

基于猪丁型冠状病毒重组蛋白 N 间接 ELISA 检测方法的建立与初步应用

刘磊^{1,2}, 秦毅斌¹, 陈忠伟¹, 赵武¹, 段群棚¹, 全琛宇¹, 赵硕¹, 许心婷¹, 陈婷婷¹, 梁家幸¹, 周英宁¹, 许艺兰¹, 李斌¹, 蒋冬福¹, 卢敬专¹, 何颖^{1*}, 卢冰霞^{1*}

(1. 广西兽医研究所 广西兽医生物技术重点实验室, 广西 南宁 530001;

2. 广西农业职业技术大学, 广西 南宁 530007)

摘要: 为建立快速、准确的猪丁型冠状病毒(PDCoV)抗体 ELISA 检测方法,本研究以重组蛋白 N 作为包被抗原,建立了 PDCoV 间接 ELISA 抗体检测方法。结果显示,经条件筛选,确定了该 ELISA 最佳反应条件:重组蛋白每孔包被 0.2 μg;待检血清 1:80 稀释,孵育 60 min;酶标二抗 1:4 000 稀释,反应 30 min;底物显色 10 min。待检血清样品 S/P 值 > 0.200 时判定为阳性, S/P 值 < 0.173 时判定为阴性, S/P 值介于 0.173 和 0.200 之间则判为可疑。特异性试验结果表明,该检测方法不与 HCV、FMDV、PRRSV、PRV、TGEV 和 PEDV 的阳性血清发生交叉反应;重复性试验结果显示,批内变异系数为 0.79%~4.75%,批间变异系数在 1.92%~6.60% 之间,表明重复性良好;敏感性试验结果显示,该方法可检测到血清最大稀释度为 1:320。符合率试验结果显示,本方法与中和试验检测结果符合度高,阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 86.36%、96.43% 和 92.00%。利用本研究建立的 ELISA 方法对 456 份来自广西地区不同阶段猪群的血清样品进行检测,结果显示,总体样品阳性率为 40.40%,不同阶段猪群抗体阳性率有较大区别,后备母猪的阳性率可高达 100%,保育猪阳性率最低仅为 3.90%。

关键词: 猪丁型冠状病毒; N 蛋白; 间接 ELISA

Establishment and preliminary application of indirect ELISA based on recombinant protein N for the detection of antibodies against porcine deltacoronavirus

LIU Lei^{1,2}, QIN Yi-bin¹, CHEN Zhong-wei¹, ZHAO Wu¹, DUAN Qun-peng¹, QUAN Chen-yu¹, ZHAO Shuo¹, XU Xin-ting¹, CHEN Ting-ting¹, LIANG Jia-xing¹, ZHOU Ying-ning¹, XU Yi-lan¹, LI Bin¹, JIANG Dong-fu¹, LU Jing-zhuan¹, HE Ying^{1*}, LU Bing-xia^{1*}

(1. Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China;

2. Guangxi Agricultural Vocational and Technical University, Nanning 530007, China)

Abstract: Aim to establish a rapid and accurate ELISA method for the detection of PDCoV antibody, an indirect ELISA method for the detection of PDCoV antibody was optimized by using the purified recom-

收稿日期:2022-06-08;修回日期:2022-08-04

基金项目:广西创新驱动发展专项资金项目(桂科 AA17204057);玉林市科学研究与技术开发项目(玉市科 20220515;玉市科 20220516);柳州市科学研究与技术开发项目(2020NACB0804)

作者简介:刘磊(1989-),男,安徽宣城人,兽医师/讲师,硕士,研究方向为动物传染病病原与分子生物学, E-mail: gxullei@163.com。* 通讯作者:何颖(1979-),女,广西柳州人,正高级兽医师,博士,研究方向为动物传染病病原与分子生物学, E-mail: heyings21@163.com;卢冰霞(1986-),女,广西桂平人,高级兽医师,硕士,研究方向为动物传染病病原与分子生物学, E-mail: lubingxia13@163.com。

binant protein N as the coating antigen. The results showed that the optimal conditions of ELISA as follows, the recombinant protein was coated with 0.2 μg per well, the serum was diluted at 1:80 and incubated for 60 min, enzyme labeled secondary antibody was diluted at 1:4 000 and reacted for 30 min, finally add substrate for color development for 10 minutes under room temperature. The serum sample was determined to be positive while S/P value >0.200 , to be negative when S/P value <0.173 , to be suspected when S/P value between 0.173 and 0.200. Specificity experiment showed that the method did not cross-react with positive serums of HCV, FMDV, PRRSV, PRV, TGEV, and PEDV. Repeatability experiment showed good repeatability with inter-assay coefficients of variation ranging from 0.79%—4.75% and intra-assay coefficients of variation ranging from 1.92%—6.60%. Sensitivity experiment showed that the maximum dilution ratio of serum detected was 1:320. Coincidence rate test showed that the method has high consistency with the results of neutralization test. The positive coincidence rate, negative coincidence rate and total coincidence rate are 86.36%, 96.43% and 92.00% respectively. The indirect ELISA established in this study was used to detect 456 serum samples of pigs at different stages in Guangxi. The overall positive rate of samples was 40.40%, and the positive rates of pigs at different stages were quite different. The positive rate of gilts can be as high as 100%, and the lowest positive rate of nursery pigs was only 3.90%.

