

网络出版时间:2020-08-13 15:31 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2021.02.004
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200812.1345.007.html

基于 A 型塞内卡病毒 VP3 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立

申水莹¹, 闫若潜², 雷从从³, 王淑娟², 马震原², 刘影², 赵雪丽², 谢彩华², 吴志明⁴

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省动物疫病预防控制中心, 河南 郑州 450008;

3 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 4 河南省兽药饲料监察所, 河南 郑州 450002)

[摘要] **【目的】**建立基于 VP3 蛋白检测血清中 A 型塞内卡病毒(SVA)抗体的间接 ELISA 方法,为临床上猪群 SVA 感染及未来疫苗免疫效果评价提供有效手段。**【方法】**克隆 SVA 的 VP3 基因,将其与 pQE-30 表达载体连接,并进行原核表达,对表达的蛋白进行纯化和鉴定。用纯化的重组 VP3 蛋白(rVP3)作为包被抗原,通过矩阵法优化 ELISA 反应条件,建立检测 SVA 抗体的间接 ELISA 方法,通过对已知背景的 200 份 SVA 阴阳性血清进行检测以确定临界值,并对该方法的特异性、敏感性、重复性和稳定性进行验证。将采自 SVA 灭活疫苗免疫猪不同时期的 160 份血清,分别用该试验建立的方法及本课题组前期建立的基于 VP1 蛋白的间接 ELISA 方法进行检测,对比两者检测结果。**【结果】**成功克隆 717 bp 的 VP3 基因,表达出分子质量约为 32 ku 的 VP3 重组蛋白(rVP3)。Western Blot 试验结果表明,纯化的 rVP3 蛋白具有良好的反应原性。建立了基于 VP3 蛋白的 SVA 间接 ELISA 检测方法,当样本 OD₄₅₀(S)/阳性对照 OD₄₅₀(P) > 0.138 时判定为 SVA 抗体阳性。该方法特异性强,与 FMDV(O/A 型)、PRV、PRRSV、CSFV 病原阳性血清均无交叉反应;敏感性较好,检测出的阳性血清最高稀释倍数与中和试验基本一致;重复性和稳定性好,批内变异系数小于 4%,批间变异系数小于 9%。160 份血清检测结果表明,两种方法在不同时期的抗体阳性检出率略有差异。**【结论】**建立了基于 VP3 蛋白的 SVA 间接 ELISA 检测方法,该方法具有较好的特异性、敏感性、重复性和稳定性。

[关键词] A 型塞内卡病毒;VP3 蛋白;间接 ELISA;病毒检测

[中图分类号] S855.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2021)02-0023-08

Establishment of indirect ELISA for detecting antibody based on VP3 protein of senecavirus A

SHEN Shuiying¹, YAN Ruoqian², LEI Congcong³, WANG Shujuan²,
MA Zhenyuan², LIU Ying², ZHAO Xueli², XIE Caihua², WU Zhiming⁴

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Henan Centre for Animal Disease Control & Prevention, Zhengzhou, Henan 450008, China;

3 Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

4 Henan Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: **【Objective】**This study established an indirect ELISA method based on VP3 protein for detection of antibody to senecavirus A (SVA) in serum to provide an effective method for SVA infection in clinical pig population and evaluation of future vaccine immune. **【Method】**The VP3 gene of SVA was

[收稿日期] 2020-01-12

[基金项目] 2019 年度河南省科技创新领军人才计划项目(204200510012);动物基因工程疫苗国家重点实验室开放课题“猪塞尼卡病毒病灭活疫苗研究”(SKLGEV-ZD/ZY-2019)

[作者简介] 申水莹(1995—),女,河南焦作人,在读硕士,主要从事单克隆抗体制备研究。E-mail:shuiyingshen@126.com

[通信作者] 吴志明(1964—),男,河南周口人,研究员,硕士生导师,主要从事畜禽传染病防治研究。

E-mail:wuzhiming6@sina.com

cloned into pQE-30 vector for prokaryotic expression, and the expressed protein was purified and identified. The purified recombinant VP3 protein (rVP3) was used as coating antigen to establish the indirect ELISA method for detection of SVA antibody with optimal reaction conditions obtained by matrix method. The critical value was determined by testing 200 serum samples with known background. The specificity, sensitivity, repeatability and stability of this method were tested. A total of 160 serum samples collected from pigs that were immunized with SVA inactivated vaccine at different stages were tested and compared by the established method in this study and the VP1 protein based indirect ELISA method. 【Result】 The VP3 gene of 717 bp was cloned successfully, the recombinant VP3 protein (rVP3) of 32 ku was expressed, and Western Blot results showed that the purified rVP3 protein had good reactivity. The SVA indirect ELISA method based on VP3 protein was established. When the ratio of OD₄₅₀ of sample (S) to the OD₄₅₀ of positive control (P) was more than 0.138, the sample of SVA antibody was determined to be positive. This method had strong specificity, and showed no cross reactions with the positive sera of FMDV (O/A type), PRV, PRRSV and CSFV. This method had good sensitivity and the highest dilution ratio of positive serum was basically consistent with neutralization test. This method had good repeatability and stability with intra-batch variation coefficient of less than 4% and inter-batch variation coefficient of less than 9%. The results of 160 serum samples tests showed that the positive detection rates of antibody in different stages were slightly different between methods. 【Conclusion】 The established indirect ELISA method based on VP3 protein had good specificity, sensitivity, repeatability and stability.

