

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.12.03

犬瘟热病毒单克隆抗体的研制及 胶体金试纸条检测方法的建立

张敏¹, 李建¹, 舒金秀², 冯超林², 石宝兰¹, 郑良益¹, 牟林琳¹, 柏娇¹,
胡玉立¹, 徐松¹, 刘国兴¹, 闵娟娟¹, 石瑛¹, 顾素云¹, 谢红玲^{1*}

(1. 国药集团动物保健股份有限公司, 武汉 430075; 2. 湖北省兽药监察所, 武汉 430070)

[收稿日期] 2022-06-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 12-0016-09 [中图分类号] S852.65

[摘要] 利用原核表达、纯化的犬瘟热病毒 (Canine distemper virus, CDV) N 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 成功筛选到两株分泌 CDV N 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 D3、D6。2 株杂交瘤细胞分泌单克隆抗体敏感性、特异性良好, 能识别不同来源的 CDV 株, 单抗亚类均为 IgG1。以 D3 作为金标抗体, D6 作为检测抗体, 兔抗鼠 IgG 作为质控线抗体, 制备 CDV 胶体金检测试纸条, 检测 CDV 敏感性为 1000 TCID₅₀, 能在 CDV、犬细小病毒、犬腺病毒 2 型、狂犬病病毒中有效检测区分出 CDV。本研究建立的胶体金试纸条检测方法灵敏度高、特异性强, 适用于 CDV 临床快速诊断。

[关键词] 犬瘟热病毒; N 蛋白; 单克隆抗体; 胶体金试纸条

Preparation of Monoclonal Antibody against Canine Distemper Virus and Development of Colloidal Gold Strip

ZHANG Min¹, LI Jian¹, SHU Jin-xiu², FENG Chao-lin², SHI Bao-lan¹, ZHENG Liang-yi¹,
MU Lin-lin¹, BAI Jiao¹, HU Yu-li¹, XU Song¹, LIU Guo-xing¹, MIN Juan-juan¹,
SHI Ying¹, GU Su-yun¹, XIE Hong-ling^{1*}

(1. Sinopharm Animal Health Corporation Ltd., Wuhan 430075, China; 2. Hubei Province Institute of Veterinary Drug, Wuhan 430070, China)

Corresponding author: XIE Hong-ling, E-mail: 13419546263@163.com

Abstract: In this study, the prokaryotic expression of canine distemper virus (CDV) N protein was induced, and the purified N protein was immunized to BALB/C mice. Two monoclonal hybridoma cell lines (D3, D6) secreting CDV N protein antibody were developed by hybridoma cell technology. The monoclonal antibodies secreted by the two hybridoma cells were sensitive and specific, and could recognize different canine distemper

作者简介: 张敏, 硕士, 从事动物病毒体外诊断试剂的研究; 李建, 博士, 从事动物疫苗及体外诊断试剂研究。二人为共同第一作者。

通讯作者: 谢红玲。E-mail: 13419546263@163.com

virus strains. The monoclonal antibody subclass both was IgG1. Using D3 as the colloidal gold labeled antibody, D6 as the detection antibody and rabbit anti - mouse as the quality control antibody, a colloidal gold strip for detecting porcine coronavirus was prepared. The test line was visible with a detection limit of 1000 TCID₅₀ (CDV). And the specificity tests of dipsticks showed that could distinguish CDV, canine parvovirus (CPV), canine adenovirus type 2 (CAV2) and rabies virus (RV). The colloidal gold strip detection method established in this study had good sensitivity and specificity, and could be suitable for rapid clinical diagnosis of CDV.

Key words: canine distemper virus; N protein; monoclonal antibody; colloidal gold strip

犬瘟热 (Canine distemper, CD) 是由犬瘟热病毒 (Canine distemper virus, CDV) 引起的一类在多种肉食性犬类 (尤其是幼仔)、貂类等动物中急性高度接触性、致死性传染病,同时可感染非人灵长类动物^[1]。该病广泛分布全球,且各季节均有发生。根据临床症状可分急性和慢性期,常引起剧烈的如结膜炎、肠胃炎等炎症反应和各种慢性神经症状^[2],感染动物死亡率高达 80%^[3]。犬瘟热已成为阻碍宠物饲养业、毛皮动物养殖业等发展的主要疫病之一。由于缺乏简便快捷、准确、便于操作的检测方法,常常延误病机,错过治疗机会,导致动物死亡^[4]。因此,开展对于 CDV 感染早期临床诊断检测研究具有重要意义。

