



猪瘟病毒双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法的建立与应用

谢亚格, 罗俊聪, 石正旺, 廖焕程, 陈 捷, 朱昱茜, 王 琳, 杨倩倩, 武嘉惠,
茹 毅, 田 宏*, 何继军*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 兰州 730000)

摘 要: 旨在建立检测猪瘟病毒 E2 蛋白抗体的双抗原夹心 ELISA 方法。利用 BioEdit 软件对比猪瘟病毒与牛病毒性腹泻病毒 E2 蛋白完整序列, 筛选猪瘟病毒 E2 蛋白特异性序列, 构建 pCDNA3.1-2×rE2-His 重组表达载体, 通过 CHO 细胞表达 2×rE2-His 蛋白, 采用凝血酶切除蛋白 His 标签, 将切除 His 标签的 2×rE2 蛋白作为包被抗原, 辣根过氧化物酶标记的 2×rE2-His 蛋白作为检测抗原, 经过一系列的反应条件优化, 建立了双抗原夹心 ELISA 方法, 对其特异性、敏感性、重复性进行评估, 并比较与商品化试剂盒的符合率。结果表明, 该方法的抗原包被浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 血清稀释度为 1:4, 酶标抗原稀释度为 1:40 000; 该方法与其他常见猪病(塞内卡病毒、猪伪狂犬病病毒、猪流行性腹泻病毒、口蹄疫病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒)阳性血清无交叉反应、与血清学检测中易发生交叉反应的牛病毒性腹泻病毒阳性血清不反应, 具有良好的特异性; 可检测抗体阳性血清的最大稀释比例达 1:2 048; 批内、批间变异系数均小于 10%, 具有良好的重复性; 与 IDEXX 猪瘟抗体检测试剂盒的检测结果符合率为 97.1%。本研究建立的双抗原夹心 ELISA 检测方法和 IDEXX 猪瘟抗体检测试剂盒同时评价猪瘟活疫苗(C 株)联合 E2 亚单位疫苗免疫的 2 只健康猪抗体消长规律, 本方法可提前 6 d 检出抗体应答, 两种方法均显示抗体水平在免疫后 37 d 达到高峰, 随后趋于稳定。本研究建立的猪瘟病毒双抗原夹心 ELISA 抗体检测方法特异性强、敏感性高、重复性好, 适用于猪瘟的临床诊断与免疫效果评估。

关键词: 猪瘟病毒; E2 蛋白; ELISA

中图分类号: S852.651

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1571-10

Establishment and Application of a Double Antigen Sandwich ELISA Method for Swine Fever Virus

XIE Yage, LUO Juncong, SHI Zhengwang, LIAO Huancheng, CHEN Jie, ZHU Yuqian,
WANG Lin, YANG Qianqian, WU Jiahui, RU Yi, TIAN Hong*, HE Jijun*

(State Key Laboratory of Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine,
Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences,
Lanzhou 730000, China)

Abstract: Establishment of a double-antigen sandwich ELISA for the detection of antibodies against

收稿日期: 2025-07-18

基金项目: 甘肃省科技重大专项(23ZDNA007; 22ZD6NA001); 2022 甘肃省创新联合体-家畜重要疫病诊断研制与产业化(22ZD6NA012); 国家生猪技术创新中心(NCTIP-XD/C03); 中国农业科学院创新计划(CAAS-CSL.PDCP-202302); the STI 2030-Major Projects (2023ZD0404301)

作者简介: 谢亚格, 硕士, 主要从事动物疫病诊断技术研究, E-mail: 2139046402@qq.com

* 通信作者: 田 宏, 主要从事动物病毒分子生物学及疫病诊断技术研究, E-mail: tianhong@caas.cn; 何继军, 主要从事动物传染病病原学与流行病学研究, E-mail: hejijun@caas.cn

classical swine fever virus (CSFV) E2 protein. The complete E2 protein sequences of CSFV and bovine viral diarrhea virus (BVDV) were aligned using BioEdit software to identify CSFV-specific epitopes. A recombinant pCDNA3.1-2×rE2-His expression vector was constructed. The 2×rE2-His protein was expressed in CHO cells, followed by thrombin cleavage to remove the His-tag. The purified His-tag-free 2×rE2 protein was used as the coating antigen, while horseradish peroxidase (HRP)-labeled 2×rE2-His protein served as the detection antigen. After systematic optimization of reaction conditions, a double-antigen sandwich ELISA method was successfully established. The specificity, sensitivity, and repeatability of the assay were evaluated, and its concordance rate with a commercial ELISA kit was compared. The optimized assay conditions were as follows: antigen coating concentration at $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, serum dilution at 1:4, and enzyme-labeled antigen dilution at 1:40 000. The method exhibited no cross-reactivity with positive sera against other common swine pathogens, including senecavirus A (SVA), porcine pseudorabies virus (PRV), porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), foot-and-mouth disease virus (FMDV), and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), nor with BVDV sera, which frequently causes serological cross-reactivity, demonstrating high specificity. The maximum detectable dilution ratio for antibody-positive sera reached 1:2 048. Both intra-assay and inter-assay coefficients of variation were below 10%, indicating excellent repeatability. The concordance rate with the IDEXX CSFV Antibody Test Kit was 97.1%. To further evaluate the assay, both the established double-antigen sandwich ELISA and the IDEXX kit were used to monitor antibody kinetics in two healthy pigs immunized with CSFV C-strain vaccine combined with an E2 subunit vaccine. The developed ELISA detected antibody responses 6 days earlier than the IDEXX kit. Both methods demonstrated that antibody levels peaked at 37 days post-immunization and subsequently stabilized. In this study, a double-antigen sandwich ELISA antibody detection method for CSFV was established with high specificity, sensitivity and reproducibility, which is suitable for the clinical diagnosis and evaluation of immunization effect of swine fever.

