

非洲猪瘟病毒抗体快速检测试纸的研发和应用

乔松林 博士

河南省农业科学院动物免疫学重点实验室
农业部动物免疫学重点实验室

报告提纲

- 近期非洲猪瘟流行新特点
- 非洲猪瘟病毒抗体检测试纸的研制
- 我们非洲猪瘟病毒抗体检测试纸特色
- 非洲猪瘟病毒抗体检测试纸初步应用

一、近期非洲猪瘟流行新特点

- 病毒已在我国定殖并形成较大污染面
- 非洲猪瘟变异株和经典强毒株共流行，防控更复杂
- 非洲猪瘟变异株带来的挑战
 - 症状更隐蔽、监测更困难
非典型、亚急性病例增多，临床症状不典型，容易与其他疫病混淆
实验室诊断困难（检测不到病毒），漏检病例增多
 - 精准清除更困难、损失巨大
发现晚、污染广，难以实施精准清除，损失巨大

根据相关分离的毒性，非洲猪瘟的临床形式



来源：联合国粮食及农业组织 (FAO)

对非洲猪瘟变异株的认识

- 非洲猪瘟基因缺失株

- 国内专家监测到多种基因缺失类型
- 毒株来源于非法疫苗使用（所谓2 ml关键技术）
- 农业农村部专门近期发文严厉打击

- 自然变异株、自然弱毒株

