

猪瘟病毒实验室检测技术

张明敬 史 慧

江苏省连云港市畜牧兽医站, 江苏连云港 222001

摘要 本文主要介绍猪瘟血清学实验室诊断技术应用, 猪瘟病毒中和试验、胶体金免疫检测、猪瘟正向间接血凝试验和猪瘟琼脂扩散试验的特点、猪瘟常见的血清学实验室诊断技术以及存在的问题与不足, 以便更好地适用于临床应用。

关键词 猪瘟; 实验室检测; 探讨

猪瘟是养猪业中常见的主要疾病之一, 该病感染率和死亡率均较高, 且该病无有效的药物进行治疗, 早期确诊并快速清除感染猪是控制猪瘟的关键。猪瘟主要用疫苗免疫接种预防该病的发生, 疫苗的使用虽然控制了猪瘟的大规模流行, 各种疾病均表现出非典型特征, 给猪瘟和其他相关疫病的鉴别诊断带来了困难。仅靠临床症状及病理剖检变化很难对猪瘟进行确诊, 必须依靠实验室诊断方法。

我国猪瘟病原检测技术的研发已经比较完善, 基于病毒抗原、抗体或核酸等都建立了比较成熟的检测方法, 各种方法在检测灵敏度、特异性、敏感性、稳定性、重复性、符合性等方面都显示出了各自不同的优势。通过猪瘟病毒 E2 单克隆抗体的研发, 使经典的病毒分离技术、标记免疫抗体技术和 ELISA 技术等传统检测技术得到改善, 特异性得到进一步提升, 检测结果更加准确可靠。目前, 我国已经利用分子生物学的手段, 设计猪瘟病毒的保守基因片段, 利用这些保守的基因片段建立了猪瘟病毒分子病毒诊断方法, 如套氏 RT-nPCR 方法、荧光定量 RT-PCR 方法、荧光定量鉴别 RT-PCR 方法, 这些分子生物学诊断方法被广泛应用于猪瘟病毒的检测之中, 具有很高的准确性和敏感性。该方法操作麻烦, 需要相应的仪器和技术, 因此, 分子生物学技术在诊断猪瘟病毒的应用, 使得猪瘟病毒核酸检测技术达到了突飞猛进的程 度, 与传统病毒分离技术、标记免疫抗体技术和 ELISA 技术相比, 检测灵

敏度呈现数量级的提高, 并且多种生物学的检测方法实现了对猪瘟病毒野毒株和疫苗株的鉴别诊断的突破, 为鉴别诊断提供了强有力的工具。

常用的猪瘟病原学实验室诊断技术主要包括动物接种试验、病毒分离技术、标记抗体技术、酶联免疫吸附试验和分子生物学检测技术。病毒分离方法仍然是猪瘟病毒实验室检测与鉴定的标准方法, 采用单克隆抗体用于猪瘟病毒培养物的检测, 较多克隆抗体具有更好的准确性和特异性。细胞培养过程中增殖的病毒也可以通过 RT-PCR 扩增和序列测定来确认。分离到的病毒可以用于基因分型及分子流行病学调查等进一步的研究工作。标记抗体技术可以对感染组织或细胞中的猪瘟病毒进行特异性检测, 根据其标记物的不同分为荧光抗体检测技术 (Fluorescent antibody test, FAT) 和免疫过氧化物酶检测技术 (Immunoperoxidase test, IPT), 根据标记的抗体分子不同, 可分为直接法和间接法 2 种。ELISA (酶联免疫吸附试验) 是当前应用最广泛、发展最快的一项实用技术, 是继荧光技术之后发展起来的又一快速检测技术。

1 猪瘟血清学实验室诊断技术应用

猪瘟血清学实验室诊断技术在养猪业中广泛应用, 无论是在猪瘟病毒阴阳性的检测, 还是猪瘟病毒抗体的检测中, 猪瘟血清学实验室诊断技术具有很好的敏感性和准确性, 广泛应用于规模化和集

约化猪场。加拿大、美国和欧洲部分国家等发达国家中规模化和集约化猪场,都是利用猪瘟血清学实验室诊断技术来检测猪瘟病毒。常用的猪瘟病原学实验室诊断技术主要包括动物接种试验、病毒分离技术、标记抗体技术、酶联免疫吸附试验和分子生物学检测技术。这些猪瘟病原学实验室诊断技术取得了突破性进展,猪瘟病原学实验室诊断技术产品逐渐走向市场,但是,猪瘟病原学实验室诊断技术部分产品还存在一定问题,准确性和敏感性较低,需要改进。猪瘟病原学实验室诊断技术应用对解决当前猪瘟防控和净化具有十分重要的现实意义。

