

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/531

G01N 33/563 G01N 33/569



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03126199. X

[43] 公开日 2003 年 12 月 10 日

[11] 公开号 CN 1460857A

[22] 申请日 2003.6.10 [21] 申请号 03126199. X

[71] 申请人 陈睿锋

地址 450008 河南省郑州市花园路 22 号院 1
号楼 53 号

[72] 发明人 张钦献 王则宇 陈睿锋

[74] 专利代理机构 郑州科维专利代理有限公司

代理人 张欣棠 刘卫东

权利要求书 3 页 说明书 7 页

[54] 发明名称 牛病毒性腹泻病毒抗体间接 ELISA
检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种牛病毒性腹泻病毒抗体间接 ELISA 检测方法，主要经由抗原预包被条制备、酶结合物制备、其它试剂的配制、检测。利用辣根过氧化物酶标记兔抗牛 IgG 以检测已与固相牛病毒性腹泻病毒抗原结合的受检牛病毒性腹泻病毒抗体。其检测方法特异性高，操作方便，通过可增敏的惰性蛋白和酶结合物增敏剂的使用，大幅度提高了灵敏度和检出率，降低了抗原和酶结合物的用量，相应地也降低了成本，检测时间短，2 小时内即可完成检测操作。其方法操作简便易行，可以标准化为产品，可以用于大批量检测，做到每头牛检测，也可以用于流行病学调查和主动免疫效果检测，以及辅助检测牛病毒性腹泻病毒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 牛病毒性腹泻病毒抗体间接 ELISA 检测方法, 经以下检测方法进行, 抗原预包被条制备 → 抗体酶结合物制备 → 其它试剂的配制 → 检测, 其特征在于:

(1) 抗原预包被条制备: 经由包被、封闭、保护、干燥过程

a. 包被: 用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液将病毒抗原或重组抗原稀释为 0.1~10.0 $\mu\text{g/ml}$, 按 100 μl /孔加于聚苯乙烯微孔板中, 放置、甩干;

b. 封闭: 按 150 μl /孔用含 0.1%~20.0% 惰性蛋白即蛋白胨, pH6.5~8.0 的磷酸盐缓冲液封闭、甩干;

c. 保护: 按 100 μl /孔用含 20% 蔗糖, pH6.5~8.0 的磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时;

d. 干燥: 置干燥室干燥后, 装入含干燥剂的包装中保存;

(2) 酶结合物制备: 经由酶标记、酶工作液配制过程

1) 酶标记

a. HRP 的活化: 用三蒸水配制 HRP ($\text{RZ} \geq 3.0$) 溶液, 加入过碘酸钠溶液, 2°C~8°C 避光 1 小时; 加入乙二醇, 2°C~8°C 反应 28~32 分钟; 加入 pH4.4 的醋酸盐缓冲液 2°C~8°C 透析过夜, 换透析液两次;

b. 标记: 将上述活化酶加抗体, 加入纯化的兔抗牛 IgG 中, 用 pH9.5 的碳酸盐缓冲液调节 pH 至 9.2, 2°C~8°C 反应 20 小时;

c. 还原: 将硼氢化钠溶液加入前述反应混合物中, 2°C~8°C 反应 2 小时; 结合物加入 pH6.0 的磷酸盐缓冲液 2°C~8°C 透析过夜, 换透析液两次, 加对倍中性甘油后 -20°C 保存;

2) 酶工作液配制

a. 缓冲液配制: 以三蒸水配 pH6.5~pH8.0 的磷酸盐缓冲液, 内含 0.1%~5.0% 增敏剂聚乙二醇; 0.1%~20.0% 蛋白胨; 0.5% 酶保护剂; 0.5% 硫柳汞钠及以 1% 吐温-20;

b. 以所配的缓冲液, 按适当浓度稀释冻存的标记酶;

(3) 其它试剂的配制

1) 洗涤液: 本方法采用固体洗液, 有商品洗液出售;

2) 样品稀释液: 以三蒸水配内含 0.1%~20.0%蛋白胨的 pH7.4 磷酸盐缓冲液;

3) 显色剂 A: 以三蒸水配 pH5.0 醋酸盐缓冲液, 内含 0.5%过氧化脲;

4) 显色剂 B: 用甲醇配 1.6%四甲基联苯胺, 溶解后对倍加甘油;

