

禽流感病毒 H9 亚型特异性抗原捕捉 ELISA 检测方法的研究*

宋建领¹, 张文东², 王金萍¹, 李作生³, 冯子良³, 胡媛媛¹,
郭松辉¹, 张应国², 范泉水³, 宋学林², 邱薇³, 张富强³

(1. 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南 昆明 650224;

2. 云南省动物疫病预防控制中心, 云南 昆明 650051; 3. 成都军区疾病预防控制中心, 云南 昆明 650032)

摘要: 采用禽流感病毒多克隆抗体及 H9 亚型特异性单克隆抗体, 研究建立 H9 亚型特异性抗原捕捉 ELISA 检测方法, 用于检测 H9 亚型禽流感病毒. 优化了反应条件, 确定了包被抗体、检测抗体及酶结合物的最佳工作浓度, 对该方法的敏感性、特异性、重复性及稳定性分析, 并与 RT-PCR 方法比较. 通过使用该方法对野外样品进行检测. 结果表明该方法敏感、特异, 具有良好的重复性和稳定性, 可用于检测临床样品、鸡胚培养物及细胞培养物中的 H9 亚型禽流感病毒.

关键词: 禽流感病毒; H9 亚型特异性; 抗原捕捉 ELISA

中图分类号: S 855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2008)01-0087-05

禽流感(Avian influenza, AI or bird flu)是由正粘病毒科、流感病毒属 A 型流感病毒(Influenza virus type A)引起的严重危害养禽业的一种烈性传染病^[1]. 世界动物卫生组织(OIE)将其列为 A 类疫病^[2], 我国动物防疫法规定为一类动物传染病. 1992 年陈伯伦等在广东某蛋鸡场的鸡中分离到 H9N2 亚型禽流感毒株, 其后几年由该亚型病毒引起的禽流感疫情不断增多. H9N2 虽然为中低致病力毒株, 但它分布广泛, 能造成宿主的免疫抑制, 并且可与其他病原微生物通过协同作用引起禽类发病, 对养禽业的危害不容忽视. 近几年来, 禽流感呈世界性发生和流行, 给世界养禽业造成了重大经济损失, 具有重要的公共卫生意义, 给人类健康造成严重威胁, 引起全球的高度重视. 目前禽流感病原诊断通常采用病毒分离鉴定和 RT-PCR 2 种方法^[2,3], 难以在基层大面积推广使用. ELISA 以其高敏感性、高特异性、经济、简便的特点, 在疫病诊断和监测中发挥了重要作用. 国际上已有采用抗原捕捉 ELISA 检测流感病毒抗原的报道并有商品化

试剂盒^[2,4], 建立了禽流感间接 ELISA, Dot-ELISA 抗体检测技术及夹心 ELISA 抗原检测技术^[5-8]. 本研究在获得禽流感病毒多克隆抗体及 H9 亚型特异性单克隆抗体的基础上, 研究建立 H9 亚型特异性抗原捕捉 ELISA (Antigen Capture ELISA, AC-ELISA) 检测方法, 用于检测临床样品或鸡胚、细胞培养物中的禽流感病毒.

1 材料与方 法

1.1 病毒、野外样品 来源于不同时间、不同禽类的 H9N2, H5N1 亚型禽流感及新城疫(ND)、传染性支气管炎(IB)、传染性喉气管炎(ILT)、传染性法氏囊病(IBD)、减蛋综合症(EDS-76)、马立克氏病(MD)病毒及鸡慢性呼吸道病(MG)病原, 本实验室分离、保存, 由哈尔滨兽医研究所和本实验室鉴定, 并采用 0.05%~0.1% β -丙内酯灭活. 野外样品为自云南 16 个地州(市)采集的 8 423 份喉、气管组织或拭子及 10 份健康鸡喉、气管组织和拭子.

1.2 试剂、酶标板及仪器 H9N2 亚型禽流感病毒

* 收稿日期: 2007-03-28

基金项目: 云南省科技攻关项目(2006NG-24); 昆明市科技重点资助项目(06N114134); 云南省后备人才基金资助项目(2005PY01-12).

作者简介: 宋建领(1974-), 男, 山东人, 硕士, 副研究员, 主要从事分子病毒学方面的研究.

通讯作者: 张富强, E-mail: zfq1968@yahoo.com.cn.

