

猪瘟病毒检测技术研究进展

杨克礼, 徐涂平*, 梁望旺, 刘泽文, 汪宏才, 段正赢 (湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 湖北武汉 430064)

摘要 综述了猪瘟病毒检测技术的研究现状, 并对今后的研究趋势进行了展望。

关键词 猪瘟; 猪瘟病毒; 检测

中图分类号 S852 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2007) 16 - 04853 - 02

Progress on Technology for Detection Hog Chorera Virus

YANG Ke-li et al (Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan, Hubei 430064)

Abstract This article summarized the progress on the technology for detection hog chorera virus, and discussed the research direction.

Key words Hog chorera; Hog chorera virus; Detection

猪瘟病毒(Hog chorera virus, HCV)属黄病毒科(Haviridae)瘟病毒属(pestivirus), 其病毒子直径为40~50 nm, 有囊膜, 二十面体核衣壳被脂质层包围。该病毒的基因组是单股正链RNA, 包含在衣壳里, 大约为12.5 Kb^[1]。猪瘟(Hog chorera, HC)是由猪瘟病毒引起的一种高度接触性热性传染病, 以出血和发热为主要特征, 并引起妊娠母猪流产、胎儿畸变、慢性营养性消耗、淋巴细胞和血小板减少等免疫系统受损、继发或并发细菌或其他病毒感染等临床表现, 呈急性或慢性经过, 是一种对猪危害性极大的传染病^[2]。1984年猪瘟被国际动物卫生组织(OIE)列为A类动物传染病^[3]。因此猪瘟病毒的检测技术历来为国际畜牧兽医界所重视, 各国都投入了大量的人力、物力, 并取得了一定的进展, 但现有的各种技术均存在不同程度的缺点, 有待于改进。笔者就猪瘟病毒的检测技术研究进展进行概述, 以期对猪瘟的快速诊断及最终控制和消灭提供理论依据。

1 临床诊断

病猪体温变化明显, 迅速上升至41℃, 少数达42℃, 稽留不退。病猪食欲不振, 精神萎靡, 伏卧嗜睡, 后肢无力。先便秘后腹泻, 以后交替发生, 粪便中混有粘液或血丝。发病后期, 部分病猪有血尿、气喘等症状。急性结膜炎流出粘液或脓性分泌物, 部分病猪上、下眼睑粘在一起。个别病猪有磨牙、痉挛、脚交叉、站立不稳等神经症状。先天性猪瘟病毒感染可造成流产、木乃伊胎、畸形、死胎, 或生产出有震颤症状的弱仔猪以及外观正常但已被感染的仔猪。

病猪出现全身性出血, 皮肤、粘膜、实质器官都有充血和大小不等的出血点, 常在鼻端、耳、四肢内侧、腹下有出血斑和出血点, 指压不褪色。淋巴结外观充血肿胀, 切面周边出血, 呈红白相间的“大理石样”。脾脏不肿大, 边缘发现楔状梗死区。肾皮质色泽变淡, 有点状出血。膀胱粘膜表现不同程度的充血, 粘膜上有针尖大小的出血点。扁桃体出现梗死, 随着细菌侵入发生化脓性炎症。肠道有不同程度的充血和出血, 回肠末端、盲肠和结肠常有特征性的坏死和溃疡变化, 呈纽扣状。根据以上临床症状、特征性病理变化, 可以进行猪瘟的初步诊断, 但应与猪丹毒、猪副伤寒、猪肺疫、猪弓

形体和链球菌病等进行区别。

2 实验室诊断

典型的猪瘟暴发, 根据流行病学、临床症状和特征性病理变化, 一般可作出猪瘟的初步诊断。但要确诊非典型猪瘟, 尤其是仔猪表现的复杂症状, 难以根据临床症状作出诊断, 必须借助实验室进行诊断。

2.1 病毒分离 这是最经典和可靠的方法。取病猪的扁桃体、脾脏、肾脏、淋巴结组织, 加双抗后磨成乳剂, 过滤、离心后取上清液, 接种PK 15、PK 2a、ST等细胞进行病毒分离。再将病毒回归到健康动物体内, 出现猪瘟的典型症状即可确诊。该法特异性高, 可直接确诊, 只是时间较长, 成本高。

