

doi:10.11920/xnmdzk.2025.03.006

A型口蹄疫病毒抗体化学发光免疫竞争分析法的建立与初步应用

王婷芳¹,丹珍翁姆¹,卞世傲¹,周 泷¹,扎西央宗²,张志东¹,李彦敏¹

(1.西南民族大学畜牧兽医学院,四川 成都 610041;2.西藏那曲市农牧业(草业)科技研究推广中心,西藏 那曲 852000)

摘要:为提高A型FMDV抗体检测的敏感性和特异性,简化反应步骤,缩短反应时间,以免抗A型FMDV抗体作为捕获抗体,A型FMDV 146S作为包被抗原,A型特异性的单克隆抗体作为竞争抗体,鲁米诺作为化学发光底物,结合化学发光免疫分析法技术,建立一种高特异性、高灵敏性、准确快速、操作简便的A型FMDV抗体cCLIA检测方法.结果显示,最佳免抗A型FMDV抗体包被稀释度为1:1 000,最佳抗原浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最佳稀释液为2%BSA-PBST,血清最佳稀释度为1:10,酶标单抗BC2B7-HRP最佳浓度为0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,待检血清和酶标单抗最佳作用时间为37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min,其批内变异系数0.5%~17.4%之间,批间变异系数在0.4%~7.9%之间,具有良好的重复性.通过对175份临床血清的检测,该方法与液相阻断ELISA试剂盒相比,其相对敏感性为102.3%,特异性为100%.结果表明,建立的A型FMDV抗体cCLIA特异性和灵敏性高,且能在1.5 h完成检测,成功建立了一种快速检测A型口蹄疫病毒抗体的化学发光免疫竞争分析法(A型FMDV抗体cCLIA),为口蹄疫的有效防控提供了新的技术.

关键词:A型口蹄疫病毒;化学发光免疫竞争分析法;抗体检测方法

中图分类号:S852.65

文献标志码:A

文章编号:2095-4271(2025)03-0281-07

Establishment and preliminary application of chemiluminescence immunocompetitive assay for antibodies against foot-and-mouth disease virus type A

WANG Tingfang¹, Danzhenwengmu¹, BIAN Shi'ao¹, ZHOU Long¹,

Zhaxiyangzong², ZHANG Zhidong¹, LI Yanmin¹

(1. School of Animal and Veterinary Science, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Science and Technology Research and Extension Center of Agriculture and Animal Husbandry (Prataculture), Naqu 852000, China)

Abstract: In order to enhance the sensitivity and specificity of type A FMDV antibody detection, simplify the reaction steps and shorten the reaction time, rabbit anti-type A FMDV antibody was used as the trapping antibody, type A FMDV 146S was served as the coated antigen, type A specific monoclonal antibody (mab) was employed as the competing antibody, and luminol was utilized as the chemiluminescence substrate. By integrating these components with chemiluminescence immunoassay technology, a cCLIA assay for detection of type A FMDV antibody was established that was highly specific and sensitive, and accurate, rapid and easy to operate. The results showed that the optimal antibody coating dilution was 1:1 000, the optimal antigen concentration was 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the optimal diluent was 2% BSA-PBST, the optimal serum dilution was 1:10, and the optimal concentration of mab(BC2B7) -HRP was 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The optimal action time of the serum to be tested and the enzyme-conjugate mab was 30 min incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$, and the intra-batch coefficient of variation was between 0.5% and 17.4%, and the inter-batch coef-

收稿日期:2024-09-19

通信作者:张志东(1962-),男,教授,博士,博士生导师,研究方向:动物病毒病致病机制.E-mail:zhangzhidong@swun.edu.cn;李彦敏(1964-),女,教授,博士,博士生导师,研究方向:动物病毒病免疫机制与防控技术.E-mail:liyanmin@swun.edu.cn

基金项目:四川省自然科学基金项目(2024NSFSC1274);中央高校基本科研业务费专项资金优秀学生培养工程项目(2023NYXXS111);西南民族大学引进高层次人才科研资助金项目(RQD202100)

ficient of variation was between 0.4% and 7.9%, which had good repeatability. The detection of 175 clinical sera showed that the relative sensitivity and specificity of the method were 102.3% and 100%, respectively, compared with the liquid phase blocking ELISA kit, indicating that the established type A FMDV antibody cCLIA had high specificity and sensitivity. The test could be completed in 1.5 H. A chemiluminescence immunocompetitive assay (cCLIA) for the rapid detection of type A FMDV antibodies was successfully established, providing a new technology for the effective prevention and control of FMD.

