

# ELISA 方法在猪瘟抗原抗体检测上的应用

庄金秋<sup>1,2</sup>, 梅建国<sup>1,2</sup>, 张颖<sup>1</sup>, 王艳<sup>1</sup>, 李峰<sup>1</sup>

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东滨州 256600;

2. 滨州贝尔凯瑞生物技术有限公司, 山东滨州 256600)

**摘要:** 本文总结了猪瘟抗原检测, 包括双抗体夹心 ELISA、竞争 ELISA、抗原捕获 ELISA 和 NASBA-ELISA, 以及猪瘟抗体检测方法, 包括间接 ELISA、竞争 ELISA、液相阻断 ELISA 和斑点 ELISA 方面的研究进展。

**关键词:** 猪瘟; ELISA; 间接 ELISA; 抗体检测

中图分类号: S852.65 文献标识码: B 文章编号: 1005-944X (2018) 01-0065-05

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.01.019

## Application of ELISA Methods in Detection of Antigen and Antibody of Classical Swine Fever

Zhuang Jinqui<sup>1,2</sup>, Mei Jianguo<sup>1,2</sup>, Zhang Ying<sup>1</sup>, Wang Yan<sup>1</sup>, Li Feng<sup>1</sup>

(1. Binzhou Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Binzhou, Shandong 256600, China;

2. Binzhou Baer Carrey Biotechnology Co., Ltd., Binzhou, Shandong 256600, China)

**Abstract:** In this paper, the progress of Classical swine fever (CSF) antigen detection methods was summarized, including DAS-ELISA, competitive ELISA, AC-ELISA and NASBA-ELISA. Meanwhile, the progress of detection method of CSF antibody was also introduced, including indirect ELISA, competitive ELISA, liquid phase blocking ELISA and Dot-ELISA.

**Key words:** Classical swine fever; ELISA; indirect ELISA; antibody detection

猪瘟 (Classical swine fever, CSF) 是由猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 引起的一种严重危害养猪业的传染病。猪瘟抗体检测是免疫效果评价的主要手段。目前, 世界动物卫生组织 (OIE) 推荐的猪瘟抗体检测方法是酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和荧光抗体中和试验 (Fluorescent antibody virus neutralization test, FVNT)。由于 FVNT 对试验条件和操作人员的要求很高, 且耗时长, 仅适用于专业实验室进行少量样本检测, 不宜推广应用。因此 ELISA 方法是目前国际上认可的唯一适合大规模应用的血清学检测方法, 既可用于测定猪瘟抗

体, 又可用于测定猪瘟抗原。本文综述了近年来 ELISA 方法在猪瘟抗原抗体检测应用方面的研究进展, 以期为临床兽医工作者和广大养殖场户更好地诊断和防治猪瘟提供参考。

### 1 猪瘟抗原检测

#### 1.1 双抗体夹心 ELISA

双抗体夹心 ELISA 是检测 CSFV 抗原的常用方法。汤赛冬等<sup>[1]</sup>用提纯的高效价 CSFV 抗体及兔抗 CSFV 血清作为包被抗体和酶标记抗体, 建立了双抗体夹心 ELISA 方法, 用于检测 CSFV 抗原, 经与进口单抗 ELISA 同步检测 45 份可疑样品, 发现阳性结果符合率达 97.7%。秦彤<sup>[2]</sup>利用兔抗猪瘟 IgG、猪抗猪瘟 IgG 和羊抗兔酶标抗体, 建立了双抗体夹心 ELISA。曹兴萍等<sup>[3]</sup>用双抗夹心 ELISA 法检测规模化猪场临床无异常种猪抗凝全血, 共

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2015GSF121027); 山东省现代农业产业技术体系生猪产业创新团队项目 (SDAIT-08-17)

检测 22 个猪场，检测样品 361 份，检出阳性率为 2.2%。双抗体夹心 ELISA 法在种猪隐性感染、疑似疫情诊断、疫源净化，以及猪瘟病原、流行病学调查与防控等方面均有较强的实用性。

