微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

May 20, 2025, 52(5): 2344-2358
CSTR: 32113.14.j.MC.240646
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.240646
Copyright ©2025 Microbiology China All Rights Reserved

技术与方法

猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体化学发光检测方法的建立与应用

黄亦奇[1,2]，温肖会[2]，宋帅[2]，向国庆[2]，吕殿红[2]，罗胜军*[2]，李家奎*[1]

1 西藏农牧学院 动物科学学院，西藏 林芝 860000
2 广东省农业科学院动物卫生研究所 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室 农业农村部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站，广东 广州 510640

黄亦奇, 温肖会, 宋帅, 向国庆, 吕殿红, 罗胜军, 李家奎. 猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体化学发光检测方法的建立与应用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2344-2358.

HUANG Yiqi, WEN Xiaohui, SONG Shuai, XIANG Guoqing, LV Dianhong, LUO Shengjun, LI Jiakui. Establishment and application of a chemiluminescence detection method for antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2344-2358.

摘　要：【背景】猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的母猪流产或死胎、仔猪呼吸道症状并伴随死亡率升高的一种传染性疾病。【目的】建立一种特异性强、灵敏度高、操作简捷、检测时间短的 PRRSV 抗体化学发光检测方法，用于检测 PRRSV 抗体水平。【方法】以羧基磁珠作为固相载体偶联 PRRSV 重组 N 蛋白，用适量的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)进行封闭，加入检测样品进行反应，以兔抗猪 IgG-AP 抗体作为酶标二抗，加入相应底物进行显色，优化各项反应条件，建立 PRRSV 抗体化学发光检测方法，并对该方法的特异性、灵敏度、重复性和符合率进行验证。【结果】建立的 PRRSV 抗体化学发光检测方法的血清样品稀释倍数为 1:30，蛋白与羧基磁珠偶联 pH 值为 8.0，蛋白偶联量为 20 μg/mL，使用 20 μL 10% BSA 溶液封闭最佳，磁珠稀释液用量为 1 mL，酶标二抗稀释度为 1:20 000，一步反应时间为 20 min，二步反应时间为 10 min，底物反应时间为 3 min。根据背景清晰的 PRRSV 临床血清样本制标准曲线，通过绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线确定阴阳临界点为 32.56 U，当临床 PRRSV 抗体阳性样品稀释到 4 倍时，ELISA 和化学发光检测方法均鉴定为阴性，说明该化学发光检测方法具有良好的灵敏度。与非洲猪瘟病毒、经典猪瘟病毒、猪乙脑病毒、猪细小病毒、猪圆环病毒 2 型、

资助项目：广东省农业科学院动物卫生研究所青年科技人才培育项目(PY2024010)；广东省科技计划(2021B1212050021)
This work was supported by the Young Science and Technology Talents Training Program, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences (PY2024010), and the Science and Technology Program of Guangdong Province (2021B1212050021).
*Corresponding authors. E-mail: LI Jiakui, lijk210@mail.hzau.edu.cn; LUO Shengjun, m13808877470@163.com
Received: 2024-08-05; Accepted: 2024-09-26; Published online: 2024-11-11

猪流行性腹泻病毒抗体阳性血清均无交叉反应。重复性试验中，批内变异系数为 2.79%−5.32%，批间变异系数为 1.05%−11.31%，均<15%，与商品化猪繁殖与呼吸综合征抗体检测试剂盒阳性符合率 93.8%，阴性符合率 96.3%，总符合率 96.1%。【结论】本研究建立的 PRRSV 抗体化学发光检测方法可用于 PRRSV 疫苗接种后或感染痊愈后抗体水平检测，为后续试剂盒的开发提供参考。

关键词：猪繁殖与呼吸综合征；重组 N 蛋白；羧基磁珠；化学发光检测方法

Establishment and application of a chemiluminescence detection method for antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus

HUANG Yiqi[1,2], WEN Xiaohui[2], SONG Shuai[2], XIANG Guoqing[2], LV Dianhong[2], LUO Shengjun[*2], LI Jiakui[*1]

1 College of Animal Science, Xizang Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, Xizang, China
2 Guangdong Key Laboratory of Animal Disease Control, Guangdong Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Medicine and Diagnostic Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: [Background] Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is an infectious disease caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), which results in abortion or stillbirth in sows and respiratory symptoms in piglets with increased mortality. **[Objective]** To develop a chemiluminescence detection method for the antibodies against PRRSV with high specificity, high sensitivity, simple operation, and short detection time. **[Methods]** Carboxylated magnetic beads were used as solid-phase carriers to be coupled with the recombinant N protein of PRRSV and then blocked with an appropriate amount of bovine serum albumin (BSA). The test sample was then added for the reaction. With rabbit anti-porcine IgG-AP as the enzyme-labeled secondary antibody, the corresponding substrate was added for chemiluminescence. The reaction conditions were optimized, and thus a chemiluminescence detection method for the antibodies against PRRSV was established. The established method was then evaluated in terms of the specificity, sensitivity, reproducibility, and compliance rate with other methods. **[Results]** The established chemiluminescence detection method for the antibodies against PRRSV was based on a dilution of 1:30 for serum samples, pH 8.0 for protein coupling with carboxylated magnetic beads, 20 μg/mL protein for coupling, 20 μL 10% BSA solution as the best solution for blocking, the volume of magnetic bead diluent used is 1 mL, a dilution of 1:20 000 for enzyme-labeled secondary antibody, and the one-step, two-step, and substrate reaction time of 20 min, 10 min, and 3 min, respectively. The standard curve was established according to the clinical serum samples of PRRSV with a clear background, and the receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted, on the basis of which the negative and positive threshold was determined to be 32.56 U. ELISA and chemiluminescent detection methods reported negative results when the clinical PRRSV

antibody-positive samples were diluted to 4 folds, which indicated that this chemiluminescent detection method had good sensitivity. There was no cross-reactivity with the sera positive for antibodies against African swine fever virus, classical swine fever virus, Japanese encephalitis virus, porcine parvovirus, porcine circovirus type 2, and porcine epidemic diarrhea virus. In the reproducibility test, the intra-batch coefficients of variation ranged from 2.79% to 5.32%, and the inter-batch coefficients of variation ranged from 1.05% to 11.31%, which were all <15%. The established method showed the positive compliance rate of 93.8% and the negative compliance rate of 96.3% with the commercial PRRSV antibody detection kit, with an overall compliance rate of 96.1%. **[Conclusion]** The chemiluminescent detection method for the antibodies against PRRSV established in this study can be used to detect the antibody level after PRRSV vaccination or after the infection is cured. It can provide a reference for the subsequent development of detection kits.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome; recombinant N protein; carboxylated magnetic beads; chemiluminescence detection method

