

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.09.03

鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 抗体 间接 ELISA 检测方法的建立

黄小洁¹, 吴华伟¹, 张兵¹, 杨承槐¹, 孔冬妮¹,
侯力丹¹, 杨飞², 薛麒^{1*}, 刘丹^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 中牧实业股份有限公司, 农业部兽用生物制品与化药重点实验室,
北京市兽用多肽疫苗设计与制备工程技术中心, 北京 100095)

[收稿日期] 2022-03-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 09-0014-08 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为建立鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 抗体的间接 ELISA 检测方法, 应用原核表达的 IBDV VP2 蛋白作为包被抗原, 经方阵试验确定间接 ELISA 试验的最佳反应条件: 包被抗原的浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 标准阴、阳性血清的稀释度为 1:400, 封闭液选用 10% 马血清, 酶标抗体最佳稀释倍数为 1:15000, 最佳抗原稀释液为 0.01 mol/L PBS (pH7.2), 抗原最佳包被条件为 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 待检血清和酶标二抗反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 底物作用时间为 15 min。待检血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 0.288$ 判为阳性, 反之判为阴性。结果显示, 该方法的特异性好、敏感高、重复性好。用建立的间接 ELISA 方法与商品化 IDEXX-ELISA 试剂盒对临床血清样品进行检测, 符合率为 95.7%。该方法的建立为检测 IBDV 抗体提供了一种安全、特异、敏感、方便经济的检测方法, 为鸡传染性法氏囊病免疫监测和预防控制提供了科学的技术手段。

[关键词] 鸡传染性法氏囊病病毒; 抗体; VP2; 间接 ELISA

Development of an Indirect ELISA to Detect Antibodies against Infectious Bursal Disease Virus

HUANG Xiao-jie¹, WU Hua-wei¹, ZHANG Bing¹, YANG Chen-huai¹, KONG Dong-ni¹,
HOU Li-dan¹, YANG Fei², XUE Qi^{1*}, LIU Dan^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Key Laboratory of Veterinary

Bioproduction and Chemical Medicine of the Ministry of Agriculture; Engineering and Technology Research Center for Beijing

Veterinary Peptide Vaccine Design and Preparation, Zhongmu Institutes of China Animal Husbandry Industry Co. Ltd, Beijing 100095, China)

Corresponding authors: XUE Qi, E-mail: xueqiholic@126.com; LIU Dan, E-mail: liudan813@163.com

Abstract: To develop an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect antibodies against infectious bursal disease virus (IBDV), the recombinant VP2 protein of IBDV was used as the coated antigen.

作者简介: 黄小洁, 硕士, 助理研究员, 从事禽用疫苗检验及相关研究工作。

通讯作者: 薛麒, E-mail: xueqiholic@126.com; 刘丹, E-mail: liudan813@163.com

The best ELISA reaction system was determined by array titrimetric test. The final concentration of the coated antigen was 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the dilution of the normal positive and negative serum was 1:400. The confining liquid was 10% horse serum, and the working concentration of conjugate antibody was 1:15000. The best diluents was 0.01 mol/L phosphate buffer solution (pH7.2). The best packing condition was 4 $^{\circ}\text{C}$ overnight. The reaction condition for serum samples and conjugate antibody was 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min. The substrate action time was 15 min $\text{OD}_{450\text{nm}}$ of 0.288 was set as the positive cutoff. The result of specificity test, sensitivity test and duplicability test showed that the method was specific, sensitive and repeatable. The serum samples were detected by the established ELISA method and the IDEXX – ELISA kit. The coincidence was 95.7%. The results showed that the indirect ELISA was rapid, simple, specific, sensitive, suggesting it was a valuable method for immunity surveillance, prevention and control of infectious bursal disease.

