

非洲猪瘟诊断技术研究进展

朱小甫, 吴旭锦*

(咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 咸阳市动物疫病分子生物学诊断技术研究重点实验室, 陕西咸阳 712000)

摘要: 非洲猪瘟是我国农业农村部规定的一类动物疫病之一, 该病具有传染性强、发病率和病死率高的特点, 严重危害养猪业的健康发展。要防控非洲猪瘟, 前提是对非洲猪瘟快速、准确的诊断, 文章综述了非洲猪瘟的诊断和检测技术方法, 旨在为非洲猪瘟的诊断防控提供参考思路。

关键词: 非洲猪瘟病毒; 非洲猪瘟; 诊断; 检测

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2020)02-005

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)的病原是非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV), 该病传播速度快, 发病率、病死率高, 对社会经济造成巨大影响, 是我国动物防疫法规定的一类动物疫病之一^[1]。非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属仅有ASFV一个成员, 病毒粒子为典型二十面体结构, 平均直径约200nm, 遗传物质为双股线性DNA, 碱基数170kb~190kb^[2]。由于ASFV结构复杂, 学界对其大多数蛋白结构与功能尚不清楚, 亦无有效疫苗投入临床应用, 在预防ASF方面面临很多困难^[3]。自从2018年8月辽宁沈阳爆发我国首例ASF以来, 疫情迅速蔓延全国, 我国生猪产业损失惨重^[4]。为尽快控制扑灭疫情, 除了加快研发有效疫苗外, 更为现实和重要的是依靠诊断技术做到早诊断、早扑杀感染动物, 消除传染源和疫点。总的来看, ASF诊断技术分为临床与病理诊断、病原学诊断和血清学诊断三大类, 现综述如下, 以期对诊断防控ASF提供参考。

1 临床与病理诊断

ASF临床表现与病毒毒力、感染剂量与途径有关。最急性型表现为猪只无明显临床症状的突然死亡。急性型表现为高热(40℃~41℃), 食欲不振, 皮肤出血, 先便秘后腹泻带血, 死亡率极高。慢性型临床症状温和, 主要表现为食欲减退, 轻微

发热, 精神差, 有呼吸道症状, 怀孕母猪流产^[5]。病理变化上以急性型表现最为特征, 脾脏显著肿大, 质地变脆, 色泽发黑, 切面隆起有多量黑红色液体流出。淋巴结肿胀, 表面点状出血, 切面呈红白相间的大理石纹状。有的病例中可见心包积水, 心外膜内膜有出血点。胸腔积水, 肺脏水肿有淤血。肾脏皮质与髓质有出血点。肝脏、胆囊充血, 肠道浆膜点状或斑片状出血, 黏膜弥漫性出血。膀胱黏膜有点状出血。病毒侵害中枢神经引起脑膜点状出血^[6]。需要指出的是, 以上症状与病变并不是ASF特有, 猪瘟、高致病性猪蓝耳病以及败血性链球菌病等均有类似表现, 因此依据症状与病变只能诊断为疑似病例, 确诊需要实验室方法^[7]。

2 病原学诊断

ASFV病原学诊断包括病毒分离、病毒抗原检测和基因组DNA检测技术三类。病原检测适用范围广, 在潜伏期、发病初期均可应用。

2.1 病毒分离

OIE推荐ASF诊断的黄金标准是病毒分离, 常用红细胞吸附试验(HAD)进行ASFV分离确诊^[8]。其原理是, 如果猪的单核细胞或巨噬细胞被ASFV感染, 这些细胞就具有吸附猪红细胞的能力。用疑似感染猪血清或病料处理液接种原代白细胞培养物进行HAD, 或用感染猪外周血白细胞作

收稿日期: 2020-01-09

基金项目: 咸阳市科学技术研究与发展计划项目(2019k02-63); 咸阳职业技术学院重大科研项目(2018KYA01)