Key words: senecavirus A; VP3 protein; indirect ELISA; virus detecting

A 型塞内卡病毒 (SVA) 可引起猪原发性水疱病, 即塞内卡病毒病。SVA 感染初期, 病猪出现精神萎靡、进食困难、体温升高等症状, 随后鼻、舌和蹄冠等部位出现水疱样病变, 严重时会长蔓延至蹄底部, 使病猪出现跛行的症状^[1]。母猪感染 SVA 后虽然死亡率极低, 但其发病率可达 90%, 会造成产奶减少甚至停止、饿死乳猪等生产性能上的危害。1~3 日龄新生仔猪感染 SVA 后体态瘦弱, 贪睡, 不愿进食, 死亡率可达 30%~70%^[2-3], 给养猪行业带来了巨大的潜在隐患。首例 SVA 毒株 (SVV-001) 于 2002 年由美国科研人员从细胞培养基污染物中发现并分离得到^[4-5]; 2002—2013 年, SVA 主要在美国和加拿大呈零星发生; 2014—2016 年, 巴西、哥伦比亚和泰国均发现了猪 SVA 感染^[6-9]。2015—2017 年, 塞内卡病毒病在我国广东、福建、辽宁、湖北、河南、黑龙江等地相继确诊^[10-12], 目前国内尚无针对 SVA 的商品化疫苗, 也无特效的治疗方法, 一旦 SVA 大面积爆发必然给养殖产业带来极大的影响。

SVA 为单股、正链、RNA 病毒^[13], 属塞内卡病毒属 *Senecavirus*, 与心病毒属 (*Cardiovirus*) 成员的亲缘关系较近^[4,14-15]。SVA 基因组含有 7 280 个核苷酸, 包括 666 个核苷酸的非编码区和一个包含 6 543 个核苷酸的开放阅读框。SVA 有 4 种衣壳蛋白: VP1、VP2、VP3 和 VP4^[16], 其中 VP1、VP2 和

VP3 位于蛋白衣壳的外部, VP4 位于蛋白衣壳的内部^[17], 且 VP1 和 VP3 是主要的抗原表位区域, 可刺激机体产生中和抗体^[4,18]。Maggioli 等^[19]研究发现, 在 SVA 感染的急性期, 机体产生的抗体主要是抗 VP2 和 VP3 的特异性 IgM; 在康复期, 机体产生的抗体主要是抗 VP1、VP2、VP3 的特异性 IgM 和 IgG^[6], 说明 VP3 蛋白在感染早期就能产生中和抗体, 可作为塞内卡病毒病早期检测的靶标抗体。

猪感染 SVA 的症状与口蹄疫、水泡性口炎和水疱性疹等水泡类疾病的症状十分相似, 临床上难以区分^[1], 国内对 SVA 的检测主要以 RT-PCR 为主, 但 ELISA 方法既能达到与病毒中和试验、间接免疫荧光等方法高度一致, 又可实现 SVA 的快速、简便、敏感的诊断要求, 可用于大规模的流行病学研究或监测^[20]。本课题组已建立了基于 VP1 蛋白的 SVA 间接 ELISA 检测方法^[21], 本试验旨在进一步建立基于 VP3 蛋白的 SVA 间接 ELISA 检测方法, 比较基于不同蛋白建立的 SVA 间接 ELISA 检测方法的差异, 为 SVA 感染的临床诊断检测及未来疫苗免疫效果评价提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与血清 SVA 毒株及 87 份 SVA 阴性

猪血清(采自健康猪,SVA 荧光 PCR 检测阴性)、113 份 SVA 阳性血清(采自 SVA 灭活疫苗免疫的猪,病毒中和试验检测阳性)和 160 份猪血清(20 头 SVA 灭活疫苗免疫猪免疫后第 14,21,28,35,42,49,56,63 天的血清),均由河南省动物疫病预防控制中心提供。O 型和 A 型口蹄疫病毒(FMDV)阳性血清,为兰州兽医研究所生产的阻断 ELISA 检测试剂盒中所配备。猪伪狂犬病毒(PRV)、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)和猪瘟病毒(CSFV)阳性血清,均为美国爱德士(IDEXX)公司生产的 ELISA 检测试剂盒中所配备。

