

王燕, 邹艳丽, 何佳依, 等. 非洲猪瘟病毒 pK205R 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (2): 105-111.

WANG Y, ZOU Y L, HE J Y, et al. Establishment of an indirect ELISA antibody detection method based on African swine fever virus pK205R protein [J].

Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (2): 105-111.

非洲猪瘟病毒 pK205R 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立

王燕^{1,2}, 邹艳丽³, 何佳依¹, 刘珊³, 苗雨润¹, 任炜杰³, 王振忠^{1,3},
白昀², 陈欢¹, 钱莺娟¹, 贾红⁴, 吴晓东^{3*}, 冯志新^{2*}, 郑龙三^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院/教育部动物健康与食品安全国际合作联合实验室/农业农村部细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095;

2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014;

3. 中国动物卫生与流行病学中心/国家非洲猪瘟参考实验室, 山东 青岛 266000;

4. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 旨在建立可以检测非洲猪瘟病毒 (ASFV) 非结构蛋白 pK205R 抗体的血清学检测方法。基于杆状病毒表达系统构建重组杆粒 Bacmid-pK205R, 以纯化的 pK205R 蛋白为包被抗原, 优化各项反应条件, 建立间接 ELISA 抗体检测方法, 验证方法的特异性、灵敏度、重复性, 并对临床血清样品进行检测。结果显示: pK205R 蛋白可以与 ASFV 阳性血清发生反应, ELISA 方法的抗原包被浓度为 50 ng/孔, 4 °C 过夜包被, 封闭液为 2% 牛血清白蛋白 (BSA), 37 °C 封闭 1 h, 待检血清以 5% 脱脂乳进行 1:200 稀释, 37 °C 孵育 0.5 h; 二抗工作浓度为 1:5 000, 37 °C 孵育 0.5 h, 37 °C 下显色 10 min; 该方法的阳性临界值为 0.186 (≥ 0.186 为阳性, < 0.186 为阴性), 且具有良好的特异性、灵敏度、可重复性, 与商品化试剂盒符合率为 79.92%。本研究成功建立 pK205R 非洲猪瘟间接 ELISA 抗体检测方法, 为进一步优化和研制非洲猪瘟抗体的快速检测试剂盒提供了参考。

关键词: 非洲猪瘟病毒; pK205R 蛋白; 间接 ELISA; 杆状病毒表达

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)02-0105-07

Establishment of an indirect ELISA antibody detection method based on African swine fever virus pK205R protein

WANG Yan^{1,2}, ZOU Yanli³, HE Jiayi¹, LIU Shan³, MIAO Yurun¹, REN Weijie³, WANG Zhenzhong^{1,3},
BAI Yun², CHEN Huan¹, QIAN Yingjuan¹, JIA Hong⁴, WU Xiaodong^{3*}, FENG Zhixin^{2*}, JUNG Yongsam^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/MOE Joint International Research Laboratory of Animal Health and Food Safety/Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

3. China Animal Health and Epidemiology Center/National African Swine Fever Reference Laboratory, Qingdao 266000, China;

4. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to establish a serological detection method for detecting antibodies against African swine fever (ASFV), a recombinant bacmid-pK205R based on the baculovirus expression system was constructed. The purified pK205R protein was used as the coating antigen, and the reaction conditions were optimized to establish an indirect ELISA antibody detection method to verify its specificity, sensitivity and reproducibility. Finally, clinical serum samples were tested. The results showed that the protein reacted with ASFV-positive sera. The optimal

收稿日期: 2024-03-14; 修回日期: 2024-12-25

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2021YFD1801200); 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项 (2019YFE0107300); 江苏省重点研发计划 (现代农业) 重点项目 (SBE2020310346)

第一作者: 王燕, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 郑龙三, 韩国, 教授, 博士生导师, 研究方向为动物传染病防控, E-mail: ysjung@njau.edu.cn; 冯志新, 研究员, 研究方向为动物疫病疫苗与诊断研究, E-mail: fzjass@163.com; 吴晓东, 研究员, 研究方向为重大外来动物疫病的综合防控技术研究, E-mail: wuxiaodong@cahec.cn.

