

陈兴继,魏后军,范志宇,等. 鉴别检测兔出血症病毒 1 型、2 型双抗体夹心 ELISA 方法的建立及应用[J]. 江苏农业科学,2023,51(24):161-167.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.24.022

鉴别检测兔出血症病毒 1 型、2 型双抗体夹心 ELISA 方法的建立及应用

陈兴继^{1,2,3}, 魏后军^{2,3}, 范志宇^{2,3}, 胡波^{2,3}, 宋艳华^{2,3}, 陈萌萌^{2,3}, 仇汝龙^{2,3}, 葛雷^{2,3}, 王芳^{1,2,3}

[1. 塔里木大学动物科学与技术学院,新疆阿拉尔 843300; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所/

农业农村部兽用生物制品工程重点实验室,江苏南京 210014; 3. 兽用生物制品(泰州)国泰技术创新中心,江苏泰州 225300]

摘要:为实现对兔出血症病毒 1 型(RHDV1)和兔出血症病毒 2 型(RHDV2)的有效鉴别诊断,从而有效预防和控制兔出血症,将抗 RHDV 广谱单抗 2A11 作为捕获抗体包被于 ELISA 板,以 HRP 标记的抗 RHDV1 特异性单抗 1D4、抗 RHDV2 特异性单抗 6B3 分别作为检测抗体,经条件优化,建立了鉴别检测兔出血症病毒 1 型、2 型的双抗体夹心 ELISA 方法,并进行敏感性、特异性试验,对送检的 60 份兔肝脏样品用该双抗体夹心 ELISA 方法和 RT-PCR 方法进行检测,比较这 2 种方法的符合率。结果显示,该双抗体夹心 ELISA 方法的最佳工作条件为:捕获抗体浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,2 种 HRP 标记的检测抗体的浓度均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;判定标准为:以检测抗体 HRP-1D4 检测样品 D 值 >0.195 判为 RHDV1 阳性,以检测抗体 HRP-6B3 检测样品 D 值 >0.166 判为 RHDV2 阳性;通过特异性和敏感性试验发现,该双抗体夹心 ELISA 方法具有较强特异性和较高敏感性。检测 60 份送检的兔肝脏样品,发现本方法与 RT-PCR 方法相比,检测 RHDV1 阳性样品的符合率为 100% (9/9),RHDV2 阳性样品的符合率为 82.61% (19/23),阴性样品的符合率为 87.5% (28/32),总符合率为 93.33% (56/60),且该方法阳性样品检出率高于 RT-PCR 方法。本研究建立的双抗体夹心 ELISA 方法可有效地鉴别检测 RHDV1 和 RHDV2 这 2 种不同基因型的病毒,为兔出血症的流行病学研究提供有力的技术支撑。

关键词:兔出血症病毒;双抗体夹心 ELISA;单抗;鉴别检测

中图分类号:S852.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)24-0161-07

兔出血症(rabbit hemorrhagic disease, RHD)是由兔出血症病毒(rabbit haemorrhagic disease virus, RHDV)引起的一类危及兔类健康的急性传染病,又被称为兔出血性肺炎、兔瘟,它的致死性极强,可以导致多个品种的兔子大面积死亡,典型症状包括全身实质器官的水肿、出血和瘀血等^[1]。目前,RHDV 有 RHDV1(基因型 GI.1)和 RHDV2(基因型 GI.2)2 种基因型。1984 年,中国江苏地区首次报道了 RHDV1,并在全国大部分地区和全球范围内快速传播^[2]。2010 年,法国首次报道 RHDV2^[3],并蔓延传播至欧洲多个国家,研究发现,其已取代 RHDV1 成为优势基因型^[4-5]。RHDV2 感染宿主范围更广,除