1.1.2 主要仪器和试剂 洗板机,瑞士 Tecan Austria GmbH 公司产品;BioTek-ELx808 酶标仪,美国伯腾公司产品;蛋白超滤离心管,购于 Millipore 公司。病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(CDC),购于西安天隆科技有限公司;5×PrimeScript RT Master Mix、Agarose Gel DNA Extraction Kit、Plasmid Purification Kit,购于 TaKaRa 公司;BCA 蛋白质量浓度测定试剂盒,购于碧云天生物技术公司;pGEM-T Easy Vector,购于 Promega 公司;JM109、BL21(DE3),购于康为世纪生物科技有限公司;pQE-30,购于优宝生物公司;T4 连接酶、*Bam*H I 和 *Sac* I 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶,购于宝生物工程(大连)有限公司;10×PBST、TMB 单组份显色液、Western Blot 试剂盒,购于 Solarbio 公司;山羊抗猪 HRP-IgG(H+L),购于 Proteintech 公司;包涵体蛋白溶解及复性试剂盒,购于天恩泽生物科技公司。

1.2 SVA VP3 基因的扩增及重组表达质粒的构建

参照 GenBank 中登录的 SVA VP3 基因序列(GenBank 登录号为:MN885796),设计 1 对特异性引物,P1:5'-TCAGGATCCCTGAACGCGAGAAC-CTCTAC-3',下划线部分为插入的 *Bam*H I 酶切位点;P2:5'-TCAGAGCTCCAAGCCTATGTCC-AAATAGA-3',下划线部分为插入的 *Sac* I 酶切位点。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,预期扩增出的目的片段长度为 717 bp。

使用病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(CDC)提取 SVA 的总 RNA,用 5×PrimeScript RT Master Mix 将 RNA 反转录为 cDNA,备用。以合成的 cDNA 为模板 PCR 扩增 VP3 基因,设以 ddH₂O 代替模板的处理为阴性对照。PCR 反应体系为:Premix Taq 12.5 μL,ddH₂O 8.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,cDNA 模板 3 μL。反应程序为:94℃预变性 4 min;

94℃45 s,56℃45 s,72℃45 s,35 个循环;72℃10 min,4℃停止。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后使用 Agarose Gel DNA Extraction Kit 回收目的片段。

将 VP3 基因与 pGEM-T Easy 载体连接,构建重组质粒 rT-VP3,进行蓝白斑试验筛选。对筛选出的阳性重组质粒进行 PCR 和测序鉴定,设以 ddH₂O 代替模板的处理为阴性对照。将鉴定正确的重组质粒和 pQE-30 载体进行 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切,回收两者的目的片段,用 T4 连接酶在 4℃条件下过夜连接,构建重组表达质粒 rpQE30-VP3。将 rpQE30-VP3 转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,对质粒进行 PCR 及 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切鉴定,将鉴定正确的重组质粒送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.3 重组 VP3(rVP3)蛋白的表达、纯化及抗原性鉴定

选取鉴定过的阳性菌落,1:100 接种到 LB(含氨苄青霉素 100 μg/mL)培养液,在 37℃下 180 r/min 培养约 2 h,测定 600 nm 处吸光值(OD₆₀₀)为 0.5~0.6 时(即达到对数生长期),加入 IPTG 使终浓度为 0.3 mmol/L,诱导 6 h。取 1 mL 菌液 4℃下 8 000 r/min 离心 5 min,取沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,观察 rVP3 蛋白是否表达。将菌液于 4℃下 8 000 r/min 离心 30 min,收集菌体,于-80℃冻融后用裂解液重悬,超声波裂解(功率 320 W,工作 3 s 间歇 7 s,重复至菌体完全破碎),4℃下 8 000 r/min 离心 30 min,收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,分析 rVP3 蛋白是否可溶性表达。按照包涵体蛋白溶解及复性试剂盒说明书对包涵体溶解、洗涤及复性,之后用 10 K 蛋白超滤管 5 000 r/min 离心 20 min 进行浓缩,按照 BCA 蛋白质量浓度测定试剂盒说明书测定浓缩后蛋白的质量浓度。

采用 Western Blot 法鉴定 rVP3 蛋白的抗原特异性。将经过 SDS-PAGE 鉴定的样品重新进行 SDS-PAGE,同时设置 pQE-30 转化的产物为阴性对照,然后电转印至硝酸纤维素膜(NC 膜)。将 NC 膜置于封闭液(含 50 g/L 脱脂奶粉的 PBST)中,4℃封闭过夜。将 NC 膜取出后用 PBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入灭活的 SVA 阳性血清(1:200 稀释)37℃孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,每次 5 min;加入山羊抗猪 HRP-IgG(H+L)(1:5 000 稀释)37℃孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,每次 5 min;用 ECL 底物显色试剂盒显色。

1.4 间接 ELISA 方法工作条件的优化

采用矩阵法,分别对包被液[pH 7.2 的 PBS、pH 9.6 的碳酸盐缓冲液(CB)]、纯化的 rVP3 蛋白包被浓度(1,2,4 μg/mL)、封闭液(10 g/L BSA,50 g/L 脱脂奶粉和 5 g/L Casein)、封闭条件(37 ℃ 下 2 h、4 ℃ 过夜)、样品稀释倍数(1 : 25,1 : 50,1 : 100,1 : 200)、TMB 室温下作用时间(5,10,15 min)、山羊抗猪 HRP-IgG (H + L) 稀释倍数(1 : 2 500,1 : 5 000,1 : 7 500)和作用时间(15,30,60 min)等条件进行优化。

