

猪瘟疫病毒 4 种检测方法的比较^{*}

张朝红,张彦明,张永国,郭抗抗,魏中锋,孙 裴

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 应用病毒分离鉴定、荧光抗体法、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和夹心 ELISA 4 种方法,分别对 23 份猪瘟疫病组织中的猪瘟疫病毒(CSFV)进行了检测,并比较 4 种检测方法的优缺点。结果显示,病毒分离鉴定法准确性较高,诊断比较容易,但存在试验步骤繁琐,所需时间长的缺点;荧光抗体检测法所需时间较短,但需要经验比较丰富人员来判定结果,且存在假阳性结果,特异性比较差;RT-PCR 检测法具有快速、敏感等优点,特别是样品保存不理想时更有价值,利用套式 PCR(nested-PCR)可以提高检测的特异性;夹心 ELISA 检测法具有快速、敏感等优点,但在样品保存不理想时会出现假阴性结果。

[关键词] 猪瘟疫;病毒分离鉴定;荧光抗体;反转录-聚合酶链式反应;ELISA

[中图分类号] S813.3;S852.65⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0024-05

Comparisons of four methods for detection of classical swine fever virus

ZHANG Chao-hong, ZHANG Yan-ming, ZHANG Yong-guo,
GUO Kang-kang, WEI Zhong-feng, SUN Pei

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: Four methods including the virus isolation and identification, fluorescent antibody, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Sandwich ELISA were used to detect classical swine fever (CSFV) in 23 samples and were compared thereafter. The results showed that the virus isolation and identification could generate considerably reliable results but the procedure was complicated and costed long time; microtomy fluorescent antibody detection was fast, but the specificity was low and needed to exclude the false positive from the results. Sandwich ELISA detection combined the merits of the former two methods, but it generated the false negative results when the samples were in bad preservation. Compared with the others, RT-PCR was fast, high sensitive and especially useful for detecting the CSFV directly from the samples. The specificity could be raised by using the nested-PCR to detect the CSFV from the samples, especially when the samples were in bad preservation.

Key words: classical swine fever; virus isolation and identification; fluorescent antibody; RT-PCR; ELISA

猪瘟疫(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的严重

威胁养猪业、具有重要经济意义的病毒性疾病,被世界动物卫生组织(OIE)列为 A 类动物疫病,我国也

^{*} [收稿日期] 2006-10-31

[基金项目] 陕西省重大科技攻关项目(2006kz07-G2)

[作者简介] 张朝红(1973-),男,甘肃天水人,在读硕士,主要从事分子病原学与免疫学研究。

[通讯作者] 张彦明(1956-),男,陕西南郑人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail: ylzhangym@sohu.com

将其列为一类动物疾病,是我国重点防控的重要动物疫病^[1]。在猪瘟的诊断方面,由于猪瘟疫病毒不同毒株的毒力不同,患病猪的临床症状和死后剖检的病理变化差别很大,一般仅据临床症状和病理变化很难对猪瘟作出确诊^[2]。建立有效、准确的 CSFV 实验室检测方法,对 CSF 的预防和控制有重要意义。目前 CSFV 的检测方法主要有以下 4 种:(1)病毒的分离鉴定。将病料中的病毒在细胞上的增殖后,直接通过荧光抗体法对细胞培养物上的病毒进行检测^[3];(2)荧光抗体法。利用 CSFV 特异性的荧光抗体来检测组织器官中的 CSFV^[4];(3)酶联免疫吸附试验(ELISA)^[5]。检测组织和血液中的猪瘟疫病毒粒子;(4)反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)^[6]。用来检测病料中的病毒核酸。以上 4 种检测方法各有优缺点。为了评价和筛选有效的 CSF 诊断方法,本试验以 CSF 阳性、阴性病料以及 21 份疑似 CSF 病料为试验材料,用上述 4 种诊断方法对其进行了检测,比较了各种方法的优缺点,以期寻找到检测 CSFV 的最佳方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料和细胞 猪瘟疫病毒阴性病料、阳性病料及临床上疑似猪瘟的病料(脾脏、淋巴结和扁桃体),共 23 份,由西北农林科技大学动物科技学院动物疫病防治与畜产品安全工作室采集并保存。PK-15 细胞由西北农林科技大学动物科技学院动物疫病防治与畜产品安全工作室提供。