Key words: porcine deltacoronavirus; nucleocapsid protein; indirect ELISA

* **Corresponding authors:** HE Ying, E-mail: heyings921@163.com; LU Bing-xia, E-mail: lubingxia13@163.com

猪丁型冠状病毒 (porcine deltacoronavirus PDCoV) 作为一种新型猪肠道冠状病毒, 可引起不同品种、不同日龄的猪感染, 感染猪出现呕吐、腹泻、脱水以及消瘦等症状, 与猪流行性腹泻 (PED) 和猪传染性胃肠炎 (TGE) 的发病症状极为相似, 表现为日龄越小症状越严重、死亡率越高。PDCoV 最早于 2012 年首次从市场采集的猪直肠拭子中被检测到, 但并不能明确其致病性^[1]。2014 年 2 月, 美国从发生腹泻猪场检测到 PDCoV, 而对其他常见病毒性腹泻病毒, 如 TGEV、PEDV、猪轮状病毒 (PoRV) 的检测结果均为阴性^[2], 表明 PDCoV 可能具有致病性并引起仔猪腹泻。

自美国首先报道腹泻猪群存在 PDCoV 感染后, 包含中国、加拿大等在内的多个国家陆续报道了 PDCoV 的发生或流行^[3-8], PDCoV 的流行范围有着逐渐扩大的趋势, 对全球养猪业的危害日趋凸显。国内 Dong 等^[9]从 2004 年采自安徽猪场的粪便样本中检出了 PDCoV, 说明 PDCoV 早已存在于我国的猪群中。抗体检测可以辅助诊断、评估疫苗接种效果, 是疫病监控预警、控制或净化疾病的重要手段。建立灵敏度高、特异性好的 PDCoV 抗体检测方法对了解 PDCoV 的流行情况、制定有效防控措施具有重要意义。

PDCoV 病毒粒子中核衣壳 (N) 蛋白含量丰富, 且有着良好的免疫原性。研究发现, 猪感染 PDCoV 后 N 蛋白抗体产生早、水平高、维持久, 且不同 PDCoV 毒株中 N 蛋白高度保守^[10-11]。因此, 建立 PDCoV 抗

体血清学检测方法可选择 N 蛋白作为靶蛋白。笔者所在课题组前期已通过大肠杆菌原核表达系统表达并纯化获得了重组 PDCoV N 蛋白, 本研究以此蛋白作为包被抗原, 优化建立了检测 PDCoV 抗体的 ELISA 方法并进行了初步应用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

PDCoV 重组蛋白 N (分子质量大小为 58 ku, 浓度为 0.6 mg/mL) 由本实验室原核表达并纯化。456 份猪血清样品于 2017—2018 年采自广西不同地市规模化猪场。猪瘟病毒 (HCV)、口蹄疫病毒 (FMDV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪伪狂犬病病毒 (PRV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 这 6 种猪重要疫病病原阳性血清由本实验室保存。

1.2 相关试剂的配制

包被液、血清及酶标抗体稀释液、洗涤液、封闭液、终止液参考秦毅斌等^[12]的方法配制。

1.3 间接 ELISA 的优化

1.3.1 包被抗原浓度与二抗工作浓度的优化 参考秦毅斌等^[12]的方法, 使用重组蛋白 N 作为包被抗原, 先将抗原稀释至 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 再用倍比稀释法稀释至 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 试验共设 7 个稀释度, 各个稀释度分别包被同一个竖行, 每孔 100 μL 。以 HRP-山羊抗猪 IgG 抗体作为二抗, 先用抗体稀释液将二抗稀释成 1:1 000, 再用倍比稀释法稀释至 1:32 000,

共设 6 个稀释度,各个稀释度分别加在同一个横行,每孔 100 μL ,形成方阵。试验设 3 个重复,测定每个条件下阴阳性对照血清的 D_{450} 值,并计算二者比值 (P/N 值)。取 P/N 值最大组的反应条件作为最佳抗原包被浓度和最佳二抗反应浓度。