- 病毒传入3~4年后，其他国家均出现过自然变异株、自然弱毒株
- 表现为死亡率下降、亚临床症状和出现大量慢性或隐性感染猪

非洲猪瘟变异株临床症状

- 嗜睡、轻触不起、采食量减少
- 发热、皮肤发红、关节肿胀、坏死
- 咳喘、腹式呼吸
- 育肥猪死淘率增高
- 母猪流产或出现死胎/木乃伊胎

图 17
慢性型非洲猪瘟的典型病变



ASFV抗体检测

在“非洲猪瘟变异株”流行背景下需要开展抗体检测

- 临床需要

- “变异毒株”用qPCR检测困难
- 漏检率高，错过防控时机，损失大

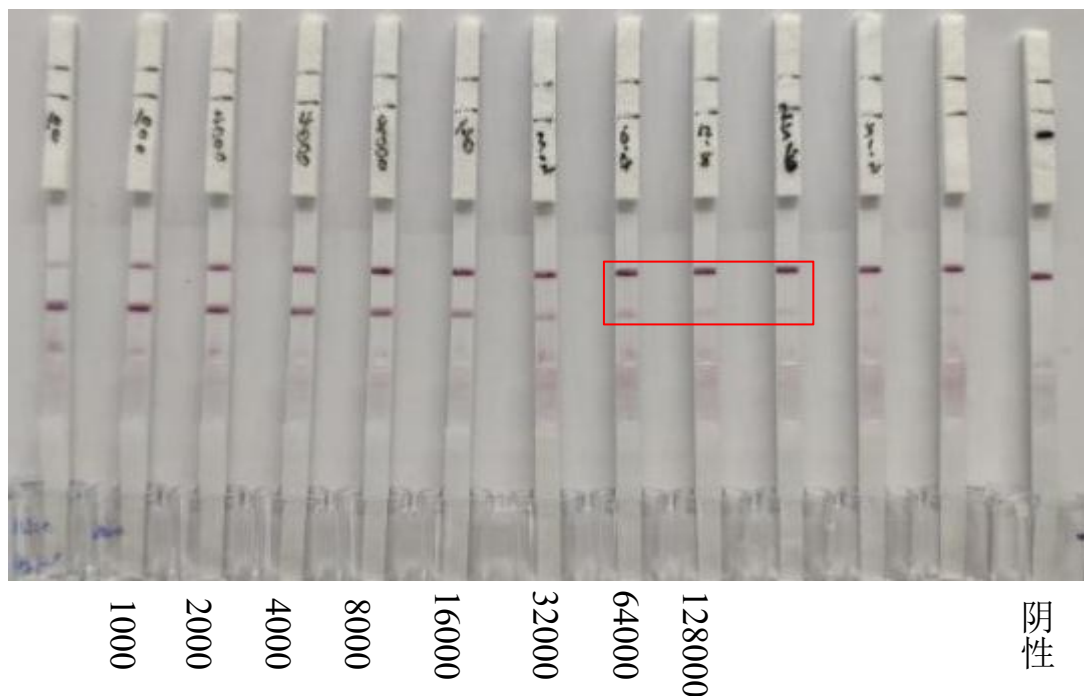
- 检测目的

- 疫情综合分析
- 引种检测，确保“抗原、抗体”双阴性
- 净化

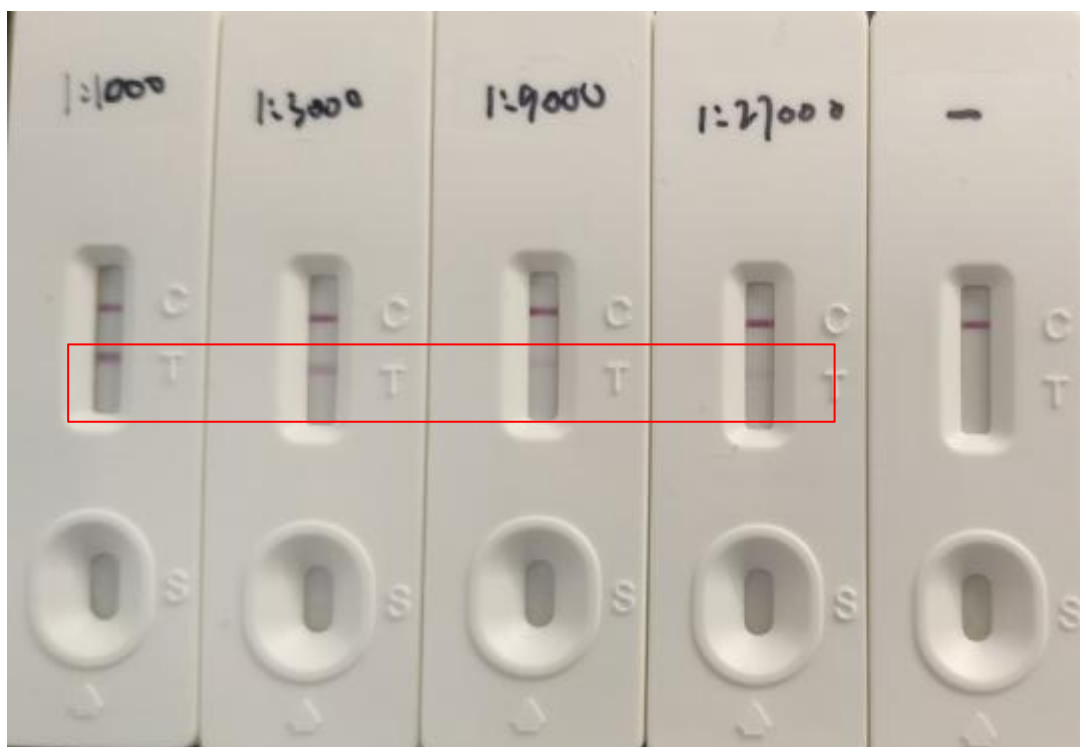
二、非洲猪瘟病毒抗体检测试纸研制

对阳性参考血清的检测

- 对于IFA检测效价为1: 4000的ASFV阳性参考血清（中监所）试纸检测效价可达1: 100000以上
- 检测实验室留存的2018年前血清5批200多份，全部是阴性