2 猪瘟常见的血清学实验室诊断技术

猪瘟常见的血清学实验室诊断技术主要包括猪瘟病毒中和试验、ELISA、猪瘟抗体胶体金免疫检测技术、猪瘟正向间接血凝试验、猪瘟琼脂扩散试验和其他新型技术。

1)猪瘟病毒中和试验(VNT)。猪瘟病毒 VNT 可以检测血清中猪瘟病毒的中和抗体或病料中的猪瘟病毒。利用猪瘟病毒 VNT 检测抗体的中和抗体试验,在适当条件下作用一定时间后,接种于宿主系统(敏感细胞、兔体或猪体),观察一定时间后,根据混合液中病毒的感染力来判定该血清对病毒的中和能力,并计算出待检血清的中和效价,从而进行血清学诊断。猪瘟病毒中和试验不仅可在易感的试验动物体内进行,亦可在敏感细胞上进行。在敏感细胞上进行的中和试验。猪瘟病毒(Neutralization-immunofluorescence, NIF)和过氧化物酶联中和试验(Neutralization peroxidase-linked assay, NPLA);在兔体或猪体上进行的中和试验称为体内病毒中和试验,操作不便、敏感性比较低,因此,没有被广泛应用。由于兔体差异,虽然猪瘟病毒兔体中和试验结果不稳定,但该方法为我国猪瘟抗体检测确诊的标准方法通常需要采用其他方法确诊,以提高试验的准确性。

2)胶体金免疫检测(GICA)。胶体金免疫检测(Gold immunochromatography assay, GICA)主要优点是利用金颗粒可催化银离子还原成金属银这一特性,通过银显影剂增强金颗粒的可见性,提高测定灵敏度,试验数据表明可达到 ELISA 的灵敏度水平。胶体金免疫检测技术只能定性,不能定量,因

此,猪瘟的胶体金免疫检测技术不适合大批量的样品检测,而且成本比较高,不适合广泛应用于规模化和集约化的猪场,其灵敏度和特异性有待进一步评价。

3)猪瘟正向间接血凝试验(IHA)。猪瘟正向间接血凝试验(IHA)的优点是不需要特殊检测仪器,肉眼即可判定结果,操作方法简单,适用于基层和技术落后地区。该方法采用肉眼观察判定结果,受主观因素影响极大,因此需要通过纯化抗原的获得和对测试人员进行培训,提高该方法的特异性和准确性。

4)猪瘟琼脂扩散试验。该试验特点是操作简单、快捷,易于判定结果,可应用于猪瘟的定性及抗体检测,但敏感性低,几乎不再使用。

3 存在的问题与不足

由于传统的猪瘟实验室诊断与检测技术费时、费力,敏感性、特异性和准确性低,同时还涉及动物福利和生物安全等问题,新型猪瘟实验室诊断与检测技术研发和应用势在必行。随着猪瘟病毒单克隆抗体制备技术的不断成熟,我国猪瘟抗体新型检测技术取得了突破性进展,使得经典的 NIF、NPLA 等体外中和试验更加完善和准确;各种 ELISA 技术乃至胶体金免疫快速检测技术应用于猪瘟抗体的检测更加特异、敏感和准确;其他新型抗体检测技术如荧光微球免疫技术在猪瘟抗体诊断中的研究已初露曙光,显示出更加特异、敏感和稳定的特性,同时在抗体的鉴别诊断研究中也显示了巨大潜力。其他免疫芯片技术(Immuno chip)和荧光微球技术(Fluorescent microsphere-based technology)用于猪瘟抗体诊断的研究已经显示出良好的势头,开发这类技术用于猪瘟抗体的鉴别诊断具有良好的应用前景。

4 小结

目前,我国猪瘟检测技术已经达到了国际水平,在猪瘟诊断、疫情监测、分子流行病学调查分析等方面已经建立了一套完整的检测体系,但是在临床应用中还存在不足,需要改进与创新,应研制出操作简便、便宜、易于临床的、高效的猪瘟检测技术。