

猪瘟病毒结构蛋白 E0 抗体间接 ELISA 检测方法的建立及优化

郭东光¹, 陈明艳¹, 朱艳平¹, 李鹏¹, 岳锋¹, 崔芳微^{1,2}, 李文明^{1,2}, 王金海¹, 王选年¹

(1. 新乡学院 生命科学技术学院, 河南 新乡 453003; 2. 郑州大学 生命科学技术学院, 河南 郑州 450000)

摘要: 为建立一种经济、可靠的猪瘟病毒(CSFV)血清抗体检测方法, 采用间接 ELISA(E0-ELISA)方法, 以在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达的重组蛋白 E0 为包被原, 优化反应条件。结果显示, 优化后的 E0-ELISA 在包被原 1.0 μg/mL 质量浓度下 37 °C 包被 1 h 效果最佳, 最佳封闭条件为 5% 脱脂奶粉溶液 37 °C 作用 2 h, 待检血清以 1:100 稀释后 37 °C 作用 60 min 效果最佳, 二抗以 1:5 000 稀释后 37 °C 孵育 45 min 效果最佳。当 OD₄₅₀ < 0.370 时, 判断为猪血清 CSFV 抗体阴性; 批内和批间重复试验变异系数分别为 1.99% ~ 7.69% 和 2.16% ~ 9.23%, 表明该方法具有良好的稳定性; E0-ELISA 检测猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪圆环病毒(PCV)、猪细小病毒(PPV)阳性血清时结果均为阴性; 当 CSFV 阳性血清稀释至 1:640 时结果仍为阳性, 表明该检测方法具有良好的敏感性; 与 IDEXX CSFV 抗体检测试剂盒相比, E0-ELISA 检测符合率为 92.00%, 敏感性为 97.86%, 特异性为 78.33%。综上, 成功建立一种经济、稳定、特异性好和敏感性高的 CSFV 血清抗体间接 ELISA 检测方法。

关键词: 猪瘟病毒; 结构蛋白 E0; 抗体检测; 间接 ELISA

中图分类号: S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2019)11-0151-06

Establishment and Optimization of Indirect ELISA for Detection of Structural Protein E0 Antibody of Classical Swine Fever Virus

GUO Dongguang¹, CHEN Mingyan¹, ZHU Yanping¹, LI Peng¹, YUE Feng¹,

CUI Fangwei^{1,2}, LI Wenming^{1,2}, WANG Jinhai¹, WANG Xuannian¹

(1. School of Life Science, Xinxiang University, Xinxiang 453003, China;

2. School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: In order to establish an economical and reliable method for the detection of serum antibody against classical swine fever virus(CSFV), the recombinant protein E0 expressed in *Escherichia coli* was used as the coating agent, an indirect ELISA(E0-ELISA) was developed for the detection of serum antibody against CSFV. The results showed that the optimized E0-ELISA best effect was gained when the E0 protein was coated at 37 °C for 1 h and the protein mass concentration at 1.0 μg/mL. The best blocking condition was 5% skimmed milk powder solution at 37 °C for 2 h. The best effect was obtained when the serum to be tested was diluted at 1:100 and incubated at 37 °C for 60 min, and when the second antibody was diluted at 1:5 000 and incubated at 37 °C for 45 min. When OD₄₅₀ < 0.370, it was negative for CSFV antibody. The variation coefficients of intra-batch and inter-batch repeated tests were 1.99% — 7.69% and 2.16% — 9.23%, respectively, which showed a good stability for the indirect ELISA. The

收稿日期: 2019-06-15

基金项目: 河南省科技攻关项目(192102110066); 河南省高等学校重点科研项目(19A230009); 新乡学院博士科研启动经费项目(1366020120)

作者简介: 郭东光(1987-), 男, 河南淮阳人, 讲师, 博士, 主要从事动物分子免疫学研究。E-mail: gdg2011@163.com

通信作者: 王选年(1969-), 男, 河南灵宝人, 教授, 博士, 主要从事动物病理学与分子免疫学研究。

E-mail: wangxuannian@163.com

positive serum of PRRSV, PRV, PCV and PPV tested by E0-ELISA showed the negative results. It was still positive when the positive serum CSFV was diluted to 1:640, showing that E0-ELISA had a good sensitivity. Compared with IDEXX CSFV antibody detection kit, the E0-ELISA coincidence rate, sensitivity and specificity were 92.00%, 97.86% and 78.33%, respectively. All the results indicated that an economical, stable, specific and sensitive indirect ELISA for detection of CSFV antibodies was successfully established.