Key words: infectious bursal disease virus; antibody; VP2; indirect ELISA

鸡传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的鸡和火鸡的急性、高度接触性传染病^[1], IBDV 属双 RNA 病毒科双 RNA 病毒属。该病与禽网状内皮组织增生症、禽白血病、鸡传染性贫血病并称为危害鸡免疫系统的四大病毒性疾病^[2]。该病主要感染 3 周龄以内的鸡, 鸡群被感染后会造成中枢免疫器官法氏囊的损伤, 从而引起免疫抑制, 进而引起疫苗免疫失败或继发其他病毒性、细菌性疾病, 严重的可以导致鸡群大量死亡, 给养禽业带来巨大的经济损失^[3]。自从 IBDV 发现至今, 鸡传染性法氏囊病目前几乎遍及世界上所有养鸡国家和地区, 已成为危害养鸡业的重要疾病之一。

目前防控 IBDV 最有效的方法就是疫苗免疫, 但由于 IBDV 基因组易发生基因突变, 不同毒株交叉感染还易发生基因组重配, 造成疫苗免疫失败^[4]。因此, 在使用 IBDV 疫苗免疫后, 对鸡群免疫后的保护性抗体水平进行评价, 也是当前 IBD 防控工作中的重要课题。IBDV 抗体的检测方法主要有中和试验、琼脂扩散试验 (AGP)、间接免疫荧光试验 (IFA) 及酶联免疫吸附试验 (ELISA)^[5]。中和试验是评价鸡群抗体的金标准, 但操作繁琐, 耗时长, 且需要用细胞培养, 普通养殖场很难开展操作。琼脂扩散试验操作简单, 但耗时较长, 不符合快速检测的要求。IFA 操作繁琐, 需要用细胞培养, 且

观察需要用的荧光显微镜, 既不方便也价格昂贵。而 ELISA 检测方法具有特异性好、操作简便、快速的优点, 逐渐成为近年来研究的热点。

本研究选用大肠杆菌表达系统表达 IBDV 的 VP2 蛋白作为包被抗原^[6], 建立了检测 IBDV 抗体的间接 ELISA 方法, 为 IBDV 流行病学调查和隐性感染监测提供有效的监测手段, 为试剂盒的研制提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 IBDV 标准阳性血清及阴性血清、鸡减蛋综合征病毒 (EDSV) 阳性血清、鸡新城疫病毒 (NDV) 阳性血清、鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 阳性血清、鸡传染性喉气管炎病毒 (ILT) 阳性血清、禽网状内皮组织增生症病毒 (REV) 阳性血清和马立克氏病火鸡疱疹病毒 (HVT) 阳性血清、鸡大肠杆菌阳性血清购自中国兽医药品监察所; 禽流感病毒 (AIV, H5、H9) 阳性血清购自哈尔滨兽医研究所; 375 份临床血清采自 SPF 鸡; HRP 标记的 Donkey anti-chicken IgY 购自康为世纪生物科技有限公司; TMB 由 Sigma 公司提供; 酶标板为 Corning 公司产品; IBD ELISA 抗体检测试剂盒为 IDEXX 公司产品。

1.1.2 IBDV VP2 蛋白的制备 参照文献^[6], 利用大肠杆菌表达系统进行 VP2 蛋白表达, 纯化后的蛋白浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 将纯化后的蛋白定量后作为

ELISA 包被用抗原。

1.2 方法

1.2.1 抗原包被浓度和待检血清稀释度的确定

用 PBS 将纯化后蛋白进行倍比稀释,取 8、4、2、1、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5 个浓度,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 包被酶标板,37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。洗涤后加入 10% 脱脂乳,每孔 200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。洗涤拍干后分别加入 1:100、1:200、1:400、1:800 稀释的 IBD 阳性血清和阴性血清进行 ELISA 方阵试验,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h,洗涤后加入 1:1800 稀释的酶标抗体,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h;洗涤后加入 TMB 底物溶液,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。在酶标仪上测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值,每个稀释度做 2 个重复,取其平均值。以阳性血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值接近 1.0、P/N 值最大的所在孔的抗原浓度和血清稀释倍数作为最佳抗原工作浓度和血清稀释度。

