

文章编号: 1000-0615(2017)01-0142-08

DOI: 10.11964/jfc.20160110271

草鱼呼肠孤病毒HZ08株抗体IPMA检测方法的建立及应用

曾伟伟¹, 王庆¹, 王英英¹, 李莹莹¹,
郝贵杰², 石存斌¹, 沈锦玉^{2*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔药创制重点实验室, 广东 广州 510380;

2. 浙江省淡水水产研究所农业部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江 湖州 313001)

摘要: 为建立一种检测草鱼呼肠孤病毒HZ08株(HZ08)抗体的免疫学方法, 本实验以接种HZ08病毒的细胞培养板为抗原板, 以免疫弱毒疫苗的草鱼血清为抗体, 通过反应条件优化, 建立了检测GCRV HZ08血清抗体的免疫过氧化物酶单层细胞实验(IPMA)方法, 并对该方法特异性、敏感性、重复性、与ELISA检测结果的符合率及对临床血清样品的检测效果等进行了验证。结果显示, HZ08株种毒按照 1×10^3 拷贝/ μL 浓度接种后72h固定, HRP-IgG二抗1:1000稀释, 待检血清1:100稀释时效果最佳; 该IPMA方法与草鱼阴性血清、免疫细菌三联疫苗的草鱼血清、感染GCRV JX0901(GCRV I型)的草鱼血清无交叉反应; GCRV HZ08株阳性血清稀释至1:800时仍能检出; 批内和批间重复性实验显示, 该方法具有良好的重复性; 符合性实验结果显示, 该IPMA方法与ELISA方法的阳性和阴性符合率分别为95.7%和87.5%; 用建立的IPMA方法检测草鱼出血病弱毒疫苗免疫草鱼, 免疫2周后抗体水平达到峰值; 对现地送检的126份草鱼血清样本进行检测, 平均检出阳性率为72.2%。研究表明, 建立的HZ08株IPMA方法特异性强、重复性好、敏感性高, 为GCRV II型的流行病学调查、疫苗免疫效果评价及抗原抗体检测提供了一种有效的检测手段。

关键词: 草鱼; 呼肠孤病毒; 免疫过氧化物酶单层细胞实验; 抗体检测

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国最主要的淡水鱼养殖品种^[1], 其产量在2015年占整个淡水鱼养殖产业的17.8%, 目前已引入到全球40多个国家^[2]。然而, 由草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)引起的草鱼出血病的频繁爆发, 严重制约了草鱼养殖业的健康发展^[3]。GCRV隶属于呼肠孤病毒科、水生呼肠孤病毒属^[4], 主要危害当年的草鱼鱼苗, 死亡率一般为30%~50%, 最高可达60%~100%^[3-4], 而且还能感染青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)、布氏鲮条(*Hemiculter leucisculus*)等, 并能使这几种鱼发生出血病症状而死亡^[5], 该病毒流

行广、危害大、死亡率高、发病季节长, 严重影响了广大养殖者的积极性和我国淡水养殖业的健康发展^[5-6]。草鱼呼肠孤病毒具双层衣壳, 病毒粒子平均直径为60~70 nm, 二十面体对称, 无囊膜, 基因组由11条分节段的双链RNA组成。

目前已经报道了30多个分离株, 包括GCRV854、GCRV861、GCRV873、GCRV875、GCRV876、GCRV991、H962、ZV-8802、GCHV-854、GCRV HZ08、JX09-01、GCRV-104、GD108、106、109等, 不同分离株在基因组序列、基因组带型、细胞病变、对草鱼的致病力等方面差异较大^[8-15]。对草鱼呼肠孤病毒至今还

收稿日期: 2016-01-30 修回日期: 2016-05-10

资助项目: 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室开放课题(ZJK201301); 江西省科技计划项目(20152ACF60021); “十二五”国家科技支撑计划(2012BAD12B02)

通信作者: 沈锦玉, E-mail: sjyu@126.com

没在血清学或者基因型上进行系统分类。根据现有的分离株序列信息, 进行核苷酸序列与氨基酸序列比对以及构建系统进化树分析, 所有毒株总体上可以分为3大类, 分为3个基因型, 即GCRV I型(代表株为GCRV-873与GCRV-JX09-01)、GCRV II型(代表株为GCRV-HZ08与GCRV-GD108)和GCRV III型(GCRV-104, GCRV-HB1007)^[7-9, 16-17]。当前, 全国各地分离到的流行株中, 3类亚型均有报道, 有的单独感染, 也有混合感染。通过本研究团队2009—2013年的草鱼出血病监测和流行病学调查分析表明, 目前导致草鱼出血病流行和暴发是以HZ08为代表株的GCRV II型^[16]为主。因此, 对GCRV II型病毒引起的草鱼出血病特异性诊断具有重要意义。