重组血凝素蛋白(经凝胶切割洗脱液洗脱纯化获得,蛋白质量浓度为 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$), BL21 大肠杆菌菌体裂解物, 本实验室制备、保存. H9 血凝抗原购自哈尔滨兽医研究所. Protein A 亲和层析柱购自美国 BIO-RAD 公司. 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司. OPD 底物购自 SIGMA 公司. 高亲合性 96 孔酶标板购自 Costar 公司. EmaxTM 酶标仪购自美国分子设备有限公司(Molecular Devices Corporation). 4060 紫外分光光度计购自瑞典 Pharmacia 公司.

1.3 包被抗体和检测抗体 包被抗体和检测抗体均由本实验室按常规方法制备、保存. 包被抗体采用抗 H9N2 亚型禽流感病毒的鸡高免血清, 经硫酸铵沉淀法纯化, 按常规测定血凝抑制效价后混合血清. 检测抗体采用抗 H9N2 亚型流感病毒血凝素亚型特异性单克隆抗体, 并采用 Protein A 亲和层析柱按试剂盒提供的操作手册进行浓缩、纯化, 紫外定量后, 经直接 ELISA 检测已知病毒和重组血凝素蛋白评价其特异性.

1.4 抗原捕捉 ELISA(AC-ELISA)

1.4.1 试验程序 稀释后的包被抗体, 按 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 包被 ELISA 板, 混匀后置湿盒密封 4°C 过夜或 37°C 振荡 1 h, 洗板, 加抗原或待检样品 $200 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 振荡孵育 1 h, 洗板, 加稀释后的检测抗体 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 振荡孵育 1 h, 洗板, 加稀释后的酶结合物 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 振荡 1 h, 洗板, 加底物避光显色 20 min, $2 \text{ mol}/\text{L}$ H_2SO_4 $50 \mu\text{L}/\text{孔}$ 终止, 测定 490 nm 光密度值. 计算 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 试验组与 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 阴性对比如值.

1.4.2 各组分最佳工作浓度的确定 滴定包被抗体、检测抗体、酶结合物、重组血凝素蛋白的浓度, 测定重组抗原阳性对照孔 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 在 $1.0 \sim 1.2$ 之间的各组分最高稀释浓度, 优化 ELISA 反应条件, 以期提高检测敏感性和特异性.

1.5 判定标准的确定 检测 10 份健康鸡泄殖腔拭子样品, 测定其 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 值, 按统计学方法确定 ELISA 的判定标准.

1.6 敏感性试验 应用 AC-ELISA 检测已知禽流感病毒, 评价其覆盖率. 选取 1 株 H9N2, 1 株 H5N1 亚型禽流感病毒及 1 株新城疫病毒自 1:2 倍比稀释至 1:4 096, 应用 AC-ELISA 和传统血凝试验同步检测, 评价其敏感性.

1.7 特异性试验 应用 AC-ELISA 检测灭活后的新城疫(ND)、传染性支气管炎(IB)、传染性喉气管炎(ILT)、传染性法氏囊病(IBD)、减蛋综合症

(EDS-76)、马立克氏病(MD)病毒及鸡慢性呼吸道病(MG)病原, 评价其特异性.

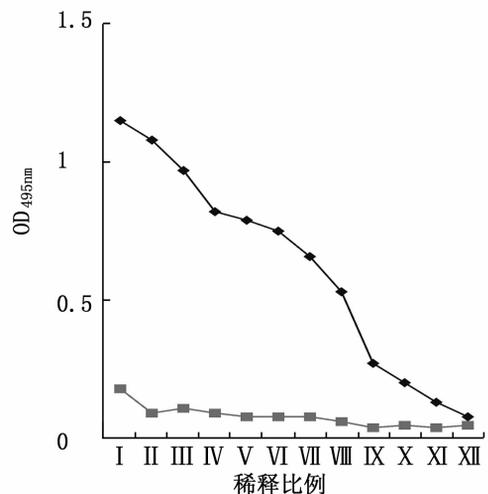
1.8 重复性和稳定性试验 固定样品, 对同一批次和 3 批不同批次的 AC-ELISA 试剂进行重复检测, 评价其重复性; 对保存于 4°C 6 个月的 3 批不同批次的 AC-ELISA 试剂按月进行重复检测, 评价其稳定性.

1.9 野外样品检测 检测自云南 16 个地州(市)采集灭活后的 8 423 份喉、气管组织或拭子样品, 并与病毒分离结果比较, 对其敏感性、特异性和应用价值进行评价.

2 结果

2.1 包被抗体和检测抗体浓度 硫酸铵沉淀法纯化后的抗 H9N2 亚型流感病毒的鸡高免血清, 血凝抑制效价为 $2^{11} \sim 2^{12}$, 作为包被抗体. Protein A 亲和层析柱纯化的 H9 亚型特异性单克隆抗体, 经紫外定量, 蛋白质量浓度为 $1.03 \text{ g}/\text{L}$.