1.2.2 酶标抗体稀释度的确定

固定抗原包被浓度和待检血清稀释度,将 HRP 标记的驴抗鸡酶标抗体稀释为 1:10000、1:12000、1:15000、1:18000、1:20000,按照 ELISA 程序进行检测,筛选酶标抗体的最佳稀释度。

1.2.3 封闭液的确定

以 1% BSA、10% 脱脂乳、10% 马血清、3% 明胶、1% OVA 封闭包被板,用 IBDV 标准阴性、阳性血清进行检测,以确定最佳包被液。

1.2.4 最佳包被条件的确定

分别选择 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜、37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h+4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜、37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 三个反应条件进行检测,以确定最佳包被条件。

1.2.5 抗原稀释液的确定

分别用 0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 和 0.01 mol/L PBS (pH7.2) 稀释 VP2 蛋白进行检测,确定抗原稀释液。

1.2.6 ELISA 反应时间的优化

1.2.6.1 待检血清反应时间的确定

加入最佳稀释度的 IBDV 标准阳性血清和阴性血清,按作用时间分别为 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min、37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min、37 $^{\circ}\text{C}$ 90 min 及 37 $^{\circ}\text{C}$ 120 min 进行 ELISA 检测,确定血清最佳反应时间。

1.2.6.2 酶标抗体作用时间的确定

加入酶标抗

体后,分别按 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min、37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min、37 $^{\circ}\text{C}$ 90 min 及 37 $^{\circ}\text{C}$ 120 min 进行 ELISA 检测,确定酶标抗体最佳反应时间。

1.2.6.3 底物反应时间的确定

加入底物后,按室温 10、15、20 min 进行反应,以 P/N 值最高确定最终反应时间。

1.2.7 阴阳性临界值的确定

按照已建立的 IBDV 抗体间接 ELISA 方法进行检测。通过对 375 份阴性鸡血清样品进行检测,根据检测结果计算阴性血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 平均值和标准差,将平均值 + 3 \times 标准差作为判断阴阳性血清临界值的标准。

1.2.8 特异性试验

用已建立的 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法对抗 EDSV、NDV、IBV、ILTV、REV、ALV (H5)、ALV (H9) 和 HVT 等 8 种禽常见传染病病毒阳性血清和鸡大肠杆菌阳性血清进行测定,评价该 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法的特异性。

1.2.9 敏感性试验

取 4 份 IBDV 阳性血清,分别进行 1:400、1:800、1:1600、1:3200 稀释后进行检测,同时与 IDEXX 公司生产的 IBDV 抗体检测试剂盒进行比较,以评价 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法的敏感性。

1.2.10 重复性试验

1.2.10.1 批内重复性试验

取同一批次三块 ELISA 板,对 4 份阳性血清、4 份阴性血清进行 ELISA 测定,每个平行做 3 孔,进行批内重复性试验,检测结果进行统计学分析、计算变异系数。

1.2.10.2 批间重复性试验

不同时间制备的三批抗原包被的 ELISA 板,对 4 份阳性血清、4 份阴性血清进行 ELISA 测定,每个平行做 3 孔,进行批间重复性试验,检测结果进行统计学分析、计算变异系数。

1.2.11 与 IDEXX 公司的 IBDV 抗体检测试剂盒进行符合率比较

用已建立的 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法检测不同抗体效价的血清 184 份,同时将这些血清按照 IDEXX 公司的 IBDV 抗体检测试剂盒说明进行测定。根据结果确定两者之间的符合率。

2 结果与分析

2.1 抗原包被浓度和待检血清稀释度的确定

ELISA 方阵试验结果表明,在抗原的包被浓度为 8 μg/mL,每孔 100 μL,待检血清稀释度为 1:400 时,阳性血清 OD_{450nm} 在 1.0 左右,且 P/N 值最大(表 1)。