Keywords: foot-and-mouth disease virus type A; chemiluminescence immunocompetitive assay; antibody detection

口蹄疫(foot and mouth disease, FMD)是一种由口蹄疫病毒(Food-and-mouth disease virus, FMDV)引起的急性、热性和传染性强的病毒性疾病^[1-2].可感染许多偶蹄类动物,如牛、羊、猪等^[3-4].口蹄疫传播迅速、发病率高^[5],可引起动物生产性能严重下降和新生动物死亡,是制约养殖业健康发展的重要因素之一.被世界动物卫生组织(WOAH)列为必须通报的动物疫病,也被我国将其列为一类动物疫病^[6-7].FMDV主要有7个血清型(O型、A型、亚洲I型、C型、SAT 1、SAT 2和SAT 3型)^[8-9],各型之间不存在交叉保护.现阶段中国主要针对O、A型口蹄疫进行疫苗接种.口蹄疫传播途径广泛,可动物直接接触传播,通过排泄物和分泌物间接传播,尤其当患病动物蹄部等部位的水疱破裂流出液体时,传染力极强^[10].

准确、快速诊断是口蹄疫有效防控的前提.目前口蹄疫的实验室诊断方法主要包括病原学诊断、血清学检测、分子生物学诊断,以及其他方法如免疫层析快速诊断、环介导逆转录等温扩增技术等^[11-12].在血清学诊断技术中,中和试验(VNT)和液相阻断ELISA(LPBE)为WOAH推荐的检测FMDV抗体的参考方法^[13].其中VNT耗费时间且需要使用活病毒,增大了操作难度,且普通实验室难以开展.LPBE虽然具有高灵敏度和高准确性等优点,但存在实验操作繁琐、耗时长且特异性受限等问题^[14].固相竞争ELISA与LPBE相比,具有灵敏、操作简便等优点,但在检测的快速性、灵敏度方面仍存在不足^[15-16].化学发光免疫分析(CLIA)是一种新型标记免疫测定技术,已广泛应用于多种病毒抗体或抗原检测,具有稳定性高、操作简便、灵敏度高等优点,并且能够在较短时间内得到结果^[17-18].本研究利用实验室制备的A型FMDV单克隆抗体,建立了一种A型FMDV抗体化学发光免疫竞争分析法(A型FMDV抗体cCLIA),为口蹄

疫有效防控提供一种新的抗体检测技术.

1 材料与方法

1.1 材料

A型FMDV抗体阳性血清72份、A型FMDV抗体阴性血清70份、175份临床血清、灭活的A型FMDV 146S抗原、兔抗A型FMDV 146S抗体、A型口蹄疫病毒特异性单克隆抗体(BC2B7)由西南民族大学兽医学院实验室提供;鲁米诺化学发光底物购自Roche公司;96孔全白酶标板购自上海百千生物有限公司;碳酸盐缓冲液(pH值为9.6)购自Sigma公司;HRP偶联试剂盒购自Abcam公司;口蹄疫A型抗体液相阻断ELISA试剂盒购自兰州兽研生物科技有限公司.

1.2 主要仪器设备

化学发光免疫分析仪购于PerkinElmer公司;CO2恒温培养箱购于上海恒一科学仪器有限公司;漩涡振荡器、磁力搅拌器购于美国精骐有限公司;电子天平购于龙腾电子;pH测定仪购于Sartorius公司;可调式移液器、移液排枪购于Eppendorf、Thermo公司.

1.3 方法

1.3.1 酶标单克隆抗体制备

辣根过氧化物(Horseradish Peroxidase, HRP)标记A型口蹄疫病毒单克隆抗体BC2B7的制备按照HRP偶联试剂盒说明书进行操作.标记好的HRP-BC2B7抗体置-20℃保存.