1.5 间接 ELISA 方法临界值的确定

采用上述最优条件检测 SVA 阳性对照(经 3 次重复检测确定 P 值)和 200 份临床猪血清样品(87 份 SVA 阴性猪血清和 113 份 SVA 阳性血清)。采用 SPSS 16.0 软件对 200 份血清样品在 450 nm 处的吸光值(OD₄₅₀)进行分析。以敏感性为纵坐标,1-特异性为横坐标,使用非参数构建受试者工作特征曲线(ROC),以 Youden 指数(敏感性-(1-特异性))最大点作为阴阳性判断的临界点,确定间接 ELISA 方法的判定标准。

1.6 间接 ELISA 方法的特异性、敏感性、重复性和稳定性检测

1.6.1 特异性 采用已建立的间接 ELISA 方法分别对 SVA 阴性血清、SVA 阳性血清以及 FMDV(O/A 型)、PRV、PRRSV、CSFV 阳性血清进行检测,同时设置 SVA 阳性对照,重复 3 次,分析该方法的特异性。

1.6.2 敏感性 随机选取 SVA 阳性血清 10 份,进行病毒中和试验;同时,对血清进行 2 倍倍比稀释

(1 : 2,1 : 4,1 : 8,...,1 : 512)后,采用已建立的间接 ELISA 方法进行检测,分析该方法的敏感性。

1.6.3 重复性和稳定性 随机选取 SVA 阴性、阳性血清共 10 份。用 3 个批次 rVP3 蛋白包被的 ELISA 反应板进行检测;同时,采用同一批次 rVP3 蛋白包被的 ELISA 反应板,分别在 3 个不同的时间点进行检测。上述试验每份血清平行重复 3 次,测定 OD₄₅₀ 值。3 次平行重复结果取其平均值,计算批内和批间的变异系数(CV),分析该方法的重复性和稳定性。

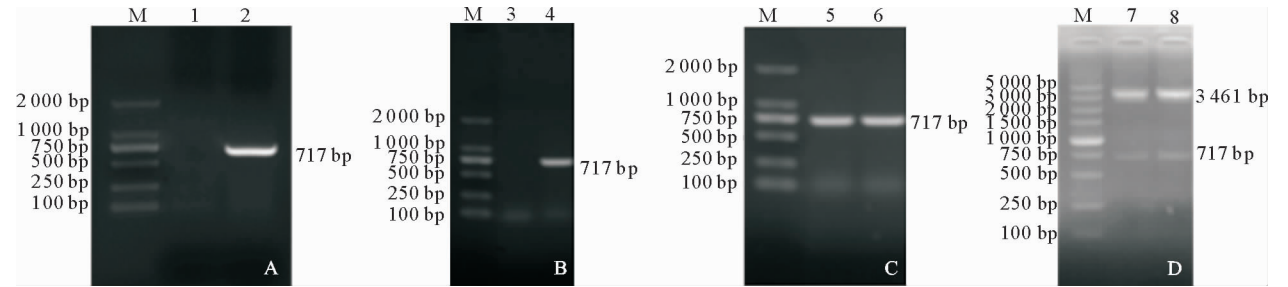
1.7 血清样品的检测

分别采用本试验建立的方法和课题组已建立的基于 VP1 蛋白的 SVA 间接 ELISA 检测方法^[21],对 SVA 灭活疫苗免疫猪不同时期的 160 份血清进行检测,以 SVA 阴、阳性血清为对照,计算 SVA 抗体阳性率,分析两方法间的差异。

2 结果与分析

2.1 SVA VP3 基因的扩增及 rpQE30-VP3 的构建

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,结果显示,在 717 bp 处获得一条特异性片段(图 1-A)。筛选出的阳性重组质粒 rT-VP3 经 PCR 扩增,获得一条 717 bp 的特异性条带(图 1-B);测序结果证实,rT-VP3 构建成功。构建的重组表达质粒 rpQE30-VP3 经 PCR 鉴定后,获得一条 717 bp 的特异性 PCR 扩增条带(图 1-C),BamH I 和 Sac I 双酶切鉴定获得了 3 461 和 717 bp 的条带,与预期结果相符(图 1-D)。经测序对比分析,结果显示目的序列无碱基插入、突变或缺失,表明重组质粒 rpQE30-VP3 构建成功。



A. VP3 基因 PCR 扩增结果;B. rT-VP3 质粒 PCR 扩增结果;C. rpQE30-VP3 质粒 PCR 扩增结果;D. rpQE30-VP3 质粒双酶切鉴定结果。M. DNA Marker;1,3. 阴性对照;2. VP3 基因 PCR 扩增产物;4. rT-VP3 质粒 PCR 扩增产物;5~6. rpQE30-VP3 质粒 PCR 扩增产物;7~8. rpQE30-VP3 质粒双酶切产物

A. PCR amplification results of VP3;B. PCR amplification results of rT-VP3;C. PCR amplification results of rpQE30-VP3;D. Identification of rpQE30-VP3 plasmid digested. M. DNA Marker;1,3. Negative control;2. PCR amplification products of VP3;4. PCR amplification products of rT-VP3;5~6. PCR amplification products of rpQE30-VP3;7~8. Enzyme-digested product of rpQE30-VP3

