

闫文卓,周洁,胡建华,等. 猫细小病毒抗体 ELISA 检测方法建立与初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 98 – 101.
Yan WZ, Zhou J, Hu JH, et al. Establishment and preliminary application of an ELISA method for detecting antibody to feline panleukopenia virus in cats[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 98 – 101.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.04.017

猫细小病毒抗体 ELISA 检测方法建立与初步应用

闫文卓¹,周 洁²,胡建华²,刘铁龙³,张圆圆¹,赵丽丽¹,陈洪岩^{1*},陆涛峰^{1*}

(1.黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,哈尔滨 100193;
2.上海实验动物研究中心,上海 201203;3.河南省济源市动物卫生监督所,河南 济源 454650)

【摘要】 目的 建立猫细小病毒(feline panleukopenia virus, FPV)抗体 ELISA 检测方法,应用于临床样品中 FPV 抗体的检测。方法 利用猫肾传代细胞(CRFK)增殖 FPV 病毒,回收的培养物经纯化后制备 FPV 抗原,通过对纯化抗原和山羊抗猫 IgG-HRP 的最佳工作浓度进行确定,建立 FPV 抗体 ELISA 检测方法,并进行特异性、敏感性、稳定性测定。结果 抗原和二抗的最佳工作浓度分别为 5 μg/mL 和 1:6000,批次内和批次间的变异系数分别为 8.68%和 7.14%,检测临床血清的灵敏度大于 1:5000,且与猫疱疹病毒 1 型(feline herpesvirus 1, FHV-1)和猫杯状病毒(feline calicivirus, FCV)均无交叉反应,与国外试剂盒符合率达到 90.7%。结论 建立的抗体 ELISA 方法重复性、稳定性良好,特异性和敏感性良好,可用于猫 FPV 抗体检测。

【关键词】 猫细小病毒;猫泛白细胞减少症;ELISA

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 04-0098-04

Establishment and preliminary application of an ELISA method for detecting antibody to feline panleukopenia virus in cats

YAN Wenzhuo¹, ZHOU Jie², HU Jianhua², LIU Tielong³, ZHANG Yuanyuan¹,
ZHAO Lili¹, CHEN Hongyan^{1*}, LU Taofeng^{1*}

(1. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine,
Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 100193, China.
2. Shanghai Lab. Animal Research Center, Shanghai 201203. 3. Jiyuan Animal Health Inspection, Jiyuan 454650)

【Abstract】 **Objective** To establish an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for detecting antibody to feline panleukopenia virus (FPV) and apply this method for FPV antibody detection in cats. **Methods** The FPV antigen was raised in CRFK cells and purified by ultracentrifugation. The purified FPV antigens were coated in microtiter plates and goat anti-cat IgG-HRP was used as the detection antibody. After a series of experiments on the optimization of reaction conditions, the ELISA method was established. Experiments were carried out to evaluate the sensitivity, specificity, repeatability and stability. **Results** The optimal working densities of the purified FPV antigens and the enzyme-labeled antibody were 5 μg/mL and 1:6000, respectively. The inter-assay and intra-assay average coefficients of variation were 8.68% and 7.14%, respectively. The detection sensitivity was more than 1:5000. There was no cross-reaction with feline herpesvirus type 1 (FHV-1) and feline calicivirus (FCV). Compared with the results of the ELISA kit from the European Veterinary Laboratory (EVL), the concordance between the two methods was 90.7%. **Conclusions**

[基金项目] 上海市科委科研计划项目(16140900500)。

[作者简介] 闫文卓(1995—),女,硕士研究生,研究方向:预防兽医学。E-mail: 719769390@qq.com

[通信作者] 陈洪岩(1963—),男,研究员,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: sydw2014@163.com。陆涛峰(1982—),男,助理研究员,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: lutaofeng@caas.cn。* 共同通信作者

The established ELISA method exhibits satisfactory duplication, stability, specificity, and sensitivity. This method can be used for the antibody detection of FPV in cats.

