

猪流行性腹泻病毒检测技术研究进展

芮聪杰^{1,2}, 潘孝成^{1*}, 沈学怀¹, 赵瑞宏¹, 张丹俊^{1*}

(1. 安徽省农业科学院畜牧兽医研究所, 安徽合肥 230031; 2. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230061)

摘要 猪流行性腹泻(PED)是由猪流行性腹泻病毒(PEDV)引起的猪急性高度接触性肠道传染病, 主要临床症状表现为呕吐、水样腹泻、脱水等。近年来, PED 在全球范围内暴发流行, 使养猪业遭受巨大的经济损失。对猪流行性腹泻的检测方法(病毒的分离和鉴定、免疫电镜法、免疫学检测法、分子生物学检测等)进行了综述, 以期对猪流行性腹泻病毒的防控提供理论依据。

关键词 猪流行性腹泻病毒; 检测技术; 研究进展

中图分类号 S852.65⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)25-0022-04

Research Progress on the Detection Technique of Porcine Epidemic Diarrhea Virus

RUI Cong-jie^{1,2}, PAN Xiao-cheng¹, SHEN Xue-huai¹ et al (1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Anhui Academy of Agricultural Science, Hefei, Anhui 230031; 2. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230061)

Abstract Porcine epidemic diarrhea (PED), caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), is a highly contagious, acute enteric viral disease of swine characterized by vomiting, watery diarrhea, dehydration and death. In recent years, swine epidemic diarrhoea has become a global epidemic. As a result, the pig industry has suffered huge economic losses. This paper reviewed the methods to detect PEDV, such as isolation and identification of PEDV, immunoelectron microscopy methods, immunological methods and methods in molecular biology, so as to provide theoretical basis for prevention and control of porcine epidemic diarrhea virus.

Key words Porcine epidemic diarrhea virus; Detection technique; Research progress

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的猪急性高度接触性肠道传染病, 主要表现为呕吐、水样腹泻、脱水等特征^[1-2]。各年龄猪只均可发病, 但以 10 日龄以内哺乳仔猪的病死率最高。该病最早于 1971 年在英格兰猪群中首次发现^[3]。1982 年, 比利时 Pensaert 等^[4]分离出不同于传染性胃肠炎的病毒, 将其命名为类冠状病毒 CV777 株; 随后英国、德国、捷克、匈牙利等国家相继报道有该病的发生。20 世纪 80 年代, 日本、韩国、泰国等亚洲国家也陆续有该病的报道。我国于 1973 年首次报道出现 PEDV 的感染, 并于 1982 年分离该病毒获得成功^[5]。自 2010 年底以来, 我国大部分地区暴发了由 PEDV 变异毒株引起的腹泻, 此次疫情的临床症状较为严重, 初生仔猪的病死率可达 90%^[6], 给我国养猪业带来了巨大的经济损失。目前, 该病在全球肆虐, 美国、墨西哥、台湾、日本、加拿大、多米尼加共和国、哥伦比亚、秘鲁、韩国、乌克兰等国家和地区也相继暴发猪流行性腹泻疫情^[7-8], 给各国养猪业带来严重损失, 是近年来全球养猪业关注的疫病焦点。笔者对猪流行性腹泻病毒的检测方法(包括病毒的分离鉴定、免疫电镜法、免疫学检测、分子生物学检测等)进行了综述, 以期对猪流行性腹泻病毒的防控提供理论依据。