表 1 抗原包被浓度和待检血清稀释度的确定

Tab 1 Determination of antigen concentration and serum dilution

血清稀释倍数	检测指标	不同抗原包被浓度(μg/mL)的检测值				
		8	4	2	1	0.5
1:100	P	1.489	1.290	0.923	0.824	0.625
	N	0.298	0.325	0.347	0.331	0.316
	P/N	5.00	3.96	2.66	2.49	1.98
1:200	P	1.177	0.895	0.675	0.518	0.381
	N	0.219	0.220	0.235	0.227	0.226
	P/N	5.38	4.08	2.87	2.28	1.69
1:400	P	0.906	0.630	0.461	0.351	0.259
	N	0.166	0.161	0.165	0.213	0.172
	P/N	5.45	3.93	2.80	1.64	1.50
1:800	P	0.577	0.426	0.303	0.240	0.184
	N	0.133	0.132	0.136	0.133	0.150
	P/N	4.35	3.24	2.23	1.80	1.22

P:阳性血清 OD_{450nm} 值; N:阴性血清 OD_{450nm} 值; P/N:阳性血清 OD_{450nm} 值/阴性血清 OD_{450nm} 值

2.2 酶标抗体稀释度的确定 在最适抗原包被浓度和待检血清最佳稀释度条件下,将 HRP 标记的驴抗鸡酶标抗体稀释为 1:10000、1:12000、1:15000、1:18000、1:20000,按照 ELISA 程序检测,结果表明酶标抗体的最佳稀释度为 1:15000(表 2)。

表 2 不同酶标抗体稀释度的 ELISA 结果

Tab 2 ELISA results of dilution of different enzyme-labeled antibodies

二抗浓度	P	N	P/N
1:10000	1.607	0.280	5.74
1:12000	1.648	0.308	5.36
1:15000	0.954	0.160	5.94
1:18000	1.732	0.302	5.74
1:20000	1.538	0.261	5.89

注释同表 1

2.3 封闭液的确定 分别以 1% BSA、10% 脱脂乳、10% 马血清、3% 明胶、1% OVA 封闭包被板,用

IBDV 标准阴性、阳性血清进行检测,结果显示 10% 马血清的封闭效果最好(表 3)。

表 3 不同封闭液条件的 ELISA 结果

Tab 3 ELISA results of different sealing fluid

封闭液	P	N	P/N
1% BSA	1.187	0.163	7.30
10% 脱脂乳	0.954	0.160	5.94
10% 马血清	1.254	0.126	9.87
3% 明胶	1.158	0.156	7.44
1% OVA	1.029	0.297	3.46

注释同表 1

2.4 最佳包被条件的确定 分别选择 4 ℃ 过夜、37 ℃ 1 h+4 ℃ 过夜、37 ℃ 2 h 三个反应条件进行检测,结果显示 4 ℃ 过夜、37 ℃ 1 h+4 ℃ 过夜效果较好,确定最佳包被条件为 4 ℃ 过夜(表 4)。

表 4 不同包被条件的 ELISA 结果

Tab 4 ELISA results of different coating conditions

包被方式	P	N	P/N
4 ℃ 过夜	0.769	0.092	8.32
37 ℃ 1 h+4 ℃ 过夜	0.789	0.094	8.43
37 ℃ 2 h	0.521	0.091	5.71

注释同表 1

2.5 抗原稀释液的确定 分别用 0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)和 0.01 mol/L PBS(pH7.2)稀释 VP2 蛋白进行检测,两者差异不大,选择常用的 0.01 mol/L PBS(pH7.2)作为抗原稀释液(表 5)。

表 5 不同抗原稀释液的 ELISA 结果

Tab 5 ELISA results of different Antigen Diluents

抗原稀释液	P	N	P/N
0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)	0.996	0.114	8.71
0.01 mol/L PBS(pH7.2)	1.014	0.118	8.62

注释同表 1

2.6 待检血清反应时间的确定 加入最佳稀释度的 IBDV 标准阳性血清和阴性血清,按作用条件分别为 37 ℃ 30 min、37 ℃ 60 min、37 ℃ 90 min 及 37 ℃ 120 min 进行 ELISA 检测,确定血清最佳反应时间为 90 min(表 6)。

表 6 不同血清反应时间的 ELISA 结果

Tab 6 ELISA results of different serum reaction time

血清作用时间	P	N	P/N
30 min	0.670	0.097	6.88
60 min	0.905	0.101	8.99
90 min	0.973	0.104	9.37
120 min	0.998	0.123	8.11