【Keywords】 feline panleukopenia virus; feline panleukopenia syndrome; ELISA

实验动物新资源开发与利用,一直是实验动物科技工作者的长期坚持的任务^[1]。实验猫常被用于脑神经的生理及病理学实验,也是药理学实验和动物疾病模型中常用的动物^[2],但是由于在饲料、饲养、繁殖和疫病净化等方面存在难题,猫的实验动物化进展缓慢^[3]。国外很多国家已经建立了实验猫的繁育基地,有的国家通过疫病净化已培育出 SPF 猫和无菌猫,而我国目前尚无权威的猫保种和繁育基地,多数用于实验的猫多来自于宠物猫或捕获的野猫,安全隐患突显。

猫细小病毒(feline panleukopenia virus, FPV)又称猫泛白细胞减少综合征病毒、猫传染性肠炎病毒或猫瘟病毒,主要感染猫科和鼬科等多种动物,是目前肉食动物细小病毒属中感染范围最广、致病性最强的一种病毒^[4],能引起以高热、呕吐、肠炎和白细胞严重减少为特征的急性、高度接触性传染病,死亡率一般为 50%~60%。该病在世界范围内存在,我国多地均有本病发生,对猫及其它猫科动物危害极大^[5-7]。针对该病免疫,有多种商品化疫苗(荷兰英特威、美国辉瑞和法国维克等)可以选择,但是针对该病的诊断试剂却参差不齐,因此,建立一种快速、准确、特异和灵敏的诊断方法不仅对于猫群体疫病净化有重要意义,更有利于推动我国实验猫的实验动物化进程。

1 材料和方法

1.1 病毒及样品

猫细小病毒(feline panleukopenia virus, FPV)由吉林大学任文陟老师惠赠。F81 细胞由本实验室保存。山羊抗猫 IgG-HRP 购自 Abcam 公司。商品化 FPV 抗体 ELISA 试剂盒,猫疱疹病毒 1 型(FHV-1)和猫杯状病毒(FCV)阴、阳性对照血清均购自荷兰的 BV European Veterinary Laboratory (EVL)公司。75 份猫血清采自上海、大连和黑龙江等地。本实验过程遵循 3R 原则及动物福利伦理相关要求。

1.2 主要仪器

酶标仪使用美国 Biotek 公司产品,CO₂ 培养箱使用 Heal force 公司产品,超速离心机使用 Beckman 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 病毒滴度(TCID₅₀)测定

将获得的病毒液进行 10 倍梯度稀释(10^{-1} ~ 10^{-8} ,共 8 个梯度)接种到 F81 细胞,每个梯度 8 个重复,72 h 后观察细胞病变情况,按照 Reed-Muench 法^[8]计算病毒滴度。

1.3.2 抗原制备及浓缩纯化

培养 F81 细胞,待细胞生长至 80% 汇合,按照感染复数(Multiplicity of Infection)为 1 的比例接种 FPV 病毒,待培养 72 h 后收集病毒液,反复冻融 3 次。收集的病毒液利用超速离心法浓缩纯化抗原。首先将病毒液 4℃,4000 r/min 离心 20 min 去除细胞碎片,收集上清,再重复一次;再将收集的上清使用 32 Ti 超速离心机转子,28 000 r/min 于 4℃ 离心 2 h 浓缩病毒;最后沉淀用 500 μL PBS 重悬,充分混匀,并用紫外分光光度法测定抗原蛋白含量。

1.3.3 最佳工作浓度的确定

以制备的抗原为包被抗原,用碳酸盐缓冲液倍比稀释为 40 μg/mL、20 μg/mL、10 μg/mL、5 μg/mL、2.5 μg/mL 和 0 μg/mL 包被酶标板,以 1:100 倍稀释的 FPV 阳性血清为待检血清,将酶标抗体(山羊抗猫 IgG-HRP)分别以 1:6000,1:8000,1:10000,1:16000 稀释,采用方阵法确定抗原和酶标抗体的最佳工作浓度。

以 5 μg/mL 的抗原浓度包被酶标板,优化封闭液和封闭时间。封闭液主要选择 5% 脱脂奶粉、5% 胎牛血清和 5% BSA,封闭时间选择 37℃ 1 h、37℃ 2 h 和 4℃ 过夜。