CDV 为有囊膜的单股负链 RNA 病毒,基因组 6 个开放阅读框分别编码 6 种结构蛋白:核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质膜蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝蛋白(H)和大蛋白(L),其中核衣壳蛋白在病毒装配、转录和复制过程中起重要作用,能刺激机体产生强烈的体液免疫反应^[5-6]。核衣壳蛋白的结构核心和功能核心高度保守,是保守性较强的免疫原性蛋白,为单克隆抗体、胶体金检测试纸条的研制等研究提供必要条件^[7]。

目前 CDV 检测方法包括病毒学诊断、电镜显微镜诊断、病毒分离与鉴定^[8]、免疫学诊断、分子生物学等多种检测手段,免疫胶体金试纸条检测技术无疑是最为简便、快捷、高效、灵敏的病毒诊断方法,不受环境及人员限制,无需仪器设备辅助,对于动物感染的早期诊断及控制具有重要意义^[9]。本研究用原核表达的 N 蛋白,免疫小鼠制备单克隆抗体,建立一种敏感性、特异性良好的免疫胶体金试

纸条检测方法。

1 材料与方法

1.1 毒种、细胞和其他试剂 SP2/0 细胞、表达载体 pET - 28a、Vero 细胞、MDCK 细胞、F81 细胞、BHK 细胞、CDV (YD 株、Snyder Hill 株、WH - G 株)、犬细小病毒 (canine parvovirus, CPV)、犬腺病毒 2 型 (canine adenovirus type 2, CAV2)、狂犬病病毒 (rabies virus, RV) 为国药集团动物保健股份有限公司保存; FITC 标记羊抗小鼠 IgG、HRP 标记羊抗小鼠 IgG, Thermo 公司; DMEM 培养基, Hyclone 公司; HAT、HT, Sigma 公司; 单抗亚类鉴定试剂盒, 洛阳赛尔维公司。安捷犬瘟热病毒抗原快速检测试纸, 购自韩国安捷公司, 货号 RG1103DF。

1.2 CDV N 蛋白表达载体的构建与蛋白表达纯化

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中登录的 CDV N 全基因序列, 设计 RT - PCR 扩增引物, 预期扩增片段为 1572 bp。引物序列如下:

CDV - NF: 5' - GGTGCCCGCGCGCAGCCATATGATGGCTAGCCTTCTCAAGAG - 3' (*Nde* I)

CDV - NR: 5' - GTGGTGCTGCTGCTGCTGCTCGAGATTAAGTAGCTCTCTATCATTATA - 3' (*Xho* I)

1.2.2 CDV 中 N 基因的扩增及重组表达质粒的构建 参照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA 并以其为模板, 按上述引物扩增 CDV 的 N 基因。RT - PCR 的反应参数是: 98 °C 预热 2 min, 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火温度 15 s, 72 °C 延伸 2 min (从第二步 98 °C 变性到第四步 72 °C 延伸进行 35 个循环), 72 °C 延伸 10 min。回收纯化的 PCR 产物经 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切后克隆至 pET - 28a 载体中, 构建重组表达质粒。

1.2.3 重组 CDV N 蛋白的表达、纯化及鉴定 将 pET-28a-N 转化至受体菌 BL21, 待 OD_{600} 达到 0.4~0.5 时, IPTG 诱导表达, 将 BL21 诱导后的培养物离心取菌体进行超声破碎, 破碎后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。表达的上清过 Ni 柱进行纯化, 分别收集流穿液和各洗脱峰, 并将各样品进行 SDS-PAGE 电泳。将纯化后的 CDV N 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳、转膜, 加入合适稀释倍数的阳性兔血清作一抗, 用羊抗兔 IgG-HRP 为二抗, 进行 Western Blotting 鉴定。

1.3 单克隆抗体的研制

1.3.1 动物免疫 将 CDV N 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合并完全乳化后, 小鼠腹股沟两侧靠近淋巴结区和颈部皮下多点免疫, 每只 50 μ g/0.5 mL, 21 d 后 2 免, 免疫剂量为首次免疫的一半, 佐剂用弗氏不完全佐剂, 间隔 21 d 后 3 免, 免疫剂量和佐剂同 2 免, 10 d 之后采用腹腔注射进行加强免疫, 剂量同首免, 3 d 后融合。

1.3.2 细胞融合 按照常规方法无菌采取小鼠的脾细胞, 与骨髓瘤细胞按 10:1 比例混合, 用 PEG1450 进行融合, 将融合之后的细胞加入铺好饲养细胞的 96 孔板中。

1.3.3 杂交瘤细胞株筛选 利用间接 ELISA 法和间接免疫荧光法对所培养的杂交瘤上清进行检测, 有限稀释法对检测阳性的杂交瘤细胞进行至少三次以上的克隆直至阳性率为 100% 为止。

1.4 单克隆抗体的鉴定

1.4.1 腹水的生产及其纯化 选择 12 周龄以上的雌性 BALB/C 小鼠, 腹腔注射单克隆杂交瘤细胞, 7 d 之后收取小鼠腹水, 采用辛酸-硫酸铵法纯化腹水。