1.1.2 试剂 胎牛血清,购自杭州四季青公司;TRIZOL 试剂盒,购自 Invitrogen 公司;反转录酶(AMV)、反转录试剂和 PCR 试剂均购自大连宝生物工程有限公司;FITC 猪瘟疫病毒荧光抗体,由西北农林科技大学动物科技学院动物疫病防治与畜产品安全工作室制备;夹心 ELISA 猪瘟疫病毒抗原检测试剂盒 Classical Swine Fever Virus Antigen Test Kit 购自 IDEXX 公司;MEM 为 Invitrogen 公司产品。

1.1.3 仪器设备 3K-18 高速台式冷冻离心机和高速微量离心机均为 Sigma 公司产品;PCR 仪为 MJ 公司产品;紫外凝胶成像系统为 Syngene 公司产品;荧光倒置显微镜为尼康公司产品;酶标仪为美国伯乐公司产品。

1.2 CSFV 的分离鉴定

PK-15 细胞按常规方法进行培养,细胞培养液为 MEM 培养基(含体积分数 10%无牛病毒性腹污

病毒抗体的胎牛血清)。

取病猪脾脏一小块,充分剪碎后置乳钵中研磨,随后加入 5 倍体积的 PBS 制成乳液,移入离心管中,12 000 r/min 4 °C 离心 10 min,取上清,过 0.22 μm 滤膜除菌后得到病料无菌浸出液。向培养 PK-15 细胞的培养皿内放入盖玻片,待细胞形成单层后接入病料无菌浸出液,37 °C 吸附 1 h,吸除多余的液体,Hanks 液洗涤后,加入维持液(含体积分数 2%无牛病毒性腹污病毒抗体的胎牛血清)培养 24~72 h。取出盖玻片,进行荧光抗体染色,待检玻片用 PBS 冲洗,丙酮固定 15 min,自然干燥,加 FITC 标记的抗 CSFV 多抗,37 °C 温育 1 h,用 PBS 冲洗,封片液封片,在荧光倒置显微镜下观察,如细胞内有亮绿色荧光斑,判为阳性,细胞内无亮绿色荧光斑,判为阴性。同时设正常 PK-15 细胞为阴性对照

1.3 CSFV 的荧光抗体检测

将无菌采取的疑似 CSF 病猪的淋巴结、扁桃体、脾脏用消毒的剪刀剪取一小块,在洁净无划痕的载玻片上触压,室温自然干燥。丙酮固定 3~5 min,用 pH 7.2 PBS 轻轻漂洗,自然干燥。加 FITC 标记的抗 CSFV 多抗,37 °C 温育 1 h,PBS 冲洗,封片液封片。荧光显微镜下观察,如见细胞浆内有亮绿色荧光斑,判为阳性,如胞浆内有青灰色或橙色光斑则判为阴性。

1.4 CSFV 的 RT-PCR 检测

1.4.1 引物设计及合成 参照 CSFV Alfort 株、Brescia 株和 C 株序列,设计 2 对引物:

E1 5'-TGATTTAGACCA GACTGG-3',

E2 5'-CGGCTA GCCTGTAA GGAA GA-3';

P1 5'-CTGCCAACCGCCGTCTA TCTT-3',

P2 5'-TGGTCGCCGCTCAACAA GACA-3'。

引物由宝生物(大连)工程有限公司合成。

1.4.2 CSFV RNA 的提取 参照试剂盒说明书进行操作。

1.4.3 CSFV RNA 的 RT-PCR^[7] RT 反应体系为 20 μL,其中总 RNA 提取液 11 μL,P1 引物(50 pmol/L) 1 μL,混匀后 65 °C 热育 10 min,立即冰浴 5 min,加入 5 × RT buffer 4 μL,dNTP (25 mmol/μL) 2 μL,RNasin(20 U/μL) 1 μL,AMV(10 U/μL) 1 μL。反应条件为:先 42 °C 作用 1 h,然后煮沸 5 min,置 -20 °C 保存备用。

PCR 和 nPCR:PCR 反应体系为 50 μL,其中反转录 cDNA 液 5 μL,10 × PCR 缓冲液 5 μL,MgCl₂ (25 mmol/μL) 4 μL,dNTP(25 mmol/μL) 3 μL,

E1(50 pmol/ μ L) 1 μ L ,P1(50 pmol/ μ L) 1 μ L ,*Taq* DNA polymerase (5 U/ mL) 0.5 μ L ,补加 ddH₂O 至 50 μ L 。反应条件为:98 $^{\circ}$ C 预变性 8 min;98 $^{\circ}$ C 50 s,48 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 120 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