1.3.2 抗原包被条件的优化 参考秦毅斌等^[12]的方法,以 1.3.1 中的优化条件包被抗原,100 μL /孔;试验分成 3 组,置于不同条件下进行包被,分别为 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜、37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒 2 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后再置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒 2 h。每组设 3 个重复,分别进行 ELISA 并计算出 P/N 值。将 P/N 值最大组的反应条件作为抗原包被的最佳条件。

1.3.3 封闭时间的优化 参考秦毅斌等^[12]的方法,以 1.3.1 和 1.3.2 中优化获得的条件包被抗原。分 4 组优化封闭时间,4 个试验组均加 250 μL 封闭液后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱分别封闭 0.5 h、1 h、1.5 h 和 2 h。洗涤后进行 ELISA,读数后比较各组 P/N 值,取最大值的那组为最佳封闭时间。

1.3.4 血清稀释度及孵育时间的优化 参考秦毅斌等^[12]的方法,以前面优化获得的最佳条件包被抗原并进行封闭。将阴阳性血清先进行 1:10 稀释后,再倍比稀释至 1:320,取各稀释度阴阳性血清 100 μL 加入酶标板中,每个稀释度血清设 3 个重复。再分成 3 组,分别孵育 30 min、60 min 和 120 min,后续各组 ELISA 反应条件相同。反应结束后并比较各组 P/N 值,取最大值的那组为最佳血清稀释度和最佳孵育时间。

1.3.5 二抗反应时间的优化 参考秦毅斌等^[12]的方法,以前述优化获得的最佳条件进行抗原包被、封闭、血清孵育,按照优化后的浓度加入二抗后再分成 4 组,分别于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min、30 min、45 min 和 60 min,每组 3 个重复,后续各组 ELISA 反应条件相同。反应结束后比较各组 P/N 值,取最大值的那组为最佳二抗反应时间。

1.3.6 底物显色时间的优化 参考秦毅斌等^[12]的方法,以前面优化后的最佳条件包被抗原、封闭、加入血清并孵育、加入二抗并反应。洗涤并加入显色液 (100 μL /孔) 后分成 4 组,分别于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱避光显色 5 min、10 min、15 min 和 20 min,每组 3 个重复,比较各组 P/N 值,取最大值的那组为最佳底物显色时间。

1.4 阴阳性临界值的确定

参考秦毅斌等^[12]的方法,随机选取猪血清若干份作为一抗进行 Western-blot 试验,获得 30 份 PDCoV 阴性猪血清,再利用本研究建立的间接 ELISA 方法

检测,计算出每份血清的 S/P 值。 S/P 值 = (样品血清 D_{450} 值 - 阴性对照血清 D_{450} 值) / (阳性对照血清 D_{450} 值 - 阴性对照血清 D_{450} 值)。利用 Excel 软件求出 30 份血清样品 S/P 值的平均值 (\bar{x}) 和标准差 (SD)。阴阳性判定标准: S/P 值 $< \bar{x} + 2SD$ 为阴性; S/P 值 $> \bar{x} + 3SD$ 为阳性; S/P 值介于二者之间为可疑。

1.5 特异性试验

利用本研究建立的间接 ELISA 方法检测 HCV、FMDV、PRRSV、PRV、TGEV 和 PEDV 阳性血清的 D_{450} 值,同时设 PDCoV 阴阳性血清对照,以判定本研究建立的间接 ELISA 方法的特异性。

1.6 重复性试验

参考秦毅斌等^[12]的方法进行,分别包被 3 个批次的 PDCoV N 蛋白,每个批次内设 4 个重复,随机对 6 份猪血清进行 ELISA 检测,并测定 D_{450} 值,分析各批次内以及每个批次间的变异系数,评估本方法的重复性。

1.7 敏感性试验

随机选取 3 份 PDCoV 阳性血清,先稀释至 1:40,再采用倍比稀释法稀释至 1:1 280,分别进行 ELISA 检测,分析各稀释度的 S/P 值,评估其敏感性。

1.8 符合率试验

随机挑选新鲜猪血清 50 份,同时用中和试验^[13]和本研究建立的 PDCoV N 蛋白间接 ELISA 方法进行检测。将中和试验结果作为标准,比较两种检测方法的阴性符合率、阳性符合率和总体符合率。中和试验采用固定病毒稀释血清法,试验用病毒为本实验室分离并保存的 PDCoV CH/GX/1468B/2017 株,当孔内细胞出现 CPE 的最小稀释度小于 1:4 时,判定为阴性血清,大于等于 1:4 时则判定为阳性血清。

1.9 PDCoV N 蛋白间接 ELISA 方法的初步应用

使用本研究建立的 ELISA 方法检测 456 份来自广西部分地市猪场不同阶段猪群的血清样品,分析广西部分地市各阶段猪群 PDCoV 抗体水平。

2 结果

2.1 ELISA 反应条件的优化

2.1.1 包被抗原浓度与二抗工作浓度的优化 抗原包被浓度与二抗工作浓度优化结果表明,最佳包被抗原浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最佳二抗稀释度为 1:4 000,在此条件下 P/N 值最大,为 9.0 (表 1)。