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的母猪流产或死胎，以及仔猪出现呼吸道症状并伴随死亡率上升的一种具有传染性的疾病。PRRSV 归类于尼多病毒目(Nidovirales)下的动脉炎病毒科(Arteriviridae)，进一步细分则属于动脉炎病毒属(Arterivirus)。PRRSV 是具有囊膜的单股正链 RNA 病毒。其基因组全长约为 15 kb，有 11 个开放阅读框(open reading frame, QRF)，包括 ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b、ORF3、ORF4、ORF5、ORF5a、ORF6、ORF7 和 ORF1a-TF[1]。其中 ORF1a 和 ORF1b 是病毒基因中的 2 个开放阅读框，主要负责编码病毒的非结构蛋白(non-structural protein, Nsp)，而 ORF2−ORF7 主要负责编码病毒的结构蛋白，其中包括 GP2a、GP2b、GP3、GP4、GP5a、GP5、M 和 N 蛋白[2]。PRRSV 分为 I 型(欧洲型)和 II 型(美洲型)，这 2 个基因型在全基因组水平上具有大约 60%的序列相似性[3]。目前国内以 II 型为主，少量 I 型地区性流行。PRRSV 在猪巨噬细胞中复制，但 II 型 PRRSV 诱发的呼吸道疾病比 I 型 PRRSV 更严重，这可能由于 II 型对巨噬细胞谱系有更强的亲和力[4]。2006 年，我国遭遇了高致病性猪蓝耳病的疫情，其病原为高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus，HP-PRSSV)，相较于经典 PRRSV，HP-PRSSV 在非结构蛋白 Nsp2 上缺失 30 个氨基酸，但有研究发现这一特性并不会使其毒力增强，目前不确定毒力增强的具体原因[5]。N 蛋白是病毒的核衣壳蛋白，在 I 型和 II 型 PRRSV 中分别包含 128 个和 123 个氨基酸[6]，是同基因型 PRRSV 中最保守的蛋白之一，病毒粒子含量高达 40%，具有较好的免疫原性。当猪感染 PRRSV 后，一周左右机体会首先产生针对 N 蛋白的抗体[7-8]，并且该抗体可在机体内延续半年之久，可作为良好的靶标蛋白用于检测或诊断。

PRRSV 已呈现全球地方性流行，对生猪养殖产业造成了巨大的经济损失。目前市面上的常规疫苗无法提供可持续的疾病控制，因为它们既受到病毒的免疫逃避策略的影响，也受到野毒株抗原异质性的影响[9]。而且对感染期的猪群接种猪流感、猪瘟等疫苗，会导致接种失败的情况[10]，一旦感染疾病将进一步加重猪场经济损失。因此，在 PRRSV 的根除和净化过程中，早期的准确诊断起着至关重要的作用。当

前，应用于 PRRSV 的分子生物学检测方法主要有 PCR、等温核酸扩增技术和基因芯片检测技术，血清学检测目前主要采用的方法有酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)及荧光免疫层析法(fluorescence immunochromatography assay, FICA)，ELISA 灵敏度高，但操作复杂，需要大量人工，并且易出现假阳性和假阴性，无法完成高通量及定量检测，FICA 虽然检测快速方便，结果读取客观，适用于大规模现场筛查，但仍然存在背景信号高、重复性低等缺点。

化学发光免疫分析法(chemiluminescent immunoassay, CLIA)融合了高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应，是一种被广泛使用的分析技术，常应用于抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素及药物等多种物质检测[11]。相较于 ELISA、FICA，该技术具备灵敏度高、试剂稳定、无放射危害、线性范围宽、操作简便等优点[12]。目前，CLIA 在人类医学、动物医学等各个领域疾病的预防与诊断中发挥其优势，承担着重要作用。

本研究利用 PRRSV 重组 N 蛋白作为偶联抗原，结合磁性分离技术和化学发光技术，开发一种灵敏度高、特异性高且重复性良好的 PRRSV 抗体化学发光检测方法，以期用于猪临床血清样品中 PRRSV 抗体的精确定量测定。

1 材料与方法

1.1 样品

PRRSV 高免阳性血清由广东省农业科学院动物卫生研究所诊断中心实验室负责制备并妥善保存；PRRSV 抗体阳性血清、PRRSV 抗体阴性血清、非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)、经典猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、猪乙脑病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)、猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)、猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)抗体阳性血清均由广东省农业科学院动物卫生研究所诊断中心实验室收集与保存；随机抽取的 129 份临床血清样本由广东省农业科学院动物卫生研究所诊断中心实验室提供。

1.2 主要试剂和仪器

PRRSV II 型 NADC34-like 毒株重组 N 蛋白，保存于广东省农业科学院动物卫生研究所；PRRSV ELISA 抗体检测试剂盒，北京爱德士生物科技有限公司；JSR 羧基磁珠，北京博尔迈生物技术有限公司；化学发光底物，兰州兽研生物科技有限公司；兔抗猪 IgG-AP 抗体，GeneTex 公司；PBS 溶液，武汉普诺赛生命科技有限公司。全自动化学发光免疫分析仪，重庆科斯迈生物科技有限公司；旋涡混合器，上海芃奇科学仪器有限公司；滚轴混匀仪，群安科学仪器(浙江)有限公司。

1.3 磁珠制备与偶联

使用旋涡混合器混匀羧基磁珠母液(100 mg/mL)，待分布均匀后，取 10 μL 加入内壁光滑的 2 mL 离心管内，放置于磁力架中 5 min，弃上清。加入 2-吗啉乙磺酸(2-morpholine ethanesulfonic acid, MES)偶联缓冲液，涡旋混匀磁珠，放置于磁力架中 5 min，移除上清，重复洗涤 4 次。使用 MES 偶联缓冲液对羧基磁珠进行充分混合，并向其中加入 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺[1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC]和 N-羟基丁二酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)，重悬后放置到滚轴混匀仪活化 30 min。将活化后的羧基磁珠放置于磁力架中 5 min，弃上清，洗涤 4 次，直至洗涤液中无 EDC 和 NHS。加入不同 pH 的 MES 偶联缓冲液和不同含量的 PRRSV 重组 N 蛋白放置到滚轴混匀仪上混匀 3 h。3 h 后放置到磁力架中，弃上清，已完成偶联的磁珠需使用 MES 清洗 4 次，加入封闭剂，并将其放置到滚轴混匀仪上，封闭 3 h。封闭过程结束后，把磁珠置于磁力架上，弃上清，用磁珠清洗液清洗 4 次，

加入不同剂量的磁珠保存液，混匀后放置于4 ℃冰箱储存 24 h。

1.4 磁珠反应条件

初步设定的磁珠反应条件包括：样品上样量 15 μL，磁珠用量 25 μL，结合缓冲液 100 μL，酶标二抗添加量 55 μL，一步反应时间设为 10 min，随后进行 4 次洗涤，二步反应时间设为 15 min，再次洗涤 4 次，底物反应时间为 5 min，底物使用量 100 μL，基于以上条件，使用全自动化学发光免疫分析仪对 PRRSV 阴性、阳性血清进行检测，并对各个条件进行优化。