1.3.2 A型FMDV抗体cCLIA检测方法的建立

利用碳酸盐缓冲液稀释兔抗A型FMDV抗体,加入96孔全白酶标板,100 μL/孔,静置4℃过夜(约12 h);用0.05% Tween 20-PBST洗3次后,加入A型FMDV 146S抗原,50 μL/孔,置于37℃孵育1 h, PBST洗3次;用稀释液将阳性、阴性血清对照以及待检血清稀释至1:10,加入酶标板,50 μL/孔;随后加入稀释液稀释的酶标单抗BC2B7-HRP,50 μL/孔,混

匀,置于 37 ℃ 孵育;PBST 洗 5 次,加入鲁米诺化学发光底物,将底物试剂 A(含鲁米诺缓冲液)与起始试剂 B(含稳定形式 H₂O₂的缓冲液)以 1:100 的比例配制,100 μL/孔,室温避光孵育 4~5 min,用化学发光检测仪读取 435 nm 发光值.按照抑制率(PI)=1-(血清样品发光值-空白对照发光值)/(抗原对照发光值-空白对照发光值),计算血清的抑制率 PI;分析 N/P 值(N 是阴性血清的化学发光值,P 是阳性血清的化学发光值),当 N/P 值最大时将其确定为最优结果.

1.3.3 A 型 FMDV 抗体 CLIA 检测方法的优化

(1) 筛选兔抗 A 型 FMDV 抗体最佳稀释度

将兔抗 A 型 FMDV 抗体稀释为 1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:6 000,其他组分浓度不变,确定最佳稀释度.

(2) 筛选 A 型 FMDV 146S 抗原最佳工作浓度

用 PBST 将 A 型 FMDV 146S 抗原稀释为 0.5、1、2 μg/mL,在最佳兔抗 A 型 FMDV 抗体包被稀释度的条件下,确定 146S 抗原的最佳工作浓度.

(3) 筛选血清和酶标单抗稀释液

分别选取含 5%脱脂奶粉的 PBST、含 2%BSA 的 PBST 溶液和 PBST 分别稀释血清.在最佳兔抗 A 型 FMDV 抗体包被稀释度、最佳 A 型 FMDV 146S 抗原浓度条件下进行筛选,确定最佳血清和酶标单抗稀释液.

(4) 筛选最佳血清稀释度

将待检血清用最佳稀释液稀释为 1:10、1:20、1:40、1:80,在最佳兔抗 A 型 FMDV 抗体包被稀释度、最佳 A 型 FMDV 146S 抗原浓度的条件下进行筛选,确定最佳血清稀释度.

(5) 筛选酶标单抗最佳浓度

将酶标单抗(BC2B7)-HRP 用最佳稀释液稀释为 0.04、0.06、0.08、0.1 μg/mL,在最佳兔抗 A 型 FMDV 抗体包被稀释度、最佳 A 型 FMDV 146S 抗原浓度、最佳血清稀释度的条件下进行筛选,确定酶标单抗最佳浓度.

(6) 筛选血清和酶标单抗最佳作用时间

将血清与酶标单抗混合液分别于 37 ℃ 和常温条件下,分别作用 5、10、20、30 min,在最佳抗体包被稀释度、最佳抗原浓度、最佳血清稀释度、最佳封闭条件以及最佳酶标单抗浓度的条件下进行筛选,确定血清和酶标单抗最佳作用时间.

(7) 筛选 PI 临界值、诊断敏感性和特异性

使用建立的 cCLIA 方法,检测已知背景的血清(牛、羊以及猪血清)142 份,其中 A 型 FMDV 阳性血清 72 份,阴性血清 70 份.根据检测已知背景的血清计算出的抑制率,应用 Medcalc 软件绘制 ROC 曲线分析,并得出 PI 临界值(cut-off 值),诊断敏感性和诊断特异性.