1.4.2 单克隆抗体的亚类测定 按照洛阳赛尔维公司单抗亚类试剂盒说明书进行单克隆抗体亚类的测定。

1.4.3 单克隆抗体敏感性鉴定 将不同 CDV 株 (YD 株、Snyder Hill 株、WH-G 株) 分别接种长满单层的 Vero 细胞的 96 孔板中, 置 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱中进行培养 72 h 后用冷丙酮固定; 以 CDV N

蛋白单克隆抗体作为一抗, FITC 标记的抗鼠 IgG 作为二抗进行间接免疫荧光检测, 于荧光显微镜下观察试验结果。

1.4.4 单克隆抗体特异性鉴定 将 CDV、CPV、CAV2、RV 分别接种长满单层的 Vero 细胞、F81 细胞、MDCK 细胞、BHK 细胞的 96 孔板中, 置 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱中进行培养 72 h 后用冷丙酮固定; 以 CDV N 蛋白单克隆抗体作为一抗, FITC 标记的抗鼠 IgG 作为二抗进行间接免疫荧光检测, 于荧光显微镜下观察试验结果。

1.5 免疫胶体金试纸条的制备及检测

1.5.1 CDV 胶体金快速检测试纸条的制备 用柠檬酸三钠还原法制备 25 nm 的金颗粒溶液, 标记量为 30 μ g/mL 胶体金溶液的单克隆抗体 D3, 搅拌 30 min, 在加入终浓度 20% 的 PEG 20000 稳定未结合的胶体金颗粒, 8700 r/min 离心 30 min, 弃上清, 再用金标缓冲溶液定容至 2 mL。标记好的胶体金溶液均匀涂布于金标垫上, 37 $^{\circ}$ C 烘干 2 h 备用。再将羊抗小鼠 IgG 二抗和单克隆抗体 D6 分别以 1 mg/mL 浓度包被硝酸纤维素膜作为质控线和检测线, 37 $^{\circ}$ C 烘干 2 h 备用。将准备好的硝酸纤维素膜、样品垫、金标垫和吸水纸按顺序粘贴到背衬板上, 切条机切割成 4 mm 条, 组装成检测试纸条。

1.5.2 CDV 胶体金快速检测试纸条检测

1.5.2.1 试纸条对不同毒株 CDV 的敏感性检测 将 Snyder Hill 株和 WH-G 株进行 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200 系列稀释, YD 株进行 1:5、1:10、1:20、1:40 系列稀释; 加样量均为 0.1 mL/孔, 分别用本试纸条进行检测, 评判试纸条检测敏感性。

1.5.2.2 试纸条特异性检测 取 CPV、CAV2、RV、CDV 阴性对照样品, 分别用本试纸条进行检测, 评判试纸条特异性。

1.5.3 临床试验样本适用性试验及对比试验

分别用本研究制备试纸条、安捷试纸条及 PCR 扩增法检测 50 份犬鼻液或眼分泌物样品, 具体参照《犬瘟热病毒病诊断技术标准》(GB/T 27532-2011), 计算本研究试纸条与安捷试纸条、PCR 检测

方法的符合率。

符合率 = 结果符合的样品数 / 总样品数 × 100%

2 结果与分析

2.1 CDV 重组 N 蛋白表达及鉴定

2.1.1 CDV N 基因的 PCR 扩增 PCR 扩增出 CDV N 蛋白基因片段,电泳检测结果(图 1)显示,目的基因 CDV N 蛋白基因片段长度为 1572 bp,与预期结果相符。

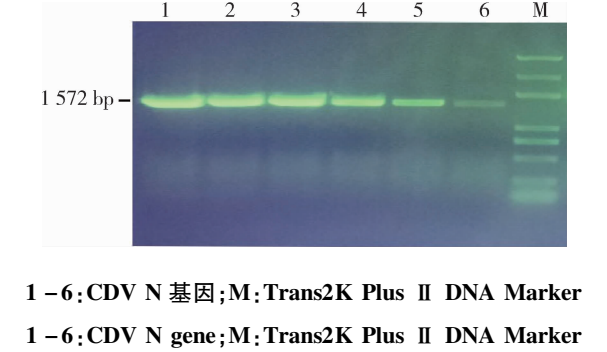


图 1 CDV N 基因 PCR 扩增图

Fig 1 The PCR results of CDV N gene

2.1.2 CDV N 蛋白表达、纯化及鉴定 原核表达系统诱导表达 CDV N 蛋白,菌体破碎后上清及沉淀进行 SDS - PAGE 电泳结果(图 2)显示,表达纯化后的 N 蛋白分子量大小在 58 kD 附近,大量存在于破碎后的上清液中。上清液纯化后杂蛋白被去除,可见明显单一目的蛋白条带(图 3)。同时将纯化后的 N 蛋白进行 Western Blotting 鉴定,N 蛋白样品孔出现一条与目的蛋白大小相同的条带,表明纯化后的 N 蛋白反应原性良好(图 4)。