对于草鱼出血病的防治, 还没有特异有效的治疗药物和方法, 目前的办法仍然是注射疫苗, 进行免疫预防^[5-6]。控制和阻止草鱼出血病第二个有效办法是早期诊断和尽早隔离感染鱼。目前有多种方法用来进行草鱼出血病的诊断, 包括细胞分离、电镜观察、基因组带型分析、PCR技术等^[5]。这些方法各具优势和缺陷, 病毒分离、电镜观察、核酸带型分析至今仍是检测草鱼呼肠孤病毒普遍采用的方法, 但这些方法费时费力、操作比较复杂, 不能对病毒进行快速诊断, 不利于草鱼出血病的流行病学调查工作。全病毒诊断涉及病毒培养、纯化及浓缩等过程, 不仅制作过程复杂、耗时、成本较高, 而且还潜在散毒危险, 因此不利于推广使用。当前, 对于草鱼呼肠孤病毒的检测, 最为常用的方法是基于核酸扩增技术的各种分子生物学检测方法, 包括常规的RT-PCR^[16, 18]、荧光定量PCR^[19-20]、RT-LAMP^[21-23]等, 具有较高的敏感性和特异性。但这些分子生物学方法都是检测病毒的核酸存在与否, 方法单一, 经常导致假阳性和假阴性结果, 难于对该病做到确诊。因此, 急需其他方法来弥补分子生物学检测方法的不足, 如各种免疫学(血清学)检测方法。

针对草鱼出血病的疫苗, 无论是法规许可的细胞弱毒疫苗还是市场上流行的土法疫苗, 甚至一些细胞灭活疫, 绝大部分都是针对GCRV II型的疫苗。对这些疫苗免疫效果的评价, 只是根据免疫草鱼的死亡率来初步估计, 一旦其他疫病的暴发导致免疫草鱼死亡, 就无法弄清是由于疫苗效果不好, 草鱼出血病依然暴发导

致而的死亡, 还是由于其他疫病的暴发而导致的死亡, 更无法对疫苗免疫效果进行评价。因此, 也急需一种检测GCRV特异性抗体的免疫学检测方法。临床和实验室试验证实, 草鱼出血病弱毒疫苗是预防控制草鱼出血病的有效生物制剂, 而对草鱼呼肠孤病毒特异性抗体的监测是评价鱼出血病疫苗免疫效果及合理制定免疫程序的关键。

对于草鱼呼肠孤病毒抗体的检测, 目前还没有有效可靠的方法, ELISA方法特异性好、灵敏度高、快速易行, 可进行大量样品的检测, 但存在病毒抗原或重组蛋白抗原纯化条件苛刻、试剂保存条件要求高、检测需要酶标测定仪, 只能在具有一定条件的实验室使用等缺点^[24-26]。本实验建立的GCRV HZ08株免疫过氧化物酶单层细胞实验(immunoperoxidase monolayer assay, IPMA)采用病毒感染细胞后固定作为检测抗原, 实验过程所需时间短、特异性好、敏感性高、操作方便, 并且观察时只需普通的光学显微镜, 适用于基层流行病学调查、临床检测和疫苗免疫后血清抗体的监测。

1 材料与方 法

1.1 毒株、菌株和细胞

GCRV-JX0901(I型)、GCRV-HZ08(II型)、致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、荧光极毛杆菌和肠炎型点状气单胞菌均由本实验分离并保存, GCRV 104由中国水产科学研究院长江水产研究所曾令兵研究员惠赠, 草鱼吻端成纤维细胞(proboscis snout into fibers, PSF)由本实验室提供。鼠抗草鱼免疫球蛋白IgM单克隆抗体由本实验制备并保持, 分泌该单克隆抗体的杂交瘤细胞株已保存至中国细胞典藏中心(CTCC保存编号: C2013193)。