conditions of the indirect ELISA were: the antigen coating concentration of the ELISA method was 50 ng/well, coated overnight at 4 °C, with a blocking solution of 2% BSA, and blocked at 37 °C for 1 h. The serum samples to be tested were diluted with 5% skimmed milk at 1 : 200 and incubated for 0.5 h in a 37 °C incubator. The secondary antibody working concentration was 1 : 5 000 and incubated for 0.5 h at 37 °C, and TMB at 37 °C for 10 min. The critical positive value for the ELISA assay was determined to be 0.186, indicating that the tested serum with a S/P value not less than 0.186 would be defined as positive to ASFV, and negative when the S/P value of the tested serum was less than 0.186. To sum up, the assay had good specificity, sensitivity and reproducibility, with a compliance rate of 79.92% with a commercial kit. An indirect ELISA assay for the detection of pK205R African swine fever antibody was successfully developed here, which laid a foundation for further optimization and development of a rapid detection kit for African swine fever antibody.

Keywords: African swine fever virus; pK205R protein; indirect ELISA; baculovirus expression

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 感染引起的一种猪的烈性传染病, 被世界动物卫生组织 (WOAH) 列为必须上报的动物疫病, 在我国被列为一类动物传染病^[1-2]。ASF 易感动物主要为欧亚野猪和家猪, 发病猪的急性型病例死亡率高达 100%, 急性型病例的症状与经典猪瘟等相似。ASF 于 1921 年在非洲肯尼亚首次被发现, 之后有很长一段时间在非洲国家流行^[3]。ASF 有 24 种基因型, 2007 年, 基因 II 型毒株传入格鲁吉亚, 此后, 一路蔓延至俄罗斯和东欧等国家^[4]。2018 年基因 II 型毒株传入中国, ASF 的突然袭击, 对我国养猪业造成了沉重打击^[5]。

ASFV 是非洲猪瘟病毒科下唯一的种, 也是唯一已知的经虫媒传播的 DNA 病毒, 主要在宿主细胞胞浆中复制, 是一种核质大 DNA 病毒^[6-7]。ASFV 病毒粒子呈二十面体结构, 基因组为单分子线性双链 DNA。不同毒株的基因组长度不同, 在 170~190 kb 左右, 包含 150~167 个开放阅读框 (ORF), 编码 150~200 种蛋白质^[8-9]。pK205R 由 K205R 基因编码, 是一种非结构蛋白, 在病毒感染后 4 h 产生, 6 h 后扩散^[10]。有研究表明, pK205R 蛋白在 ASFV 感染早期、中期和后期诊断中具有良好的抗原性, 可以诱导机体产生免疫反应, 针对 pK205R 蛋白的检测可以满足对 ASF 早发现、早确诊的需求^[11]。

基于 ASFV 复杂的基因型和感染机制, 目前尚无安全有效的商品化疫苗, 因而 ASF 快速灵敏的早期诊断对于疫病的防控至关重要。由于基因组的突变和重组, ASFV 在流行过程中出现了变异株, 哈尔滨兽医研究所在山东和河南分离出 2 株低毒力的基因 I 型变异株, 这 2 株毒株均无红细胞吸附能力。一些低毒力变异株或许会引起隐性感染, 排毒滴度降低, 影响了病原学检测^[12]。因而, ASF 的诊断还依赖于早期的血清学诊断方法。目前, ASF 血清学诊断的主要靶点是 p72、p30、p54 等。国外已有基于 p72 和 p30 的相关检测试剂盒, 国内有两家公司的 ELISA 试剂盒获得批准文号。

本研究利用杆状病毒表达系统制备的真核

pK205R 蛋白为包被抗原建立间接 ELISA 抗体检测方法, 为 ASFV 诊断试剂盒的开发提供一种可能。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞和血清

pFastBac-HTA 和 pcDNA3-2×Flag-K205R 质粒由本实验室保存; 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、DH10bac 由本实验室制备并保存, sf9 细胞由本实验室冻存。

ASF 标准阳性血清购自中国兽医药品监察所。ASF 标准阴性血清、猪瘟病毒 (CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪圆环病毒 (PCV)、伪狂犬病病毒 (PRV)、猪肺炎支原体 (Mhp) 标准阳性血清、159 份 ASFV 阴性血清由江苏省农业科学院兽医研究所保存并提供。ASFV 灭活阳性血清由北京畜牧兽医研究所和江苏省农业科学院兽医研究所保存并提供, 前者由中国动物疫病预防与控制中心馈赠, 后者由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所馈赠。ASFV 猪临床血清由中国动物卫生与流行病学中心保存。