1 病毒分离与鉴定

PEDV 属于冠状病毒科冠状病毒属成员, 核酸基因组为单股正链 RNA 囊膜病毒^[7]。1982 年, 宣华等^[5]以吉林分离

毒株在胎猪肠组织原代单层细胞培养物中分离 PEDV 获得成功。1988 年, 瑞典学者 Hofmann 等^[8]成功在 Vero 细胞中培养 PEDV, 并发现在培养基中加入胰酶有利于 PEDV 在 Vero 细胞的增殖。孙莹^[9]从江苏省某大规模猪场感染 PEDV 的哺乳仔猪小肠内容物样品中分离到 JSX2014 毒株, 接种 Vero 细胞产生的 CPE 病变明显, 但此病变特征与 PEDV 经典株 CV777 在细胞上产生的大空泡、细胞融合及多核细胞等病变特征不一致。此毒株的第 55 代已达到 TCID₅₀ 为 10^{-4.71}/mL, 与 2010 年底以来国内 PEDV 分离株的亲缘关系较近, 与经典毒株 CV777 等的亲缘关系较远, 为新型 G2b 型变异株。卓秀萍^[10]利用 Vero 细胞分离出 EM-P 株, 属于 G1-1 亚型, 与 CV777 株、韩国、日本、泰国等其他国家的流行毒株及 2010 年前的中国毒株处于同一亚群, 经测定病毒的 TCID₅₀ 为 10^{-5.5}/mL。利用 Vero 细胞培养并加入一定浓度的胰酶分离 PEDV 毒株已成为使用最多的方法, 添加胰酶的浓度从 2.5 μg/mL 到 60 μg/mL 不等。潘溪^[11]用未添加胰酶的维持液成功分离出一株 SH6 变异毒株, 证实了在培养 PEDV 的 Vero 细胞中可以不添加胰酶。Shirato 等^[12]研究表明, 没有胰酶, PEDV 可以在 Vero 细胞上增殖, 但病毒释放入培养液被强烈抑制。培养 PEDV 的细胞除了最常用的 Vero 细胞外, 还有 PK、CPK、MA104、PK-15、ESX 等^[13], 其中常用的是 PK-15 细胞。

2 免疫电镜法

免疫电子显微镜技术(immunoelectron microscopy, IEM)是免疫化学技术与电镜技术结合的产物, 是在超微结构水平研究和观察抗原、抗体结合定位的一种方法。它主要分为两大类: 一类是免疫凝集电镜技术, 即采用抗原抗体凝集反应后, 再经负染色直接在电镜下观察; 另一类是免疫电镜定位技术。免疫电镜的应用使得抗原和抗体定位的研究进入到亚细胞的水平。由于 PEDV 属于冠状病毒, 在形态和结构上

基金项目 安徽省重点研究与开发计划项目(1704a07020066); 安徽省农业科学院院所共建团队项目(18C0430); 安徽省生猪产业技术体系项目; 安徽省科技重大专项(17030701008)。

作者简介 芮聪杰(1989—), 男, 河南漯河人, 硕士研究生, 研究方向: 畜禽传染病。*通讯作者: 潘孝成, 博士, 从事畜禽传染病研究; 张丹俊, 研究员, 从事畜禽传染病研究。

收稿日期 2018-05-07

与猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus of swine, TGEV)在普通电镜下不容易区分。王继科等^[14]建立了改进的直接 IEM 方法,以鉴定、区分 PEDV 和 TGEV,该方法具有 3 次筛选作用。2015 年, Lavazza 等^[15]建立了检测 PEDV 等病毒的 IAEM(immuno-aggregation electron microscopy)方法,该方法结合 IEM 法和 ns-EM(negative staining electron microscopy method)法,是一种非常敏感和特异的方法。免疫电镜法虽然具有敏感性高、特异性强、定性准确等优点,但该方法对实验仪器的要求较高。

3 免疫学检测方法

3.1 血清中和试验(serum neutralization test, SNT) 血清中和试验通过检测免疫血清与病毒中和后病毒的感染力,来判定免疫血清对病毒的中和力,该方法的特异性和灵敏性均较高,主要用于病毒毒株的种型鉴定(该方法不仅可以定属,而且可以定型)、测定血清抗体效价、分析病毒的抗原性。谢明星等^[16]于 1988 年采用固定病毒-稀释血清法,建立了检测血清中抗体消长规律的微量血清中和试验,结果表明该方法既可用于 PED 早期诊断,也可用于流行病学调查,此外还能用于免疫水平的检测。石明明^[17]在传统中和试验的基础上进行了改进,建立了快速、新型的 PEDV 中和抗体检测方法。试验使用的 rPEDV-GFP 病毒是通过反向遗传技术,将 GFP 荧光基因插入至 PEDV 基因序列中,由于 GFP 自带荧光,只要 PEDV-GFP 在细胞中复制,就能看见荧光,用 TBS-380 微型荧光计对其反应结果进行分析并建立线性关系,比较血清样品间抗体水平的高低,此方法与传统中和试验相比更省时间(12 h 即可出结果)。

