

非洲猪瘟诊断技术研究进展

刘 贺

(抚顺市现代农业及扶贫开发促进中心, 辽宁抚顺 113006)

摘 要:非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒引起的家猪和野猪的传染病,能引起所有品种和年龄猪的一系列综合征。论文从非洲猪瘟临床症状与病理变化、样品采集和实验室诊断等方面对非洲猪瘟诊断技术进行简述,重点介绍了血细胞吸附试验、荧光抗体试验、酶联免疫吸附试验、聚合酶链反应、荧光定量 PCR、环介导等温扩增等非洲猪瘟诊断技术的最新研究进展,以期对非洲猪瘟综合防控提供借鉴和参考。

关键词:非洲猪瘟;临床症状;病理变化;诊断技术

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.20180925.001

中图分类号:S852.659.1;S858.28

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2019)07-0108-03

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒科的唯一成员非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的家猪和野猪高热、网状内皮系统出血和高致性为特征的传染病^[1-2]。ASFV是可在钝缘蜱中增殖的一种双股线状DNA虫媒病毒,兼有虹彩病毒和痘病毒的某些特性,存在1个血清型、22个基因型。ASF流行广泛,时空分布较广,2007年—2017年暴发疫情的有捷克、波兰、乌克兰、格鲁吉亚、亚美尼亚、俄罗斯、阿塞拜疆、白俄罗斯、立陶宛、拉脱维亚、爱沙尼亚、摩尔多瓦、罗马尼亚、科特迪瓦、南非、马里、布隆迪等。研究表明,发生在高加索和俄罗斯的ASF疫情具有较高的流行强度,其流行病趋势是长期且不利的^[3]。2017年3月31日,俄罗斯远东地区伊尔库茨克州暴发的ASF疫情是离我国最近的一起疫情^[4],也给国内ASF防控带来巨大的风险和压力。2018年8月3日,辽宁沈阳ASF疫情被国家参考实验室确诊^[5],预示着ASF这一外来疫病已经进入国门,其防控策略需要相应调整。ASF的消除和净化工作已经被提到日程,ASF诊断技术研究与应用对我国ASF的防控和根除显得尤为重要。

1 ASF 的诊断

1.1 ASF 临床症状和病理变化

ASF的临床症状广泛,从最急性、亚急性、慢性到隐性带毒。强毒株可导致高热、食欲废绝、内在和皮肤出血,病死率可达100%;弱毒株感染的猪临床症状均为温和性经过,多见于地区流行,并且呈散发性,出现呼吸困难、流鼻涕、咳嗽、呼吸道症状、皮肤

淤血等临床症状,这种情况易与猪的其他疫病混淆。急性病例出现全身各脏器严重出血,以淋巴结尤为明显。脾脏淤血、出血、极度肿大、易碎,切面可见粥样物流出;心包积液及心包肌层有出血点;肾脂肪囊及肾表面布满出血点,肾盂及肾乳头有出血斑;膀胱有时可见潮红和出血点;肺脏充血、出血、水肿;肝脏肿大、淤血、出血;胆囊壁水肿,肠胃均有出血。慢性病例极度消瘦,心包脏层附有纤维素,有出血点,心肺粘连,偶见肺部肉芽肿病变。

1.2 ASF 排查和样品采集

当出现古典猪瘟免疫失败,或不明原因大范围生猪死亡时就要优先排除ASF感染的可能,在排查工作开始时不能忽略ASF亚急性和慢性临床类型的存在,因此对死亡猪剖检是不可或缺的,必要时做好检测样品采集工作。重点采集病死猪的脾、淋巴结、扁桃体、肺脏、肝脏、肾脏等组织样品,活体动物采集抗凝血、棉拭子、粪便,捕捉的蜱虫要干燥保存。合格的样品采集和正确的保存对于ASF实验室诊断尤为重要,同时在采集样品后要严格按照《高致病性动物病原微生物菌(毒)种或者样品运输包装规范》(农业部第503号文)进行包装处理。

1.3 ASFV 的实验室检测

ASFV的实验室检测方法分为病原鉴定和血清学试验。具体的诊断方法包括红细胞吸附试验(hemadsorption, HAD)、荧光抗体试验(fluorescent antibody test, FAT)、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、实时荧光定量

收稿日期:2018-08-10

作者简介:刘贺(1981—),男,辽宁辽阳人,高级兽医师,硕士,主要从事动物疫病防控工作。

PCR(real-time PCR)、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)等^[6]。

1.3.1 红细胞吸附试验 HAD是ASF的确诊方法,通过用猪的血液或组织悬液接种原代白细胞培养物或制备感染猪血液白细胞培养物完成相应检测,镜检出现红细胞吸附在感染细胞的表面,呈现玫瑰花环或桑葚状现象,可判定为阳性。ASFV的红细胞吸附可被特异性抗体阻断,红细胞吸附抑制(chemadsorption inhibition,HADI)用来滴定抗体效价或鉴别ASFV不同毒株的抗原性差异。HAD需要观察的时间取决于病料中病毒的含量,通常需要3d~10d,因此目前逐步被PCR所代替。

