

刘石, 刘缓缓, 刘君君, 等. 猪传染性胃肠炎病毒间接 ELISA 抗体检测方法的建立与应用[J]. 山西农业科学, 2025, 53(6): 176-182.

LIU S, LIU H H, LIU J J, et al. Development and application of an indirect ELISA antibody detection method for porcine transmissible gastroenteritis virus[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(6): 176-182.

doi:10.26942/j.cnki.issn.1002-2481.2025.06.21

猪传染性胃肠炎病毒间接 ELISA 抗体检测方法的建立与应用

刘石¹, 刘缓缓², 刘君君², 穆向辉², 郭子涵², 徐鼎盛²,
项玉强^{2,3,4}, 郭东辉², 陈丽颖^{2,3,4}

(1. 河南省种业发展中心, 河南 郑州 450046; 2. 河南农业大学 动物医学院, 河南 郑州 450046; 3. 动物病原与生物安全教育部重点实验室, 河南 郑州 450046; 4. 河南省动物性食品病原体监控重点实验室, 河南 郑州 450046)

摘要:猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)是一种高度传染性的病原体,会导致猪(尤其是仔猪)严重腹泻,造成重大经济损失。为建立一种用于 TGEV 血清抗体的高特异性、高灵敏度的间接 ELISA 检测方法,为监测猪传染性胃肠炎病毒在猪场的流行情况以及免疫后抗体水平评价提供技术支持,以灭活的 TGEV HN—2012 株全病毒作为固相包被抗原,系统性优化反应参数,确定最佳反应条件。结果表明,建立的间接 ELISA 检测方法阴阳性临界值为 0.439 2,最佳反应条件为:用碳酸盐缓冲液将灭活后的抗原(灭活前病毒滴度 1.0×10^7 TCID₅₀/mL)1:8 稀释,50 μL/孔,37 °C 孵育 3 h;2.5% BSA 37 °C 封闭 2 h;血清样本稀释比例为 1:64,37 °C 孵育 45 min;酶标抗体 1:6 000 稀释,37 °C 孵育 60 min;TMB 显色 10 min。该检测方法特异性好,与其他常见猪病毒阳性血清均无交叉反应;敏感性高,高免阳性血清 1:1 024 倍稀释时检测结果仍为阳性;批内、批间重复性好,变异系数均小于 10%;利用所建立的 ELISA 方法对 100 份疑似感染 TGEV 的猪血清样品进行检测,结果与血清中和试验符合率为 98%。对河南省 588 份临床疑似感染猪传染性胃肠炎病毒的血清样品进行检测,抗体阳性率为 64.97%。

关键词:猪传染性胃肠炎病毒;ELISA;血清学;流行病学

中图分类号:S858.28 文献标识码:A 文章编号:1002-2481(2025)06-0176-07

Development and Application of an Indirect ELISA Antibody Detection Method for Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus

LIU Shi¹, LIU Huanhuan², LIU Junjun², MU Xianghui², GUO Zihan², XU Dingsheng²,
XIANG Yuqiang^{2,3,4}, GUO Donghui², CHEN Liying^{2,3,4}

(1. Henan Province Seed Industry Development Center, Zhengzhou 450046, China; 2. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory for Animal Pathogens and Biosafety, Zhengzhou 450046, China; 4. Henan Province Key Laboratory for Animal Food Pathogens Surveillance, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Porcine transmissible gastroenteritis virus(TGEV) is a highly contagious pathogen that can cause severe diarrhea in pigs, especially piglets, leading to significant economic losses. Aiming to establish a highly specific and sensitive indirect ELISA detection method for TGEV serum antibody to provide technical support for monitoring the prevalence of porcine transmissible gastroenteritis virus in pig farms and evaluating antibody levels after immunization, in this study, using inactivated whole virus of the TGEV HN-2012 strain as the solid-phase coating antigen, a highly specific indirect ELISA

收稿日期:2025-07-28

基金项目:河南省重点研发专项(231111113100);河南省自然科学基金(232300421001)