2.1.2 抗原包被条件的优化 结果表明,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜最佳,此时 P/N 值为 8.85,在 3 组中最大 (图 1)。

2.1.3 封闭时间的优化 结果表明,在 4 组封闭时

表 1 包被抗原浓度和二抗稀释度优化结果

Table 1 Optimization results of coating antigen concentration and secondary antibody concentration

包被抗原浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ Coating antigen concentration		二抗稀释度 Dilution of the secondary antibody											
		1:1 000		1:2 000		1:4 000		1:8 000		1:16 000		1:32 000	
		D_{450}	P/N	D_{450}	P/N	D_{450}	P/N	D_{450}	P/N	D_{450}	P/N	D_{450}	P/N
16	P	1.903	3.7	1.721	4.9	1.303	5.5	0.888	6.4	0.536	5.7	0.32	4.6
	N	0.52		0.351		0.236		0.138		0.094		0.07	
8	P	1.964	3.8	1.695	5.0	1.296	6.3	0.841	6.8	0.516	5.5	0.303	4.0
	N	0.511		0.337		0.206		0.123		0.094		0.075	
4	P	1.946	5.0	1.676	8.1	1.223	7.9	0.807	8.4	0.484	6.5	0.278	4.2
	N	0.393		0.21		0.154		0.10		0.075		0.066	
2	P	1.837	7.1	1.527	8.8	1.111	9.0	0.681	7.6	0.397	5.7	0.247	3.7
	N	0.259		0.174		0.123		0.09		0.07		0.067	
1	P	1.663	8.8	1.226	8.5	0.76	7.0	0.434	6.3	0.273	4.6	0.168	3.1
	N	0.189		0.145		0.108		0.069		0.059		0.055	
0.5	P	1.352	7.3	0.853	6.1	0.535	5.5	0.366	5.5	0.162	3.0	0.139	2.4
	N	0.186		0.14		0.098		0.067		0.054		0.059	
0.25	P	1.06	6.0	0.674	7.7	0.38	3.9	0.214	3.9	0.151	2.7	0.084	1.6
	—	0.176		0.088		0.098		0.055		0.056		0.054	

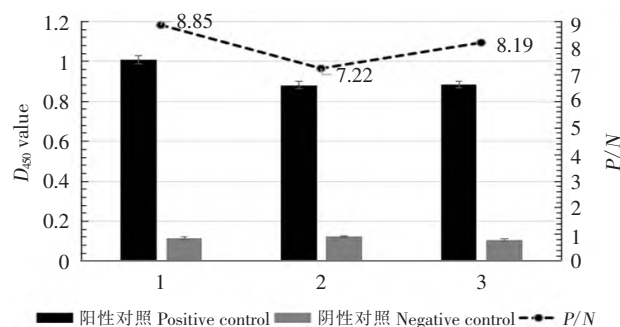


图 1 最佳包被条件的优化

Figure 1 The optimization of coating condition

1:4 ℃包被过夜;2:37 ℃包被 2 h;3:4 ℃包被过夜加 37 ℃包被 2 h。
1:4 ℃ coating overnight;2:37 ℃ coating for 2 h;3:4 ℃ coating for overnight plus 37 ℃ coating for 2 h.

间中,封闭 2 h 最佳,此时 P/N 值为 8.22,4 组中最大(图 2)。

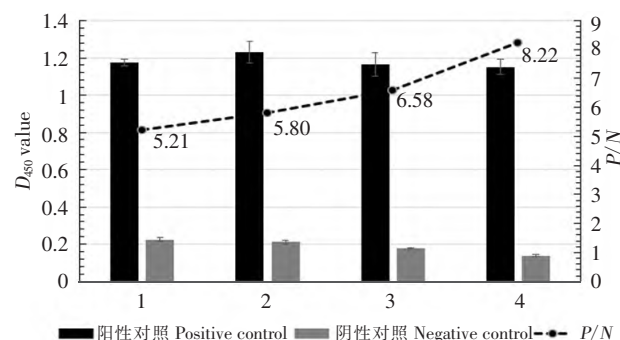


图 2 最佳封闭时间的优化

Figure 2 The optimization of blocking time

1~4:37 ℃分别封闭 0.5 h,1 h,1.5 h 和 2 h。
1~4:37 ℃ block for 0.5 h,1 h,1.5 h and 2 h respectively.

