4 份的阳性、弱阳性和阴性血清分成 3 管, 各取 2 管同 2 个试剂盒、结果统计表和操作说明, 分别采用冷链运输(环境温度控制在 4~8 $^{\circ}\text{C}$)送至新疆畜牧兽医科学院兽医研究所(Lab 1)、山西农业大学兽医传染病学实验室(Lab 2), 2 d 内到达。剩下 1 管血清留在本实验室, 即云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室(Lab 3)进行检测。每个实验室收到样品, 2 d 内开始检测, 设置三个重复。完成后将检测结果报至本实验室, 进行再现性分析。

2 结 果

2.1 病毒纯化及抗体制备

用 PBS 将纯化灭活后的 2 型 EHDV 稀释 250 倍, BAC 法测定总蛋白质量浓度为 192 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 佐剂乳化后免疫豚鼠, 每次免疫后取血测定血清中和抗体效价(表 1), 1 号和 3 号豚鼠在试验过程中死亡, 2 号和 4 号豚鼠 3 次免疫后血清中和抗体效价为 1 : 2 560 和 1 : 1 810, 选取 2 号豚鼠高免血清作为竞争抗体使用。

2.2 最佳抗原包被浓度和最佳竞争抗体浓度的确定

棋盘法滴定结果显示 6 型 EHDV 抗原按 1 : 10 000 倍稀释(总蛋白质量浓度为 5.12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 竞争抗体按 1 : 10 000 倍稀释时, 阴性对照(N) OD_{450 nm} 为 1.04, 接近 1.0; 阳性对照(P) OD_{450 nm} 为 0.074, 背景较低; 阴阳反差 N/P 值 14.05, 最大, 因此在 C-ELISA 体系中抗原 1 : 10 000 稀释包被反应板, 竞争抗体最佳工作浓度为稀释 1 : 10 000 倍(表 2)。

2.3 临界值的确定

对 270 份牛、羊阴性血清进行 C-ELISA 检测, 平均 PI 值为 4.88%, 标准差(s)为 0.133, 根据公式: 临界值 = 阴性样品平均抑制率 + 3 $\times s$, 计算出临界值为 44.78%; 对同样数量的阳性血清进行检测并计算 PI 值, 最小 PI 为 45.87%, 平均 PI 为

表 1 豚鼠血清中和抗体效价

Table 1 Neutralizing antibody titer of guinea pig serum

动物编号 Animals No.	抗体效价 Antibody titer			
	0 次免疫 Non immune	1 次免疫 Primary immune	2 次免疫 Secondary immune	3 次免疫 Tertiary immune
1	0	1 : 113	1 : 453	死亡 Die
2	0	1 : 57	1 : 640	1 : 2 560
3	0	1 : 80	死亡 Die	—
4	0	1 : 160	1 : 1 280	1 : 1 810

表 2 包被抗原及竞争抗体最佳浓度的确定

Table 2 Determination of optimal conditions of the competitive ELISA

包被抗原稀释度 Antigen dilution	指标 Indexes	豚鼠抗 EHDV 抗体稀释度 Guinea pig anti-EHDV antibody dilution					
		1 : 4 000	1 : 6 000	1 : 8 000	1 : 10 000	1 : 12 000	1 : 14 000
1 : 4 000	OD _{450 nm} N	1.83	1.70	1.54	1.43	1.25	1.18
	OD _{450 nm} P	0.189	0.175	0.164	0.151	0.137	0.108
	N/P	9.68	9.71	9.39	9.47	9.12	10.93
1 : 6 000	OD _{450 nm} N	1.72	1.59	1.48	1.29	1.20	1.11
	OD _{450 nm} P	0.179	0.17	0.158	0.142	0.117	0.091
	N/P	9.61	9.35	9.37	9.08	10.26	12.20
1 : 8 000	OD _{450 nm} N	1.56	1.43	1.24	1.16	1.01	0.82
	OD _{450 nm} P	0.168	0.152	0.138	0.114	0.083	0.077
	N/P	9.29	9.41	8.99	10.18	12.17	10.65
1 : 10 000	OD _{450 nm} N	1.43	1.24	1.12	1.04	0.89	0.76
	OD _{450 nm} P	0.152	0.131	0.103	0.074	0.069	0.068
	N/P	9.41	9.47	10.87	14.05	12.90	11.18
1 : 12 000	OD _{450 nm} N	1.26	1.11	1.02	0.87	0.78	0.69
	OD _{450 nm} P	0.139	0.116	0.088	0.071	0.068	0.065
	N/P	9.06	9.57	11.59	12.25	11.47	10.62
1 : 14 000	OD _{450 nm} N	1.15	1.03	0.89	0.75	0.69	0.48
	OD _{450 nm} P	0.113	0.094	0.076	0.069	0.065	0.064
	N/P	10.18	10.96	11.71	10.87	10.62	7.50