1.3.4 判定标准的确定

用 EVL 公司试剂盒检测采集的猫血清,共得到 17 份猫 FPV 阴性血清,再用建立的 ELISA 方法检测 17 份猫 FPV 阴性血清样品,计算 OD_{450 nm} 的平均值($\bar{x}$)和标准差(SD),根据公式 cut-off value = $\bar{x}$ + 3SD,确定阳性判定标准。

1.3.5 特异性试验

以优化的最佳检测条件,用制备的抗原包被酶标板,将 FPV、FHV-1 和 FCV 的阳性对照血清进行 1:100 倍稀释进行检测,检验该方法的特异性。

1.3.6 敏感性试验

先将 FPV 阳性血清做 50 倍稀释,然后进行 2 倍梯度倍比稀释(1:100~1:6400),用建立的 ELISA 方法进行检测,根据判定标准,将最大稀释比例为

阳性的稀释度判定为该方法的灵敏度。

1.3.7 重复性试验

为了测定批内重复性,随机选择 5 份猫血清样品,使用同一批包被的酶标板重复测定 3 次,计算批内变异系数(coefficient of variation, CV)。为了测定批间重复性,随机选择 5 份猫血清样品,使用不同批次包被的酶标板重复测定 3 次,计算批间变异系数(CV)。

1.3.8 初步应用及比较研究

用建立的 ELISA 方法和 EVL 试剂盒同时检测收集的 75 份猫血清,通过比较判定该方法的符合率。符合率=(阳性样品数+阴性样品数)/样品总数×100%。

2 结果

2.1 病毒滴度的确定

采用 Reed-Muench 法,测定获得 FPV 的滴度为 5.76 lgTCID₅₀/0.1 mL。

2.2 最佳工作条件的确定

通过方阵法,最终确定的抗原和酶标抗体的最佳工作浓度分别为 5 μg/mL 和 1:6000。通过优化封闭液发现 5%脱脂奶粉具有良好的封闭效果,封闭时间三组之间差异不显著,鉴于 37℃ 1 h 能节省时间,因此选择 5%脱脂奶粉于 37℃ 封闭 1 h 为最佳封闭条件。

2.3 判定标准的确定

利用建立的抗体 ELISA 方法,检测 12 份经 EVL 公司试剂盒确定的猫 FPV 血清阴性样品,OD_{450 nm} 的 $\bar{x}$ 为 0.209,SD 为 0.064,因此 Cut-off 值 = $\bar{x} + 3SD = 0.401$,即当 OD_{450 nm} 值 > 0.401 时,则判定该样品为 FPV 血清阳性。

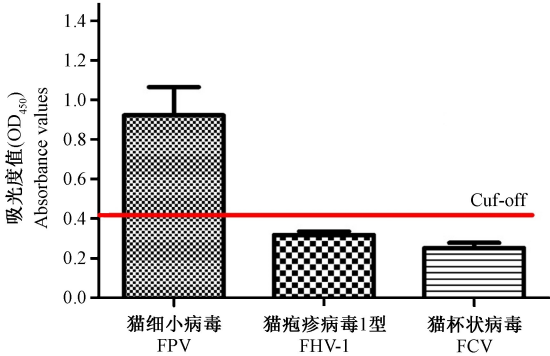
2.4 特异性实验

以优化的最佳检测条件,检测 FPV、FHV-1 和 FCV 的阳性对照血清,结果显示只有 FPV 阳性血清的观测值大于 0.401,判定为阳性,而 FHV-1 和 FCV 阳性血清的观测值均低于 0.401,判定为均为阴性,表明该方法具有良好的特异性。