5) 终止液: 以三蒸水配 2M 硫酸溶液;

6) 阳性对照: 取筛出的阳性血清 ($OD_{450nm} \geq 0.500$) 加少量红色染料并按 1000 单位/ml 加青霉素和链霉素, 无菌过滤;

7) 阴性对照: 取筛出的阴性血清 ($OD_{450nm} \leq 0.100$), 按 1000 单位/ml 加青霉素和链霉素, 无菌过滤;

(4). 检测

1) 将一包固体洗液加 500ml 蒸馏水溶解后即为洗涤液;

2) 取抗原预包被条, 每孔各加 100 μ l 样品稀释液, 再加 1~20 μ l 待测标本血清, 同时设空白 (只加 100 μ l 样品稀释液)、阴性对照 (加 100 μ l, 不加样品稀释液)、阳性对照 (加 100 μ l, 不加样品稀释液), 37°C 孵育 20~60 分钟后, 甩干;

3) 用洗涤液洗涤 6 遍, 甩干;

4) 加 1 滴前述的酶结合物工作液 (空白不加), 37°C 孵育 20~60 分钟后, 甩干;

5) 用洗涤液洗涤遍, 甩干;

6) 依次加 1 滴显色剂 A 和 1 滴显色剂 B, 37°C 避光孵育 10 分钟;

7) 加 1 滴终止液, 酶标仪检测 OD_{450nm} 。

2. 根据权利要求 1 所述的牛病毒性腹泻病毒抗体间接 ELISA 检测方法, 其特征在于所述的惰性蛋白即蛋白胨可以用酵母浸膏代替, 优选蛋白胨。

3. 根据权利要求 1 所述的牛病毒性腹泻病毒抗体间接 ELISA 检测方法, 其特征在于预包被条制备 a. 包被过程是 2°C~8°C 过夜后再 37°C 放置 1~3 小时。

4. 根据权利要求 1 所述的牛病毒性腹泻病毒抗体间接 ELISA 检测方法, 其特征在于预包被条制备 b. 封闭中所述的缓冲液还可选用四羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, 优选磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求 1 所述的牛病毒性腹泻病毒抗体间接 ELISA 检测方法, 其特征在于预包被条制备 c. 封闭采用的含 20% 蔗糖的 pH6.5~pH8.0 缓冲液可选用四羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, 优选磷酸盐缓冲液。

6. 根据权利要求 1 所述的牛病毒性腹泻病毒抗体间接 ELISA 检测方法, 其特征在于酶工作液配制 a 中配制所用的增敏剂为单体有 2 个或 2 个以上羟基的高分子物质可选用聚乙二醇、右旋糖苷、肝素、透明质酸、可溶性淀粉、糖原、菊糖、硫酸软骨素等, 优选聚乙二醇、右旋糖苷。

7. 根据权利要求 1 所述的牛病毒性腹泻病毒抗体间接 ELISA 检测方法, 其特征在于酶工作液配制 b. 以所配的缓冲液, 一般按 1: 100~1: 50000 稀释冻存的标记酶, 即为酶工作液。

牛病毒性腹泻病毒抗体间接 ELISA 检测方法

（一）技术领域

本发明涉及牛的一种病毒抗体的检测方法，具体说是牛病毒性腹泻病毒抗体的间接 ELISA 检测方法。

（二）背景技术

牛病毒性腹泻病毒（简称 BVDV）也称牛病毒性腹泄——粘膜病毒，是一种重要的动物病毒。它不仅是牛病毒病毒性腹泻的重要病原，能够引起牛的一种复杂、呈多种临床表现的疾病，主要表现为腹泻、急慢性粘膜病、免疫耐受与持续性感染、免疫抑制、先天性缺陷、母畜流产、产死胎和畸形胎等，也是我国内蒙古和新疆地区羔羊腹泻的重要病原之一，同时还是牛血清培养细胞时的主要污染源之一。