作者简介:刘石,高级兽医师,硕士,主要从事动物疫病快速诊断方法研究,E-mail:hnl60@126.com

通信作者:郭东辉,兽医师,在读博士,研究方向:动物传染病学,E-mail:guodonghui0808@126.com

陈丽颖,教授,博士生导师,主要从事动物源性食品安全及其分子病原学研究,E-mail:chliying@henau.edu.cn

detection method was constructed by systematically optimizing the reaction parameters, and the optimal reaction conditions were determined. The results showed that the cut-off value for positive/negative of the established indirect ELISA detection method was 0.4392, the optimal reaction conditions were as follows: the inactivated antigen (virus titer before inactivation: 10^{7.0} TCID₅₀/ml) diluted 1:8 with carbonate buffer, 50 μL/well, incubated at 37 °C for 3 h, and blocked with 2.5% of BSA at 37 °C for 2 h; serum samples diluted 1:64, incubated at 37 °C for 45 min; enzyme-labeled antibody diluted 1:6,000, incubated at 37 °C for 60 min; TMB color development for 10 min. This detection method exhibited good specificity, with no cross-reactivity with positive sera from other common porcine viruses; high sensitivity, as hyperimmune positive serum diluted 1:1024 still yielded positive results; and good intra- and inter-batch reproducibility, with coefficients of variation less than 10%. Using the established ELISA method, 100 pig serum samples suspected of TGEV infection were tested, and the concordance rate between the detection results and the serum neutralization test was 98%. Detection of 588 clinical serum samples from Henan province suspected of porcine transmissible gastroenteritis virus infection showed an antibody positive rate of 64.97%.

Keywords: Transmissible gastroenteritis virus(TGEV); ELISA; serology; epidemiology

猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)是引发猪急性、高度传染性腹泻的主要病原体,可造成养殖业重大经济损失^[1-2]。TGEV 主要定植于猪小肠组织,通过破坏肠绒毛结构引发肠道稳态失衡,造成仔猪严重腹泻及营养代谢障碍^[3-6]。值得注意的是,TGEV 具有跨物种传播能力,可感染猫、犬等哺乳动物^[7-9]。TGEV 主要依赖疫苗免疫进行防控,及时、准确地监测 TGEV 抗体水平,是科学防控 TGEV 的基础。TGEV 血清学方法包括中和试验(Neutralization test, NT)、间接免疫荧光法(Indirect fluorescent Assay, IFA)、胶体金免疫层析(Gold immunochromatographic assay, GICA)、免疫过氧化物酶单层试验(Immunoperoxidase monolayer assay, IPMA)等^[10-13]。ELISA 方法与其他方法相比,在灵敏度、通量、标准化、安全性等方面有明显优势,尤其适合猪群大规模监测和临床诊断。

TGEV 基因组为单股正链不分节段的 RNA,全长 28~30 kb,其中,4 种主要结构蛋白在病毒生命周期及免疫识别中发挥关键作用,核衣壳蛋白(N)是病毒核衣壳的核心组成成分,主要包裹病毒 RNA 基因组以维持其稳定性,同时也是机体免疫应答早期识别的重要靶标;纤突糖蛋白(S)位于病毒颗粒表面,通过介导病毒与宿主细胞表面受体的结合及膜融合参与感染起始过程,是诱导中和抗体产生的主要抗原;膜糖蛋白(M)是病毒包膜的核心结构蛋白,在病毒装配与出芽过程中起关键调控作用;小膜蛋白(sM)则作为辅助结构蛋白,与 M 蛋白协同参与病毒包膜的形成与成熟。已有基于 TGEV N 蛋白或 S 蛋白的间接 ELISA 研究^[14-16],由于 N 蛋白抗体通常在感染早期出现,而 S 蛋白抗体在中后期逐渐上升,因此,仅使用单一

重组蛋白的 ELISA 抗体无法捕捉到不同感染阶段的动态抗体谱,导致诊断窗口受限。

本研究在动物病原与生物安全教育部重点实验室的 TGEV 分离纯化灭活研究的基础上^[17],系统评估以灭活全病毒抗原作为包被抗原构建 ELISA 抗体检测方法的特异性、敏感性、重复性及临床适用性,旨在为 TGEV 的快速诊断和疫病防控提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 毒株、血清与细胞 TGEV HN-2012 毒株、猪睾丸细胞(Swine testis cell, ST 细胞)、TGEV、伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)、猪圆环病毒 2(Porcine circovirus, PCV2)、猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)、猪呼吸与繁殖障碍综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪丁型冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)、猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)阳性血清和猪阴性血清样本均由动物病原与生物安全教育部重点实验室制备、鉴定和提供。

1.1.2 临床样品来源 采集河南 7 个地市的 25 个猪场血清样品共 588 份,每份 2~3 mL,样品低温加冰包装后 24 h 内送回实验室待处理。离心后,取上层血清保存备检。

1.2 主要试剂

HRP-标记的羊抗猪 IgG(武汉三鹰生物技术有限公司)、牛血清白蛋白(BSA)(西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司)、ProClin-300(北京索莱宝科技有限公司)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(上海麦克林生化科技股份有限公司)、Difco™