(8) 重复性分析

批内重复性:在最佳条件下,选择同一批次包被的 3 块化学发光板,用本研究建立的 cCLIA 方法检测已知背景的 3 份 A 型 FMDV 阳性血清和 3 份 A 型 FMDV 阴性血清,来评估本方法的批内重复性,读取化学发光值并计算变异系数.批间重复性:在最佳条件下,选择不同批次包被的 3 块化学发光板,用本研究建立的 cCLIA 方法检测已知背景 3 份 A 型 FMDV 阳性血清和 3 份 A 型 FMDV 阴性血清,来评估本方法的批内重复性,读取化学发光值并计算变异系数.

(9) 灵敏度分析

将 A 型 FMDV 抗体阳性血清从 1:8 梯度稀释至 1:2 028,使用建立的 cCLIA 与商品化液相阻断 ELISA 试剂盒(LPBE)同时测定抗体效价.

(10) CLIA 对临床样本的检测

使用建立的 cCLIA 方法与商品化液相阻断 ELISA 试剂盒(LPBE)分别检测 175 份待检临床血清样本.

2 结果

2.1 兔抗 A 型 FMDV 抗体最佳稀释度的确定

当兔抗 A 型 FMDV 抗体稀释度为 1:1 000 时,PI 值最高,达到 85%,结果如图 1 所示,因此,兔抗 A 型 FMDV 抗体最佳稀释度确定为 1:1 000.

2.2 A 型 FMDV 146S 抗原最佳工作浓度的确定

当抗原浓度为 1 μg/mL 时,抑制率 PI 可达到 85%以上,且 N/P 值最大,结果如图 2 所示,因此,A 型 FMDV 146S 抗原最佳浓度确定为 1 μg/mL.

2.3 血清和酶标单抗稀释液的确定

当血清和酶标单抗稀释液为 2%BSA 时,N/P 值最大,结果如图 3 所示,因此,最佳稀释液为 2%BSA-PBST.

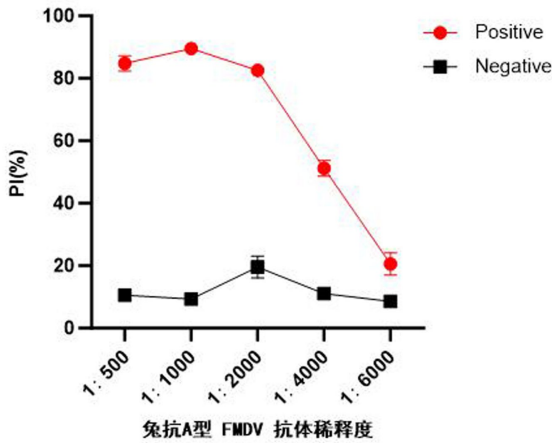


图 1 筛选兔抗 A 型 FMDV 抗体最佳稀释度
Fig. 1 Screening of optimal dilution of rabbit anti-A FMDV antibody

所示,因此,最佳血清稀释度确定为 1:10.

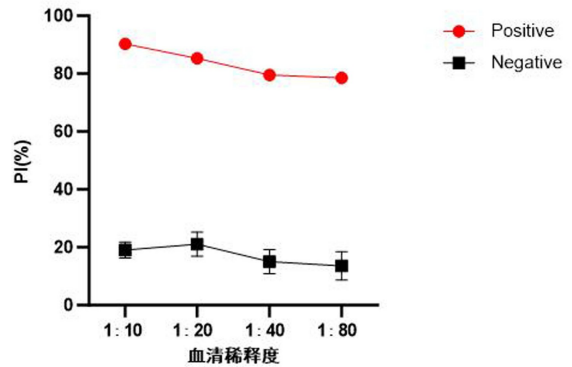


图 4 筛选最佳血清稀释度

Fig. 4 Screening of optimal serum dilution

2.5 酶标单抗最佳浓度的确定

当酶标单抗 BC2B7-HRP 浓度为 0.1 μg/mL 时, N/P 值最大, 结果如图 5 所示, 因此, 酶标单抗 BC2B7-HRP 最佳浓度为 0.1 μg/mL.