Key words: CSFV; Structural protein E0; Antibody detection; Indirect ELISA

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种猪重要急性、烈性传染病,严重威胁着我国养猪业的发展,《国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020年)》中将其列为5种优先防治的动物疫病之一^[1-5]。疫苗免疫是目前预防和控制CSF发生和流行的重要手段^[6-8]。

目前,常用的CSF疫苗主要有2种,一种是改良的活疫苗,其安全、有效,但不能从被免疫动物中区分野毒感染动物(Differentiation of infected from vaccinated animals, DIVA)^[9]。另一种是E2亚单位疫苗,其能够辨别野毒感染,但免疫接种后不能快速启动免疫反应或不能通过胎盘传递给子代^[10]。虽然标记疫苗能够区分DIVA,前提是要有准确、有效的配套辨别检测方法。由于CSFV结构蛋白E2是制备CSF标记疫苗的主要靶标蛋白。因此,最好的策略是对感染猪E0特异性抗体的鉴别^[11]。

E0蛋白是CSFV的主要结构蛋白之一,具有重要的血清学鉴别功能,能够有效区分瘟病毒属中的CSFV、牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)和边界病病毒(Border disease virus, BDV)抗体,也是与CSF标记疫苗配套使用的重要检测蛋白^[12-15]。相比传统的血清中和试验,ELISA检测技术更为方便可行,为临床上CSFV血清抗体监测提供了一种切实、可靠的检测工具^[16-17]。鉴于此,通过原核表达纯化的E0重组蛋白,建立CSFV血清抗体的间接ELISA(E0-ELISA)检测方法,一方面为临床上CSFV血清抗体的筛查提供一种经济、方便的检测手段,另一方面也为在CSFV感染后早期血清分析和后期的DIVA配套试验奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要材料 大肠埃希菌(*E. coli*)DH5 α 工程菌、Rostta(DE3)工程菌、质粒pGEX-CSFV全长质粒、原核表达载体pGEX-4T-2、猪瘟兔化阳性高免血清、CSFV抗体阳性血清140份、CSFV抗体阴性血清60份及猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine

reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)、猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)、猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV)抗体阳性血清若干份均由新乡学院生物技术研究中心保存。

1.1.2 主要试剂 Ex Taq DNA聚合酶、核酸内切酶BamH I、Xho I、T4 DNA连接酶均为TaKaRa公司产品;普通Taq DNA聚合酶,为北京鼎国公司产品;抗GST标签单克隆抗体为北京中杉金桥生物公司产品;HRP标记的羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗均购于索莱宝公司;HRP标记的羊抗猪二抗,北京博士德生物公司产品;脱脂奶粉购自美国Amresco公司;酶标板购自美国Thermo公司;牛血清白蛋白(BSA)购自Sigma公司;胎牛血清(FBS)购自Gibco公司;CSFV抗体检测试剂盒、PRV抗体检测试剂盒、PRRSV抗体检测试剂盒均为美国IDEXX公司产品;PCV抗体检测试剂盒为武汉前科动物生物制品有限公司产品;PPV抗体检测试剂盒为深圳绿诗源生物技术有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 重组蛋白表达的SDS-PAGE分析和Western blot鉴定 将pGEX-4T-2-E0阳性克隆子转化至BL21(DE3)大肠杆菌并加入IPTG进行诱导,经SDS-PAGE鉴定重组蛋白表达情况后,使用切胶回收方法对目的蛋白进行纯化。然后应用猪瘟兔化阳性高免血清及抗GST标签单克隆抗体进行Western blot分析,鉴定重组蛋白的生物学活性。

1.2.2 抗原最佳包被质量浓度和血清最适稀释度的确定 通过方阵滴定法测定抗原最适包被质量浓度和血清最佳稀释度,将E0蛋白分别按照0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度包被96孔酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBST洗涤3次;用含5%脱脂奶粉的PBST每孔200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h,PBST洗涤3次;再分别加入CSFV抗体阳性血清和阴性血清,每孔50 μL ,以第1孔1:25依次作倍比稀释,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用30 min,PBST洗涤3次;然后每孔加入50 μL 1:10 000稀释羊抗猪二抗稀释液,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用30 min;每孔加入80 μL 底物显色10 min后,每孔加入100 μL