1946 年 Olafson 首次报道牛病毒性腹泻以来，世界各地都陆续报道了该病的发生。二十世纪 80 年代我国李佑民等首次报道从牛流产胎儿脾脏分离出 BVDV，证实我国也存在该病以来，许多地区先后报道了该病的发生。BVDV 不仅可以感染牛，而且也可感染绵羊、山羊、猪、鹿等其它动物。资料表明世界每年死于此病的牛不少于 500 万头，占牛饲养总数的 0.5%~1%，牛群 BVDV 的感染率为 16.5%~89.0%，羊群 BVDV 的感染率为 14.6~83.3%，鹿群 BVDV 的感染率为 19.6%~44.4%英国、美国、澳大利亚、加拿大德国等国家中牛群 BVDV 抗体阳性率高达 50%~89%。此病一旦爆发流行，就很难控制和消灭，因此及时准确检测 BVDV，预防和控制牛病毒性腹泻，对于牧业特别是养牛业具有重大的意义。

目前牛病毒性腹泻病毒检测方法有多种，如血清中和试验、免疫荧光抗体试验、琼脂扩散试验、补体结合试验、病毒分离培养、电镜观察、酶联免疫吸附试验（简称 ELISA）、聚合酶链反应（简称 PCR）等方法。方法很多一定程度上能够满足畜养和检疫的需要，但很难满足牛血清特别是用于猪瘟病毒疫苗生产所需的牛血清加工单位和猪瘟病毒疫苗生产单位的检验需要。BVDV 与猪瘟病毒（简称 HCV）的核苷酸序列约 60%具有相源性，氨基酸序列约 85%具有同源性，二者产生的抗体具有明显的交叉，因此在猪瘟病毒疫苗生产中，若培养病毒的牛

血清带有 BVDV 抗体, 必然与 HCV 结合, 降低 HCV 的产率, 势必严重影响疫苗生产单位的生产效率和产品质量, 加大其生产成本。而由于牛病毒性腹泻发病率比较高, 许多个体中存在 BVDV 抗体, 要保证生产的血清产品中无或极低滴度 BVDV 抗体, 就必须每头牛都检测, 这方面现有技术要么做不到, 要么成本代价太高, 生产单位无法承受。

另外随着牛病毒性腹泻病毒疫苗广泛用于主动免疫, 其免疫效果也需要高灵敏的 BVDV 抗体检测技术。BVDV 抗体的存在与 BVDV 有一定的相关性, 检测 BVDV 抗体也可以作为检测 BVDV 的辅助手段。

(三) 技术内容

本发明的目的在于提供一种高灵敏、可大规模检测、也可适合做流行病学调查的牛病毒性腹泻病毒抗体的间接 ELISA 检测方法。

为实现以上所述的目的, 本发明采取利用 BVDV 标准毒株纯化的病毒抗原或基因重组的抗原包被聚苯乙烯微孔板, 以抗牛 IgG 标记辣根过氧化物酶 (简称 HRP), 以间接 ELISA 法直接检测标本中的抗 BVDV IgG 抗体。具体如下:

经以下检测方法进行, 抗原预包被条制备 → 抗体酶结合物制备 → 其它试剂的配制 → 检测

1. 抗原预包被条制备: 经由包被、封闭、保护、干燥过程

a. 包被: 用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液, 将病毒抗原或重组抗原稀释为 0.1~10.0 $\mu\text{g/ml}$, 按 100 μl /孔加于聚苯乙烯微孔板中, 放置、甩干;

b. 封闭: 按 150 μl /孔用含 0.1%~20.0% 惰性蛋白即蛋白胨, pH6.5~8.0 的磷酸盐缓冲液封闭、甩干;

c. 保护: 按 100 μl /孔用含 20% 蔗糖的 pH6.5~pH8.0 的磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时;

d. 干燥: 置干燥室干燥后, 装入含干燥剂的包装袋中保存;

2. 酶结合物制备: 经由酶标记、酶工作液配制过程

1) 酶标记

a. HRP 的活化: 用三蒸水配制 HRP ($\text{RZ} \geq 3.0$) 溶液, 加入过碘酸钠溶液, 2℃~8℃ 避光 1 小时; 加入聚乙二醇, 2℃~8℃ 反应 28~32 分钟; 加入 pH4.4 的醋酸盐缓冲液 2℃~8℃ 透析过夜, 换透析液两次;

b. 标记：将上述活化酶加抗体，加入纯化的兔抗牛 IgG 中，用 pH9.5 的碳酸盐缓冲液调节 pH 至 9.2，2℃~8℃反应 20 小时；

c. 还原：将硼氢化钠溶液加入前述反应混合物中，2℃~8℃反应 2 小时；结合物加入 pH6.0 的磷酸盐缓冲液 2℃~8℃透析过夜，换透析液两次，加对倍中性甘油后-20℃保存；