2.2 单克隆抗体特异性 单克隆抗体能与纯化后的重组血凝素蛋白(图 1)及来源于不同时间、不同禽类的 18 株 H9 亚型禽流感病毒尿囊液 ($\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 值 $0.68 \sim 1.21$) 发生特异性反应, 而与 H5N1 亚型禽流感病毒 ($\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 值 0.04), 新城疫 ($\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 值 0.04) 等相关病毒无交叉反应, 详细结果见表 1. 提示单克隆抗体针对 H9 亚型禽流感病毒血凝素蛋白中的共有表位, 具有 H9 亚型特异性.



I:1:20; II:1:40; III:1:80; IV:1:160;
V:1:320; VI:1:640; VII:1:1280; VIII:1:2516;
IX:1:10240; X:1:20480; XI:1:40960; XII:1:81920
◆—重组H9蛋白 ■—大肠杆菌对照

图 1 单克隆抗体特异性分析

Fig. 1 Specificity of the monoclonal antibody to recombinant H9 by ELISA using

表 1 抗原捕捉 ELISA 检测 H9 亚型禽流感病毒结果

Tab.1 H9 subtype avian influenza virus result of antigen capture ELISA

病毒编号	H9-1	H9-2	H9-3	H9-4	H9-5	H9-6	H9-7	H9-8	H9-9	H9-10
OD _{490nm} 值	0.69 ± 0.005	0.73 ± 0.005	0.78 ± 0.006	0.68 ± 0.005	0.72 ± 0.005	0.95 ± 0.007	0.87 ± 0.004	0.94 ± 0.003	0.79 ± 0.006	0.97 ± 0.005
病毒编号	H9-11	H9-12	H9-13	H9-14	H9-15	H9-16	H9-17	H9-18	阳性对照	阴性对照
OD _{490nm} 值	1.05 ± 0.004	1.01 ± 0.006	0.88 ± 0.007	0.74 ± 0.005	1.21 ± 0.005	0.93 ± 0.005	0.82 ± 0.004	0.94 ± 0.005	1.13 ± 0.004	0.04 ± 0.004

2.3 最佳工作浓度的确定 当重组 H9 蛋白作 1:1 000 倍稀释,包被抗体、检测抗体、酶结合物稀释度分别为 1:3 000,1:500,1:500,阳性孔 OD_{490nm} 值达 1.11,菌体裂解物对照孔和阴性尿囊液对照孔 OD_{490nm} 值分别为 0.04,0.05,且考虑到各组分采用更高稀释度后,均引起阳性孔 OD_{490nm} 值出现 30%~40% 的下降,阴性对照孔无明显差异.因此确定 AC-ELISA 包被抗体、检测抗体、酶结合物最佳工作浓度分别为 1:3 000,1:500,1:500.

2.4 判定标准的确定 检测 10 份健康鸡泄殖腔拭子,根据统计学原理,样品 OD_{490nm} 值 > 阴性样品 OD_{490nm} 平均值 + 3SD 时,可以在 99.9% 的水平上判定为阳性.10 份阴性样品 OD_{490nm} 平均值为 0.062(0.041~0.084),标准方差(SD)为 0.016,OD_{490nm} 值大于 0.11 可判为阳性.为了便于基层判定结果,确定 OD_{490nm} 值大于 0.15,且 OD_{490nm} 试验组与 OD_{490nm} 阴性对照比值大于 2,作为 AC-ELISA 阳性判定标准.

2.5 敏感性和特异性试验 AC-ELISA 检测 18 株 H9 亚型禽流感病毒,结果均为阳性,其 OD_{490nm} 值 0.66~1.23,阴性对照 OD_{490nm} 值 0.05.提示 AC-ELISA 能检测来源于不同时间、不同禽类的禽流感病毒 H9 亚型.

所检测的 1 株 H9 亚型病毒血凝价为 2⁶(1:64),1 株 H5 亚型和 1 株新城疫病毒血凝价病毒均为 2⁸(1:256).H9 亚型病毒作 1:256(2⁸)倍稀释后,AC-ELISA 检测 OD_{490nm} 值为 0.16(阴性对照 OD_{490nm} 值为 0.05),呈阳性;1 株 H5 亚型病毒和新城疫病毒检测结果为阴性(图 2).提示 AC-ELISA 较传统血凝试验敏感 4 倍.

2.6 特异性试验 AC-ELISA 检测新城疫(ND)、传染性支气管炎(IB)、传染性喉气管炎(ILT)、传染性法氏囊病(IBD)、减蛋综合症(EDS

-76)、马立克氏病(MD)病毒及鸡慢性呼吸道病(MG)病原均为阴性.表明 AC-ELISA 具有较高的特异性(表 2),与相关病原体无交叉反应.