1.3.2 荧光抗体试验 FAT能检测可疑猪的组织或HAD阴性的白细胞培养物中的ASFV抗原。组织切片或压印涂片或者白细胞培养物涂片,室温风干并用丙酮固定10min,适宜浓度的异硫氰酸荧光素标记的抗ASFV抗体染色(37℃湿盒中着染1h),磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)冲洗,PBS/甘油封固,使用带有适当栏栅和激发滤片的紫外光显微镜检查。如果巨噬细胞内有特异的胞浆荧光,该组织或培养物为ASFV阳性。FAT可以区分由ASFV和其他病毒或细胞毒性引起的接种物细胞病变效应(cytopathic effect,CPE),但因其对检测人员和仪器设备要求较高,目前常作为检测ASFV的辅助方法。

1.3.3 酶联免疫吸附试验 ELISA是一种能够直接检测较低或中等毒力ASFV感染猪抗体的试验,是国际贸易指定的诊断方法之一。阻断ELISA通过包被的ASFV蛋白与ASFV特异性抗体反应,氧化物酶标记物竞争反应,底物显色实现抗体检测。阳性样本检测孔呈色浅,OD值低,并存在阻断率越大其抗体效价越高的对应关系;间接ELISA是通过包被蛋白与样品中抗体反应、酶标抗体结合和底物显色来确定其ASFV抗体是否为阳性。梁云浩等^[7]以p54重组蛋白建立的间接ELISA检测灵敏度可达1:320,批内、批间变异系数均小于10%。目前以VP73蛋白、VP72蛋白、p54蛋白包被的各类商品化ELISA试剂盒被广泛应用,抗体检测试剂盒有ASF阻断ELISA抗体检测试剂盒(Ingenasa,西班牙)、ASF间接ELISA抗体检测试剂盒(ID-vet,法国),抗原检测试剂盒有ELISA INGEZIM K3抗原检测试剂盒(Ingenasa,西班牙)。ELISA INGEZIM K3抗原检测试剂盒的敏感性和特异性数据报告不多,但是已完成的相关检测表明其具有特异性,对于无力购买PCR仪等相关设备进行PCR检测,但具

备ELISA检测技术能力的实验室是不错的选择。因为急性型的大多数病例体内各组织中均存在较高水平的ASFV,来自高发病率、高病死率的畜群的样品采用抗原ELISA检测方法更容易检测出阳性。值得关注的是对于亚急性和慢性病例的脂肪样品的抗原ELISA敏感性显著降低,这很可能是由于感染猪组织中的抗原-抗体复合物阻断了ASFV抗原与标记ASFV免疫球蛋白的交互作用。因此,建议把抗原ELISA作为畜群感染诊断方法时,要结合其他病毒学检测方法。

1.3.4 聚合酶链反应 PCR快速、敏感、特异性强,已经广泛用于ASFV检测,可以检测和区分各种分离株,适用于非疫区国家的疫情监测和产品入关检疫。杨吉飞等^[8]基于非洲猪瘟病毒VP72基因建立了非洲猪瘟病毒检测的PCR方法,检测欧盟非洲猪瘟参考实验室提供的ASFV17个分离株的基因组为阳性。曾少灵等^[9]从VP73基因序列中挑选设计了1对特异性检测引物,建立的检测ASFV的PCR比世界动物卫生组织(OIE)推荐使用的2组引物方法的灵敏度高出100倍和1000倍,而特异性相当。胡凌等^[10]建立了可以同时检测猪瘟病毒(Classical swine fever virus,CSFV)、ASFV、猪伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus,PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)和高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(HP-PRRSV)的多重PCR,具有对单一或混合感染的临床样本进行快速鉴别检测的优势。Zsak L等^[11]描述了一种基于VP72的替代实时探针PCR检测方法,该法是在含有干燥的PCR试剂的单管内进行,使用便携式检测仪器可以获得实时检测结果,简化了PCR前后操作程序,检测结果表明该方法特异、敏感,其敏感度达到1.4拷贝~8.4拷贝病毒基因组等同物。

1.3.5 实时荧光定量PCR 实时荧光定量PCR与PCR相比,其敏感性比常规PCR要高^[12],并且降低了因电泳产物分析带来的污染和溴化乙锭(ethidium bromide,EB)的危害。曾少灵等^[13]建立的ASFV实时荧光定量PCR检测方法,最低检测限可达10拷贝/ μ L病毒DNA,灵敏度高出普通PCR10倍,具有重复性好和稳定性好的特点。李维彬等^[14]对构建的实时荧光定量PCR进行了稳定性、特异性、灵敏性试验,开展了送检猪肉样品的检测,结果表明该法敏感、特异、可靠。王华清等^[5]对2头疑似ASF病死猪的全血、肾脏、脾脏、淋巴结的8份样品进行实时荧光定量PCR检测,均检测到ASFV特异