1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶、Q5 高保真酶、T4 DNA 连接酶均购自美国 New England Biolabs 公司; SIM-SF 细胞培养基购自北京 Sino Biological 公司; 牛血清白蛋白 (BSA) 购自安徽 Biosharp 公司; 辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 二抗购自 Sigma 公司; TMB 显色液购于碧云天公司; ASF ELISA 检测试剂盒购自法国 ID. vet 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 重组杆粒的构建与鉴定

根据 ASFV China/2018/AnhuiXCGQ (GenBank: MK128995.1) 毒株中 K205R 基因序列设计引物, 引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点, PCR 扩增目的片段。利用 T4 DNA 连接酶连接目的片段与 pFastbac-HTA 载体构建重组质粒, 将连接产物转化进 DH5 α 感受态细胞中进行平板培养, 挑取单菌落扩大培养获得质粒并进行双酶切鉴定, 酶切验证成功的重组质粒转化入 DH10bac 感受态细胞构建重组杆粒, 经蓝白斑筛选挑

选白色单菌落扩大培养获得杆粒，对杆粒进行 PCR 验证。

1.4 蛋白的表达、纯化与鉴定

将构建正确的 Bacmid-pK205R 转染 sf9 细胞获得重组杆状病毒，重组杆状病毒接种 sf9 细胞表达目的蛋白，利用 SDS-PAGE 对蛋白进行可溶性分析，根据蛋白可溶性情况，利用镍柱亲和层析纯化获得高纯度的重组抗原，ASFV 阳性血清对蛋白反应原性进行 Western blot 鉴定。

1.5 间接 ELISA 抗体检测方法反应条件的优化

按照间接 ELISA 的基本操作步骤，首先采用棋盘滴定法确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度。利用 pH=9.6 的碳酸盐缓冲液将蛋白稀释为 800、400、200、100、50 ng/孔，每个梯度重复 1 个孔，4 ℃ 包被过夜；第 2 天弃掉包被液，用 PBST 洗板 3 次并拍干，每孔加入 3% 脱脂乳 37 ℃ 封闭 1 h，弃掉封闭液后 PBST 洗板 5 次并拍干；5% 脱脂乳作为血清稀释液，阴阳性对照血清的稀释度为 1:100、1:200、1:400，每孔 100 μL，37 ℃ 作用 30 min，弃掉后 PBST 洗板 5 次并拍干；二抗按照 1:10 000 比例稀释，37 ℃ 作用 1 h，弃掉后 PBST 洗板 5 次并拍干；每孔加入 100 μL TMB 显色 10 min，最后加入 50 μL 的 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色并读数。读取 OD_{450 nm} 值，求阴阳性对照平均值并计算 P/N 值。根据 P/N 最大值确定最佳的抗原包被浓度和血清稀释度。

按照确定的最佳抗原浓度包被酶标板，在最佳血清稀释度的作用条件下依次对封闭液（2% BSA、5% BSA、3% 脱脂乳、5% 脱脂乳），血清作用时间（30 min、1 h、2 h），二抗工作浓度（1:5 000、1:10 000、1:20 000、1:40 000），二抗工作时间（30 min、1 h、2 h），底物作用时间（5、10、15 和 20 min）等条件进行优化，阴阳性对照设置 2 个重复孔，其他操作不变，根据 P/N 最大值确定最佳反应条件。

1.6 临界值的确定

利用初步建立的 pK205R 间接 ELISA 方法检测 159 份已知 ASF 阴性血清，同时设置阴阳性对照，测定 OD_{450 nm} 值并根据公式计算 159 份阴性血清的 S/P 值，计算 S/P 的平均值 (\bar{X}) 和标准差 (SD)，当数据符合正态分布时按照 99% 置信区间， $\bar{X} \pm 3SD$ 作为阳性判定标准。待检血清的 S/P 值大于等于阳性临界值时判定为阳性，待检血清的 S/P 值小于阴性临

界值时判定为阴性。

1.7 特异性试验

利用建立的检测方法对 CSFV、PRRSV、PCV、PRV 和 Mhp 标准阳性血清进行检测，同时设置阴阳性对照，测量 OD_{450 nm} 值并计算 S/P 值判定结果，评价本方法的特异性。