1.2 血清制备

阴性血清制备 采集健康无发病的草鱼呼肠孤病毒抗原、抗体检测为阴性的草鱼血清, 参照曾伟伟等^[16]报道的三重RT-PCR检测方法进行病原检测, 参照He等^[24]报道间接ELISA方法进行抗体检测, 然后按常规方法制备阴性血清。

阳性血清制备 由本实验室通过GCRV HZ08株病毒感染上述制备阴性血清的同一批草

鱼制备而得；抗GCRV-JX0901、GCRV 104、致病性嗜水气单胞菌、荧光极毛杆菌和肠炎型点状气单胞菌阳性血清分别用相应病原感染健康、没有发病史且没有注射疫苗的草鱼，然后分别采集感染后发病并出现明显症状的草鱼血清制备而得。

1.3 主要试剂与仪器

Medium199(M199)培养基、0.25%-EDTA胰蛋白酶和胎牛血清(FBS)均为GIBCO公司产品；Premix Ex Taq (Probe qPCR), PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time)均为TaKaRa公司产品；E.Z.N.A. Total RNA Kit I、E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I均为OMEGA公司产品；HRP标记的羊抗鼠IgG二抗(HRP-IgG)和3-氨基-9-乙基咪唑(AEC)为Sigma公司产品；其他化学试剂为国产分析纯。ABI7500荧光定量PCR仪为美国应用系统公司ABI产品；PICO 17型离心机、CO2培养箱为德国Thermo公司产品；数码倒置荧光显微镜(DV730)为日本尼康公司产品。

1.4 病毒的增殖与毒价测定

用GCRV HZ08 病毒液接种PSF细胞，细胞培养液为M199培养基，含10%灭活的胎牛血清和青霉素、链霉素各100 U/mL，当感染病毒5 d以后，取细胞上清液参照文献[27]的方法进行荧光定量检测，当每毫升上清液的病毒拷贝数达到 10^6 以上时，收集病毒液，反复冻融3次，4 °C 3000 r/min离心15 min，取上清液，分装后置于-80 °C保存作为种毒备用。

1.5 IPMA抗原板的制备

将M199稀释的种毒稀释至 1.0×10^3 拷贝/ μ L后同步接种于新消化的PSF细胞悬液中，细胞浓度为 1.0×10^6 个/mL，于12孔板中每孔加入2 mL，同时设未接种病毒细胞对照。置于28 °C条件下培养48 h形成单层后取出，弃去细胞培养液，用PBS洗3次后，固定液(100%的丙酮与甲醇按1:1比例混合)室温固定15 min，干燥后置于-20 °C保存备用。

1.6 IPMA操作程序

取IPMA 抗原板于室温预热30 min，PBS洗1次。用PBS将GCRV待检血清从1:25起进行2倍系列稀释，加入抗原孔和细胞对照孔，每孔

200 μ L，28 °C湿盒孵育1 h，PBS洗3次；加入1:5000倍稀释的抗草鱼IgM单克隆抗体，每孔200 μ L，28 °C湿盒孵育1 h，PBS洗3次；加入稀释的HRP标记的羊抗鼠 IgG二抗(HRP-IgG)，每孔200 μ L，37 °C湿盒孵育1 h，PBS洗3次，加入底物ACE，每孔200 μ L，室温显色15 min，3%双氧水封闭，用光学显微镜观察，判定结果并拍照。

1.7 IPMA反应条件的优化

将种毒稀释为 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 和 1.0×10^2 拷贝/ μ L分别培养12、24、36、48和60 h后逐一取出固定，HRP-IgG按1:500、1:1000、1:1500和1:3000进行稀释，运用方阵法确定最佳的IPMA反应条件。

1.8 IPMA的特异性实验

用抗GCRV-JX0901、GCRV-104、致病性嗜水气单胞菌、荧光极毛杆菌和肠炎型点状气单胞菌的阳性血清进行交叉反应实验，以检验该方法的特异性。

1.9 IPMA的敏感性实验

将GCRV II型阳性血清从1:25开始做2倍系列稀释，进行IPMA的敏感性实验。

1.10 IPMA的重复性实验

制备3批IPMA反应板，选用HZ08阳性和阴性血清各5份，用相同批次和不同批次的3个IPMA反应板进行批内和批间重复性实验。

1.11 IPMA与ELISA的符合实验

挑选收集自养殖场的草鱼血清临床样品30份，分别用IPMA和ELISA进行平行检测，比较符合情况。ELISA参照文献[24]的步骤进行。

1.12 人工免疫草鱼血清的检测

选取GCRV病原和GCRV HZ08抗体阴性草鱼100尾，腹腔注射感染浓度为 1×10^4 拷贝/ μ L的HZ08病毒液，200 μ L/尾。分别于感染前、感染后第1~5周采集实验鱼血清，每次采集10尾，用本发明IPMA方法和ELISA检测血清抗体水平，将10个样品的结果去除异常数据之后求平均值，得到不同时间阶段免疫鱼的抗体效价。