1.5 样品稀释倍数的优化

羧基磁珠偶联蛋白时，暂定 MES 偶联缓冲液 pH 值为 5.0，蛋白用量为 10 μg，封闭剂为 10 μL 的 10%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)，磁珠保存液用量为 2 mL，制作 PRRSV 重组 N 蛋白偶联磁珠，对样品进行 1:10、1:15、1:25、1:30、1:35 稀释，测定 PRRSV 阴、阳性血清的发光值，通过计算 P/N 值，选取 P/N 最大值的为最优样品稀释倍数。

1.6 偶联蛋白时 MES 偶联缓冲液 pH 的优化

羧基磁珠活化完成后，分别加入 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 MES 偶联缓冲液与 PRRSV 重组 N 蛋白进行偶联，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，计算出 P/N 值，选取 P/N 最大值的为最优 MES 偶联缓冲液 pH。

1.7 PRRSV 重组 N 蛋白浓度的优化

羧基磁珠活化完成后，分别向离心管中加入 5、10、20、30、40 μg/mL 重组 N 蛋白进行偶联，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，计算出 P/N 值，选取 P/N 最大值的为最优偶联蛋白用量。

1.8 不同封闭剂的优化

分别用 5%脱脂奶粉、10%脱脂奶粉、1% BSA、5% BSA、10% BSA、5%海藻糖、5%明胶对偶联完成的羧基磁珠封闭 3 h，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，计算出 P/N 值，选取 P/N 最大值的封闭剂为最优封闭剂。

1.9 封闭剂量的优化

分别加入 5、10、15、20、25 μL 封闭剂到已偶联完成的羧基磁珠中封闭 3 h，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，通过化学发光值计算 P/N 值，P/N 最大值相对应的封闭剂用量为最优封闭剂量。

1.10 磁珠保存液量的优化

分别向已经封闭完成的磁珠中加入 0.5、1、2、3、5、10 mL 磁珠保存液，放入 4 ℃冰箱保存 24 h，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，通过化学发光值计算 P/N 值，选取 P/N 最大值所对应的磁珠保存液用量为最优磁珠保存液量。

1.11 兔抗猪 IgG-AP 酶标二抗稀释度的优化

将兔抗猪 IgG-AP 酶标二抗分别稀释为 1:10 000、1:20 000、1:30 000、1:40 000、1:50 000，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，通过计算 P/N 值，选取 P/N 最大值所对应的兔抗猪 IgG-AP 酶标二抗稀释度为最优酶标二抗稀释度。

1.12 血清加样量的优化

将全自动化学发光免疫分析仪上的血清加样量设置为 5 个梯度，分别为 20、25、30、35 和 40 μL，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，通过计算 P/N 值，选取 P/N 最大值所对应的血清加样的量为最优血清加样量。

1.13 磁珠加样量的优化

将全自动化学发光免疫分析仪上的磁珠用量设置为 5 个梯度，分别为 5、10、15、20 和 25 μL，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，通过计算 P/N 值，选取 P/N 最大值所对应的磁珠加样量为最优磁珠用量。

1.14 一步、二步反应时间的优化

将全自动化学发光免疫分析仪上的一步反应时间改为 10、15、20、25 和 30 min，将二步反应时间改为 3、5、10、15、20 min，测定 PRRSV

阴、阳性血清的化学发光值，通过计算 P/N 值，选取 P/N 最大值所对应的反应时间为最优一步和最优二步反应时间。

1.15 底物反应时间的优化

将全自动化学发光免疫分析仪上的底物反应时间改为 1、3、5、7、9 min，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，通过计算 P/N 值，选取 P/N 最大值所对应反应时间为最优底物反应时间。

1.16 标准曲线的绘制

将高免的 PRRSV 阳性血清经过倍比稀释处理，利用 PRRSV ELISA 抗体检测试剂盒检测，根据检测结果确定出 ELISA 检测呈阳性的最大稀释滴度，该稀释滴度下的血清抗体含量定义为 100 U，假设此时血清稀释度为 1:4 096，则 1:2 048 血清为 200 U，1:8 192 血清为 50 U，而未加血清的稀释液血清为 0 U，以此类推，选出血清为 0、100、200、400、800、1 600 U 作为标准品，测定化学发光值。利用 OriginPro 软件，以抗体浓度值为横坐标，化学发光值为纵坐标，对数据进行深入分析，在此基础上，采用非线性拟合的方式绘制出标准曲线。

1.17 阴阳性临界点的确定

选取 233 份经过 ELISA 检测且背景清晰的猪血清样本(PRRSV 抗体阴性血清 122 份，PRRSV 抗体阳性血清 111 份)，通过本实验建立的方法检测样品 PRRSV 抗体浓度值。利用 MedCalc 软件将浓度值转化为受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线的绘制数据，其中特异性为横坐标，灵敏度为纵坐标。计算约登(Youden)指数(Youden=灵敏度+特异性–1)，约登指数最大时对应的浓度值即为阴阳性的临界点。

1.18 特异性试验

选取 ASFV、CSFV、JEV、PPV、PCV2、PEDV、SS、PRRSV 抗体阳性标准血清，利用全自动化学发光仪已优化完成的程序检测浓度值，通过 1.17 已确定的临界点判断血清阴阳性，分析本检测方法的特异性。

1.19 灵敏度试验

选取一份 PRRSV 阳性血清样本用 PBS 稀释进行倍比稀释，将稀释后的样品分别通过全自动化学发光仪和商品化 PRRSV ELISA 抗体检测试剂盒进行检测，计算出 2 种检测方式检测出阴性时的稀释度，从而判断该方法的灵敏度。

1.20 重复性试验

批内重复性试验设计：使用同一批次磁珠对 10 份猪血清进行 PRRSV 抗体浓度检定，其中包括 5 份 PRRSV 抗体阳性血清和 5 份 PRRSV 抗体阴性血清，每份血清重复检测是 10 次，根据每份血清的抗体浓度值计算出变异系数，变异系数越小，说明该检测方法的重复性越好。

批间重复性试验设计：使用不同批次的 3 份磁珠对 10 份猪血清进行 PRRSV 抗体浓度检定，其余同批内重复性试验。

1.21 与商品试剂盒的符合率

随机选取 129 份猪临床血清样本采用了 2 种方法进行对比检测：一种是使用市面上已有的 PRRSV ELISA 抗体检测试剂盒，另一种则是本研究中所建立的方法，从而判断该方法与 ELISA 试剂盒的符合率。

2 结果与分析

2.1 样品稀释倍数的确定

使用全自动化学发光免疫分析仪检测阴、阳性血清按照 1:10、1:15、1:25、1:30、1:35 稀释时的化学发光值，重复检测 3 次，利用血清化学发光值的平均值计算出 P/N 值。如图 1A 所示，当血清稀释到 30 倍时，对应的 P/N 值最大，所以 30 倍为最优样品稀释倍数。

2.2 确定偶联蛋白时 MES 的 pH

PRRSV 重组 N 蛋白偶联活化完成的羧基磁珠时，分别选用 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 MES 偶联缓冲液，在其他条件相同的情况下，使用全自动化学发光免疫分析仪检测阴、