### 1.2 竞争 ELISA

张富强等<sup>[4]</sup>应用 c2410 筛选噬菌体肽库获得与其特异性结合的噬菌体拟位的基础上，分析噬菌体拟位的免疫反应性，建立依赖 c2410 和噬菌体拟位的竞争性 ELISA，用于诊断和检测临床组织样品中的 CSFV 抗原，并与国际标准的 CSFV 抗原捕获 ELISA 比较，发现所建立的竞争性 ELISA 比抗原捕获 ELISA 具有更高的敏感性，可作为 CSFV 抗原的常规检测方法在基层推广应用。

### 1.3 抗原捕获 ELISA (AC-ELISA)

AC-ELISA 是一种特异、敏感、快速、简便且实用的方法，是检测 CSFV 的有效方法。高华峰等<sup>[5]</sup>应用抗原捕获 ELISA 方法，分别对现行猪瘟疫苗毒、接种疫苗后产生定型热的兔脾和不同地区可疑猪瘟组织样品进行检测，发现 AC-ELISA 对猪瘟强毒组织样品的检测效果良好，但对弱毒并不敏感，因而可用于野毒感染鉴别。陆芹章等<sup>[6]</sup>制备了猪瘟单克隆抗体，用 AC-ELISA 检测 CSFV，并用 PCR 方法作比较，发现 30 份猪瘟阴、阳性病料的 AC-ELISA 试验结果与 PCR 检测结果相符。刘建文等<sup>[7]</sup>将筛选的 CSFV 特异性单抗 1E2、3B7 和 4B6 纯化后等量混合后包被酶标板（捕捉抗体），与兔抗 CSFV IgG（检测抗体）联合应用，建立了 CSFV 抗原捕获 ELISA 方法，发现与病毒分离和 RT-PCR 方法符合率分别为 86.2% 和 90.3%。该方法将单抗的特异性和 ELISA 方法的敏感性有机结合起来，能够短时间内准确、快速、直接检测大批量样品中的 CSFV 抗原，明显优于病毒分离和免疫荧光等方法，更适合于各级兽医研究机构和生产单位应用。

### 1.4 依赖核酸序列的扩增技术 (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)

NASBA 是在 PCR 的基础上发展起来的 1 项扩增 RNA 的新技术，是由 1 对引物介导的、连续

均一的体外特异核苷酸序列等温扩增的酶促反应过程。聂福平等<sup>[8]</sup>以 CSFV E2 基因为研究对象，将 NASBA 技术与液相杂交和 ELISA 相结合，建立了 NASBA-ELISA 检测方法，应用该法对采自重庆市部分地区猪场的 125 份样品进行了检测，发现 CSFV 阳性检出率为 5.6%，与 RT-PCR 法的检出符合率为 94.4%，检测灵敏度是 RT-PCR 的 100 倍。本方法的建立为 CSFV 的检测提供了一种快速特异的方法。

## 2 猪瘟抗体检测

### 2.1 间接 ELISA

间接 ELISA 是目前检测 CSFV 抗体最常用的方法。由于灵敏性高、技术比较成熟、试剂盒已商品化、质量较稳定和操作简单等优点，在我国基层和实验室得到全面推广。

2.1.1 基于 CSFV 全病毒的猪瘟抗体间接 ELISA 刘胜江<sup>[9]</sup>、于涟等<sup>[10]</sup>和陈春旺等<sup>[11]</sup>先后用纯化 CSFV 及猪瘟兔化弱毒乳兔组织冻干疫苗为原料，提取 CSFV 抗原，以酶标葡萄球菌蛋白 A (PPA) 代替酶标抗猪 IgG，建立了间接 PPA-ELISA 法，其反应能被猪瘟纯化抗原或疫苗培养液所抑制。杜伟贤等<sup>[12]</sup>用猪瘟兔化弱毒犊牛睾丸细胞苗为材料提取 CSFV 抗原，以羊抗猪 IgG-HRP 结合物为免疫试剂，建立了间接 ELISA 法，也取得了预期效果。