Keywords: classical swine fever virus; E2 protein; ELISA

* **Corresponding authors:** TIAN Hong, E-mail: tianhong@caas.cn; HE Jijun, E-mail: hejijun@caas.cn

猪瘟(classical swine fever, CSF)是一种由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的具有高度传染性和致病性疾病,可感染不同品种、年龄和性别的猪^[1]。感染猪表现多种临床症状,包括发热、食欲不振、虚弱、皮下出血和结膜炎等。目前除了美国、澳大利亚和北欧部分地区(丹麦和瑞典等)已经成功根除猪瘟外,其他大部分国家和地区通过持续的防控措施,使得猪瘟疫情得到了较好的控制,但仍有部分地区存在猪瘟疫情散发情况^[2-3]。

我国主要通过接种兔化猪瘟弱毒疫苗的方式来防控猪瘟,实现了疫情从暴发式流行到零星散发的转变。然而,疫苗在保存运输中具有失效风险,且猪个体差异可能导致免疫应答不足,因此疫苗免

疫后抗体水平的监测对于该病的防控至关重要^[4]。基于抗体检测结果及时补免猪并优化防控策略对于保障养猪业安全生产具有重要意义。

猪瘟抗体检测方面,世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOAH)主要推荐病毒中和试验以及ELISA^[5]。中和试验通常被视为抗体检测的金标准,但因其操作流程繁琐、检测周期长、需要活病毒、对实验环境及操作人员要求高、且无法高通量检测,难以在基层广泛应用^[6]。相比之下,ELISA方法因其操作简便、检测速度快、高通量等优点广泛应用于抗体检测,更适合在基层推广应用。目前WOAH推荐以及市售的CSFV ELISA抗体检测方法主要是阻断ELISA。但是阻断

ELISA 通常仅针对某一免疫球蛋白(如 IgG)进行检测,可能导致因抗体类型覆盖不全而漏检其他免疫球蛋白(如 IgM 等),不完全适用于抗体的动态监测和免疫效果评价^[7-8],同时在单抗识别表位的限制下,检测敏感性也受到影响。因此,需要建立一种特异性强、灵敏度高的 ELISA 抗体检测方法。

在众多 ELISA 抗体检测方法中,双抗原夹心 ELISA 凭借其广谱性、高灵敏度、跨物种通用性等优点成为多种病原体血清学诊断的重要方法,广泛应用于新型冠状病毒^[9](SARS-CoV-2)、非洲猪瘟病毒^[10](African swine fever virus, ASFV)及塞内卡病毒^[11](Senecavirus A, SVA)等重要疫病的抗体检测。在众多 CSFV 蛋白中,囊膜糖蛋白 E2 因其良好的免疫原性和可诱导机体产生中和抗体的能力成为首选靶标^[12-14]。E2 蛋白上存在特异性抗原表位,可用于区分 CSFV 和牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV),从而减少血清学检测中的交叉反应^[15]。且 E2 蛋白包含多个糖基化修饰位点^[16],有研究表明特定糖基化位点变化对其免疫原性影响较大^[17-18]。而真核表达系统能够高效表达外源蛋白,并且可对表达的蛋白进行翻译后修饰,如糖基化、磷酸化等,使得表达蛋白在结构功能、抗原性和免疫原性上与天然蛋白相似^[19]。

因此,本研究利用 CHO 细胞表达系统成功获得最接近天然蛋白糖基化修饰的 CSFV 2×rE2-His 蛋白,并基于 2×rE2-His 蛋白建立了检测 CSFV 抗体的双抗原夹心 ELISA 方法,能够检测不同感染阶段产生的各种免疫球蛋白(包括 IgM、IgG、IgA 等)^[11,20],实现对猪瘟感染的早期、中期和晚期诊断以及疫苗免疫后抗体水平监测,为临床 CSFV 抗体的检测提供了新型检测方法。

1 材料与方法

1.1 血清样本

CSFV 阴性血清和阳性血清、BVDV、SVA、伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)、猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、A 型口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)阳性血清来自中国农业科学院兰州兽医研究所;208 份临床血清(采自甘肃康乐某养猪场)来自中国农业科学院兰州兽医研究所临床服务中心;5 份中

和效价为 1:512、1:128、1:32、1:16、1:10 的 CSFV 阳性血清保存于本实验室。

1.2 主要试剂

CSFV 2×rE2-His 蛋白由 CHO 细胞表达并保存于本实验室;ELISA 板购自 Costar 公司;抗体稀释液购自百迪泰公司;TMB 购自 SurModics 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;凝血酶购自索莱宝;猪瘟病毒抗体检测试剂盒购自 IDEXX 公司;Goat Anti-Pig IgG H&L (HRP)购自 Abcam 公司;His 标签单克隆抗体购自苏州博奥龙科技有限公司;HRP 标记试剂盒购自 Roche 公司。