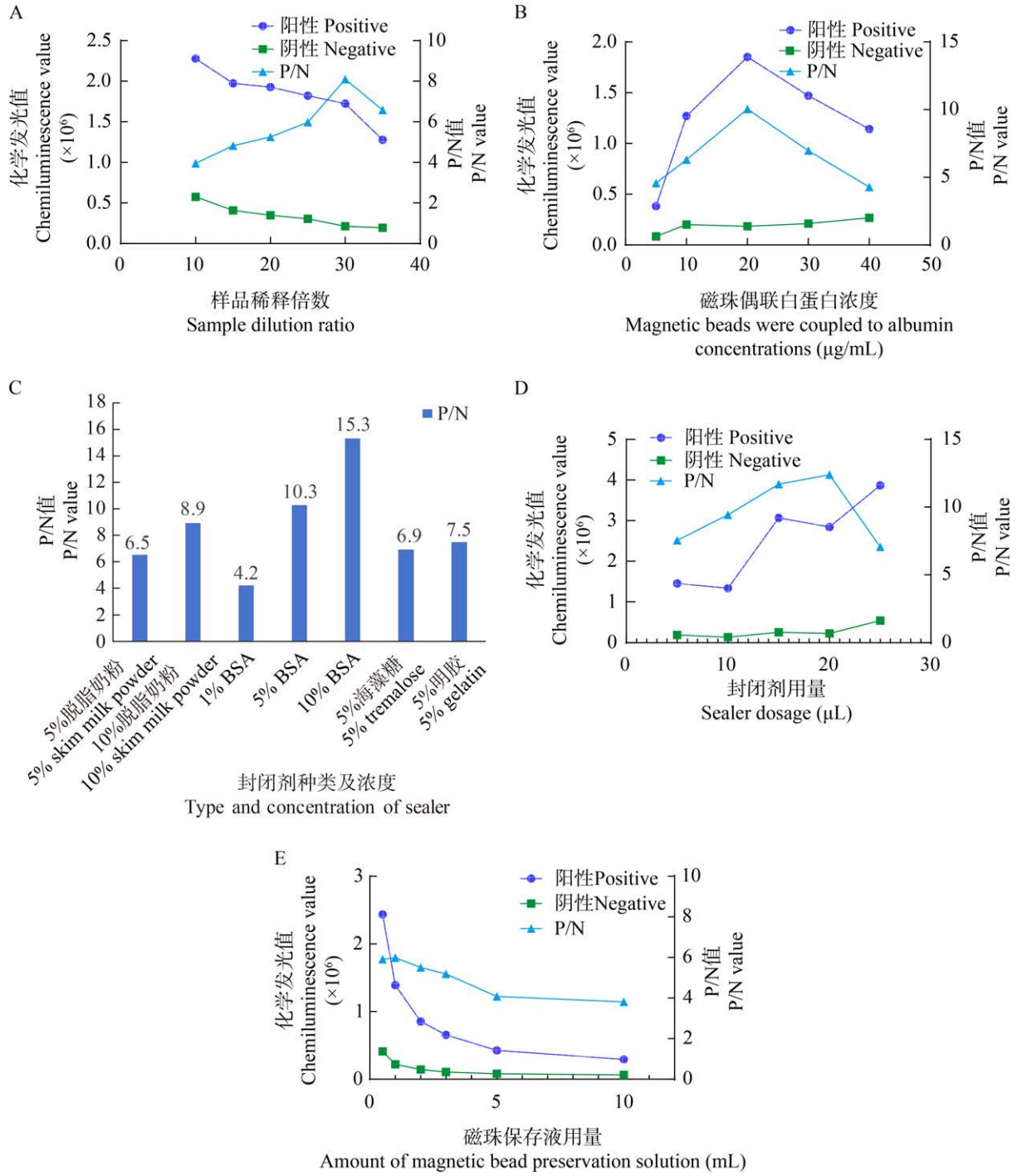

图 1 磁珠偶联条件优化结果 A：最优样品稀释倍数的确定；B：最优磁珠偶联蛋白用量的确定；C：封闭剂种类及浓度的确定；D：封闭剂量的确定；E：磁珠保存液量的确定。

Figure 1 Results of optimization of magnetic bead coupling conditions. A: Determination of optimal sample dilution; B: Determination of the optimal amount of magnetic bead-coupled protein; C: Determination of type and concentration of sealer; D: Determination of blocking dose; E: Determination of the amount of magnetic bead preservation solution.

阳性血清化学发光值，重复检测 3 次，选取 3 次发光值的平均值，计算出 P/N 值。如表 1 所示，当 MES 偶联缓冲液 pH 值为 8.0 时对应的 P/N 值最大，所以 pH 8.0 为最优的 MES 偶联缓冲液 pH。

2.3 PRRSV 重组 N 蛋白浓度的确定

活化完成的羧基磁珠分别与 5、10、20、30、40 μg/mL 的 PRRSV 重组 N 蛋白偶联，在其他条件相同的情况下，使用全自动化学发光免疫分析仪检测阴、阳性血清化学发光值，重复检测 3 次，用 3 次发光值的平均值计算出 P/N 值。如图 1B 所示，当蛋白用量为 20 μg/mL 时，P/N 值最大，蛋白与羧基磁珠偶联更充分，并且非特异性结合更少。因此用 20 μg/mL 为最佳 PRRSV 重组 N 蛋白用量。

2.4 封闭剂种类及浓度的确定

将 5%脱脂奶粉、10%脱脂奶粉、1% BSA、5% BSA、10% BSA、5%海藻糖、5%明胶作为封闭剂加入已经与 PRRSV 重组 N 蛋白偶联的羧基磁珠中，在其他条件相同的情况下，使用全自动化学发光免疫分析仪检测阴、阳性血清化学发光值，重复检测 3 次，用 3 次检测的血清化学发光值的平均值计算出 P/N 值。如图 1C 所示，其中 10% BSA 效果最好，P/N 值最大，所以 10%BSA 为最佳封闭剂。

2.5 封闭剂量的确定

以 10% BSA 作为封闭剂，按照 5、10、15、20、25 μL 分别加入偶联磁珠中，在其他条件相同的情况下，使用全自动化学免疫分析仪检测 PRRSV 阴性血清和阳性血清的发光值，重复检测 3 次，用 3 次检测的血清化学发光值的平均值计算 P/N 值。如图 1D 所示，当封闭剂 20 μL 时 P/N 值最大，所以 20 μL 为最佳封闭剂用量。

2.6 磁珠保存液量的确定

分别向已经封闭完成的磁珠中加入 0.5、1、2、3、5、10 mL 磁珠保存液，放入 4 ℃冰箱保存 24 h，使用全自动化学发光免疫分析仪测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，重复 3 次，计算出 P/N 值。如图 1E 所示，磁珠保存液量越少，非特异性反应增加，检测成本越高。当磁珠保存液为 0.5 mL 和 1 mL 时，P/N 值接近，1 mL 磁珠保存液保存的免疫磁珠与血清结合时非特异性反应更小，因此，将磁珠保存液的工作体积定为 1 mL。