康复猪血清检测



康复猪血清进行1:27000的稀释，
该试纸依旧可以检测到

对PCR检测结果阳性血清用试纸进行抗体检测

- 盲样：54个，PCR检测全部阳性。
- 本次检测阳性：20 阴性：34。



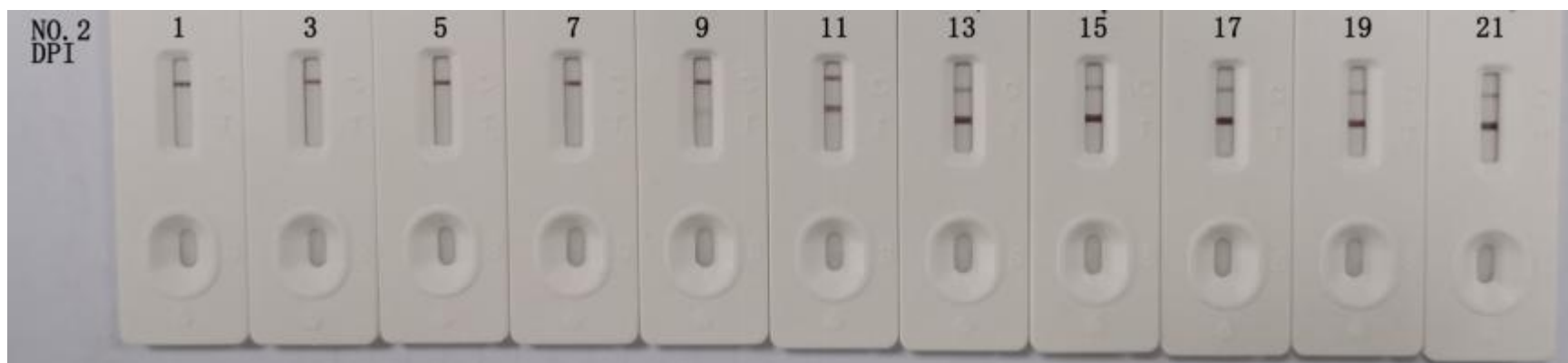
抗体检测胶体金试纸和进口ELISA试剂盒比对检测

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			阳性				阳性	阳性				
B												
C											阳性	阳性
D	阳性	阳性					阳性	阳性	阳性	阳性		
E	阳性	阳性				阳性						
F												
G												
H												阳性 13
A			阳性		可疑		阳性	阳性				
B												
C											阳性	阳性
D	阳性	阳性					阳性	阳性	阳性	阳性		
E	阳性	阳性				阳性						
F												
G												
H												阳性 13
试纸条A			阳性				阳性	阳性	阳性	阳性		
B				阳性				阳性				
C	阳性	阳性		阳性	弱阳			阳性			阳性	阳性
D	阳性	阳性		阳性			阳性	阳性	阳性	阳性		
E	阳性	阳性			阳性	阳性	阳性					
F	弱阳		弱阳		弱阳	弱阳						
G	阳性		阳性									
H												阳性 25 弱阳 5

使用两种ELISA试剂盒和试纸对77份血清盘（其中有背景不清楚、康复猪及感染猪）检测：

- 康复猪、感染猪血清试纸阳性检出率明显高于ELISA
- A10、B4、B8三个感染后5-7天的样品试纸检测阳性，试剂盒检测阴性

用胶体金试纸条检测ASFV感染后抗体产生情况



临床感染后抗体产生时间（4月29日案例）

- 客户情况：200头母猪场（自繁自养）
- 2018年以来一直稳定，今年首次中招
- 1-4号全血为保育后期，同舍
- 客户口述3. 4号发病5天，2号没抗体的大概发病3天。