2.7 重复性和稳定性试验 AC-ELISA 批内和批间重复检测 OD_{490nm} 值波动范围(变异系数)在 1.46%~3.98% 之间,保存于 4℃ 6 个月的试剂重复检测 OD_{490nm} 值波动范围(变异系数)在 1.98%~4.87% 之间,变异系数均小于 5%.表明 AC-ELISA 有良好的重复性和稳定性,整套试剂 4℃ 保存期 6 个月检测稳定性基本不变.

2.8 野外样品检测 应用 H9N2 亚型特异性 AC-ELISA 检测自云南 16 个地州(市)采集的 8 423 份喉、气管组织或拭子样品,并与传统的病毒分离鉴定结果比较,其敏感性、特异性和符合率详见表 3.

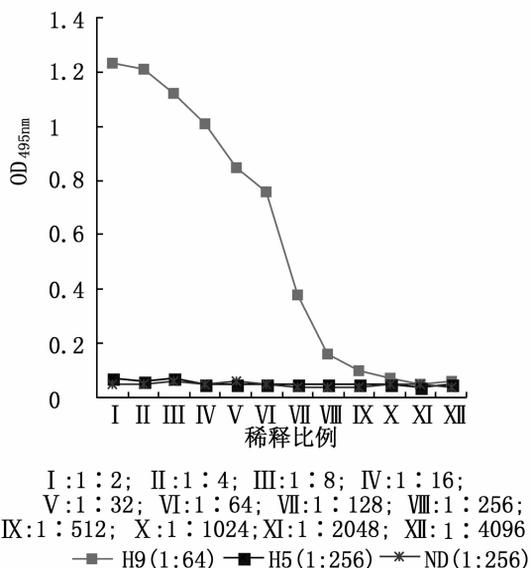


图 2 抗原捕捉 ELISA 敏感性和特异性分析

Fig.2 Sensitivity analysis of antigen capture ELISA

表 2 抗原捕捉 ELISA 特异性分析

Tab.2 Specificity analysis of antigen capture ELISA

相关禽类 病毒	H5	NDV	IBV	ILTV	IBDV	EDS76	MDV	MG	阳性 对照	阴性 对照
OD _{490 nm} 值	0.06 ± 0.005	0.05 ± 0.005	0.04 ± 0.006	0.05 ± 0.007	0.04 ± 0.005	0.05 ± 0.004	0.03 ± 0.005	0.05 ± 0.007	1.11 ± 0.006	0.04 ± 0.006

表 3 AC-ELISA 对野外样品检测的特异性、敏感性符合率分析

Tab.3 Specificity, sensitivity and coincidence analysis of AC-ELISA in clinical tissue samples

方法	阳性/例	阴性/例	敏感性/%	特异性/%	符合率/%
病毒分离	15	8 408			
AC-ELISA	14	8 409	93.3	100	96.5

3 讨 论

(1) H5N1 高致病性禽流感的发生和危害,以及对人类健康的威胁引起各国广泛重视. H9N2 亚型的发生和危害同样应该给予高度重视,因为 H9N2 亚型不仅流行于全世界,而且可以感染人类. 1994 年,陈伯伦等^[9]报道广东的某些鸡场发生 H9N2 亚型禽流感病毒以来,陈福勇、付朝刚、唐秀英等^[10,11]也相继介绍了我国从病鸡、鸭、鹌鹑体内分离到多株 H9N2 亚型禽流感病毒和发病情况,从我国部分养鸡场的禽流感调查,说明 H9 亚型禽流感在我国广大地区存在,是我国禽流感的主要流行亚型,同时给我国的养禽业造成巨大的经济损失.

(2) 禽类呼吸道疾病仍然是当前困扰和制约我国养禽业发展的重要问题之一,如新城疫、禽流感、传染性支气管炎、传染性喉气管炎、传染性鼻炎、慢性呼吸道病等,由于缺乏特征性临床症状和病理剖检变化,确诊依赖实验室诊断^[1,2]. 血清抗体检测无法区分野毒感染和疫苗免疫动物,不能实时反应疫病分布、流行、传播动态,病毒分离鉴定周期长、成本高、需要在生物安全实验室或国家指定研究机构进行,RT-PCR 依赖特定的设备、良好的实验室条件和高素质的技术人员,难以在疫区和基层推广应用. 快速、有效的抗原诊断技术已成为急需研究建立的关键技术.