作者简介: 朱小甫(1977—), 男, 硕士, 副教授, 执业兽医师, 主要从事动物疫病分子诊断技术研究工作。

“自动玫瑰花环”HAD。培养完成后镜检,发现在感染细胞上有红细胞吸附即可判定为阳性。特异性抗体可阻断ASFV的红细胞吸附,据此设计的红细胞吸附抑制试验(HADI)用来测定抗体水平或测试不同分离株是否在抗原性上存在差异^[9]。HAD技术的缺点是耗时长,操作复杂,需要借助其他检测方法进行判定,不适合快速诊断。

2.2 荧光抗体检测病毒抗原

荧光抗体试验(Fluorescent antibody test, FAT)检测ASFV,用待检组织作冰冻切片或压印片,或在载玻片上涂开已接种的白细胞培养物的细胞沉淀,风干后丙酮固定,用荧光素标记抗体染色,冲洗后置荧光显微镜观察,在细胞浆中有特异性荧光出现,即判为阳性。FAT可用来检测疑似病例组织中有无ASFV,也可用于确定无HAD现象的白细胞培养物中是否存在ASFV,即能鉴定无HAD能力的毒株。FAT还可鉴别CPE是由ASFV和其他病原、或有细胞毒性的接种物引起。但在检测慢性感染病例时FAT灵敏度较低,可能是抗原抗体复合物干扰的结果^[10]。

2.3 胶体金检测病毒抗原

吴海涛等^[11]用大肠杆菌表达ASFV P72蛋白,免疫兔制备高免血清,用杂交瘤细胞技术制备ASFV单克隆抗体,将上述ASFV多克隆抗体和单克隆抗体纯化,在硝酸纤维素膜上包被SPA作为质控线,包被ASFV多克隆抗体作为检测线,组装成检测ASFV抗原的胶体金试纸条。为了验证试纸条的特异性、敏感性及稳定性,用两种原核表达ASFV P72蛋白作为抗原进行检测,发现制备的试纸条在5-10 min内可准确识别两种蛋白抗原,对两种抗原的最低识别量分别为15 ng和21 ng。胶体金检测操作简单快捷,稳定性好,检测成本低,但只可定性不可定量,适用于ASFV初步筛查。

2.4 基因组DNA检测

2.4.1 普通PCR技术 PCR技术的出现极大的推动了分子生物学的发展,应用PCR技术扩增病原核酸特异性片段诊断相应的疫病成为实验室常用技术手段,OIE官方推荐PCR作为ASFV检测方法之一。PCR方法的优点是快速、敏感,特异性好,不需要病毒分离即可快速诊断。吴忆春^[12]以人工合成的ASFV VP73基因为模板,设计特异性引物,建立

PCR方法并组装成试剂盒,该试剂盒与常见的6种猪病毒、健康猪和蝉的基因组无交叉反应,检测重组质粒敏感性极限为0.1fg,与OIE推荐的引物敏感性相当。杨吉飞等^[13]根据ASFV VP72基因设计了检测ASFV的PCR方法,与猪的13种常见病毒、细菌、衣原体核酸无交叉反应,敏感性与OIE推荐方法类似,所建立的PCR方法能准确扩增17个ASFV分离株的基因组,验证了方法的有效性。Luo Y等^[14]根据p72基因设计引物,用建立的PCR方法检测了不同地区I、V、VIII、IX 4个基因型14个代表毒株,该方法比OIE推荐的两种PCR灵敏度更高,检测ASFV基因型更为全面。

2.4.2 多重PCR技术 多重PCR技术可以一次性检测多种病原核酸,检测效率高,节约试剂耗材成本,被广泛应用于动物疫病检测。冷依伊等^[15]针对水疱性口炎病毒、非洲猪瘟病毒、猪口蹄疫病毒、猪伪狂犬病病毒和猪瘟病毒5种病原设计引物,建立了五重RT-PCR鉴别诊断方法,该方法对CSFV、PRV、ASFV、FMDV和VSV的核酸检测极限分别为 6.87×10^4 拷贝/ μL 、 8.82×10^3 拷贝/ μL 、5.71拷贝/ μL 、 4.32×10^2 拷贝/ μL 和 4.93×10^4 拷贝/ μL 。张倩等^[16]采用OIE推荐的ASFV检测引物,再设计一对检测猪瘟病毒的引物,建成了检测这两种病原的双重PCR方法,该方法在一个反应体系中同时扩增两个不同病毒目的基因,检测极限为100pg的DNA,具有省时、快速的特点。