76.00%,对以上结果进行统计(图 1)。PI 在 40%~50%间为在一个过渡区域,极少数阴性和弱阳性血清样品存在此期间内,为保证检测的准确性,将临界值设定为 50%,PI>50%判定为阳性,PI 在 40%~50%之间判定为可疑。

2.4 特异性试验

对各 1 份的不同血清型 EHDV 和 BTV 阳性血清,各 2 份 GPV、AKAV、CHUV、PPRV、FMDV、BEFV 阳性血清进行 C-ELISA 检测(表 3)。结果表明不同血清型 EHDV 血清检测均为阳性,24 种血

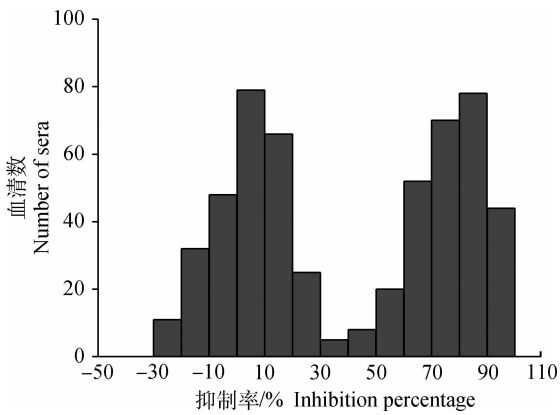


图 1 270 份阴性血清和 270 份阳性血清 C-ELISA PI 值频率分布图

Fig. 1 Distribution of the EHDV C-ELISA results of 270 negative sera and 270 positive sera

表 3 EHDV C-ELISA 特异性试验检测结果

Table 3 The specificity assay of EHDV C-ELISA

血清 Sera	抗体效价 Titer	抑制率/% PI	判定结果 Result	血清 Sera	抗体效价 Titer	抑制率/% PI	判定结果 Result
EHDV-1	1 : 160	86.72	+	BTV-16	1 : 320	13.10	-
EHDV-2	1 : 160	85.60	+	BTV-17	1 : 113	1.70	-
EHDV-5	1 : 320	91.50	+	BTV-18	1 : 40	11.75	-
EHDV-6	1 : 160	87.50	+	BTV-19	1 : 40	10.70	-
EHDV-7	1 : 320	89.90	+	BTV-20	1 : 57	9.83	-
EHDV-8	1 : 320	89.40	+	BTV-21	1 : 80	21.40	-
BTV-1	1 : 28	22.50	-	BTV-22	1 : 113	1.33	-
BTV-2	1 : 57	6.40	-	BTV-23	1 : 40	12.41	-
BTV-3	1 : 40	21.10	-	BTV-24	1 : 57	13.50	-
BTV-4	1 : 80	15.20	-	GPV No. 1	Positive	4.31	-
BTV-5	1 : 57	12.30	-	GPV No. 2	Positive	5.20	-
BTV-6	1 : 113	5.80	-	AKAV No. 1	1 : 40	3.10	-
BTV-7	1 : 160	0.30	-	AKAV No. 2	1 : 57	1.70	-
BTV-8	1 : 320	0.40	-	CHUV No. 1	1 : 57	11.75	-
BTV-9	1 : 40	23.50	-	CHUV No. 2	1 : 80	10.70	-
BTV-10	1 : 57	20.95	-	PPRV No. 1	1 : 80	9.83	-
BTV-11	1 : 226	20.70	-	PPRV No. 2	1 : 57	13.10	-
BTV-12	1 : 113	23.00	-	FMDV No. 1	1 : 64	1.70	-
BTV-13	1 : 57	0.28	-	FMDV No. 2	1 : 128	1.75	-
BTV-14	1 : 80	21.30	-	BEFV No. 1	1 : 113	10.70	-
BTV-15	1 : 160	23.00	-	BEFV No. 2	1 : 80	9.83	-