2.2 单克隆抗体研制及鉴定 共筛选 2 株分泌 CDV N 蛋白抗体单克隆杂交瘤细胞株,分别命名为 D3 和 D6。

2.2.1 单克隆抗体亚类测定 D3、D6 亚类均为 IgG1。

2.2.2 腹水的纯化 纯化抗体 D3、D6 进行 SDS - PAGE 鉴定分析,结果见图 5,2 株单克隆抗体均出现大小 50 kD 左右的重链和 25 kD 左右的轻链,且杂蛋白去除较好,单抗纯净度较高。

2.2.3 单克隆抗体敏感性鉴定 D3、D6 单克隆抗体均能与不同 CDV 株(YD 株、Snyder Hill 株、

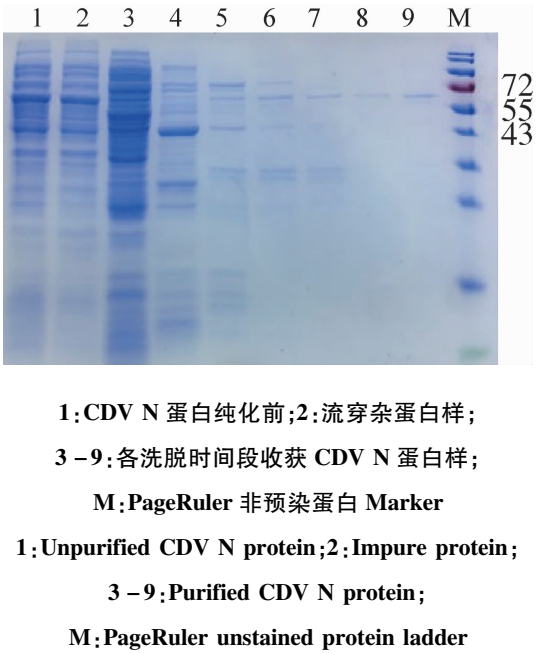
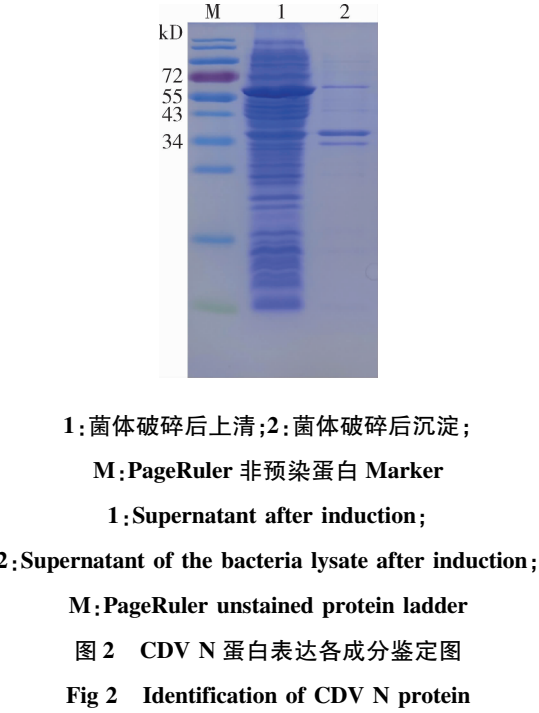
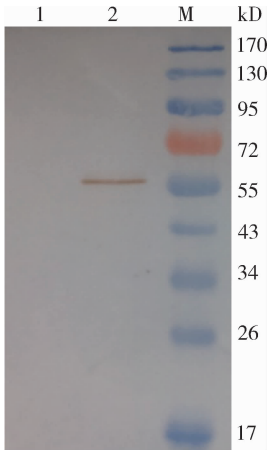


图 3 CDV N 蛋白柱纯化鉴定图

Fig 3 Identification and purification of CDV N protein

WH - G 株)感染的 Vero 细胞反应,可见明显绿色荧光,与阴性细胞无荧光,说明 D3、D6 单克隆抗体敏感性良好,能识别结合多株 CDV(图 6、图 7)。

2.2.4 单克隆抗体特异性鉴定 D3、D6 单克隆抗体均能与感染 CDV 的 Vero 细胞反应,可见明显绿

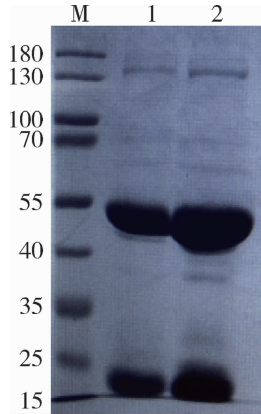


1:阴性对照;2:CDV N 蛋白;
M:PageRuler 预染蛋白 Marker

1:Negative control;2:Purified CDV N protein;
M:PageRuler prestained protein ladder