2.7 兔抗猪 IgG-AP 酶标二抗浓度的确定

将兔抗猪 IgG-AP 酶标二抗稀释成 1:10 000、1:20 000、1:30 000、1:40 000、1:50 000，分别与免疫磁珠结合，放入全自动化学发光免疫分析仪中，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，重复检测 3 次，利用血清的化学发光平均值，计算出 P/N。如表 2 所示，当兔抗猪 IgG-AP 酶标二抗稀释成 1:20 000 时，P/N 值最大。因此最佳的兔抗猪 IgG-AP 酶标二抗稀释度为 1:20 000。

2.8 血清加样量的确定

将全自动化学发光免疫分析仪上的加样量改为 20、25、30、35、40 μL，在其他条件相同的情况下，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，重复 3 次，使用血清化学发光值平均值，计算出 P/N 值，如图 2A 所示，当血清加样量为 30 μL 时，P/N 值最大，所以 30 μL 为最佳加样量。

表 1 磁珠偶联 pH 优化结果

Table 1 Results of pH optimization of magnetic bead coupling

pH	阳性样品相对光单位 Positive sample relative light unit	阴性样品相对光单位 Negative sample relative light unit	P/N 值 P/N value
5.0	917 414	223 699	4.1
6.0	795 428	122 014	6.5
7.0	1 322 693	170 463	7.7
8.0	880 338	108 423	8.1
9.0	607 464	139 704	4.3

2.9 磁珠加样量的确定

将全自动化学发光免疫分析仪上的磁珠加样量改为 5、10、15、20、25 μL，在其他条件相同的情况下，测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，重复检测 3 次，用血清化学发光值的平均值计算出 P/N 值。如图 2B 所示，当磁珠加样量为 15 μL 时，P/N 值最大，所以 15 μL 为最佳磁珠加样量。

2.10 一步反应时间的确定

将全自动化学发光免疫分析仪上的一步反应时间设置为 10、15、20、25、30 min，在其他条件相同的情况下，使用全自动化学发光免疫分析仪测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，重复 3 次，计算出 3 次血清化学发光值的平均值，再用平均值计算出 P/N 值。见如图 2C 所示，当一步反应时间为 20 min 时，对应的 P/N 值最大，所以一步反应最佳时间为 20 min。

2.11 二步反应时间的确定

将全自动化学发光免疫分析仪上的二步反应时间设置为 3、5、10、15、20 min，在其他条件相同的情况下，使用全自动化学发光免疫分析仪测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，重复检测 3 次，用血清化学发光值的平均值计算出 P/N 值。如图 2D 所示，当二步反应时间为 10 min 时，P/N 值最大，所以 10 min 为最佳二步反应时间。

2.12 底物反应时间的确定

将全自动化学发光免疫分析仪上的底物反应时间设置为 1、3、5、7、9 min，在其他条件相同的情况下，使用全自动化学发光免疫分析仪测定 PRRSV 阴、阳性血清的化学发光值，重复检测 3 次，用 PRRSV 阴、阳性血清化学发光值的平均值计算出 P/N 值。如图 2E 所示，当底物反应时间为 3 min 时，P/N 值最大，所以底物反应时间 3 min 为最佳。

2.13 绘制标准曲线

将高免的 PRRSV 阳性血清倍比稀释，利用 PRRSV ELISA 抗体检测试剂盒检测，根据检测结果确定出 ELISA 检测呈阳性的最大稀释滴度，该稀释滴度下的血清抗体含量定义为 100 U，假设此时血清稀释度为 1:4 096，则 1:2 048 稀释血清为 200 U，1:8 192 稀释血清为 50 U，而未加血清的稀释液血清为 0 U，以此类推，选出稀释血清为 0、100、200、400、800、1 600 U 作为标准品，测定化学发光值。使用 OriginPro 软件对数据进行深入分析，将抗体含量值设为横坐标，化学发光值设为纵坐标，得到一条 R^2 为 0.999 65 的曲线，如图 3 所示，该曲线为该检测方法的标准曲线。

2.14 阴阳临界点的确定结果

选取经 ELISA 检测过的 233 份背景清晰的猪血清(PRRSV 阴性血清 122 份，PRRSV 阳性血清 111 份)，通过本实验建立的方法检测样品含量值。应用 MedCalc 软件将浓度值绘制成的 ROC 曲线如图 4 所示，该 ROC 曲线设置特异性为横坐标，灵敏度为纵坐标，ROC 曲下面积(area

表 2 兔抗猪 IgG-AP 酶标二抗稀释度优化结果

Table 2 Results of dilution optimization of rabbit anti-porcine IgG-AP enzyme-labeled secondary antibody

酶标二抗稀释度 Dilution of enzyme-labeled secondary antibody	阳性样品相对光单位 Positive sample relative light unit	阴性样品相对光单位 Negative sample relative light unit	P/N 值 P/N value
1:10 000	3 047 530	350 228	8.7
1:20 000	2 033 636	156 735	12.9
1:30 000	1 541 297	123 551	12.5
1:40 000	812 393	106 810	7.6
1:50 000	647 871	87 047	7.4