1.3 CSFV E2 与 BVDV E2 蛋白序列比对

通过 NCBI 数据库检索并获取 5 株 BVDV 代表毒株(包括 BVDV-1 型和 BVDV-2 型)以及涵盖 3 个基因型的 CSFV 代表毒株的 E2 蛋白完整序列,使用 BioEdit 软件进行多序列比对,筛选在 CSFV 内部高度保守且与 BVDV 同源性较低的序列区域。为进一步增强抗原与抗体结合的效率 and 灵敏度,将三段经筛选的 CSFV E2 特异性序列(共 164 个氨基酸)通过柔性氨基酸串联为双拷贝单元,并在 N 端添加信号肽、C 端插入 His 标签,构建重组表达载体 pCDNA3.1-2×rE2-His。

1.4 CSFV E2 蛋白鉴定

通过 BCA 蛋白定量试剂盒对 CSFV 2×rE2-His 蛋白进行定量,随后进行 SDS-PAGE 鉴定。同时通过 Western blot 对 2×rE2-His 蛋白与 CSFV 阳性血清、阴性血清的反应性进行鉴定:分别以 CSFV 阳性血清(1:500)和 CSFV 阴性血清(1:500)为一抗,以 HRP 标记的山羊抗猪 IgG(1:30 000)为二抗鉴定蛋白反应性。

1.5 E2 蛋白 His 标签的切除

将纯化的 1 mg 2×rE2-His 蛋白与 3 μL 凝血酶于室温过夜孵育,随后通过 Ni-NTA 亲和层析柱分离酶切产物。为评估酶切效果及 His 标签去除对蛋白反应性的影响,分别将 2×rE2-His(酶切前)与 2×rE2(酶切后)蛋白包被于 ELISA 板,通过 His 单抗检测酶切效率,并利用 CSFV 阴、阳性血清评估蛋白反应性。

