

管式磁微粒非洲猪瘟病毒 pp62 蛋白化学发光抗体检测方法的建立

向国庆^{#1,2}, 宋帅^{#1}, 温肖会¹, 吕殿红¹, 贾春玲¹, 牛瑞辉¹, 顾有方², 罗胜军*¹

1 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

2 安徽科技学院动物科学学院 动物营养调控与健康安徽省重点实验室, 安徽 凤阳 233100

向国庆, 宋帅, 温肖会, 吕殿红, 贾春玲, 牛瑞辉, 顾有方, 罗胜军. 管式磁微粒非洲猪瘟病毒 pp62 蛋白化学发光抗体检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5614-5624.

XIANG Guoqing, SONG Shuai, WEN Xiaohui, LYU Dianhong, JIA Chunling, NIU Ruihui, GU Youfang, LUO Shengjun. A carboxylated magnetic bead-based CLIA method for detecting anti-pp62 antibody of African swine fever virus[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5614-5624.

摘要: 【背景】非洲猪瘟(African swine fever, ASF)作为高致病性传染病, 给我国生猪养殖业造成了严重的经济损失, 因此建立快捷、灵敏的诊断方法至关重要。【目的】建立一种管式非洲猪瘟病毒 pp62 蛋白化学发光抗体检测方法。【方法】以重组 pp62 蛋白作为包被抗原, 羧基磁珠(carboxylic magnetic beads)作为固相载体, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)标记的兔抗猪 IgG 作为酶标二抗, 通过对反应条件进行优化, 采用非洲猪瘟国家参考品作为溯源血清绘制出标准曲线, 建立基于 ASFV pp62 蛋白的化学发光抗体检测方法。【结果】用建立的化学发光方法检测 277 份临床样品血清, 通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析确定阴性、阳性临界值, 并确定判定标准: 浓度值>140.02 U 时为抗体阳性, 浓度值<140.02 U 时为抗体阴性。此方法对 6 种不同的病原血清抗体进行检测均无交叉反应, 且批内和批间变异系数均在 10%以内, 与商品化非洲猪瘟抗体检测试剂盒的符合率达 96.7%。【结论】本研究建立的管式非洲猪瘟病毒化学发光抗体检测方法具有良好的特异性、敏感性和重复性, 可为非洲猪瘟早期监测及

资助项目: 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目(2023KJ119); 广东省科技计划(2021B1212050021); 广东省基础与应用基础研究基金(2022A1515012239); 安徽高校协同创新项目(GXXT-2019-035); 滁州市科技计划(2019ZN003); 安徽科技学院重点学科建设项目(AKZDXK2015A04)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Guangdong Provincial Modern Agriculture Industry Common Key Technology Research and Development Innovation Team Construction Project (2023KJ119), the Science and Technology Project of Guangdong Province (2021B1212050021), the Basic and Applied Basic Foundation of Guangdong Province (2022A1515012239), the Collaborative Innovation Program of Anhui Province (GXXT-2019-035), the Chuzhou Science and Technology Program (2019ZN003), and the Key Discipline Construction Program of Anhui Science and Technology University (AKZDXK2015A04).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: luoshengjun@gdaas.cn

Received: 2023-07-20; Accepted: 2023-10-05; Published online: 2023-11-23

试剂盒研发提供参考。

关键词: 非洲猪瘟病毒; 重组 pp62 蛋白; 羧基磁珠; 化学发光检测方法

A carboxylated magnetic bead-based CLIA method for detecting anti-pp62 antibody of African swine fever virus

XIANG Guoqing^{#1,2}, SONG Shuai^{#1}, WEN Xiaohui¹, LYU Dianhong¹, JIA Chunling¹, NIU Ruihui¹, GU Youfang², LUO Shengjun^{*1}

1 Guangdong Provincial Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Technology of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Livestock and Poultry Disease Prevention, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

2 Anhui Province Key Laboratory of Animal Nutrition Regulation and Health, College of Animal Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China

Abstract: [Background] African swine fever (ASF), as a highly pathogenic infectious disease, has caused serious economic losses in China's pig farming industry, so it is crucial to establish a fast and sensitive diagnostic method. **[Objective]** To develop a chemiluminescence immunoassay (CLIA) for the detection of the anti-pp62 antibody of African swine fever virus (ASFV). **[Methods]** The recombinant pp62 protein was used as the coating antigen, carboxylated magnetic beads as the solid-phase carrier, and alkaline phosphatase (AP)-conjugated rabbit anti-swine IgG as the secondary antibody. The reaction conditions were optimized, and the standard curve was established with the national reference product of ASFV as the traceable serum. Finally, a CLIA method for detecting the anti-pp62 antibody of ASFV was established. **[Results]** The established CLIA method was used to test 277 clinical samples, and the negative and positive thresholds were determined by the receiver operating characteristic (ROC) curve. The concentrations >140.02 U and <140.02 U were determined as antibody positive and negative, respectively. Furthermore, the established method was used to detect the serum antibodies to six different pathogens, which showed no cross-reactivity, the intra- and inter-batch coefficients of variation below 10%, and a compliance rate of 96.7% with the results obtained by commercial ASFV antibody detection kits. **[Conclusion]** The CLIA method established for the detection of ASFV has good specificity, sensitivity, and reproducibility, which can provide a reference for the early monitoring of ASF and the research and development of the relevant kits.