CT值 37.2 14.5 16.6 23.9

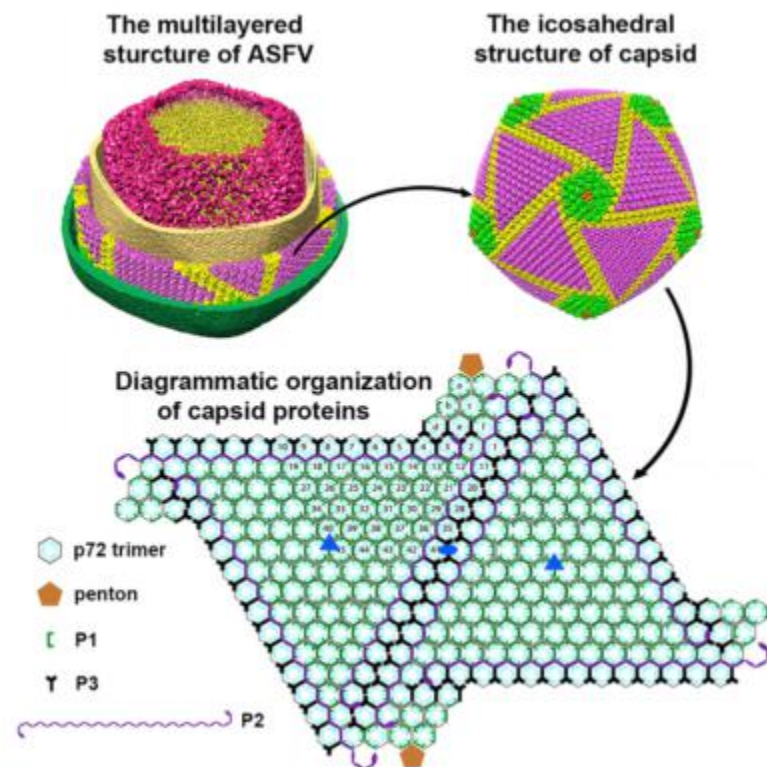


三、非洲猪瘟抗体检测试纸特色

检测靶标的选择 – Capsid p72

p72 蛋白是病毒二十面体的主要成分，约占蛋白总重的**三分之一**，对于病毒衣壳的形成至关重要。

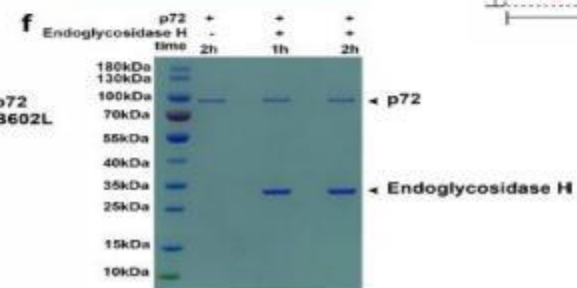
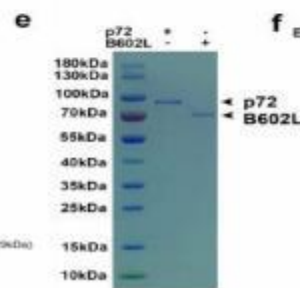
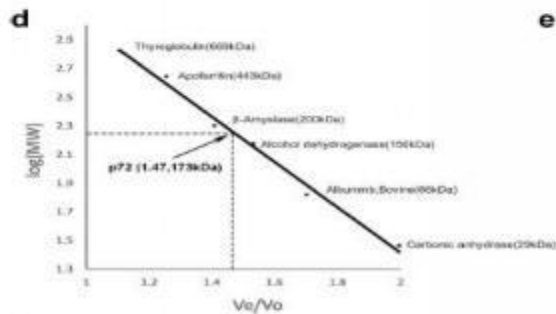
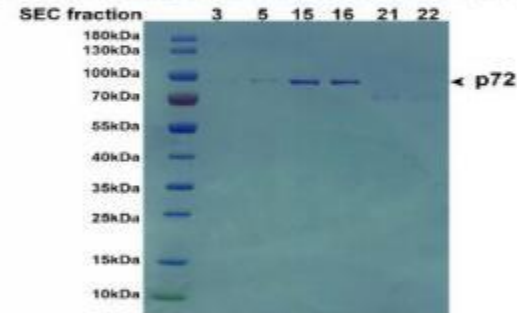
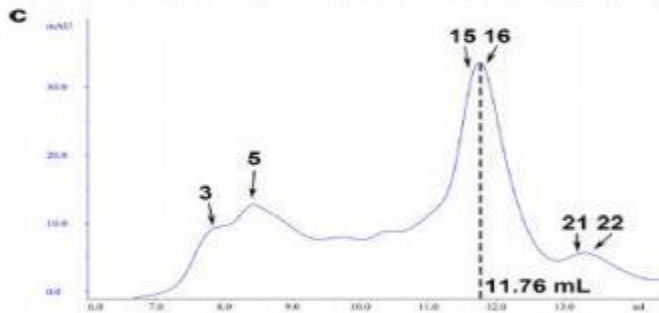
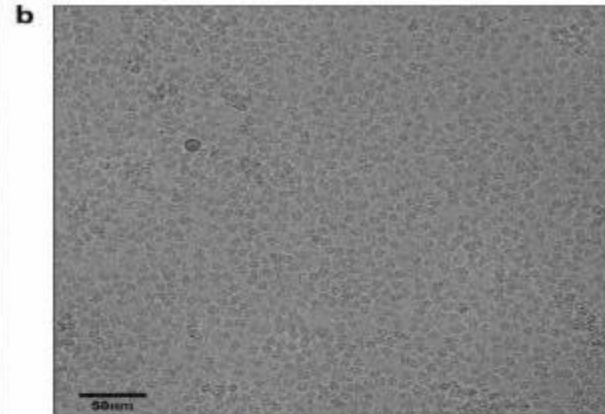
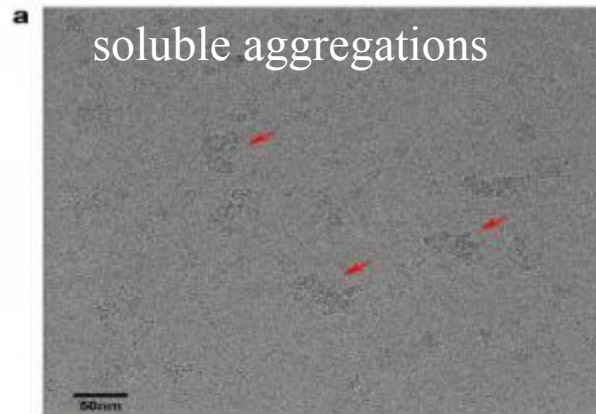
p72蛋白是病毒主要的病毒抗原，**抗原决定簇保守，免疫原性稳定。**