Skim Milk(美国 BD 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 抗原包被液的选择 采用磷酸盐缓冲液 PBS (10 mmol/L, pH=7.4)、CB(50 mmol/L, pH=9.6)、TB(0.1 mol/L, pH=7.5)、硼酸缓冲液(50 mmol/L, pH=8.0)等不同包被液对 TGEV 病毒原液(1×10^7 TCID₅₀/mL)进行稀释,将稀释的病毒溶液包被酶标板,将 TGEV 阴阳性血清用抗体稀释液进行稀释,后将稀释液 100 μ L/孔加入酶标板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。洗板 5 次并拍干,用酶标抗体稀释液将 HRP-羊抗猪 IgG 抗体进行稀释,加入酶标板中 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。洗板 5 次后,加入 TMB 显色液 100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 反应 5~10 min,每孔加入 50 μ L 终止液。反应结束后 30 min 内测定 OD₄₅₀。以阴性血清的 OD₄₅₀ 为噪声背景值,阳性血清的 OD₄₅₀ 为信号值,计算出信噪比(Signal to Noise, S/N 值),以确定最佳抗原包被液。

1.3.2 抗原包被条件的选择 在以上优化条件的基础上分别设置冷包和热包 2 种模式,其中,冷包为抗原 4 $^{\circ}$ C 包被 16 h,热包为抗原 37 $^{\circ}$ C 包被 3 h。按照 1.3.1 的方法进行后续试验,通过测定 OD₄₅₀ 计算 S/N 值,以确定最佳抗原包被条件。

1.3.3 包被抗原浓度的选择 以优化的血清稀释度为基础进行抗原包被条件的优化。将已灭活的 TGEV 病毒液进行 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32~1/256 倍比稀释,将稀释液每孔 100 μ L 加入酶标板中,37 $^{\circ}$ C 包被 3 h。按照 1.3.1 的方法进行后续试验,通过测定 OD₄₅₀ 计算 S/N 值,从而确定最佳包被抗原浓度。

1.3.4 封闭液的选择 在确定抗原包被浓度以及血清稀释度的基础上对封闭条件进行优化。选取 2.5% BSA、1% BSA、2.5% S.M.、1% S.M.、2.5% (BSA+S.M.)、1% (BSA+S.M.)、2.5% S.M.+1% BSA、1% S.M.+2.5% BSA 为封闭液,加入酶标板中 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育 2 h,待封闭结束,按照 1.3.1 的方法进行后续试验,通过测定 OD₄₅₀ 计算 S/N 值,以确定最佳封闭液。

1.3.5 待检抗体孵育时间的选择 在确定封闭条件的基础上对待检抗体孵育时间进行优化。设定 15、30、45、60 min 等 4 个时间对 PDCoV-N-ELISA、TGEV-V-ELISA 等 2 种方法进行优化,按照 1.3.1 的方法进行后续试验,通过测定 OD₄₅₀ 计算 S/N 值,以确定最佳待检抗体孵育时间。

1.3.6 酶标抗体稀释度的选择 在确定以上条件

的基础之上对酶标抗体稀释度进行条件优化。将带有 HRP 羊抗猪多克隆抗体进行 1/2 000、1/4 000、1/8 000、1/16 000、1/32 000 梯度稀释,加入已封闭完成的酶标板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min。按照 1.3.1 的方法进行后续试验,通过测定 OD₄₅₀ 计算 S/N 值,以确定最佳酶标抗体稀释度。

1.3.7 酶标抗体孵育时间的选择 在以上基础上对酶标抗体孵育时间进行条件优化。设定 15、30、45、60 min 等 4 个时间段,按照 1.3.1 的方法进行后续试验,通过测定 OD₄₅₀ 计算 S/N 值,最高者即为最佳酶标抗体孵育时间。

1.3.8 显色时间的选择 在确定以上条件的基础上对显色时间进行条件优化。将显色时间设定为 5、10、15、20、30 min,待显色完成后加入 50 μ L 的终止液,测定 OD₄₅₀,计算 S/N 值,以确定最佳显色反应时间。

1.3.9 临界值判定 按照最佳反应条件建立的间接 ELISA 方法,检测 100 份 TGEV 临床血清(60 份阳性血清,40 份阴性血清),通过 GraphPad Prism 8.0 进行数据统计分析并绘制 ROC 曲线,从 ROC 曲线中得出各切点的灵敏度和特异性,并计算 Youden 指数,从而判定 TGEV-V-ELISA 方法的临界值。

1.3.10 特异性评估 利用所建立的间接 ELISA 方法检测 PRRSV、PEDV、CSFV、ASFV、PRV、PCV、PDCoV 阳性血清和猪阴性血清,设立标准阳性对照组,以此确定该方法的特异性。