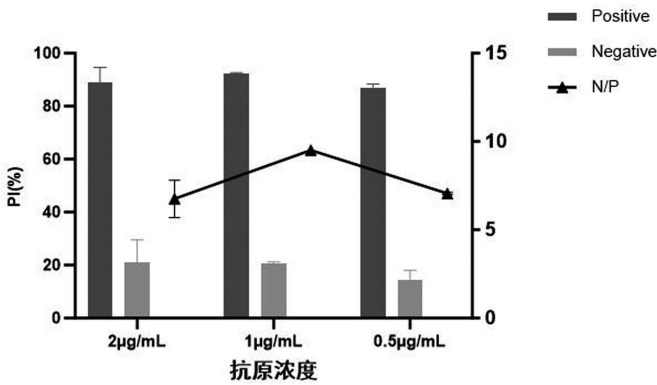


图 2 筛选抗原最佳浓度

Fig. 2 Screening of optimal concentration of the FMDV 146s antigen

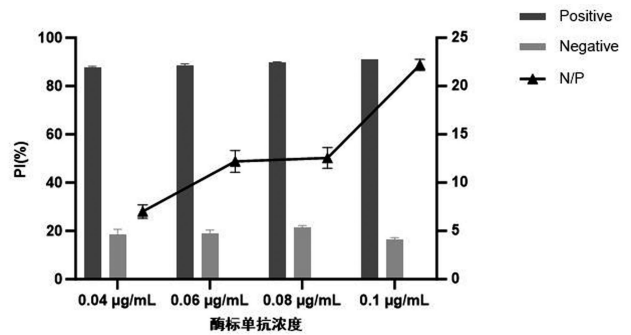


图 5 筛选酶标单抗最佳浓度

Fig. 5 Screening of optimal concentration of enzyme-conjugate mab

2.6 血清和酶标单抗最佳作用时间的确定

在 37 °C 下待检血清和酶标单抗孵育 30 min 时, N/P 值最大, 结果如图 6 所示, 因此, 可以确定血清和酶标单抗最佳作用时间为 37 °C 下孵育 30 min.

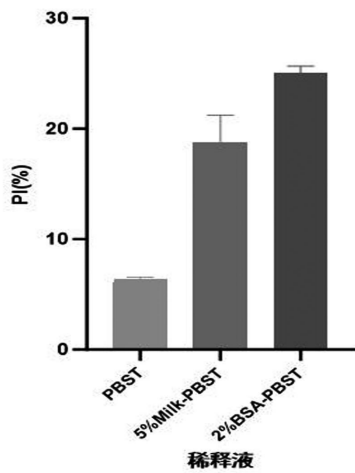


图 3 筛选稀释液

Fig. 3 Selection of optimal dilution buffer

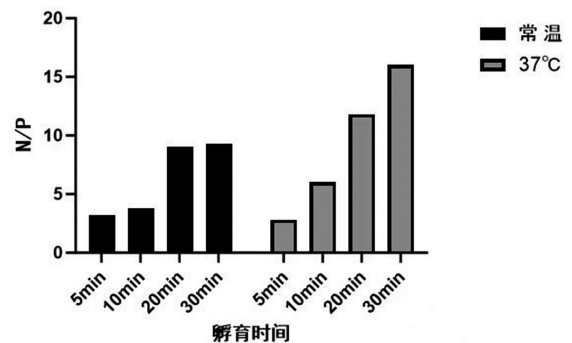


图 6 筛选血清和酶标单抗最佳作用时间

Fig. 6 Screening of optimal incubation time for serum and enzyme-conjugate mab

2.4 最佳血清稀释度

当血清稀释度为 1:10 时, PI 值最高, 结果如图 4

2.7 临界值及敏感性和特异性的确定

结果显示(图 7),当 PI 临界值为 50.3%时,AUC 曲线下面积为 0.979,95%的置信区间为 0.907 ~ 0.999,约登指数为 0.907,此时诊断特异性为 95.7%,敏感性为 95.1%,因此,确定临界值为 50.3%。当被检样品的 PI 大于 50.3%时,则判定为阳性,PI 小于 50.3%时,则判定为阴性。

2.8 重复性分析结果

结果显示(表 1),批内变异系数为 0.5%~17.4%;使用不同批次的抗体包被化学发光板,在相同时间测定相同已知背景的 3 份 A 型 FMDV 抗体阳性血清和 3 份 A 型 FMDV 阴性血清 3 次,批间变异系数为 0.4%~7.9%。批内系数小于 20%,批间变异系数小于 10%,说明该方法的重复性良好。