2 mol/L 硫酸进行终止;最后在 450 nm 下测量各孔的 OD 值。判断标准:当 OD 值接近 1,且测量值/阴性值(P/N) > 2.1 时,即为抗原最佳包被质量浓度和最适血清稀释度。

1.2.3 间接 ELISA 最佳反应条件的优化 在上述条件的基础上,又通过对抗原最佳包被时间(4 °C 过夜、37 °C 2 h、37 °C 3 h 和 37 °C 4 h)、封闭液的种类及用量(5% 脱脂奶粉溶液、0.5% BSA、1% BSA 和 2% FBS)、封闭液作用时间(4 °C 过夜、37 °C 1、2、3、4 h)、血清最适作用时间(37 °C 下反应 30、60、90、120 min)、二抗最佳稀释比例(1:5 000、1:10 000、1:15 000、1:20 000)和最适二抗孵育时间(37 °C 作用 15 min、30 min、1 h、2 h)进行优化,450 nm 下测量各组各孔的 OD 值。判断标准:当 P/N 最大时,所对应的条件即为最佳作用条件。

1.2.4 间接 ELISA 临界值确定 利用新乡学院生物技术研究中心保存的 60 份 CSFV 抗体阴性血清,确定间接 ELISA 的临界值判定标准。统计学分析测定的 OD₄₅₀,计算平均值(\bar{X})和标准差(SD),样品 OD₄₅₀ < $\bar{X} + 3SD$ 为阴性,反之则判断为阳性。

1.2.5 特异性分析 用上述已优化方法检测 PCV、PPV、PRRSV、PRV 猪阳性血清抗体样品,以 CSFV 阳性血清和阴性血清为对照,检测该方法的特异性。

1.2.6 敏感性分析 将 CSFV 抗体阳性血清进行 1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1 280 稀释,根据 ELISA 临界值判断标准判断该方法的敏感性。

1.2.7 重复性试验 分别用同一批制备(批内)的重组 E0 蛋白包被的 96 孔酶标板和不同批次制备(批间)的重组 E0 蛋白包被的 96 孔酶标板,分别将 7 份 CSFV 抗体阳性血清和 3 份阴性血清按已优化方法分别重复检测 6 次,进行批内和批间重复性试验,确定建立检测方法的重复性和稳定性。

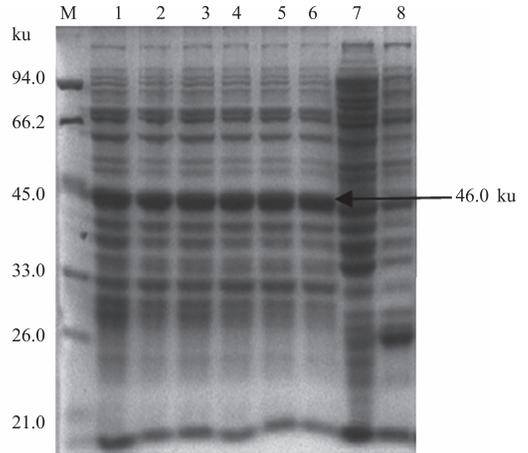
1.2.8 符合率检测 随机选取用 IDEXX CSF 抗体检测试剂盒检测的 200 份猪血清样品,再用建立的检测方法检测,450 nm 下测量 OD 值,根据临界值判断标准进行结果判定,比较两者的符合率。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白 E0 表达的 SDS - PAGE 分析和 Western blot 鉴定

SDS - PAGE 分析结果表明,pGEX - 4T - 2 - E0 阳性克隆子经 0.1 ~ 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导后,均在预期位置 46.0 ku 处出现了目的条带,且 IPTG 浓度在 1.0 mmol/L 时表达量最高(图 1)。Western

blot 结果显示,重组蛋白 E0 不仅与抗 GST 标签单克隆抗体反应,而且还与猪瘟兔化阳性高免血清反应,在 46.0 ku 左右也出现了特异性目的条带(图 2)。以上结果表明,融合蛋白被正确表达且具有良好的生物学活性,纯化后的 E0 重组蛋白可以作为 ELISA 检测方法的包被抗原。