将上述 PCR 产物稀释 50 倍做模板,再以 E2 和 P2 为配对引物进行 nPCR。反应条件为:98 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 100 s,35 个循环;最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。其余条件及步骤均同一扩。

取 PCR 和 nPCR 产物 5 μ L 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,然后用凝胶成像系统分析结果。

1.5 CSFV 的夹心 ELISA 检测

取 CSFV 阳性、阴性和疑似病料(脾脏)3 g,剪碎研磨后加 500 μ L 样品稀释液,充分涡旋混匀,室温放置 1 h,期间定期涡旋数次,于 - 20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。用前再次以 1 500 r/min 离心 10 min,取上清用于 CSFV 的检测。检测步骤如下:加 25 μ L 猪瘟特异单抗于每孔(已用 CSFV 包被,每个样品用一孔)中,加 75 μ L 阳性对照、阴性对照和疑似病料的

处理上清液于对应孔中,室温(18~25 $^{\circ}$ C)孵育过夜后倒掉板内样品,用洗涤液清洗 5 次。加 100 μ L 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 于各孔中,室温孵育 1 h。用洗涤液清洗后加 100 μ L 底物溶液于各孔中,避光,室温孵育 10 min。每孔中加 100 μ L 终止液终止反应,于 450 nm 波长处测定待检样品和对照样品的 OD₄₅₀ 值。

2 结果与分析

2.1 CSFV 分离鉴定结果

与正常 PK-15 细胞相比,接种 CSFV 的 PK-15 细胞形态未发生明显的变化;免疫荧光试验结果(图 1)表明,病毒主要分布在细胞质中,某些阳性细胞核周围的区域荧光更强,细胞核清晰可见。其中阳性对照,1,3,5,8,11,12,15,16,19 和 21 号病料接种 PK-15 细胞后,细胞有亮绿色荧光斑,判为猪瘟阳性;而 2,4,6,7,9,10,13,14,17,18,20,22 号和 23 号病料接种 PK-15 细胞后,细胞未见亮绿色荧光斑,判为猪瘟阴性。

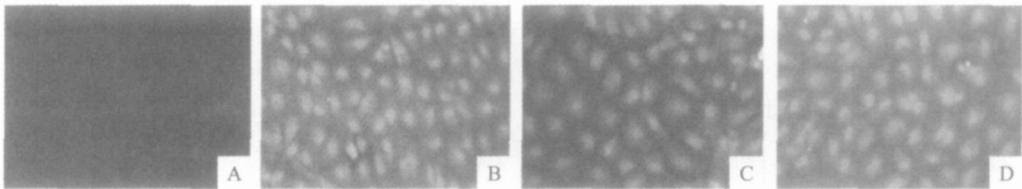


图 1 接种猪瘟病料后 PK-15 细胞免疫荧光检测照片(部分结果)
A. 阴性对照(未接种);B. 阳性对照(石门株);C. 接种 3 号病料;D. 接种 16 号病料

Fig. 1 Detection of PK-15 cells inoculated with the samples by IFA

A. Negative reference;B. Positive reference;C. Inoculation sample 3;D. Inoculation sample 16

2.2 CSFV 荧光抗体检测结果

荧光抗体检测结果(图 2)显示,阳性对照细胞胞浆呈黄绿色或翠绿色;阴性对照细胞没有黄绿色荧光出现,胞浆呈黄色或橙红色,或者荧光极弱;1,

3,8,11,12,16 和 21 号病料有黄绿色荧光,判为阳性;5,13,15,20 和 19 号病料荧光很弱,判为可疑;2,4,6,7,9,10,14,17,18,22 和 23 号病料未见黄绿色荧光,判为阴性。

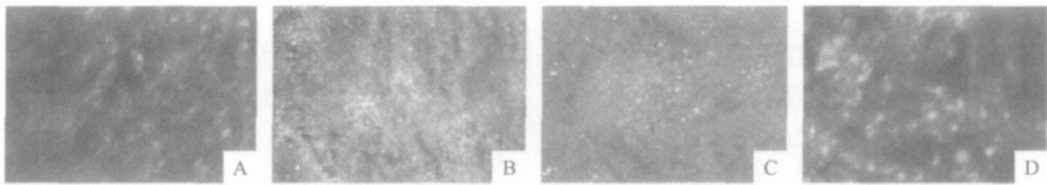


图 2 猪瘟病料组织免疫荧光检测照片(部分结果)