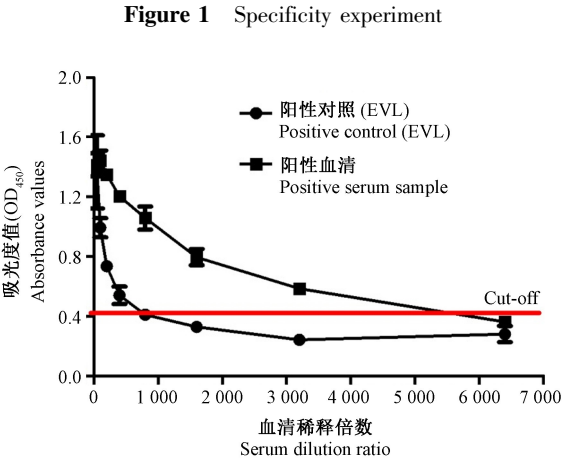
2.5 敏感性实验

利用建立的抗体 ELISA 方法,分别对 EVL 试剂盒阳性对照和临床阳性血清进行梯度稀释,以测定该方法的敏感性。结果如图 2 所示,EVL 试剂盒阳性对照在稀释度大于 1:800 时观测值低于 0.401,而临床阳性血清在稀释度大于 1:5000 是观测值低于 0.401,表明建立的抗体 ELISA 方法检测临床阳性血清的敏感性为 1:5000。另外,在实验中研究人

员发现 EVL 的试剂盒阳性对照的 OD₄₅₀ 值相对于临床血清测得的 OD₄₅₀ 值偏低,说明利用本方法检测临床样品的敏感性良好。



注:图中红色横线表示 Cut-off 值。
图 1 特异性实验
Note. The red line in the figure represents the cut-off value.



注:图中红色横线表示 Cut-off 值。
图 2 敏感性实验
Note. The red line in the figure represents the cut-off value.

2.6 重复性实验

分别采用同批次和不同批次包被的酶标板,分别检测 5 份猫血清样品,每份样品重复 3 次,结果如表 1 所示,批次内和批次间的变异系数分别为 8.68% 和 7.14%,除 2 份阴性血清的变异系数稍大外(12% 和 13.9%),阳性血清在批次间和批次内的重复性均良好(<10%)。分析原因,阴性样品测定变异系数偏大可能是仪器测定误差所导致的。

2.7 临床样品检测

利用建立的 ELISA 方法和 EVL 试剂盒检测收集的 75 份猫血清,阴阳性判定结果如表 2 所示,计算符合率为 90.7%(68/75)。因此建立的 FPV 抗体检测方法与 EVL 公司试剂盒的符合率为 90.7%。

表 1 重复性实验
Table 1 Repetitive experiment

样品 Samples	OD ₄₅₀			均值 Mean	标准差 SD	变异系数 CV(%)
	组内 1 Rep.1	组内 2 Rep.2	组内 3 Rep.3			
A	0.227	0.223	0.275	0.242	0.029	12.0
B	0.664	0.751	0.735	0.717	0.046	6.5
C	0.656	0.789	0.747	0.731	0.068	9.3
D	0.078	0.071	0.059	0.069	0.010	13.9
E	0.612	0.627	0.633	0.624	0.011	1.7
	组间 1 Run1	组间 2 Run2	组间 3 Run3			
F	0.767	0.817	0.917	0.834	0.076	9.2
G	1.586	1.865	1.907	1.786	0.174	9.8
H	1.168	1.301	1.348	1.272	0.093	7.3
I	0.655	0.702	0.686	0.681	0.024	3.5
J	0.657	0.699	0.739	0.698	0.041	5.9

表 2 临床样品检测
Table 2 Clinical sample test

样品 Samples	EVL ELISA Positive EVL 试剂盒阳性	EVL ELISA Negative EVL 试剂盒阴性	Total
ELISA Positive ELISA 阳性	58	5	63
ELISA Negative ELISA 阴性	2	10	12
Total	60	15	75