1.6 酶标抗原的制备

将 2×rE2-His 蛋白按照 HRP 标记试剂盒说明书进行标记,获得酶标抗原,-40℃储存备用。

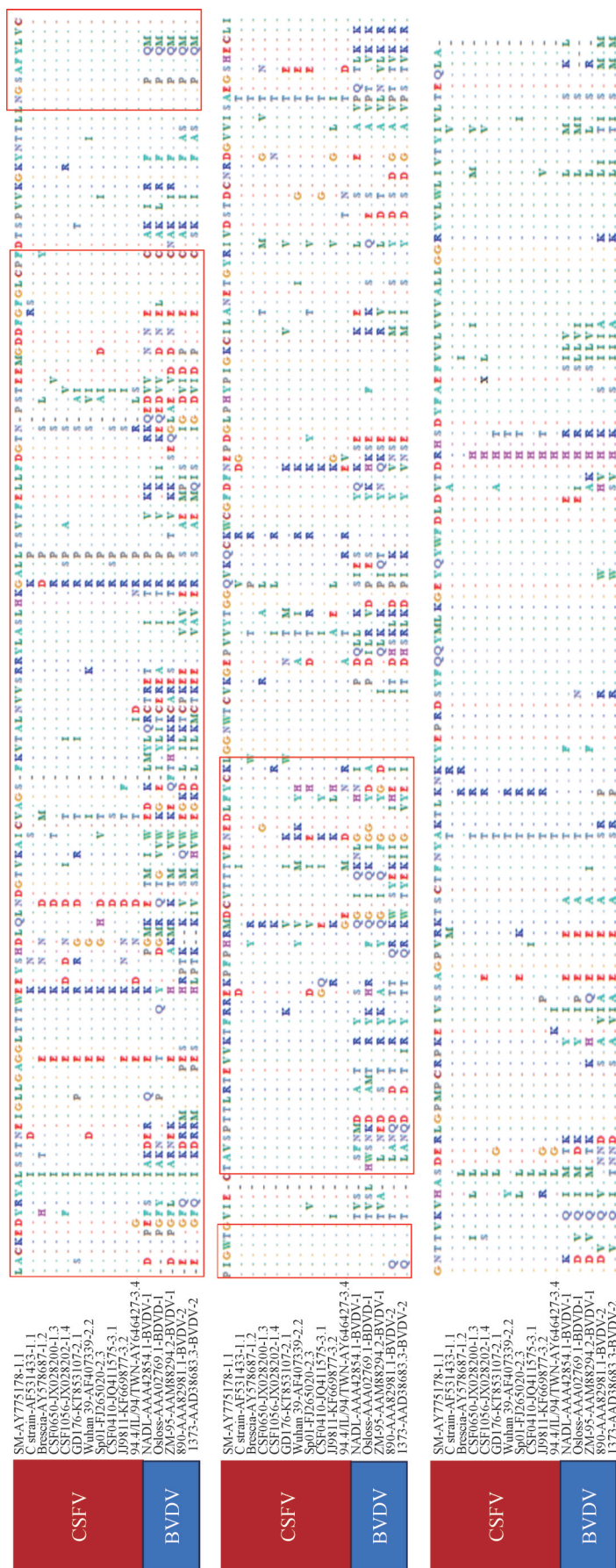


图1 CSFV 与 BVDV E2 蛋白序列对比

Fig. 1 Comparison of CSFV and BVDV E2 protein sequences

1.7 双抗原夹心 ELISA 检测方法的建立

1.7.1 E2 蛋白最佳包被浓度及血清稀释度 采用棋盘滴定法确定抗原的最佳包被浓度和血清最佳稀释度。用包被缓冲液以 $100\ \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$ 将 $2\times\text{rE2}$ 蛋白分别稀释为 100、50、25 和 $12.5\ \text{ng}\cdot\text{孔}^{-1}$, 包被 ELISA 板, $2\sim 8\ ^\circ\text{C}$ 包被 10 h, 用 PBST 洗涤 4 次, 拍干。加入封闭液 $120\ \mu\text{L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 温箱封闭酶标板 2 h; 弃掉封闭液, 吹干。将阳性对照血清(P)和阴性对照血清(N)进行 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128 和 1:256 稀释, 按照棋盘滴定的模式加入到酶标反应板中, $50\ \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 作用 30 min。PBST 洗涤 4 次并拍干, 将酶标抗原稀释至 1:40 000, $50\ \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 30 min。PBST 洗涤 4 次并拍干, 加入 TMB, $50\ \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 避光显色 12 min 后, 加终止液, 在酶标仪上读取 $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 值。以 P/N 值最大的原则确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度。

1.7.2 酶标抗原最佳稀释度的确定 以“1.7.1”中确定的最佳条件为基础, 将标记好的 HRP- $2\times\text{rE2}$ -His 用抗体稀释液稀释成 1:10 000、1:20 000、1:40 000、1:80 000 四个梯度, 以 P/N 值最大的原则确定最佳酶标抗原稀释度。

1.7.3 最佳反应时间的确定 在上述最佳反应条件下, 逐步优化双抗原夹心 ELISA 的反应时间, 包括待检样品孵育时间(15、30、45、60 min)、酶标抗原孵育时间(15、30、45、60 min)和底物显色时间(5、12、15、20 min), 根据检测结果的 $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 值, 计算 P/N 值, 以 P/N 值最大时对应的时间为最佳反应时间。

1.7.4 临界值的确定 用优化好的双抗原夹心 ELISA 方法检测 103 份血清样本, 其中 60 份 CSFV 阴性血清, 43 份 CSFV 阳性血清。计算每份样品 S/N 值, 绘制 ROC 曲线, 并以 Youden 指数[Youden 指数=敏感性-(1-特异性)]最大时对应的 S/N 值为临界值(cut-off 值)。

1.7.5 特异性试验 用已建立的双抗原夹心 ELISA 方法对以下血清样本进行检测: CSFV 阴、阳性对照血清; 与 CSFV 存在交叉反应的 BVDV 阳性血清; 与 CSFV 临床症状相似的常见猪病阳性血清(FMDV、PRRSV、PRV、PEDV、SVA)。每份样品设置 3 个重复, 评价本方法的特异性。

1.7.6 敏感性试验 将 CSFV 阴、阳性血清按 IDEXX 猪瘟疫抗体检测试剂盒(1:2)和本研究建立的

双抗原夹心 ELISA(1:4)进行初始稀释, 随后对初始稀释后的样本从 1:2 连续两倍倍比稀释, 将每一份稀释后的样品作为待检样品, 采用两种方法检测上述样品, 所有样品均设置 3 个重复; 同时用两种方法对不同中和效价的 CSFV 阳性血清进行检测, 综合分析比较两种方法敏感性差异。

1.7.7 重复性试验 选取经 IDEXX 猪瘟疫抗体检测试剂盒确认的田间血清样本进行本试剂盒重复性试验, 选取强阳性血清(阻断率 $>80\%$, $n=1$)、中阳性血清(阻断率 $60\%\sim 80\%$, $n=3$)、弱阳性血清(阻断率 $40\%\sim 60\%$, $n=3$)以及阴性血清(阻断率 $<30\%$, $n=3$)。批内重复: 用同一批次试剂盒检测上述 10 份血清样本, 每份样本设置 3 个重复孔, 根据测定的 $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 值, 计算批内变异系数。批间重复: 用 3 个批次试剂盒检测上述 10 份血清样本, 每份样本设置 3 个重复孔, 根据测定的 $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 值, 计算批间变异系数。综合分析本方法的重复性。

1.7.8 符合率 以本研究中建立的 ELISA 检测方法 IDEXX 猪瘟疫抗体检测试剂盒分别对 208 份临床样本进行检测, 评估这两种方法的符合率。

1.8 抗体消长规律测定

选取 4 头健康试验猪, 将其分为两组(试验组和对照组), 试验组首免猪瘟疫活疫苗, 首免 16 d 后试验组用 E2 亚单位疫苗加强免疫 1 次, 对照组同步注射等量 PBS 缓冲液。在首次免疫后 0、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、32、37、42 和 47 d 采集两组血清样本, 采用本方法和 IDEXX 猪瘟疫抗体检测试剂盒检测抗体水平, 分析不同免疫时期的抗体水平和抗体消长规律。

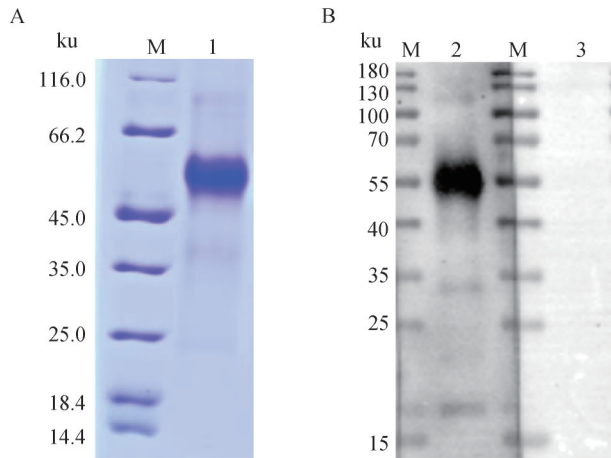
2 结 果

2.1 CSFV E2 蛋白的鉴定

通过 BCA 蛋白定量试剂盒测得的 $2\times\text{rE2}$ -His 蛋白浓度为 $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。对 $2\times\text{rE2}$ -His 蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定, SDS-PAGE 结果表明目的蛋白与预期大小一致且纯度较高(图 2A)。Western blot 结果表明 $2\times\text{rE2}$ -His 蛋白与 CSFV 阳性血清能发生特异性反应(图 2B)。