2.4.3 纳米PCR技术 纳米PCR是在普通PCR反应体系中加入固体纳米金属颗粒,形成热导性更强的纳米流体,PCR反应温度调节更快,可消除非特异性扩增,提高反应的特异性和扩增产物产量^[17]。崔尚金等^[18]采用纳米PCR方法检测ASFV与其他7种常见猪病原,结果显示该方法仅ASFV能够特异性扩增,敏感性试验表明,该方法最低可检测到43拷贝/ μL 的ASFV,而普通PCR检测极限为 4.3×10^4 拷贝/ μL ,纳米PCR敏感性提高了1 000倍。

2.4.4 实时荧光定量PCR技术 1996年由美国应用生物系统公司推出实时荧光定量PCR技术(qPCR),该技术采用荧光标记特异性探针或荧光染料标记PCR产物,通过荧光信号强弱变化实时监控反应过程,用软件计算分析样品模板浓度。qPCR不需要电泳成像,检测过程简化,且真正实现了绝对定

量。李洪利等^[19]根据p72基因序列设计荧光定量引物与探针,建立了一种最低能够检测到10拷贝/ μ L的质粒的qPCR方法。郭少平等^[20]针对ASFV K205R基因设计并建立了qPCR检测方法,提取猪肝组织DNA,掺入ASFV K205R基因重组质粒作为模板,确定检测效率,以OIE推荐的qPCR方法作为对照,试验证实,建立的基于K205R基因的qPCR效率比OIE推荐方法要高。王建华等^[21]以ASFV CP530R基因和高致病性猪蓝耳病病毒(HP-PRRSV)NSP2基因为靶序列,分别设计特异性引物和探针,建成一种二重荧光RT-PCR检测方法,该方法对ASFV和HP-PRRSV可特异性扩增,最低检测极限分别为61拷贝/ μ L和41拷贝/ μ L,重复性试验表明该方法具有良好的重现性。

2.4.5 环介导等温PCR技术 环介导等温PCR技术(LAMP)是一种基于链置换DNA聚合酶的恒温核酸扩增方法,该方法针对靶基因的6个区域设计4种特异引物,在63℃左右恒温30~60min完成核酸扩增,不需要常规PCR的核酸模板变性、退火、延伸等循环过程,无需电泳成像,只要有简单的恒温设备即可完成,具有简单、低成本、快速、特异的特点。王彩霞等^[22]合成了ASFV P72全长基因,设计了环介导恒温扩增的内、外引物,建成了LAMP诊断方法,该方法能检测质粒的最低浓度为10拷贝/ μ L,特异性良好。杨吉飞等^[23]基于ASFV P72基因设计了LAMP检测方法,对猪基因组、蜂基因组与ASFV参考实验室提供的ASFV基因组进行检测,结果仅ASFV基因组能扩增,猪与蜂的基因模板为阴性。王建昌等^[24]建立了一种基于ASFV P72基因的重组酶聚合酶等温扩增检测方法,在38℃恒温0.5h即可有效扩增目的基因,以P72基因质粒为模板,检测极限达到200个拷贝,与OIE推荐的qPCR灵敏度相当,比OIE推荐的PCR灵敏度高10倍,方法简单快速,成本较低,是非洲猪瘟一线防控可靠的技术手段。

2.4.6 微滴数字PCR技术 微滴数字PCR(Droplet digital PCR, ddPCR)是一种全新的绝对定量技术,通过稀释模板直到实现理论上的单分子扩增,利用泊松分布原理和终点法PCR,通过软件分析计算出模板浓度。ddPCR无需绘制标准曲线,低浓度模板也可精准定量,该技术引起国内外的高度关注和应