1.13 临床送检血清样品的检测

收集江西、广东、广西、湖南、湖北、山东、

江苏7个不同地区养殖场的疑似草鱼出血病血清样本126份, 用IPMA方法检测抗HZ08抗体情况。

2 结果

2.1 IPMA反应条件的确定

条件优化结果表明, 种毒按照 1×10^3 拷贝/ μL 的终浓度接种GCRV HZ08株72 h后固定效果最佳, HRP-IgG最适稀释度为1:1000。GCRV

HZ08株阳性血清与病毒感染细胞反应显示细胞胞浆内有特异性棕色反应(图1-a), 而阴性组与空白对照组无特异着色反应(图1-b)。

2.2 IPMA的特异性实验

交叉反应实验结果表明, 除HZ08阳性血清呈阳性外, 其他基因型和病原的阳性血清均呈阴性, 证明IPMA方法与这些草鱼常见病原无血清学交叉反应。

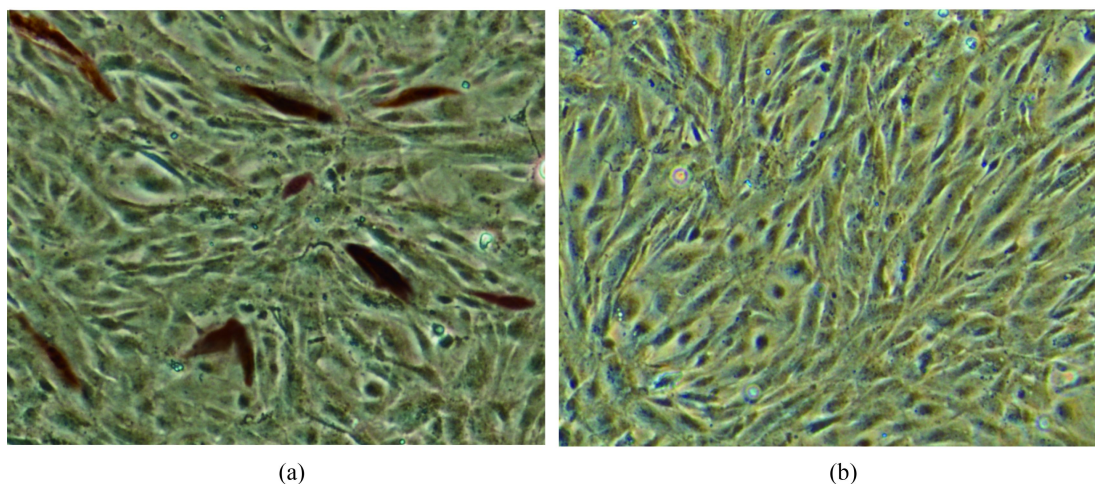


图1 草鱼血清中GCRVHZ08抗体的IPMA检测

(a)阳性反应; (b)阴性反应

Fig. 1 Detection of antibodies against GCRV HZ08 by IPMA

(a)positive result; (b)negative control

2.3 IPMA的敏感性实验

敏感性实验结果表明, 当HZ08阳性血清稀释至800倍(25×2^5 倍)时, 仍能观察到很特异的着色反应, 表明本方法具有较好的敏感性。

2.4 IPMA的重复性实验

重复性实验结果表明, 该IPMA方法的批内和批间检测结果一致, 表明本方法具有良好的重复性。

2.5 IPMA与ELISA的符合实验

分别用IPMA和ELISA对30份临床血清样本进行平行实验, IPMA法检出23份阳性, 7份阴性; ELISA法检出22份阳性, 8份阴性(表1)。IPMA与ELISA检测结果阳性符合率为95.7%, 阴性符合率为87.5%。对上述存在检测差异的血清样品进一步进行western blot和间接免疫荧光实验