2.1.4 血清稀释度及孵育时间的优化 优化结果表明,血清 1:80 稀释,孵育 60 min 时最佳,此时 P/N 值为 9.82,4 组中最大(表 2)。

2.1.5 最佳二抗反应时间的优化 结果表明,二抗反应 30 min 为最佳,P/N 值最大为 9.03,在 4 组中最大(图 3)。

2.1.6 底物显色时间的优化 结果表明,25 ℃避光显色 10 min 为最佳,P/N 值为 8.61,在 4 组中最大(图 4)。

2.2 阴阳性临界值的确定

用本研究建立的 ELISA 方法检测 30 份阴性血清,其 S/P 值的平均值(\bar{x})=0.119,标准方差(SD)=0.027。经计算, $\bar{x}+3SD=0.200$, $\bar{x}+2SD=0.173$ 。由此确定阴阳性临界值,即待检样品 S/P 值<0.173 时判为阴性,S/P 值>0.200 时判为阳性,0.173≤S/P 值≤0.200 时判为可疑,需重新检测。

2.3 特异性试验

结果显示,PDCoV 阳性对照血清的 D_{450} 值(PC)为 0.978,PDCoV 阴性对照血清的 D_{450} 值(NC)为 0.108,NC<0.3,PC-NC>0.7;此时 HCV 阳性血清、FMDV 阳性血清、PRRSV 阳性血清、PRV 阳性血清、TGEV 阳性血清和 PEDV 阳性血清的 S/P 值均小于 0.173(图 5),说明本方法具有良好的特异性。

2.4 重复性试验

重复性试验结果(表 3)显示,同一批次包被的孔板的 4 次检测结果变异系数为 0.79%~4.75%,3 个

表 2 血清稀释度和孵育时间的优化结果

Table 2 Optimization results of serum dilution ratio and incubation time

血清稀释度 Dilution of serum	血清孵育时间 / min Reacting time for the serum						
	30		60		120		
	平均 D_{450} 值 Average D_{450} value	P/N value	平均 D_{450} 值 Average D_{450} value	P/N value	平均 D_{450} 值 Average D_{450} value	P/N value	
1:10	+	1.275	3.82	1.215	3.67	1.134	3.05
	-	0.334		0.331		0.372	
1:20	+	1.151	4.62	1.105	5.78	1.092	3.90
	-	0.249		0.191		0.280	
1:40	+	1.068	9.37	0.998	8.11	1.041	7.08
	-	0.114		0.123		0.147	
1:80	+	0.921	9.64	0.860	9.82	0.854	7.59
	-	0.096		0.086		0.113	
1:160	+	0.674	9.10	0.612	8.81	0.678	8.63
	-	0.074		0.070		0.079	
1:320	+	0.452	6.84	0.468	7.54	0.498	8.01
	-	0.066		0.062		0.071	

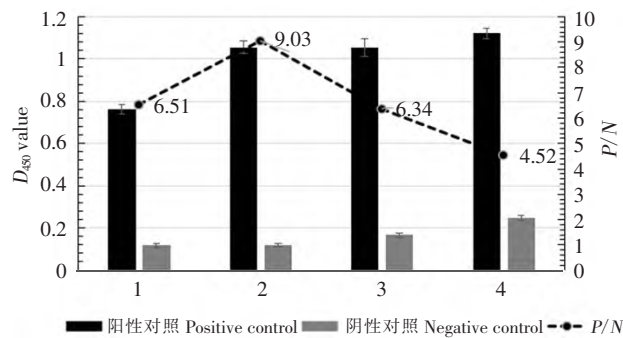


图 3 最佳二抗反应时间的优化
Figure 3 The optimization of secondary antibody reacting time

1~4: 二抗反应时间分别为 15 min, 30 min, 45 min 和 60 min。
1—4: The reaction time of secondary antibody was 15, 30 min and 60 min respectively.

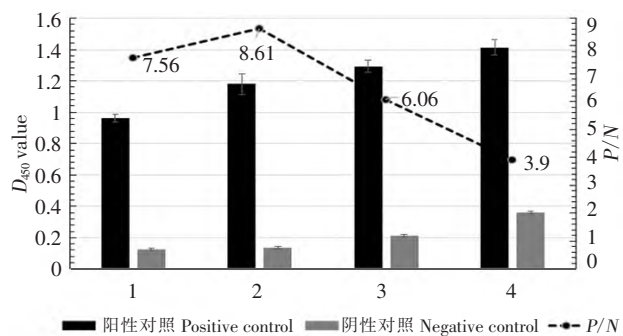


图 4 最佳底物显色时间的优化
Figure 4 The optimization of TMB reacting time

1~4: 底物显色时间分别为 5 min, 10 min, 15 min 和 20 min。
1—4: The optimization of TMB reacting time was 5 min, 10 min, 15 min and 20 min respectively.