1.8 灵敏性试验

利用优化的间接 ELISA 抗体检测方法检测 3 份 ASF 阳性血清，血清按照 1:200~1:12 800 的比例进行倍比稀释，同时设置阴阳性对照，最后读取 OD_{450 nm} 值并计算 S/P 值判定结果，评价该方法的灵敏性。

1.9 重复性试验

选取 3 份阳性血清和 7 份阴性血清，用 pK205R 间接 ELISA 抗体检测方法分别进行批间和批内重复试验，验证方法的稳定性。

批内重复性试验：用同批次蛋白包被的酶标板检测 10 份血清，每种血清设置 3 个重复孔，计算 OD_{450 nm} 值的 \bar{X} 、SD 和变异系数 (CV)。

批间重复性试验：用 3 个不同批次的抗原蛋白包被的酶标板检测 10 份血清，计算 OD_{450 nm} 值的 \bar{X} 、SD 和 CV。

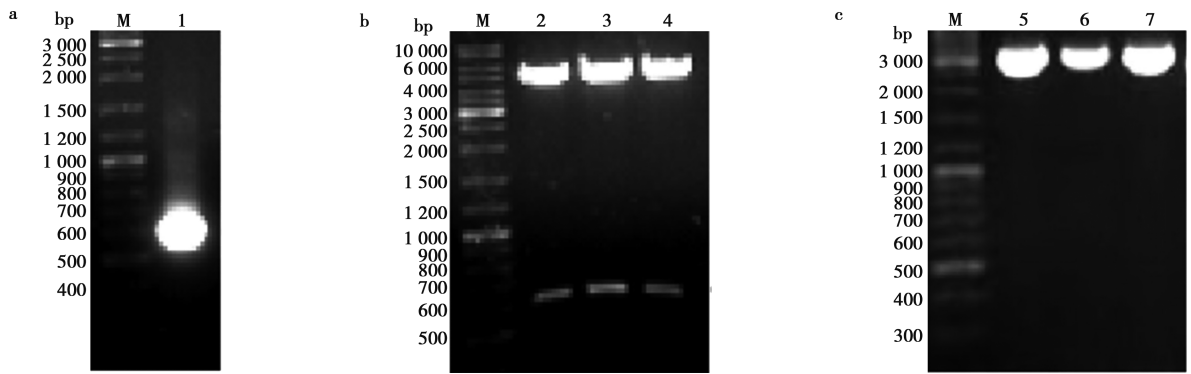
1.10 符合率试验

使用优化的 pK205R 间接 ELISA 抗体检测方法与商品化试剂盒共同检测 130 份临床血清样品，将本方法与商品化试剂盒作对比，计算相对敏感性、相对特异性和符合率。该试验在青岛中国动物卫生与流行病学中心完成。

2 结果与分析

2.1 重组杆粒的构建

以 pcDNA3-2×Flag-K205R 为模板进行 PCR 扩增，通过核酸凝胶电泳鉴定 PCR 产物。K205R 目的条带约为 618 bp (图 1a)；将 K205R 目的基因克隆到 pFastbac-HTA 载体中，经 EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定可知，酶切产物包含 5 000 bp 左右的载体片段和 618 bp 的 K205R 的目的条带 (图 1b)，测序结果与预期相符；利用通用引物对重组杆粒进行 PCR 鉴定可知，Bacmid-pK205R 所在泳道出现了 3 000 bp (3 048 bp) 左右的目的条带 (图 1c)，与预期结果相符，杆粒构建成功。



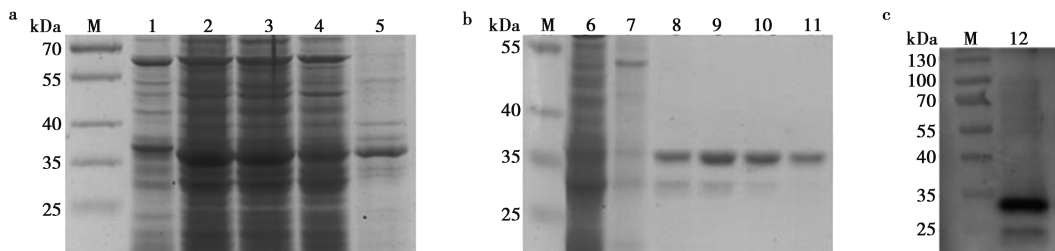
M. DNA Marker; 1. PCR 扩增产物; 2~4. pFastBac-HTA-K205R 双酶切产物; 5~7. Bacmid-K205R 扩增产物。