3.2 免疫荧光法(immunofluorescence, IF) 免疫荧光法就是利用免疫荧光显微镜观察抗原与抗体特异性的结合,包括直接免疫荧光法、间接免疫荧光法。崔现兰等^[18]建立了检测 PEDV 的直接免疫荧光法和间接免疫荧光法,其对猪流行性腹泻病毒(PEDV)人工感染仔猪的阳性检出率为 91.3%(42/46)。林志雄等^[19]用适应于 Vero、Pk15 等传代细胞株生长繁殖的 PEDV-G1 株建立直接免疫荧光法,同时与哈尔滨兽医研究所的荧光抗体方法比较,阳性符合率达 95%(19/20),阴性符合率达 90%(9/10),并不与猪传染性胃肠炎病毒、猪细小病毒、轮状病毒和大肠杆菌等发生交叉反应,表明该方法具有较高的准确性和特异性。朱维正等^[20]用间接血凝法(IHA)和间接免疫荧光法(IFAT)对感染 PEDV 猪的血清进行检测,并对这 2 种方法进行比较,结果发现 IHA 的阳性检出率(50.43%)低于 IFAT(89.25%)。免疫荧光法是比较经典的检测 PEDV 的方法。

3.3 酶联免疫吸附实验(ELISA) 由于 ELISA 检测方法具有灵敏度高、特异性强、反应快速、操作相对简单、可对血清进行批量检测、既可以检测免疫后血清抗体也可以检测感染抗原等优点,该方法是检测 PEDV 应用最广泛的方法之一。潘溪^[11]通过将 PEDV 的 N 基因克隆到 pCoid-1DNA 载体中进行原核表达,构建了 pCoid-1-N 的重组质粒,并将纯化的 N 蛋白进行包被,作为包被抗原构建间接 ELISA 方法,对 50

份已知来源和背景的血清进行了检测,符合率达 94%。同时,还制备了 N 蛋白的单克隆抗体作为竞争性抗体,建立了竞争 ELISA 检测方法。郑芳园^[21]将 PEDV 的 S 蛋白用 pET-28a 为载体进行原核表达,并将纯化的 Sc 蛋白作为包被抗原,建立了检测 PEDV 抗体的间接 ELISA 方法。将 5 份阳性血清进行 1:3 200 倍稀释后检测结果呈阳性,证实了此方法的敏感性和重复性;利用该方法对伪狂犬病毒(PRV)、猪圆环病毒 2 型病毒(PCV2)、口蹄疫病毒(FMDV)、猪蓝耳病毒(PRRSV)的阳性血清进行检测,结果均呈阴性,证实了此方法的特异性。张清真等^[22]以体外表达的 S 蛋白为包被抗原,商品化单抗为捕获抗体,对 IgG 进行生物素标记作为二抗,建立了检测 PEDV 的双夹心 ELISA 方法,该方法的最低检测限量为 20 ng/ μ L,且稳定性和特异性较好。对 25 份临床猪腹泻样品进行 PEDV 检测,3 份检出为阳性,与 RT-PCR 结果的符合率为 100%。王晨燕等^[23]采用鼠源抗 PEDV 单克隆抗体为捕获抗体,以兔源多克隆抗体为检测抗体,建立了 PEDV 双抗体夹心 ELISA 方法,该方法与轮状病毒、猪传染性胃肠炎病毒无交叉反应,敏感度达 30 μ g/mL,与 PCR 检测符合率为 92.30%。

3.4 胶体金免疫层析技术 胶体金颗粒可以通过静电及其表面的物理特性与抗体、葡萄球菌蛋白 A(SPA)等多种生物分子结合,形成蛋白质胶体金复合物,即胶体金标记物^[24]。胶体金免疫层析技术因其具有操作简单、不需要昂贵的精密仪器、对检测人员的素质要求不高、有利于在基层推广等优点,目前已在许多领域得到了广泛应用,如肉食品药物残留检测^[25]、粮食霉菌毒素的检测、抗原抗体检测、兽医疾病诊断等。魏艳秋^[26]应用杂交瘤技术,以制备的 N 蛋白特异性单克隆抗体为材料,建立了检测 PEDV 的胶体金免疫层析方法,并用 RT-PCR 的方法对 13 份不同地区采集的猪小肠样品进行检测,发现这 2 种方法的阳性检出率分别为 38.46%(5/13)和 46.15%(6/13),阳性样品的总符合率为 83.5%。张利勃等^[27]将基因工程表达的 PEDV M 蛋白抗原作为检测线,自制的抗葡萄球菌蛋白 A(SPA)多抗血清包被硝酸纤维素膜作为质控线,对葡萄球菌蛋白 A(SPA)进行胶体金标记作为指示介质,制成了检测 PEDV 感染猪血清抗体的快速检测试纸,并与 ELISA 检测方法进行比较,二者有相似的灵敏度,75 份样品中有 65 份阳性、7 份阴性,符合率达 96%。