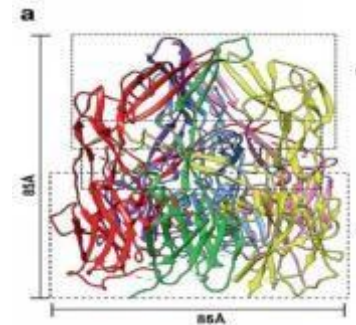
Cryo-EM Structure of the African Swine Fever Virus, 2019

B602L!!!

The African swine fever virus nonstructural protein pB602L is required for formation of the icosahedral capsid of the virus particle
J Virol. 2006; 80 (24):12260-70



HEK293F

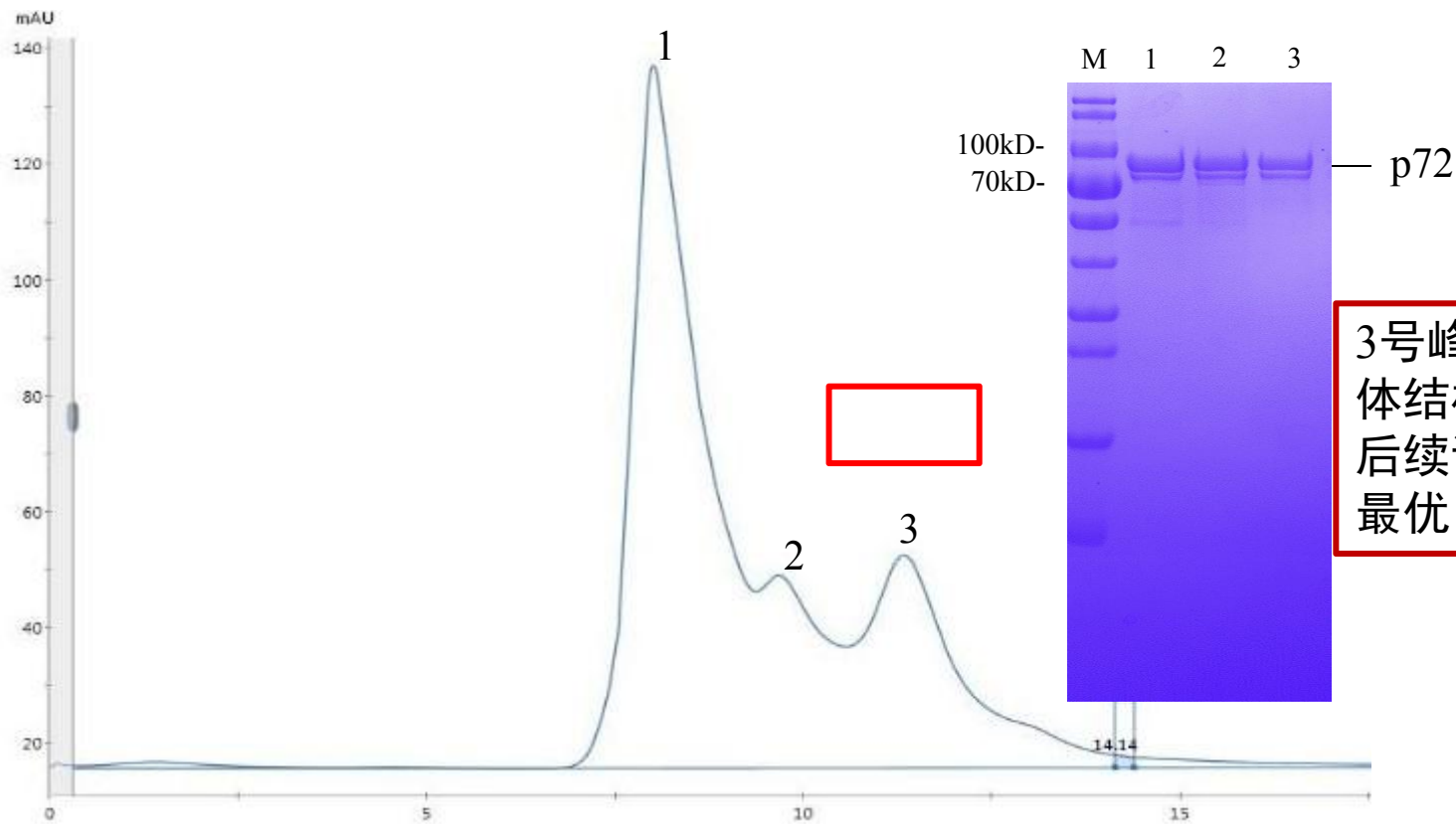


我们重组抗原的制备



同时转染B602L和p72共表达
获取正确折叠的三聚体衣壳蛋白

重组抗原的获取



3号峰获取蛋白为三聚体结构蛋白
后续试纸测试中表现最优

四、非洲猪瘟抗体检测试纸初步应用

疫情综合分析

原编号	CT值	抗体结果	原编号	CT值	抗体结果
R1-101	40	阴性	R4-22	40	可疑
R2-12	40	阴性	R4-26	40	阴性