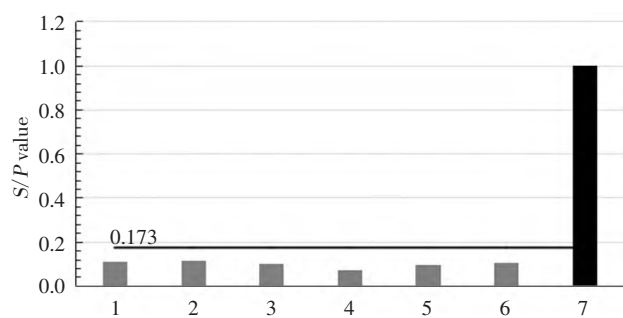


图 5 ELISA 特异性试验结果
Figure 5 The specificity test of indirect ELISA

1~7: 被检样品分别为 HCV、FMDV、PRRSV、PRV、TGEV、PEDV 和 PDCoV 的阳性血清。
1—7: The detected samples was positive sera of HCV, FMDV, PRRSV, PRV, TGEV, PEDV and PDCoV respectively.

批次间的变异系数在 1.92% ~ 6.60% 之间。说明本 ELISA 抗体检测方法具有良好的批内及批间重复性。

2.5 敏感性试验

敏感性试验结果(图 6)显示, 3 份阳性血清均在 1:640 稀释度时检测结果为阴性, 该方法可检测到血清最大稀释度为 1:320, 说明本方法具有较好的敏感性。

2.6 符合率试验

采用中和试验与本研究建立的方法对 50 份血清进行检测, 结果(表 4)显示, 中和试验检出阳性 22 份、阴性 28 份, 本方法检出阳性 20 份、阴性 30 份; 阳性符合率为 86.36%, 阴性符合率为 96.43%, 总符合率为 92.00%。

表 3 重复性试验结果

Table 3 Repeatability test results

血清编号 Serum number	批内试验 Intra-batch assay		批间试验 Inter-batch assay	
	平均数 Average	变异系数/% Coefficient of variation	平均数 Average	变异系数/% Coefficient of variation
1	1.082 ± 0.041	3.80	0.926 ± 0.043	4.64
2	0.825 ± 0.034	4.12	0.832 ± 0.031	3.73
3	1.007 ± 0.008	0.79	0.989 ± 0.019	1.92
4	0.324 ± 0.015	4.63	0.314 ± 0.018	5.73
5	0.118 ± 0.004	3.39	0.116 ± 0.003	2.59
6	0.111 ± 0.005	4.75	0.106 ± 0.007	6.60

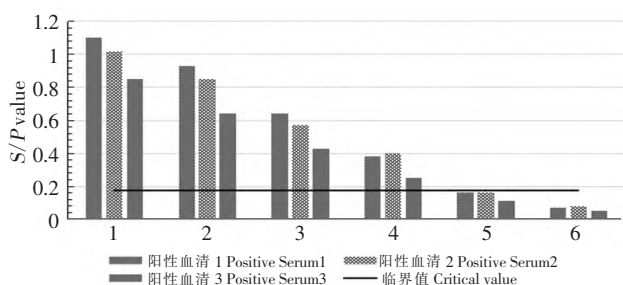


图 6 敏感性试验结果

Figure 6 Sensitivity test results

1~6:被检血清稀释度分别为 1:40,1:80,1:160,1:320,1:640 和 1:1280。

1—6:The dilution ratios of detected serum were 1:40,1:80,1:160,1:320,1:640 and 1:1280 respectively.

表 4 符合率试验结果

Table 4 Coincidence rate test result

			间接 ELISA Indirect ELISA		符合率/% Coincidence rate
			阳性 Positive	阴性 Negative	
中和试验 Neutralization test	阳性 Positive	22	19	3	86.36
	阴性 Negative	28	1	27	96.43
	合计 Total	50	20	30	92.00

3 讨论

自 2010 年底以来,以猪流行性腹泻病毒等冠状病毒引起的病毒性腹泻引起大量仔猪死亡,已严重危害我国养猪业的健康发展^[14]。肠道冠状病毒 PDCoV 对猪具有较强的致病性,其引起的仔猪呕吐、拉稀和急性脱水、消瘦等临床症状与 TGE、PED 极为相似,且临床上 PDCoV 易与 TGEV、PEDV 等其他肠道病毒发生混合感染,造成猪场腹泻类疫病愈加复杂^[15-16]。

自 2014 年美国报道腹泻猪群发生 PDCoV 感染后,国内多个实验室相继开展了对 PDCoV 病原学、流行病学、致病性及致病机理的研究。国内学者的研究结果^[3-5,17-18]表明,在我国广东、湖北、安徽、广西等十多个省市的猪场中均存在 PDCoV 感染,张