4 分子生物学检测方法

4.1 核酸探针技术 核酸探针技术是 20 世纪 70 年代在基因工程学的基础上发展起来的^[28],在生化分析、分子药理学、动物疾病检测及进出口贸易检测等领域得到广泛应用。随着科学技术的进步,新的核酸探针技术也得到了快速发展,目前探针的种类有 DNA 探针、RNA 探针、寡核苷酸探针和新型光学核酸探针^[29]。Kim 等^[30]将已知序列的核苷酸用地高辛进行标记,在特定条件下与人工感染仔猪 PEDV 的 N 蛋白的基因进行碱基配对,结果发现 PEDV 检出率为 93.33%(14/15)。Jung 等^[31]利用基于 RT-PCR 建立的斑点杂交技术,采用地高辛标记过的 cDNA 探针同时对 PEDV 和

TGEV 感染后的猪粪便样品进行检测,检测结果与 RT-PCR 检测结果相一致,且敏感性更高。

4.2 聚合酶链式反应 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是 1985 年由美国 PE-Cetus 公司的 Mullis 发明的一种可在体外扩增特定基因或 RNA 序列的技术。PCR 技术操作简单,结果可靠,目前已被广泛应用于医学、农学、考古等领域进行基因研究和分析。随着对 PCR 技术研究的加深,在传统 PCR 的基础上又衍生出多种 PCR 技术。这些技术包括实时荧光定量 PCR、多重 PCR、套式 PCR、纳米 PCR, PCR 技术已经成为研究 PEDV 的基本技术手段并得到广泛应用。李劫^[32]利用 RT-PCR 方法扩增从仔猪临床病料中分离出一株 PEDV (CHM2013),对其进行全基因组序列测定,并通过绘制进化树,CHM2013 属于 PEDV 的 G1 亚群,与经典毒株 CV777、SM98、DR13 属于同一亚群,全基因组同源率为 97.9%~99.9%,同时基于 PEDV 毒株 CHM2013 和分离出的强毒株 BJ-2011-C 的全程基因组设计引物,进行分段扩增,为进一步研究 S 基因突变对弱毒株在体外增殖和致病性的研究提供了技术支持。石坚等^[33]根据 GenBank 中当前流行毒株 S 基因序列设计了 2 条特异扩增引物,建立了一套能够区分 PEDV 变异毒株和经典毒株的套式 RT-PCR 方法。此方法不仅能检测出 PEDV,而且能快速鉴定毒株是否发生了变异,并且不会受其他非特异性产物的影响,灵敏度也较高。施开创等^[34]建立了能够区分 PEDV 经典株、变异株及疫苗株的多重 PCR 方法,并与猪的其他病毒[如传染性胃肠炎病毒(TGEV)、轮状病毒(RV)、猪瘟病毒(HCV)、伪狂犬病毒(PRV)]无交叉反应。刘琪等^[35]建立了一种能够快速区分 PEDV 疫苗毒株与野毒株的巢式 PCR 方法,该方法能够对 PEDV 与 TGEV、RV、HCV、PRV 等进行鉴别。沈思思等^[36]采用靶向 PEDV S 基因的引物和探针,建立了检测 PEDV 的恒温隔绝式 PCR (iiPCR),结果表明该方法的特异性和灵敏性与实时荧光定量 PCR 方法相当,使用的恒温隔绝式 PCR 检测仪比传统的 PCR 仪反应效率高,其反应总过程只需 42 min,此外一键操作,无需设置反应条件,操作简单,结果易判读,对操作人员素质要求不高,无需电泳,减少了交叉污染和人为因素的影响。邢娜^[37]通过系统化筛选 TGEV 和 PEDV 特异性探针并进行优化,分别标记于磁性颗粒和纳米金颗粒上,形成 MMPs-RNA-AuNPs“三明治”复合物,将病毒核酸信号进一步扩大,并利用特殊引物通过 PCR 检测特异性,分别建立了特异性针对 TGEV 和 PEDV 基于纳米颗粒的超敏检测方法 (ultrasensitive nanoparticle DNA probe-based PCR assay, UNDP-PCR),并在此基础上又建立了同时检测 TGEV 和 PEDV 的双重 UNDP-PCR 检测技术。