了家兔外,还感染野兔等啮齿类野生动物,且所有年龄阶段的家兔对其都易感,可导致 2~3 周龄幼兔死亡,且潜伏期更长。2020 年笔者所在团队首先发现并报道了 RHDV2 在我国暴发^[6-7]。感染 RHDV1 或 RHDV2 的家兔在临床表现上大致相同,常于感染后 24~72 h 死亡,最常见的病变为肝坏死、脾肿大、肺和气管充血和出血等^[8];通过临床症状难以鉴别诊断。目前,针对兔出血症的临床诊断方法可以划分为 2 类:一类是病毒核酸检测,主要是 RT-PCR^[9]和 qRT-PCR^[10-11]等方法,具有操作简单、检测准确性较高的优势,但由于需要使用特殊的试剂、仪器以及专业的操作技术,使得应用受到了一定的局限,从而阻碍了基层及大规模临床样本的检测。另一类是抗原检测,主要是红细胞凝集试验^[12]、胶体金试纸条^[13]以及夹心 ELISA^[14-16]等方法,但这些方法并不能鉴别检测 RHDV1、RHDV2。

双抗体夹心 ELISA 方法被广泛应用于动物疫病诊断中,具有高灵敏度和专一性,并且不需要预先纯化抗原。此外,操作简单,适用于基层和大批

收稿日期:2023-03-17

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-43-C-1)。

作者简介:陈兴继(1995—),男,云南昭通人,硕士研究生,主要从事动物疫病防控研究。E-mail:cxj125451@126.com。

通信作者:王芳,博士,研究员,主要从事家兔重要疫病致病机制及防控技术研究。E-mail:rwangfang@126.com。

样品检测。本研究以 RHDV 广谱单抗捕获 RHDV1、RHDV2, 以 HRP 标记的 RHDV1 特异性单抗、RHDV2 特异性单抗分别作为检测抗体, 建立双抗体夹心 ELISA 方法用于快速鉴别检测 RHDV1、RHDV2。

1 材料与方法

1.1 试验时间和地点

2022 年 10—12 月于江苏省农业科学院兽医研究所家兔重大疫病防控创新团队实验室进行试验。

1.2 抗体及样品

笔者所在实验室制备: 2 株抗 RHDV 广谱单克隆抗体(1B8、2A11)、2 株 HRP 标记的抗 RHDV1 特异性单克隆抗体(HRP-1D4、HRP-5F3)及 2 株 HRP 标记的抗 RHDV2 特异性单克隆抗体(HRP-6B3、HRP-4F1); 笔者所在实验室保存健康兔肝脏样品和 RHDV1、RHDV2、兔波氏杆菌(Bb)、兔巴氏杆菌(Pm)、兔 A 型产气荚膜梭菌(CpA)、肠炎沙门氏菌(Se)、轮状病毒(RV)感染死亡兔肝脏样品; 送检的死亡兔肝脏样品来自四川省、山东省、河南省等各兔养殖场。

1.3 试剂

脱脂乳、BSA、干酪素钠和底物显色液(TMB)购自北京索莱宝公司; 明胶购自北京金沙生物公司。

1.4 样品的处理

兔肝脏样品与 PBS 按质量体积比 1 g : 10 mL 充分研磨制成匀浆, 8 000 r/min 离心 15 min 后取上清保存。

1.5 双抗体夹心 ELISA 方法的建立

1.5.1 抗体配对试验 将抗 RHDV 广谱单克隆抗体 2A11 和 1B8 分别作为捕获抗体用包被液(pH 值 9.6, 0.05% 碳酸盐缓冲液)稀释至 8 $\mu\text{g/mL}$, 加入 100 $\mu\text{L/孔}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 用 PBST (pH 值 7.4, 含 0.05% Tween 20)洗涤 3 次, 每次持续 5 min, 拍干; 然后加入 200 $\mu\text{L/孔}$ 封闭液(5% 脱脂乳), 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 2.0 h, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次持续 5 min, 拍干; 分别加入 100 $\mu\text{L/孔}$ 兔出血症病毒 1 型、2 型阳性肝脏研磨上清和阴性肝脏研磨上清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1.0 h, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次持续 5 min, 拍干; 然后分别加入 100 $\mu\text{L/孔}$ 用 PBST 稀释至 1 $\mu\text{g/mL}$ HRP 标记的 RHDV1 检测抗体(HRP-1D4、HRP-5F3)、HRP 标记的 RHDV2 检测抗体(HRP-6B3、HRP-4F1), 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1.0 h, 用 PBST 洗涤 3