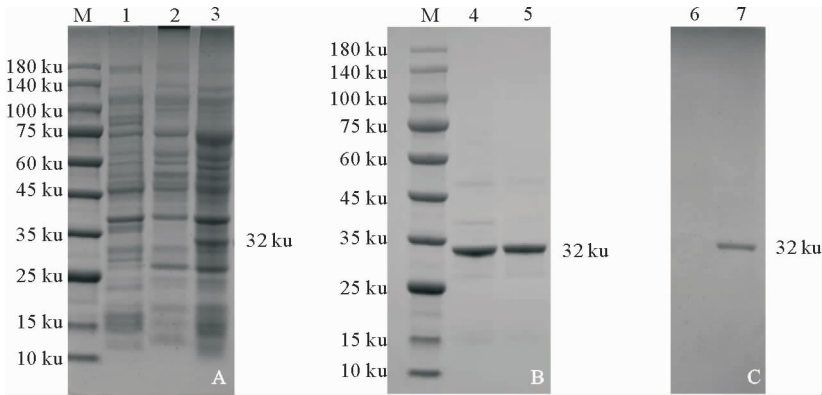
图 1 SVA VP3 基因及 rT-VP3 质粒和 rpQE30-VP3 质粒的鉴定结果

Fig. 1 Identification of SVA VP3 gene, rT-VP3 plasmid and rpQE30-VP3 plasmid

2.2 rVP3 蛋白的表达、纯化及抗原性鉴定

rpQE30-VP3 经 IPTG 诱导,表达出 32 ku 的 rVP3 蛋白(图 2-A)。诱导表达产物经超声破碎后离心,取沉淀和上清进行 SDS-PAGE 鉴定,结果显示目的蛋白主要存在于沉淀中,表明 rVP3 以包涵

体的形式表达。纯化的 rVP3 蛋白分子质量约 32 ku(图 2-B)。经 Western Blot 鉴定约 32 ku 处有特异性条带(图 2-C),表明 rVP3 蛋白能与 SVA 阳性血清发生特异性反应,具有较好的反应原性。经 BCA 试剂盒检测,该蛋白的质量浓度为 1.54 mg/mL。



A. rVP3 蛋白 SDS-PAGE;B. rVP3 蛋白纯化后 SDS-PAGE;C. rVP3 蛋白 Western Blot。M. 蛋白质标准分子量;

1,6. pQE-30 空载体诱导表达对照;2. 未诱导的 rVP3 蛋白;3. IPTG 诱导的 rVP3 蛋白;4,5,7. 纯化后的 rVP3 蛋白

A. The SDS-PAGE results of rVP3;B. The SDS-PAGE results of purified rVP3;C. The Western Blot of purified rVP3.

M. Protein Marker;1,6. Induction of pQE-30 empty vector;2. Uninduction of rpQE-30-VP3;3. Induction of rpQE-30-VP3;

4,5,7. Purification of rpQE-30-VP3

图 2 rVP3 蛋白的表达、纯化及抗原性分析

Fig. 2 Expression, purification and antigenicity analysis of rVP3 protein

2.3 间接 ELISA 方法最佳工作条件的优化

矩阵法试验结果显示,间接 ELISA 的最佳工作条件为:抗原 2 μ g/mL,碳酸盐缓冲液(pH 9.6)在 4 $^{\circ}$ C 下包被 14~16 h,5 g/L Casein 在 4 $^{\circ}$ C 下封闭 14~16 h,1 : 100 稀释样品在 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 h,1 : 5 000 稀释山羊抗猪 HRP-IgG(H+L)在 37 $^{\circ}$ C 下反应 30 min,TMB 在室温避光条件下反应 10 min。

2.4 间接 ELISA 方法的判定标准

利用 SPSS 16.0 软件对 200 份血清样品的 OD₄₅₀ 检测结果进行分析,绘制的 ROC 曲线见图 3。结果显示,SPSS 16.0 软件数据分析 Youden 指数最大时所对应的 OD₄₅₀ 值,即临界 OD₄₅₀ 为 0.276,3 次重复测定阳性对照的 OD₄₅₀ 为 2.0。临界 OD₄₅₀/阳性对照 OD₄₅₀ = 0.138,因此,本方法的判定标准定为:样本 OD₄₅₀ (S)/阳性对照 OD₄₅₀ (P) > 0.138 为 SVA 抗体阳性,反之则为阴性。

2.5 间接 ELISA 方法的特异性、敏感性、重复性和稳定性

2.5.1 特异性 特异性检测结果(表 1)显示,rVP3 蛋白与 FMDV(O/A 型)、PRV、PRRSV、CSFV 病原阳性血清均为阴性(S/P $\leq$ 0.138),仅能与 SVA 阳性血清发生反应,表明本检测方法特异性较好。