图 4 CDV N 蛋白纯化 Western blotting 鉴定图

Fig 4 Western blotting identification
of purified CDV N protein



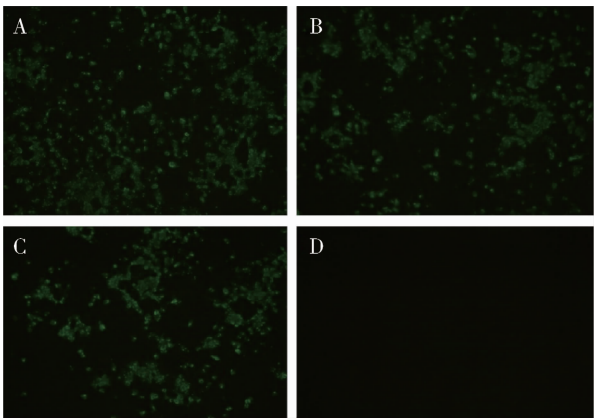
1:D3 单抗;2:D6 单抗;M:PageRuler 非预染蛋白 Marker

1:Monoclonal antibody D3;2:Monoclonal antibody D6;
M:PageRuler unstained protein ladder

图 5 CDV N 蛋白单抗纯化 SDS-PAGE 鉴定图

Fig 5 SDS-PAGE identification of purified
McAbs against CDV N protein

色荧光,与阴性细胞无荧光。与感染 CPV、CAV2、RV 的细胞均不发生特异性反应,无荧光信号,说明 D3、D6 单克隆抗体仅与 CDV 发生特异性反应,与 CPV、CAV2、RV 均不结合,单克隆抗体特异性良好(图 8、图 9)。

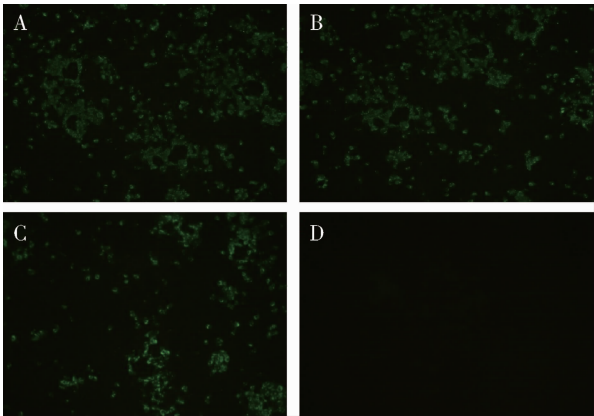


A:感染 CDV - YD 株细胞孔;B:感染 CDV - Snyder Hill 株细胞孔;
C:感染 CDV - WH - G 株细胞孔;D:正常细胞对照

A:Infected CDV - YD;B:Infected CDV - Snyder Hill;
C:Infected CDV - WH - G;D:Negative control

图 6 单克隆抗体 D3 敏感性鉴定(×40)

Fig 6 Immunofluorescence assay(IFA) analyze the
binding sensitivity of antibody D3(×40)



A:感染 CDV - YD 株;B:感染 CDV - Snyder Hill 株;
C:感染 CDV - WH - G 株;D:正常细胞对照

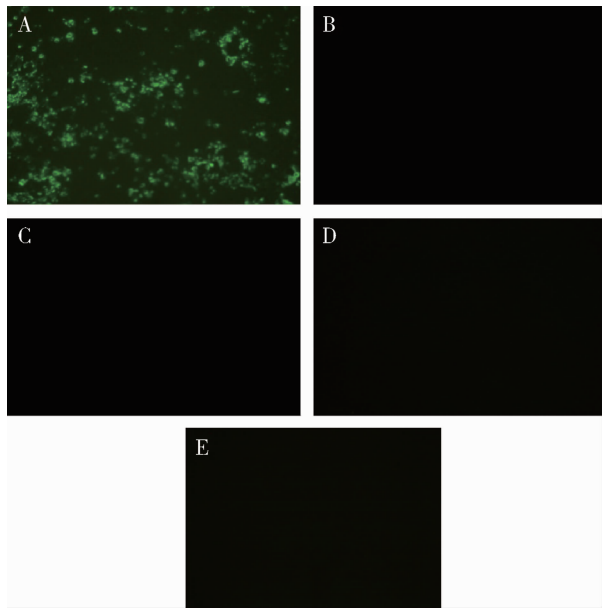
A:Infected CDV - YD;B:Infected CDV - Snyder Hill;
C:Infected CDV - WH - G;D:Negative control