注释同表 1

2.7 酶标抗体作用时间的确定 加入酶标抗体后,分别按 37 ℃ 30 min、37 ℃ 60 min、37 ℃ 90 min 及 37 ℃ 120 min 进行 ELISA 检测,确定酶标抗体最佳反应时间为 37 ℃ 60 min(表 7)。

表 7 不同酶标抗体作用时间的 ELISA 结果

Tab 7 ELISA results of different enzyme labeled antibody reaction time

酶标抗体作用时间	P	N	P/N
30 min	0.887	0.107	8.30
60 min	1.211	0.128	9.45
90 min	1.398	0.156	8.96
120 min	1.602	0.170	9.42

注释同表 1

2.8 底物反应时间的确定 加入底物后,按室温 10、15、20 min 进行反应,确定最终反应时间为 15 min(表 8)。

表 8 不同底物作用时间的 ELISA 结果

Tab 8 ELISA results of different substrates reaction time

底物作用时间	P	N	P/N
10 min	0.892	0.114	7.83
15 min	1.174	0.127	9.25
20 min	1.234	0.136	9.06

注释同表 1

2.9 阴阳性临界值的确定 按照已建立的 IBDV 抗体间接 ELISA 方法进行检测。通过对 370 份阴性鸡血清样品进行检测,计算得到阴性血清的 OD_{450 nm} 平均值为 0.144,标准差为 0.048,临界值 = 平均值 + 3 × 标准差 = 0.144 + 3 × 0.044 = 0.288 (表 9)。