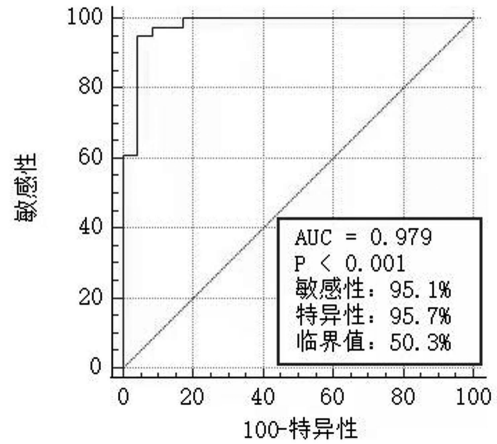


图 7 ROC 曲线判定临界值以及诊断的敏感性和特异性

Fig. 7 Determination of critical value of ROC curve and diagnosis sensitivity and specificity

表 1 重复性试验

Table 1 Repeatability test

血清编号	抑制率 PI(\bar{X} , n=3)			\bar{X}	S	CV	
	第一板	第二板	第三板				
批内重复检测结果	1	7.0	7.5	6.8	7.1	0.3	4.3%
	2	9.0	11.0	10.5	10.0	0.9	9.0%
	3	30.0	26.5	40.0	32.2	5.6	17.4%
	4	95.3	95.1	96.2	95.5	0.5	0.5%
	5	90.7	90.2	92.8	91.2	1.1	1.2%
	6	90.0	89.5	92.7	91.0	1.3	1.4%
批间重复检测结果	1	6.0	5.0	5.8	5.6	0.4	7.1%
	2	6.0	7.0	6.0	6.3	0.5	7.9%
	3	32.0	32.5	29.0	31.1	1.6	5.1%
	4	97.6	96.1	95.8	96.5	1.4	1.5%
	5	92.1	92.1	92.1	92.1	0.4	0.4%
	6	89.4	91.5	91.5	91.1	1.3	1.4%

2.9 灵敏度分析结果

结果显示(图 8),cCLIA 方法检测时,在阳性血清稀释度为 1:512 时 PI 为 56.3%,而血清稀释度为 1:1 024 时 PI 为 29%。LPBE 检测时当阳性血清稀释度为 1:256 时 PI 为 64%,而当血清稀释度为 1:512 时 PI 为 21%。因此,cCLIA 方法可测定抗体的效价为 1:720,商品化液相阻断 ELISA 试剂盒(LPBE)可测定的

抗体效价为 1:360,表明建立的 A 型 FMDV 抗体 cCLIA 方法灵敏度比 LPBE 高。利用 cCLIA 检查已知 O 型 FMDV 抗体阳性血清,PI 为 27%,表明建立的 A 型 FMDV 抗体 cCLIA 可特异性地检测 A 型 FMDV 抗体。