性扩增曲线,CT值为19.14~26.5,表明荧光定量PCR可以作为ASF的诊断与分子流行病学调查的技术手段。

1.3.6 环介导等温扩增技术 Heather E等^[15]以ASFV异构酶II型基因为靶点构建的LAMP检测方法,其灵敏度不低于330个基因拷贝数,并能够区分ASFV和CSFV,该团队采用LAMP与实时荧光定量PCR对感染ASFV(马拉维株)样品比对试验结果一致。杨吉飞等^[16]建立的LAMP能够成功检测欧盟非洲猪瘟参考实验室提供的ASFV 17个毒株的基因组,而野外收集的猪和蜚的基因组检测均为阴性,结果表明该法可以用于ASF的快速诊断。在ASF多国流行的背景下,因LAMP具有实用、简便、廉价等特点,该检测方法对ASF快速诊断意义重大,具有广泛的应用前景。

2 小结

ASF一直是我国重点防范的外来疫病,因该病跳跃式的进入辽宁中部地区,该病的全国防控压力会异常严峻,这就需要政府各部门密切协作,做好联防联控,在内防外堵基础上做好防控监测工作,同时还需要加强宣传培训,提高国民防控意识,消除忧患恐惧心理,做好基层技术人员和实验室检验人员培训。各级动物疫病防控实验室要根据自身的人员情况、仪器设备和试验条件选择合适的检测方法开展培训,做好ASF防控和实验室诊断的技术储备,为我国ASF的综合防控和监测做好技术支持。

参考文献:

- [1] 郑明球,蔡宝祥,姜平. 动物传染病诊治彩色图谱[M]. 2版. 北京:中国农业出版社,2010:13-17.
- [2] 田克恭,李明. 动物疫病诊断技术-理论与应用[M]. 北京:中国农业出版社,2014:570-575.
- [3] Penrith M L, Guberti V, Depner K, et al. Preparation of African

swine fever contingency plans[R]. Yerevan: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011: 77.

- [4] Kolbasov D, Titov I, Tsybanov S, et al. African swine fever, Siberia, Russia, 2017[J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24(4): 796-798.
- [5] 王清华,任炜杰,包静月,等. 我国首例非洲猪瘟的确诊[J/OL]. 中国动物检疫, 2018, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/37.1246.S.20180807.0908.002.html>.
- [6] Oura C A, Edwards L, Batten C A, et al. Virological diagnosis of African swine fever-Comparative study of available tests[J]. Virus Res, 2013(173): 150-158.
- [7] 梁云浩,曹琛福,陶虹,等. 非洲猪瘟病毒P54蛋白的真核表达及间接ELISA检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(4): 373-378.
- [8] 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.
- [9] 曾少灵,花群义,张彩虹,等. 非洲猪瘟病毒PCR检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2009, 30(10): 6-10
- [10] 胡凌,王印,杨泽晓,等. 同时检测五种引起猪繁殖障碍的病毒的多重PCR的建立[J]. 中国兽医科学, 2015, 45(10): 1047-1052.
- [11] Zsak L, Borca M V, Risatti G R, et al. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1): 112-119.
- [12] 张泉,朱鸿飞,孙怀昌. 非洲猪瘟病毒常规PCR及Real-time PCR检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 29(6): 459-461.
- [13] 曾少灵,花群义,杨俊兴,等. 非洲猪瘟病毒实时荧光PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(9): 1176-1178.
- [14] 李维彬,蒋正军,王玉炯,等. 非洲猪瘟病毒TaqMan探针实时荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 宁夏大学学报:自然科学版, 2007, 28(1): 56-59.
- [15] James H E, Ebert K, McGonigle R, et al. Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Meth, 2010(164): 68-74.
- [16] 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.

Progress on Diagnostic Techniques of African Swine Fever

LIU He

(Centre for Modern Agriculture, Poverty Alleviation and Development in Fushun City, Fushun, Liaoning, 113006, China)

Abstract: African swine fever is an infectious disease of swine and wild boars caused by African swine fever virus, which can cause a series of symptoms in all different breeds and ages of swine. The diagnostic techniques of ASF were briefly described from the clinical symptoms and pathological lesions, sample collections and laboratory diagnosis of ASF; The latest research progress in diagnostic technology about HAD, FAT, ELISA, PCR, fluorescent quantitative PCR and LAMP was emphasized in order to provide references for comprehensive prevention and control of African swine fever.

Key words: African swine fever; clinical symptom; pathological lesion; diagnostic technique