

禽流感病毒型及亚型特异性免疫酶染色技术的研究^{*}

金卫华¹, 宋建领², 张文东³, 赵毅⁴, 王金萍², 李作生⁵, 冯子良⁵, 胡媛媛², 郭松辉²,
张应国³, 范泉水⁵, 宋学林³, 邱薇⁵, 张富强⁵

(1. 昆明市动物疫病预防控制中心, 云南 昆明 650223; 2. 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南 昆明 650224; 3. 云南省动物疫病预防控制中心, 云南 昆明 650051; 4. 陕西省动物疫病预防控制中心, 陕西 西安 710016; 5. 成都军区疾病预防控制中心, 云南 昆明 650032)

摘要: 在获得禽流感病毒型及亚型特异性单克隆抗体的基础上, 研究建立型及亚型特异性免疫酶染色技术, 用于检测或鉴定禽流感病毒。优化反应条件, 确定单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记二抗的最佳工作浓度, 进行敏感性、特异性、重复性及稳定性分析, 并与病毒分离鉴定比较。结果表明该方法敏感、特异, 具有良好的重复性和稳定性, 可用于检测临床组织样品、鸡胚及细胞培养物中的禽流感病毒。

关键词: 禽流感病毒; 型特异性; 亚型特异性; 免疫酶染色

中图分类号: S 855.3 文献标识码: A 文章编号: 0258-7971(2008)05-0526-05

禽流感是由 A 型流感病毒引起的一种禽类的感染和疾病综合征^[1]。高致病性禽流感是由部分 H5、H7 亚型禽流感病毒引起, 主要侵袭家禽、野禽, 引起高发病率、高死亡率的烈性传染病, 并可感染人、马、猪^[2]。目前 H5N1 亚型高致病性禽流感在全球呈蔓延趋势, 引起数以亿计的家禽及野生鸟类发病、死亡或被扑杀。禽流感病毒(*Avian influenza virus*, AIV) 属于正粘病毒科(Orthomyxoviridae) 流感病毒属(*Influenza virus*) A 型流感病毒(*Influenza type A viruses*) 成员, 病毒粒子表面分布密集的钉状物或突起物, 包含血凝素和神经氨酸酶。其抗原性差异确定病毒亚型的划分, 目前已知 HA 共有 16 种亚型(H1, H16)^[3], NA 共有 9 种亚型(N1, N9)。禽流感病毒感染后引起的临床症状和病理变化, 因感染禽的种类、年龄、免疫状况、继发或混合感染情况、病程长短及感染毒株的毒力等不同而表现不一致, 缺乏特征性症状和病理剖检变化, 易与新城疫、传染性支气管炎、传染性喉气管炎、传染性法氏囊病、及鸡慢性呼吸道病等疫病相混淆, 因此禽流感确诊必须依赖实验室诊断^[4, 5]。免疫酶

技术具有特异性强、敏感性高、速度快、不需要特殊设备、安全的优点, 在疫病诊断中发挥重要作用^[6~8]。在获得禽流感病毒型及 H5N1, H9N2 亚型特异性单克隆抗体的基础上, 分别建立了禽流感病毒的免疫荧光和 ELISA 检测方法^[9~11]。本文研究建立 A 型及 H5N1, H9N2 亚型特异性免疫酶染色技术, 用于检测和鉴定临床组织样品、鸡胚及细胞培养物中的流感病毒及 H5N1, H9N2 亚型禽流感病毒。

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 H5N1, H9N2 等亚型禽流感病毒 45 株(其中 H5N1 亚型 36 株, H9N2 亚型 6 株, 非 H5, H7, H9 亚型 3 株)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, 本实验室鉴定、保存。野外样品为自云南 16 个地州(市)采集的 3 000 份喉、气管组织或拭子及 10 份健康鸡喉、气管组织和

* 收稿日期: 2007-03-28

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

作者简介: 金卫华(1967-), 女, 硕士, 高级兽医师, 主要从事禽流感等在动物疫病诊断、监测及防控技术方面的研究。

通讯作者: 张富强, 男, 博士, 研究员, 主要从事分子病毒学及免疫学方面的研究。E-mail: Zfq1968@yhoo.com.cn.