Keywords: African swine fever virus; recombinant pp62 protein; carboxylated magnetic beads; chemiluminescence immunoassay

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一种急性、高度传染性和致命性的传染病,同时是阿斯法病毒(Asfarviridae)家族的唯一成

员^[1]。非洲猪瘟病毒高度稳定,很容易通过蜱虫、受感染的猪、受污染的猪肉产品或其他污染物传播^[2]。该病的发病特征为病程较短并伴有高烧、出血等症状,急性感染的致死率高达

100%^[3-4]。非洲猪瘟病毒是一种基因组全长 170–194 kb 的双链 DNA 病毒,可编码 150–200 个不同的病毒蛋白,其中包括 68 种结构蛋白和 100 多种非结构蛋白^[5-6]。pp62 蛋白和 pp220 蛋白主要存在于核心壳内,可以通过蛋白水解裂解成成熟的病毒蛋白,并组装成含有 DNA 的核壳^[7]。其通常被内切蛋白酶 pS273R 切割为 p8、p15、p35 及 p5、p14、p34、p37、p150,整个过程对于非洲猪瘟病毒颗粒的成熟和传染性至关重要^[8-9]。

对于 ASFV 的早期感染诊断主要以 PCR 类分子检测方法为主,但近年来随着非洲猪瘟病毒的不断变异,其临床症状不明显且临床样品病毒载量低,用 PCR 类分子检测方法容易出现漏检现象。当猪只在未表现前期临床症状时,非洲猪瘟病毒可在猪体内形成相应抗体。因此,通过血清学方法检测抗体为现在流行的变异非洲猪瘟病毒早期检测和监测提供重要帮助,而现有非洲猪瘟病毒抗体的检测方法主要以酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)为主^[10-11],但非洲猪瘟 ELISA 抗体检测方法一般检测时间为 2 h 以上,操作繁杂,检测过程中会出现假阳性和假阴性概率。化学发光免疫分析(chemiluminescent immunoassay, CLIA)技术由化学发光反应与免疫反应相结合,是继酶联免疫反应和放射免疫反应的一种新型检测方法。目前该方法以全自动检测趋势迅速发展,具备灵敏度高、检测时间短、操作简捷、高通量及联检等突出优势。现今国内外对 ASFV(pp62)蛋白作为诊断抗原的相关研究较少。本研究将重组 pp62 蛋白作为诊断抗原,通过各项条件优化建立一种敏感性高、特异性强、操作简便的 ASFV 间接 CLIA 抗体检测方法,以期对 ASFV 抗体的快速定量检测及早期诊断提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

非洲猪瘟重组 pp62 蛋白购自江苏东抗医药生物科技有限公司;兔抗猪 IgG-AP 抗体购自 Gene Tex 公司;JSR 羧基磁珠购自北京博尔迈生物技术有限公司;化学发光底物、包被磁珠保存液购自兰研生物科技有限公司;非洲猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒购自北京金诺百泰生物技术有限公司。全自动化学发光免疫分析仪购自重庆科斯迈有限公司。

1.2 血清样品

非洲猪瘟标准阴性、阳性血清国家参考品购自于中国兽医药品监察所;非洲猪瘟病毒(ASFV)阳性血清、猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)阳性血清、猪伪狂犬病毒 gB (porcine pseudorabies virus gB, PRV-gB)阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)阳性血清、口蹄疫 O 型(foot-and-mouth disease virus type O, FMDV-O)阳性血清、口蹄疫 A 型(foot-and-mouth disease virus type A, FMDV-A)阳性血清、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)阳性血清以及来自不同猪场的阴性样品血清均由中国农业科学院兰州兽医研究所家畜病原学国家重点实验室制备与保存。

1.3 方法

1.3.1 羧基磁珠偶联及方法建立流程

取 1 mg 羧基磁珠加入 1 mL 磁珠缓冲溶液分散均匀,置于磁力架上磁分离 2 min,去上清,重复清洗 2 次,用 100 μ L 磁珠缓冲溶液重悬磁珠,使羧基磁珠混合液浓度为 10 mg/mL。取 10 μ L 磁珠活化剂加入上述羧基磁珠混合液中,室温涡旋振荡 30 min 进行活化。活化完成后进行磁分离去上清,加入磁珠缓冲溶液分散均匀后置

磁力架上磁分离 2 min, 去上清, 重复清洗 2 次去除混合液中的活化剂, 最后用 100 μ L 磁珠缓冲溶液重悬定容。选用 30 μ g/mL 的 ASFV(pp62) 重组蛋白加入活化完成的磁珠混合液中, 室温涡旋振荡 3 h。偶联完成后加入 30 μ L 的牛血清白蛋白(100 mg/mL)封闭磁珠表面未结合抗原的位点, 室温涡旋振荡 3 h。封闭完成后用磁珠清洗液分散均匀, 置于磁力架上磁分离 2 min, 去上清, 重复清洗 2 次, 保存于 2 mL 磁珠保存液中, 即得到磁珠工作液。将上述得到的磁珠工作液通过全自动化学发光免疫分析仪检测阴性、阳性血清样品并进行各反应条件优化。

