

猪流行性腹泻检测方法研究进展

尹宝英

(咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 本猪流行性腹泻是由猪流行性腹泻病毒引起猪的一种高度接触性肠道传染病。该病以水样腹泻、呕吐、脱水以及哺乳仔猪高致死率为主要特征, 严重危害猪群健康。因本病与传染性胃肠炎在流行病学、临床症状和病理变化等方面很难区分, 所以快速、准确的实验室诊断技术对于该病的防控具有重要作用。本文在介绍猪流行性腹泻病毒分子特征的基础上, 对该病的病原学检测、免疫学检测及分子生物学检测方法进行系统综述。

关键词: 猪; 流行性腹泻; 检测方法

中图分类号: S856.4

文献标志码: A

文章编号: 94047-(2013)03-050-04

猪流行性腹泻病(Porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起猪的一种急性肠道传染病。该病最早发现于上世纪七十年代英格兰地区, 现今已成为严重危害亚洲地区养猪业的主要疾病之一^[1]。通常猪流行性腹泻多发于寒湿较重的秋冬季, 近年多呈地方性流行。不同年龄段的猪只对该病毒均易感, 病毒感染后对初生仔猪的危害最大, 常致其整窝发病, 死亡率接近100%。因为该病病原基因型多^[2-6], 而且与传染性胃肠炎和轮状病毒病的临床症状、流行特点和病理变化都极其相似, 所以快速、准确的实验室诊断方法对于猪流行性腹泻的监测和防控具有重要意义。本文对猪流行性腹泻病毒学鉴定、免疫学和分子生物学诊断方法等实验室研究技术进行综述, 为养猪生产中猪流行性腹泻疾病的防控提供指导参考。

1 猪流行性腹泻病毒

PEDV是冠状病毒科冠状病毒属1群a亚群的成员。该病毒在蔗糖中的浮密度为1.18 g/mL。PEDV不耐热, 在50℃条件下相对稳定, 在4℃ PH值5.0~9.0或37℃ PH值6.5~7.5条件下稳定, 但经60℃处理30 min, 即失去感染力。该病毒对乙

醚和氯仿敏感, 对外界环境和消毒药抵抗力不强, 一般消毒剂可将其灭活。到目前为止, 还没有发现本病毒有不同的血清型。从患病仔猪的病料中纯化的病毒不能凝集家兔、鼠、犬、马、雏鸡、山羊、绵羊、猪、母牛和人等12种不同动物的红细胞。

PEDV是具有囊膜的单股正链RNA病毒, 其基因组大小为28 kb。基因组中的S, N, P, M基因是主要结构蛋白基因, ORF3是结构基因间存在的一个附属基因。因S、N、M基因编码的蛋白具有高度的保守性, 并在病猪体内能持续高水平表达, 而ORF3基因负责编码区别不同冠状病毒数目和序列的辅助蛋白, 所以S、N、M、ORF3蛋白常被用来作为PEDV分子生物学诊断和基因变异检测的主要依据。

2. 病原学检测

2.1 电镜观察

电镜下该病毒粒子的核芯呈多形性, 多数中心为电子不透明区。粒子外围包裹着一层囊膜, 囊膜外放射状的花瓣状纤突短小而密集。病毒粒子的大小变化范围较大, 直径在95 nm~190 nm (包括长为18 nm~23 nm纤突)之间。PEDV粒子在肠道上皮细胞内的形态特征与其他冠状病毒相

收稿日期: 2013-03-12

项目基金: 咸阳职业技术学院科研基金项目, 项目编号2012KY02。

作者简介: 尹宝英(1979—)女, 内蒙古赤峰人, 临床兽医学博士, 讲师, 主要从事畜牧专业教学及研究工作。

同,从形态学上很难将其与猪传染性胃肠炎病毒相区别,所以电镜检测要依托免疫荧光染色等技术才能确诊。

2.2 病毒分离培养

病毒分离培养鉴定是畜禽病毒病的主要检测手段,其结果准确、可靠、灵敏、极少量病毒也可检出。常规检测主要方法是将疑似感染PEDV的病料经处理后接种Vero细胞,观察细胞病变。若接种后第二天细胞表面粗糙,颗粒增多,出现多核细胞,细胞出现空斑、脱落等特征,即可做出初步确认^[7,8]。但为使结果更为可靠,往往还需结合其他检测手段。但总体而言该方法的检测周期长,操作程序繁杂,不适用于该病的快速诊断。