图 7 单克隆抗体 D6 敏感性鉴定(×40)

Fig 7 Immunofluorescence assay(IFA) analyze
the binding sensitivity of antibody D6(×40)

2.3 免疫胶体金试纸条检测方法的敏感性 & 特异性

2.3.1 试纸条检测敏感性 本试纸条检测不同 CDV 株,检测 $10^{5.3}$ TCID₅₀/mL 的 YD 株病毒液,



A:感染 CDV;B:感染 CPV;C:感染 CAV2;
D:感染 RV;E:正常细胞对照

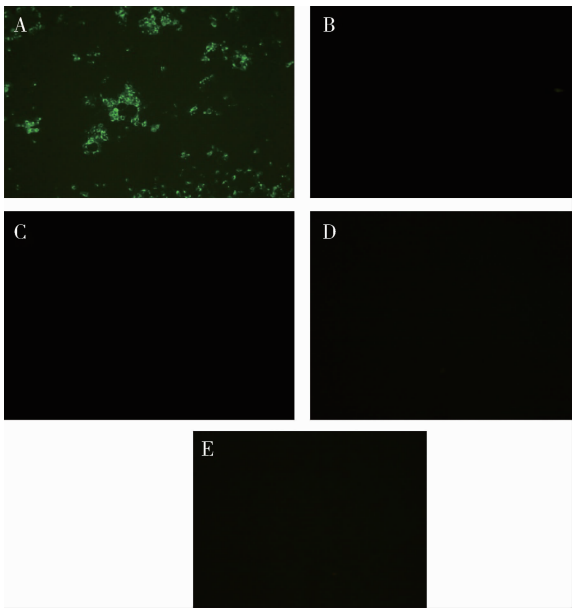
A:Infected CDV;B:Infected CPV;C:Infected CAV2;
D:Infected RV;E:Negative control

图 8 单克隆抗体 D3 特异性鉴定 (×40)
Fig 8 Immunofluorescence assay (IFA) analyze
the binding specificity of antibody D3 (×40)

1: 5、1: 10 稀释度检测结果均为阳性,1: 20、1: 40 稀释度检测结果为阴性;检测 10^{6.5} TCID₅₀/mL 的 Snyder Hill 株和 WH - G 株病毒液,1: 50、1: 100、1: 200、1: 400 稀释度检测结果均为阳性,1: 800、1: 1600、1: 3200 稀释度检测结果为阴性(图 10)。本试纸条检测不同株 CDV 的最低限均为 1000 TCID₅₀,敏感性良好。

2.3.2 试纸条检测特异性 本试纸条检测 CPV、CAV2、RV、CDV 阴性对照,结果均为阴性,表明该试纸条不与犬其他常见病毒反应,特异性良好,检测结果见图 11。

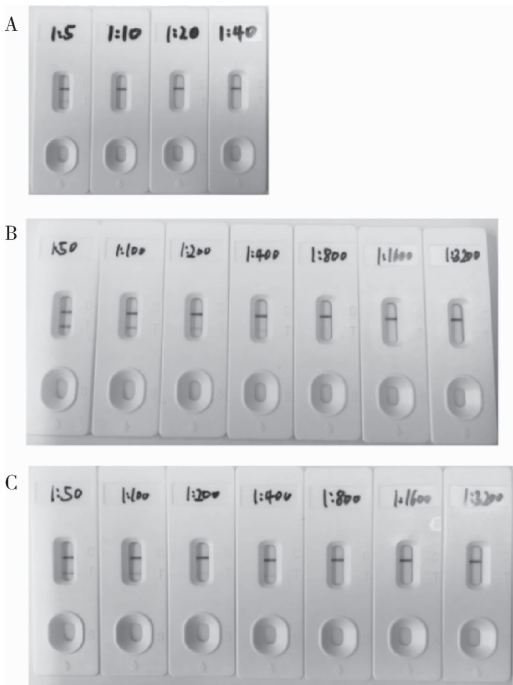
2.4 试纸条临床适用性及同类产品、PCR 法符合率 检测临床犬鼻液或眼分泌物样品 50 份,其中阳性样品 16 份,阴性样品 34 份,阳性率为 32%。安捷试纸条检测阳性结果 17 份,阴性结果 33 份。两种试纸条的检测符合率为 98%。PCR 检测阳性结果 17 份,阴性结果 33 份。本试纸条与 PCR 检测符合率为 98%。各检测结果见表 1。