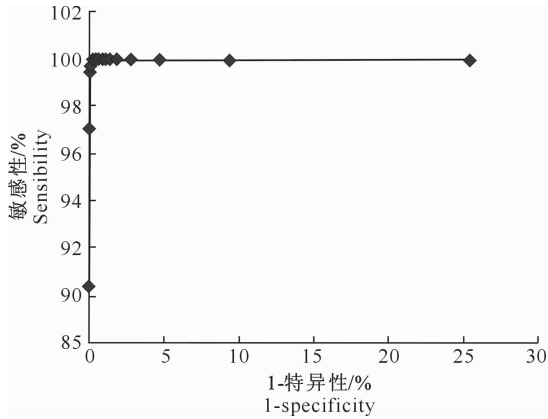


图 3 基于 VP3 蛋白的 SVA 间接 ELISA 检测方法的 ROC 曲线

Fig. 3 ROC curve of SVA indirect ELISA method based on VP3 protein

2.5.2 敏感性 敏感性检测结果(表 2)显示,有 6 份血清样品的结果与中和试验一致,4 份样品最高稀释度倍数比中和试验仅低 1 个稀释度。病毒中和试验能够检测出的平均最高稀释度为 1 : 150.4,而本方法能够检测出的平均最高稀释度为 1 : 113.6。结果表明,本研究建立的间接 ELISA 检测方法虽比中和试验结果略低,但依旧有较好的敏感性。

表 1 基于 VP3 蛋白的 SVA 间接 ELISA 检测方法的特异性

Table 1 Specificity of SVA indirect ELISA method based on VP3 protein

项目 Item	SVA 阳性血清 SVA positive serum	SVA 阴性血清 SVA negative serum	O 型 FMDV 阳性血清 FMDV(O) positive serum	A 型 FMDV 阳性血清 FMDV(A) positive serum	PRV 阳性血清 PRV positive serum	CSFV 阳性血清 CSFV positive serum	PRRSV 阳性血清 PRRSV positive serum
S	1.669	0.146	0.134	0.107	0.042	0.136	0.084
S/P value	0.835	0.073	0.067	0.054	0.021	0.068	0.042
结果 Results	+	—	—	—	—	—	—

注:S 为检测样本 OD₄₅₀ 值;P 为阳性对照 OD₄₅₀ 值,P=2.0。
Note:S is OD₄₅₀ of the test sample and P is OD₄₅₀ of positive control,P=2.0.

表 2 基于 VP3 蛋白的 SVA 间接 ELISA 检测方法的敏感性

Table 2 Sensitivity of SVA indirect ELISA method based on VP3 protein

样品编号 Sample number	间接 ELISA 法最高稀释倍数 The highest dilution ratio of indirect ELISA method	中和试验最高稀释倍数 The highest dilution ratio of neutralization test	样品编号 Sample number	间接 ELISA 法最高稀释倍数 The highest dilution ratio of indirect ELISA method	中和试验最高稀释倍数 The highest dilution ratio of neutralization test
1	1 : 32	1 : 64	6	1 : 64	1 : 128
2	1 : 128	1 : 128	7	1 : 64	1 : 64
3	1 : 256	1 : 256	8	1 : 128	1 : 128
4	1 : 256	1 : 512	9	1 : 64	1 : 64
5	1 : 128	1 : 128	10	1 : 16	1 : 32

2.5.3 重复性和稳定性 将选取的 10 份猪血清分别进行批内和批间重复性检测,其变异系数(CV)分别为 1.0%~3.8%和 3.0%~8.0%,批内小于 4%,批间小于 9%(表 3),表明该检测方法重复性和稳定性较好。

表 3 基于 VP3 蛋白的 SVA 间接 ELISA 检测方法的重复性

Table 3 Repeatability of SVA indirect ELISA method based on VP3 protein

样品编号 Sample number	批内结果 The result of intra		批间结果 The result of inter	
	OD ₄₅₀	变异系数/% CV	OD ₄₅₀	变异系数/% CV
1	1.141±0.024	2.1	1.208±0.079	6.5
2	1.077±0.026	2.5	1.114±0.058	5.2
3	1.025±0.037	3.6	1.059±0.076	7.2
4	0.865±0.033	3.8	0.898±0.027	3.0
5	0.747±0.020	2.7	0.740±0.031	4.2
6	0.562±0.014	2.5	0.555±0.044	8.0
7	0.436±0.006	1.3	0.453±0.021	4.6
8	0.278±0.004	1.6	0.298±0.022	7.4
9	0.185±0.002	1.0	0.191±0.012	6.4
10	0.121±0.002	1.8	0.128±0.007	5.3

2.6 基于 VP3,VP1 蛋白的 SVA 间接 ELISA 法
免疫血清检测结果比较

采用两种方法对 SVA 灭活疫苗免疫猪不同时期的 160 份血清进行检测。结果显示,在免疫后的第 14,21,28,35,42,49,56 和 63 天,VP1 抗体的阳性率分别为 30.00%,70.00%,90.00%,100.00%,90.00%,90.00%,85.00%和 80.00%;VP3 抗体的阳性率分别为 35.00%,70.00%,80.00%,100.00%,90.00%,100.00%,95.00%和 95.00%(图 4),表明两种方法均能在不同时期检测出抗体,但抗体阳性检出率略有差异。