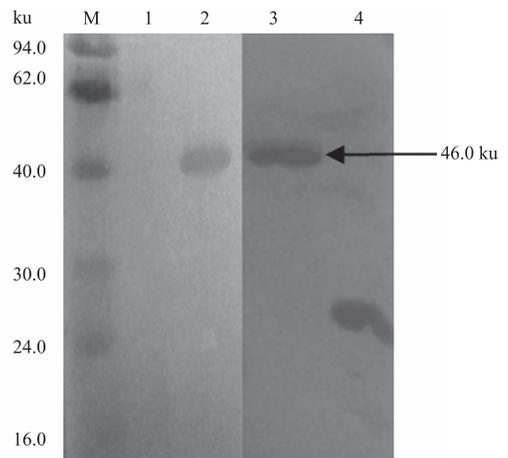


M. 蛋白质分子质量标准; 1—6: IPTG 浓度分别为 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1 mmol/L; 7. 未诱导对照; 8. pGEX - 4T - 2(DE3) 空载体

M. Protein molecular weight; 1—6. The dose of 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 mmol/L of IPTG; 7. Uninduced control; 8. pGEX-4T-2(DE3) control

图 1 重组蛋白表达的 SDS - PAGE 分析结果

Fig. 1 SDS-PAGE analysis results of recombinant protein expression



M. 蛋白质分子质量标准; 1. 未诱导对照; 2. 重组蛋白 E0 与猪瘟兔化阳性高免血清反应; 3. 重组蛋白 E0 与抗 GST 标签单克隆抗体反应; 4. pGEX - 4T - 2(DE3) 空载体

M. Protein molecular weight; 1. Uninduced control; 2. Results of E0 recombinant protein with rabbit serum that anti CSFV; 3. Results of E0 recombinant protein with anti GST mAb; 4. pGEX-4T-2(DE3) control

图 2 重组蛋白 E0 的 Western blot 鉴定结果

Fig. 2 Western blot identification results of E0 recombinant protein

2.2 抗原最适包被质量浓度和待检血清最适稀释度

由表 1 可知,根据方阵滴度法判断标准,当 OD 值接近 1,且 P/N > 2.1 时,即为抗原最适包被质量

浓度和血清最适稀释度。结果显示,抗原最适包被质量浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,待检血清最适稀释度为 1:100。

表 1 抗原最适包被质量浓度和血清最适稀释度测定结果

Tab.1 The results of optimal antigen coating mass concentration and serum optimal dilution

抗原质量 浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$) Antigen mass concentration	项目 Item	血清稀释度 Serum dilution					
		1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
0.5	+	1.905	1.812	0.694	0.592	0.297	0.259
	-	0.728	0.427	0.267	0.194	0.134	0.094
	P/N	2.617	4.244	2.600	3.052	2.216	2.756
1.0	+	2.047	1.937	1.077	0.659	0.476	0.316
	-	0.402	0.295	0.274	0.187	0.114	0.112
	P/N	5.092	6.567	3.931	3.524	4.175	2.821
2.0	+	2.456	2.355	1.215	0.769	0.653	0.380
	-	0.765	0.424	0.305	0.286	0.204	0.187
	P/N	3.210	5.554	3.984	2.689	3.201	2.032
3.0	+	2.030	1.892	1.090	0.829	0.614	0.557
	-	0.853	0.514	0.328	0.315	0.273	0.202
	P/N	2.380	3.681	3.323	2.632	2.250	2.757
4.0	+	2.352	2.178	1.397	0.867	0.594	0.467
	-	0.914	0.546	0.383	0.319	0.258	0.186
	P/N	2.573	3.990	3.648	2.718	2.302	2.511
5.0	+	2.225	2.092	1.472	1.106	0.703	0.591
	-	0.995	0.725	0.426	0.384	0.327	0.220
	P/N	2.236	2.886	3.455	2.880	2.150	2.686

2.3 E0 - ELISA 最佳反应条件的优化

通过对各反应条件的优化,E0 - ELISA 最佳反应条件分别为:抗原在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下包被 1 h 时,其 P/N 值最大,为 4.230;使用 5% 脱脂奶粉溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下封闭 2 h 时,P/N 值最大,为 3.765;重组蛋白 E0 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下封闭 3 h 时,P/N 值最大,为 3.833;阳性血清在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下作用 60 min 时,P/N 值最大,为 4.278;二抗在 1:5 000 稀释时,孵育时间 45 min,P/N 值达到最大。