拭子。

1.2 主要试剂及器材 Protein A, Protein G 磁性珠购自 New England BioLabs 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. 3-氨基-9-乙基吡啶(AEC) 底物购自 SIGMA 公司. 96 孔平底细胞培养板购自美国 BECTON DICKINSON 公司.

1.3 单克隆抗体 A 型及 H5N1, H9N2 亚型特异性单克隆抗体, 均由本实验室制备、保存, 并采用 Protein A, Protein G 磁性珠按抗体纯化试剂盒提供的操作手册进行浓缩、纯化, 紫外定量后, -20℃ 保存备用.

1.4 免疫酶染色技术

1.4.1 待检样品处理

(1) 组织触片或压印片 取新鲜组织样品, 剪开后用滤纸将切面液体吸干, 用镊子取洁净盖玻片通过酒精灯火焰后, 轻压组织切面, 室温晾干或吹干.

(2) 单层细胞 取无菌 96 孔平底细胞培养板, 每孔加 100 μL MDCK 细胞悬液(细胞浓度 $2.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$), 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24~48 h, 于倒置显微镜下观察形成单层细胞, 移弃细胞培养液, 取待检组织上清液, 按每孔 50 μL 接种单层细胞, 每个样品 2 孔, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育 30 min, 移弃组织上清液, 按每孔 200 μL 加新鲜细胞维持液, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24~48 h. 或将待检组织上清液按 10% 与 MDCK 细胞悬液(细胞浓度 $2.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) 混合, 按每孔 100 μL, 每个样品 2 孔, 加至无菌 96 孔平底细胞培养板, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24~48 h. 同时设阳性对照和健康鸡样品阴性对照.

1.4.2 试验程序 将临诊组织触片在 3% 甲醛中浸泡 10 min, 或将 96 孔细胞培养板中培养液移弃, 按每孔 300 μL 加 3% 甲醛, 室温固定 10 min. 用 PBST 浸洗 5 次, 每片加入 150 μL(或 50 μL/孔) 稀释后的禽流感型特异或亚型特异性单克隆抗体, 置于湿盒中 37℃ 孵育 30 min. 用 PBST 浸洗 3 次, 每片加入 150 μL(或 50 μL/孔) 稀释后的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗, 置于湿盒中 37℃ 孵育 30 min. 用 PBST 浸洗 3 次, 每片加入 300 μL(或 100 μL/孔) AEC 底物(称取 20 mg AEC, 用 6 mL 二甲基亚砷溶解后, 加至 50 mL pH6.0 的醋酸盐缓冲液中, 再加 40 μL 30% H₂O₂), 室温静置 30 min, 弃去底物, 每孔加入 100 μL PBS 液, 置倒置显微镜下

观察.

1.4.3 结果判定 阳性对照和阴性对照成立的前提下, 5 个以上细胞胞浆或核内存在棕红色沉淀为阳性, 表明检测样品中存在 A 型、H5N1 或 H9N2 亚型禽流感病毒.

1.4.4 各组份最佳工作浓度的确定 滴定单克隆抗体、HRP 标记二抗的工作浓度, 确定获得特异性染色的高稀释浓度, 优化免疫酶染色反应条件, 以期提高检测敏感性和特异性.

1.5 敏感性试验 应用免疫酶染色检测已知禽流感病毒, 评价其覆盖率. 选取 2 株 H5N1、2 株 H9N2 亚型禽流感病毒及 1 株新城疫病毒, 自 10^{-2} 稀释到 10^{-7} , 应用免疫酶染色(每个稀释度 8 孔)和鸡胚接种分离(每个稀释度 5 个鸡胚)同步检测, 评价其敏感性.

1.6 特异性试验 应用免疫酶染色检测新城疫(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, 评价其特异性.

