

胶体金检测试纸卡在检测非洲猪瘟病毒抗体上的应用

张元峰¹ 刘锡玲² 毕路² 李佳² 方瑞³ 李乾²

赵俊龙³ 毕丁仁² 黄丽¹ 步志高¹ 翁长江^{1*}

1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 / 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150069; 2. 武汉观锐生物科技有限公司, 武汉 430070; 3. 武汉科维创生物科技有限公司, 武汉 430014

摘要 本研究采用非洲猪瘟病毒抗体检测试纸卡检测倍比稀释后的非洲猪瘟病毒标准阳性血清, 将标准阳性血清倍比稀释至 1:256 时, 试纸卡检测线仍呈现清晰的、肉眼可见的红色沉淀线; 标准阴性血清、空载体血清及其他无关病毒阳性血清各稀释度均无沉淀线。检测已知感染猪血清时, 最早感染后第 8 天即能查出阳性抗体, 与 ELISA 检测结果一致。用非洲猪瘟病毒抗体检测试纸卡对 230 份送检猪血清中的非洲猪瘟抗体进行检测, 并与西班牙 INGENASA 非洲猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测试剂盒进行比较试验。试验结果显示, 阳性符合率为 80%, 阴性符合率为 89.2%, 总符合率为 84.8%, 说明本试验所制备的试纸卡在检测非洲猪瘟病毒抗体的临床应用中特异性强、准确度高, 与常规 ELISA 试剂盒比较, 能更快、更便捷地查出猪群中非洲猪瘟病毒抗体阳性猪, 更适合于普通实验室及养殖单位现场临床应用。

关键词 非洲猪瘟; 抗体检测; 胶体金检测试纸卡; 病毒抗体

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)感染家猪和各种野猪(如非洲野猪、欧洲野猪等)引起的一种急性、出血性、烈性传染病^[1]。世界动物卫生组织(OIE)将其列为法定报告动物疫病, 该病也是我国重点防范的一类动物疫情。2018年8月3日, 我国辽宁省某养殖场生猪发生疑似 ASF 疫情, 经确认并上报 OIE 确诊为我国首例非洲猪瘟^[2]。而后疫情相继席卷全国, 截至 2020 年 1 月初, 国内共报告发生 162 起非洲猪瘟疫情, 共扑杀染疫生猪约 120 万头, 造成了巨大的经济损失^[3]。因非洲猪瘟病毒的感染机制复杂, 基因型多, 全球尚无安全有效的商品化疫苗, 其防控难度较大。

非洲猪瘟的早期快速诊断包括病原学检测和

血清学检测, OIE 推荐的 ASF 实验室检测方法有病毒分离、PCR、ELISA 和荧光抗体试验等。在 ASF 暴发初期, 普遍采用 PCR 检测病原以确诊病例, 但在 ASF 呈地方流行趋势后, 病原检测试验(FAT)和血清学试验(IFA)的结合有利于对可疑病例、隐性病例进行确诊。ELISA 方法是目前最常用的血清学诊断方法, 用于抗体的检测, 已有多项研究报道采用非洲猪瘟病毒 p72、p54、p30 等基因表达重组蛋白并建立了非洲猪瘟病毒抗体 ELISA 检测方法^[4-7]。ELISA 检测方法一般在实验室中进行, 需要一定的设备, 同时相对耗时较长, 而胶体金免疫层析技术因其快速、灵活、灵敏的特点, 在临床快速检测诊断中尤为适合。本研究对采用胶体金免疫层析技术制备的快速检测试纸卡检测非洲猪瘟病毒抗体的性

收稿日期: 2020-09-11

基金项目: 国家自然科学基金非洲猪瘟专项项目(31941002)

* 通讯作者

张元峰, 男, 1991 年生, 硕士, 主要从事非洲猪瘟病毒检测方法研发及病毒感染和致病机制的研究。

能和效果进行评估。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1)非洲猪瘟疫病毒抗体检测试纸卡,由武汉观锐生物科技有限公司和中国农业科学院哈尔滨兽医研究所共同制备,批号:200501,有效期至 2021 年 5 月。

2)非洲猪瘟疫病毒阻断 ELISA 抗体检测试剂盒,购自西班牙 INGENASA,批号:011019-B,有效期至 2021 年 10 月。

3)非洲猪瘟疫病毒间接 ELISA 抗体检测试剂盒;非洲猪瘟疫病毒标准阳性血清,标准阴性血清,猪流行性腹泻病毒 (PEDV),猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV),猪瘟疫病毒 (CSFV),伪狂犬病毒 (PRV),猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 抗体阳性血清,大肠杆菌 BL21 空载体阳性血清,均由中国农业科学院哈尔滨兽药研究所制备并提供。