2.1.2 基于 E2 蛋白的猪瘟抗体间接 ELISA 在 CSFV 结构蛋白中，囊膜蛋白 E2 是 CSFV 中免疫功能最重要的蛋白，携带有能刺激机体产生保护性免疫的抗原决定簇，可诱导动物机体产生保护性的中和抗体，是近年来研制新型疫苗和血清学诊断抗原以及研究 CSFV 抗原变异的主要对象。余兴龙等<sup>[13]</sup>、王海震等<sup>[14]</sup>、尹双辉等<sup>[15]</sup>、谢金文等<sup>[16]</sup>、李文良等<sup>[17]</sup>、苏佰通<sup>[18]</sup>、冯春花等<sup>[19]</sup>、刘丽娅等<sup>[20]</sup>和藺辉星等<sup>[21]</sup>先后以大肠杆菌表达纯化后的重组 E2 蛋白作为包被抗原，建立了间接 ELISA 方法。李娇等<sup>[22]</sup>以纯化的 CSFV 重组 E2 蛋白为包被抗原，以辣根过氧化物酶标记葡萄球菌 A 蛋白 (HRP-SPA) 为酶标二抗，研制了检测

CSFV 抗体的间接 PPA-ELISA 诊断试剂盒, 发现其具有良好的重复性、敏感性和特异性。何艳<sup>[23]</sup>、孙元等<sup>[24]</sup>和徐璐等<sup>[25]</sup>先后将昆虫杆状病毒表达的重组 E2 蛋白纯化后作为 ELISA 包被抗原, 建立了基于重组 E2 蛋白的间接 ELISA 方法。李文良等<sup>[26]</sup>以大肠杆菌表达纯化后的重组 E2 蛋白作为抗原, 建立了检测 IgM 抗体的间接 ELISA 方法。基于 E2 蛋白的猪瘟抗体间接 ELISA 方法操作简便、快速、敏感性高且特异性强, 为 CSFV 的快速诊断、疫苗免疫猪群抗体监测、疫苗效果评价和 CSFV 流行病学调查提供了快速、简便的血清学检测方法, 适合基层兽医单位推广应用。

**2.1.3 基于 E0 蛋白的猪瘟抗体间接 ELISA** 糖蛋白 E0 是 CSFV 包膜蛋白与核酸酶, 也是病毒吸附进入敏感细胞的必需蛋白, 其活性对病毒在宿主体内的持续感染有直接关系, 是诱导机体产生中和抗体的保护性抗原之一。目前研究的 CSFV 基因工程疫苗主要以 E2 蛋白为抗原, 基于 CSFV E0 蛋白建立相应的抗体检测技术对监测猪瘟的流行情况、区分 E2 标记疫苗免疫猪和野毒感染猪具有重要意义。陈振海等<sup>[27]</sup>、贾洪林等<sup>[28]</sup>、李鹏等<sup>[29]</sup>和吴素丽等<sup>[30]</sup>先后以大肠杆菌表达的 CSFV 重组 E0 蛋白经纯化后作为包被抗原, 建立了检测猪瘟抗体的 E0-ELISA 方法。刘芳冰<sup>[31]</sup>利用毕赤酵母表达 CSFV E0 蛋白, 建立了间接 ELISA。E0-ELISA 方法简便、特异、稳定, 在标记疫苗的研制和应用上具有重要的血清学鉴别功能, 对于监测 CSFV 的流行情况和疫苗免疫情况及制定免疫程序具有重要作用。

**2.1.4 基于 NS3 蛋白的猪瘟抗体间接 ELISA** NS3 蛋白是 CSFV 的非结构蛋白, 是病毒复制增殖必需蛋白, 是病毒引起细胞病变作用的主要因子, 在动物体内能产生不同程度的抗体。以 NS3 蛋白为抗原建立间接 ELISA 可以作为 CSFV 的血清学鉴别诊断方法。蒋大良等<sup>[32]</sup>和陆欣然等<sup>[33]</sup>先后以大肠杆菌表达的 CSFV 重组 NS3 蛋白纯化后作为包被抗原, 建立了检测猪瘟 NS3 抗体的间接 ELISA 方法。该检测方法与 IDEXX 公司检测试剂盒具有较高的一致性。基于 NS3 蛋白的猪瘟抗体间接 ELISA 方法可