1.7 重复性和稳定性试验 固定样品, 对同一批次和 3 批不同批次的免疫酶染色试剂进行重复检测, 评价其重复性; 对保存于 4℃ 6 个月的 3 批不同批次的免疫酶染色试剂按月进行重复检测, 评价其稳定性.

1.8 野外样品检测 检测自云南 16 个地州(市)采集的 3 000 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, 对其敏感性、特异性和应用价值进行评价.

2 结果

2.1 单克隆抗体浓度 Protein A, Protein G 磁珠纯化的 A 型及 H5N1, H9N2 亚型特异性单克隆抗体, 经紫外定量, 蛋白质浓度为 1.17, 1.63, 1.34 g/L.

2.2 最佳工作浓度的确定 随机选取 H5N1, H9N2, ND 毒株各 1 株, 将 A 型及 H5, H9 亚型特异性单克隆抗体和 HRP 标记二抗体分别作 1:500, 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000 稀释, 进行 16 种组合后进行免疫酶染色试验, 详细结果见表 1~3. 确定单克隆抗体及二抗的最佳工作稀释度为: A 型单克隆抗体为 1:2 000, H5 及 H9 亚型特异性单克隆抗体均为 1:1 000, HRP 标记二抗体为 1:1 000.

表 1 A 型单克隆抗体及二抗抗体稀释度筛选结果

Tab. 1 Screening results of avian influenza A type monoclonal antibody and HRP- labeled second antibody

二抗体稀释度	H5				H9				ND			
	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
1:500	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	-	-	-	-
1:1000	+	+	+	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-
1:2000	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
1:4000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : 阳性; +/- : 可疑; - : 阴性

表 2 H5 亚型单克隆抗体及二抗抗体稀释度筛选结果

Tab. 2 Screening results of avian influenza H5 subtype monoclonal antibody and HRP- labeled second antibody

二抗体稀释度	H5				H9				ND			
	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
1:500	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:1000	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:2000	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:4000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : 阳性; +/- : 可疑; - : 阴性

表 3 H9 亚型单克隆抗体及二抗抗体稀释度筛选结果

Tab. 3 Screening results of avian influenza H9 subtype monoclonal antibody and HRP- labeled second antibody

二抗体稀释度	H5				H9				ND			
	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
1:500	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	-
1:1000	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
1:2000	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
1:4000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : 阳性; +/- : 可疑; - : 阴性

2.3 免疫酶染色试验的敏感性

2.3.1 免疫酶染色试验的覆盖率 应用所建立的 A 型及 H5, H9 亚型特异性免疫酶染色试验, 检测 2002~ 2006 年不同时间、不同禽类的禽流感病毒 45 株(其中 H5N1 亚型 36 株, H9N2 亚型 6 株, 非 H5, H7, H9 亚型 3 株), 结果发现型特异性免疫酶染色试验对 45 株禽流感病毒均呈阳性反应. H5 亚型特异性免疫酶染色试验对 36 株 H5N1 亚型禽流感病毒均呈阳性反应, 与其它 9 株病毒呈阴性反应. 而 H9 亚型特异性免疫酶染色试验对 6 株 H9N2 亚型禽流感病毒均呈阳性反应, 与其它 39 株病毒呈阴性反应. 表明所建立的免疫酶染色试验具有较好的覆盖率和特异性.

2.3.2 免疫酶染色试验的敏感度 选取 5 株病毒自 10^{-2} 稀释到 10^{-7} , 应用免疫酶染色(每个稀释度

8 孔)和鸡胚接种分离(每个稀释度 5 个鸡胚)同步检测, 结果发现: 单层细胞法与鸡胚接种分离敏感性相似(表 4), 经统计学分析无显著差异.

2.4 免疫酶染色试验的特异性 应用 A 型及 H5, H9 亚型特异性免疫酶染色检测新城疫(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, 结果均为阴性(表 5), 表明 A 型及 H5, H9 亚型特异性免疫酶染色具有特异性.