2.10 CLIA 临床样本检测结果

结果显示(表 2),CLIA 检测出阳性血清为 44

份,阴性血清 131 份;LPBE 检出阳性血清为 43 份,阴性血清 132 份。CLIA 相对敏感性为 102.3%,特异性为

100%,表明建立的 CLIA 检测方法比商品化检测试剂盒敏感度高。

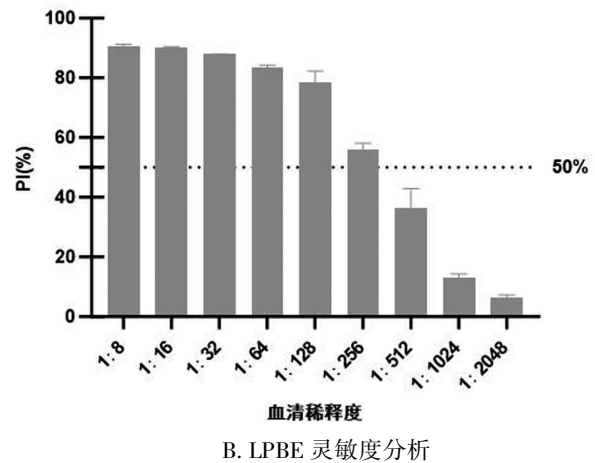
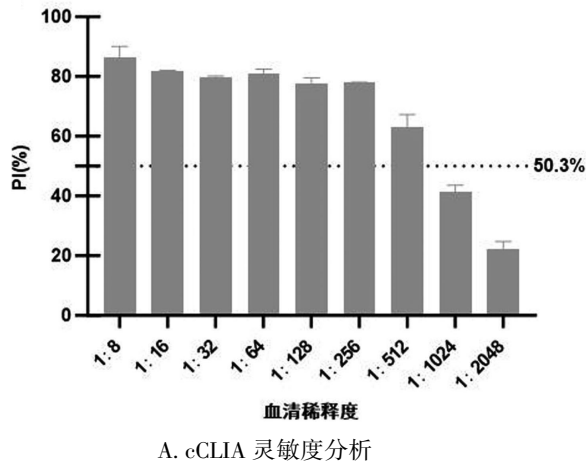


图 8 灵敏度分析

Fig. 8 Analysis of sensitivity

表 2 CLIA 与 LPBE 临床样本检测结果

Table 2 Results of CLIA and LPBE clinical serum samples

方法	LPBE			
	阳性	阴性	合计	
c-CLIA	阳性	43	1	44
	阴性	0	131	131
	合计	43	132	175

3 讨论

口蹄疫是一种严重影响偶蹄动物健康并威胁畜牧业发展的重大动物疫病,一旦暴发,可对畜牧业造成重大损失^[19]。因此,早期诊断对于控制口蹄疫至关重要。为了快速、经济、准确地检测 FMDV 抗体,本试验选择用化学发光法与单克隆抗体竞争 ELISA 相结合,通过优化各反应条件,建立了敏感性高、特异性强、安全无毒且操作简单快速的 A 型 FMDV 抗体 cCLIA^[20]。目前 CLIA 已广泛应用到了多种动物疫病的检测中^[21-24]。该方法能在 1.5 h 内完成血清样本的检测,与传统的 LPBE 相比,减少了对血清进行梯度稀释的步骤,简化了操作流程,且检测时间比 LPBE 快了 3 h,大大缩短了检测时间,提高了检测效率。此外,对 175 份血清临床样本的检测表明,建立的 cCLIA 方法在保持高特异性的同时,检测灵敏度也优于 LPBE。目前化学发光技术已在动物疾病检测中显

示出快速增长的趋势^[25],随着新材料和新型反应发光剂的应用,进一步改进了 CLIA 的检测效能,随着人们对食品安全和人畜共患疾病关注度的提高,CLIA 技术在动物疾病诊断领域的应用将变得更加重要^[26-27],因此被广泛应用于医学、食品分析、农药残留检测等多个领域^[28-29]。总之,本研究成功建立了 A 型 FMDV 抗体 cCLIA,将为口蹄疫的防控和净化提供了新的技术支撑。

参考文献

- [1] 颜健华,兰宗宝,何奇松,等.A 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J].黑龙江畜牧兽医,2016(7):167-171.
- [2] 刘伟.O 型口蹄疫病毒抗体及 3ABC 抗体快速检测化学发光法的建立[D].北京:中国农业科学院,2020.
- [3] 苗勤,吴香菊,齐静,等.FMDV 3D 基因真核表达质粒的构建、表达及对 I 型 IFN 信号通路的作用[J].山东农业科学,2024,56(2):144-150.
- [4] 崔辰,黄立纲,李晶,等.猪 O 型口蹄疫病毒抗体化学发光酶联免疫检测方法的建立[J].生物工程学报,2016,32(11):1519-1530.
- [5] 周广青,刘晓庆,史喜娟,等.口蹄疫病毒抗体 SA-ELISA 快速检测方法的建立[J].畜牧兽医学报,2023,54(5):2020-2029.
- [6] SARRY M,ROMEY A,LEFEBVRE D,et al.Foot and mouth disease virus; Transmission, pathogenesis, diagnosis and surveillance[J].Virologie,2022,26(5):355-373.
- [7] ZHANG Y,WANG R,BAI M Y,et al.Development of a competitive ELISA method based on VLPs detecting the antibodies of serotype A FMDV [J]. Journal of Virological Methods, 2022, doi: 10.1016/