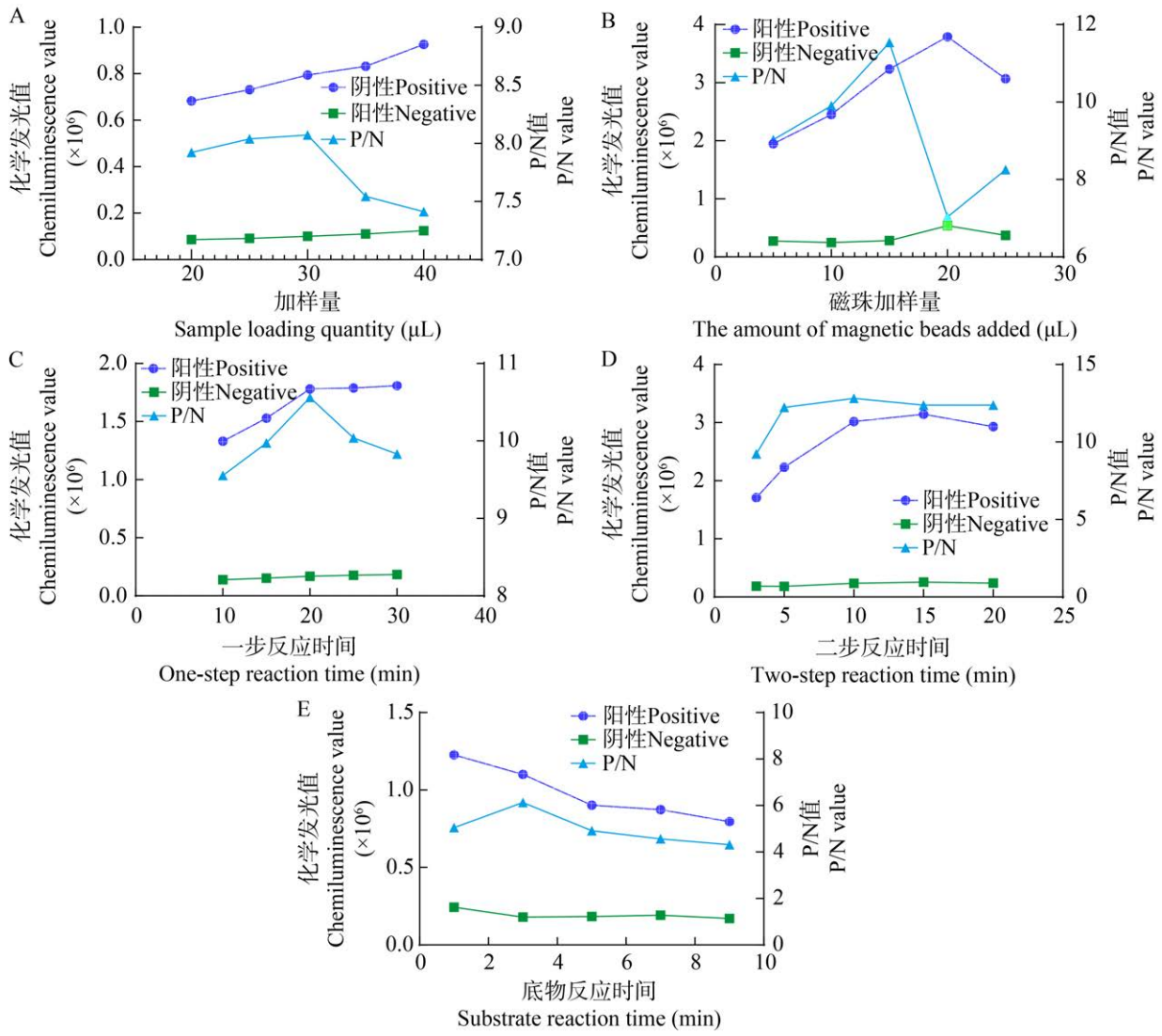

图 2　磁珠反应条件的优化　A：血清加样量的确定；B：磁珠加样量的确定；C：一步反应时间的确定；D：二步反应时间的确定；E：底物反应时间的确定。

Figure 2　Optimization of reaction conditions for magnetic beads. A: Determination of The amount of serum addition; B: Determination of The amount of magnetic beads addition; C: Determination of one-step reaction time; D: Determination of two-step reaction time; E: Determination of substrate reaction time.

under the curve, AUC)为 0.999，显著性水平 P(面积=0.5)<0.000 1，灵敏度为 99.1%，特异性为 98.4%，Youden 指数最大值为 0.974 6，对应的浓度为 32.56 U。因此抗体含量大于 32.56 U 时，判定为血清 PRRSV 抗体阳性，抗体水平浓度小于 32.56 U 时，判定为血清 PRRSV 抗体阴性。

2.15　特异性试验结果

选取 ASFV、CSFV、JEV、PPV、PCV2、PEDV、SS、PRRSV 抗体阳性的标准血清，利用全自动化学发光仪按照上述实验设计的程序检测猪血清的 PRRSV 抗体化学发光值，如表 3 所示，除 PRRSV 抗体阳性标准血清外，推算出猪血清的 PRRSV 抗体化学发光值含量均小于 32.56 U。

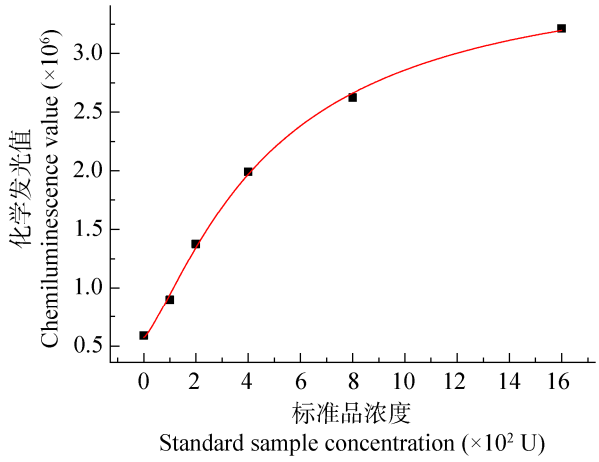

图 3　不同浓度的血清抗体对应的相对光单位

Figure 3　Relative light unit corresponding to different concentrations of serum antibodies.

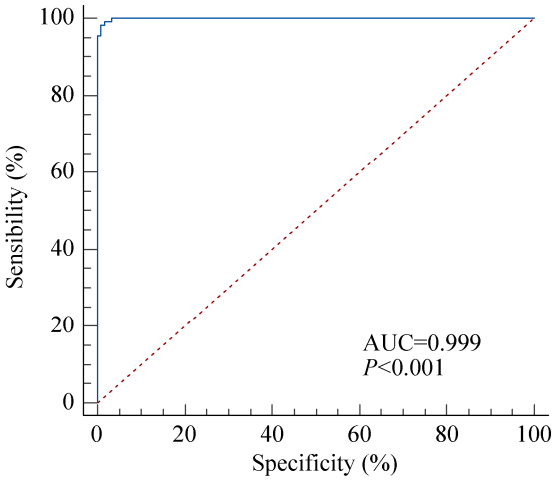

图 4　受试者工作特征曲线

Figure 4　Receiver operating characteristic curve.

2.16　灵敏度试验结果

选取一份阳性样本，用 PBS 对其进行倍比稀释，再将稀释后的样本分别用化学发光免疫分析法和 ELISA 检测方法同时检测。表 4 结果显示，该方法和商品化 ELISA 试剂盒检测灵敏度相当。

2.17　重复性试验结果

选取了包含 5 份 PRRSV 抗体阳性血清和 5 份 PRRSV 抗体阴性血清在内的 10 份猪血清样本，在已建立的条件下，批内试验使用同一批次磁珠，每份样品重复检测 10 次，计算出变异系数，结果显示血清浓度变异系数为 2.79%−5.32%。

选取了包含 5 份 PRRSV 抗体阳性血清和 5 份 PRRSV 抗体阴性血清在内的 10 份猪血清样本，批间试验使用 3 份不同批次的免疫磁珠，在同样的条件对每份血清样品重复进行 3 次 PRRSV 抗体浓度的测定，计算出每份血清样品 PRRSV 抗体浓度值的变异系数，结果显示含量变异系数在 1.05%−11.31%。结果见表 5，2 次实验所得结果的变异系数均保持在 15% 以下，这充分证明该检测方法的重复性表现良好。

表 3　用 8 种不同猪病毒血清抗体验证 CLIA 抗体检测方法的特异性

Table 3　Serum antibodies against 8 different swine viruses were used to verify the specificity of the CLIA antibody detection method

项目 Item	相对光单位 Relative light unit	浓度值 Concentration value (U)	结果 Result
ASFV	124 043	7.07	–
CSFV	225 459	17.94	–
JEV	253 901	19.35	–
PPV	179 073	12.88	–
PCV2	288 107	24.99	–
PEDV	265 808	22.45	–
SS	85 696	3.14	–
PRRSV	1 831 702	328.43	+

+：阳性；−：阴性。

+: Positive; −: Negative.