进行验证, 验证结果与IPMA法检测的结果相同, 为GCRV HZ08型阳性, 说明IPMA检测方法具有更好的准确性。

表1 IPMA方法与ELISA方法的符合性实验结果

Tab. 1 The conformance test results between

检测方法 detection method	IPMA and ELISA		份 total
	ELISA检测阳性数 ELISA positive number	ELISA检测阴性数 ELISA Negative number	
IPMA检测阳性数 IPMA positive number	22	1	23
IPMA检测阴性数 IPMA negative number	0	7	7
总计 total	22	8	30

2.6 人工感染草鱼血清检测结果

通过IPMA方法和ELISA方法检测人工感染草鱼的血清特异性抗体实验表明, 病毒接种后

第1周, IPMA法和ELISA法检测的抗体效价均为1:400, 免疫第2周后就达到1:1600最高水平, 第4周下降至1:800, 第5周抗体效价均为1:400(表2)。说明ELISA检测结果与IPMA法的结果基本一致, 但其敏感性相对较低、操作繁琐、耗时长。

表2 接种GCRV II后不同时间的血清抗体效价

Tab. 2 The serum antibody titers at different period post-infection of GCRV HZ08

	血清抗体效价 serum antibody titers					
	第0周 0 week	第1周 1 st week	第2周 2 nd week	第3周 3 rd week	第4周 4 th week	第5周 5 th week
IPMA	1:5<	1:400	1:1600	1:1600	1:800	1:400
ELISA	1:5<	1:400	1:800	1:800	1:800	1:400

2.7 临床送检血清样品的检测

收集江西、广东、广西、湖南、湖北、山东、山西等地养殖场的疑似草鱼出血病血清样本126份, 用IPMA方法检测抗GCRVHZ08抗体水平。结果显示, 各地检出的阳性率为63.6%~79.4%, 平均阳性率为72.2%(表3)。

表3 IPMA法检测不同地区疑似草鱼出血病血清样品结果

Tab. 3 Detection of antibodies against GCRVHZ08 from field fish sera by IPMA

来源 resources	血清样本数/份 counts of samples	阳性数/份 positive	阴性数/份 negatives	阳性率/% detection rates
广东 Guangdong	34	27	7	79.4
江西 Jiangxi	28	20	8	71.4
湖南 Hunan	17	11	6	64.7
湖北 Hubei	14	10	4	71.4
广西 Guangxi	11	7	4	63.6
山东 Shandong	13	10	3	76.9
江苏 Jiangsu	9	6	3	66.7
总计 total	126	91	35	72.2

3 讨论

早期诊断和疫苗免疫是当前防治草鱼出血病最为有效的措施, 针对草鱼出血病的诊断和

病原检测, 目前最为常用的是细胞培养、电镜观察和PCR等分子生物学检测方法^[6-7], 而免疫学技术则研究和应用的较少, 主要原因可能一是草鱼呼肠孤病毒免疫原性较弱、鱼类等水生动物血清采集比较困难、体液免疫反应相对较弱、缺少商品化的抗体等。早期也有学者研制过一系列草鱼出血病血清学检测方法, He等^[20]根据草鱼IgM的保守序列制备和筛选出单克隆抗体, 建立了一种特异性针对GCRV VP7蛋白抗体的蛋白印迹法, 该法能用于GCRV感染的血清学诊断; Jing等^[21]建立了单克隆抗体检测GCRV的方法, 特异性和敏感性都好, 能用于GCRV的准确诊断。上述这些免疫学方法都是针对873为代表株的GCRV I型病毒, 但针对目前流行的GCRV II型还没有合适的血清学诊断方法。

以HZ08为代表株的GCRV II在毒力、细胞敏感性和致细胞病变效应、基因组带型、基因组序列和特征等方面与GCRV I型都存在较大差异。GCRV II毒株接种常见的鱼类细胞都没有明显的CPE, 而GCRV I型正好相反, 感染常见的鱼类细胞均能产生明显的CPE^[8]。这一特性给GCRV II毒株的分离、鉴定和毒价测定等造成了较大的困难, 而把IPMA免疫学方法应用到GCRV II的检测中, 解决了GCRV II无CPE、无法直接判定细胞是否感染的难题, 加之IPMA操作无需昂贵的荧光显微镜, 所以IPMA测定方法非常适合基层单位的使用。