4)猪临床血清 230 份,从湖北、河南、江西、上海等地采集或送检。

1.2 方 法

1)敏感性试验。将非洲猪瘟疫病毒标准阳性血清 (ELISA 测定效价,1:32 768) 用稀释液倍比稀释后,用非洲猪瘟疫病毒抗体检测试纸卡检测,以肉眼能观察到检测线处有红色沉淀线出现的血清最高稀释倍数为试纸卡的检测灵敏度。

2)特异性试验。用非洲猪瘟疫病毒抗体检测试纸卡分别检测非洲猪瘟疫病毒标准阳性血清、标准阴性血清和 5 种其他病毒标准阳性血清 (PEDV、TGEV、

CSFV、PRV、PRRSV) 以及大肠杆菌 BL21 空载体阳性血清,进行试纸卡特异性评价。

3)已知阳性血清检测试验。用非洲猪瘟疫病毒分离株 (ASFV/HLJ/2018-△X) 攻毒 3 头 SPF 猪 (编号 1\2\3),分别在攻毒第 0 天、第 5 天、第 8 天采集并分离猪血清 (P4 实验室完成),再用非洲猪瘟疫病毒 ELISA 抗体检测试剂盒和非洲猪瘟疫病毒抗体检测试纸卡检测。

4)符合率实验。临床采集 230 份猪血清样品,每份样品用非洲猪瘟疫病毒抗体检测试纸卡检测,同时用西班牙 INGENASA 非洲猪瘟疫病毒阻断 ELISA 抗体检测试剂盒检测,并将检测结果进行比较,评价二者的符合率。

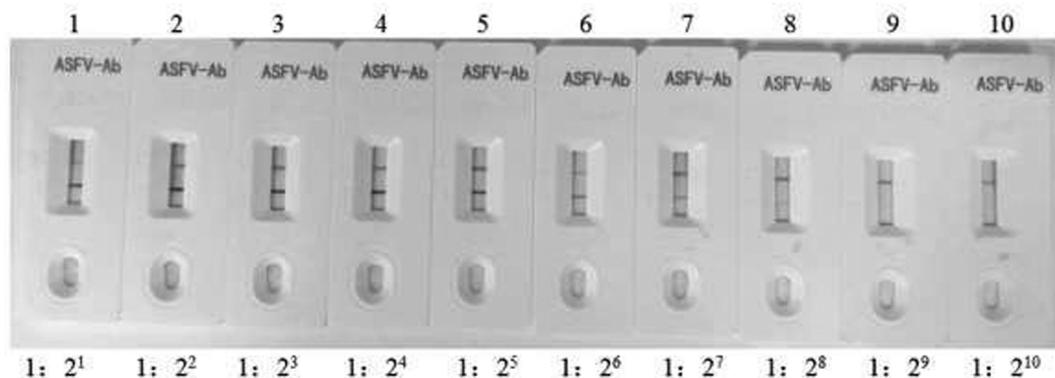
2 结果与分析

2.1 敏感性试验

用非洲猪瘟疫病毒抗体检测试纸卡检测倍比稀释后的非洲猪瘟疫病毒标准阳性血清,结果如图 1。当稀释度达 1:256 时,检测线处仍然呈现肉眼可见的清晰的红色沉淀线,表明试纸卡检测标准阳性血清的灵敏度为 1:2⁸,说明本研究制备的试纸卡在非洲猪瘟疫病毒抗体检测临床应用中的灵敏度较高。

2.2 特异性试验

用非洲猪瘟疫病毒抗体检测试纸卡检测 ASFV 标准阳性血清、标准阴性血清、空载体血清及 5 份其他病毒标准阳性血清时,结果如图 2 所示。试纸卡除检测非洲猪瘟疫病毒标准阳性血清为阳性 (检测线显色) 外,其余血清均为阴性 (检测线不显色),表明试纸卡的特异性很强。