用。邬旭龙等^[25]基于ASFV K205R基因设计并建立了qPCR和ddPCR检测方法,评估了这两种方法的特异性、灵敏性、重复性和线性关系,检测了163份国内外的血清和组织样品,用ASFV ELISA试剂盒复检了血清样品,计算不同方法检测符合率,结果建立的qPCR和ddPCR检测方法有良好的线性关系,ddPCR灵敏度可达0.36个拷贝,灵敏度比qPCR高10倍。

2.4.7 交叉引物扩增-试纸条法 Gao Yao等^[26]选择ASFV基因的高保守区域,设计检测引物与探针,探针用异硫氰酸荧光素和生物素标记,同样用异硫氰酸荧光素和生物素标记CPA扩增产物的末端,在试纸条检测线区域会形成胶体金-抗异硫氰酸荧光素抗体-扩增产物-抗生物素抗体偶联复合物,检测线处固定胶体金,阳性结果检测线会显示颜色变化,建成交叉引物扩增-诊断试纸联合使用的检测方法,该方法检测下限为200拷贝/ μ L,试纸条重复性好,全血样品检测显示与qPCR的符合率为97.8%。这种方法先通过交叉引物进行等温PCR扩增,再用试纸条检测产物,不需要仪器设备,实现现场快速诊断,适合现地检测需求,应用前景广阔。

3 血清学诊断

3.1 ELISA检测技术

龚振华等^[27]参考非洲猪瘟病毒P54基因序列,通过人工合成P54基因,克隆至表达载体构建重组质粒,结果显示,该质粒可高效表达分子量约20.7 ku的P54蛋白,该蛋白具有可溶性,易于纯化,能特异性识别ASFV阳性血清,ELISA试验显示,P54蛋白针对ASFV阳性血清和阴性血清的P/N值为1.67,结果证实用该蛋白建立的ELISA方法可用于非洲猪瘟抗体诊断。靳雯雯等^[28]采用基因工程技术制备ASFV VP73蛋白,以此蛋白包被ELISA板,建立了ASFV抗体测定的间接ELISA,灵敏性测试表明,该方法可检测到1:2560稀释的标准阳性血清,与同类进口ELISA试剂盒相当,特异性和重复性良好。董志珍等^[29]以表达的ASFV P54蛋白免疫小鼠,制备ASFV单克隆抗体,建立了检测ASFV抗体的竞争ELISA法,该方法特异性高,比间接免疫荧光法灵敏度高,可用于检测ASFV抗体水平。

3.2 胶体金试纸检测技术

张鑫宇等^[30]原核表达了p54蛋白,用胶体金标记蛋白,以玻璃纤维垫为载体,喷涂标记蛋白,质控线为抗p54多克隆抗体,检测线为SPA,制成了胶体金免疫层析试纸。该试纸条检测抗体的灵敏度为200 ng/mL,检测猪常见病毒抗体阳性血清均为阴性,提示试纸特异性高。应用试纸检测141份猪血清样品,结果发现对于ASFV早期感染的诊断上,该试纸比OIE推荐的间接ELISA要好。以免疫印迹法为参照,在检测疫区临床阳性样品上,该试纸条的符合率比OIE推荐的ELISA要高。试纸表现出了良好的应用效果,具有良好的开发前景。

3.3 量子点免疫层析试纸条检测技术

林彦星等^[31]利用软件分析ASFV VP73蛋白的氨基酸序列,推测该蛋白优势抗原表位区域后人工合成多肽,将其偶联上牛血清白蛋白,选取抗原性好的多肽作为检测线包被抗原采用量子点标记葡萄球菌蛋白A,抗葡萄球菌蛋白A的多克隆抗体作为质控线的包被蛋白,制成了检测非洲猪瘟病毒抗体的量子点免疫层析试纸条。试验结果显示,该试纸条特异性良好,不与常见相关猪病阳性血清发生反应,同时用进口ELISA试剂盒检测进行对比,结果完全符合。制成的量子点免疫层析试纸条操作简便,在ASFV抗体的现场检测方面具有优势。