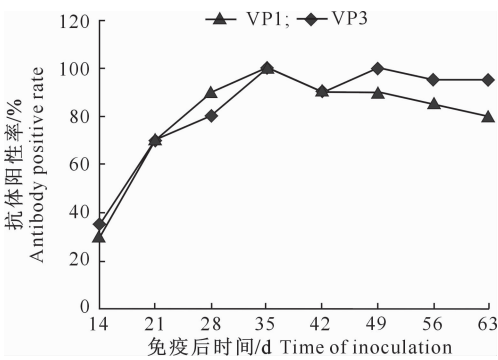


图 4 基于 VP3、VP1 蛋白的 SVA 间接 ELISA 检测方法的检测结果对比

Fig. 4 Comparison of detection effects of indirect ELISA based on VP3 and VP1 protein

3 讨 论

2015 年初,我国与 SVA 相关的水疱病暴发并开始增多,且与新生仔猪死亡率的升高密切相关^[5,22]。2015 年我国广东、福建、河南、湖北^[23-24]等地陆续检出 SVA,隐性感染率极高,给我国养猪行业带来了潜在的危害。SVA 与其他水疱病在临床症状上难以区分,还需要依靠实验室诊断技术。目前国内外尚无 SVA 疫苗的应用,ELISA 检测出抗体阳性即为感染。而间接 ELISA 方法具有敏感度高、特异性强、重复性和稳定性好以及成本低、操作简单等优点,适用于基层的检测。目前,已有针对 VP1 和 VP2 蛋白建立的间接 ELISA 抗体检测方法^[21,25-26],但市场上仍缺少商品化可用试剂盒。本研究以 VP3 蛋白作为包被抗原,建立了检测 SVA 抗体的间接 ELISA 方法。本方法与常发猪病毒病阳性猪血清无交叉反应,对检测 SVA 阳性血清具有特异性;阳性血清检测结果与中和试验基本一致,具有良好的敏感性;批内和批间的变异系数均在 9% 以内,具有良好的重复性和稳定性。为临床血清 SVA 抗体检测提供了成本低、操作简单的技术手段,同时也为不同蛋白所建立的间接 ELISA 方法的对比奠定了基础。评估本研究方法的敏感性时发现,其敏感性略低于中和试验,可能是中和试验检测所有的中和抗体,而本方法检测的是 VP3 单一蛋白的 IgG 抗体^[6],因而两种试验会产生一定差别,但是本研究建立的间接 ELISA 方法仍具有较高的敏感性。

采用本研究建立的基于 VP3 蛋白的间接 ELISA 方法和本实验室已建立的基于 VP1 蛋白的间接 ELISA 方法,分别对 SVA 灭活疫苗免疫猪不同时期的 160 份血清进行检测。结果显示,两种方法均能在不同时期检测出抗体,但抗体阳性检出率略有差异,免疫后第 14 天到第 35 天,VP1 较 VP3 检测出的抗体阳性率略高;从第 42 天至第 63 天,VP3 比 VP1 检测出的抗体阳性率略高。目前本实验室正在进行 VP2 蛋白间接 ELISA 方法的建立,以期进行不同抗体水平的检测。

[参考文献]

- [1] Joshi L R, Fernandes M H, Clement T, et al. Pathogenesis of senecavirus A infection in finishing pigs [J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(12): 3267-3279.
- [2] Vannucci F A, Linhares D C L, Barcellos D E S N, et al. Identification and complete genome of seneca valley virus in vesicular

- fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015, 62(6): 589-593.
- [3] Zhang J Q, Pablo P, Chen Q, et al. Full-length genome sequences of senecavirus A from recent idiopathic vesicular disease outbreaks in U. S. swine [J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(6): e01270-15.
 - [4] 张永宁, 吴绍强, 林祥梅. 塞内卡病毒病研究进展 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(8): 1381-1388.
Zhang Y N, Wu S Q, Lin X M. The research progress of senecaviral disease [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(8): 1381-1388.
 - [5] 方 静, 赵 明. 塞内卡病毒病的特征及防控概述 [J]. *贵州畜牧兽医*, 2018, 42(6): 46-48.
Fang J, Zhao M. The overview of characteristics and prevention and control of senecavirus A [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Guizhou*, 2018, 42(6): 46-48.
 - [6] 黄健强, 吴静波. 猪塞内卡病毒研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2019, 40(3): 82-88.
Huang J Q, Wu J B. Research progress of porcine senecavirus A [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(3): 82-88.
 - [7] Sun D, Vannucci F, Knutson T P, et al. Emergence and whole-genome sequence of senecavirus A in Colombia [J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2017, 64(2): 1-4.
 - [8] Saeng-chuto K, Rodtian P, Temeeyasen G, et al. The first detection of senecavirus A in pigs in Thailand, 2016 [J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2017, 65(1): 1-4.
 - [9] 赵振翔, 朱紫祥, 杨 帆, 等. 猪塞尼卡谷病毒流行态势与诊断防控研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(12): 3024-3030.
Zhao Z X, Zhu Z X, Yang F, et al. Advance in seneca valley virus epidemiology, diagnosis and control [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(12): 3024-3030.
 - [10] 卢 昌, 辛俊宝, 黄 凯, 等. 值得注意的猪的潜在病原塞内卡病毒 [J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(11): 1401-1405.
Lu C, Xin J B, Huang K, et al. Senecavirus A: a noteworthy potential pathogen of swine [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(11): 1401-1405.
 - [11] Zhu Z, Yang F, Chen P, et al. Emergence of novel seneca valley virus strains in China, 2017 [J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2017, 64(4): 1024-1029.
 - [12] Qian S, Fan W, Qian P, et al. Isolation and full-genome sequencing of seneca valley virus in piglets from China, 2016 [J]. *Virological Journal*, 2016, 13(1): 173.
 - [13] 胡东波, 李雪锋, 晋春霞, 等. A 型塞内卡病毒 CH-HNXC 株的分离鉴定及其致病性研究 [J]. *动物医学进展*, 2019, 40(8): 18-23.
Hu D B, Li X F, Jin C X, et al. Isolation and pathogenicity studies of senecavirus A strain CH-HNXC [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(8): 18-23.
 - [14] Hales L M, Knowles N J, Reddy P S, et al. Complete genome sequence analysis of seneca valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus [J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89(5): 1265-1275.