2.7 PDCoV N 蛋白间接 ELISA 检测方法的初步应用

对 456 份猪血清样品的检测结果表明,样品总体阳性率为 40.40%,不同阶段阳性率相差较大。阳性率最高的为后备母猪,达到 100%(32/32),保育猪阳性率最低,为 3.90%(4/102)。公猪和母猪的阳性率也较高,分别为 82.40%(28/34)和 60.50%(104/172),生长育肥猪的阳性率为 9.30%(8/86)。该检测结果提示,广西地区猪群感染 PDCoV 的情况较为普遍,且不同阶段猪群感染率具有较大的差异。

帆帆等^[17]发现在腹泻仔猪粪便、肠内容物或者母猪粪便中 PDCoV 的检出率可达 31.33%,且阳性率有逐渐增高的趋势。同时,越来越多的研究表明,PDCoV 具有较强的致病性,能够引起感染仔猪出现严重的腹泻,具有较高的死亡率^[9,19]。快速而准确的诊断是做好疫病防控的前提,鉴于 PDCoV 流行日趋严重且具有较强的致病性,有必要加快 PDCoV 的基础研究、诊断及防控产品研发,以有助于控制当前流行严重、危害巨大的仔猪腹泻疫情。

中和试验是检测病毒抗体常用的方法,其检测结果能体现样品中保护性抗体的水平。但其也存在条件要求高、耗时长、不适合大批血清样品检测等缺点,一般仅适合于科研单位开展科学研究时使用,并不适合基层养殖场进行大批样品的快速检测。而

ELISA 具有易实施、耗时短、可对批量样品进行快速检测等优点。因此,建立一种特异性强、敏感性高的 PDCoV 抗体 ELISA 检测方法,并应用于 PDCoV 的流行病学调查与监测,有助于更好地做好该病的防控。本研究以前期表达并纯化的 PDCoV N 蛋白为包被抗原,优化建立了检测 PDCoV 抗体的间接 ELISA 方法,并确定了阴阳性临界值。本研究建立的间接 ELISA 抗体检测方法具有较好的特异性,与同属冠状病毒的 TGEV、PEDV 的阳性血清无交叉反应,且与 HCV、PRRSV、FMDV 和 PRV 的阳性血清无交叉反应。同时,本方法敏感性高,可检测到 1:320 稀释的阳性血清。为了验证本方法的准确性,随机选择了 50 份临床血清,使用中和试验和本研究建立的间接 ELISA 方法同时检测血清样品中 PDCoV 抗体水平,结果表明,该间接 ELISA 在检测阴、阳性血清时均具有较高的符合率,与中和试验的阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 86.36%、96.43% 和 92.00%。

利用本研究建立的 PDCoV N 蛋白间接 ELISA 方法检测了 456 份采自广西部分地区不同阶段猪群的血清样品,结果样品总阳性率为 40.40%。江珊等^[16]利用 PDCoV S 基因抗原表位区作为包被抗原建立了检测抗体的间接 ELISA 方法,对 2012—2017 年四川部分猪场 490 份临床血清进行 PDCoV 抗体检测,结果阳性率为 49.18%,总体样品阳性率与本研究结果相似。在现阶段国内大部分猪场尚未使用 PDCoV 疫苗的情况下,猪血清中的 PDCoV 抗体阳性说明可能存在野毒感染。不同阶段猪群 PDCoV 抗体阳性率相差较大,本次检测结果显示,公猪和母猪的 PDCoV 抗体阳性率分别为 82.40% 和 60.50%,说明种猪群感染过 PDCoV 的现象十分普遍。哺乳仔猪阳性率为 27.0%,其抗体可能来源于母源抗体或野毒感染,保育猪阳性率最低,为 3.90%,与哺乳仔猪相比阳性率下降,可能是随着日龄的增大,其母源抗体水平逐渐降低。育肥猪相较于保育猪,其阳性率上升明显,达到 32.60%,提示在此阶段可能存在 PDCoV 野毒感染。后备猪阳性率为 100%,提示随着猪的日龄增大,PDCoV 的野毒感染也更加普遍。当然,本研究检测的临床血清样本数还较少,不能完全体现广西地区猪群 PDCoV 感染情况,但该检测结果提示,广西地区猪群 PDCoV 的感染情况较为普遍,且不同阶段猪群感染率具有较大的差异。

参考文献 (References)

[1] WOO P C Y, LAU S K P, LAM C S F, et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in

the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7):3995-4008.