2.4 E0 - ELISA 阴性临界值

由表 2 可知,用 E0 - ELISA 共检测 60 份 CSFV 阴性血清,其阴性血清 OD_{450} 平均值为 0.313,标准差为 0.019,根据公式:阴性临界值 = $\text{OD}_{450} + 3\text{SD}$,确定其阴性血清临界值为 0.370,当样本 $\text{OD}_{450} < 0.370$ 时,判断为阴性,反之则判断为阳性。

2.5 E0 - ELISA 的特异性分析

由表 3 可知,用 E0 - ELISA 分别检测 PRV、PRRSV、PCV、PPV 的猪阳性血清 20 份,且每份重复 3 次,同时设立 CSFV 阳性和阴性对照,结果显示, OD_{450} 均小于临界值判断标准 0.370,全部判断为阴

表 2 E0 - ELISA 阴性临界值的测定结果

Tab.2 The results of threshold for the E0-ELISA

项目 Item	结果 Result
阴性样本 OD_{450} 平均值 OD ₄₅₀ average of negative sample	0.313
标准方差 Standard variance	0.019
临界值 Cut off value	0.370
阳性对照 OD_{450} Positive OD ₄₅₀	0.997
阴性对照 OD_{450} Negative OD ₄₅₀	0.148
空白对照 OD_{450} Blank OD ₄₅₀	0.052

性结果,说明该检测方法具有良好的特异性。

2.6 E0 - ELISA 的敏感性分析

由图 3 可知,用 E0 - ELISA 对 2 倍倍比稀释后的 CSFV 阳性抗体血清进行检测,当血清稀释至 1:640 时, OD_{450} 仍大于所设定的临界值判断标准,结果判断为阳性,表明该方法敏感性良好。

表 3 E0-ELISA 的特异性分析结果

Tab.3 Specificity analysis results for the E0-ELISA

样品编号 Sample No.	检测样品 Detected sample					阳性对照 Positive control	阴性对照 Negative control
	PRRSV	PRV	PCV	PPV			
1	0.243	0.295	0.207	0.222	0.763	0.160	
2	0.258	0.229	0.186	0.235	0.758	0.159	
3	0.014	0.317	0.259	0.197	0.760	0.177	
4	0.322	0.302	0.304	0.186	0.751	0.165	
5	0.206	0.198	0.288	0.203	0.770	0.172	

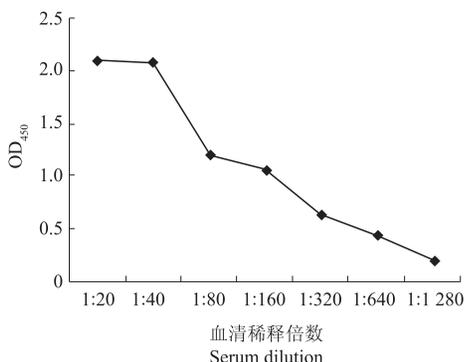


图 3 E0-ELISA 的敏感性试验结果

Fig.3 The sensitivity test results for the E0-ELISA

2.7 E0-ELISA 稳定性分析

由表 4 可知,用同一批(批内)制备的重组蛋白 E0 包被的 96 孔酶标板和不同批次(批间)制备的重组蛋白 E0 包被的 96 孔酶标板,分别对 7 份阳性 CSFV 血清样品和 3 份阴性血清样品进行检测,得到批内变异系数为 1.99%~7.69%,批间变异系数为 2.16%~9.23%,两者均小于 10%,说明该检测方法具有较好的稳定性和重复性。

表 4 E0-ELISA 的重复性试验结果

Tab.4 Repeatability assay results for the E0-ELISA

血清编号 Serum No.	批内重复试验 Intra batch experiment		批间重复试验 Inter batch experiment	
	平均数	变异系 数/% CV	平均数	变异系 数/% CV
	$\bar{X} \pm SD$		$\bar{X} \pm SD$	
1	1.208 ± 0.024	1.99	1.222 ± 0.032	2.62
5	1.342 ± 0.032	2.38	1.298 ± 0.028	2.16
12	0.998 ± 0.018	1.80	1.084 ± 0.045	4.15
16	1.106 ± 0.022	1.99	1.078 ± 0.031	2.88
23	0.546 ± 0.042	7.69	0.589 ± 0.036	6.11
34	0.652 ± 0.032	4.91	0.663 ± 0.040	6.03
67	0.735 ± 0.028	3.81	0.764 ± 0.025	3.27
3	0.326 ± 0.009	2.76	0.339 ± 0.028	8.26
18	0.289 ± 0.012	4.75	0.320 ± 0.019	5.93
28	0.169 ± 0.011	6.51	0.195 ± 0.018	9.23