注:1~10:非洲猪瘟疫病毒标准阳性血清从 1:2 稀释至 1:2¹⁰。

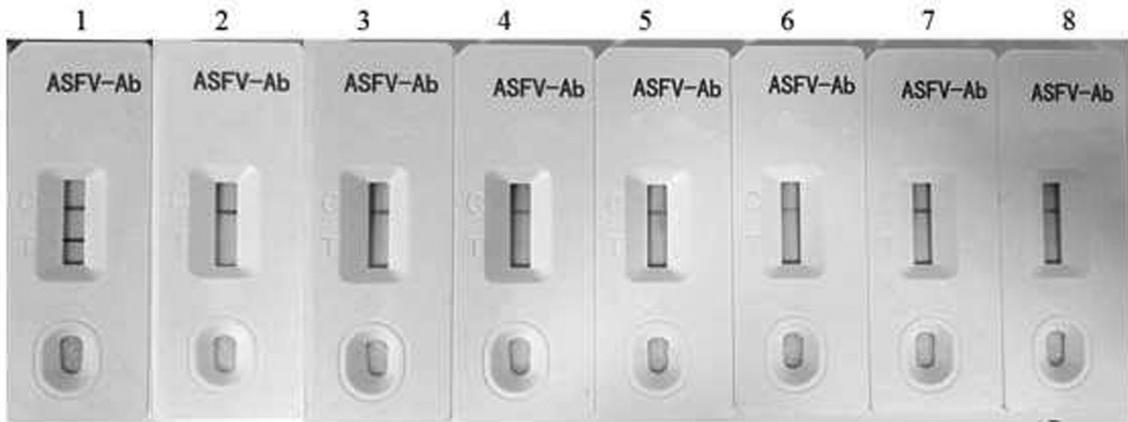
图 1 非洲猪瘟疫病毒抗体检测试纸卡灵敏度试验

2.3 已知阳性血清检测试验

用间接 ELISA 试剂盒和试纸卡方法同时检测 3 头攻毒前(0 天)、攻毒第 5 天、第 8 天采集分离的猪血清,如表 1 和图 3 所示。ELISA 和试纸卡均在攻毒后第 8 天检测出非洲猪瘟病毒抗体,表明非洲猪瘟病毒抗体检测试纸卡与 ELISA 方法检测结果一致,均能在猪感染非洲猪瘟病毒后及早地检测到抗体。

2.4 与进口非洲猪瘟病毒抗体检测 ELISA 试剂盒符合率试验

将 230 份临床猪血清样品同时用非洲猪瘟病毒抗体检测试纸卡和西班牙 INGENASA 非洲猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测试剂盒检测。结果如表 2 所示,试纸卡检出阳性血清样本 101 份,阴性血清 129 份;ELISA 试剂盒检出阳性血清 110 份, 阴性血清



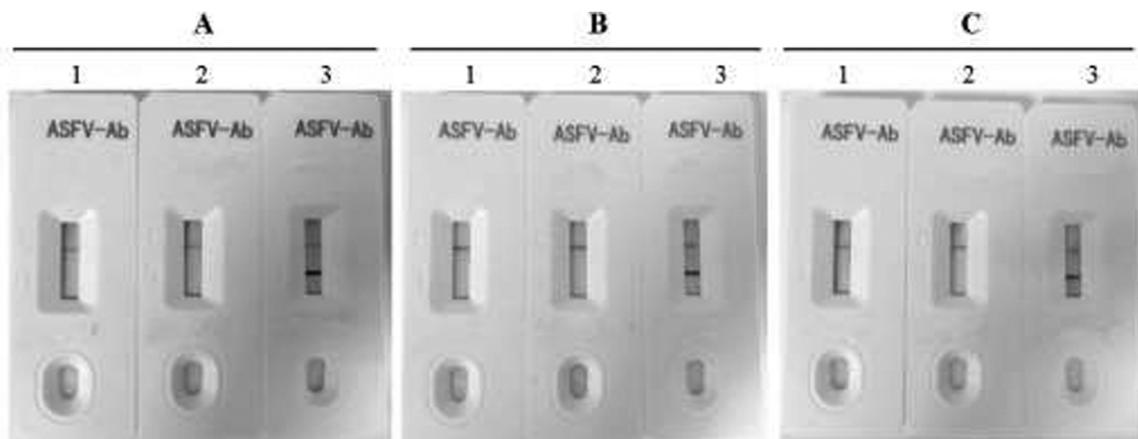
注:1.ASFV 阳性血清;2.ASFV 阴性血清;3.PEDV 阳性血清;4.TGEV 阳性血清;5.CSFV 阳性血清;6.PRIV 阳性血清;7.PRRSV 阳性血清;8. BL21 阳性血清。