3 免疫学检测

3.1 血清中和试验

血清中和实验是猪流行性腹泻病毒检测最早的方法,主要有常量法和微量法两种。因微量法的操作简便,结果易于判定,故适于大批量样品检测。我国研究者林志雄等^[9]以PK15作指示细胞,采用适应于传代细胞生长的PEDV G1株,成功建立了PED微量中和试验检测方法。但由于猪的特殊的黏膜免疫系统,血清内胃肠病原抗体的存在并不一定与防御有关,能检测出抗体只能证明机体接触传染性微生物。而且中和试验必须有对照板和做回归试验,所以该方法的鉴定结果有一定的不确定性。

3.2 免疫荧光检测

免疫荧光抗体检测具有较高的准确性和特异性,有直接免疫荧光和间接免疫荧光两种。国内学者林志雄等^[10]用适应于Vero、PK15等传代细胞株生长繁殖的PEDV-G1株成功建立直接免疫荧光法。免疫荧光试验与电镜检测和间接血凝试验进行PED检测,结果发现免疫荧光技术具有较高的敏感性。另外,直接免疫与间接免疫试验相比,前者的检验结果更为精确^[11]。虽然免疫荧光法的特异性和准确性都很高,但因所耗时间较长和易出现假阳性等问题阻碍了其在实践临床中的应用。

3.3 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

ELISA是由世界卫生组织推荐使用的检测病毒的标准方法,也是目前PEDV检测应用最为广泛的一种方法。该方法最大的优点在于可直接检测出猪粪便中抗原。近年来还发展了竞争阻断ELISA(ELISA-blocking)、斑点酶联免疫吸附试

验(Dot-ELISA)和快速ELISA等方法。传统ELISA能检测出免疫接种后7 d~13 d的PEDV抗体,但所有ELISA不适用于检测腹泻出现后的2 w~3 w恢复期的血清样品。ELISA-blocking可检出存在至少1年的PEDV抗体,而Dot-ELISA比传统琼脂扩散试验敏感,重复性更好。Ren X等^[12]以大肠埃希菌纯化的PEDV的M基因为基础制备了ELISA方法的兔多克隆抗体,该抗体能够在感染细胞中检测到PEDV,并且与猪瘟等病毒不发生交叉反应。Rodak L等^[13]利用PEDV M蛋白的单克隆抗体,建立竞争阻断ELISA方法,检测结果证实该方法敏感性高、特异性强,适于PEDV流行病学调查。Hou等^[14]利用PEDV和重组N蛋白抗原建立了检测PEDV血清的ELISA方法,为PEDV血清学检测提供手段。Oh等^[15]建立了PEDV的间接ELISA诊断方法,并与病毒血清中和试验进行对比,结果证明间接ELISA方法的敏感性和特异性都要高于血清中和试验。

4 分子生物学检测

4.1 核酸探针杂交

核酸杂交用的核酸探针用于直接检测细胞内的靶核酸序列。该技术的优点是能保持组织与细胞的完整性。该技术能检测细胞中的病毒核酸的复制与表达以及病毒的传播,并对细胞中的病毒核酸进行定位。研究者设计针对M蛋白基因的cDNA探针,成功地检测到了自然感染的猪小肠组织中的PEDV,并对其在小肠进行了定位^[16,17]。但该检测方法操作程序复杂,耗时较长,需要精湛的技术,使其在临床上的应用带来一定的困难。

4.2 聚合酶链式反应

4.2.1 反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR) RT-PCR方法已成为当前病毒诊断技术中应用最为广泛的方法之一。与传统检测手段相比,RT-PCR具有灵敏度高、特异性强、操作简便、检测时间短和适用于群体检测等优点,另外该方法还可进行细胞毒和粪便毒的检测^[18,19]。国内吴学敏^[20]根据PEDV CV777株的M基因序列建立了PEDV的RT-PCR检测方法,结果证明RT-PCR具有较好的特异性和敏感度,可检测到PEDV浓度为100 pg/ μ L的RNA。应用RT-PCR、免疫组织化学和原位杂交三种方法的比较检测了含PEDV的病料,结果发现RT-PCR方法不适合福尔马林固定组织样品外,其他与后两种一样能检测到PEDV^[16]。