图 1 目的片段 (a)、重组质粒 (b) 及杆粒 (c) 的鉴定

2.2 蛋白的表达、纯化与鉴定

将 Bacmid-pK205R 转染 sf9 细胞获得重组杆状病毒，重组杆状病毒感染昆虫细胞表达目的蛋白，利用 SDS-PAGE 对蛋白进行可溶性分析，结果显示，蛋白大小在 36 kDa 左右，与预期大小相符，主要表达

在上清液中 (图 2a)。镍柱亲和层析获得高纯度目的蛋白 (图 2b)，利用 ASFV 阳性血清对纯化后的蛋白进行反应原性鉴定，pK205R 蛋白可以与阳性血清结合出现特异性条带 (图 2c)，表明蛋白表达正确且特异性良好。



M. 标准蛋白 Marker; 1. Bacmid 空杆粒对照; 2. 蛋白全菌体; 3. 破碎全菌体; 4. 破碎蛋白上清液; 5. 破碎蛋白沉淀; 6. 流穿液; 7~11. 洗脱蛋白; 12. ASFV 标准阳性血清。

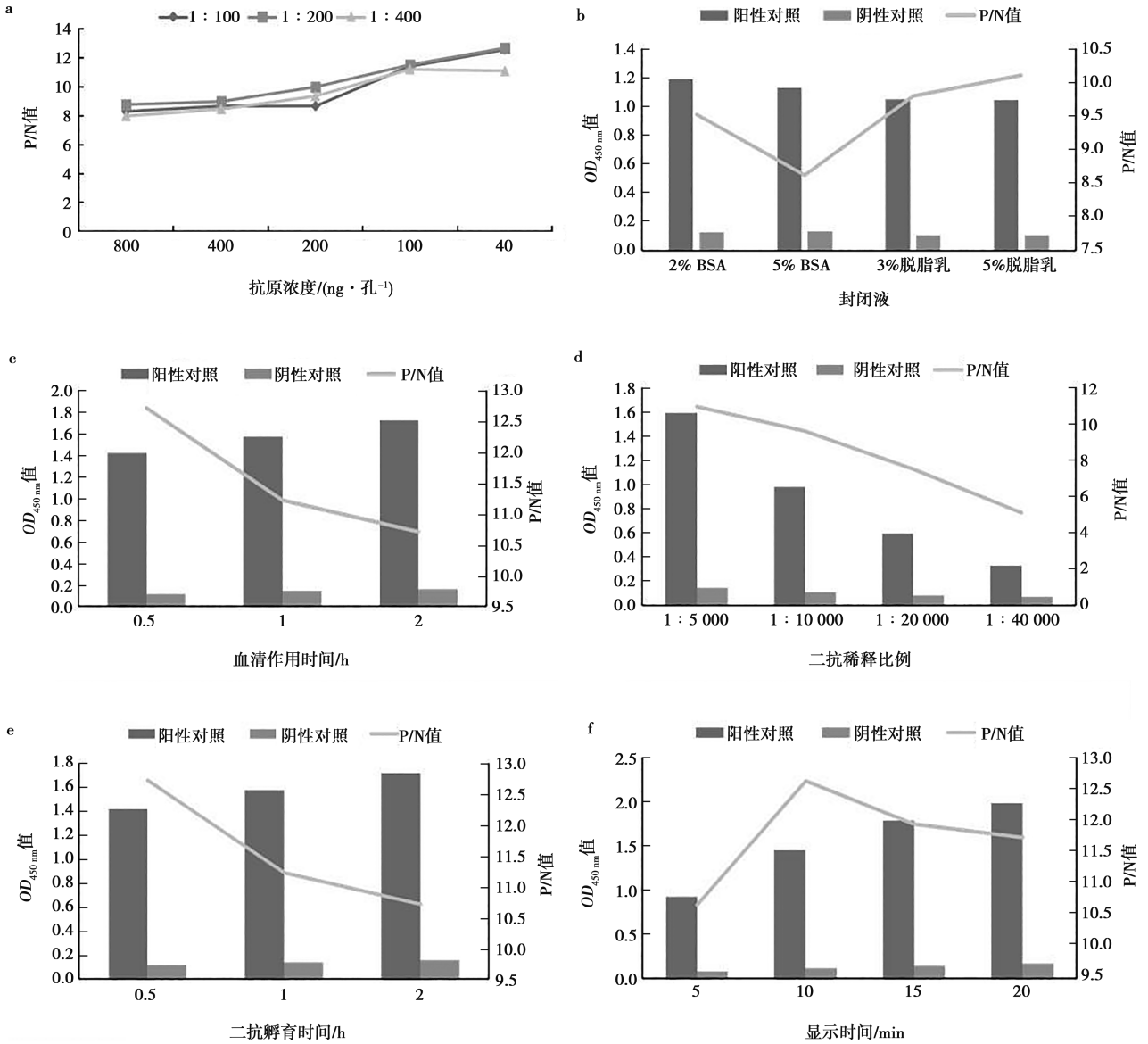
图 2 重组蛋白表达 (a)、纯化 (b) 与反应原性 (c) 鉴定

2.3 间接 ELISA 抗体检测方法反应条件优化

棋盘滴定法确定 pK205R 的最佳包被浓度为 50 ng/孔，血清稀释度为 1 : 200 (图 3a)。依次优化各项反应条件，结果显示，2% BSA 为最佳封闭液，37 °C 封闭 1 h (图 3b)；5% 脱脂乳稀释血清样品，37 °C 环境下作用 0.5 h 孵育效果最好 (图 3c)；二抗工作浓度最佳比例为 1 : 5 000 (图 3d)，37 °C 环境下孵育 0.5 h 时效果最好 (图 3e)；底物作用最佳时间为 37 °C 10 min (图 3f)。

2.4 临界值的确定