2.2 CSFV E2 蛋白 His 标签的切除

通过 ELISA 对 His 标签酶切效果验证, 结果表明, His 标签成功切除并且 $2\times\text{rE2}$ 蛋白仍具有良好反应性(图 3), 因此选择酶切后无 His 标签的 $2\times\text{rE2}$ 蛋白作为后续的包被蛋白。



M. 蛋白质分子质量标准;1. 2×rE2-His 蛋白;2. 2×rE2-His 蛋白与 CSFV 抗体阳性血清反应原性鉴定;3. 2×rE2-His 蛋白与 CSFV 抗体阴性血清反应原性鉴定

M. Protein marker; 1. 2×rE2-His protein; 2. Identification of the reactivity of 2×rE2-His protein and CSFV antibody-positive serum; 3. Identification of the reactivity of 2×rE2-His protein and CSFV antibody-negative serum

图2 CSFV 2×rE2-His 蛋白 SDS-PAGE 分析(A)及 2×rE2-His 蛋白的 Western blot 鉴定(B)

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of CSFV 2×rE2-His protein (A) and Western blot identification of 2×rE2-His protein (B)

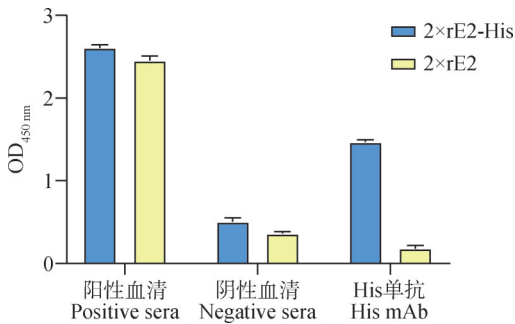


图3 酶切后蛋白反应性鉴定

Fig. 3 Characterization of protein reactivity after digestion

2.3 双抗原夹心 ELISA 方法的建立及优化

通过棋盘滴定试验,确定双抗原夹心 ELISA 最

佳蛋白包被浓度为 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,血清稀释度为 1:4,酶标抗原稀释度为 1:40 000,样品及酶标抗原最佳孵育时间均为 37℃孵育 30 min,底物溶液最佳显色时间为 37℃避光显色 12 min(表 1)。

2.4 临界值的确定

用优化好的双抗原夹心 ELISA 方法检测 43 份阳性血清和 60 份阴性血清,计算 S/N 值并绘制成 ROC 曲线(图 4A),结果表明,当 S/N 值为 2.097 时,Youden 指数最高为 97.67%,此时灵敏度为 97.67%,特异性为 100%,因此,将该方法的临界值定为 2.1。散点图(图 4B)分布显示了临界值及样本的分布情况。

表1 ELISA 最佳反应条件的确定

Table 1 Determination of optimal reaction conditions for ELISA

反应条件 Reaction condition	包被抗原 Encapsulated antigen	待检样品 Sample	酶标抗原 Enzyme-labeled antigen	底物 Substrate
最佳稀释比例 Optimal dilution ratio	$0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1:4	1:40 000	50 μL
最佳反应条件 Optimal reaction conditions	4℃ 10 h	37℃ 30 min	37℃ 30 min	37℃ 12 min

2.5 特异性试验

按照本研究中建立的双抗原夹心 ELISA 方法分别检测 PRRSV、PEDV、PRV、SVA、FMDV、BVDV、CSFV 阳性血清及 CSFV 阴性血清,结果表明,CSFV 阳性血清 S/N 值 ≥ 2.1 ,CSFV 阴性血清