4.2.1 实时荧光定量 PCR。实时荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 是在标准 PCR 的基础上发展起来的检测技术,该技术是采用荧光探针或 SYBR Green I 荧光染料通过连续监测荧光信号强弱的变化来判断特异性产物的量。李亚青^[38]根据 GenBank 中 PEDV 的 CV777 株及 Attenuated DR13 株 ORF3 基因序列设计了一对特异性引物,并以野毒株和疫

苗毒的 cDNA 为模板,优化了引物浓度和退火温度,构建了 Eva Green 荧光定量 RT-PCR 方法,并经过多次验证,特异性和重复性好。此外,还可以对感染 PEDV 病猪的心、肝、脾、肺、肾、淋巴结和肠组织中的 PEDV 含量进行了定量分析。劳秀杰等^[39]根据 PEDV N 基因设计了一对引物,利用 SYBR Green I 荧光染料建立了 SYBR Green 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法,对同一样品 3 次重复试验,变异系数小于 0.9%,最低检测限为 1×10^0 copy/ μ L,比常规 PCR 敏感度高 100 倍 (1×10^2 copy/ μ L),特异性强,标准曲线线性关系好,相关系数为 1.0,扩增效率为 105.4%。刘邓等^[40]建立了多重实时荧光定量 RT-PCR 方法,并对 PEDV、TGEV 和 RV 进行鉴别检测,结果发现该方法具有较高的敏感性、特异性和重复性。

4.2.2 纳米 PCR。纳米 PCR 是纳米技术与生命科学交叉的成果。2005 年中国科学院应用物理所与上海交通大学首次报道了纳米金粒子 (Au nanoparticles) 对 PCR 反应的优化作用^[41]。沈鹤柏等^[42]将引物连接到金纳米颗粒表面,研究基于纳米金颗粒的 PCR,将均相体系中的 PCR 技术扩展到纳米粒子表面。目前,纳米 PCR 已经在生命科学、动物医学等领域得到广泛应用。朱禹^[43]根据 PEDV 和 TGEV N 基因的核苷酸序列分别设计了 2 对引物并扩增 N 基因,以 pMD18-T 为载体,与 N 基因连接作为标准质粒,设计出特异性引物,以特异性引物为模板,优化退火温度和引物的量,建立纳米 PCR 方法。灵敏性试验表明,质粒 PEDV-N、TGEV-N 的最低检出量分别为 7.6×10^1 和 8.5×10^1 copy/ μ L。敏感性试验表明,普通 PCR 检测的病毒 RNA 最低量为 2.4×10^{-3} 和 1.7×10^{-2} μ g/mL,纳米 PCR 结果比普通 PCR 敏感 10 倍。通过理论计算可得到纳米 PCR 检测 PEDV 及 TGEV 的最低量达到 $10^{0.5}$ TCID₅₀/mL,以其他多种病毒 PPV、PCV-2、PRRSV、PRV、CSFV 和 H₁N₁ 作为检测对象,进行特异性试验,结果均未扩增出任何条带。利用纳米 PCR 的敏感性和特异性,用于临床诊断和流行病学调查,为 PEDV 的早期诊断提供了新的方法。

4.3 环介导等温扩增技术 环介导等温扩增技术最早由 Notmi 等^[44]于 2000 年创建,是一种体外扩增特异性基因片段的分子生物学技术,该技术被广泛应用于核酸检测的各个领域,如病原体的识别、生物标志物检测、性别鉴定等。在常规 LAMP 扩增的基础上,各国学者对其进行了改进并开发出一系列多重 LAMP 扩增技术,如微型扩增技术以及实时荧光环介导技术。罗亚坤等^[45]针对 PEDV N 基因设计了 6 条引物并对 LAMP 反应体系和反应温度进行了优化,建立了检测 PEDV 的环介导等温扩增法,结果发现其检测限量为 91 copy/mL,是常规 PCR 检测方法敏感性的 100 倍,并与 RT-PCR 方法检测的 75 份临床样品进行对比,发现这 2 种方法的检测符合率为 97.3%。田野等^[46]也建立了检测 PEDV 的逆转录环介导等温核酸扩增 (RT-LAMP),是在原反应液中加入一定量的逆转录酶,实现了 RNA 的一步扩增。时建立等^[47]针对 PEDV S 基因设计特异性引物,建立了快速检测 PEDV 的 LAMP 方法。此方法特异性好,灵敏性强,将