1.3.2 磁珠偶联 pH 值的优化

将磁珠偶联环境 pH 值分别调节为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 同时检测阴性、阳性血清样品并读取化学发光值, 以阴阳性比值(positive to negative ratio, P/N)最大时为磁珠偶联时最佳 pH 值。

1.3.3 ASFV(pp62)蛋白浓度的优化

按磁珠偶联时最佳 pH 值, 选用 5、10、20、30 和 40 μ g/mL 不同蛋白对羧基磁珠进行偶联, 同时检测阴性、阳性血清样品并读取化学发光值, 以 P/N 值达到最大时确定为最优蛋白浓度。

1.3.4 封闭剂量的优化

将已确定的最佳蛋白浓度与磁珠偶联形成免疫磁珠, 免疫磁珠在偶联过程中会出现非特异性结合位点, 为降低非特异性反应, 分别选用 10、20、30 和 40 μ L 的 100 mg/mL 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)进行封闭处理, 读取阴性、阳性血清样品化学发光值, 以 P/N 为最大值时选择为最优的封闭剂量。

1.3.5 AP 酶标二抗稀释度的优化

通过酶稀释液将酶标二抗稀释为 1:10 000、1:20 000、1:40 000、1:60 000、1:80 000 不同稀释浓度, 同时检测阴性、阳性血清样品读取化

学发光值, 计算 P/N 值, 以 P/N 值最大时为 AP 酶标二抗最佳稀释度。

1.3.6 一步反应时间的优化

将一步反应时间设置为 5、10、15 和 20 min, 对阴性、阳性血清样品进行检测并读取化学发光值, 同时计算 P/N 值, 当 P/N 值最大时为最佳一步反应时间。

1.3.7 二步反应时间的优化

将二步反应时间设置为 5、10、15 和 20 min, 对阴性、阳性血清样品进行检测并读取化学发光值, 同时计算 P/N 值, 当 P/N 值最大时为最佳二步反应时间。

1.3.8 酶促反应时间的优化

将酶与化学发光底物的反应时间分别设置为 1、3、5、7 和 9 min, 同时检测阴性、阳性血清样品读取化学发光值, 计算 P/N 值, 以 P/N 值最大时为酶促反应的最佳时间。

1.3.9 标准品曲线的绘制

取 ASFV 阳性血清国家参考品作为标准品的溯源血清, 将溯源血清进行 2 倍倍比稀释, 检测化学发光值, 通过北京金诺百泰生物技术有限公司生产的非洲猪瘟病毒抗体 ELISA 试剂盒测出的检测值临界点作为定义 CLIA 标准品抗体浓度的参考值, 分别选用 25、50、100、400、1 600 和 6 400 U 这 6 个抗体浓度不同的标准品, 以浓度值作为横坐标、化学发光值作为纵坐标, 通过全自动化学发光仪进行四参数曲线拟合方法绘制标准曲线。

1.3.10 阴阳性临界点的确定

采用本研究建立的方法检测 277 份背景清晰的临床样品血清, 使用 MedCalc 软件将抗体浓度值绘制成横坐标为特异性和纵坐标为敏感性的受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线。在 ROC 曲线方法中约登(Youden)指数作为诊断方法参考的重要指标,

常被用来评价筛查试验的真实性,指数越大说明真实性越大, Youden 指数=敏感性+特异性-1,当 Youden 指数最大时所对应的抗体浓度值作为阴性、阳性临界点值。

1.3.11 敏感性试验

取一份 ASFV 阳性血清进行 2 倍倍比稀释,同时采用本研究建立的 CLIA 方法和北京金诺百泰生物技术有限公司生产的非洲猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒进行检测,根据判定标准确定该方法的敏感性。

1.3.12 特异性试验

使用本研究建立的 CLIA 方法检测 CSFV、PRV-gB、PRRSV、FMDV-O、FMDV-A 和 PCV2 共 6 种病原血清。根据判断标准判定阴阳性,从而分析本方法的特异性和交叉反应性。

1.3.13 重复性试验

将重组 pp62 蛋白以最佳浓度偶联于羧基磁珠上,选取 6 份血清,每份血清重复检测 10 次。通过已优化好的反应条件进行批内重复性试验,同时对抗体浓度值进行统计学分析,计算变异系数。将重组 pp62 蛋白以最佳浓度偶联于 3 组不同批次的羧基磁珠上,选取 6 份血清,每份血清重复检测 4 次。通过已优化好的反应条件进行批间重复性试验,同时对抗体浓度值进行统计学分析,计算变异系数。

1.3.14 与商品化试剂盒的符合率检测

用研究建立好的 CLIA 方法检测甘肃省多个猪场的血清样品 92 份,根据判定标准检测结果与北京金诺百泰生物技术有限公司生产的非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒进行对比。