3 讨论

猫是药理学实验和动物疾病模型中常用的动物,中国药典也规定了猫作为降压药检测的实验动物,但由于缺乏检测试剂,多数用于实验的猫多为未经检测的宠物猫或捕获的野猫,安全隐患突显。为了推动我国实验猫质量改善,提高实验猫实验动物化水平,本团队一直致力于实验猫诊断制剂的开发。FPV 是侵害猫的重要病原微生物,该病的发病率和死亡率均较高,严重影响猫的健康。虽然已有多种针对猫细小病毒的疫苗可以用于该病的防控,但该病的抗体检测试剂盒一直没有实现商品化,严重制约实验猫的质量提高。虽然早在 1990 年就有猫细小病毒间接 ELISA 方法的报道^[9],也有多篇文献^[10-13]报道了 FPV 抗体检测方法的建立和应用,但一直没有可以真正应用于临床检测的产品出现,也缺乏 FPV 的相关国家标准的实施。因此,本研究致力于建立一种 FPV 抗体检测方法,并应用于进一步试剂盒的开发。

为了提高检测方法的敏感性,本研究利用纯化的 FPV 作为包被抗原,通过优化抗原浓度、封闭液、封闭时间、待检血清稀释度和酶标抗体的浓度,建立了特异性、敏感性、稳定性良好的 FPV 抗体检测方法。该方法批次内和批次间的变异系数分别为 8.68%和

7.14%,检测临床血清的灵敏度大于 1:5000,与国外试剂盒符合率达到 90.7%。值得提到的是,在实验过程中,研究人员比较了国内某品牌试剂盒和国外试剂盒与该方法的差异,发现国内的某个检测产品完全不能工作,国外试剂盒虽然与本方法符合率较好,但其阳性对照一直不稳定,也存在一定缺陷。此外,利用该方法检测临床猫血清样品发现血清阳性率达 84%(63/75),高于其他研究的 73%(44/60),由于大部分猫的来源、疫苗免疫状况等不甚清楚,所以无法确定抗体阳性个体是接种疫苗产生抗体,还是自然感染产生的抗体,但也从一定程度反映了 FPV 感染的风险。由于猫阴性血清的不易得,因此在本方法的 Cut-off 值判定中仅选择了 12 个阴性样品,这种状况也反映了猫实验动物化的重要性。

综上,本研究建立了猫 FPV 抗体 ELISA 检测方法,该方法特异性、敏感性、稳定性良好,而且操作简便、快速,从而为猫 FPV 抗体 ELISA 检测试剂盒的研发奠定基础。

参考文献:

[1] 贺争鸣. 我国资源动物的实验动物化潜力与展望[J]. 中国比较医学杂志,2010,20(3):1-7.

[2] 李厚达. 实验动物学[M]. 北京:中国农业出版社,2002,267.

[3] 宋洋,付金凤. 浅谈实验用猫的饲养与管理方法[J]. 黑龙江医药,2011,24(6)928-930.

[4] 饶家辉,王玉平,雷连成. 猫细小病毒、犬细小病毒、貂细小病毒的特征比较[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(07):166-168.

[5] 刘碧涛,任常宝,张晓战,等. 猫细小病毒的分离与鉴定[J]. 动物医学进展,2013,34(09):124-127.

[6] 郗磊. 猫细小病毒病研究进展[J]. 中国畜牧兽医文摘,2012,28(02):40+67.

[7] 邢建民. 猫细小病毒病的病原分离鉴定及其病理形态学的初步观察[D]. 长春:吉林大学,2010.

[8] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. Am J Hygiene,1938, 27(3):493

[9] 钱建飞,张振兴,陈溥言,等. 检测抗猫泛白细胞减少症病毒单克隆抗体的间接 ELISA 方法[J]. 畜牧与兽医,1990,(05):204-206.

[10] 雍海平. 猫细小病毒间接 ELISA 方法的建立及灭活疫苗毒株筛选[D]. 长春:吉林大学,2008.

[11] 田丽红,华育平. 检测 2 种猫科动物猫瘟热病毒抗体 SPA-ELISA 方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报,2010,30(11):1418-1421.

[12] 刘中奇. 猫瘟热病毒 ELISA 与 HA/HI 诊断方法和免疫原性及 FPV 疫苗金钱豹应用效果研究[D]. 雅安:四川农业大学,2005.

[13] 单振振. 抗猫细小病毒单克隆抗体的制备及病毒检测方法的建立[D]. 长春:吉林大学,2009.