以区分全病毒(包括疫苗毒和野毒)和重组腺病毒(rAd-E0-E2)感染的猪群, 极大促进了 CSFV 的净化或根除, 具有广阔的应用前景。

## 2.2 竞争 ELISA

抗体测定一般不使用竞争法, 但当抗原中杂质难以去除或抗原的结合特异性不稳定时, 可采用该法测定抗体。梁冰冰<sup>[34]</sup>用重组杆状病毒表达的 CSFV 重组 E2 蛋白作为 ELISA 包被抗原, 用辣根过氧化物酶标记的 E2 蛋白中和性单克隆抗体作为竞争抗体, 建立了用于检测 CSFV 中和抗体的重组 E2 蛋白竞争抑制 ELISA 方法(Competitive inhibition ELISA, CI-ELISA), 用于检测 CSFV 中和抗体。用该法和阻断 ELISA 试剂盒方法同时对采自部分省份的 370 份现地血清进行 CI-ELISA 检测, 发现二者的符合率为 96.7%。张新成等<sup>[35]</sup>选择 3 个场共 12 头母猪, 在产前 136~140 d 进行猪瘟兔化弱毒(细胞苗)疫苗接种(4 mL/头), 通过竞争 ELISA 检测其所产仔猪在 7、14、21、28、35 和 42 日龄时血清中抗体水平, 监测了母源抗体在仔猪体内的消长规律, 探索了仔猪猪瘟疫苗最佳首免日龄。

## 2.3 液相阻断 ELISA

刘胜宇等<sup>[36]</sup>利用液相阻断 ELISA 法测 E2 蛋白产生的抗体。因其与中和抗体具有高度的正相关性, 在一定区间内可以用阻断率高低来估测猪群保护性抗体水平。蒋卉等<sup>[37]</sup>通过比较 14 种国内外猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒的符合率, 发现 6 种阻断 ELISA 试剂盒的符合率均可达到 100.0%, 在敏感性和特异性上整体优于另外 8 种间接 ELISA 试剂盒。

## 2.4 斑点 ELISA (Dot-ELISA)

Dot-ELISA 不仅保留了常规 ELISA 的优点, 而且弥补了抗原或抗体对载体包被不牢等缺点, 具有敏感性高、特异性强、被检样品用量少、节省材料、不需特殊仪器、结果判定简单易行和便于长期保存等特点。李勇等<sup>[38]</sup>、陈永锋等<sup>[39]</sup>和邓何生等<sup>[40]</sup>先后应用 Dot-ELISA 方法对猪瘟抗体水平进行了监测, 发现 Dot-ELISA 适用于规模化猪场猪瘟抗体水平的监测。

### 3 讨论

我国现阶段猪瘟呈现出区域性、散发性流行,其临床症状不典型,容易产生温和型和非典型猪瘟共存、持续和隐性感染共存、免疫耐受和带毒综合征共存,以及母猪繁殖障碍等,使该病防治成为一大难题,给我国养猪业带来严重危害。目前猪瘟 ELISA 抗体诊断试剂盒种类较多,在实际应用过程中均具有合理性。徐璐等<sup>[41]</sup>认为在我国猪瘟疫苗强制免疫的政策下,选择间接 ELISA 抗体试剂盒更适合我国实际情况。间接 ELISA 更侧重于敏感性,液相阻断 ELISA 使用了单克隆抗体,检测的特异性更高。在进行 ELISA 检测方法评价时,一定要寻找敏感性和特异性最佳的平衡点和结合点。相信随着分子生物学的发展及电脑化程度极高的 ELISA 检测仪的使用,ELISA 方法将更为简便、实用和标准化,成为能够被广泛应用的抗体检测方法。