A. 阴性对照(未接种);B. 阳性对照(石门株);C. 3 号病料;D. 16 号病料

Fig. 2 Detection of tissues section by IFA

A. Negative reference;B. Positive reference;C. Sample 3;D. Sample 16

2.3 CSFV RT-PCR 检测结果

由图 3 可以看出,1,3,5,8,11,12,15,16,19 和

21 号病料扩增出长度约为 1 200 bp 的基因片段,与预期的 E2 基因片段长度相符,判为猪瘟阳性;2,4,

6,7,9,10,13,14,17,18,20,22 和 23 号病料未见扩 增片段,判为阴性。

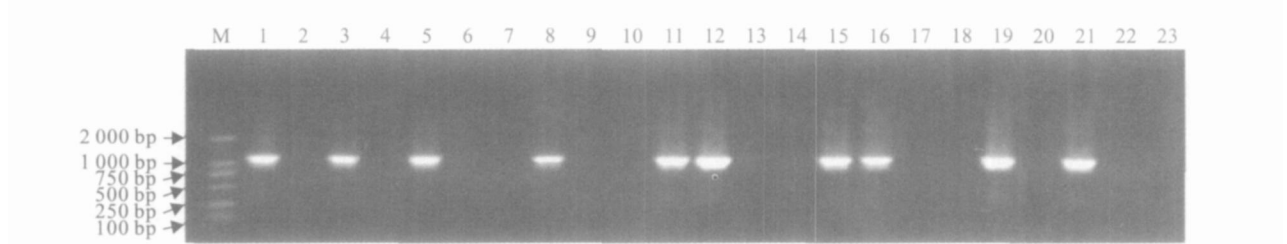


图 3 猪瘟病料的 RT-PCR 检测结果
M. DNA 标准 DL2 000; 1~23. 病料

Fig. 1 Detection of CSF samples by RT-PCR
M. DNA marker DL 2000; 1 - 23. Samples

2.4 CSFV 夹心 ELISA 检测结果

为确保分析的可靠性,阳性对照的 OD₄₅₀ 值应大于 0.500,阴性对照的 OD₄₅₀ 值不能大于阳性对照 OD₄₅₀ 值的 20%,测定的校正 OD₄₅₀ 值大于 0.300 判定为阳性。由表 1 可知,1,3,5,8,12,15,16,19 和

21 号病料为猪瘟阳性;而 2,4,6,7,9,10,11,13,14,17,18,20,22 和 23 号病料为猪瘟阴性。其中 11 号病料的检测结果与上述其他方法检测结果不符,可能是因为 11 号病料保存不当,故检测结果呈阴性。

表 1 猪瘟病料夹心 ELISA 检测结果

Table 1 Detection results of CSF by sandwich ELISA

序号 Code	OD ₄₅₀ 值 OD ₄₅₀ values	校正 OD ₄₅₀ 值 Correction OD ₄₅₀ values	判定结果 Judgement	序号 Code	OD ₄₅₀ 值 OD ₄₅₀ values	校正 OD 值 Correction OD ₄₅₀ values	判定结果 Judgement
1	1.321	1.148	+	13	0.212	0.039	-
2	0.173	0.000	-	14	0.197	0.024	-
3	1.214	1.041	+	15	1.105	0.932	+
4	0.175	0.002	-	16	1.035	0.962	+
5	1.189	1.016	+	17	0.241	0.068	-
6	0.180	0.007	-	18	0.256	0.083	-
7	0.186	0.013	-	19	1.263	1.090	+
8	1.112	0.939	+	20	0.241	0.068	-
9	0.185	0.012	-	21	0.954	0.781	+
10	0.194	0.021	-	22	0.212	0.039	-
11	0.240	0.067	-	23	0.237	0.064	-
12	1.060	0.887	+				

3 讨 论

在进行 CSFV 分离鉴定时,由于 CSFV 在体外培养细胞中增殖滴度较低,且不引起致细胞病变效应,因而无法从细胞形态的改变上判定 CSFV 感染与否,必须通过免疫荧光试验进行判断。CSFV 分离鉴定所需的时间较长,一般在 16 h 以上,并且对实验室细胞培养要求较高、步骤比较繁琐,但结果易于判定、准确性比较高、不仅适用于急性猪瘟的早期诊断,也适用于慢性猪瘟的诊断和扁桃体发生化脓的急性猪瘟的诊断,是目前猪瘟特异诊断的方法之一。