次, 每次持续 5 min, 拍干; 加入 100 $\mu\text{L/孔}$ 底物显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 10 min, 加入 50 $\mu\text{L/孔}$ 终止液(2 mol/L H_2SO_4), 置于酶标仪上测定 $D_{450\text{nm}}$, 其中阳性抗体的 $D_{450\text{nm}}$ 用 P 表示, 阴性用 N 表示。根据 $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值最大, 确定鉴别检测 RHDV1 的抗体组合; 根据 $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$ 值最大, 确定鉴别检测 RHDV2 的抗体组合。

1.5.2 肝脏样品的稀释倍数 按“1.5.1”节试验确定的抗体配对组合, 用包被液将捕获抗体按照 8 $\mu\text{g/mL}$ 进行包被, 将 RHDV1、RHDV2 阳性肝脏和阴性肝脏分别按 1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80 进行稀释, 然后分别加入稀释至 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 HRP 标记的 RHDV1 检测抗体和 HRP 标记的 RHDV2 检测抗体, 最后用酶标仪测定 $D_{450\text{nm}}$ 。根据用 HRP 标记的 RHDV1 检测抗体检测样品时, $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值; 以及用 HRP 标记的 RHDV2 检测抗体检测样品时, $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$ 值, 综合确定肝脏样品最佳稀释倍数。

1.5.3 捕获抗体和检测抗体最适工作浓度的确定

采用方阵滴定法确定捕获抗体和检测抗体的最适工作浓度。用包被液将捕获抗体稀释至 12、8、4、2 $\mu\text{g/mL}$, 将 RHDV1、RHDV2 阳性肝脏和阴性肝脏分别按“1.5.2”节中确定的最佳稀释倍数稀释, 用 PBST 将 HRP 标记的 RHDV1 检测抗体和 HRP 标记的 RHDV2 检测抗体稀释至 1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g/mL}$, 最后用酶标仪测定 $D_{450\text{nm}}$ 。选择 $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值最大的捕获抗体和检测抗体浓度作为检测 RHDV1 的最适工作浓度; 选择 $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$ 值最大的捕获抗体和检测抗体作为检测 RHDV2 的最适工作浓度。

1.5.4 最佳封闭液的确定 以上述试验确定的作用条件进行双抗体夹心 ELISA, 选择 PBST 稀释的 5% 脱脂乳、1% BSA、2% 明胶、1% 干酪素钠作为封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 2.0 h, 根据用 HRP 标记的 RHDV1 检测抗体检测样品时, $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值; 以及用 HRP 标记的 RHDV2 检测抗体检测样品时, $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$ 值, 综合确定合适的封闭液。

1.5.5 抗原最佳作用时间的确定 以上述试验确

定的作用条件进行双抗体夹心 ELISA, 分别选择 37 ℃ 下 0.5、1.0、1.5、2.0 h 作为抗原作用时间, 根据用 HRP 标记的 RHDV1 检测抗体检测样品时, $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值; 以及用 HRP 标记的 RHDV2 检测抗体检测样品时, $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$ 值, 综合确定抗原作用时间。

1.5.6 检测抗体最佳作用时间的确定 以上述试验确定的作用条件进行双抗体夹心 ELISA, 分别选择 37 ℃ 下 40、60、90、120 min 作为检测抗体作用时间, 根据用 HRP 标记的 RHDV1 检测抗体检测样品时, $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值; 以及用 HRP 标记的 RHDV2 检测抗体检测样品时, $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$ 值, 综合确定检测抗体作用时间。

1.5.7 阴性和阳性标准的确定 用建立的双抗体夹心 ELISA 方法对 30 份 RHDV 阴性健康兔肝脏样品进行检测, 测定 $D_{450 \text{ nm}}$ 的平均值(\bar{x})和标准差(s), 以“ $\bar{x} + 3s$ ”作为阴性和阳性的分界线。

1.6 特异性试验

用建立的双抗体夹心 ELISA 方法检测 RHDV1、RHDV2、兔波氏杆菌(Bb)、兔巴氏杆菌(Pm)、兔 A 型产气荚膜梭菌(CpA)、肠炎沙门氏菌(Se)、轮状