- j. jviromet.2021. 114406.
- [8] LI Y M, SWABEY K G, GIBSON D, et al. Evaluation of the solid phase competition ELISA for detecting antibodies against the six foot-and-mouth disease virus non-O serotypes [J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 183(2): 125-131.
- [9] 蒋韬, 梁仲, 陈涓, 等. 口蹄疫病毒 O、A、Asia I 型定型诊断胶体金免疫层析方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3801-3808.
- [10] 安林昌. 口蹄疫的诊断及防治[J]. *兽医导刊*, 2021(5): 25-26.
- [11] 李艳华, 刘振君, 丛慧敏. 奶牛常见传染病的生物学基础和诊断方法[J]. *中国奶牛*, 2011(24): 45-48.
- [12] 武刚, 王洪梅, 刘晓, 等. 口蹄疫诊断技术研究进展[J]. *家畜生态学报*, 2011, 32(2): 100-105.
- [13] 张明飞. 规模猪场口蹄疫抗体效价的检测方法[J]. *畜牧业环境*, 2024, (06): 106-107.
- [14] 廖德芳, 李乐, 苗海生, 等. 应用固相竞争 ELISA、液相阻断 ELISA 和中和试验检测口蹄疫抗体的比较研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(4): 183-186.
- [15] YANG M, XU W H, BITTNER H, et al. Generation of mAbs to foot-and-mouth disease virus serotype A and application in a competitive ELISA for serodiagnosis[J]. *Virology Journal*, 2016, 13(1): 195.
- [16] 李敏杰, 许智强, 刘彦玲, 等. A 型口蹄疫抗体固相竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(9): 899-904.
- [17] 麻园, 石正旺, 罗俊聪, 等. 猪瘟疫病毒化学发光抗体检测方法的建立与应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(6): 1744-1752.
- [18] 赵利霞, 李振甲, 魏彦林, 等. 化学发光免疫分析[J]. *世界科技研究* 与发展, 2004, 26(4): 24-33.
- [19] 李伟. 口蹄疫流行病学、病理变及防控措施[J]. *甘肃科技*, 2009, 25(2): 152-154+135.
- [20] 徐璐, 张乾义, 夏应菊, 等. 猪瘟疫病毒化学发光竞争 ELISA 抗体检测试剂盒的应用研究[J]. *中国兽医杂志*, 2020, 56(11): 31-33+122.
- [21] 向国庆, 孙菁哈, 宋帅, 等. 非洲猪瘟疫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.
- [22] 孙雨, 宋晓晖, 肖颖, 等. 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.
- [23] 赵协, 安利民, 高沙沙, 等. 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.
- [24] 马震原, 王淑娟, 闫若潜, 等. 猪伪狂犬病病毒 gB 蛋白抗体竞争化学发光酶联免疫检测方法的建立[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(3): 574-583.
- [25] 王隆柏, 王晨燕, 张丹青, 等. 化学发光免疫分析技术及其在动物领域中应用的研究进展[J]. *当代畜牧*, 2017, (24): 44-47.
- [26] 魏光伟, 余永鹏, 魏文康, 等. 化学发光免疫分析技术及其应用研究进展[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(3): 97-102.
- [27] 钱榜, 刘振东, 赵印, 等. 小反刍兽疫病毒 H 蛋白抗体化学发光免疫分析检测方法的建立[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(5): 120-129.
- [28] 王世杰, 王春新, 卢菲, 等. O 型口蹄疫病毒抗体高通量液相阻断 CLIA 检测方法的建立[J]. *生物学杂志*, 2018, 35(6): 102-106.
- [29] 包艳芳, 蒋韬, 何莉, 等. 口蹄疫病毒 O 型全自动磁微粒 CLIA 抗体定量检测方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2024, 57(4): 810-819.

(责任编辑:和力新,殷锋,付强,张阳,肖丽;英文编辑:周序林,郑玉才)