2.18　与商品试剂盒符合率的结果

选取 2023 年 10 月份后广东省各猪场送往广东省农业科学院动物卫生研究所诊断中心实验室检测的 129 份猪血清样本，其中有免疫 PRRSV 疫苗后、感染痊愈后、未感染且未接种 PRRSV 疫苗的猪血清样本。将 129 份猪血清样本分别通过 PRRSV 抗体检测 ELISA 商品试剂盒和本研究建立的方法进行检测。利用 CLIA

表 4 CLIA 抗体检测方法与 ELISA 抗体检测方法灵敏度比较

Table 4 Comparison of the sensitivity of CLIA antibody detection method and ELISA antibody detection method

稀释倍数 Dilution ratio	CLIA			ELISA	
	相对光单位 Relative light unit	浓度值 Concentration value (U)	结果 Result	S/P	结果 Result
2	828 928	97.95	+	0.633	+
4	499 872	50.82	+	0.409	+
8	298 403	26.18	–	0.243	–
16	222 966	17.67	–	0.163	–
32	143 739	9.13	–	0.092	–
64	100 950	4.69	–	0.047	–
128	77 064	2.28	–	0.013	–

+：阳性；−：阴性。

+: Positive; −: Negative.

表 5 重复性试验结果

Table 5 Results of repeatability experiments

血清 Serum	数量 Number	批内试验 Intra-batch repeatability test		批间试验 Inter-batch repeatability test	
		平均值±标准差 Mean±SD	变异系数 Coefficient of variation (%)	平均值±标准差 Mean±SD	变异系数 Coefficient of variation (%)
阳性样品 Positive sample	5	333.87±14.38	4.31	69.08±1.23	1.78
		231.57±9.27	4.00	159.13±1.68	1.05
		52.63±1.52	2.88	35.73±0.59	1.65
		331.83±10.14	3.05	152.53±5.79	3.79
		122.04±3.41	2.79	225.16±3.23	1.43
阴性样品 Negative sample	5	10.58±0.44	4.15	19.57±1.24	6.33
		14.48±0.65	4.48	20.38±0.61	2.99
		13.61±0.50	3.67	11.49±1.30	11.31
		28.91±1.34	4.63	10.75±0.31	2.88
		27.81±1.48	5.32	12.15±0.91	7.48

和 ELISA 检测方法共同检测出来的阳性样本为 45 份，阴性样本为 79 份，另外还有 4 份血清，CLIA 检测为阳性，而 ELISA 检测为阴性，1 份样品，ELISA 检测为阳性，CLIA 检测为阴性，2 种检测方法之间的阳性样品符合率高达 93.8% (表 6)。对于阴性样品符合率为 96.3%。综合来看，2 种方法的总符合率为 96.1%。

3 讨论

PRRSV 是威胁全球养猪业的主要传染病，PRRSV 是 RNA 病毒，突变率极高，进化速度快，毒株多样性不断提高，新毒株和重组毒株的出现频率不断增加，猪场中多种 PRRSV 毒株的传播增加可能会降低疫苗的效力，给防控带

表 6 符合率试验结果

Table 6 Coincidence rate experimental results

试剂盒种类 Types of kits		猪繁殖与呼吸综合征 ELISA 抗体检测试剂盒 Antibody detection of porcine reproductive and respiratory syndrome ELISA kit		
		阳性 Positive	阴性 Negative	共计 Total
CLIA	阳性 Positive	45	4	49
	阴性 Negative	1	79	80
	共计 Total	46	83	129

来很大难度[13]。我国猪繁殖与呼吸综合征防控措施较为完善，根据《动物疫病净化场评估技术规范(2023 版)》[14]，猪繁殖与呼吸综合征免疫无疫猪场标准为种猪场种猪、生产母猪和后备种猪抽检病原阴性；净化标准是在达到免疫无疫连续 2 年前提下，PRRSV 抗体为阴性，停止免疫 2 年以上，无临床病例。近几年种猪场积极执行该标准，PRRSV 抗体阴性的比例大幅度增加。N 蛋白作为 PRRSV 主要结构蛋白，具有丰富的抗原表位，免疫原性强，并且序列高度保守，所以 N 蛋白是常被用于 PRRSV 血清学诊断的蛋白之一。

目前 ELISA 是 PRRSV 血清学检测的最常用的方法之一，但操作复杂、检测用时长、易出现人为失误导致的假阳性和假阴性的结果。CLIA 是一种融合了高特异性免疫反应与高灵敏度化学发光的技术手段，利用羧基磁珠作为固相载体，羧基磁珠表面具有丰富的官能基团，能与抗原通过共价键的形式结合[15]，增强了蛋白与磁珠的结合能力，进而实现了信号的放大，这使得检测的线性范围有了显著的提升[16]。CLIA 因其高灵敏度的特点，当血清样本未做稀释时，免疫磁珠易与血清中其他成分发生非特异性结合，导致背景值升高，阴性与阳性血清化学发光值难以区分，通过对样品进行稀释，降低非特异性反应，使得特异性反应更加充分地显现出来，阴性血清发光值出现明显的下降趋势，当阳性血清发光值降到一定范围后缓慢下降，P/N 值逐渐增大，并在 1:30 时出现峰值。同时封闭剂的量会对免疫磁珠的检测效果造成影响，封闭剂不足会导致非特异性结合增加，封闭剂用量过多，会导致封闭剂的浪费，增加成本，本研究经过优化，选择 20 μL 10%的 BSA 进行封闭，检测效果最佳。另外，磁珠保存液用量也会对免疫磁珠检测效果造成影响，免疫磁珠需要储存在磁珠保存液中保持其活性，根据磁珠保存液用量优化实验结果判断，在磁珠保存液用量少的情况下，免疫磁珠聚集，检测过程中会造成抗体与免疫磁珠结合产生空间位阻，进而导致非特异性增加，并且磁珠瓶中的免疫磁珠在最终会有剩余，该部分无法被机器抽取使用，而造成损耗，磁珠保存液用量越大，免疫磁珠损耗越小，所以当磁珠保存液 1 mL 和 0.5 mL 时 P/N 值接近，但磁珠保存液 1 mL 能提高磁珠的利用率，降低损耗。当前，国内在进行 PRRSV 抗体检测时，普遍倾向于使用进口的 ELISA 试剂盒，进口 PRRSV 抗体检测试剂盒之所以在国内被广泛采用，并非因为其特异性和灵敏度绝对优于国内产品，而是由于进口试剂盒在批内和批间表现出较小的差异性，使用不同批次的进口试剂盒对同一份样品进行检测时，能够获得相对稳定的结果[17]。稳定性是检验检测方法是否合格的一个重要标准，本化学发光检测方法在设计过程中曾遇到稳定性差的问题，后通过大量实验发现酶标二抗对稳定性会造成很大的影响，酶标二抗在配制的当天使用，血清背景值会升高，连续几天使用该酶标二抗检测血清样品，血清样品的发光值会随着时间推移而下降，2–3 d 后趋于稳定，所以该检测方法所使用的酶标二抗均是提前配制并放置 3 d 以上。在本研究中用建立的化学发光 PRRSV 抗体检测方法与 PRRSV 抗体 ELISA 检测方法共同检测 129 份临床样品，其中有 4 份