4 小结与展望

自ASF传入我国以来,短时间对我国养猪业造成了巨大打击,生猪养殖量明显下降,猪肉价格上涨,给社会生活造成了一定的影响。为了控制ASFV的蔓延传播,急需短时、特异、准确、方便的诊断手段。

病毒分离是ASFV诊断的金标准,但分离鉴定需要较长时间,分离物需要辅助手段进行鉴定,因此只适合进行病原研究,不能用于快速诊断。PCR技术灵敏度高,特异性好,检测样本来源多样化,操作简单快速,适合快速诊断。荧光定量PCR是目前主要推广使用的快速诊断方法,该方法能实时监测反应过程,对模板可绝对定量,但该方法易产生假阳性结果,检测中要严格设立对照,且对检测环境和操作技术要求很高。环介导等温PCR技术快速准确,成本低,结果直观,不需要特

殊设备,适用于现场便携式诊断,该方法缺点是低浓度模板单一温度扩增会导致产生非特定产物,易形成气溶胶污染造成假阳性。ELISA方法灵敏度高、特异性好,是国际贸易指定试验方法,但该方法技术要求高,鉴定时程长,对仪器设备依赖性较大。目前急需现场快速诊断技术支持猪场现场筛查,为迅速控制疫情争取时间。环介导等温PCR技术和胶体金技术主要优点就是耗时更短、不需要特殊设备即可进行,因而是重要的技术开发方向。需要指出的是,ASF诊断是防控的第一步,扑灭疫情需要在诊断的基础上结合扑杀、消毒、限制病原传播、生物安全等综合措施,才能有效控制并达到消灭ASF的目的。

参考文献

- [1] OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2016. Chapter 2.8.1 African swine fever [EB/OL]. (2017-05-22). http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.01-ASF.pdf.
- [2] VILLIERS E, UALLARDO C, ARIAS M, et al. Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences [J]. *Virology*, 2010, 100(1): 128-136.
- [3] 欧云文, 阎传忠, 张杰, 等. 非洲猪瘟病毒的分子病原学及致病机理研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(7): 2139-2146.
- [4] 王琴. 猪瘟与非洲猪瘟对养猪业的重大冲击 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(21): 4143-4145.
- [5] 陈腾, 张守峰, 周鑫韬, 等. 我国首次非洲猪瘟疫情的发现和流行分析 [J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(9): 1831-1832.
- [6] 王颖, 缪发明, 陈腾, 等. 中国首例非洲猪瘟诊断研究 [J]. *病毒学报*, 2018, 34(6): 817-821.
- [7] 林彦星, 曹探福, 杨俊兴, 等. 非洲猪瘟病毒实验室诊断方法的研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(10): 2020-2032.
- [8] MALMQUIST W, HAY D. Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and bully coat cultures [J]. *Am J Vct Rcs*, 1960, 21: 104-108.
- [9] 姜睿姣, 张鹏飞, 朱光恒, 等. 非洲猪瘟检测技术进展 [J]. *病毒学报*, 2019, 35(3): 1-10.
- [10] 刘贺. 非洲猪瘟诊断技术研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2019, 40(7): 1-3.
- [11] 吴海涛, 成大荣, 吴萌, 等. 非洲猪瘟病毒胶体金免疫层析试纸条的研制 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018, (17): 126-128, 238.