A:感染 CDV;B:感染 CPV;C:感染 CAV2;
D:感染 RV;E:正常细胞对照

A:Infected CDV;B:Infected CPV;C:Infected CAV2;
D:Infected RV;E:negative control

图 9 单克隆抗体 D6 特异性鉴定 (×40)
Fig 9 Immunofluorescence assay (IFA) analyze
the binding specificity of antibody D6 (×40)



A:YD 株;B:Snyder Hill 株;C:WH - G 株
A: YD;B: Snyder Hill;C: WH - G

图 10 试纸条敏感性结果
Fig 10 Sensitivity test of dipstick



1:CPV;2:CAV2;3:RV;4:阴性对照
1:CPV;2:CAV2;3:RV;4:Negative control

图 11 试纸条特异性检测结果

Fig 11 Specificity test of dipstick

3 讨论与小结

CDV 自然感染的宿主范围广泛,造成的危害及经济损失逐步扩大,以幼犬最为易感。目前实验室诊断虽快速高效、特异性强,但常用的 RT – PCR 法、电镜法等对人员的专业技术和仪器设备要求较高。基于单克隆抗体和免疫胶体金技术构建的检测方法完美地规避上述难题,提供一种可现场检测、操作简单、结果直观可见的诊断方法^[9-10]。犬瘟热胶体金试纸条为目前宠物医院等临床用于 CDV 检测中使用最广泛的检测方法,但主要存在的问题为敏感性较低,为解决该问题,高敏感性单克隆抗体的研制显得尤为关键^[11-12]。使用 CDV 全

表 1 临床试验检测结果

Tab 1 Clinical test

编号	症状	本品	安捷	PCR	编号	症状	本品	安捷	PCR
1	咳嗽,流鼻涕,腹泻	+	+	+	26	咳嗽	+	+	+
2	反复咳嗽	-	-	-	27	咳嗽,流鼻涕	+	+	+
3	咳嗽,流鼻涕,腹泻	+	+	+	28	咳嗽	-	-	-
4	咳嗽,流鼻涕,腹泻	+	+	+	29	腹泻	-	+	-
5	无	-	-	-	30	无	-	-	-
6	咳嗽	-	-	-	31	拉稀,呕吐,流鼻涕	+	+	+
7	咳嗽	-	-	-	32	腹泻	-	-	+
8	咳嗽,腹泻	+	+	+	33	咳嗽	-	-	-
9	呕吐,咳嗽	-	-	-	34	腹泻,少量眼屎	+	+	+
10	咳嗽	+	+	+	35	咳嗽	-	-	-
11	便血	-	-	-	36	咳嗽,拉稀	+	+	+
12	便血	-	-	-	37	厌食	-	-	-
13	咳嗽	-	-	-	38	咳嗽	-	-	-
14	咳嗽,呼吸困难	-	-	-	39	咳嗽,拉稀	-	-	-
15	咳嗽	+	+	+	40	拉稀,便血	-	-	-
16	咳嗽,便血	+	+	+	41	咳嗽,流鼻涕	+	+	+
17	咳嗽	-	-	-	42	无	-	-	-
18	咳嗽,流鼻涕,腹泻	+	+	+	43	咳嗽	-	-	-
19	便血	-	-	-	44	咳嗽	-	-	-
20	咳嗽	-	-	-	45	呕吐,咳嗽	-	-	-
21	便血	-	-	-	46	呕吐,咳嗽	+	+	+
22	咳嗽,流鼻涕	+	+	+	47	便血	-	-	-
23	咳嗽	-	-	-	48	便血	-	-	-
24	流鼻涕	-	-	-	49	无	-	-	-
25	无	-	-	-	50	无	-	-	-

“+”为阳性,“-”为阴性

病毒研发的单克隆抗体,应用于试纸条产品较为常见^[13],但存在不同来源的病毒株检测敏感性低、假阳性、特异性不强等问题^[14-15]。区别于传统的试纸条研发,本研究专注于开发针对 CDV 亚单位的单克隆抗体并进行试纸条的研发,能较大幅度地提高试纸条检测方法的敏感性及特异性。CDV N 蛋白结构及功能高度保守,以其作为免疫抗原得到的单克隆抗体,构建胶体金试纸条检测方法,灵敏性特异性强^[16]。本研究研制的 CDV 胶体金检测试纸条有很好的临床适用性,与目前宠物诊所广泛使用的韩国安捷公司生产的 CDV 抗原快速检测试纸对比有较高的符合率,为临床快速诊断 CDV 提供参考方法,同时降低了动物诊所的使用成本。

本研究成功构建了 CDV N 蛋白原核表达载体,通过大肠杆菌表达系统高效表达,纯化获得免疫原性良好的 CDV N 蛋白。应该杂交瘤技术,成功筛选到 2 株敏感性及特异性良好的单克隆抗体 D3、D6,可识别不同 CDV 株(YD 株、Snyder Hill 株、WH-G 株)。以此单抗为基础,成功构建免疫胶体金试纸条检测方法,实验室检测证实能有效区分 CDV、CPV、CAV2、RV,特异性良好。本研究研制的 CDV 检测试纸条,在临床应用方面仍需进一步完善,临床样本(口鼻、眼结膜分泌物)杂质多^[17],检测方法需进一步优化验证。