1.3.11 灵敏度评估 将 TGEV 病毒阳性血清按照 1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128~1/8 192 倍比稀释,利用所建立的间接 ELISA 方法进行检测,通过判定标准确定该方法的灵敏度。

1.3.12 重复性评估 批内重复性:使用同一批次酶标板,利用所建立的间接 ELISA 方法对 10 份血清样品(含 5 份阳性血清和 5 份阴性血清)进行检测,每个样品检测 3 次,计算批内变异系数(Coefficient of variation, CV)。批间重复性:使用不同批次酶标板,于 3 个不同时间段利用所建立的间接 ELISA 方法对上述 10 份血清样本进行 3 次检测,计算批间变异系数(CV)。

$$CV = \text{标准差} / \text{平均数} \times 100\% \quad (1)$$

1.4 临床样品检测

用已优化的 TGEV 间接 ELISA 抗体检测方法,对分别收集于河南省郑州市、焦作市、许昌市、安阳市、驻马店市、新乡市、济源市共 7 个市级地区

的多家不同规模生猪养殖基地的 588 份待检血清进行检测,统计其阳性率。

1.5 血清中和比对试验

为了进一步验证 TGEV 间接 ELISA 抗体方法的检测结果,选取 100 份临床血清进行血清中和试验,其中,阳性血清 60 份,阴性血清 40 份,并计算符合率。血清中和试验的具体步骤如下:在 96 孔细胞培养板上从 1:4 开始倍比稀释血清,稀释至 1:512,每个稀释度重复 3 孔,保留 50 μL /孔,然后加 200 个 TCID_{50} 的 TGEV HN—2012 株病毒液 50 μL /孔;振荡 1~2 min,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;再加 ST 细胞悬液(10^5 个/mL)50 μL /孔,同时设 TGEV 阴/阳性血清、病毒、正常细胞对照孔,培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱,72 h 后判定结果。以病毒孔和阴性血清对照孔均出现细胞致病变效应(CPE)、阳性血清及正常细胞对照组均无 CPE 为

试验成立,将能抑制 50% 以上细胞出现 CPE 的血清最高稀释度判定为待检血清样本的 TGEV 抗体效价,中和抗体效价 $>1:4$ 为 TGEV 阳性血清,中和抗体效价 $<1:2$ 为 TGEV 阴性血清。

2 结果与分析

2.1 间接 ELISA 方法的条件优化

选定 S/N 值较大且阴/阳性值在合理范围内的反应条件为该 ELISA 方法的最优反应条件,结果如图 1 所示,TGEV 最佳的包被液为 CB,最佳包被条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 3 h,TGEV 病毒的最佳包被浓度为 1:8 稀释(病毒效价为 $10^7 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$),最佳封闭液为 2.5% BSA。待检血清最佳孵育时间为 45 min,酶标抗体最佳稀释度为 1:6 000;酶标抗体最佳孵育时间为 60 min,TMB 最佳显色时间为 10 min。