表 9 370 份鸡阴性血清的 ELISA 测定结果

Tab 9 ELISA results of 370 negative serum samples

样品	OD _{450 nm}									
1 ~ 10	0.111	0.160	0.109	0.119	0.155	0.185	0.116	0.116	0.083	0.180
11 ~ 20	0.098	0.121	0.135	0.129	0.111	0.094	0.137	0.121	0.122	0.133
21 ~ 30	0.139	0.142	0.135	0.136	0.136	0.093	0.104	0.161	0.137	0.128
31 ~ 40	0.129	0.115	0.121	0.130	0.214	0.190	0.104	0.156	0.121	0.133
41 ~ 50	0.106	0.155	0.093	0.075	0.13	0.157	0.118	0.140	0.135	0.093
51 ~ 60	0.189	0.086	0.122	0.112	0.086	0.113	0.148	0.120	0.128	0.152
61 ~ 70	0.135	0.103	0.134	0.137	0.244	0.115	0.107	0.171	0.243	0.117
71 ~ 80	0.219	0.146	0.196	0.170	0.189	0.134	0.126	0.134	0.139	0.206
81 ~ 90	0.211	0.154	0.220	0.164	0.211	0.147	0.231	0.183	0.264	0.183
91 ~ 100	0.191	0.157	0.226	0.195	0.196	0.150	0.141	0.097	0.101	0.094
101 ~ 110	0.099	0.092	0.119	0.111	0.108	0.113	0.106	0.113	0.096	0.087
111 ~ 120	0.143	0.092	0.160	0.243	0.107	0.128	0.201	0.136	0.118	0.142
121 ~ 130	0.177	0.139	0.148	0.111	0.116	0.105	0.206	0.166	0.150	0.099
131 ~ 140	0.115	0.114	0.193	0.104	0.122	0.122	0.131	0.164	0.166	0.119
141 ~ 150	0.128	0.135	0.125	0.111	0.237	0.181	0.091	0.106	0.146	0.113
151 ~ 160	0.111	0.144	0.099	0.088	0.095	0.090	0.078	0.090	0.094	0.176
161 ~ 170	0.119	0.081	0.210	0.122	0.093	0.115	0.090	0.095	0.106	0.149
171 ~ 180	0.085	0.111	0.144	0.176	0.101	0.111	0.279	0.153	0.135	0.140
181 ~ 190	0.108	0.100	0.116	0.181	0.131	0.136	0.165	0.133	0.142	0.173
191 ~ 200	0.123	0.201	0.188	0.114	0.088	0.119	0.093	0.101	0.129	0.096
201 ~ 210	0.115	0.113	0.224	0.135	0.172	0.113	0.135	0.111	0.105	0.183
211 ~ 220	0.174	0.147	0.141	0.175	0.140	0.166	0.225	0.131	0.107	0.110
221 ~ 230	0.149	0.267	0.153	0.184	0.192	0.225	0.097	0.208	0.150	0.254
231 ~ 240	0.244	0.241	0.237	0.152	0.233	0.191	0.140	0.162	0.170	0.169
241 ~ 250	0.279	0.128	0.187	0.183	0.247	0.163	0.269	0.230	0.111	0.164
251 ~ 260	0.217	0.112	0.279	0.194	0.128	0.132	0.134	0.144	0.196	0.259
261 ~ 270	0.124	0.242	0.191	0.195	0.248	0.246	0.258	0.165	0.079	0.107
271 ~ 280	0.096	0.078	0.110	0.128	0.116	0.146	0.129	0.078	0.099	0.098
281 ~ 290	0.085	0.103	0.113	0.101	0.106	0.098	0.105	0.087	0.135	0.172
291 ~ 300	0.23	0.237	0.186	0.248	0.181	0.257	0.195	0.256	0.122	0.083
301 ~ 310	0.229	0.156	0.149	0.209	0.117	0.220	0.201	0.191	0.153	0.111
311 ~ 320	0.211	0.222	0.075	0.075	0.096	0.217	0.117	0.213	0.078	0.097
321 ~ 330	0.131	0.080	0.097	0.082	0.102	0.093	0.084	0.085	0.094	0.100
331 ~ 340	0.127	0.107	0.205	0.122	0.119	0.197	0.099	0.094	0.116	0.083
341 ~ 350	0.104	0.131	0.100	0.106	0.123	0.095	0.095	0.122	0.170	0.068
351 ~ 360	0.090	0.184	0.115	0.094	0.108	0.093	0.116	0.187	0.111	0.083
361 ~ 370	0.087	0.109	0.161	0.131	0.176	0.167	0.241	0.237	0.181	0.118

2.10 特异性试验 用已建立的 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法对抗 EDSV、NDV、IBV、ILTV、REV、ALV(H5)、ALV(H9)和 HVT 等 8 种禽常见传染病病毒阳性血清和鸡大肠杆菌阳性血清进行测定,检测结果均为阴性,证明无血清交叉反应,建立的 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法具有很好的特异性(表 10)。

表 10 ELISA 方法特异性试验结果

Tab 10 The results of the specificity of ELISA method

血清	OD _{450nm}	判定
标准阳性血清	0.805	试验成立
标准阴性血清	0.072	试验成立
AIV - H9	0.085	阴性
AIV - H5	0.080	阴性
REV	0.128	阴性
HTV	0.185	阴性
IBV	0.139	阴性
EDS	0.141	阴性
NDV	0.086	阴性
ILTV	0.081	阴性
鸡大肠杆菌阳性血清	0.076	阴性

2.11 敏感性试验 表 11 结果表明,本试验建立的 ELISA 方法检测 1:400 至 1:1600 倍稀释的血清均为阳性,IDEXX 公司生产的 IBDV 抗体检测试剂盒检测的最高限 1:1600 为阳性,说明两者的敏感性相当(表 11)。

表 11 ELISA 方法敏感性试验结果

Tab 11 The results of the sensitivity of ELISA method

样品及标准血清	不同稀释度血清 OD _{450 nm}			
	1:400	1:800	1:1600	1:3200
1	0.968	0.656	0.389	0.234
2	0.836	0.546	0.375	0.209
3	0.652	0.432	0.253	0.160
4	0.807	0.510	0.320	0.196
标准阳性血清	0.809	0.660	0.381	0.292
标准阴性血清	0.096	0.080	0.064	0.058