病毒(RV)感染死亡兔肝脏样品, 评价方法的特异性。

1.7 敏感性试验

将 1 : 10 的 RHDV1、RHDV2 阳性样品倍比稀释至 1 : 20 480, 用建立的双抗体夹心 ELISA 方法对不同稀释度样品测定 $D_{450 \text{ nm}}$, 同时将结果与红细胞凝集试验(HA)对比, 从而确定所建立的检测方法的敏感性。

1.8 临床样品检测试验

对四川省、山东省、河南省各兔场送检的 60 份死亡兔肝脏样品用建立的双抗体夹心 ELISA 方法进行检测, 同时用 RT-PCR 方法^[9]进行检测, 比较 2 种方法的符合率。

2 结果与分析

2.1 抗体配对试验

抗体配对试验结果(表 1)显示, 单克隆抗体 2A11 作为捕获抗体, HRP-1D4 作为 RHDV1 检测抗体, $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值最大; 单克隆抗体 2A11 作为捕获抗体, HRP-6B3 作为 RHDV2 检测抗体, $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV1})$ 值最大。

表 1 抗体配对结果

捕获抗体	检测抗体	$P(\text{RHDV1})$	$P(\text{RHDV2})$	N	$P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$	$P(\text{RHDV1})/N$	$P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$	$P(\text{RHDV2})/N$
1B8	HRP-1D4	0.618	0.077	0.063	8.026	9.810	—	—
	HRP-5F3	0.936	0.103	0.112	9.087	8.357	—	—
	HRP-6B3	0.228	0.878	0.087	—	—	3.851	10.092
	HRP-4F1	0.387	0.528	0.090	—	—	1.364	5.867
2A11	HRP-1D4	1.556	0.099	0.094	15.717	16.553	—	—
	HRP-5F3	1.133	0.125	0.094	9.064	12.053	—	—
	HRP-6B3	0.191	1.451	0.118	—	—	7.597	12.297
	HRP-4F1	0.291	0.593	0.084	—	—	2.038	7.060

注: “—”表示未计算。

2.2 双抗体夹心 ELISA 法的建立与优化

2.2.1 肝脏样品最佳稀释倍数的确定 以捕获抗体 2A11、RHDV1 检测抗体 HRP-1D4、RHDV2 检测抗体 HRP-6B3, 对 1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80 稀释 RHDV1、RHDV2 阳性肝脏和阴性肝脏进行检测。结果显示, 用 RHDV1 检测抗体 HRP-1D4 检测 1 : 40 稀释的肝脏样品时, $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值最大; 用 RHDV2 检测抗

体 HRP-6B3 检测 1 : 40 稀释的肝脏样品时, $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$ 值最大。因此, 确定肝脏样品最佳稀释倍数为 1 : 40(表 2)。

2.2.2 捕获抗体和检测抗体最适工作浓度的确定

通过方阵滴定法确定捕获抗体和检测抗体的最适工作浓度。结果显示, 捕获抗体 2A11 浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RHDV1 检测抗体 HRP-1D4

表 2 肝脏样品最佳稀释倍数的确定

检测抗体	稀释倍数	$P(\text{RHDV1})$	$P(\text{RHDV2})$	N	$P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$	$P(\text{RHDV1})/N$
HRP-1D4	1:10	1.439	0.111	0.093	12.964	15.473
	1:20	1.461	0.094	0.086	15.543	16.988
	1:40	1.456	0.086	0.071	16.93	20.507
	1:80	1.320	0.084	0.068	15.714	19.412
HRP-6B3	1:10	0.214	1.445	0.159	6.752	9.088
	1:20	0.209	1.452	0.128	6.947	11.344
	1:40	0.161	1.371	0.116	8.516	11.819
	1:80	0.146	1.234	0.103	8.452	11.981

浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值较大; 捕获抗体 2A11 浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、RHDV2 检测抗体 HRP-6B3 浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/$

$P(\text{RHDV1})$ 值最大。综合考虑确定捕获抗体 2A11 浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、检测抗体 HRP-1D4、HRP-6B3 浓度均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 3)。