2.2 动物试验 取病猪的扁桃体、脾脏、肾脏、淋巴结等组织(扁桃体是分离病毒首选器官, 如采集不到扁桃体, 也可采集脾脏、肾脏、淋巴结^[3]), 剪碎、研磨, 加生理盐水制成乳剂, 无菌处理后接种易感猪, 观察发病情况, 然后分离病毒。中国兽医药品监察所建立了用家兔代替易感猪诊断猪瘟试验的兔体免疫交互试验体系, 即将病料乳剂接种健康家兔, 7 d后用兔化猪瘟弱毒注射家兔, 24 h后每6 h测体温1次, 连续3 d。通过体温曲线确定家兔体内是否含有猪瘟病毒。若体温反应正常, 则说明含有猪瘟病毒; 若体温反应成定型热, 则说明不含有猪瘟病毒^[4]。该方法特异性强, 可用作初步诊断, 但时间长、成本高, 且不能区分毒株。

2.3 血清学检测技术

2.3.1 血清中和试验。通过血清中和试验可以检测出猪体内的抗体, 但大量使用猪瘟兔化弱毒疫苗后, 猪群中的猪瘟抗体水平普遍较高, 所以应进行前后相关14 d以上的双份血清检测, 才能确定抗体滴度是否升高。目前最常用的方法是免疫荧光中和试验、PAV株中和试验。邵振华等利用免疫荧光中和试验分别对70日龄、5~6月龄、7月龄的65、34、44份猪瘟非免疫猪血清进行猪瘟母源抗体检测^[5]。结果发现, 70日龄猪的阳性率为52.3%; 至5~6月龄, 全部转为阴性。70日龄和5~6月龄猪的猪瘟兔体免疫交互试验的阳性率分别为47.5%和42.5%。可见免疫荧光中和试验比猪瘟兔体免疫交互试验检测猪瘟效果好。血清中和试验具有快速、方便, 节省人力物力等优点, 但不能精确检测猪瘟抗体水平滴度。

2.3.2 凝集性试验。

(1) 直接血凝试验。李晓华等利用已知的血凝抗原检测

基金项目 湖北省科技攻关项目(2006AA203A01); 湖北省农业科技创新中心资助项目。

作者简介 杨克礼(1976-), 男, 安徽怀远人, 硕士, 研究实习员, 从事预防兽医学研究工作。* 通讯作者。

收稿日期 2007-03-05

未知的血清抗体^[6]。他们将抗原吸附(致敏)在红血球表面,再与相应的抗体结合,红血球便出现凝集现象,不仅肉眼可见、直观性强,而且反应的敏感性也大大提高。猪瘟血凝试验有简便、价廉、特异性好等优点,缺点是需时较长。

(2) 间接血凝试验。李树春等将猪瘟兔化毒株细胞培养物浓缩纯化后,致敏由戊二醛鞣酸处理的健康绵羊红细胞,制成冻干猪瘟间接血凝诊断液,用以检测血清中的猪瘟抗体效价^[7]。该法具有操作简单、无需特殊仪器设备、特异性强且与其他传染性血清发生交叉凝集和重复性好等优点,缺点是耗时长、成本高。

2.3.3 荧光抗体技术。潘树德等用免疫荧光抗体诊断及单克隆抗体纯化酶联免疫吸附试验诊断技术对怀疑为猪瘟病毒感染猪进行了检测,共检测5份病料,其中有2份为阳性,阳性率为40%;用单克隆抗体纯化酶联免疫吸附试验诊断技术检测40头份猪瘟血清,发现所检测的血清样品中,猪瘟弱毒抗体效价OD值较高,有10%的隐性瘟感染,其强毒抗体效价OD值大于0.5,表明体内带有猪瘟病毒^[8]。Robertson等首次将荧光抗体(fluorescent antibody, FA)运用于猪瘟病料和组织培养物的检测,可在病死猪扁桃体、脾、回肠末端等器官的触片或冰冻组织切片中发现病毒抗原^[9];他们发现也可先将可疑病料乳剂经无菌处理后接种于细胞培养物,随后再用FA检测出感染细胞中的猪瘟抗原。荧光抗体检测方法具有快速、鉴别准确、可靠、分辨率高等优点,但费用昂贵(需配备荧光显微镜)、特异性差、主观性强(需有经验的检验员),同时难区分非特异性染色,特别是诊断中强毒。