2 结果与分析

2.1 磁珠偶联过程 pH 值的确定

随着磁珠偶联环境 pH 值的改变,磁珠偶联状态和化学发光值也会随之改变。如表 1 所

示,当 pH 值为 5.0 时,磁珠偶联时无聚集、贴壁现象且 P/N 值达到最大。因此, pH 值为 5.0 是磁珠偶联状态的最佳值。

2.2 磁珠偶联 pp62 蛋白浓度的确定

如图 1 所示,随着磁珠偶联蛋白浓度的增加,ASFV 阳性血清化学发光值不断升高,而阴性血清化学发光值基本处于平稳状态。当蛋白浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,磁珠与蛋白偶联基本达到饱和状态且 P/N 值达到最大。因此蛋白浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时为磁珠偶联的最佳浓度。

表 1 磁珠偶联过程 pH 值优化结果

Table 1 Optimization results of pH value of magnetic bead coupling process

pH 值 pH	阳性样品发光值 Positive sample luminescence value (RLU)	阴性样品发光值 Negative sample luminescence value (RLU)	阴阳性比值 Positive to negative ratio (P/N)
5.0	2 693 996	184 398	14.6
6.0	2 804 728	338 767	8.3
7.0	2 892 101	248 779	11.6
8.0	2 830 872	341 451	8.3
9.0	2 819 215	265 952	10.6

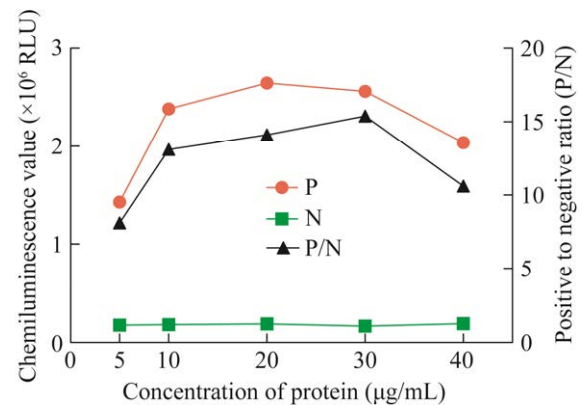


图 1 针对不同浓度磁珠偶联蛋白的相对光单位 (RLU) 值

Figure 1 Relative light unit (RLU) values for different concentrations of magnetic bead coupling proteins. P: Positive sample luminescence value; N: Negative sample luminescence value; P/N: Positive to negative ratio. The same below.

2.3 封闭剂量的确定

随着封闭剂量的增加, BSA 会将磁珠偶联过程中的非特异性结合位点进行封闭, 以降低非特异性反应。结果如表 2 所示, 当封闭剂的量为 30 μL 的 BSA (100 mg/mL) 时, 阴性血清样品发光值处于平稳状态, 非特异性反应减少, 磁珠偶联中结合位点基本达到饱满状态且 P/N 值达到最大。因此, 本方法封闭剂的最佳优化量为 30 μL 的 BSA (100 mg/mL)。

2.4 AP 酶标二抗稀释度的优化结果

在各项试验最佳条件下, 将 AP 酶标二抗稀释度进行优化。如图 2 所示, 随着稀释度比例的增大, 化学发光值会随之降低; 当 AP 酶标二抗稀释度为 1:40 000 时, 检测阴性、阳性血

清样品化学发光值 P/N 值达到最大。因此稀释浓度比例 1:40 000 为 AP 酶标二抗的最佳稀释度。

2.5 一步反应时间的优化结果

按照所设定好的一步反应时间对阴阳性血清样品进行检测, 并读取化学发光值, 随着一步反应时间的延长, 化学发光值也随之增加。如表 3 所示, 当反应时间为 5 min 时, 阴性、阳性血清样品化学发光值 P/N 值达到最大, 因此本研究建立的 CLIA 方法中一步反应的最佳时间为 5 min。

2.6 二步反应时间的优化结果

按照所设定好的二步反应时间对阴性、阳性血清样品进行检测并读取化学发光值, 随着二步反应时间的延长, 化学发光值也随之增加。如表 4 所示, 当反应时间为 15 min 时, 阴性、阳性血清样品化学发光值 P/N 值达到最大。因此, 本研究建立的 CLIA 方法最佳二步反应时间为 15 min。

表 2 针对不同封闭剂量的 RLU 值

封闭剂的量 Amount of blocking dosage (μL)	阳性样品发光值 Positive sample luminescence value (RLU)	阴性样品发光值 Negative sample luminescence value (RLU)	阴阳性比值 Positive to negative ratio (P/N)
10	3 042 556	272 625	11.2
20	2 580 930	193 817	13.3
30	2 731 376	197 677	13.8
40	2 461 928	184 079	13.4

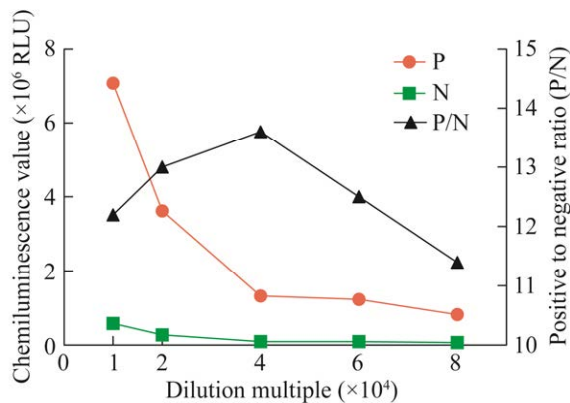


图 2 针对不同稀释度 AP 酶标二抗的 RLU 值
Figure 2 RLU values for the different dilutions of AP enzyme-labeled secondary antibodies.