表 3 最适捕获抗体和检测抗体浓度的确定

捕获抗体浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	检测抗体	检测抗体浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	$P(\text{RHDV1})$	$P(\text{RHDV2})$	N	$P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$	$P(\text{RHDV1})/N$
12	HRP-1D4	1	1.733	0.087	0.083	19.920	20.880
		0.5	1.505	0.077	0.075	19.545	20.067
		0.25	1.178	0.066	0.062	17.848	19.000
		0.125	0.836	0.055	0.045	15.200	18.578
	HRP-6B3	1	0.259	1.567	0.151	6.050	10.377
		0.5	0.146	1.270	0.096	8.699	13.229
		0.25	0.093	0.994	0.074	10.688	13.432
		0.125	0.114	0.658	0.063	5.772	10.444
8	HRP-1D4	1	1.653	0.081	0.126	20.407	13.119
		0.5	1.321	0.061	0.066	21.656	20.015
		0.25	1.054	0.056	0.058	18.821	18.172
		0.125	0.744	0.042	0.046	17.714	16.174
	HRP-6B3	1	0.194	1.467	0.137	7.562	10.708
		0.5	0.114	1.227	0.095	10.763	12.916
		0.25	0.087	0.974	0.072	11.195	13.528
		0.125	0.063	0.647	0.056	10.270	11.554
4	HRP-1D4	1	1.605	0.084	0.089	19.107	18.034
		0.5	1.255	0.062	0.055	20.242	22.818
		0.25	0.920	0.054	0.056	17.037	16.429
		0.125	0.597	0.045	0.046	13.267	12.978
	HRP-6B3	1	0.129	1.357	0.125	10.519	10.856
		0.5	0.087	1.183	0.085	13.598	13.918
		0.25	0.072	0.825	0.079	11.458	10.443
		0.125	0.054	0.543	0.070	10.056	7.757
2	HRP-1D4	1	1.406	0.067	0.096	20.985	14.646
		0.5	1.054	0.055	0.070	19.164	15.057
		0.25	0.747	0.049	0.061	15.245	12.246
		0.125	0.482	0.042	0.051	11.476	9.451
	HRP-6B3	1	0.109	1.254	0.137	11.505	9.153
		0.5	0.082	0.938	0.102	11.439	9.196
		0.25	0.062	0.695	0.081	11.210	8.580
		0.125	0.058	0.282	0.062	4.862	4.548

2.2.3 最佳封闭液的确定 对比 5% 脱脂乳、1% BSA、2% 明胶、1% 干酪素钠作为封闭液的 ELISA 检测结果。用 5% 脱脂乳作为封闭液,以 RHDV1 检测抗体 HRP-1D4 检测样品时, $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值最大;同时用 5% 脱脂乳

作为封闭液,以 RHDV2 检测抗体 HRP-6B3 检测样品时, $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$ 值最大。因此,确定最佳封闭液为 5% 脱脂乳(表 4)。

表 4 最适封闭剂的确定

检测抗体	封闭剂	$P(\text{RHDV1})$	$P(\text{RHDV2})$	N	$P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$	$P(\text{RHDV1})/N$
HRP-1D4	5% 脱脂乳	1.315	0.059	0.067	22.288	19.627
	1% BSA	1.287	0.067	0.075	19.209	17.160
	2% 明胶	1.524	0.078	0.085	19.538	17.929
	1% 干酪素钠	1.314	0.060	0.071	21.900	18.507
HRP-6B3	5% 脱脂乳	0.083	1.342	0.082	16.169	16.366
	1% BSA	0.141	1.604	0.234	11.376	6.855
	2% 明胶	0.153	1.603	0.231	10.477	6.939
	1% 干酪素钠	0.089	1.291	0.081	14.506	15.938

2.2.4 最佳抗原作用时间的确定 对比抗原 37 °C 下作用 0.5、1.0、1.5、2.0 h 的 ELISA 检测结果。以 RHDV1 检测抗体 HRP-1D4 进行试验,抗原作用 1.0 h 时, $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$

值最大;以 RHDV2 检测抗体 HRP-6B3 进行试验,抗原作用 1.0 h 或 1.5 h 时, $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$ 值较大。因此,综合考虑确定最佳抗原作用时间为 1.0 h(表 5)。