- [15] 樊晓旭,迟田英,赵永刚,等. 塞尼卡谷病毒病研究进展 [J]. 中国预防兽医学报,2016,38(10):831-834.
Fan X X,Chi T Y,Zhao Y G,et al. The research progress of senecavirus A [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2016,38(10):831-834.
- [16] 范 慧,李 亮,姜 平,等. 塞内卡病毒 A 的 RT-PCR 检测方法的建立和应用 [J]. 畜牧兽医学报,2019,50(6):1312-1318.
Fan H,Li L,Jiang P,et al. Isolation and identification of porcine senecavirus A and mutation analysis on its VP1 gene [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2019,50(6):1312-1318.
- [17] 张永宁,张 舟,诸明欣,等. A 型塞内卡病毒 VP2 蛋白原核表达及其多克隆抗体的制备 [J]. 中国畜牧兽医,2019,46(1):256-263.
Zhang Y N,Zhang Z,Chu M X,et al. Prokaryotic expression of the VP2 protein of senecavirus A and preparation of its polyclonal antibodies [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2019,46(1):256-263.
- [18] Gimenez-Lirola L G,Rademacher C,Linhares D,et al. Serological and molecular detection of senecavirus A associated with an outbreak of swine idiopathic vesicular disease and neonatal mortality [J]. J Clin Microbiol,2016,54(8):2082-2089.
- [19] Maggioli M F,Lawson S,de Lima M,et al. Adaptive immune responses following senecavirus A infection in pigs [J]. Journal of Virology,2017,1717(17):1-46.
- [20] Goolia M,Vannucci F,Yang M,et al. Validation of a competitive ELISA and a virus neutralization test for the detection and confirmation of antibodies to senecavirus A in swine sera [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,2017,29(2):250-253.
- [21] 赵月龙,闫若潜,王淑娟,等. 基于 A 型塞内卡病毒结构蛋白 VP1 间接 ELISA 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国预防兽医学报,2019,41(8):818-823.
Zhao Y L,Yan R Q,Wang S J,et al. Establishment and preliminary application of indirect ELISA based on structural protein VP1 of senecavirus A [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2019,41(8):818-823.
- [22] 刘 存,刘 畅,刘 琪,等. A 型塞内卡病毒病原学、流行病学和诊断研究进展 [J]. 猪业科学,2018,35(1):104-108.
Liu C,Liu C,Liu Q,et al. Research progress in etiology, epidemiology and diagnosis of senecavirus A [J]. Swine Industry Science,2018,35(1):104-108.
- [23] Wu Q,Zhao X,Bai Y,et al. The first identification and complete genome of senecavirus affecting pig with idiopathic vesicular disease in China [J]. Transboundary & Emerging Diseases,2017,64(5):1633.
- [24] Wang H,Li C,Zhao B,et al. Complete genome sequence and phylogenetic analysis of senecavirus isolated in northeast China in 2016 [J]. Archives of Virology,2017,162(10):3173-3176.
- [25] 申 珊,史雪坤,李 蕊,等. A 型塞内卡病毒 VP2 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国兽医科学,2020,50(2):152-158
Shen S,Shi X K,Li R,et al. Establishment of indirect ELISA for detection of VP2 protein of senecavirus A [J]. Chinese Veterinary Science,2020,50(2):152-158
- [26] 范 慧,曾 洁,李 亮,等. 塞内卡病毒 A(SVA) VP1 间接 ELISA 抗体检测方法的建立及应用 [J]. 中国兽医学报,2019,39(10):1907-1912.
Fan H,Zeng J,Li L,et al. Establishment and application of indirect ELISA for detection of VP1 antibody of senecavirus A (SVA) [J]. Chinese Veterinary Science,2019,39(10):1907-1912.