- [2] WANG L Y, BYRUM B, ZHANG Y. Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(7):1227-1230.
- [3] DONG N, FANG L R, ZENG S L, et al. Porcine deltacoronavirus in mainland China [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(12):2254-2255.
- [4] SONG D, ZHOU X, PENG Q, et al. Newly emerged porcine deltacoronavirus associated with diarrhea in swine in China: identification, prevalence and full-length genome sequence analysis [J]. *Transboundary Emerging Diseases*, 2015, 62(6):575-580.
- [5] 吴美洲, 陈芳洲, 朱银杏, 等. 丁型冠状病毒我国猪源株的遗传变异分析 [J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(6):689-694.
- WU Mei-zhou, CHEN Fang-zhou, ZHU Yin-xing, et al. Genetic variation analysis of porcine deltacoronavirus in China [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(6):689-694. (in Chinese)
- [6] LEE J H, CHUNG H C, NGUYEN V G, et al. Detection and phylogenetic analysis of porcine delta coronavirus in Korean swine farms, 2015 [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016, 63(3):248-252.
- [7] MADAPONG A, SAENG-CHUTO K, LORSIRIGOO A, et al. Complete genome sequence of porcine deltacoronavirus isolated in Thailand in 2015 [J]. *Genome Announcements*, 2016, 4(3):e00408-16.
- [8] AJAYI T, DARA R, MISENER M, et al. Herd-level prevalence and incidence of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) and porcine deltacoronavirus (PDCoV) in swine herds in Ontario, Canada [J]. *Transbound Emerg Diseases*, 2018, 65(5):1197-1207.
- [9] DONG N, FANG L R, YANG H, et al. Isolation, genomic characterization and pathogenicity of a Chinese porcine deltacoronavirus strain CHN-HN-2014 [J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 196:98-106.
- [10] JUNG K, HU H, SAIF L J. Porcine deltacoronavirus infection: etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis [J]. *Virus Research*, 2016, 226:50-59.
- [11] ZHANG J Q. Porcine deltacoronavirus: overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution [J]. *Virus Research*, 2016, 226:71-84.
- [12] 秦毅斌, 刘磊, 卢冰霞, 等. 猪流行性腹泻病毒重组 S2

- 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立及初步应用[J/OL]. 中国动物传染病学报;1-10. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.s.20200318.1722.014.html>. QIN Yi-bin, LIU Lei, LU Bing-xia, et al. Development and preliminary application of an indirect ELISA for detection antibody to porcine epidemic diarrhoea virus using recombinant s2 protein [J/OL]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*; 1-10. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.s.20200318.1722.014.html>. (in Chinese)
- [13] 徐宜为. 免疫检测技术[M]. 北京:科学出版社,1997. XU Yi-wei. *Immunoassay Technology* [M]. Beijing: Science Press, 1997. (in Chinese)
- [14] WANG D, FANGL R, XIAO S B. Porcine epidemic diarrhoea in China[J]. *Virus Research*, 2016, 226:7-13.
- [15] 强桃艳, 成温玉, 张犇, 等. 猪 δ 冠状病毒病原检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2021, 42(4):83-88. QIANG Tao-yan, CHENG Wen-yu, ZHANG Ben, et al. Progress on pathogen detection methods of porcine deltacoronavirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(4):83-88. (in Chinese)
- [16] 江珊, 李富强, 李秀丽, 等. 猪德尔塔冠状病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 动物医学进展, 2019, 40(10):10-17. JIANG Shan, LI Fu-qiang, LI Xiu-li, et al. Establishment and application of TaqMan fluorescence quantitative PCR for detecting porcine deltacoronavirus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(10):10-17. (in Chinese)
- [17] 张帆帆, 宋德平, 周信荣, 等. 新现猪 Delta 冠状病毒 RT-PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 中国农业科学, 2016, 49(7):1408-1416. ZHANG Fan-fan, SONG De-ping, ZHOU Xin-rong, et al. Establishment and application of a RT-PCR assay for detection of a newly emerged porcine delta-coronavirus[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(7):1408-1416. (in Chinese)
- [18] 宋亚兵, 徐帅飞, 苏丹萍, 等. 2012 年—2016 年广东省猪丁型冠状病毒的流行病学调查及分析[J]. 中国预防兽医学报, 2018(10):886-890. SONG Ya-bing, XU Shuai-fei, SU Dan-ping, et al. Epidemiological survey and analysis of porcine deltacoronavirus in Guangdong province from 2012 to 2016[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary*, 2018(10):886-890. (in Chinese)
- [19] 贺东生, 李锦辉, 苏丹萍, 等. 猪德尔塔病毒 H223 株的分离鉴定和持续传代及 N 基因遗传进化分析[J]. 猪业科学, 2019, 36(7):72-74. HE Dong-sheng, LI Jin-hui, SU Dan-ping, et al. Isolation, identification and continuous passage of porcine deltacoronavirus H223 strain and phylogenetic analysis of N gene[J]. *Swine Industry Science*, 2019, 36(7):72-74. (in Chinese)

(责任编辑 胡弘博)