表 5 最适抗原孵育时间的确定

检测抗体	抗原孵育时间 (h)	$P(\text{RHDV1})$	$P(\text{RHDV2})$	N	$P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$	$P(\text{RHDV1})/N$
HRP-1D4	0.5	0.994	0.053	0.055	18.755	18.073
	1.0	1.206	0.059	0.064	20.441	18.844
	1.5	1.292	0.064	0.069	20.188	18.725
	2.0	1.315	0.070	0.077	18.786	17.078
HRP-6B3	0.5	0.073	0.883	0.075	12.096	11.773
	1.0	0.083	1.197	0.081	14.422	14.778
	1.5	0.087	1.293	0.089	14.862	14.528
	2.0	0.095	1.270	0.087	13.368	14.598

2.2.5 最佳检测抗体作用时间的确定 对比检测抗体 37 °C 下作用 40、60、90、120 min 的 ELISA 检测结果。RHDV1 检测抗体 HRP-1D4 作用 60 min 或 90 min 时, $P(\text{RHDV1})/N$ 值及 $P(\text{RHDV1})/P(\text{RHDV2})$ 值较大;RHDV2 检测抗体 HRP-6B3 作用 60 min 时, $P(\text{RHDV2})/N$ 值及 $P(\text{RHDV2})/P(\text{RHDV1})$ 值最大。因此,综合考虑最佳检测抗体作用时间为 60 min(表 6)。

2.3 阴阳性临界值的确定

检测 30 份 RHDV 阴性的健康兔肝脏,检测抗体 HRP-1D4 检测样品平均值(\bar{x})为 0.113,标准差(s)为 0.027,阴性、阳性临界值为 0.195,则待检样品 $D_{450\text{ nm}} \geq 0.195$ 判为 RHDV1 阳性, $D_{450\text{ nm}} < 0.195$

判为 RHDV1 阴性;检测抗体 HRP-6B3 检测样品平均值(\bar{x})为 0.093,标准差(s)为 0.024,则待检样品 $D_{450\text{ nm}} \geq 0.166$ 判为 RHDV2 阳性, $D_{450\text{ nm}} < 0.166$ 判为 RHDV2 阴性。

2.4 试验的特异性

对兔常见病原样品用建立的双抗夹心 ELISA 方法进行检测,结果显示,检测 RHDV1 阳性样品为 RHDV1 阳性、RHDV2 阴性,检测 RHDV2 阳性样品为 RHDV2 阳性、RHDV1 阴性;检测兔波氏杆菌(Bb)、兔巴氏杆菌(Pm)、兔 A 型产气荚膜梭菌(CpA)、肠炎沙门氏菌(Se)、轮状病毒(RV)感染死亡兔肝脏样品,均为阴性,说明该方法特异性良好(表 7)。

表 6 最适检测抗体孵育时间的确定

检测抗体	抗体孵育时间 (min)	P(RHDV1)	P(RHDV2)	N	P(RHDV1)/P(RHDV2)	P(RHDV1)/N
HRP-1D4	40	1.089	0.065	0.064	16.754	17.016
	60	1.294	0.070	0.065	18.486	19.908
	90	1.396	0.074	0.070	18.865	19.943
	120	1.535	0.086	0.077	17.849	19.935
HRP-6B3	40	0.064	0.818	0.060	12.781	13.633
	60	0.072	1.168	0.067	16.222	17.433
	90	0.080	1.121	0.077	14.013	14.558
	120	0.114	1.183	0.077	10.377	15.364

表 7 特异性试验结果

样品	HRP-1D4	HRP-6B3	结果判定	
			(RHDV1)	(RHDV2)
RHDV1	1.334	0.076	+	-
RHDV2	0.082	1.235	-	+
RV	0.085	0.091	-	-
Bb	0.112	0.103	-	-
Pm	0.102	0.116	-	-
CpA	0.098	0.087	-	-
Se	0.124	0.118	-	-