利用已经初步建立的 pK205R 间接 ELISA 抗体检测方法对 159 份 ASF 阴性血清进行检测，根据阴阳性对照及阴性血清的 $OD_{450\text{nm}}$ 值按照计算公式求出相应的 S/P 值 (图 4)，利用 SPSS 软件分析该组数据不符合正态分布，经百分位数法分析，其单侧 99% 上限临界值为 0.186。当待检血清的 S/P 值 ≥ 0.186 时为阳性，当待检血清的 S/P 值 < 0.186 时为阴性。



a. 最佳抗原浓度和血清稀释度的确定; b. 最佳封闭液的确定; c. 最佳血清作用时间的确定; d. 最佳二抗工作浓度的确定; e. 最佳二抗工作时间的确定; f. 最佳底物作用时间的确定。

图3 反应条件优化

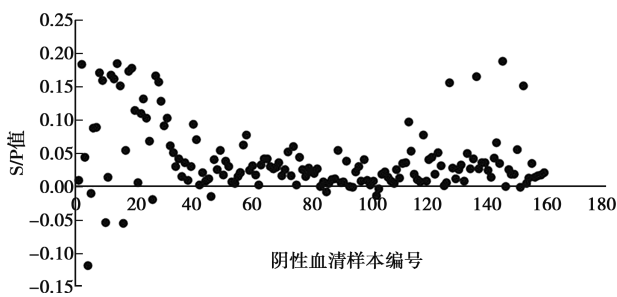


图4 159份阴性血清的S/P值

测方法对 CSFV、PRRSV、PCV、PRV、Mhp 标准阳性血清进行检测。结果如表 1 所示，该检测方法与除 ASFV 阳性血清外的其他病原阳性血清反应均为阴性，表明该检测方法具有良好的特异性。

表 1 不同病原标准阳性血清的特异性试验结果

项目	ASFV	CSFV	PRRSV	PCV	PRV	Mhp
OD _{450 nm} 值	1.469	0.135	0.143	0.266	0.114	0.140
S/P 值	1	0.007	0.013	0.105	-0.008	0.011
判定结果	+	-	-	-	-	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。下同。

2.5 特异性试验

利用已经初步建立的 pK205R 间接 ELISA 抗体检

2.6 灵敏性试验

利用已经初步建立的 pK205R 间接 ELISA 抗体检测方法对已知的 3 份 ASF 阳性血清进行检测, 结果如表 2 所示, 3 份血清可识别的最大稀释倍数分别为 1 : 400、1 : 1 600、1 : 3 200, 表明该方法有较好的灵敏性。