4.2.2 逆转录一环介导等温核酸扩增技术(reverse transcription loop-mediated isothermal

amplification, RT-LAMP) RT-LAMP技术是一种便捷、敏感又特异的核酸扩增技术,已应用于动物胚胎性别鉴定、细菌和病毒检测。该技术的出现为猪流行性腹泻的快速诊断提供了一种新的检测手段。此方法较传统RT-PCR相比,耗时短、污染少、特异性高,就此而言非常适合于需要快速确定结果的检疫和屠宰场所。Ren X等^[22]研究证实,RT-LAMP方法检测PDEV较传统RT-PCR和EILSA更为敏感,它能够从临床样本中检测到病毒,并能将之与猪传染性胃肠炎病毒、猪轮状病毒、猪伪狂犬病病毒、猪繁殖和呼吸综合征病毒和鸡传染性支气管炎病毒区分开来。

4.2.3 巢式RT-PCR 巢式PCR是高特异性、高敏感性和高通量的一种快速诊断方法,主要用于鉴别诊断猪轮状病毒、猪传染性胃肠炎以及猪流行性腹泻。王金良等^[23]在优化RT-PCR反应条件的基础上,建立了检测PEDV的套式RT-PCR检测方法,证实该方法较普通RT-PCR更加灵敏、可靠,并能有效降低假阳性和污染,可用于PEDV的快速诊断和流行病学调查。刘孝珍等^[24]利用巢式RT-PCR对2011年分离的17个PEDV S1基因进行扩增、克隆和序列测定,并将其进行比对和遗传演化分析,结果表明全部的PEDV基因与经典野毒株相比都出现了不同程度的缺失。

4.2.4 实时荧光定量 RT-PCR (real time RT-PCR) real time RT-PCR是基于标准PCR基础上的最新发展的检测技术,该技术的出现实现了PCR从定性到定量的飞跃。该方法的灵敏度高,能检测少到10个分子。另外还可对患PED病料的病毒载量进行了定量分析,这点可用于疾病的早期诊断和定量分析PEDV感染程度的关系。国内研究者对该方法在PEDV的检测上做了大量工作。王金良等^[25]根据猪流行性腹泻病毒株FJ473395的M基因序列设计1对特异性引物建立了检测PEDV的SYBR Green I 荧光定量PCR方法,其研究为PEDV的早期诊断和定量分析病毒感染程度奠定了基础。刘邓等^[26]根据TaqMan 探针荧光定量分析原理,根据PEDV-N 基因设计荧光探针建立的方法,以质粒作为模板时,在40个循环内即可检测到10 copies/ μ L的质粒DNA。比Kim O建立的常规RT-PCR方法敏感性至少提高了10倍。2012年修金生等^[27]建立了基于SYBR 野毒株和弱毒疫苗株(CV777)和弱毒疫苗

株高度保守ORF3基因核苷酸序列的两套实时荧光定量RT-PCR,结果证实该方法可对免疫猪群PEDV野毒感染和疫苗免疫做出快速准确的鉴别诊断,尤其是对PEDV弱毒疫苗免疫后仍暴发PEDV野毒感染的研究更有临床意义。

5 展望

猪流行性腹泻病毒的免疫学检测大多都存在耗时长、敏感性低和特异性差等缺点。而分子生物学诊断技术能够精确的对细胞毒和粪便毒进行检测,具有很高的敏感性和特异性。相信随着分子生物学技术的不断发展,猪流行性腹泻病及病毒的更多特征将逐渐被揭示,更多更简便、快速、灵敏的病毒检测方法将应用于兽医临床,这些诊断方法无意将更快推动猪流行性腹泻病的防控。

参 考 文 献

- [1] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J].Virus Genes,2012,44:167-175.
- [2] Yang X, Huo J Y, Chen L, et al. Genetic variation analysis of reemerging porcine epidemic diarrhea virus prevailing in central China from 2010 to 2011[J]. Virus Genes,2013,46(2):337-344.
- [3] Li W, Li H, Liu Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China,2011[J].Emerg Infect Dis, 2012,18(8):1350-1353.
- [4] 刘孝珍,陈建飞,时洪艳等.2011年猪流行性腹泻病毒的遗传变异分析[J].中国预防兽医学报,2012,34(3):180-183
- [5] Chen J, Liu X, Lang H,et al. Genetic variation of nucleocapsid genes of porcine epidemic diarrhea virus field strains in China[J].Arch Virol. 2013,158(6):1397-1401.
- [6] Li W, Li H, Liu Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China,2011[J].Emerg Infect Dis,2012,18(8):1350-1353. [7]洪声安.猪流行性腹泻病病毒的分离鉴定[J].中国动物保健,2012,14(5):20-21.
- [8] 何玲,唐满华,陈瑞爱,等.猪流行性腹泻病毒 ShT 株的分离鉴定及传代培养[C]. 2012第四届中国兽药大会论文集.2012,752-754.
- [9] 林志雄,李树根,李力复,等.猪流行性腹泻微量血清中和试验的建立和应用[J].中国兽医科