+. 阳性; -. 阴性

+. Positive; -. Negative

清型 BTV 阳性血清及其他相关病毒阳性血清检测结果均为阴性。因此,该 ELISA 方法具有较好的群特异性,与其他牛、羊易感病毒的阳性血清无交叉反应。

2.5 敏感性试验

将中和抗体效价为 1 : 113、1 : 160、1 : 320、1 : 320、1 : 226 和 1 : 453 的 6 种不同血清型 EHDV 血清,从 1 : 10 开始倍比稀释,同时进行 C-ELISA、SNT 和 AGID 检测(表 4)。C-ELISA 能检测出阳性的血清最大稀释度分别为 1 : 320、1 : 640、1 : 1 280、1 : 1 280、1 : 640 和 1 : 1 280,均高于 SNT 和 AGID;AGID 能检出阳性的血清稀释度最小,超过 1 : 80 倍,检测结果均为阴性。

表 4 C-ELISA、SNT 和 AGID 检测敏感度的比较

Table 4 The comparison of sensitive of C-ELISA, SNT and AGID

血清型 Serotype	抗体效价 Titer	检测方法 Methods	不同血清稀释度的检测结果 ^a Detection results of different serum dilution ^a								
			1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
EHDV-1	1:113	C-ELISA(<i>PI</i> /%)	83.12	79.45	75.16	70.65	65.03	59.11	43.07	34.72	27.73
		SNT	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		AGID	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EHDV-2	1:160	C-ELISA(<i>PI</i> /%)	88.01	85.45	80.32	77.12	74.92	68.03	57.21	43.32	34.95
		SNT	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		AGID	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EHDV-5	1:320	C-ELISA(<i>PI</i> /%)	90.87	86.81	81.06	80.60	76.53	69.02	62.81	54.04	39.73
		SNT	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		AGID	+	+	+	+	-	-	-	-	-
EHDV-6	1:320	C-ELISA(<i>PI</i> /%)	91.70	88.30	83.40	80.70	75.50	66.30	61.30	53.26	36.40
		SNT	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		AGID	+	+	+	+	-	-	-	-	-
EHDV-7	1:226	C-ELISA(<i>PI</i> /%)	89.21	85.35	80.97	79.69	73.32	63.11	58.28	47.14	26.37
		SNT	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		AGID	+	+	+	-	-	-	-	-	-
EHDV-8	1:453	C-ELISA(<i>PI</i> /%)	91.96	88.70	84.44	81.60	79.34	75.67	65.59	54.35	30.67
		SNT	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		AGID	+	+	+	+	-	-	-	-	-

^a. 检测结果:C-ELISA 以“*PI*/%”表示;SNT、AGID 以“阴、阳性”表示(+, 阳性;- , 阴性)

^a. Detection results: C-ELISA results are displayed with *PI* (%); SNT, AGID results are displayed with positive or negative (+, Positive; -, Negative)