表 2 灵敏性试验结果

血清稀释度	血清 1		血清 2		血清 3	
	S/P 值	判定	S/P 值	判定	S/P 值	判定
1 : 200	1.035	+	0.618	+	1.395	+
1 : 400	0.746	+	0.309	+	1.090	+
1 : 800	0.495	+	0.148	-	0.788	+
1 : 1 600	0.295	+	0.065	-	0.553	+
1 : 3 200	0.166	-	0.009	-	0.287	+
1 : 6 400	0.084	-	-0.009	-	0.141	-
1 : 12 800	0.037	-	-0.019	-	0.074	-

2.7 重复性试验

利用已经初步建立的 pK205R 间接 ELISA 抗体检测方法进行批内重复试验和批间重复试验, 选取 3 份阳性血清和 7 份阴性血清作为检测样本, 结果如表 3 所示。批内重复试验和批间重复试验的 CV 均小于 10%, 说明该方法具有良好的可重复性。

表 3 批内和批间重复性试验结果

样品	批内重复		批间重复	
	检测值	CV/%	检测值	CV/%
阳性血清	0.989±0.048	4.84	0.955±0.018	1.84
	0.731±0.011	1.51	0.645±0.049	7.57
	1.448±0.066	4.57	1.363±0.070	5.13
阴性血清	0.095±0.001	1.21	0.077±0.006	7.23
	0.100±0.002	2.09	0.078±0.005	6.41
	0.094±0.002	1.62	0.077±0.006	7.23
	0.098±0.002	1.55	0.079±0.006	7.59
	0.097±0.001	1.19	0.087±0.003	3.68
	0.111±0.003	2.26	0.088±0.006	6.23
	0.104±0.004	3.47	0.078±0.004	5.16

2.8 符合率试验

使用本研究建立的 pK205R 间接 ELISA 检测方法与商品化试剂盒共同检测 130 份 ASF 临床血清样品, 两种方法的结果对比如表 4 所示, 计算得到该方法的相对特异性为 84.85%, 相对敏感性为 75%, 总符合率为 79.92%。

表 4 间接 ELISA 抗体检测与商品化试剂盒符合率检测

间接 ELISA	商品化试剂盒		
	阳性样品/份	阴性样品/份	总计/份
阳性样品/份	48	10	58
阴性样品/份	16	56	72
总计/份	64	66	130

3 讨论

ASF 是一种可以引起家猪和野猪急性发病、死亡率极高的一类传染病。该传染病自暴发以来, 已经蔓延到许多国家和地区, 对与生猪养殖等相关行业造成打击。与 ASF 暴发之初相比, 目前临床流行的 ASFV 基因 II 型毒株变异复杂, 出现了低毒力变异株, 临床呈隐性感染、低病毒血症、间隙排毒等新情况, 同时部分地区也发现了基因 I 型毒株, 增加了检测监测的难度^[13]。建立高灵敏、高特异的 ASF 早期诊断方法, 是实现 ASFV 快速检测的关键。ELISA 是一种 WOAH 规定针对国际贸易的指定试验, 用于检测 ASFV 的特异性抗体。ELISA 方法敏感性强、操作简便且经济实惠, 适用于初步的大规模筛查^[14]。当前商品化 ASF 的 ELISA 检测试剂盒包被用蛋白主要包括 p72、p30、p54、pp62 等, 另外, 有相关研究发现重组 pK205R、A104R、B602L 检测抗体也有较好的敏感性和特异性^[15-16]。pK205R 蛋白可诱导猪产生强烈的免疫应答, 是 ASFV 的主要抗原之一^[11,17]。国内关于 pK205R 的研究较少, 该基因在感染早期复制, 可作为 ASFV 及时检测的靶标。

本课题组在前期研究中建立了 p72 间接 ELISA 检测方法, 其符合率仅为 68.85%。我们猜测, 可能是因为 p72 采用原核表达系统制备, 且主要表达在包涵体中, 无高级结构; 另外, 作为一种晚期蛋白, p72 对早期感染的检出率也不太理想。因此, 为了优化检测效果, 本研究利用杆状病毒表达系统制备 pK205R 重组抗原, 相较于原核表达系统, 该系统制备的蛋白更接近天然构象。Western blot 结果表明, 制备的 pK205R 蛋白与 ASFV 阳性血清发生特异性反应, 表明该蛋白的抗原性良好。