R2-98	阴	阴性	R2-10	阴	阴性
R2-26	阴	阴性	R2-19	36.8	阴性
R2-100	35.9	阴性	R2-23	阴	阴性
R2-92	40	阴性	R2-21	40	阴性
R2-99	阴	阴性	R2-113	40	阴性
R2-110	40	阴性	R3-92	40	阴性
R2-18	37.8	阴性	R3-14	阴	阴性
R2-103	38.6	阴性	R3-29	40	阴性
R3-110	40	阴性	R3-5	阴	阴性
R3-18	40	阴性	R4-108	阴	强阳
R3-22	疑	阴性	R4-105	40	阴性
R3-107	阴	阴性	R4-23	阴	阴性
R3-104	阴	可疑	R4-2	40	阳性
R3-97	阴	阴性	R4-88	阴	阴性
R3-8	35.8	强阳	R4-99	阴	阴性

排除疫情

20210508 山西

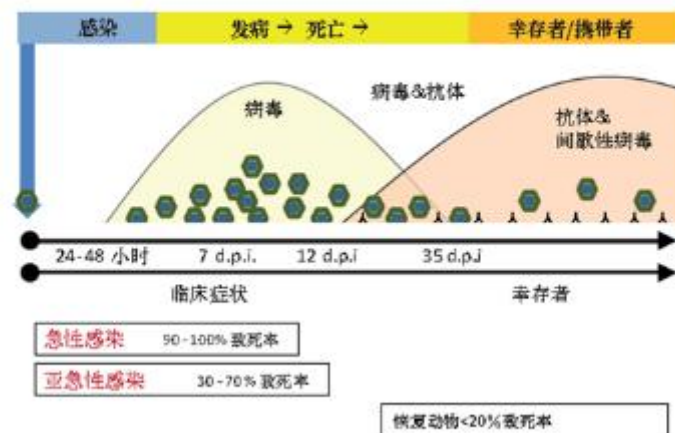
编号	CT 值
血清 1	阴
血清 2	阴
血清 3	阴
血清 4	33.8
血清 5	34.3
血清 6	36.5
血清 7	29.6
血清 8	阴
血清 9	阴
血清 10	阴