2.6 临床样品测定

2014—2017 年间,共对 40 头牛和 20 头羊采集的各 1 980 份血清和抗凝血进行 C-ELISA、RT-PCR 及病毒分离检测。C-ELISA 检测发现,2014 年 6、7 月 3 头牛转阳,转阳率为 30%;2015 年 8 月 1 头牛转阳,转阳率为 10%;2016 年 10 月 2 头牛转阳,转阳率为 20%;2017 年 6 月 2 头牛转阳,转阳率为 20%,除 2016 年动物在 10 月转阳,其余动物均在 6—8 月转阳,说明夏季虫媒活动更频繁,易引起虫媒病传播。4 年间均未发现山羊血清转阳,动物血清转阳前后几周试验数据见表 5。测定分离病毒 TICD₅₀后,用病毒同对应牛的血清进行

SNT,血清转阳结果同 C-ELISA 结果吻合;抗凝血 RT-PCR 检测及病毒分离证明血清转阳动物均被 EHDV 感染,感染时间和血清转阳时间吻合;其他动物样品 4 种方法连续检测结果均为阴性,说明该方法能准确检测出动物的血清转阳,有很好的准确性。

2.7 重复性试验

从同一批次及不同批次 EHDV C-ELISA 试剂盒中随机抽取 4 个试剂盒,分别检测 8 份样品,批次间变异系数在 2.62%~8.72%,批次内变异系数在 2.95%~8.89%,变异系数均小于 10%(表 6),表明该试剂盒有较好的批次内及批次间重复性。

表 5 临床样品检测结果

Table 5 Results of clinical samples tested by C-ELISA, RT-PCR and virus isolation

动物 Animal	采血日期 Date of blood collection	检测结果 ^a Detection results ^a			
		C-ELISA(<i>PI</i> /%)	SNT	RT-PCR	病毒分离 Virus isolation
牛-8 No. 8	2014-06-24	13.95	—	—	—
	2014-07-01	10.50	—	—	—
	2014-07-08	12.38	—	+	—
	2014-07-15	61.28	1 : 5	+	+
	2014-07-22	80.25	1 : 28	+	—
	2014-07-29	83.17	1 : 54	—	—
	2014-08-05	87.65	1 : 80	—	—
	2014-08-12	88.34	1 : 113	—	—
	2014-08-18	88.03	1 : 80	—	—
牛-10 No. 10	2014-06-10	10.33	—	—	—
	2014-06-17	38.22	—	+	—
	2014-06-24	53.10	—	+	+
	2014-07-01	72.69	1 : 20	+	—
	2014-07-08	77.98	1 : 28	+	—
	2014-07-15	72.62	1 : 40	—	—
	2014-07-22	82.28	1 : 54	—	—
	2014-07-29	82.40	1 : 80	—	—
	2014-08-05	83.67	1 : 80	—	—
牛-21 No. 21	2014-07-08	10.19	—	—	—
	2014-07-15	20.37	—	—	—
	2014-07-22	26.43	—	+	—
	2014-07-29	72.60	1 : 7	+	+
	2014-08-05	82.34	1 : 40	+	—
	2014-08-12	80.57	1 : 54	—	—
	2014-08-18	83.52	1 : 80	—	—
	2014-08-25	83.51	1 : 113	—	—
	2014-09-02	88.37	1 : 113	—	—
牛-7 No. 7	2015-07-28	18.87	—	—	—
	2015-08-04	12.55	—	—	—
	2015-08-11	44.72	—	+	+
	2015-08-18	55.67	—	+	+
	2015-08-25	70.26	1 : 20	+	—
	2015-09-01	82.18	1 : 54	+	—
	2015-09-08	87.03	1 : 113	—	—
	2015-09-15	86.59	1 : 160	—	—
	2015-09-28	88.87	1 : 113	—	—

(转下页 Carried forward)

(续表 5 Continued)