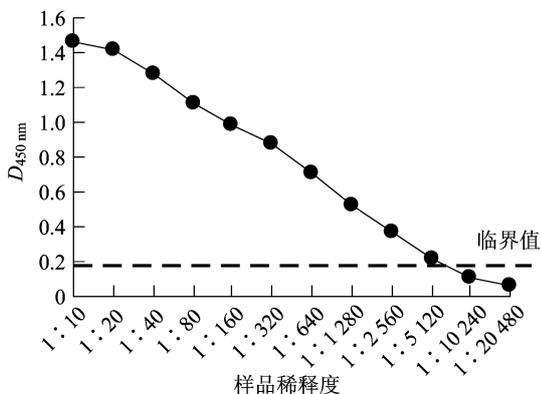


图 2 RHDV2 敏感性试验结果

2.5 试验的敏感性

RHDV1 型阳性样品 HA 效价为 1 : 2 560、1 : 10 240 稀释时,双夹心 ELISA 检测结果为阳性,此后为阴性(图 1)。RHDV2 阳性样品 HA 效价为 1 : 2 560、1 : 5 120 稀释时,双夹心 ELISA 检测结果为阳性,此后为阴性(图 2)。与 HA 试验相比,所建立的 ELISA 方法具有较高的敏感性。

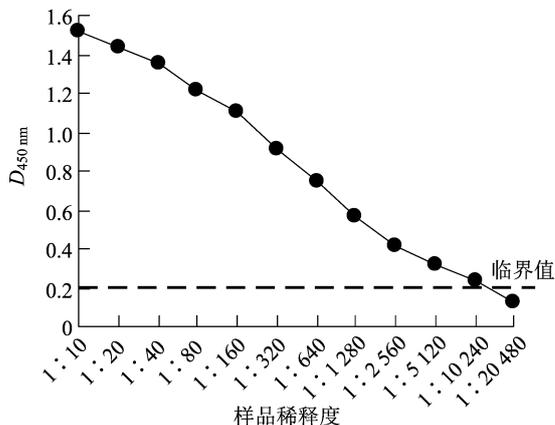


图 1 RHDV1 敏感性试验结果

进行检测,检测结果显示,RHDV1 阳性样品 9 份,RHDV2 阳性样品 23 份,阴性样品 28 份;RT-PCR 方法检测结果显示,RHDV1 阳性样品 9 份,RHDV2 阳性样品 19 份,阴性样品 32 份。2 种方法检测 RHDV1 阳性样品的符合率为 100% (9/9),RHDV2 阳性样品的符合率为 82.61% (19/23),阴性样品的符合率为 87.5% (28/32),总符合率为 93.33% (56/60)(表 8)。

表 8 临床样品检测结果

结果	样品数量(份)		符合率 (%)
	RT-PCR 法	ELISA 法	
RHDV1 阳性	9	9	100.00
RHDV2 阳性	19	23	82.61
阴性	32	28	87.50
合计			93.33(56/60)

2.6 临床样品检测

对四川省、山东省、河南省各兔场送检的 60 份死亡兔肝脏样品用建立的双抗体夹心 ELISA 方法

3 讨论与结论

养兔业是我国畜牧业的重要组成部分,在养殖业中具有不可替代的地位,但 RHD 的发生与流行,给全球兔养殖业带来了严重威胁。2010 年,RHDV2

首次在法国报道。我国于 2020 年 4 月首次发现 RHDV2。研究显示,RHDV1 抗原制备的疫苗不能对 RHDV2 毒株提供有效的交叉保护作用^[17],而国内尚无商品化的 RHD2 疫苗。本研究中采用建立的双抗体夹心 ELISA 法和 RT-PCR 方法^[9]对 2022 年送检的死亡兔肝脏样品进行检测,发现 RHDV2 阳性样品明显多于 RHDV1 阳性样品,应引起重视;同时,RT-PCR 对 RHDV2 的检出率低于双抗体夹心 ELISA,推测可能是因为 RT-PCR 中扩增 RHDV2 基因序列的引物是参考法国毒株 (GenBank:HE800529.1) 设计,并不能很好地适用于国内流行毒株的检测,这需要对阳性样品中 RHDV2 的基因进行测序验证;也可能是单抗识别的表位在所有试验用毒株都存在。

目前,国内已建立的检测 RHDV 的双抗体夹心 ELISA 方法^[15-16],使用的是用 RHDV1 的 VP60 蛋白作为免疫原制备的单抗,并不适用于 RHDV1、RHDV2 的鉴别检测;国外报道有特异性检测 RHDV2 的双抗体夹心 ELISA 方法^[14],在检测临床样品时,需配合特异性检测 RHDV1 双抗体夹心 ELISA 方法,而且能否用于国内 RHDV2 流行毒株的检测需进一步确认。