2) 酶工作液配制

a. 缓冲液配制：以三蒸水配 pH6.5~pH8.0 的磷酸盐缓冲液，内含 0.1%~5.0% 增敏剂聚乙二醇；0.1%~20.0%蛋白胨；0.5%酶保护剂；0.5%硫柳汞钠及以 1%吐温-20；

b. 以所配的缓冲液，按适当浓度稀释冻存的标记酶；

3. 其它试剂的配制

1) 洗涤液：本方法采用固体洗液，有商品洗液出售；

2) 样品稀释液：以三蒸水配内含 0.1%~20.0%蛋白胨的 pH7.4 磷酸盐缓冲液；

3) 显色剂 A：以三蒸水配 pH5.0 醋酸盐缓冲液，内含 0.5%过氧化脲；

4) 显色剂 B：用甲醇配 1.6%四甲基联苯胺，溶解后对倍加甘油；

5) 终止液：以三蒸水配 2M 硫酸溶液；

6) 阳性对照：取筛出的阳性血清 ($OD_{450nm} \geq 0.500$) 加少量红色染料并按 1000 单位/ml 加青霉素和链霉素，无菌过滤；

7) 阴性对照：取筛出的阴性血清 ($OD_{450nm} \leq 0.100$)，按 1000 单位/ml 加青霉素和链霉素，无菌过滤；

4. 检测

1) 将一包固体洗液加 500ml 蒸馏水溶解后即为洗涤液；

2) 取抗原预包被条，每孔各加 100 μ l 样品稀释液，再加 1~20 μ l 待测标本血清，同时设空白（只加 100 μ l 样品稀释液）、阴性对照（加 100 μ l，不加样品稀释液）、阳性对照（加 100 μ l，不加样品稀释液），37℃孵育 20~60 分钟后，甩干；

3) 用洗涤液洗涤 6 遍，甩干；

4) 加 1 滴前述的酶结合物工作液（空白不加），37℃孵育 20~60 分钟后，甩干；

- 5) 用洗涤液洗涤遍, 甩干;
- 6) 依次加 1 滴显色剂 A 和 1 滴显色剂 B, 37℃避光孵育 10 分钟;
- 7) 加 1 滴终止液, 酶标仪检测 OD_{450nm}。

其上所述的惰性蛋白即蛋白胨可以用酵母浸膏代替, 优选蛋白胨。

其上所述的预包被条制备 a. 包被过程是 2℃~8℃过夜后再 37℃放置 1~3 小时。

预包被条制备 b. 封闭中所述的缓冲液, 可选用四羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, 优选磷酸盐缓冲液。

其上所述的预包被条制备 c. 封闭采用的含 20%蔗糖的 pH6.5~pH8.0 缓冲液, 可选用四羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, 优选磷酸盐缓冲液。

其上所述的酶工作液配制 a 中配制所用的增敏剂为单体有 2 个或 2 个以上羟基的高分子物质可选用聚乙二醇、右旋糖苷、肝素、透明质酸、可溶性淀粉、糖原、菊糖、硫酸软骨素等, 优选聚乙二醇、右旋糖苷。

其上所述的酶工作液配制 b. 以所配的缓冲液, 一般按 1: 100~1: 50000 稀释冻存的标记酶, 即为酶工作液。

本发明的优越性在于:

1. 检测的是抗体, 适合特定目的特定需求;
2. 包被的是纯化的病毒抗原或基因重组抗原, 特异性高;
3. 由于增敏剂的使用, 灵敏度比较高, 提高了检出率, 降低了抗原和酶结合物的用量, 相应地也降低了成本;

4. 发明蛋白胨或酵母浸膏作为惰性蛋白, 有效提高了灵敏度, 同时本底没有明显增加;

5. 检测时间短, 一般 2 个小时内即可出结果;
6. 样品无需无菌化处理;
7. 操作简便易行, 可以标准化为产品;
8. 检测成本低廉, 适于推广;
9. 通过酶标仪判读, 减少主观性;
10. 可以用于流行病学调查;
11. 可以进行大批量检测, 可以做到每头牛检测。