在免疫细胞化学染色实验中, 染色标本的固定是个重要的步骤, 固定是使标记的抗体易于接近抗原, 从而发生反应, 同时要求固定后标本中的目的抗原保护其自然形态和位置及活性不受损失。因此, 根据所研究的抗原和组织细胞种类的不同, 应采用不同的固定方法, 其中应用最广泛的固定液是丙酮和乙醇^[28], 固定液中丙酮为100%, 乙醇为95%或100%, 固定的温度和时间根据所固定的材料变化很大, 从-70~37℃都有应用, 时间一般为10~30 min, 本实验因采用细胞培养板进行IPMA实验, 采用100%的丙酮与甲醇按1:1比例混合作为固定液, 室温固定15 min, 获得较好的固定效果, 在规定的时间内未见细胞板的腐蚀。在IPMA实验中, 为了避免一些干扰性物质与显色剂起反应, 影响染色效果而造成假阳性, 实验中一般采用3%双氧水进行封闭来应对假阳性的产生, 3%双

氧水对抗原可能有轻微损伤, 但是封闭效果比较好^[29]。

本实验中, 通过比较IPMA与ELISA的检测结果, 发现二者符合率达95.7%, 并且二者具有明显的相关性, 由此证实, 检测GCRV抗体是可以采用IPMA方法。对于临床采集的草鱼血清的检测结果显示, 各地区的检出阳性率为63.6%~79.4%, 平均阳性率为72.2%, 对存在检测差异的血清样品进一步进行western blot和间接免疫荧光实验进行验证, 验证结果与本实验IPMA法检测的结果相同, 为GCRV HZ08型阳性, 说明本实验IPMA检测方法具有更好的准确性。本实验HZ08抗体阳性率较高, 是由于GCRV感染率高, 还是草鱼免疫草鱼出血病疫苗后抗体水平显著升高引起, 还需要对病原学进一步分析。用IPMA方法检测疫苗免疫后草鱼血清特异性抗体变化情况, 结果发现, 免疫1周后, 特异性抗体水平开始显著提高, 第二周达到1:1600的最高水平, 证明IPMA法和ELISA法检测结果一致, 也表明该IPMA方法可用以疫苗免疫后抗体水平测定, 进行免疫效果评价。

本实验用GCRV HZ08株IPMA方法对采自江西、广东、广西、湖南等地7个区域的发病养殖场的草鱼血清抗体进行了检测, 结果表明, 我国GCRV II 流行相当严重, 疾病控制形势不容乐观。IPMA血清阳性并不能完全认定就是GCRV II 感染所致, 应根据血清来源养殖场的背景加以分析。接种过草鱼出血病疫苗的养殖场, IPMA抗体阳性可能因疫苗免疫所致, 而未接种过疫苗的养殖场可能因强毒感染引起。

该研究建立的GCRV HZ08株IPMA方法可用于血清抗体的检测, 也可利用已知抗体检测未知GCRV病毒, 尤其适合对不产生细胞病变的病毒鉴定, 为GCRV II 型的流行病学调查、疫苗免疫效果的评价及血清抗体检测提供了一种有效的检测手段。

参考文献:

- [1] Rao Y L, Su J G. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp[J]. Journal of Immunology Research, 2015, 2015: 670437.
- [2] Dong Z D, Zhang J, Ji X S, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression of cathepsin D from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 33(5): 1207-1214.
- [3] Brudeseth B E, Wiulsrød R, Fredriksen B N, *et al.* Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(6): 1759-1768.
- [4] Wang Q, Zeng W W, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China[J]. Journal of Virology, 2012, 86(22): 12466.
- [5] 李永刚, 曾伟伟, 王庆, 等. 草鱼呼肠孤病毒分子生物学研究进展[J]. 动物医学进展, 2013, 34(4): 97-103.
- Li Y G, Zeng W W, Wang Q, *et al.* Advance in molecular biology of grass carp reovirus[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(4): 97-103(in Chinese).
- [6] 杨映, 于辉, 古勇明. 草鱼呼肠孤病毒研究进展[J]. 广东农业科学, 2015, 42(15): 92-97.
- Yang Y, Yu H, Gu Y M. Research progress on grass carp reovirus[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(15): 92-97(in Chinese).
- [7] 张奇亚, 桂建芳. 水产动物的病毒基因组及其病毒与宿主的相互作用[J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(12): 1236-1252.
- Zhang Q Y, Gui J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. Science China Life Sciences, 2014, 44(12): 1236-1252.
- [8] Pei C, Ke F, Chen Z Y, *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of grass carp reovirus strain 109(GCReV-109) with other grass carp reovirus strains reveals no significant correlation with regional distribution[J]. Archives of Virology, 2014, 159(9): 2435-2440.
- [9] Yan X Y, Wang Y, Xiong L F, *et al.* Phylogenetic analysis of newly isolated grass carp reovirus[J]. Springer Plus, 2014, 3(1): 190.
- [10] 曾伟伟, 王庆, 刘永奎, 等. 一株草鱼呼肠孤病毒弱毒株的分离、鉴定及免疫原性初步分析[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 790-795.
- Zeng W W, Wang Q, Liu Y K, *et al.* Isolation and identification of new GCRV strain and primary study on its immunogenicity[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(5): 790-795(in Chinese).
- [11] Fan Y D, Rao S J, Zeng L B, *et al.* Identification and genomic characterization of a novel fish reovirus, Hubei grass carp disease reovirus, isolated in 2009 in China[J]. Journal of General Virology, 2013, 94(10): 2266-2277.
- [12] 刘永奎, 王庆, 曾伟伟, 等. 草鱼呼肠孤病毒JX-0902株

- 的分离和鉴定[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1077-1083.
- Liu Y K, Wang Q, Zeng W W, *et al.* Isolation and identification of grass carp reovirus strain JX-0902[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(5): 1077-1083(in Chinese).
- [13] 郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓艺, 等. 草鱼呼肠孤病毒湖州分离株的分离及鉴定[J]. 渔业科学进展, 2011, 32(1): 47-52.
- Hao G J, Shen J Y, Pan X Y, *et al.* Isolation and identification of a strain of grass carp reovirus in Huzhou[J]. Progress in Fishery Sciences, 2011, 32(1): 47-52(in Chinese).
- [14] 徐洋, 郝贵杰, 沈锦玉, 等. 两株草鱼呼肠孤病毒江西株的分离与鉴定[J]. 淡水渔业, 2010, 40(3): 44-49.
- Xu Y, Hao G J, Shen J Y, *et al.* Isolation and identification of two grass carp reovirus strains in Jiangxi province[J]. Freshwater Fisheries, 2010, 40(3): 44-49(in Chinese).
- [15] 张超, 王庆, 石存斌, 等. 草鱼呼肠孤病毒HZ08株的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1257-1263.
- Zhang C, Wang Q, Shi C B, *et al.* Isolation and identification of a grass carp reovirus isolate GCRV HZ08[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1257-1263(in Chinese).
- [16] 曾伟伟, 王庆, 王英英, 等. 草鱼呼肠孤病毒三重PCR检测方法的建立及其应用[J]. 中国水产科学, 2013, 20(2): 419-426.
- Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* Establishment of multiplex PCR for detection of grass carp reovirus and its application[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(2): 419-426(in Chinese).
- [17] Wang Q, Zeng W W, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China[J]. Journal of Virology, 2012, 86(22): 12466.
- [18] Zhang L L, Luo Q, Fang Q, *et al.* An improved RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of grass carp reovirus[J]. Journal of Virological Methods, 2010, 169(1): 28-33.
- [19] 殷亮, 王庆, 曾伟伟, 等. 基因I型草鱼呼肠孤病毒TaqMan Real-Time PCR检测方法的建立及应用[J]. 水产学报, 2014, 38(4): 569-575.
- Yin L, Wang Q, Zeng W W, *et al.* Establishment and application of a TaqMan Real-Time PCR assay for detection of grass carp reovirus genotype I[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(4): 569-575(in Chinese).
- [20] 杨映. 南方草鱼呼肠孤病毒流行病学调查及双重荧光定量RT-PCR检测方法的建立[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- Yang Y. Epidemiologic survey of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus in south China and establishment of duplex real-time RT-PCR[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2013(in Chinese).
- [21] Zeng W W, Wang Q, Wang Y Y, *et al.* A one-step molecular biology method for simple and rapid detection of grass carp *Ctenopharyngodon idella* reovirus (GCRV) HZ08 strain[J]. Journal of Fish Biology, 2013, 82(5): 1545-1555.
- [22] 张金凤, 曾令兵, 张辉, 等. 草鱼呼肠孤病毒逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)检测方法的建立[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 129-136.
- Zhang J F, Zeng L B, Zhang H, *et al.* Development of a reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method for detection of grass carp reovirus[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 129-136(in Chinese).
- [23] 杨水仙. 草鱼呼肠孤病毒的RT-PCR及RT-LAMP检测方法建立[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- Yang S X. Establishment and application of RT-PCR and RT-LAMP for differential diagnosis of grass carp reovirus[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2013(in Chinese).
- [24] He Y X, Jiang Y S, Lu L Q. Serodiagnosis of grass carp reovirus infection in grass carp *Ctenopharyngodon idella* by a novel Western blot technique[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 194(1-2): 14-20.
- [25] Jing H L, Zhang L F, Fang Z Z, *et al.* Detection of grass carp reovirus (GCRV) with monoclonal antibodies[J]. Archives of Virology, 2014, 159(4): 649-655.
- [26] 黄立平, 刘长明, 危艳武, 等. 猪圆环病毒1型抗体IPMA检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(9): 738-742.
- Huang L P, Liu C M, Wei Y W, *et al.* Development and application of an immunoperoxidase monolayer assay for detection of antibodies against porcine circovirus type 1[J]. Chinese Veterinary Science, 2008, 38(9): 738-742(in Chinese).