#### 参考文献:

- [1] 汤赛冬,周雪芳,周光胜,等.检测猪瘟抗原的夹心 ELISA 诊断试剂盒的制备、标化和应用的研究[J].上海畜牧兽医通讯,2002(2):14-15.
- [2] 秦彤.猪瘟病毒 SPA 协同凝集试验及双夹心 ELISA 检测方法的建立[D].保定:河北农业大学,2006.
- [3] 曹兴萍,张以芳,何从忠,等.双抗夹心 ELISA 法及荧光抗体法检测猪瘟抗原的应用与分析[J].中国兽医杂志,2008,44(1):66.
- [4] 张富强,李志华,张念祖,等.竞争 ELISA 检测猪瘟病毒抗原[J].中国兽医杂志,2005,41(11):24-26.
- [5] 高华峰,单于乃纯,姚俊,等.抗原捕获 ELISA 对猪瘟的诊断效果[J].中国兽医科技,2003,32(7):48-50.
- [6] 陆芹章,罗廷荣,温和心,等.猪瘟单克隆抗体的制备及 ACI-ELISA 检测猪瘟病毒的研究[J].中国预防兽医学报,2004,26(5):86-89.
- [7] 刘建文,余兴龙,张丽颖,等.单克隆抗体捕捉猪瘟病毒抗原 ELISA 方法的建立[J].畜牧兽医学报,2006,37(5):474-479.
- [8] 聂福平,肖进文,李应国,等.猪瘟病毒 NASBA-ELISA 检测方法的建立与应用[J].中国兽医科学,2012,42(6):601-605.
- [9] 刘胜江.猪瘟的免疫监测 - II .用 PPA-ELISA 检测猪瘟抗体及其质量控制[J].南京农业大学学报,1988(1):46-48.
- [10] 于涟,邵明芳,刘锦海,等.ELISA 间接法检测猪瘟抗体的研究[J].畜牧兽医学报,1988(3):188-194.
- [11] 陈春旺,梁砚如,鲁还美,等.PPA-ELISA 猪瘟免疫检测技术的应用[J].湖北畜牧兽医,1994(3):56-58.
- [12] 杜伟贤,郑锦兰,黄忠,等.ELISA 间接法用于猪瘟免疫监测研究[J].广东畜牧兽医科技,1991(4):2-5.
- [13] 余兴龙,涂长春,李作生,等.以重组 mE2 蛋白为抗原建立检测猪瘟病毒抗体间接 ELISA 方法的研究[J].中国预防兽医学报,1999,21(3):220-222.
- [14] 王海震,李学仁,冯秀丽,等.猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原域的高效表达及间接 ELISA 方法的初步建立[J].中国生物工程杂志,2005,25(1):81-85.
- [15] 尹双辉,尚佑军,刘艳红,等.可溶性 E2 蛋白作为抗原的检测猪瘟病毒血清抗体间接 ELISA 方法的建立[J].中国兽医学报,2009,29(12):1529-1533.
- [16] 谢金文,李娇,董林,等.猪瘟病毒 E2 基因原核表达及间接 ELISA 检测方法的初步建立[J].中国兽医杂志,2011,47(3):28-30.
- [17] 李文良,毛立,江杰元,等.猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原区的原核表达及其间接 ELISA 检测方法的建立与应用[J].动物医学进展,2012,33(5):8-13.
- [18] 苏佰通.抗猪瘟病毒疫苗效力免疫监测方法的建立及应用[D].长春:吉林大学,2014.
- [19] 冯春花,朱艳平,郭东光,等.猪瘟病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立及优化[J].中国畜牧兽医,2016,43(3):608-614.
- [20] 刘丽娅,汪洋,苗书魁.以二抗为基底猪瘟抗体 ELISA 检测方法建立[J].中国畜禽种业,2017,13(8):27-29.
- [21] 蔺辉星,周红,童泽鑫,等.猪瘟病毒血清抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2017,47(1):9-15.
- [22] 李娇,王金良,祖立闯,等.猪瘟病毒重组 E2 蛋白 PPA-ELISA 抗体检测试剂盒的研制及应用[J].中国兽医学报,2011,31(10):1390-1394.
- [23] 何艳.猪瘟病毒 E2 蛋白在昆虫细胞中的表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[D].南京:南京农业大学,2008.
- [24] 孙元,夏照和,梁冰冰,等.基于重组 E2 蛋白的猪瘟病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2008,38(4):315-319.
- [25] 徐璐,范学政,梁智选,等.猪瘟病毒间接 ELISA 抗体检测试剂盒的临床应用研究[J].中国兽医杂志,2014,50(8):36-38.