引种、购猪检测

- 发病猪、潜伏感染、耐过猪是主要传染源
- 变异株感染、亚急性、慢性感染排毒量低、间歇排毒，抗原漏检
- 引种检测，确保“抗原、抗体”双阴性

图 30
伊比利亚半岛及西半球的欧洲家猪中观察到的
血液中病毒和抗体随着时间的变化及与 ASFV 感染不同阶段的关系
(1960 - 1995)



精准清除、净化

- 准确的诊断是净化的前提
- 实时荧光定量PCR检测容易漏检
- 抗原检测成本高、操作复杂
- 在病毒污染面广的情况下，通过抗体检测，净化是必由之路



试纸的优势



滴血检测 诊断无忧 随时随测

"10分"

放心



百奥生物

非洲猪瘟病毒抗体胶体金检测试纸卡

简便·快速·特异·敏感



非洲猪瘟（ASF）是由非洲猪瘟病毒（ASFV）感染家猪和野猪而引起的一种急性、出血性、烈性传染病。世界动物卫生组织（OIE）将其列为法定报告动物疫病，我国列为一类动物疫病。

1 为什么要用非洲猪瘟病毒抗体检测试纸卡？

1. 非洲猪瘟非典型、亚急性病例增多，临床症状不典型，容易与其他疫病混淆，必须依靠核酸和抗体检测；
2. 非洲猪瘟病毒变异株感染后排毒量低，而潜伏排毒，难以及时发现，错过最佳防控时机，损失大；
3. 实时荧光定量PCR检测成本高，且需要专业人员在专业实验室才能完成；
4. 抗体检测试纸卡不需要任何仪器、试剂及技术人员，可实现现场检测，10分钟判定结果。

2 试纸卡有什么特色？

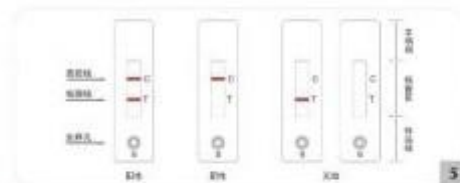
1. 产品领先：首个直接检测表达的ASFV P72蛋白抗体检测试纸卡；
2. 早期诊断：在病毒感染早期（5-7天）可检出感染抗体；
3. 特异性强：与其他疫病抗体无交叉反应，有效避免非特异性反应存在的非特异性反应；
4. 灵敏度高：检测非洲猪瘟病毒血清（中剂量）抗体效价达10万倍以上。



3 试纸卡怎么用？



1. 用滴管吸取猪样血清或加样枪取100微升加到稀释杯中；
2. 用取样环吸取（剪圆环端）1次或加样枪取1微升血清、血浆或新鲜血液；
3. 取样环浸入加好稀释液的稀释杯中，旋转数次使样品混匀；
4. 用滴管或加样枪将稀释过的待检样品加入试卡加样孔（S），静置10-15分钟；
5. 结果判定。



4 检测结果有什么指导意义？

1. 试纸卡阴性：血清或血液样品未检出非洲猪瘟病毒抗体，提示检测猪只未检测到非洲猪瘟病毒感染；或者猪只处于感染初期抗体尚未产生，建议根据临床症状及周边情况1周后复检，必要时进行核酸检测；
2. 试纸卡阳性：血清或血液样品检出非洲猪瘟病毒抗体，提示检测猪只感染了非洲猪瘟病毒。

研制单位：农业部动物疫病学重点实验室
中试企业：河南百奥生物工程股份有限公司（兽药GMP）

地址：郑州市花园路116号畜牧兽医防疫学实验室

联系人：杨先生13837378080

团队成员



河南农业大学动物医学院
2019级硕士 耿瑞

动物免疫学重点实验室
杨继飞副研究员

动物免疫学重点实验室
孙亚宁 博士

动物免疫学重点实验室
宜原原 硕士

请批评指正！

乔松林 13613820094