检测方法临界值的确定, 若 S/P 值符合正态分布, 可利用置信区间进行判断, SPSS 统计软件分析该组数据不符合正态分布, 属于偏态分布, 可利用百分位数法进行分析, 由于阳性样本数量低, 无法确定可疑区范围, 存在假阳性率高的局限性, 选择单侧 99% 上限来降低假阳性的可能性。基于 ASF 严格的实验室条件, 在后续研究中, 可以增加血清样本对临界值进一步确定。最后, 用本方法和 ASF 商品化试

试剂盒共同检测 130 份临床血清样品, pK205R 检测方法符合率为 79.92%, 可见其检测效果优于 p72 间接 ELISA 检测方法。在后续研究中, 可以利用更多的临床血清样本如感染 ASFV 后不同时间点的试验猪血清等进行检测, 并利用间接免疫荧光、免疫印迹等试验确定临床血清的阴阳性, 进一步判定该方法的符合度。另外, 可以进一步优化抗原制备, 同时尝试双抗原或多抗原包被, 以提高检测敏感性, 研制能应用于实际需要的 ELISA 检测试剂盒。

综上, 本研究成功建立了具有良好特异性和重复性的 pK205R 间接 ELISA 抗体检测方法。该方法与国外商品化抗体检测试剂盒符合率为 79.92%, 为研发 ASF 抗体的快速检测试剂盒奠定了基础。

参考文献:

- [1] BLOME S, FRANZKE K, BEER M. African swine fever: a review of current knowledge [J]. *Virus Res*, 2020, 287: 198099.
- [2] GAUDREAU N N, MADDEN D W, WILSON W C, et al. African swine fever virus: an emerging DNA arbovirus [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 215.
- [3] EUSTACE MONTGOMERY R. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony) [J]. *J Comp Pathol*, 1921, 34: 159-191.
- [4] WOZNAKOWSKI G, KOZAK E, KOWALCZYK A, et al. Current status of African swine fever virus in a population of wild boar in eastern Poland (2014-2015) [J]. *Arch Virol*, 2016, 161 (1): 189-195.
- [5] SANCHEZ-VIZCAINO J M, MUR L, MARTINEZ-LOPEZ B. African swine fever: an epidemiological update [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2012, 59 (Suppl 1): 27-35.
- [6] DIXON L K, ABRAMS C C, BOWICK G, et al. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 100 (3/4): 117-134.
- [7] GALINDO I, ALONSO C. African swine fever virus: a review [J]. *Viruses*, 2017, 9 (5): 103.
- [8] DE VILLIERS E P, GALLARDO C, ARIAS M, et al. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences [J]. *Virology*, 2010, 400 (1): 128-136.
- [9] DIXON L K, CHAPMAN D A, NETHERTON C L, et al. African swine fever virus replication and genomics [J]. *Virus Res*, 2013, 173 (1): 3-14.
- [10] 张鑫宇, 陈宇, 刘文俊, 等. 非洲猪瘟病毒 E183L、B602L、K205R 和 A104R 基因表达及诊断抗原筛选 [J]. *中国兽医杂志*, 2014, 50: 3-5.
- [11] GUTIERREZ-CASTANEDA B, REIS A L, CORTEYN A, et al. Expression, cellular localization and antibody responses of the African swine fever virus genes B602L and K205R [J]. *Arch Virol*, 2008, 153 (12): 2303-2306.
- [12] SUN E, ZHANG Z, WANG Z, et al. Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020 [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64 (5): 752-765.
- [13] ZHAO D, LIU R, ZHANG X, et al. Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8 (1): 438-447.
- [14] GALLARDO C, SOLER A, NIETO R, et al. Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE internationally prescribed serological tests [J]. *Vet Microbiol*, 2013, 162 (1): 32-43.
- [15] GALLARDO C, REIS A L, KALEMA-ZIKUSOKA G, et al. Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16 (7): 1012-1020.
- [16] REIS A L, PARKHOUSE R M E, PENEDOS A R, et al. Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus [J]. *J Gen Virol*, 2007, 88 (9): 2426-2434.
- [17] GALLARDO C, MWAENGO D M, MACHARIA J M, et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes [J]. *Virus Genes*, 2009, 38 (1): 85-95.