(3) 国外已有采用抗原捕捉 ELISA 检测流感病毒抗原的报道^[2,4],近几年建立的 ELISA 方法主要是用于检测禽流感抗体^[5~7],肖运才等采用

鸡、兔高免血清建立夹心 ELISA 检测禽流感病毒取得一定进展^[8],但存在正常鸡胚组织或尿囊液的本底干扰. 本研究采用高纯度的特异性抗 H9N2 亚型禽流感病毒的鸡高免多克隆抗体,具有广泛的捕获待检样品中 H9 亚型病毒的作用,而检测抗体采用抗 H9 亚型流感病毒血凝素特异性单克隆抗体,具有 H9 亚型特异性,既可以特异检测 H9 亚型禽流感病毒,又可以排除正常鸡胚组织或尿囊液的本底干扰. 本研究建立的抗原捕捉 ELISA,用于检测临床样品及鸡胚组织、细胞培养物中的 H9 亚型禽流感病毒,是可行的.

(4) H9 亚型抗原捕捉 ELISA 检测滴度较传统血凝滴度高 4 倍以上,且与禽流感病毒 H5、新城疫等相关病毒无交叉反应,能检测本实验室不同时期自不同禽类分离获得的所有 H9 亚型禽流感病毒,野外样品检测结果与病毒分离结果基本一致,具有良好的重复性和稳定性,4~5 h 可获得结果,加之其检测对象为灭活后的病毒样品,表明所建立的抗原捕捉 ELISA 具有快速、简便、经济、安全、敏感、特异的优点,在预防和控制禽流感中有一定应用价值. 由于受实验条件和有关规定的限制,未能采用其它亚型病毒对所建立的 H9 亚型抗原捕捉 ELISA 的特异性进行评价.

参考文献:

- [1] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 高福,苏敬良,译. 北京: 中国农业出版社,1999.
- [2] Office Internation des Epizootites. List A and B diseases

- of mammals, birds and bees: manual of standards for diagnostic tests and vaccines[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2004.
- [3] 戚中田. 禽流感病毒与人类禽流感[J]. 中国科学基金, 2004, 2: 68-71.
- [4] World Health Organization. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance [EB/OL]. <http://www.who.int/csr/resources/publication/influenza> WHO-CDS-CR-NCS-2002-5/en/.
- [5] SHAFER A L, KATZ J B, EERNISSE K A. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera[J]. Avian Dis, 1998, 42: 28-34.
- [6] 李海燕, 于康震, 辛晓光, 等. 禽流感病毒重组核蛋白 ELISA 诊断技术的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(3): 182-185.
- [7] 李海燕, 于康震, 辛晓光, 等. 禽流感间接 ELISA 诊断试剂盒的研制及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(5): 372-376.
- [8] 肖运才, 李自力, 胡思顺, 等. 禽流感病毒夹心 ELISA 快速检测方法的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(5): 536-541.
- [9] 陈伯伦, 张泽幻, 陈伟斌, 等. 禽流感研究 I, 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 30(10): 3-5.
- [10] 陈福勇, 亚春. 禽流感 A/鸡/北京/1/96(H₉N₂)核蛋白基因克隆和序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(2): 51-54.
- [11] 唐秀英, 田园斌, 赵传珊, 等. 中国禽流感流行株的分离鉴定[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(1): 1-5.

Development of subtype-specific antigen capture ELISA for detection of H9 subtype avian influenza virus

SONG Jian-ling¹, ZHANG Wen-dong², WANG Jun-ping¹, LI Zuo-sheng³,
FENG Zi-liang³, HU Yuan-yuan¹, GUO Song-hui¹, ZHANG Ying-guo²,
FAN Quan-shui³, SONG Xue-lin², QIU Wei³, ZHANG Fu-qiang³

(1. Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Diseases Laboratory, Kunming 650224, China;

2. Yunnan General Veterinary Station, Kunming 650051, China;

3. Centre for Disease Prevention and Control, Chengdu Military Region, Kunming 650032, China)

Abstract: By using avian influenza polyclonal antibody and H9 subtype-specific monoclonal antibody, a H9 subtype specific antigen capture ELISA was developed for detection of H9 subtype avian influenza virus. The reactive condition and the working titers of coating antibody, detective antibody and enzyme-labeled conjugate were optimized, and the assay sensitivity, specificity, repeatability, stability were analyzed and compared with RT-PCR. The results indicated that antigen capture ELISA was sensitive, specific, with high repeatability and stability for detection of H9 subtype avian influenza virus in clinical samples, embryo and cell culture tissues.

Key words: avian influenza virus; H9 subtype-specific; antigen capture ELISA