- [26] 李文良, 毛立, 张纹纹, 等. 猪瘟病毒 E2 蛋白 IgM 抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [C]// 中国畜牧兽医学 会兽医公共卫生学分会. 中国畜牧兽医学 会兽医公共卫生学分会第三次学术研讨会论文集. 广州: 中国畜牧兽医学 会兽医公共卫生学分会, 2012: 4.
- [27] 陈振海, 王琴, 范学政, 等. 猪瘟病毒 E0 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 策略的建立 [J]. 中国病毒学, 2005, 20 (2): 135-139.
- [28] 贾洪林, 仇华吉, 朱庆虎, 等. 基于重组 Erns 蛋白的猪瘟 Erns-ELISA 的建立和优化 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36 (10): 1028-1032.
- [29] 李鹏, 张彦明, 张志, 等. 猪瘟流行毒株 E0 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2008, 36 (10): 24-28.
- [30] 吴素丽, 孙惠玲, 钱永华. 猪瘟病毒 E0 蛋白的高效表达及其间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2009, 30 (8): 13-18.
- [31] 刘芳冰. 猪瘟病毒 E0 蛋白在酵母系统和哺乳动物细胞系统中的表达与鉴定 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [32] 蒋大良, 余兴龙, 李润成, 等. 猪瘟病毒 NS3 基因克隆、原核表达及间接 ELISA 方法初步建立 [J]. 微生物学通报, 2010, 37 (1): 78-84.
- [33] 陆欣然, 华思红, 樊钰莹, 等. 猪瘟病毒石门株 NS3 蛋白的原核表达及其抗体检测间接 ELISA 的建立 [J]. 动物医学进展, 2017, 38 (4): 28-34.
- [34] 梁冰冰. 检测猪瘟病毒中和抗体的竞争抑制 ELISA 的建立与应用 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- [35] 张新成, 李官兵, 史子学. 猪瘟母源抗体在仔猪体内持续时间的研究 [J]. 养猪, 2008 (1): 46-48.
- [36] 刘胜宇, 汪峰, 胡元元. 液相阻断 ELISA 法与正向间接血凝 (IHA) 法检测猪瘟抗体结果比较 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2015, 47 (1): 31-32.
- [37] 蒋卉, 李翠, 戴志红, 等. 猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒的比较试验 [J]. 中国兽药杂志, 2015, 49 (6): 6-8.
- [38] 李勇, 周绍凤, 孟庆友, 等. 用 Dot-ELISA 对猪瘟抗体水平监测的报告 [J]. 湖北畜牧兽医, 1999 (3): 65-66.
- [39] 陈永锋. Dot-ELISA 在猪瘟病因探讨上的应用研究 [J]. 福建畜牧兽医, 2002 (1): 88-90.
- [40] 邓何生, 李玉萍, 张业洪. Dot-ELISA 检测规模化猪场猪瘟抗体水平 [J]. 广西畜牧兽医, 2004 (6): 112-124.
- [41] 徐璐, 范学政, 徐和敏, 等. 猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法的建立和优化 [J]. 中国兽医杂志, 2012, 48 (3): 15-17.
- [42] 李晓薇, 李永强, 钟小艳. 猪瘟 ELISA 抗体检测试剂盒的应用效果比较试验 [J]. 中国畜牧兽医文摘, 2014, 30 (5): 47.