2.12 重复性试验

2.12.1 批内重复性试验 结果见表 12,变异系数为 3.3%~7.3%,小于 10%,表明有很好的批内重复性。

2.12.2 批间重复性试验 结果见表 12,变异系数为 1.9%~6.0%,小于 10%,表明有很好的批间重复性。

表 12 ELISA 方法批内重复试验和批间重复试验结果

Tab 12 The results of the repeated batch test and iner batch test

血清	批内重复试验				批间重复试验		
	样品 OD _{450nm}		变异系数 CV	样品 OD _{450nm}		变异系数 CV	
	平均值	标准差		平均值	标准差		
阳性血清	1	0.935	0.053	0.057	1.039	0.035	0.034
	2	0.762	0.031	0.041	0.837	0.016	0.019
	3	0.921	0.033	0.036	1.017	0.024	0.024
	4	0.763	0.025	0.033	0.850	0.051	0.060
阴性血清	1	0.152	0.006	0.039	0.177	0.008	0.045
	2	0.137	0.010	0.073	0.155	0.005	0.032
	3	0.235	0.010	0.043	0.262	0.011	0.042
	4	0.087	0.003	0.034	0.095	0.002	0.021

2.12.3 与 IDEXX 公司 IBDV 抗体检测试剂盒进行符合率比较 结果见表 13。建立的 IBDV 抗体间接 ELISA 检测方法,检测结果为阳性 12 份,阴性

172 份;IDEXX 公司 IBDV - ELISA 抗体试剂盒的检测结果为阳性 14 份阳性,阴性 170 份,符合率为 95.7%。

表 13 建立的间接 ELISA 方法与 IDEXX - ELISA 试剂盒检测结果比较

Tab 13 Comparison the results of the indirect ELISA method with the IDEXX - ELISA kit

间接 ELISA 方法	IDEXX 试剂盒		合计	符合率
	阳性	阴性		
阳性	9	3	12	95.7%
阴性	5	167	172	
合计	14	170	184	

3 讨论

目前,商品化的 IBD 抗体间接 ELISA 试剂盒采用的是全病毒包被酶标板,病毒的制备过程繁琐,成本高,不利于推广应用,而且全病毒包被,有较强的背景反应和非特异性反应,易造成实验结果不准确。在 IBDV 的 5 个病毒蛋白中,VP2 和 VP3 蛋白均可以用来研制 IBDV 的抗体检测试剂盒,VP2 是病毒的衣壳蛋白,也是病毒的主要保护性抗原,有研究表明用 VP2 蛋白来研制 IBDV 抗体检测试剂盒比 VP3 具有更好的优势^[7-8]。虽然,IBD 重组 VP2 蛋白可由多种表达系统进行表达^[9-12],但若研制 IBDV 抗体检测试剂盒,大肠杆菌表达系统是首选,表达量高,生产和纯化方便。为此,试验选用重组 VP2 蛋白作为包被抗原,并通过原核表达系统来制备,操作简便,经济,特异性高。

在对临床样品的检测中,本方法跟 IDEXX 公司的试剂盒相比符合率很高,IDEXX 试剂盒多检出的两份阳性样品,用经典的琼脂扩散试验方法(参照《中国兽药典》2020 年版三部)进行复核,结果为阴性,与本方法检测结果一致,说明本方法检测准确率高。酶标液的选择是影响 ELISA 试验特异性的主要因素^[13]。研究使用 10% 的马血清做为封闭液封闭酶标板,大大降低了非特异性因素影响。包被抗原的浓度和阴阳性血清稀释度是否适宜也影响 ELISA 试验特异性和敏感性,试验中阳性血清稀释到 1:1600 仍然能检测出来,说明方法的敏感性非常好。抗原的包被浓度如果太高,蛋白分子间相互作用会造成分子的多层化,洗的时候这些蛋白容