动物 Animal	采血日期 Date of blood collection	检测结果 ^a Detection results ^a			
		C-ELISA(<i>PI</i> /%)	SNT	RT-PCR	病毒分离 Virus isolation
牛-5 No. 5	2016-09-20	15.99	—	—	—
	2016-09-27	12.53	—	—	—
	2016-10-11	10.21	—	—	—
	2016-10-18	14.89	—	+	—
	2016-10-25	30.33	—	+	+
	2016-11-01	53.99	1 : 5	+	+
	2016-12-06	82.71	1 : 40	+	—
	2017-02-24	84.48	1 : 113	—	—
	2017-03-28	82.43	1 : 80	—	—
牛-17 No. 17	2016-09-20	36.74	—	—	—
	2016-09-27	9.52	—	—	—
	2016-10-11	28.45	—	—	—
	2016-10-18	38.35	—	+	—
	2016-10-25	41.10	—	+	+
	2016-11-01	56.48	1 : 7	+	+
	2016-12-06	84.27	1 : 54	+	—
	2017-02-24	82.69	1 : 80	—	—
	2017-03-28	88.76	1 : 113	—	—
牛-13 No. 13	2017-05-16	19.12	—	—	—
	2017-05-25	12.12	—	—	—
	2017-06-08	27.91	—	+	—
	2017-06-15	42.59	—	+	+
	2017-06-20	84.94	1 : 20	+	+
	2017-06-27	87.06	1 : 40	+	—
	2017-07-04	84.92	1 : 113	—	—
	2017-07-11	83.78	1 : 226	—	—
	2017-07-18	82.29	1 : 113	—	—
牛-15 No. 15	2017-06-08	18.05	—	—	—
	2017-06-15	18.90	—	—	—
	2017-06-20	25.17	—	—	—
	2017-06-27	36.54	—	+	—
	2017-07-04	50.25	1 : 5	+	+
	2017-07-11	88.28	1 : 80	+	—
	2017-07-18	89.09	1 : 160	—	—
	2017-07-24	85.90	1 : 320	—	—
	2017-08-01	86.60	1 : 226	—	—

^a. 检测结果: C-ELISA 以“*PI*/%”表示; SNT 以“阴性(—)”或具体数值表示; RT-PCR、病毒分离试验以“阴、阳性”表示(+、阳性; —、阴性)

^a. Detection results: C-ELISA results are displayed with *PI* (%); SNT, AGID results are displayed with negative (—) or detailed values; RT-PCR, virus isolation results are displayed with positive or negative (+, Positive; —, Negative)

表 6 C-ELISA 重复性试验 ($n=8$)Table 6 Repeatability assay for C-ELISA ($n=8$)

样品序号 Sample No.	批次内 Intra batch		批次间 Inter batch	
	结果 ($\bar{x} \pm s$)	变异 系数	结果 ($\bar{x} \pm s$)	变异 系数
	Result	/ %CV	Result	/ %CV
Positive 1	0.763±0.020	2.62	0.745±0.022	2.95
Positive 2	0.845±0.025	2.96	0.857±0.030	3.50
Positive 3	0.848±0.028	3.30	0.862±0.035	4.06
Positive 4	0.797±0.024	3.01	0.773±0.031	4.01
Negative 1	0.210±0.016	7.41	0.214±0.018	8.41
Negative 2	0.056±0.004	7.62	0.059±0.005	8.47
Negative 3	0.195±0.017	8.72	0.180±0.016	8.89
Negative 4	0.130±0.009	6.92	0.133±0.011	8.27

2.8 再现性试验

在 3 个不同实验室,用该试剂盒检测同样的 4 份阳性、弱阳性和阴性血清。结果表明 12 份血清样品在 3 个实验室的检测结果相一致,阴阳性判断完全正确,变异系数在 1.14%~8.44%之间,均小于 10%(表 7),说明该试剂盒再现性较好。