表 3 针对一步反应时间的 RLU 值

反应时间 Reaction time (min)	阳性样品发光值 Positive sample luminescence value (RLU)	阴性样品发光值 Negative sample luminescence value (RLU)	阴阳性比值 Positive to negative ratio (P/N)
5	799 491	58 908	13.6
10	818 661	65 731	12.5
15	923 882	72 256	12.8
20	878 731	74 592	11.8

表 4 针对二步反应时间的 RLU 值

反应时间 Reaction time (min)	阳性样品发光值 Positive sample luminescence value (RLU)	阴性样品发光值 Negative sample luminescence value (RLU)	阴阳性比值 Positive to negative ratio (P/N)
5	420 569	34 279	12.3
10	800 508	53 589	14.9
15	1 082 072	70 417	15.4
20	1 353 627	90 916	14.9

2.7 酶促反应时间的优化结果

通过酶促反应时间的延长, 阴性、阳性血清样品化学发光值基本处于稳定状态。如表 5 所示, 当反应时间为 5 min 时, 酶与底物结合最充分且阳性、阴性血清样品 P/N 值达到最大。因此, 本研究建立的 CLIA 方法最佳酶促反应时间为 5 min。

2.8 标准品曲线

分别选取 ASFV 阳性血清国家参考品稀释 6 个不同浓度的血清样品作为标准品 1-6。如图 3 所示, 根据 6 个标准品的浓度值和化学发光值做四参数 Logistic 拟合, 最终获取一条 $R^2=0.999\ 99$ 的拟合曲线, 将此曲线作为该方法的标准曲线。

表 5 针对酶促反应时间的 RLU 值

反应时间 Reaction time (min)	阳性样品发光值 Positive sample luminescence value (RLU)	阴性样品发光值 Negative sample luminescence value (RLU)	阴阳性比值 Positive to negative ratio (P/N)
1	1 006 607	72 169	13.9
3	1 188 422	81 232	14.6
5	1 117 073	73 812	15.1
7	1 100 283	88 452	12.4
9	1 022 383	72 856	14.0

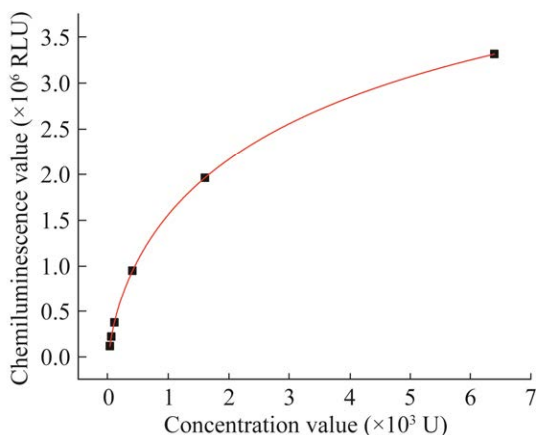


图 3 针对不同稀释度 ASFV 标准阳性血清的 RLU 值
Figure 3 RLU values for different dilutions of ASFV standard positive sera.

2.9 阴阳性临界点

通过使用 MedCalc 软件对 277 份背景清晰的阴性、阳性血清临床样品的浓度值进行分析, 分别绘制出 ROC 曲线及样品的 Youden 指数。如图 4 所示, Youden 指数最大为 0.969 5, 敏感性和特异性分别为 93.37%和 99.58%, 且所对应的浓度值临界点为 140.02。因此将本方法的阴性、阳性判断标准定为: 抗体浓度值>140.02 U 为阳性, 抗体浓度值<140.02 U 为阴性。

2.10 特异性试验结果

用本研究建立的方法对 CSFV、PRV-gB、PRRSV、FMDV-O、FMDV-A 和 PCV2 等 6 种病原阳性猪血清各 1 份进行检测。如表 6 所示, 6 种病原抗体阳性猪血清化学发光值所对应的浓度值均小于判定标准。证明该方法与其他病原阳性猪血清无交叉反应, 特异性高。

2.11 敏感性试验结果

取一份非洲猪瘟阳性血清进行 2 倍倍比稀释, 通过本研究建立的 CLIA 方法与北京金诺百泰生物技术有限公司生产的非洲猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒进行检测对比。结果如表 7

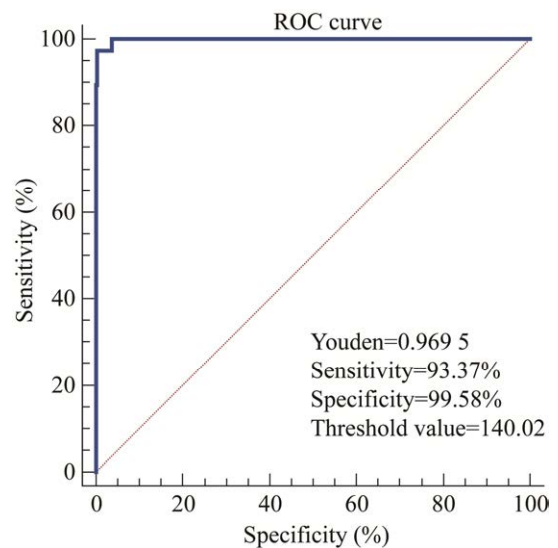


图 4 受试者工作特征曲线
Figure 4 Receiver operating characteristic curve.