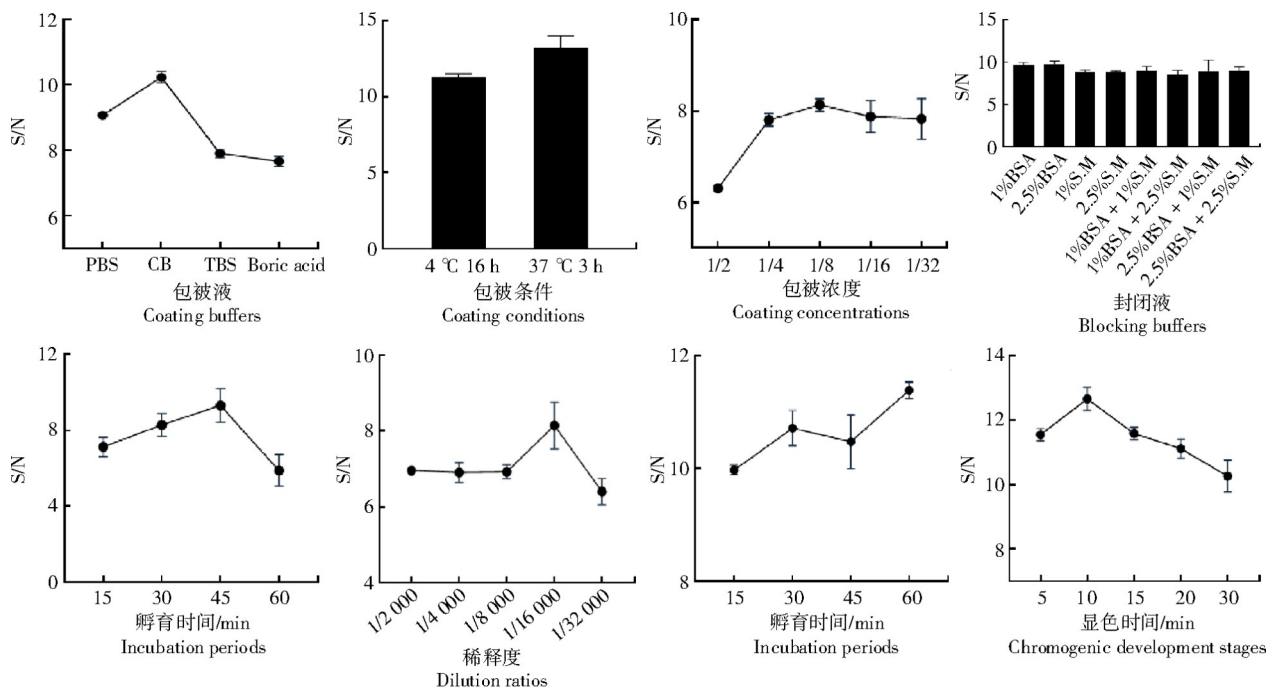


图 1 间接 ELISA 方法的条件优化

Fig.1 Optimization of experimental conditions for indirect ELISA

2.2 临界值确定

以所优化的条件为基础检测 100 份 TGEV 临床血清,ROC 曲线如图 2 所示。以最大的 Youden 指数为确定灵敏度和特异度的依据,可知灵敏度和特异度分别为 95.00% 和 97.50%;相对应的吸光度值为 0.439 2,此时曲线下面积为 0.992 1,95% 可信区间为 0.871 2~0.998 7。因此,当 $\text{OD}_{450} > 0.439 2$ 时判定为阳性,反之则为阴性。

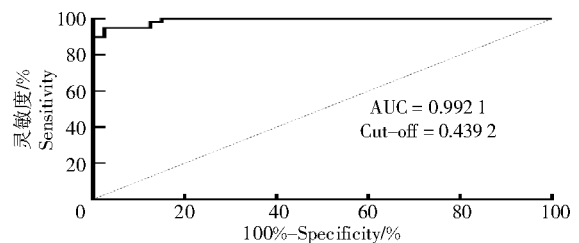
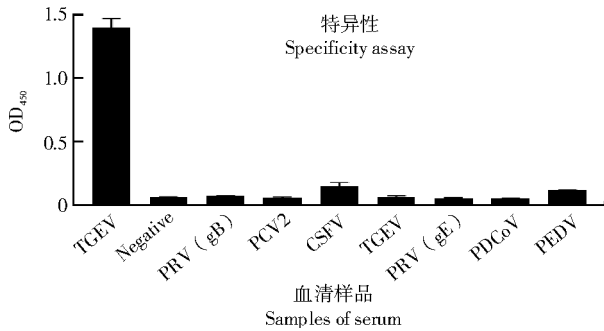


图 2 TGEV ELISA ROC 曲线

Fig.2 TGEV ELISA Rock curve

2.3 特异性和灵敏度检测

选取 PRV、PCV2、CSFV、PRRSV、PDCoV、PEDV 阳性血清用于判定 TGEV 间接 ELISA 的特异性,结果如图 3 所示,在阴性血清检测为阴性值的基础上,确定 TGEV 阳性血清为阳性,其余血清检



测均为阴性,表明建立的 TGEV 间接 ELISA 抗体检测方法与其他血清无交叉反应,具有较好的特异性。TGEV 阳性血清稀释到 1:1 024 时,结果仍为阳性,表明建立的 TGEV 间接 ELISA 抗体检测方法具有较高的灵敏度。