表 7 再现性试验

Table 7 Reproducibility test in different laboratories

样品 Sample No.	不同实验室结果 Results of different laboratory				变异 系数
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	$\bar{x} \pm s$	/ % CV
	Positive 1	0.821	0.780	0.840	0.814±0.031
Positive 2	0.819	0.811	0.857	0.829±0.024	2.95
Positive 3	0.882	0.871	0.891	0.881±0.010	1.14
Positive 4	0.858	0.840	0.862	0.853±0.012	1.37
Weak Positive 1	0.507	0.524	0.532	0.521±0.013	2.41
Weak Positive 2	0.561	0.553	0.586	0.567±0.018	3.12
Weak Positive 3	0.552	0.542	0.569	0.554±0.014	2.46
Weak Positive 4	0.592	0.581	0.622	0.598±0.021	3.55
Negative 1	0.235	0.218	0.220	0.225±0.009	4.15
Negative 2	0.155	0.172	0.163	0.163±0.009	5.46
Negative 3	0.219	0.247	0.256	0.240±0.019	8.01
Negative 4	0.269	0.317	0.305	0.297±0.025	8.44

Lab 1. 新疆畜牧兽医科学院兽医研究所; Lab 2. 山西农业大学兽医传染病学实验室; Lab 3. 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室

Lab 1. Veterinary Research Institute of Xinjiang Academy of Animal Sciences; Lab 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine of Shanxi Agricultural University; Lab 3. Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Diseases Laboratory

3 讨论

我国地域辽阔,自然条件复杂,很多地区适于各类虫媒病毒活动,新发和复发虫媒病毒病更是随着近年全球变暖而不断出现。目前,云南、新疆、山西、内蒙古、广西和广东等地都报道检测到 EHDV 阳性血清,并从部分省区分离到病毒, EHD 防控形式严峻。

EHDV 血清抗体检测是了解 EHDV 感染情况的必要手段,目前用于 EHDV 抗体检测的方法主要有 ELISA、SNT、AGID 和补体结合试验 (complement fixation test, CFT) 四种。AGID 因其简单、经济,过去曾被大量使用,但存在需对抗原进行高度浓缩,抗原需求量大等缺点,且因检测 EHDV 和 BTV 血清时存在交叉反应,所以该试验结果在 BTV 和 EHDV 共存地区不可靠^[15]。CFT 在 1980 年以前一直用于血清检测,可在病毒感染后 4~12 个月定性及定量测定抗体,但随后可靠性降低,因此不能用于检测老疫区感染^[17]。SNT 是目前国际上抗体检测的金标准,有较好的特异性、灵敏度,但有操作要求高、检测时间长等缺点,并不适于快速诊断和基层单位使用^[18]。ELISA 具有操作简便、检测样本通量大、当天就能出结果等优点,适于大规模的血清调查及基层单位使用,已被广泛应用于兽药残留检测及各类疾病诊断等方面^[19]。目前,国外有学者采用 EHDV VP7 单克隆抗体(群特异性抗体)建立了血清检测的 C-ELISA 方法^[20],国内有学者用原核表达 VP7 蛋白作包被抗原建立间接 ELISA 方法,但至今已报道的 ELISA 方法均无商品化试剂盒。为能开展 EHDV 血清学调查相关工作,本研究选择建立能进行快速血清检测的 C-ELISA 方法。

研究初期,由于制备的多株单克隆抗体未达到使用要求,所以本研究选用豚鼠抗 EHDV 多抗为竞争抗体,以纯化灭活后的 EHDV 作为包被抗原, HPR 标记的羊抗豚鼠为酶标抗体,建立了抗体检测的 C-ELISA 方法。由于多克隆抗体竞争位点较多,不可能做到彻底阻断显色反应,因此建立的 C-ELISA 方法可能在敏感性和特异性上不如单克隆抗体方法,但在本研究中,通过各反应条件的优化使阳性血清最高抗体抑制率达 90% 以上,阴性血清抑制率集中在 20% 以下。