表 6 用 6 种猪病病毒(包括两种血清型)进行 CLIA 抗体检测方法的特异性检测

Table 6 Specificity of CLIA antibody detection methods with six swine disease viruses, including two serotypes

检测项目	化学发光值	浓度值	结果判定
Test items	Chemiluminescence value (RLU)	Concentration value (U)	Result determination
FMDV-A	74 341	17.74	-
FMDV-O	213 654	51.18	-
PRRSV	80 997	19.06	-
PRV-gB	59 835	14.98	-
PCV2	137 270	31.39	-
CSFV	29 047	9.63	-

-: 阴性

-: Negative.

表 7 化学发光抗体检测方法 with 商业化 ELISA 方法的敏感性对比

Table 7 Sensitivity of CLIA antibody detection methods versus commercial ELISA methods

稀释倍数	CLIA			ELISA		
	发光值	浓度	结果判定	OD ₄₅₀	样品值/阳性 对照	结果判定
Dilution times	Luminous value (RLU)	Concentration (U)	Result determination		S/P	Result determination
0	3 312 126	6 400.00	+	1.823	1.72	+
2	3 012 452	5 732.46	+	1.752	1.65	+
4	2 674 801	4 568.23	+	1.528	1.43	+
8	2 432 252	3 665.31	+	1.232	1.13	+
16	2 095 989	2 527.23	+	0.852	0.75	+
32	1 628 762	1 551.29	+	0.633	0.54	+
64	1 248 272	592.32	+	0.535	0.44	+
128	700 212	352.51	+	0.324	0.23	-
256	500 948	223.59	+	0.219	0.12	-
512	223 514	53.25	-	0.188	0.09	-
1 024	103 272	20.73	-	0.113	0.02	-
2 048	64 321	11.82	-	0.072	-0.02	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

所示, 本研究建立的 CLIA 方法检测到非洲猪瘟阳性血清最大稀释倍数为 1:256, 而对比的 ELISA 检测试剂盒检测到非洲猪瘟阳性血清最大稀释倍数为 1:64。因此本研究建立的 CLIA 方法敏感性高于对比的 ELISA 检测试剂盒。

2.12 重复性试验结果

2.12.1 批内试验结果

选用同一批次偶联磁珠工作液分别对 3 份 ASFV 阳性血清样品和 3 份 ASFV 血清阴性血清样品进行 10 次重复 CLIA 检测。如表 8 所示,

检测的 6 份血清样品中每份血清样品在检测过程中批内变异系数(coefficient of variation, CV)均<10%, 表明建立的 CLIA 方法具有良好的重复性。

2.12.2 批间试验结果

选用 3 组不同批次偶联磁珠工作液分别对 3 份 ASFV 阳性血清样品和 3 份 ASFV 阴性血清样品进行检测, 早晚 2 次, 共 12 次重复。结果如表 9 所示, 所检测的 6 份血清样品中每份样品在检测过程中批间变异系数(CV)均<10%,

表 8 批内重复性试验结果

Table 8 Intra-batch repeatability test results

血清编号 Serum No.	血清样品浓度 Serum sample concentration (U)					平均值 Average value (U)	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation (CV, %)
1	895.79	834.24	849.59	788.15	863.08	803.10	54.41	6.80
	775.05	769.91	776.25	725.35	753.63			
2	986.71	847.94	921.97	1 004.33	984.09	1 017.24	88.90	8.70
	1 148.88	1 114.05	1 042.48	1 064.62	1 057.32			
3	1 539.29	1 334.22	1 455.03	1 451.59	1 617.08	1 518.20	97.40	6.40
	1 467.59	1 467.59	1 576.92	1 590.92	1 661.97			
4	31.01	33.20	33.45	31.57	31.20	32.37	1.10	3.50
	33.40	31.17	31.51	33.55	33.59			
5	27.43	24.57	24.72	25.45	24.22	25.91	1.40	5.30
	25.87	26.80	25.06	26.57	28.42			
6	33.38	33.09	30.60	28.37	30.24	29.23	2.70	9.20
	25.53	29.00	28.58	25.62	27.92			

表 9 批间重复性试验结果

Table 9 Inter-batch repeatability test results

血清编号 Serum No.	不同批次磁珠 Different batches of magnetic beads						平均值 Average value (U)	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation (CV, %)
	1	2	3	4	5	6			
1	486.79	434.52	444.81	448.67	451.40	512.60	464.40	35.56	7.66
	503.73	422.51	507.01	478.81	402.40	379.50			
2	376.35	396.57	361.11	368.70	341.40	369.90	356.25	35.16	9.87
	387.04	358.60	326.64	389.62	327.70	271.30			
3	931.52	805.21	866.01	970.72	807.60	964.10	881.89	77.34	8.77
	778.21	783.37	990.05	897.14	941.00	847.80			
4	35.35	29.80	34.38	35.82	29.04	29.55	31.61	2.96	9.35
	33.15	34.33	32.80	28.23	28.67	28.24			
5	26.49	25.22	27.11	23.20	23.25	22.26	24.61	2.33	9.47
	27.29	28.52	23.76	21.93	24.87	21.47			
6	24.61	22.58	27.72	25.29	24.04	25.58	25.80	2.33	9.01
	27.71	24.27	31.55	25.72	26.01	24.57			