- [27] 刘宝芹, 曾伟伟, 王庆, 等. 草鱼呼肠孤病毒HZ08株FQ-PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 中国水产科学, 2012, 19(2): 329-335.
- Liu B Q, Zeng W W, Wang Q, *et al.* Development of a fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique for detection of grass carp reovirus HZ08 strain[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(2): 329-335(in Chinese).
- [28] 崔尚金, 全滢平, 李曦, 等. 猪圆环病毒间接免疫荧光方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(1): 63-66.
- Cui S J, Quan Y P, Li X, *et al.* The development of an indirect immunofluorescent technique of porcine circovirus[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(1): 63-66(in Chinese).
- [29] 周庚寅. 组织病理学技术[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 39-58.
- Zhou G Y. Histopathological Technique[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2006: 39-58(in Chinese).

Establishment and application of immunoperoxidase monolayer assay for detection of the antibody against grass carp reovirus HZ08

ZENG Weiwei¹, WANG Qing¹, WANG Yingying¹, LI Yingying¹,
HAO Guijie², SHI Chunbin¹, SHEN Jinyu^{2*}

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,
Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture,
Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangzhou 510380, China;
2. Agriculture Ministry Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture,
Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: In order to develop an immunological method for detection of the antibody against grass carp reovirus HZ08, using the cell culture plate which infected with the the GCRV HZ08 as the antigen, and serum collected from the vaccine immune grass carp used as the antibody, an immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) was developed to detect antibody against grass carp reovirus HZ08 based on the optimized reaction condition. The specificity, sensitivity, reproducibility and using for clinical application of IPMA were evaluated, and compared with that of ELISA. The results showed that in the optimized IPMA, the virus was diluted at 1×10^3 copies/ μ L after 72 hours, HRP-IgG was diluted at 1:1000, and grass carp serum samples were diluted at 1:100, there was no cross-reaction with serum from grass carp against other pathogeny. The sensitivity test showed that the positive serum could be detected at 1:800. Reproducibility tests proved that the established IPMA had good reproducibility. The IPMA method had 95.7% positive coincident rate and 87.5% negative coincident rate with ELISA method. The results of the IPMA for detection of the immunized grass carp serum showed that the antibody titer reached peak value in the 2nd week post-inoculation. A total of 126 field serum samples were examined using this method, the average positive rate was 72.2%. The IPMA is a highly specific, sensitive, and stable method with high repeatability, and it offered a convenient tool for the epidemiological investigation, vaccine immunization effect assessment, and antigen and antibody detection.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; reovirus; immunoperoxidase monolayer assay(IPMA); antibody detection

Corresponding author: SHEN Jinyu. E-mail: sjyu@126.com

Funding projects: Agriculture Ministry Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture (ZJK201301); Science and Technology Planning Project of Jiangxi Province (20152ACF60021); National Key Technology R&D Program (2012BAD25B02)