参考文献:

- [1] Bi Z, Wang Y, Pan Q, *et al.* Development of CDV-specific monoclonal antibodies for differentiation of variable epitopes of nucleocapsid protein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 211: 84-91.
- [2] An D J, Kim T Y, Song D S, *et al.* An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 147(2): 244-249.
- [3] Appel M, Reggiardo C, Summers B A, *et al.* Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries)[J]. *Archives of Virology*, 1991, 119(1/2): 147-152.
- [4] 曹智刚, 易立, 程悦宁, 等. 抗犬瘟热病毒核蛋白单克隆抗体的制备及其线性抗原表位鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(7): 578-582.

- Cao Z G, Yi L, Cheng Y B, *et al.* Preparation and identification of linear epitope of monoclonal antibodies against canine distemper virus N protein[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39(7): 578-582.
- [5] 庄金秋, 梅建国, 沈志强. 犬瘟热病毒实验室检测方法研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2012, 44(8): 94-98.
 - Zhuang J Q, Mei J G, Shen Z Q, *et al.* Research progress on the laboratory detection methods of the canine distemper virus[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 44(8): 94-98.
 - [6] Stettler M, Zurbriggen A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 1995, 44(2-4): 211-217.
 - [7] 焦金波, 黄娟, 秦晓冰, 等. 犬瘟热病毒 F 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[C]//中国畜牧兽医学会畜牧兽医生物技术学会暨中国免疫学会兽医免疫分会第七次研讨会论文集. 2008.
 - [8] 孙玮, 王铁成, 杨松涛, 等. 犬瘟热病毒单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *动物医学进展*, 2011, 32(3): 77-81.
 - Sun W, Wang T C, Yang S T, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibodies against canine distemper virus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2011, 32(3): 77-81.
 - [9] 苏建青, 岳妙姝, 王化磊, 等. 犬瘟热病毒单克隆抗体的制备及特性鉴定[J]. *吉林农业大学学报*, 2009(1): 92-96.
 - Su J Q, Yue M S, Wang H L, *et al.* Generation and characterization of monoclonal antibodies against canine distemper virus[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2009(1): 92-96.
 - [10] 孙玮. 犬瘟热病毒单克隆抗体的制备、鉴定及初步应用[D]. 吉林大学, 2011: 1-63.
 - Sun W. Preparation, identification and preliminary application of monoclonal antibodies against canine distemper virus[D]. *Jilin Agricultural University*, 2011: 1-63.
 - [11] 房超, 张泉, 易海华, 等. 检测犬瘟热病毒的单克隆抗体胶体金试纸条的制备[J]. *中国动物传染病学报*, 2011, 19(2): 26-30.
 - Fang C, Zhang Q, Yi H H, *et al.* Development of colloidal gold immunochromatographic test strip by monoclonal antibodies against CDV[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2011, 19(2): 26-30.
 - [12] 陈万荣, 付少才, 刘树玲. 抗犬瘟热病毒单克隆抗体的制备及初步应用[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(5): 455-456.
 - Chen W R, Fu S C, Liu S L, *et al.* Preparation and application of mouse anti-CDV monoclonal antibodies[J]. *Chin J Vet Sci*,

2002, 22(5): 455 – 456.

[13] Claes B. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against four structural components of canine distemper virus[J]. Journal of General Virology, 1985, 66(3): 443 – 456.

[14] Zhao J, Zhang H, Bai X, *et al.* Emergence of canine distemper virus strains with two amino acid substitutions in the haemagglutinin protein, detected from vaccinated carnivores in North – Eastern China in 2012 – 2013 [J]. Veterinary Journal, 2014, 200(1): 191 – 194.

[15] 许阳阳. 犬瘟热流行病学研究进展[J]. 农村实用技术, 2018 (7): 36 – 37.

[16] 程敏姮, 张启龙, 潘 珺, 等. 犬瘟热诊断技术的研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(10): 138 – 143.

Cheng M H, Zhang Q L, Pan J, *et al.* Progress in research on diagnosis of canine distemper [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(10): 138 – 143.

[17] 刘天宇, 王 丞, 金海林, 等. 犬瘟热的临床诊断技术与疫苗研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2016, 37(12): 103 – 104.

Liu T Y, Wang C, Jin H L, *et al.* Research progress on clinical diagnostic technique and vaccine development of canine distemper [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2016, 37(12): 103 – 104.

(编 辑:李文平)