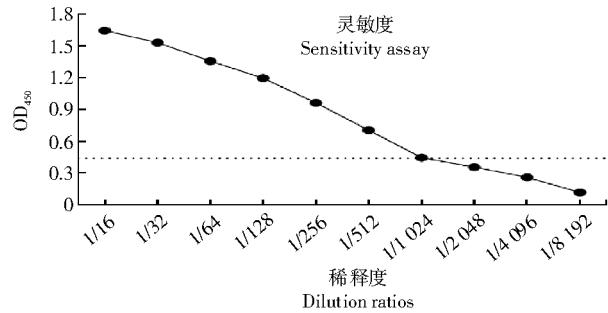


图 3 间接 ELISA 方法的特异性和灵敏度

Fig.3 Specificity and sensitivity of indirect ELISA

2.4 重复性试验结果

所建立的间接 ELISA 抗体检测方法批内变异系数为 0.94%~4.95%,批间变异系数为 1.64%~

7.63%,二者均小于 8%,表明该检测方法具有良好的重复性(表 1)。

表 1 间接 ELISA 方法的重复性

Tab.1 Repeatability test of indirect ELISA

血清样品 Samples of serum		批内重复试验 Intra-batch repeatability			批间重复试验 Inter-batch repeatability		
		OD ₄₅₀	变异系数/%	CV	OD ₄₅₀	变异系数/%	CV
阴性血清 Negative samples	1	0.078 6±0.003 7	4.73		0.075 6±0.004 6	6.04	
	2	0.075 5±0.002 4	3.17		0.067 7±0.004 9	7.23	
	3	0.054 2±0.002 7	4.95		0.058 8±0.004 5	7.63	
	4	0.048 2±0.000 5	0.94		0.049 6±0.002 6	5.24	
	5	0.083 5±0.000 8	0.95		0.086 8±0.002 8	3.23	
阳性血清 Positive samples	6	1.536 5±0.014 5	0.94		1.482 8±0.065 9	4.44	
	7	0.970 0±0.024 1	2.48		1.013 2±0.062 2	6.14	
	8	1.547 9±0.023 2	1.50		1.546 1±0.037 1	2.40	
	9	1.500 9±0.034 5	2.30		1.541 3±0.025 3	1.64	
	10	1.314 8±0.044 6	3.39		1.333 4±0.063 1	4.73	

2.5 临床检测情况

由表 2 可知,TGEV 总体阳性率为 64.97%,其中,新乡市地区的阳性率最高,为 92.86%;郑州市地区的阳性率最低,为 30.08%;焦作市的阳性率

为 60.83%;许昌市的阳性率为 79.41%;安阳市的阳性率为 76.32%;驻马店市的阳性率为 62.32%;济源市的阳性率为 63.89%,表明河南省不同地区的阳性率的差别较大。

表 2 不同地区的临床血清 TGEV 抗体检测

Tab.2 Clinical serum TGEV antibody detection in different regions

血清来源 Source of sera	样品数/份 Number of samples	阳性/份 Positive	阳性率/% Positive rate	血清来源 Source of sera	样品数/份 Number of samples	阳性/份 Positive	阳性率/% Positive rate
焦作 Jiaozuo	240	146	60.83	驻马店 Zhumadian	69	43	62.32
郑州 Zhengzhou	53	17	30.08	新乡 Xinxiang	42	39	92.86
许昌 Xuchang	34	27	79.41	济源 Jiyuan	36	23	63.89
安阳市 Anyang	114	87	76.32	总计 Total	588	382	64.97

从不同季节临床血清 TGEV IgG 抗体检测情况可以看出,河南省内地区春季、冬季血清阳性率分别为 84.91% 和 75.96%,夏季、秋季血清阳性率

分别为 69.52% 和 67.53%,表明 TGEV 在寒冷季节的流行情况比较严重(表 3)。

表 3 不同季节的临床血清 TGEV IgG 抗体检测

Tab.3 Clinical serum TGEV IgG antibody detection by season

季节 Season	样品数/份 Number of samples	阳性/份 Positive	阳性率/% Positive rate	季节 Season	样品数/份 Number of samples	阳性/份 Positive	阳性率/% Positive rate
春季 Spring	53	45	84.91	冬季 Winter	104	79	75.96
夏季 Summer	210	146	69.52	总计 Total	561	401	71.48
秋季 Autumn	194	131	67.53				

2.6 符合率分析

将 TGEV 间接 ELISA 与血清中和试验结果进

行比较,2种检测方法的阳性血清符合率为 96.67%、阴性血清符合率为 100%,总符合率为 98%(表 4)。

表 4 间接 ELISA 方法与血清中和试验符合率

Tab.4 The concordance rate of indirect ELISA assay and serum neutralization test assay

项目 Item	指标 Factor	数量 Number	间接 ELISA 试验 Indirect ELISA			
			阳性/份 Positive	阴性/份 Negative	总计/份 Total	总计/份 Total
血清中和试验 Serum neutralization test	阳性/份	60	58	2	60	
	阴性/份	40	0	40	40	
	总计/份	100	58	42	100	
符合率 Concordance rate	阳性符合率/%			96.67		
	阴性符合率/%			100		
	总符合率/%			98		