本发明的特点:

1. 把间接 ELISA 法引进测定 BVDV 抗体。ELISA 法作为一种成熟检测技术有直接法、间接法、竞争法和夹心法等几种具体方法，从方法学来说，夹心法已成功用于检测 BVDV，间接法用于检测 BVDV 抗体本应不成问题，但由于灵敏度低的问题，样品值拉不开，以及直接包病毒造成的特异性、稳定性差，长期以来没有方便有效的方法检测 BVDV 抗体。本发明通过直接包纯化的病毒抗原或基因重组的抗原，以及增敏剂和惰性蛋白的使用，成功地建立了间接 ELISA 法测定 BVDV 抗体。

2. 发明蛋白胨和酵母浸膏作为惰性蛋白。蛋白胨和酵母浸膏增敏的机理尚不明了，但其增敏的效果是确切的，加过蛋白胨或酵母浸膏，阴阳性的区别更加明显，而本底基本不变或略有降低。

3. 发明了用单体有 2 个或 2 个以上羟基的高分子物质（如聚乙二醇、右旋糖苷、肝素、透明质酸、可溶性淀粉、糖原、菊糖、硫酸软骨素等）作为酶基质增敏剂，从而降低了酶标抗体用量。聚乙二醇由于具有沉淀蛋白的作用，有些人曾把它直接包在被子上，以加快抗原抗体反应速度，国外有些人曾把右旋糖苷用在样品稀释液中，以提高抗原抗体反应的灵敏度。研究发现，大多数单体有 2 个或 2 个以上羟基的高分子物质与酶标抗体（或抗原）非特异性多对一结合，这种多对一结合后的酶标抗体（或抗原）与包被抗原（或抗体）反应形成复合物，而这种复合物实际上形成一个包被抗原（或抗体）间接联系许多酶，因此大幅度提高了灵敏度。

本发明可以形成检测试剂盒，主要由 48~96 孔抗原预包被条、1 包固体洗液、1 瓶样品稀释液、1 瓶酶结合物工作液、1 瓶显色剂 A、1 瓶显色剂 B、1 瓶终止液、1 瓶阳性对照和 1 瓶阴性对照组成。

（五）具体实施方式

1. 抗原预包被条制备：经由包被、封闭、保护、干燥过程

a. 包被：用 50mM, pH9.6 的碳酸盐缓冲液，稀释病毒抗原或重组抗原（抗原包括 gp53 和 gp25）为 0.1~10.0 $\mu\text{g/ml}$ ，按 100 μl /孔加于聚苯乙烯微孔板中，2°C~8°C 过夜后再 37°C 放置 1~3 小时，甩干；

b. 封闭：按 150 μl /孔用含 0.1%~20.0% 惰性蛋白的 pH6.5~8.0 的磷酸盐缓冲液或四羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液，惰性蛋白采用蛋白胨或酵母浸膏，37°C 封

闭1小时，甩干；

c. 保护：按100 μ l/孔用含20%蔗糖的pH6.5~pH8.0的磷酸盐缓冲液或四羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液室温保护3小时；

d. 干燥：置干燥室干燥后，按48~96孔/包装入含干燥剂的包装袋中保存；

2. 酶结合物制备：经由酶标记、酶工作液配制过程

1) 酶标记

a. HRP的活化：用三蒸水配制4mg/mlHRP ($RZ \geq 3.0$) 溶液，按每mg酶加51 μ l 0.1M过碘酸钠溶液，2℃~8℃避光1小时；按每mg酶加26 μ l 乙二醇，2℃~8℃反应30分钟；加入1mM pH4.4的醋酸盐缓冲液2℃~8℃透析过夜，换透析液两次；

b. 标记：将上述活化酶按每mg酶加1.5mg抗体，加入纯化的兔抗牛IgG中，用10mM pH9.5的碳酸盐缓冲液调节pH至9.2，2℃~8℃反应20小时；

c. 还原：将0.1M硼氢化钠溶液按每mg酶加47 μ l加入前述反应混合物中，2℃~8℃反应2小时；结合物加入pH6.0的磷酸盐缓冲液2℃~8℃透析过夜，换透析液两次，加对倍中性甘油后-20℃保存；