2.8 E0-ELISA 符合率分析

由表 5 可知,经对 200 份猪血清样品进行检测, IDEXX 试剂盒共检出 140 份 CSFV 血清阳性样品和 60 份阴性样品。E0-ELISA 共检测出 150 份 CSFV 血清阳性样品和 50 份阴性样品,其中在 150 份阳性样品中有 13 份样品 IDEXX 试剂盒检测为阴性,在 50 份 CSFV 血清阴性样品中有 3 份 IDEXX 试剂盒

检测为阳性。经计算,与 IDEXX CSFV 血清抗体试剂盒相比,E0-ELISA 检测方法的符合率为 92.00%,敏感性为 97.86%,特异性为 78.33%。

表 5 E0-ELISA 符合率检测结果

Tab.5 The results of coincidence rate for the E0-ELISA

样品类型 Sample classification	IDEXX 试剂盒检测结果 The results detected by the IDEXX ELISA kit		
	阳性份数 Positive counts	阴性份数 Negative counts	合计份数 Total counts
	E0-ELISA 检测为阳性的样品 Positive samples detected by E0-ELISA	137	13
E0-ELISA 检测为阴性的样品 Negative samples detected by E0-ELISA	3	47	50
合计份数 Total counts	140	60	200

3 结论与讨论

CSF 标记疫苗的应用为 CSF 净化提供了重要手段,前提条件是要具备配套的鉴别诊断方法,由于 E2 结构蛋白是设计 CSF 标记疫苗的首选蛋白,为此,临床上对 E0 特异性抗体的检测成为有效辨别 CSFV 野毒感染的重要检测靶标^[11]。本研究以大肠杆菌中表达的 CSFV 结构蛋白 E0 为包被原,建立了检测 CSFV 血清抗体的间接 ELISA 检测方法,经鉴定该方法具有较高的敏感性,达到 97.86%。PANNHORST 等^[18]设计并评价了 2 种使用细菌表达 E0 重组蛋白的间接 ELISA(一种用于筛选,另一种用于确认),2 种 ELISA 都在感染后 10 d 内检测出不同毒株和基因型的 CSFV 特异性抗体,其能够有效区分 CSFV 感染猪和 CP7_E2alf 疫苗免疫猪,其敏感性和特异性为 95%。MEYER 等^[11]建立了检测 E0 特异性抗体的双抗原夹心 ELISA,也可有效识别不同基因型 CSFV E0 特异性抗体,其敏感性仅为 90.2%,特异性为 93.8%。相比之下,在敏感性方面该方法要明显优于前人所建立的类似检测方法。袁莉等^[19]以 E0 蛋白为包被源也建立了检测 CSFV 血清抗体的间接 ELISA 检测方法,结果表明,当 CSFV 阳性血清稀释至 1:640 时,其结果判断为阴

性,而该方法当血清稀释至 1:1 280 时结果判断为阴性,说明本检测方法的敏感性更高。从结果来看,虽然本检测方法的特异性较低,这可能与本研究使用的临床样本较少相关,特别是阴性血清样本较少,仅有 60 份。

CSF 标记疫苗是实施 CSF 净化的重要手段。为进一步证实该方法的可靠性,本研究对 200 份猪血清样品的检测结果表明,与 IDEXX 试剂盒的符合率达到 92.00%。吴素丽等^[20]以原核表达的 E0 蛋白为基础建立了检测 CSFV 血清抗体的间接 ELISA 检测方法,与 IDEXX 试剂盒相比,其符合率仅为 83%。李鹏等^[21]也以原核表达的 E0 蛋白为基础建立了检测 CSFV 血清抗体的间接 ELISA 检测方法,其总体符合率仅为 89%。蔺辉星等^[22]以原核表达的 E2 蛋白建立了检测 CSFV 血清抗体的间接 ELISA 检测方法,其敏感性、特异性和符合率分别为 89.07%、77.59% 和 84.65%。与以上研究相比,本研究建立的检测方法的准确性和可靠性均明显提升。