表明所建立的 CLIA 方法在批间试验中具有良好的重复性。

2.13 与商业化试剂盒的符合率

采用本试验建立的 CLIA 方法与北京金诺百泰生物技术有限公司生产的非洲猪瘟病毒抗体 ELISA 检测试剂盒共同检测 92 份血清样品。

如表 10 所示, CLIA 方法阳性样品检出份数为 33 份, ELISA 检测试剂盒阳性样品检出份数为 30 份, 阳性样品符合率为 90.9%; CLIA 方法阴性样品检出份数为 59 份, ELISA 检测试剂盒阴性样品检出份数为 62 份, 阴性样品符合率为 95.1%, 总符合率为 96.7%。

表 10 与商业化试剂盒的符合率结果

Table 10 Compliance results with commercially available kits

试剂盒种类 Kit type		非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒 African swine fever virus antibody detection kit		
		阳性 Positive	阴性 Negative	合计 Total
CLIA	阳性 Positive	30	3	33
	阴性 Negative	0	59	59
	合计 Total	30	62	92

3 讨论与结论

非洲猪瘟是一种危害严重的疾病,近年来对我国养猪业造成了严重的经济损失。其发病特点主要以高热、出血性病变、发绀、厌食和共济失调为主,致死率可达 100%^[12]。非洲猪瘟病毒对外界抵抗力强,普通消毒药无效。在自然环境条件下,非洲猪瘟病毒可通过蜱虫传播感染家猪且可在血清、排泄物和血液中长时间存活^[13]。目前针对非洲猪瘟病毒无良好的特效药及安全有效的疫苗,只能通过大规模捕杀进行控制^[14-15]。因此,建立快速、方便的诊断方法对 ASFV 早期诊断至关重要。

目前,非洲猪瘟的诊断方法主要分为病原学检查和血清学检查两大类。病原学检查主要以 PCR 分子检测方法为主,而血清学检查通常采用 ELISA、间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)和胶体金试纸条等方法进行分析。传统的血清学检测方法较为烦琐,在实验过程容易出现污染造成假阳性和假阴性概率。化学发光免疫分析技术作为一种新型检测方法,具备敏感性好、特异性强、高通量、操作便捷、稳定性强等优势^[16]。与酶联免疫吸附试验相较而言,本研究建立的 CLIA 方法以羧基磁珠作为固相载体,通过化学反应与蛋白进行

共价结合,提高了蛋白的结合量,进一步实现了信号放大,提高了敏感性。Shi 等^[17]建立了化学发光磁微粒免疫测定法用于检测非洲猪瘟病毒抗体,该方法通过磁微粒偶联 p30 蛋白在灵敏度、特异性、稳定性方面表现出良好的优越性。同时,本研究建立的 CLIA 方法可实现样品检测、结果计算、报告成型自动一体化,且支持一个样品检测多种抗原或抗体达到多种病毒联检效果,进一步缩短了检测时间并降低了人员手动操作带来的假阳性或假阴性概率。

多蛋白 pp220 和 pp62 的加工主要需要衣壳蛋白 p72 的表达, pp220 的表达为 pp62 的加工奠定了基础,同时 pp220 和 pp62 的正确加工是成熟病毒粒子的重要标志^[7]。黄超华等^[18]将非洲猪瘟病毒 pp62 蛋白在昆虫细胞中进行了表达与鉴定,并以重组蛋白 pp62 为包被抗原建立了间接 ELISA 方法,进一步验证了重组蛋白 pp62 具有良好的反应活性。Gallardo 等^[19]研究了非洲猪瘟病毒蛋白 pp62 在昆虫细胞中表达的抗原特性及新型 ELISA 中的诊断潜力,结果显示 pp62 蛋白可以用于检测 ASF 病毒抗体。本研究采用 pp62 蛋白构建管式非洲猪瘟病毒间接 CLIA 抗体检测方法,通过校准和质控体系能达到良好的线性关系,进行精准定量。同时绘制 ROC 曲线进行阴阳性值判定,能够更准确地反映样品的抗体水平。本方法与 CSFV、PRV-gB、PRRSV、FMDV-O、FMDV-A、PCV2 病原阳性猪血清均不发生交叉反应,批内和批间变异系数均小于 10%。与非洲猪瘟商业化 ELISA 试剂盒符合率为 96.7%。本研究建立的管式非洲猪瘟病毒 pp62 蛋白 CLIA 抗体检测方法操作简单、反应时间短,可用于非洲猪瘟抗体检测,为非洲猪瘟大规模血清学检测提供了技术支持。