易被洗掉,造成试验的非特异性;浓度太低,载体表面吸附的抗原量太少,容易出现假阴性的情况,造成结果的不准确。试验将包被抗原稀释为 8 μg/mL,每孔加入 100 μL,试验的特异性最高。血清的稀释度也直接影响试验的特异性和灵敏度。试验显示,随着血清稀释度的增加,阳性样品 OD 值有下降趋势。而阴性样品的 OD 值变化不大。可能是因为血清中蛋白成分复杂,有可能在 ELISA 反应体系会出现非特异性反应,因此对血清做适宜的稀释可降低这种非特异性反应。该方法与其他血清不出现交叉反应,说明方法的特异性好。

本研究优化了间接 ELISA 方法的反应体系和反应条件,证明方法的敏感性高、特异性和重复性好,与国外同类型的商品化试剂盒的复合率高,初步建立了检测 IBDV 抗体的间接 ELISA 方法,为商品化试剂盒的研制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 王笑梅. 鸡传染性法氏囊病的流行与防控[J]. 北方牧业, 2013(22): 17.
Wang X M. Epidemic and control of infectious bursal disease in chickens[J]. Bei Fang Mu Ye, 2013(22): 17.
- [2] 陈玉华. 危害鸡免疫系统的四种病毒性疾病[J]. 动物医学进展, 2013, 34(2): 108-113.
Chen Y H. Four viral diseases endangering chicken immune system[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(2): 108-113.
- [3] 邓凯文, 徐斌, 何琴, 等. 鸡传染性法氏囊病毒的分离和鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(9): 134-136.
Deng K W, Xu B, He Q, et al. Isolation and identification of infectious bursal disease virus[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2015(9): 134-136.
- [4] 王晓丽, 钱晶, 马孙婷, 等. 传染性法氏囊病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(2): 159-167.
Wang X L, Qian J, Ma S T, et al. Development of a ELISA using *E. coli*-expressed truncated VP2 for specific and sensitive detection of antibodies against infectious bursal disease virus[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(2): 159-167.
- [5] 马飞. 鸡传染性法氏囊病间接 ELISA 抗体检测试剂盒的研制[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005(6): 11-12.

- Ma F. Development of indirect ELISA antibody detection kit for infectious bursal disease of chicken [J]. Shanghai Animal Husbandry and Veterinary Communication, 2005(6): 11-12.
- [6] 刘丹, 杨承槐, 吴华伟, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒 BC6/85 株 VP2 基因的原核表达、纯化及鉴定[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(5): 17-21.
- Liu D, Yang C H, Wu H W, *et al.* Prokaryotic expression, purification and identification of VP2 gene of infectious bursal disease virus BC6/85 strain [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(5): 17-21.
- [7] 祁小乐, 王笑梅, 高玉龙, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(8): 656-660.
- Qi X L, Wang X M, Gao Y L, *et al.* Research progress on VP2 protein of infectious bursal disease virus of chicken [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 30(8): 656-660.
- [8] Maqsood I, Shi W, Wang L, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing VP2 protein against IBDV in chicken [J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 125(6): 1670-1681.
- [9] Azad A A, Fahey K J, Barrett S A, *et al.* Expression in *Escherichia coli* of cDNA fragments encoding the gene for the host-protective antigen of infectious bursal disease virus [J]. Virology, 1986, 149(2): 190-198.
- [10] Macreadie I G, Vaughan P R, Chapman A J, *et al.* Passive protection against infectious bursal disease virus by viral Vp2 expressed in yeast [J]. Vaccine, 1990, 8(6): 549-552.
- [11] Shaw I, Davison T F. Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype [J]. Vaccine, 2000, 18(28): 3230-3241.
- [12] Snyder D B, Vakharia V N, Mengel-Whereat S A, *et al.* Active cross-protection induced by a recombinant baculovirus expressing chimeric infectious bursal disease virus structural proteins [J]. Avian Diseases, 1994, 38(4): 701-707.
- [13] 马秀丽. 鸡传染性法氏囊病 ELISA 监测方法的标准化研究 [D]. 山东农业大学, 2010.
- Ma X L. Study on standardization of ELISA monitoring method for infectious bursal disease of chicken [D]. Shandong Agricultural University, 2010.

(编辑:李文平)