本研究建立的双抗体夹心 ELISA 方法在试验中只需包被的同时,针对 RHDV1 和 RHDV2 的单克隆抗体 2A11 作为捕获抗体,分别以 HRP 标记的 RHDV1 型特异性单抗 1D4、RHDV2 型特异性单抗 6B3 作为检测抗体,提升了抗原抗体反应的特异性,从而减少了假阳性的发生。由于 RHDV1 与 RHDV2 感染引起的家兔临床症状极为相似,通过临床症状难以鉴别诊断,本试验建立的双夹心 ELISA 方法有效针对 RHDV1 与 RHDV2 进行鉴别诊断,极大方便了临床样品的大规模检测,而且该方法具备高敏感性、强特异性、易于操作等优点,为下一步开发鉴别检测 RHDV1 和 RHDV2 快速诊断试剂盒奠定了基础。

参考文献:

- [1] Abrantes J, van der Loo W, Pendu J L, et al. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. *Vet Res*, 2012, 43(1): 12.
- [2] Hu B, Wang F, Fan Z, et al. Recombination between G2 and G6 strains of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) in China[J]. *Arch Virol*, 2017, 162(1): 269-272.
- [3] Gall-Reculé G L, Zwingelstein F, Boucher S, et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France[J]. *The Veterinary Record*, 2011, 168(5): 137-138.
- [4] Strive T, Piper M, Huang N, et al. Retrospective serological analysis reveals presence of the emerging lagovirus RHDV2 in Australia in wild rabbits at least five months prior to its first detection[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(2): 822-833.
- [5] Rouco C, Abrantes J, Serronha A, et al. Epidemiology of RHDV2 (Lagovirus europaeus/GI.2) in free-living wild European rabbits in Portugal[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(2): e373-e382.
- [6] 魏后军, 胡波, 范志宇, 等. 兔出血症病毒 2 型的分离鉴定与序列分析[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(2): 404-409.
- [7] Hu B, Wei H, Fan Z, et al. Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in China in 2020[J]. *Vet Med Sci*, 2021, 7(1): 236-239.
- [8] Abrantes J, Lopes A M. A Review on the methods used for the detection and diagnosis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 972.
- [9] 宋艳华, 魏后军, 范志宇, 等. 兔出血症病毒经典毒株和变异毒株的 RT-PCR 鉴定[J]. *江苏农业学报*, 2016, 32(5): 1117-1121.
- [10] 肖跃强, 孙培姣, 周迎春, 等. 鉴别 RHDV 与 RHDV2 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(5): 512-520.
- [11] 陈萌萌, 仇汝龙, 范志宇, 等. 兔出血症病毒 2 型 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(6): 1476-1480.
- [12] 范志宇, 王岚, 王芳, 等. 醛化人“O”型红细胞的制备及其在兔出血症 HA/HI 试验中的应用[J]. *中国养兔杂志*, 2008, (11): 20-25.
- [13] 蔡少平, 王芳, 贾华敏, 等. 兔出血症病毒胶体金免疫层析试纸条诊断方法的建立及初步应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(11): 1795-1801.
- [14] Dalton K P, Podadera A, Granda V, et al. ELISA for detection of variant rabbit haemorrhagic disease virus RHDV2 antigen in liver extracts[J]. *J Virol Methods*, 2018, 251: 38-42.
- [15] 郭慧敏, 谭永贵, 缪秋红, 等. 双抗体夹心 ELISA 检测兔出血症病毒抗原方法的建立及初步评估[J]. *中国动物传染病学报*, 2016, 24(2): 20-24.
- [16] 董婷, 王芳, 熊富强, 等. 兔出血症病毒双夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. *江苏农业学报*, 2011, 27(3): 571-576.
- [17] 宋艳华, 胡波, 范志宇, 等. 兔出血症病毒 2 型 SC 株 VP60 基因工程疫苗研制及其与传统兔出血症病毒疫苗的交叉保护作用[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(16): 50-54.