及其他常见病阳性血清 S/N 值 < 2.1 (图 5),表明所建立的 ELISA 方法具有良好的特异性。

2.6 敏感性试验

通过本研究建立的 ELISA 检测方法和 IDEXX 猪瘟抗体检测试剂盒对倍比稀释的血清进行检测,

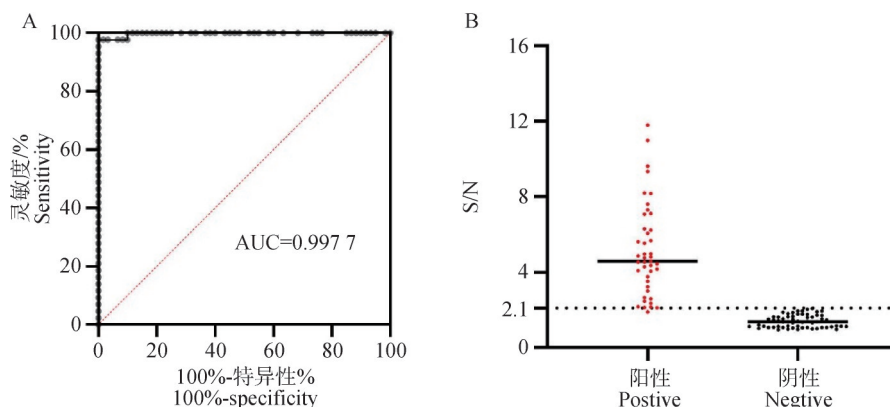


图4 临界值的确定

Fig. 4 Determination of critical values

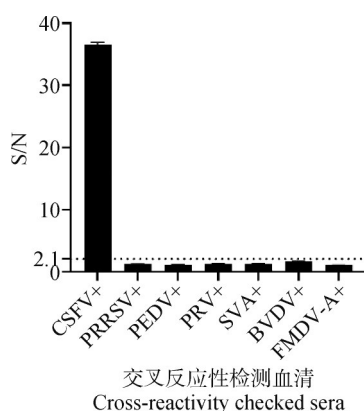


图5 ELISA 特异性试验

Fig. 5 ELISA specificity test

结果表明(图6):本研究建立的ELISA最低检出样品稀释度为1:2 048, IDEXX猪瘟疫抗体检测试剂盒最低检出样品稀释度为1:64。如表2所示,针对不同中和效价的CSFV阳性血清,本研究建立的

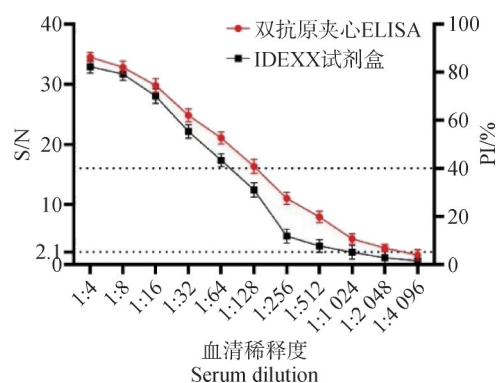


图6 ELISA与IDEXX试剂盒敏感性试验

Fig. 6 ELISA with IDEXX kit sensitivity test

ELISA可检出中和效价为1:10的CSFV阳性血清,而IDEXX猪瘟疫抗体检测试剂盒可检出中和效价为1:16的CSFV阳性血清。综上所述,本研究建立的ELISA检测方法具有良好的敏感性。

表2 CSFV抗体检测方法敏感性比较

Table 2 Comparison of sensitivity in CSFV antibody detection methods

检测方法 Detection method	中和效价 Neutralization titer				
	1:512	1:128	1:32	1:16	1:10
双抗原夹心ELISA Double-antigen sandwich ELISA	+	+	+	+	+
IDEXX猪瘟疫抗体检测试剂盒 The IDEXX CSFV antibody test kit	+	+	+	+	-

2.7 重复性试验

通过本试剂盒检测1份强阳性血清、3份中性血清、3份弱阳性血清和3份阴性血清,进行批内和批间试验,结果显示,批内变异系数为1.39%~4.03%,批间变异系数为2.32%~6.95%,批内、批间变异系数均小于10%(表3),表明该方法具有良好的重复性。

2.8 符合率

通过本研究建立的ELISA检测方法 with IDEXX猪瘟疫抗体检测试剂盒分别对208份临床样本进行检测,阳性血清符合率为95.5%,阴性血清符合率为97.9%,总符合率为97.1%(表4),表明两种检测方法符合率较高。

表 3 ELISA 重复性检测结果

Table 3 ELISA repeatability test results

血清 Serum	批内重复性 Intra batch repeatability		批间重复性 Inter batch repeatability	
	平均数 $\bar{x}$	变异系数/% CV	平均数 $\bar{x}$	变异系数/% CV
阳性血清($n=7$) Positive samples	2.87	2.88	2.86	2.39
	1.88	4.03	1.91	3.48
	1.08	2.72	1.07	3.15
	0.43	3.63	0.45	2.42
	0.41	2.93	0.39	5.58
	0.34	1.39	0.31	4.97
	0.23	3.58	0.22	4.73
阴性血清($n=3$) Negative samples	0.071	1.72	0.07	2.32
	0.103	3.43	0.11	6.95
	0.12	3.58	0.12	4.93

表 4 ELISA 与 IDEXX 试剂盒比对结果

Table 4 Comparative results of ELISA and IDEXX kits

方法 Method		双抗原夹心 ELISA Double-antigen sandwich ELISA		总计 Total
		阳性 Positive	阴性 Negative	
IDEXX 猪瘟抗体检测试剂盒 The IDEXX CSFV antibody test kit	阳性 Positive	64	3	67
	阴性 Negative	3	138	141
总计 Total		67	141	208

2.9 抗体消长规律测定

通过比较双抗原夹心 ELISA 与 IDEXX 猪瘟抗体检测试剂盒的检测结果表明(图 7):在检测灵敏度方面,双抗原夹心 ELISA 方法与 IDEXX 试剂盒相比可提前至少 6 d 检出抗体应答,试验组的抗体

转阳时间为免疫后 11 d;在抗体动态特征方面,两种方法均显示试验组抗体水平在 37 d 达到峰值;在抗体持久性方面,双抗原 ELISA 检测显示试验组的抗体维持时间大于 47 d,与 IDEXX 试剂盒的检测趋势一致。