- [12]吴忆春.非洲猪瘟病毒PCR检测试剂盒的研制[J].中国兽医科学,2012,42(11):1158-1162.
- [13]杨吉飞,关贵全,刘志杰,等.一种用于非洲猪瘟病毒检测的PCR方法[J].畜牧兽医学报,2011,42(8):1201-1206.
- [14]Luo Y, Atim S A, Shao I, et al. Development of an updated PCR assay for detection of African swine fever virus[J].Arch Viro, 2017,162(1):191-199.
- [15]冷依伊,任梅滢,蒙正群,等.5种猪病毒性传染病病原的多重PCR检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2017,39(2):123-126.
- [16]张倩,刘明团.非洲猪瘟与猪瘟双重PCR方法的建立与初步应用[J].山东畜牧兽医,2012,33(11):7-9.
- [17]Li Hui-xiang, Rothberg L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles [J].PNAS,2004, 101(39):14036-14039.
- [18]崔尚金,胡泉博,刘业兵.非洲猪瘟病毒高效纳米PCR检测方法的建立及初步应用[J].中国预防兽医学报,2012,33(10):807-809.
- [19]李洪利,曹金山,王君玮,等.非洲猪瘟病毒实时荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J].中国畜牧兽医,2012,39(6):37-40.
- [20]郭少平,刘建,吴绍强,等.非洲猪瘟病毒实时荧光定量PCR检测技术的研究与评价[J].中国畜牧兽医,2010,37(4):76-79.
- [21]王建华,赵祥平,董志珍,等.一种鉴别非洲猪瘟病毒和高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒二重荧光RT-PCR检测方法的建立[J].中国兽医科学,2016,46(1):19-25.
- [22]王彩霞,刘建,林祥梅,等.环介导恒温扩增技术快速检测非洲猪瘟病毒[J].动物医学进展,2010,31(2):15-19.
- [23]杨吉飞,关贵全,刘志杰,等.非洲猪瘟病毒环介导恒温扩增快速检测技术的建立及应用[J].中国动物传染病学报,2011,19(4):7-12.
- [24]王建昌,王金凤,刘立兵,等.非洲猪瘟病毒RPA等温检测方法建立[J].中国动物检疫,2016,33(6):78-81.
- [25]邱旭龙,肖璐,宋勇,等.非洲猪瘟病毒微滴数字PCR(ddPCR)方法的建立及应用[J].微生物学通报,2017, 44(12):2839-2846.
- [26]Gao Yao, Meng Xing-yu, Zhang Hua-wei, et al. Cross-priming amplification combined with immunochromatographic strip for rapid on-site detection of African swine fever virus [J].Sensor Actuat B-Chem,2018,274:304-309.
- [27]龚振华,王丽萍,臧京帅,等.非洲猪瘟病毒p54蛋白的高效表达及在ELISA中的应用[J].畜牧兽医学报,2013, 44(11):1832-1837.
- [28]靳雯雯,杨俊兴,花群俊,等.非洲猪瘟病毒抗体检测间接ELISA方法的建立[J].中国兽医学报,2014,34(7):1043-1046.
- [29]董志珍,肖妍,赵祥平,等.检测非洲猪瘟McAb-ELISA竞争试剂盒的建立及初步应用[J].中国动物检疫,2012, 29(4):37-40.
- [30]张鑫宇,左伟勇,朱善元,等.非洲猪瘟病毒p54抗体胶体金试纸检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2014, 36(4):281-285.
- [31]林彦星,曹深福,张彩虹,等.非洲猪瘟病毒抗体量子点检测试纸条的研制[J].中国兽医科学,2017,47(10):1214-1220.

[责任编辑:王军利]

Research Progress of African Swine Fever Analysis Technology

ZHU Xiao-pu, WU Xu-jin

(Animal Husbandry and Veterinary Institute, Xianyang Vocational & Technical College,
Molecular Biological Diagnostic Techniques for Animal Epidemics Laboratory, Xianyang, Shaanxi, 712000)

Abstract: African Swine Fever (ASF for short) is one of the first class animal epidemics that has high infectivity and mortality as well as heavy damage on public health, having a bad impact on the healthy development of pig industry. In order to prevent and control ASF, it is first to have a quick and correct diagnosis. The paper summarizes the the diagnosis and detecting methods to provide reference ideas for the diagnosis and prevention of ASF.

Key words: African Swine Fever Virus, African Swine Fever, diagnosis, detection