综上所述,本研究成功建立一种经济、稳定、特异性好和敏感性高的 CSFV 血清抗体间接 ELISA 检测方法,临床上为 CSFV 抗体的监测提供了一种经济、有效的检测手段。本研究建立的检测 CSFV 结构蛋白 E0 抗体的 ELISA 检测方法可以作为未来鉴别感染和免疫的候选方案,为未来我国实现 CSF 的净化提供技术支持。

参考文献:

- [1] HAUSE B M, COLLIN E A, PEDDIREDDI L E, *et al.* Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA [J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(10):2994-2998.
- [2] BROWN V R, BEVINS S N. A Review of classical swine fever virus and routes of introduction into the united states and the potential for virus establishment [J]. *Front Vet Sci*, 2018, 5:31-37.
- [3] GORAYA M U, ZIAGHUM F, CHEN S, *et al.* Role of innate immunity in pathophysiology of classical swine fever virus infection [J]. *Microb Pathog*, 2018, 119:248-254.
- [4] 孙亚宁,王丽,王栋,等. 猪瘟疫抗体检测试纸研发及制备工艺的优化 [J]. *西北农业学报*, 2019, 28(2):169-175.
- [5] 王春花,孙元,仇华吉. 新型猪瘟疫疫苗研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2013, 29(7):880-890.
- [6] PARK Y, AN D J, CHOE S, *et al.* Development of recombinant protein-based vaccine against classical swine fever virus in pigs using transgenic *nicotiana benthamiana* [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10:624-632.
- [7] LI H, GAO R, ZHANG Y. A promising trigene recombinant human adenovirus vaccine against classical swine fever virus [J]. *Viral Immunol*, 2016, 29(4):244-251.
- [8] DONG X N, CHEN Y H. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines [J]. *Vaccine*, 2005, 25(4):205-230.
- [9] VAN OIRSCHOT J T. Vaccinology of classical swine fever: From lab to field [J]. *Vet Microbiol*, 2003, 96(4):367-384.
- [10] ANDREA A, MÜLLER M, HOFMANN M A. Two newly developed Erns-based ELISAs allow the differentiation of classical swine fever virus-infected from marker-vaccinated animals and the discrimination of pestivirus antibodies [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 106(3):274-285.
- [11] MEYER D, FRITSCH S, LUO Y, *et al.* Detection of Erns-specific classical swine fever virus antibodies and application as an accompanying test for differentiation of infected from marker vaccinated animals [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(6):2013-2022.
- [12] 郭东光,朱艳平,孙国鹏,等. 猪瘟疫病毒 E0 蛋白的原核表达及鉴定 [J]. *动物医学进展*, 2014, 35(5):31-35.
- [13] 陈振海,王琴,范学政,等. 猪瘟疫病毒 E0 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. *中国病毒学*, 2005, 20(2):135-139.
- [14] XU Y G, CUI L C, TIAN C Y, *et al.* Immunogenicity of recombinant classic swine fever virus CD8⁺ T lymphocyte epitope and porcine parvovirus VP2 antigen co-expressed by *lactobacillus casei* in swine via oral vaccination [J]. *Clin Vaccine Immunol* November, 2011, 18(11):1979-1986.
- [15] LIM S I, CHOE S, KIM K S, *et al.* Assessment of the efficacy of an attenuated live marker classical swine fever vaccine (Flc-LOM-BEerns) in pregnant sows [J]. *Vaccine*, 2019, 37(27):3598-3604.
- [16] 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.
- [17] PANYASING Y, KEDKOVID R, THANAWONGNUWECH R, *et al.* Effective surveillance for early classical swine fever virus detection will utilize both virus and antibody detection capabilities [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 111(6):72-78.
- [18] PANNHORST K, FROHLICH A, STAUBACH C, *et al.* Evaluation of an Erns-based enzyme-linked immunosorbent assay to distinguish classical swine fever virus-infected pigs from pigs vaccinated with CP7_E2alf [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2015, 27(4):449-460.
- [19] 袁莉,杨顺利,尚佑军,等. 猪瘟疫病毒结构蛋白抗体间接 ELISA 检测方法的建立及评价 [J]. *西北农业学报*, 2018, 27(9):1273-1279.
- [20] 吴素丽,孙惠玲,钱永华. 猪瘟疫病毒 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.
- [21] 李鹏,张彦明,张志,等. 猪瘟疫流行毒株 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, 35(10):24-28.
- [22] 蔺辉星,周红,童泽鑫,等. 猪瘟疫病毒血清抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2017, 47(1):9-15.