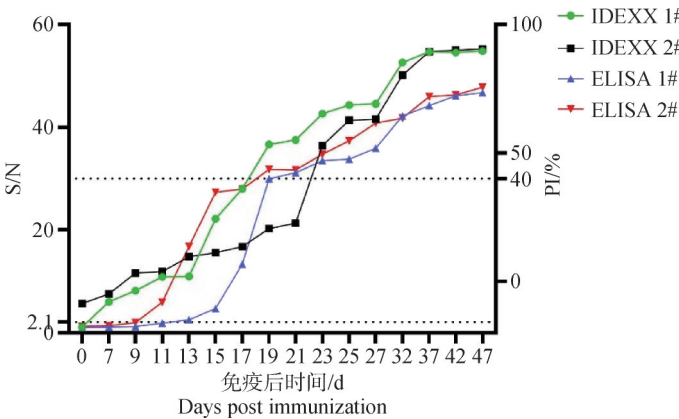


图 7 抗体消长规律检测

Fig. 7 Detection of antibody patterns

3 讨 论

CSF 是危害我国养猪业的重大动物疫病,不仅会导致生猪大规模发病死亡,还会对养殖业经济效益和公共卫生安全构成严重威胁。我国主要采用兔化猪瘟弱毒疫苗进行免疫防控,通过对疫苗免疫后抗体水平的评估与动态监测进一步优化防控策略,有效抑制了疫情的大规模流行^[21]。

在众多抗体评价方法中,双抗原夹心 ELISA 具有操作简便、检测谱广、敏感性高、特异性强等优点。但由于 CSFV 与 BVDV 具有较高的序列同源性,可在检测中产生交叉反应,影响诊断准确性。因此,为避免检测过程中产生的交叉反应,本研究通过生物信息学分析比较 CSFV 与 BVDV E2 蛋白的氨基酸序列,发现 N 端抗原表位区的同源性较低。基于 Ji 等^[22]的研究策略,选取 CSFV E2 蛋白的特异性区域进行双拷贝串联设计,构建了重组表达载体 pCDNA3.1-2×rE2-His,通过引入信号肽和优化 CHO 细胞表达条件,实现了 2×rE2-His 蛋白的高效可溶性表达。SDS-PAGE 与 Western blot 结果表明,2×rE2-His 蛋白相对分子质量约为 55 ku,与预期大小一致,且能够与 CSFV 阳性血清特异性反应;ELISA 结果表明与 BVDV 阳性血清无交叉反应,蛋白特异性良好。由于亚单位疫苗在当前应用中较为广泛,而这类疫苗相关蛋白常带有 His 标签,可能会在 ELISA 检测中发生非特异性结合,导致背景升高或假阳性结果,因此本研究利用凝血酶切除蛋白 His 标签,获得反应性良好的 2×rE2 蛋白。

本研究基于 2×rE2 蛋白(捕获抗原)与 HRP-2×rE2-His(检测抗原)成功建立了双抗原夹心 ELISA 方法,该方法可识别抗体的抗原结合位点(Fab 段),不受抗体类别限制,可检测 IgM、IgG 和 IgA 等多种免疫球蛋白,适用于猪瘟感染的早、中、晚期诊断,同时与阻断 ELISA 相比,该方法不依赖于单克隆抗体对单一表位的识别,从而显著提高了检测灵敏度。本研究建立的双抗原夹心 ELISA 方法检测灵敏度可达 1:2 048,显著高于 IDEXX 猪瘟抗体检测试剂盒(1:64),且本研究建立的 ELISA 用时相较于 IDEXX 猪瘟抗体检测试剂盒更短,仅需 72 min。特异性试验中,该方法与 PRRSV、PRV、PEDV 等常见猪病抗体无交叉反应,与 Gopinath 等^[23]、Wang 等^[24]基于 E2 蛋白建立的抗体检测方法特异性相当,确保了检测结果的准确性。批内与批

间变异系数均小于 10%,表明该方法重复性良好。本方法与 IDEXX 试剂盒符合率可达 97.1%,准确性好,可以应用于 CSF 临床诊断。

4 结 论

本研究成功建立了检测猪瘟疫病毒的双抗原夹心 ELISA 检测方法,该方法具有良好的特异性、敏感性和重复性,可为临床 CSFV 诊断和疫苗免疫效果评估提供技术支持。

参考文献(References):

- [1] XU H, HAN G, LU Y, et al. Broad neutralization of CSFV with novel monoclonal antibodies *in vivo* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 173: 513-523.
- [2] 渠雄周. 猪瘟病毒危害和流行情况及新型疫苗的研究现状[J]. 河北农业, 2025(4): 116-117.
QU X Z. Hazards and epidemiology of swine fever virus and the current status of research on new vaccines [J]. *Hebei Agriculture*, 2025(4): 116-117. (in Chinese)
- [3] MAHADEVASWAMY R, MURUGANANTHAM V, RAMESH V, et al. Global population dynamics and evolutionary selection in classical swine fever virus complete genomes: insights from Bayesian coalescent analysis[J]. *Virus Gen*, 2025, 61(4): 1-10.
- [4] 蔺 露, 董春霞, 孙 燕, 等. 采用不同 ELISA 试剂盒对猪瘟抗体水平调查结果的影响[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2015, 31(1): 45-46.
QU L, DONG C X, SUN Y, et al. Effect of using different ELISA kits on the results of the investigation of swine fever antibody levels[J]. *Chinese Abstracts of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, 31(1): 45-46. (in Chinese).
- [5] 世界动物卫生组织. OIE 陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)[M]. 8 版. 北京: 中国农业出版社, 2021.
World Organization for Animal Health. OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) [M]. 8 edition. Beijing: China Agricultural Press, 2021. (in Chinese).
- [6] 潘小慧. 基于 E2 蛋白 A-D 抗原区检测猪瘟抗体间接 ELISA 方法的建立与应用[J]. 福建畜牧兽医, 2024, 46(3): 8-11.
PAN X H. Establishment and application of an indirect ELISA method for swine fever antibodies based on the A-D antigen region of E2 protein[J]. *Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2024, 46(3): 8-11. (in Chinese).