CSFV 荧光抗体检测法主要用于检测病料组织中的 CSFV,具有检测时间较短(约 2 h)、结果直观

等优点,是实验室检测 CSFV 的常用方法之一。但该检测方法也有一些不足,如在结果判定时要求检测者要有一定经验,才能作出准确的判定;特异性较差,容易出现假阳性结果;触片的厚薄、漂洗的时间与力度均会影响结果。用该法检测时,一般最急性型、急性型猪瘟的判定较易,而慢性猪瘟或阴性猪瘟的判定较难,若病料保存不好则不能采用此法。

RT-PCR 法检测病料中的 CSFV 时,由于 CSFV 在组织材料中含量一般很低,如果将逆转录产物 cDNA 第一链直接用于 PCR 扩增,则很难获得目的片段,故在检测中采用 nested-PCR 法进行二次扩增,这样既能解决由于病毒含量低影响检测结果的问题,又可增强 PCR 的特异性,避免非特异性条带的干扰,提高检测的灵敏度。实践表明,RT-PCR 检

测法具有检出率高、准确性好的优点,检测时间也较短(一般可在拿到病料后 4~6 h 得出结果)。并且用该法扩增出的 *E2* 基因目的片段,可以作为研究 CSFV 分子流行病学的基础材料,通过测定不同病料中 *E2* 基因的变异,来了解和推断 CSFV 变异流行趋势和分子进化特点^[8-9],对了解猪瘟疫病毒流行特点和流行趋势具有重要意义。

夹心 ELISA 法具有快速、敏感等优点,受人为因素的影响小。用此法检测病料中的 CSFV 时结果较为准确,是病料保存较好时检测 CSFV 的一种简便方法。该法可以用于大量样品的检测,对猪瘟的净化有重要作用。但该检测方法对样品的要求较高,最好是新鲜的病料,如果病料保存不当时,就会检测不到病毒。

本试验利用 4 种不同的方法检测相同病料中的 CSFV,结果表明 CSFV 分离鉴定和 RT-PCR 检测结果一致;而荧光抗体法检测结果很不理想,存在大量无法判定的结果;夹心 ELISA 法除了一份病料因保存不当造成假阴性结果外,其余病料的检测结果均与病毒分离鉴定结果一致。所以作者建议,在有条件的实验室可采用 RT-PCR 进行 CSFV 检测,该法操作起来要比病毒分离鉴定方便许多,且不受细胞培养的限制,可应付突然的大量的样品检测;在对新鲜病料中的 CSFV 进行检测时,可以选用夹心 ELISA 法,该法操作更简便,易在基层推广,可作为

猪瘟普查时的首选方法。

[参考文献]

- [1] 谢庆阁,翟中和. 畜禽重大疫病免疫研究进展[M]. 北京:中国农业出版社,1996:321-338.
- [2] 孟晓芹,郑明. 国内猪瘟研究概况[J]. 中国兽药杂志,1995,29(3):56-58.
- [3] Lorena J, Barlic-Maganja D, Lojkic M, et al. Classical swine fever virus (C strain) distribution in organ samples of inoculated piglets[J]. Vet Microbiol, 2001, 81(1):1-8.
- [4] 邵振华,田海燕. 多价荧光抗体监测外源病毒污染的研究[J]. 中国兽药杂志,1997,31(2):1-6.
- [5] Clavijo A, Zhou E M, Vydellingum S, et al. Development and evaluation of a novel antigen capture assay for the detection of classical swine fever virus antigens[J]. Vet Microbiol, 1998, 60(2-4):155-168.
- [6] Semenikhin VI, Puzyrev A T, Oreshkova S F, et al. Detection of the hog cholera virus using the polymerase chain reaction[J]. Mol Gen Mikrobiol Virusol, 1999, 1:27-30.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京:科学出版社,1999.
- [8] 韩雪清,李红卫,刘湘涛,等. 中国猪瘟疫兔化弱毒(HCLV)兔脾组织毒部分基因的序列分析-gp55、p54、p80 等基因测序方法的研究和 p54 基因的序列分析[J]. 中国兽医科技,1998,28(6):13-17.
- [9] Canal CW, Hotzel I, Almeida L, et al. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. Vet Microbiol, 1996, 48(3-4):373-379.