特异性试验中,该方法仅能检测出不同血清型 EHDV 阳性血清,同相关病毒阳性血清无交叉反

应,特别是与 EHDV 同源性较高,用 AGID 试验检测常出现交叉反应的 BTV 阳性血清,用所建立的 C-ELISA 方法均能准确区分。2016 年用该方法对云南采集的 2 737 份牛血清进行 C-ELISA 检测,并从检测为阳性的血清中随机选出 700 份进行血清中和试验确定血清型,结果存在 EHDV-1、2、5、6、7 和 8 不同亚型^[9]。结果说明该方法具有较好的群特异性,但由于本实验室保存的不同亚型 EHDV 病毒库和血清库还不完整,特异性试验还需进一步完善。

敏感性试验中,6 种不同血清型的 EHDV 阳性血清从 1 : 10 倍开始倍比稀释,同时进行 C-ELISA、SNT 和 AGID 检测,C-ELISA 能检出阳性的血清最大稀释度均高于 SNT 和 AGID,且 1 d 内出检测结果,SNT 用了 7 d,AGID 用了 3 d,如果无需确定待检血清的血清型,ELISA 在敏感度和检测时间上都有优势。

检测监控点连续 4 年采集的 1 980 份血清发现,该方法检出血清转阳动物及转阳时间均与 SNT、RT-PCR 和病毒分离试验检测结果对应一致,同时发现动物被感染后的 2~3 周内为抗体增长期,抑制率迅速升高,之后进入稳定期,至次年 4 月更换动物前抑制率均维持在 80% 以上,未转阳动物血清持续检测均为阴性,说明该方法具有较好的可靠性和稳定性。对比 4 种检测结果发现,在血清抗体增长期,即核酸检测阳性后第 2 周和第 3 周更易分离到病毒,而核酸阳性仅能维持 3~4 周,所以可以首先选用 C-ELISA 方法持续检测血清,只需对血清转阳前后 5 周的抗凝血进行 RT-PCR 检测,并将核酸阳性血液接种细胞分离病毒,省去需要对每次采集的血液进行 RT-PCR 检测,提高了病毒分离工作效率。对 4 年间分离的病毒进行基因序列分析和病毒中和试验鉴定存在 EHDV-1、2、5、6、7 型,详细信息另文报道。批次内和批次间重复试验及在 3 个不同实验室间的再现性试验,CV 值均小于 10%,说明该方法有较好的重复性和再现性。

4 结 论

建立的 C-ELISA 方法具有较好的特异性、敏感性、应用性及重复性,为我国 EHDV 抗体检测提供了一种有效工具,使一些不具备 SNT 试验条件的地方也能开展血清检测,有助于我国进行 EHD 的血清调查和防控。

参考文献 (References):

- [1] TEMIZEL E M, YESILBAG K, BATTEN C, et al. Epizootic hemorrhagic disease in cattle, Western Turkey[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(2):317-319.
- [2] BRÉARD E, SAILLEAU C, HAMBLIN C, et al. Outbreak of epizootic haemorrhagic disease on the island of Réunion [J]. *Vet Rec*, 2004, 155 (14): 422-423.
- [3] KEDMI M, GALON N, HERZIGER Y, et al. Comparison of the epidemiology of epizootic haemorrhagic disease and bluetongue viruses in dairy cattle in Israel[J]. *Vet J*, 2011, 190(1):77-83.
- [4] NOON T H, WESCHE S L, CAGLE D, et al. Hemorrhagic disease in bighorn sheep in Arizona[J]. *J Wildlife Dis*, 2002, 38(1):172-176.
- [5] OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals[M]. Paris:OIE, 2013.
- [6] 张胜男,李华春,朱建波,等. 2015 年内蒙古地区蓝舌病及流行性出血热流行病学调查及血清型鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(12):939-943.
ZHANG S N, LI H C, ZHU J B, et al. The epidemiological survey and serotype identification of bluetongue disease and the epizootic hemorrhage disease in Inner Mongolia in 2015[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38 (12): 939-943. (in Chinese)
- [7] 张怡轩,林俊,曹颖颖,等. 广西鹿流行性出血热病毒血清型调查及分布影响分析[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2016(4):19-21.
ZHANG Y X, LIN J, CAO Y Y, et al. Serological investigation and distribution impact analysis of epizootic hemorrhagic disease virus in Guangxi [J]. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2016(4):19-21. (in Chinese)
- [8] 刘帅,张玲,加帕尔·哈斯木,等. 新疆牛群中鹿流行性出血热血清学调查[J]. *中国动物检疫*, 2016, 33(4):15-18.
LIU S, ZHANG L, JIAPAER H, et al. Serological survey on deer epizootic hemorrhagic disease of bovine in Xinjiang[J]. *China Animal Health Inspection*, 2016, 33(4):15-18. (in Chinese)
- [9] 和东华,杨振兴,高林,等. 云南省边境地区牛流行性出血热病毒血清学调查[J]. *云南畜牧兽医*, 2016(5):7-10.
HE D H, YANG Z X, GAO L, et al. Serological investigation of epizootic hemorrhagic disease virus in border