图 2 非洲猪瘟病毒抗体检测试纸卡特异性试验

表 1 ELISA 方法和非洲猪瘟病毒抗体检测试纸卡检测攻毒猪血清结果

方法	编号	1号猪			2号猪			3号猪		
		第0天	第5天	第8天	第0天	第5天	第8天	第0天	第5天	第8天
ELISA	OD ₄₅₀ 值	0.12	0.11	0.787	0.147	0.158	0.95	0.09	0.103	0.821
	结果判定	-	-	+	-	-	+	-	-	+
试纸卡	结果判定	-	-	+	-	-	+	-	-	+

注:“+”代表阳性,“-”代表阴性。



注:A,B,C 分别为 1 号、2 号、3 号猪;1.攻毒前(0 天),2.攻毒第 5 天,3.攻毒第 8 天。

图 3 非洲猪瘟病毒抗体检测试纸卡检测攻毒猪抗体结果

表 2 非洲猪瘟病毒抗体检测试纸卡与进口非洲猪瘟病毒抗体检测 ELISA 试剂盒的比较

检测项目		西班牙非洲猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测试剂盒		
		阳性	阴性	合计
非洲猪瘟病毒抗体检测试纸卡	阳性	88	13	101
	阴性	22	107	129
	合计	110	120	230

120 份。其中,阳性符合率 80%,阴性符合率为 89.2%,总符合率为 84.8%,表明二者有很高的符合率。

3 讨 论

我国非洲猪瘟暴发流行已近 2 年,防控非洲猪瘟将成为养猪企业的一项重要长期任务。按一般传染病流行规律,非洲猪瘟病毒毒力可能会下降,使病程呈向亚急性或慢性发展,发病猪群死亡率下降,耐过或无症状感染猪增多,带毒猪可能呈间歇式排毒状态,因而活体采样检测核酸或抗原有时均呈阴性。但由于非洲猪瘟病毒抗原性强,康复猪或隐性带毒猪循环抗体长时间呈阳性,且效价极高,因而很容易被快速检测法检测出来。所以,在非洲猪瘟流行中、后期,对致死率不高的发病群中的病猪作“拔牙”式处理,结合严格的生物安全措施和早期诊断与鉴别技术,精准淘汰 PCR 阳性或抗原阳性或抗体阳性猪只,能取得很好的防控效果。我国农业农村部发布的非洲猪瘟防控强化措施指引中指出,对自检阳性猪群且无异常死亡的养殖场,可按照“精准扑杀、定点清除”策略对生猪进行处置^[8]。

本研究采用双抗原夹心法制备出非洲猪瘟抗体检测试纸卡,该试纸卡特异性强、灵敏度高,能快速查出猪群中外观正常的隐性感染猪,被查出的这部分高效价抗体阳性猪可能会带毒,是猪群中的危险传染源,必须予以淘汰,以斩断非洲猪瘟的流行和蔓延。因此,非洲猪瘟抗体检测试纸卡的研制成

功为我国非洲猪瘟的控制与根除提供了很好的技术支持。

参 考 文 献

- [1] ZIMMERMAN J J, KARRIKER L A, RAMIREZ A, et al. Diseases of swine 11th edition [M]. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2019.
- [2] 王清华,任炜杰,包静月,等.我国首例非洲猪瘟的确诊[J].中国动物检疫,2018,35(9):1-4.
- [3] 董小迪.农业农村部:中国已扑杀 159 万头生猪非洲猪瘟防控形势仍严峻[EB/OL].(01-08-2020)[07-25-2020].http://news.china.com.cn/txt/2020-01/08/content_75590992.htm
- [4] 郭晶,孟庆玲,乔军,等.ASFV 多表位融合基因 MeP72 基因的克隆、表达及其间接 ELISA 检测方法建立[J].生物技术,2018,28(6):548-553.
- [5] 曹琛福,梁云浩,陶虹,等.非洲猪瘟病毒 p54 基因的原核表达及其抗体的间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展,2014,35(2):6-10.
- [6] 吴竞,王西西,吴映彤,等.非洲猪瘟病毒 p30 基因的原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医,2018,45(12):3555-3562.
- [7] GIMENEZ-LIROLA L G, MUR L, RIVERA B, et al. 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): e161230.
- [8] 农业农村部.非洲猪瘟防控强化措施指引[EB/OL].(05-21-2020)[07-25-2020].http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202005/120200521_6344888.htm

【责任编辑:胡 敏】