2.5 重复性和稳定性试验 对同 1 批次和 3 批不同批次的免疫酶染色试剂进行重复检测, 检测结果一致; 保存于 4°C 6 个月的 3 批不同批次的免疫酶染色试剂按月进行重复检测, 检测结果一致. 表明免疫酶染色试验有良好的重复性和稳定性, 整套试

剂 4 ℃保存期大于 6 个月.

2.6 野外样品检测 应用 A 型及 H5, H9 亚型特异性免疫酶染色检测自云南 16 个地州(市)采集的

3 000 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 6.

表 4 免疫酶染色试验敏感度分析

Tab. 4 Sensitivity analysis of immunoperoxidase staining assay

毒株	病毒亚型	病毒分离 (100 μL)/ ID ₅₀	免疫酶染色(单层细胞法, 100 μL)/ ID ₅₀		
			A 型	H5 亚型	H9 亚型
ACKK00104	H5N1	10 ^{5.6}	10 ^{5.3}	10 ^{5.3}	-
ACKYN0505	H5N1	10 ^{5.8}	10 ^{5.8}	10 ^{5.6}	-
ACKYNXIE199	H9N2	10 ^{4.4}	10 ^{4.6}	-	10 ^{4.4}
ACKYN0100	H9N2	10 ^{4.3}	10 ^{4.5}	-	10 ^{4.6}
F _{48E9}	新城疫病毒	10 ⁵	-	-	-

表 5 免疫酶染色试验特异性分析

Tab. 5 Specificity analysis of immunoperoxidase staining assay

相关禽类病毒	NDV	IBV	ILTV	IBDV	EDS76	MDV	MG	阳性对照	阴性对照
型特异免疫酶染色	-	-	-	-	-	-	-	+	-
H5 亚型特异免疫酶染色	-	-	-	-	-	-	-	+	-
H9 亚型特异免疫酶染色	-	-	-	-	-	-	-	+	-

表 6 免疫酶染色对野外样品检测的特异性、敏感性及其符合率分析

Tab. 6 Specificity, sensitivity and coincidence analysis of immunoperoxidase assay in clinical tissue samples

		阳性	阴性	敏感性/ %	特异性/ %	符合率/ %	
病毒分离		377	2 623				
	A	73/ 80	87/ 80	91. 3	100	95. 4	
免疫酶染色	触片法	H5	59/ 65	101/ 95	90. 8	100	92. 1
		H9	14/ 15	146/ 145	93. 3	100	96. 2
	细胞法	A	372/ 377	2 628/ 2 623	98. 7	100	99. 2
H5		341/ 347	2 659/ 2 653	98. 3	100	99	
	H9	15/ 15	1985/ 1985	100	100	100	

3 讨论

(1) 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、慢性呼吸道病等, 由于彼此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. 我国禽流感病毒仅发现 H5N1, H5N2(台湾), H9N2 亚型毒株, 鉴于禽流感感染动物数量及种类众多, 加之疫苗的大面积使用, 且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, 严重并将长期制约我国禽流感的防制进程. 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.

(2) 本研究采用特异性单克隆抗体, 建立 A 型及 H5, H9 亚型特异性免疫酶染色试验, 可排除正常鸡胚组织及临床症状和病理剖检相似疫病病原的干扰, 用于检测临床组织样品及鸡胚组织、细胞培养物中的禽流感病毒, 是可行的.

(3) 免疫酶染色试验触片法对病毒分离阳性的野外样品组织 80 份进行检测, A 型及 H5, H9 亚型敏感性分别为 91. 3% (73/80), 90. 8% (59/65) 和 93. 3% (14/15), 敏感性较病毒分离和单层细胞法低, 但约 2 h 可获得检测结果. 单层细胞法敏感性与病毒分离一致, 48 h 可获得检测结果. 加 1 块

96 孔细胞培养板可同时进行 44 份样品的检测,不需要特殊设备,且与新城疫等相关病毒无交叉反应,能检测或鉴定不同时期自不同禽类分离获得的所有 H5N1, H9N2 亚型禽流感病毒. 野外样品检测结果与鸡胚病毒分离鉴定结果符合率在 99% 以上,具有良好的重复性和稳定性. 表明所建立的免疫酶染色试验具有快速、简便、经济、安全、敏感、特异的优点,在预防、控制、净化、根除禽流感中有一定应用价值.