3 结论与讨论

近年来,非洲猪瘟疫情过后,养猪行业重新蓬勃发展,生物安全防控设备、疫苗及防控措施均有所提升,猪群急性传染病感染情况得以改善,但猪群传染性胃肠炎仍是需重点关注的防控对象之一^[18],预防和治疗猪传染性胃肠炎是养殖业的关键任务。现有研究均成功构建了用于检测猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)血清抗体的间接 ELISA 方法,证实了 ELISA 技术在 TGEV 血清学诊断中的可行性与可靠性^[14-15,19]。抗原的不同明显影响 ELISA 方法的检测水平,以 N 蛋白为抗原的 ELISA 检测方法批内、批间 CV 均小于 5%,特异性为 100%^[14];而以 S 基因 B、C 位点片段为抗原的 ELISA 检测方法特异性和符合率分别为 96.4%、84.0%^[15]。本研究采用灭活 TGEV HN—2012 株全病毒为抗原,通过优化反应参数,高免血清 1:1 024 稀释仍可检出,与常见猪病毒无交叉反应,与中和试验 98% 一致,变异系数小于 10%。实现了高敏感度、良好的特异性及较高临床符合率,同时批内、批间重复性好,优于单一的 N 蛋白或 S 蛋白的方法。

本研究构建的全病毒间接 ELISA 方法与中和

试验相比,虽有较高的符合率,但是依然有 2 份阳性样品漏检,可能来源于临床 TGEV 变异株,其表面抗原(如 S 蛋白)的关键表位发生氨基酸突变,导致 HN—2012 株全病毒抗原无法与变异株诱导产生的抗体有效结合;或是血清样本中存在的干扰物质(如类风湿因子、猪血清中的补体成分、非特异性免疫球蛋白)进一步抑制了抗原-抗体结合反应,导致 OD 值低于临界值而被判为阴性。后续研究将优化全病毒抗原制备工艺,提高抗原稳定性,降低批间 CV 至 5% 以内;进一步构建“全病毒+重组 N 蛋白”双抗原 ELISA 体系,利用全病毒的高敏感度与 N 蛋白的高特异性互补,提升检测性能;同时扩大临床样本范围,纳入不同日龄、不同地区及免疫抑制状态的猪血清,验证其临床普适性。

本研究对河南省 7 个地市共 588 份临床血清检测出 TGEV 抗体阳性率 64.97%,因采样均来自腹泻或 PCR 阳性场,可能会导致阳性率偏高。地区差异显著,许昌最高,为 79.41%,郑州最低,为 30.08%,提示不同地域的养殖场管理水平、生物安全措施(如消毒、隔离)等存在差异,加强生物安全措施和猪群卫生管理对于 TGEV 等腹泻相关病毒的防控也具有重要意义^[20]。冬季阳性率高于

暖季,表明低温利于病毒存活^[21-22]。

综上,本研究建立的间接 ELISA 方法可用于监测猪群中 TGEV 的抗体水平,为 TGEV 的防控提供可靠的检测手段。

参考文献:

- [1] PU J N, CHEN D W, TIAN G, et al. All-trans retinoic acid attenuates transmissible gastroenteritis virus-induced inflammation in IPEC-J2 cells *via* suppressing the RLRs/NF- κ B signaling pathway[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 734171.
- [2] YANG Y, YU Q H, SONG H, et al. Decreased NHE3 activity and trafficking in TGEV-infected IPEC-J2 cells *via* the SGLT1-mediated P38 MAPK/Akt2 pathway[J]. *Virus Research*, 2020, 280: 197901.
- [3] 张祎, 汤宇心, 史晨曦, 等. 基于网络药理学和分子对接技术研究芹黄素抗猪传染性胃肠炎病毒的作用[J]. *中国兽医学报*, 2025, 45(2): 312-321.
- ZHANG Y, TANG Y X, SHI C X, et al. Research on mechanism of apigenin against transmissible gastroenteritis virus infection based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2025, 45(2): 312-321.
- [4] 陈建飞, 石达, 时洪艳, 等. 猪主要病毒性腹泻防控技术与应用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2023, 53(12): 1754-1766.
- CHEN J F, SHI D, SHI H Y, et al. The technologies and their applications in the prevention and control of main porcine viral diarrhea[J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2023, 53(12): 1754-1766.
- [5] CHENG S P, WU H G, CHEN Z H. Evolution of transmissible gastroenteritis virus (TGEV): a *Codon* usage perspective[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 7898.
- [6] ZHANG Y F, XIA L, YUAN Y X, et al. Rhodanine derivative LJ001 inhibits TGEV and PDCoV replication *in vitro*[J]. *Virus Research*, 2020, 289: 198167.
- [7] CHEN Y W, ZHANG Y Z, WANG X, et al. Transmissible gastroenteritis virus: an update review and perspective[J]. *Viruses*, 2023, 15(2): 359.
- [8] CANTERO M, CARLERO D, CHICHÓN F J, et al. Monitoring SARS-CoV-2 surrogate TGEV individual virions structure survival under harsh physicochemical environments[J]. *Cells*, 2022, 11(11): 1759.
- [9] TIAN Y Y, SUN J Q, HOU X H, et al. Cross-species recognition of two porcine coronaviruses to their cellular receptor aminopeptidase N of dogs and seven other species[J]. *PLoS Pathogens*, 2025, 21(1): e1012836.
- [10] 路浩, 丁雪燕, 袁晋, 等. 猪肠道冠状病毒检测方法的研究进展[J]. *中国兽医科学*, 2024, 54(10): 1391-1398.
- LU H, DING X Y, YUAN J, et al. Research progress on detection methods of swine enteric coronavirus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2024, 54(10): 1391-1398.
- [11] 吴芳. 胶体金免疫层析技术在兽医领域的应用[J]. *现代畜牧科技*, 2024(8): 163-166.
- WU F. Application of colloidal gold immunochromatography technology in the field of veterinary medicine[J]. *Modern Animal Husbandry Science & Technology*, 2024(8): 163-166.
- [12] 王一鹏. TGEV 单克隆抗体及抗原检测胶体金试纸条的制备[D]. 保定: 河北农业大学, 2019.
- WANG Y P. Preparation of tgev monoclonal antibody and antigen detection colloidal gold test strip[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2019.
- [13] PENZAERT M B, HALTERMAN E O, BURNSTEIN T. Diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs by means of immunofluorescence[J]. *Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de medecine comparee*, 1968, 32(4): 555-561.
- [14] 郭宏伟, 郑鸣, 乔宏兴, 等. 猪传染性胃肠炎病毒 N 蛋白原核表达和间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(9): 2296-2301.
- GUO H W, ZHENG M, QIAO H X, et al. Prokaryotic expression and development of an indirect ELISA detection method of porcine transmissible gastroenteritis virus N protein[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 43(9): 2296-2301.
- [15] 尹杰, 杨恒, 曹三杰, 等. 猪传染性胃肠炎病毒 S 基因 B、C 位点的克隆与表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(1): 7-10.
- YIN J, YANG H, CAO S J, et al. Cloning and expression of the SBC gene of transmissible gastroenteritis virus and development of an indirect TGEV SBC-ELISA[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 51(1): 7-10.
- [16] WANG G, LIANG R, LIU Z W, et al. The N-terminal domain of spike protein is not the enteric tropism determinant for transmissible gastroenteritis virus in piglets[J]. *Viruses*, 2019, 11(4): 313.
- [17] ZHAO F J, LIU L T, XU M L, et al. Assessments of different inactivating reagents in formulating transmissible gastroenteritis virus vaccine[J]. *Virology Journal*, 2020, 17(1): 163.
- [18] 吕林丹, 牟豪, 胡霞, 等. 猪传染性胃肠炎病毒 S 基因 RAA 检测方法的建立与初步应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2024, 55(8): 3590-3599.
- LÜ L D, MOU H, HU X, et al. Establishment and preliminary application of RAA assay for the detection of porcine transmissible gastroenteritis virus based on S gene[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2024, 55(8): 3590-3599.
- [19] 牟春晓, 朱立麒, 邢宪平, 等. 猪传染性胃肠炎病毒 S 基因主要抗原位点 A 和 D 的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2015, 45(4): 356-360.
- MOU C X, ZHU L Q, XING X P, et al. Expression of major antigenic sites A and D in S gene of transmissible gastroenteritis virus of swine (TGEV) in *Escherichia coli* and development of indirect ELISA for detection of the antibody against TGEV[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 45(4): 356-360.
- [20] 李英. 猪传染性胃肠炎综合防控措施[J]. *畜牧兽医科学(电子版)*, 2021(9): 88-89.
- LI Y. Comprehensive prevention and control measures for swine infectious gastroenteritis[J]. *Graziery Veterinary Sciences (Electronic Version)*, 2021(9): 88-89.
- [21] CHEN X L, ZHANG X X, LI C X, et al. Epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus among Chinese pig populations: a meta-analysis[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 129: 43-49.
- [22] PIÑEYRO P E, LOZADA M I, ALARCÓN L V, et al. First retrospective studies with etiological confirmation of porcine transmissible gastroenteritis virus infection in *Argentina*[J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14(1): 292.