2) 酶工作液配制

a. 缓冲液配制：以三蒸水配pH6.5~pH8.0的磷酸盐缓冲液或四羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液，内含0.1%~5.0%增敏剂，增敏剂为单体有2个以上羟基的高分子物质如聚乙二醇、右旋糖苷；0.1%~20.0%惰性蛋白，惰性蛋白采用蛋白胨或酵母浸膏；0.5%酶保护剂；0.5%硫柳汞钠及以1%吐温-20；

b. 以所配的缓冲液，按适当浓度稀释冻存的标记酶；

3. 其它试剂的配制

1) 洗涤液：本方法采用固体洗液，有商品洗液出售；

2) 样品稀释液：以三蒸水配内含0.1%~20.0%惰性蛋白的pH7.4磷酸盐缓冲液，惰性蛋白采用蛋白胨或酵母浸膏；

3) 显色剂A：以三蒸水配pH5.0醋酸盐缓冲液，内含0.5%过氧化脲；

4) 显色剂B：用甲醇配1.6%四甲基联苯胺，溶解后对倍加甘油；

5) 终止液：以三蒸水配2M硫酸溶液；

6) 阳性对照：取筛出的阳性血清 ($OD_{450nm} \geq 0.500$) 加少量红色染料并按1000单位/ml加青霉素和链霉素，无菌过滤；

7) 阴性对照: 取筛出的阴性血清 ($OD_{450nm} \leq 0.100$), 按 1000 单位/ml 加青霉素和链霉素, 无菌过滤;

4. 组装

按每盒 1 包 48~96 孔/包的抗原预包被条、1 包固体洗液、1 瓶样品稀释液、1 瓶酶结合物工作液、1 瓶显色剂 A、1 瓶显色剂 B、1 瓶终止液、1 瓶阳性对照、1 瓶阴性对照和 1 份使用说明书组装。

5. 检测

1) 将一包固体洗液加 500ml 蒸馏水溶解后即为洗涤液;

2) 取抗原预包被条, 每孔各加 $100 \mu l$ 样品稀释液, 再加 $1-20 \mu l$ 待测标本血清, 同时设空白 (只加 $100 \mu l$ 样品稀释液)、阴性对照 (加 $100 \mu l$, 不加样品稀释液)、阳性对照 (加 $100 \mu l$, 不加样品稀释液), $37^{\circ}C$ 孵育 20~60 分钟后, 甩干;

3) 用洗涤液洗涤 6 遍, 甩干;

4) 加 1 滴前述的酶结合物工作液 (空白不加), $37^{\circ}C$ 孵育 20~60 分钟后, 甩干;

5) 用洗涤液洗涤 6 遍, 甩干;

6) 依次加 1 滴显色剂 A 和 1 滴显色剂 B, $37^{\circ}C$ 避光孵育 10 分钟;

7) 加 1 滴终止液, 酶标仪检测 OD_{450nm} 。

专利名称(译)	牛病毒性腹泻病毒抗体间接ELISA检测方法		
公开(公告)号	CN1460857A	公开(公告)日	2003-12-10
申请号	CN03126199.X	申请日	2003-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	陈睿锋		
申请(专利权)人(译)	陈睿锋		
当前申请(专利权)人(译)	陈睿锋		
[标]发明人	张钦献 王则宇 陈睿锋		
发明人	张钦献 王则宇 陈睿锋		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/563 G01N33/569		
代理人(译)	刘卫东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种牛病毒性腹泻病毒抗体间接ELISA检测方法，主要经由抗原预包被条制备、酶结合物制备、其它试剂的配制、检测。利用辣根过氧化物酶标记兔抗牛IgG以检测已与固相牛病毒性腹泻病毒抗原结合的受检牛病毒性腹泻病毒抗体。其检测方法特异性高，操作方便，通过可增敏的惰性蛋白和酶结合物增敏剂的使用，大幅度提高了灵敏度和检出率，降低了抗原和酶结合物的用量，相应地也降低了成本，检测时间短，2小时内即可完成检测操作。其方法操作简便易行，可以标准化为产品，可以用于大批量检测，做到每头牛检测，也可以用于流行病学调查和主动免疫效果检测，以及辅助检测牛病毒性腹泻病毒。