- 技,1994,24(11):3-4.
- [10] 林志雄,黄引贤,李树根,等.应用直接免疫荧光法检测猪流行性腹泻病毒的研究[J].中国进出口动植物检验检疫,1997,2:32-34.
- [11] 崔现兰,马思奇,王明,等.应用免疫荧光法诊断猪流行性腹泻的研究[J].中国畜禽传染,1990, 5:20-24.
- [12] Ren X, Suo S, Jang Y S. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection[J]. Biotechnol Lett, 2011, 33(2):215-220.
- [13] Rodak L, Valicek L, Smid B, et al. An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhea virus detection in faeces[J]. Vet Microbiol, 2005, 105(1):9-17.
- [14] Hou X L, Yu L Y, Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies[J]. Vet Microbiol, 2007, 123:86-92.
- [15] Oh J S, Song D S, Yang J S, et al. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection[J]. J Vet Sci, 2005, 6(4):349-352.
- [16] Kim O, Chae C. Comparison of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Immunohistochemistry and in situ Hybridization for the Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Pigs [J]. Can J Vet Res, 2002, 66(2):112-116.
- [17] Jung K, Chae C. RT-PCR-based dot blot hybridization for the detection and differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples using a non-radioactive digoxigenin cDNA probe[J]. J Virol Methods, 2005, 123(2):141-146.
- [18] Sozzi E, Luppi A, Lelli D, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for the detection of porcine Epidemic diarrhoea virus[J]. Res Vet Sci, 2010, 88(1):166-168. [19] Song D S, Kang B K, Oh J S, et al. Multiplex reverse transcription -PCR for rapid differential detection of Porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus[J]. J Vet Diagn Invest, 2006, 18:278-281.
- [20] 吴学敏,陈如敬,王隆柏,等.猪流行性腹泻病毒RT-PCR检测方法建立及初步应用研究[J].中国农学通报, 2012, 28(26):59-62.
- [21] 刘邓.猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻快速诊断方法的建立及S基因的表达[D].新疆农业大学, 2009.
- [22] Ren X, Li P. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus[J]. Virus Genes, 2011, 42(2):229-235.
- [23] 王金良,谢金文,唐娜,等.应用逆转录套式PCR检测猪流行性腹泻病毒[J].中国畜牧兽医, 2012, 39(9):86-88.
- [24] 刘孝珍,陈建飞,时洪艳,等.2011年猪流行性腹泻病毒的遗传变异分析[J].中国预防兽医学报, 2012, 34(3):180-183.
- [25] 王金良,郭显坡,魏凤,等. SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测猪流行性腹泻病毒方法的建立及应用[J].中国兽医学报, 2010, 30(10):1286-1290.
- [26] 刘邓,袁秀芳,冉多良,等. TaqMan 荧光定量PCR检测猪流行性腹泻病毒方法的建立与初步应用[J].中国动物传染病学报, 2010, 18(1):28-34.
- [27] 修金生,陈小权,王斌等.基于SYBR I 实时荧光定量PCR对猪流行性腹泻病毒野毒和疫苗弱毒鉴别诊断方法的建立[J].中国动物传染病学报, 2012, 20(5):16-21.

(责任编辑、校对:王军利)

Progress on Detection Methods for Porcine Epidemic Diarrhea

YIN Bao-ying

(Animal husbandry and Veterinary Research Institute, Xian Yang Vocational Technical College, Xian Yang, 712046, China)

Abstract: The porcine epidemic diarrhea caused by the porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV), is a highly contagious enteric disease of swine. The characters of PED re acute watery diarrhea, vomit, dehydration and the high death in piglet, which brings serious harm to pig raising. Because the epidemiology, clinical symptoms and pathological changes of PEDV are similar to those of others viral diarrheas, so rapid and accurate laboratory technologies play an important role in the diagnosis of PED. Based on the introduction of molecular characteristics of PEDV, this article reviewed virus identification, immunology and molecular biology method of PEDV.

Key words: pig; porcine epidemic diarrhea; detection method