(4) 由于受实验条件和有关规定的限制,未能采用其它亚型流感病毒对免疫酶染色试验的特异性、敏感性进行评价,但考虑到所建立的免疫酶染色试验能检测不同时期来源于不同禽类的禽流感病毒分离物. 能直接检测临床组织样品,其结果与病毒分离鉴定结果基本一致. 我国及东南亚目前存在的高致病性禽流感病毒为 H5N1 亚型, H9N2 亚型病毒在我国广泛分布. 因此,该方法仍可作为禽流感病毒鉴定和快速诊断的有效方法.

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] 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.
- [3] FOUCHIER R A, MUNSTER V, WALLENSTEN

- A, et al. Characterization of a novel influenza a virus hemagglutinin subtype(H16) obtained from black-headed gulls[J]. Journal of Virology, 2005, 79(5): 1814-1822.
- [4] 国际兽医局. 哺乳动物、禽和蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册[M]. 北京: 中国农业部兽医局, 2004.
- [5] World Health Organization. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance[EB/OL]. [2007-01-10]. <http://www.who.int/csr/reources/publication/influenza.WHO-CDS-CSR-NCS-2002-5/EN/>.
- [6] 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.
- [7] 李秉鸿. 用免疫酶染色技术检测 MD 蚀斑[J]. 畜牧兽医科技信息, 1998, 3: 6.
- [8] 陈海军, 程安春, 汪铭书, 等. I 型鸭肝炎病毒间接免疫酶染色检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(5): 369-373.
- [9] 宋建领, 张文东, 王金萍, 等. 禽流感病毒型及亚型特异性免疫荧光技术的研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(S1): 364-367.
- [10] 宋建领, 张文东, 王金萍, 等. 禽流感病毒 H9 亚型特异性抗原捕获 ELISA 检测方法的研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(1): 87-91.
- [11] 张文东, 宋建领, 王金萍, 等. 禽流感病毒 H5 亚型特异性抗原捕获 ELISA 检测方法的研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(6): 633-637.

Development of type and subtype-specific immunoperoxidase staining techniques for detection of *avian influenza virus*

JIN Wei-hua¹, SONG Jian-ling², ZHANG Wen-dong³, ZHAO Yi⁵, WANG Jin-ping²,
LI Zu-sheng⁴, FENG Zi-liang⁵, HU Yuan-yuan², GUO Song-hui², ZHANG Ying-guo³,
FAN Quan-shui⁵, SONG Xue-lin³, QIU Wei⁵, ZHANG Fu-qiang⁵

(1. Centre for Animal Disease Control and Prevention of Kunming, Kunming 650223, China; 2. Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Diseases Laboratory, Kunming 650224, China; 3. Centre for Animal Disease Control and Prevention of Yunnan Province, Kunming 650051, China; 4. Shanxi General Veterinary Station, Xi'an 710016, China; 5. Centre for Disease Prevention and Control, Chengdu Military Region, Kunming 650032, China)

Abstract: Based on obtaining avian influenza type and subtype-specific monoclonal antibody, the type and subtype specific immunoperoxidase staining techniques were developed for detection of avian influenza virus. The reactive condition and the working titers of monoclonal antibodies and HRP-labeled second antibody were optimized, and the assay sensitivity, specificity, repeatability, stability were analyzed and compared with virus isolation and identification. The results indicated that immunoperoxidase staining techniques were sensitive, specific, with high repeatability and stability for detection of *avian influenza virus* in clinical tissue samples, embryo and cell culture tissues.

Key words: avian influenza virus; type-specific; subtype-specific; immunoperoxidase staining