- [7] 周美君. 不同 ELISA 试剂盒检测猪瘟疫病毒抗体的比较分析[J]. 兽医导刊, 2016(19):68-69.
ZHOU M J. Comparative analysis of different ELISA kits for the detection of swine fever virus antibody[J]. *Veterinary Orientation*, 2016 (19) : 68-69. (in Chinese).
- [8] 张东东, 宁宜宝, 刘 灿, 等. 两种猪瘟疫病毒 ELISA 抗体检测试剂盒对疫苗免疫猪血清抗体检测的比较试验[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(7):28-29, 32, 67.
ZHANG D D, NING Y B, LIU C, et al. Comparison of two elisa kits for detection of classical swine fever virus antibodies [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(7):28-29, 32, 67. (in Chinese).
- [9] ORTIZ C M, SANDOVAL R M, CANSECO D F, et al. Development of a multispecies double-antigen sandwich ELISA using N and RBD proteins to detect antibodies against SARS-CoV-2 [J]. *Animals*, 2023, 13(22):3487.
- [10] MENGXIANG W, JINXING S, JUNRU S, et al. Development of an effective double antigen sandwich ELISA based on p30 protein to detect antibodies against African Swine Fever Virus [J]. *Viruses*, 2022, 14(10):2170.
- [11] CHEN J, SHI Z, LUO J, et al. Development and optimization of a double antigen sandwich ELISA detecting for Senecavirus A antibodies based on VP2 protein [J]. *Microbiol Spectr*, 2024, 12 (12) : e0204324.
- [12] VAN RIJN P A, VAN GENNIP H G, DE MEIJER E J, et al. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74 (10):2053-2060.
- [13] 林琪虹, 李长尧, 张朝霞, 等. 猪瘟疫病毒 E2 蛋白单克隆抗体的制备及抗原表位的鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2025, 47(2):179-184.
LIN Q H, LI C Y, ZHANG Z X, et al. Preparation of monoclonal antibody to swine fever virus E2 protein and identification of antigenic epitopes [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary*, 2025, 47(02) : 179-184. (in Chinese)
- [14] 吴思敏, 王钊哲, 许 瑞, 等. 猪瘟疫病毒表面抗原 E2 基因的克隆与原核表达[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(5):32-36.
WU S M, WANG Z Z, XU R, et al. Cloning and expression of surface antigen E2 of classical swine fever virus [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2017, 25(05):32-36. (in Chinese)
- [15] MA Z, ZHAO Y, LV J, et al. Development and application of classical swine fever virus monoclonal antibodies derived from single B cells [J]. *Vet Res*, 2023, 54(1):90.
- [16] 彭伍平, 夏照和, 侯 强, 等. 猪瘟疫病毒石门强毒株和兔化弱毒疫苗株 E2 蛋白糖基化位点差异分析[J]. 病毒学报, 2007, 23(5):389-393.
PENG W P, XIA Z H, HOU Q, et al. Differences in glycosylation of the E2 protein between virulent Shimen strain and a virulent C-strain of classical swine fever virus [J]. *Bing Du Xue Bao*, 2007, 23(5) : 389-393. (in Chinese)
- [17] VAN RIJN P A, MIEDEMA G K, WENSVOORT G, et al. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus [J]. *J Virol*, 1994, 68 (6) : 3934-3942.
- [18] RISATTI G R, HOLINKA L G, FERNANDEZ SAINZ I, et al. N-linked glycosylation status of classical swine fever virus strain Brescia E2 glycoprotein influences virulence in swine [J]. *J Virol*, 2007, 81(2):924-933.
- [19] VAN RIJN P A, BOSSERS A, WENSVOORT G, MOORMANN R J. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge [J]. *Gen Virol*, 1996, 77 (11) : 2737-45.
- [20] WEI Q, LIU Y, ZHANG G. Research progress and challenges in vaccine development against classical swine fever virus [J]. *Viruses*, 2021, 13(3):445.
- [21] QIN Y, SHA R, FENG Y, et al. Comparison of double antigen sandwich and indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of hepatitis C virus antibodies [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(11) : e23481.
- [22] JI S, LUO Y, ZHANG T, et al. An improved indirect ELISA for specific detection of antibodies against classical swine fever virus based on structurally designed E2 protein expressed in suspension mammalian cells [J]. *Arch Virol*, 2018, 163(7):1831-1839.
- [23] GOPINATH S, HOSAMANI M, JOSEPH V B, et al. Development of classical swine fever virus E2-protein based indirect ELISA for detection of antibodies against the virus in pigs [J]. *Vet Res Commun*, 2024, 48 (5):1-9.
- [24] WANG L, MI S, MADERA R, et al. A neutralizing monoclonal antibody-based competitive ELISA for classical swine fever C-strain post-vaccination monitoring [J]. *BMC Vet Res*, 2020, 16(1):14.

(编辑 白永平)