血清 ELISA 检测为阴性，CLIA 检测为阳性，1 份血清 ELISA 检测为阳性，CLIA 检测为阴性，后期将对这 5 份样品进行抗体中和试验，进一步确定抗体水平。

化学发光检测方法利用羧基磁珠作为固相载体，羧基磁珠表面具有丰富的官能基团，在相同体积下，能包被更多的抗原，与同一份血清样品结合时，能更好地捕捉到抗体，致使化学发光检测方法灵敏度高。本研究所建立的 PRRSV 化学发光检测方法与目前常见的 PRRSV 抗体检测 ELISA 方法成本相当，但检测时间不到 ELISA 检测方法的三分之一，自动化程度高，可以节约人工，非常适用于实验室大批量的血清样本同时检测。CLIA 对 10 份不同的血清进行重复性试验，批内变异系数和批间变异系数均小于 15%，实现了 PRRSV 抗体高特异性、高灵敏度、高重复性、自动化、快速检测。

4 结论

本研究建立的化学发光检测方法是将 PRSSV 重组 N 蛋白共价连接到羧基磁珠上，利用 PRRSV 重组 N 蛋白与血清中 N 蛋白抗体发生免疫反应，从而检测出血清中 PRRSV-N 蛋白抗体水平。羧基磁珠具有较大的比表面积，能更快地在血清中捕捉到抗体，使得化学发光检测方法具备高特异性、高灵敏度、高重复性等特点，能有效缩短检测时间，非常适合于大规模临床样品的筛查。此外，它也为 PRRSV 的防控与净化工作提供了有力的技术支持。

作者贡献声明

黄亦奇：设计实验方案并实施，负责样本的检测与分析，帮助实验正常进行，在整个研究过程中起到主导作用，撰写论文主要内容；温肖会、吕殿红、罗胜军和李家奎：对论文进行全面审核，从专业角度提供修改建议，完善论文的逻辑架构和学术表达。宋帅、向国庆：提供研究思路，参与论文的修改与完善，对数据呈现和结论推导部分提出建设性意见。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

[1] DENG YX, PAN YF, WANG DD, ZHOU QF, BI YZ, CHEN F, SONG YH. Complete genome sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain QY2010 reveals a novel subgroup emerging in China[J]. Journal of Virology, 2012, 86(14): 7719-7720.

[2] YE N, WANG B, FENG W, TANG DY, ZENG ZY. PRRS virus receptors and an alternative pathway for viral invasion[J]. Virus Research, 2022, 320: 198885.

[3] VU HLX, PATTNAIK AK, OSORIO FA. Strategies to broaden the cross-protective efficacy of vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Veterinary Microbiology, 2017, 206: 29-34.

[4] HAN K, SEO HW, PARK C, OH Y, KANG I, CHAE C. Comparative pathogenesis of type 1 (European genotype) and type 2 (North American genotype) porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected boar[J]. Virology Journal, 2013, 10: 156.

[5] ALLENDE R, LEWIS TL, LU Z, ROCK DL, KUTISH GF, ALI A, DOSTER AR, OSORIO FA. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions[J]. Journal of General Virology, 1999, 80 (Pt 2): 307-315.

[6] SNIJDER EJ, MEULENBERG JJ. The molecular biology of arteriviruses[J]. The Journal of General Virology, 1998, 79 (Pt 5): 961-979.

[7] ZHENG YJ, LI G, LUO Q, SHA HY, ZHANG H, WANG RN, KONG WL, LIAO JD, ZHAO MM. Research progress on the N protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1391697.

[8] 高裴苑. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白间接 ELISA 方法的建立及应用[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2023.
GAO PY. Establishment and application of an indirect ELISA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus N protein[D]. Hohhot: Master’s Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2023 (in Chinese).

[9] KIMMAN TG, CORNELISSEN LA, MOORMANN RJ, REBEL JMJ, STOCKHOFE-ZURWIEDEN N. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology[J]. Vaccine, 2009, 27(28): 3704-3718.

[10] THANAWONGNUWECH R, SURADHAT S. Taming PRRSV: Revisiting the control strategies and vaccine design[J]. Virus Research, 2010, 154(1/2): 133-140.

[11] 孙雨, 宋晓晖, 肖颖, 王睿男, 李秀梅, 任雪建, 李雪刚, 魏巍, 杨林, 王传彬. 小反刍兽疫病毒抗体化学发光免疫分析检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医,

2020, 52(10): 109-114.
SUN Y, SONG XH, XIAO Y, WANG RN, LI XM, REN XJ, LI XG, WEI W, YANG L, WANG CB. Establishment of chemiluminescent immunoassay for detection of antibody against peste des petits ruminant virus[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 52(10): 109-114 (in Chinese).

[12] 程博文, 张宏顺. 化学发光免疫分析技术的应用进展[J]. 中国工业医学杂志, 2022, 35(3): 237-240.
CHENG BW, ZHANG HS. Application progress of chemiluminescence immunoassay[J]. Chinese Journal of Industrial Medicine, 2022, 35(3): 237-240 (in Chinese).

[13] SAENGLUB W, JANTAFONG T, MUNGKUNDAR C, ROMLAMDUAN N, PINITKIATISAKUL S, LEKCHAROENSUK P. Genetic signatures of the immune-escaping type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus in farms with a robust vaccination program[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 144: 104166.

[14] 中国动物疫病预防控制中心(农业农村部屠宰技术中心). 动物疫病净化场评估管理指南(2023 版)[EB/OL]. 2023. https://www.cadc.net.cn/sites/jinghua/jhjs/202404/t20240424_122321.html.
China Center for Animal Disease Control and Prevention (Slaughter Technology Center of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs). Guidelines for the evaluation and management of animal disease purification plants (2023 version)[EB/OL]. 2023. https://www.cadc.net.cn/sites/jinghua/jhjs/202404/t20240424122321.html (in Chinese).

[15] 石良, 王锡昌, 刘源, 卢瑛. 羧基化磁性纳米微球的表面生物修饰方法[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(1): 71-77.
SHI L, WANG XC, LIU Y, LU Y. Surface biological modification research on carboxylated magnetic nanoparticles[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, 31(1): 71-77 (in Chinese).

[16] 向国庆, 孙菁晗, 宋帅, 温肖会, 吕殿红, 贾春玲, 牛瑞辉, 顾有方, 罗胜军. 非洲猪瘟病毒抗体化学发光检测方法的建立与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(4): 1362-1371.
XIANG GQ, SUN JH, SONG S, WEN XH, LYU DH, JIA CL, NIU RH, GU YF, LUO SJ. Establishment and application of chemiluminescent detection method for African swine fever virus antibody[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 51(4): 1362-1371 (in Chinese).

[17] 陈汉锶. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白间接 ELISA 方法的建立[D]. 广州: 仲恺农业工程学院硕士学位论文, 2019.
CHEN HS. Establishment of ELISA method for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2019 (in Chinese).