2.3.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)。酶免疫分析技术是继荧光技术后发展起来又一先进检测技术,其基本原理是将特异性反应系统、间接放大系统和显示系统结合起来,用于检测抗体或抗原^[10]。Shannon等报道,在猪瘟感染前病毒血症产生时,采其血清进行ELISA检测猪瘟病毒,可作早期诊断,捕获ELISA能够检测2种不同猪瘟病毒株感染的病猪血液和组织中的抗体^[11]。该法具有敏感性高、可大批量检测等优点,缺点是非特异性强,各试剂盒标准不一致,相关性差。

2.4 分子生物学检测技术

2.4.1 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)。它是以病毒RNA为模板进行反转录,再以PCR进行核酸扩增来检测猪瘟病毒。罗廷荣等应用RT-PCR对猪瘟诊断表明,RT-PCR技术可应用于临床诊断^[12]。赵耘等建立了套式RT-PCR与限制性内切酶酶切相结合的区别猪瘟兔化弱毒疫苗株与猪瘟病毒田间分离株的检测技术^[13]。李艳等建立了一种能区分猪瘟病毒(Classical swine fever, CSFV)强毒和弱毒的反转录-复合套式聚合酶链式反应(RT-nPCR)检测方法^[14]。Sandvik等利用RT-PCR法对猪瘟病毒进行检测,发现该法具有检出率高、特异性强等特点(只需微量病料即可诊断),且具有生物安全性,无散毒的危险,但其费用较高^[15-16]。

2.4.2 核酸探针技术。这是在分子标记基础上以病毒RNA基因组为模板制备探针,在cDNA合成后进行Southern blotting,特异的核酸探针会在不同病毒基因组cDNA上产生特异的条带。Grliere等利用猪瘟病毒基因组RNA构建cDNA,与牛病毒性腹泻病毒进行序列分析,合成了6个探针,按照它

们在病毒基因组的位置,根据特异杂交带区分出了猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒以及绵羊边界病病毒^[17-19]。赵启祖等研制了猪瘟病毒石门血毒P₈₀核酸探针,可检测病毒RNA的存在和对病毒RNA进行定量检测,灵敏度达220 pg^[20]。核酸探针技术特异性强、准确可靠,可用于不同毒株的分离和鉴定,但诊断费用较高。

2.4.3 基因芯片检测技术。基因芯片指在一个很小的表面,覆盖有成千上万的寡核苷酸,每个寡核苷酸都固定在芯片上的特定位置,可以找到这个点,每个寡核苷酸都能反映芯片上成千上万拷贝互补信息。这种芯片用杂交反应检测由RT-PCR、PCR、TMA(Transcription Mediated Amplification)或NASBA(nucleic acid sequence based amplification)方法放大的样品核苷酸。基因芯片包括cDNA芯片、寡核苷酸芯片、基因组芯片,主要目标是用于DNA序列的测定、病原检测、基因表达谱鉴定、基因突变体的检测分析,以及基因组的功能研究等。

应用基因芯片可以依据一级结构序列数据测量每个基因的转录水平,检测序列的多态性。一方面,可对任何一个提供的微生物基因组,直接设计并制造基因芯片,可以监控微生物基因,预测病原核酸存在,鉴定毒力相关基因和测定药物的作用,另一方面,利用宿主基因芯片,能够探测感染时的宿主反应,描述分子变化。此外,该技术还可描述每种病原菌宿主出现的特殊基因表达变化,是一种提供诊断、预测临床处置传染病的新方法^[21-22]。

3 展望

(1) 发展亚单位标记疫苗。虽然许多国家已消灭猪瘟,但为做好突发疫情的监测,发展亚单位标记疫苗,建立鉴别检测技术是未来研究的热点。如,将传统的C株疫苗某一基因用相应的牛病毒性腹泻病毒的基因代替;牛病毒性腹泻病毒的E2用猪瘟E2基因代替,或直接开发DNA疫苗进入宿主细胞后表达E2基因,或将E2基因的突变删除等。