- areas of Yunnan Province[J]. *Yunnan Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(5):7-10. (in Chinese)
- [10] 曹颖颖, 吴健敏, 林俊, 等. 广西首例牛源鹿流行性出血热病毒的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(10):746-750.
CAO Y Y, WU J M, LIN J, et al. Isolation and identification of the first case of epizootic hemorrhagic disease virus from cattle in Guangxi [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2015, 37(10):746-750. (in Chinese)
- [11] 吕敏娜, 朱建波, 李娟, 等. 广东一株牛源流行性出血病病毒的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(1):67-70.
LV M N, ZHU J B, LI J, et al. Isolation and identification of the epizootic hemorrhagic disease virus from cattle in Guangdong [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39(1):67-70. (in Chinese)
- [12] FORZAN M, PIZZURRO F, ZACCARIA G, et al. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay using baculovirus-expressed VP7 for detection of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV) antibodies[J]. *J Virol Methods*, 2017, 284:212-216.
- [13] MECHAM J O, JOCHIM M M. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to epizootic hemorrhagic disease of deer virus[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000, 12(2):142-145.
- [14] 花群义, 杨俊兴, 郭莹洁, 等. 鹿流行性出血病病毒 VP7-ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(6):527-530.
HUA Q Y, YANG J X, GUO Y J, et al. Establishment of an indirect ELISA based on recombinant VP7 protein for detection of antibody against epizootic hemorrhagic disease virus of deer[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2009, 39(6):527-530. (in Chinese)
- [15] BITEAU-COROLLER F, GERBIER G, STÄRK K D C, et al. Performance evaluation of a competitive ELISA test used for Bluetongue antibody detection in France, a recently infected area[J]. *Vet Microbiol*, 2006, 118(1-2):57-66.
- [16] AFSHAR A, ANDERSON J, NIELSEN K H, et al. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies to epizootic hemorrhagic disease virus of deer[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1997, 9(3):309-311.
- [17] 曹颖颖, 钟华, 吴健敏. 鹿流行性出血热病毒研究进展[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(3):571-576.
CAO Y Y, ZHONG H, WU J M. Research progress of deer epidemic hemorrhagic fever virus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(3):571-576. (in Chinese)
- [18] LOEFFEN W, QUAK S, DE BOER-LUIJTZE E, et al. Development of a virus neutralisation test to detect antibodies against Schmallenberg virus and serological results in suspect and infected herds[J]. *Acta Vet Scand*, 2014, 54(1):44.
- [19] STARICK E, WERNER O, SCHIRRMEIER H, et al. Establishment of a competitive ELISA (cELISA) system for the detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies and its application to field sera from different species[J]. *J Ver Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2006, 53(8):370-375.
- [20] MECHAM J O, WILSON W C. Antigen capture competitive enzyme-linked immunosorbent assays using baculovirus-expressed antigens for diagnosis of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(2):518-523.

(编辑 白永平)