REFERENCES

- [1] SALGUERO FJ. Comparative pathology and pathogenesis of African swine fever infection in swine[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 282.
- [2] GAUDREAU NN, MADDEN DW, WILSON WC, TRUJILLO JD, RICHT JA. African swine fever virus: an emerging DNA arbovirus[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 215.
- [3] WANG Y, KANG WF, YANG WP, ZHANG J, LI D, ZHENG HX. Structure of African swine fever virus and associated molecular mechanisms underlying infection and immunosuppression: a review[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 715582.
- [4] DUAN XH, RU Y, YANG WP, REN JJ, HAO RZ, QIN XD, LI D, ZHENG HX. Research progress on the proteins involved in African swine fever virus infection and replication[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 947180.
- [5] ALEJO A, MATAMOROS T, GUERRA M, ANDRÉS G. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(23): e01293-e01218.
- [6] YÁÑEZ RJ, RODRÍGUEZ JM, NOGAL ML, YUSTE L, ENRÍQUEZ C, RODRÍGUEZ JF, VIÑUELA E. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus[J]. *Virology*, 1995, 208(1): 249-278.
- [7] SUÁREZ C, SALAS ML, RODRÍGUEZ JM. African swine fever virus polyprotein pp62 is essential for viral core development[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(1): 176-187.
- [8] WANG GG, XIE MJ, WU W, CHEN ZZ. Structures and functional diversities of ASFV proteins[J]. *Viruses*, 2021, 13(11): 2124.
- [9] 储珺, 赵普, 张婕妮, 王振忠, 苗雨润, 鲍晨沂, 郑龙三, 吴晓东, 钱莺娟, 戴建君. 非洲猪瘟病毒 pp62 蛋白单克隆抗体的制备和鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(5): 579-585.
- CHU J, ZHAO P, ZHANG JN, WANG ZZ, MIAO YR, BAO CY, ZHENG LS, WU XD, QIAN YJ, DAI JJ. Generation and characterization of monoclonal antibodies against pp62 protein of African swine fever virus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(5): 579-585 (in Chinese).
- [10] YU XX, ZHU XJ, CHEN XY, LI DF, XU Q, YAO L, SUN Q, GHONAIM AH, KU XG, FAN SX, YANG HC, HE QG. Establishment of a blocking ELISA detection method for against African swine fever virus p30 antibody[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 781373.
- [11] GIMÉNEZ-LIROLA LG, MUR L, RIVERA B, MOGLER M, SUN YX, LIZANO S, GOODELL C, HARRIS DL, ROWLAND RRR, GALLARDO C, SÁNCHEZ-VIZCAÍNO JM, ZIMMERMAN J. Detection of African swine fever virus antibodies in serum and oral fluid specimens using a recombinant protein 30 (p30) dual matrix indirect ELISA[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0161230.
- [12] JIA N, OU YW, PEJSAK Z, ZHANG YG, ZHANG J. Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2017, 61(2): 135-143.
- [13] QIU ZL, LI ZY, YAN QH, LI YW, XIONG WJ, WU KK, LI XW, FAN SQ, ZHAO MQ, DING HX, CHEN JD. Development of diagnostic tests provides technical support for the control of African swine fever[J]. *Vaccines*, 2021, 9(4): 343.
- [14] TRAN XH, PHUONG LTT, HUY NQ, THUY DT, NGUYEN VD, QUANG PH, NGÒN QV, RAI A, GAY CG, GLADUE DP, BORCA MV. Evaluation of the safety profile of the ASFV vaccine candidate ASFV-G- Δ 1177L[J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 896.
- [15] TURLEWICZ-PODBIELSKA H, KURIGA A, NIEMYJSKI R, TARASIUK G, POMORSKA-MÓL M. African swine fever virus as a difficult opponent in the fight for a vaccine—current data[J]. *Viruses*, 2021, 13(7): 1212.
- [16] 赵协, 安利民, 高沙沙, 张玉, 乔飞. 化学发光免疫分析技术在动物疫病检测中的应用[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(8): 82-87.
- ZHAO X, AN LM, GAO SS, ZHANG Y, QIAO F. Application of chemiluminescence immunoassay in detection of animal diseases[J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(8): 82-87 (in Chinese).
- [17] SHI ZW, CAO LY, LUO JC, ZHOU GJ, ZUO QS, LIU XT, HU YH, TIAN H, ZHENG HX. A chemiluminescent magnetic microparticle immunoassay for the detection of antibody against African swine fever virus[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(11): 3779-3788.
- [18] 黄超华, 周华亮, 史卫军, 曹琛福, 阮周曦, 吴江, 林彦星, 曾少灵, 孙洁, 刘建利, 杨俊兴, 花群义. 非洲猪瘟病毒 pp62 蛋白在昆虫细胞中的表达与鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2020, 50(9): 1090-1095.
- HUANG CH, ZHOU HL, SHI WJ, CAO CF, RUAN ZX, WU J, LIN YX, ZENG SL, SUN J, LIU JL, YANG JX, HUA QY. Expression and identification of pp62 of ASFV in the baculovirus expression system[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2020, 50(9): 1090-1095 (in Chinese).
- [19] GALLARDO C, BLANCO E, RODRÍGUEZ JM, CARRASCOSA AL, SANCHEZ-VIZCAINO JM. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(3): 950-956.

(卷终)