(2) 开展替代兔体测毒法研究。目前我国猪瘟疫苗的效力检验、疫苗病毒滴度的确定仍采用兔体测毒法。但兔体测毒耗时、费力、价格昂贵,且兔体个体敏感性差异大,无法准确对活体病毒量进行准确标定。因而开展替代兔体测毒法的研究也是未来的一个研究方向。

(3) 加强鉴别检测技术研究。由于现有的各种技术均存在不同程度的缺点,因此开展猪瘟病毒快速、方便、经济和可区分强弱毒株的检测技术研究仍将是今后的一个研究趋势。

(4) 开展抗原抗体相关检测方法标准化的制定。我国诊断猪瘟抗原、抗体的方法较多,但各方法之间的相关性研究较少,因而应加强开展抗原、抗体相关检测方法标准化的制定也将是今后研究的一个趋势。

参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1997:652-664.
- [2] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 4版. 北京:中国农业出版社,2001:383-388.
- [3] 世界动物卫生组织. 哺乳动物、禽、蜜蜂A和B类疾病诊断试验和疫苗标准手册[M]. 农业部畜牧局,译. 北京:中国农业科学技术出版社,2002:185-197.
- [4] 王明俊. 兽医生物制品学[M]. 北京:中国农业出版社,1997:582-588.
- [5] 邵振华,杨晓林,田海燕. 猪瘟免疫荧光中和试验的研究[J]. 中国兽医杂志,1988(10):13-16.

(上接第4854页)

- [6] 李晓华, 杨小燕, 戴爱玲, 等. 猪瘟抗体水平的实验室检测技术[J]. 龙岩师专学报, 2001, 19(3): 46-47.
- [7] 李树春, 何建新, 李德珍, 等. 猪瘟间接血凝试验的研究[J]. 中国兽医杂志, 1993, 2(37): 3-6.
- [8] 潘树德, 何利昆, 李学俭, 等. 应用FA及PPA-EIISA技术对猪瘟的检测[J]. 动物医学进展, 2003, 24(5): 114-116.
- [9] ROBERISON A, GRIGAS S, APPEL M, et al. Hog cholera IV. Detection of the virus in tissue culture preparations by the fluorescent antibody technique [J]. Can J Comp Med Vet Sci, 1965, 29(9): 234-241.
- [10] 宣长和, 任风兰, 孙福先. 猪病学[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 44-52.
- [11] SHANNON A D, MORRISY C, MACKINTOSH S G. Detection of hog cholera virus antigens in experimentally infected pigs using an antigen capture ELISA [J]. Vet Microbiol, 1993, 34(3): 233-248.
- [12] 罗廷荣, 莫扬, 吴文德, 等. RT-PCR技术检测猪瘟病毒的应用研究[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(4): 307-309.
- [13] 赵耘, 秦玉明, 张广川, 等. RT-PCR和酶切方法区别猪瘟疫苗毒与野毒的研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 82-87.
- [14] 李艳, 仇华吉, 王秀荣, 等. 鉴别猪瘟强毒和弱毒的反转录-复合套式聚合酶链式反应(RT-nPCR)检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2006, 39(9): 1907-1914.

- [15] SANDMIKT, PATON DJ, LOWINGS PJ. Detection and identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5' untranslated coding regions [J]. J Virol Methods, 1997, 64: 43-56.
- [16] GLODRICK MA, LOWINGS J P, IBALA G. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorescent probe (Tagman) [J]. J Virol Methods, 1998, 72(2): 125-135.
- [17] CRUIERE C, BAKKALI L, GONZAGUE M. cDNA probes for the detection of pestiviruses [J]. Arch Virol, 1991(S3): 191-197.
- [18] DABLE J, KRIEJECHT, KAADEN O R. Differentiation of pestiviruses by a hog cholera virus-specific generic probe schelpc [J]. Arch Virol, 1991(S3): 209-215.
- [19] COLLINE O, BLOEN R M, WENSVOORT G. An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus [J]. Vet Microbiol, 1997, 59: 15-25.
- [20] 赵启祖, 刘湘涛, 刘卫, 等. 猪瘟病毒P80基因核酸探针的研制[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997: 3-7.
- [21] HUA, JIANP C, GARG M, et al. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: Global monitoring with differential display arrays [J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95(11): 14470-14475.
- [22] II J, CHENS, EVANS D H. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR [J]. Clin Microbiol, 2001, 39(2): 696-704.