反转录后的病毒 cDNA 稀释到 10^8 倍仍可检出。

5 小结

猪流行性腹泻的早期诊断和猪群抗体水平的检测,在生产上对疾病的预防与控制起着关键性作用,因此选择一种可靠的、敏感性和特异性高、易于操作和检测成本相对低的检测方法也十分重要。随着科学技术的发展, PEDV 的检测方法也有了显著进步,涉及免疫学、分子生物学等领域。目前,酶联免疫吸附实验(ELISA)和聚合酶链式反应(PCR)这 2 种方法在临床上的应用较为普遍,尤其是 PCR 方法(多重 PCR、套式 PCR、荧光定量 PCR)与 ELISA 方法相比灵敏性和特异性更高,但对仪器设备要求高,对操作人员素质也有一定要求,特别是荧光定量 PCR 在设备和人员上要求更加严格,这使得该方法在基层生产中的推广有一定的限制。使用任何一种方法都很难对疾病做出确切诊断,可根据现有情况选择可靠性、准确性高的 2 种或 2 种以上的方法进行联合诊断。随着科学技术的不断进步,相信未来会出现一种检测迅速、操作简单、成本相对较低、可靠性和准确性高的新检测技术,从而为猪流行性腹泻的诊断、流行病学调查和防控奠定基础。

参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:688-690.
- [2] 陈博言,王川庆. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业出版社,2006:229-231.
- [3] CHEN J F, WANG C B, SHI H Y, et al. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Arch Virol, 2010, 155(9): 1471-1476.
- [4] PENSART M B, DE BOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. Archives of virology, 1978, 58(3): 243-247.
- [5] 宣华,邢德坤,王殿瀛,等. 应用猪胎肠单层细胞培养猪流行性腹泻病毒的研究[J]. 兽医大学学报, 1984, 4(3): 202-208.
- [6] 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.
- [7] 翁善钢. 2014 年国际猪病疫情回顾—猪流行性腹泻在全球的流行与传播[J]. 肉类工业, 2015(2): 49-50.
- [8] HOFMANN M, WYLER R, HOFMANN M, et al. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture[J]. Journal of clinical microbiology, 1988, 26(11): 2235-2239.
- [9] 孙莹. 基因 2b 亚型猪流行性腹泻病毒变异株的分离鉴定和疫苗研制[D]. 扬州:扬州大学, 2017.
- [10] 卓秀萍. 猪流行性腹泻病毒的分离、鉴定及全基因序列分析[D]. 雅安:四川农业大学, 2016.
- [11] 潘溪. 猪流行性腹泻病毒的分离鉴定及 ELISA 检测方法的初步建立[D]. 北京:中国农业科学院, 2015.
- [12] SHIRATO K, MATSUYAMA S, UJIKE M, et al. Role of proteases in the release of porcine epidemic diarrhea virus from infected cells[J]. Journal of virology, 2011, 85(15): 7872-7880.
- [13] SONG D S, YANG J S, OH J S, et al. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF3[J]. Vaccine, 2003, 21(17/18): 1833-1842.
- [14] 王继科,刘长明,马思奇,等. 猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻病毒的免疫电镜诊断的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1991(2): 22-26.
- [15] LAVAZZA A, TITTARELLI C, CERIOLO M. The use of convalescent sera in immune-electron microscopy to detect non-suspected/new viral agents[J]. Viruses, 2015, 7(5): 2683-2703.
- [16] 谢明星,朱维正. 猪流行性腹泻病毒实验感染猪血清抗体的消长规律[J]. 兽医大学学报, 1988(2): 181-185.
- [17] 石明明. 猪流行性腹泻病毒(PEDV)及其抗体检测方法的研究与应用[D]. 南京:南京农业大学, 2012.
- [18] 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]. 中国预防兽医学报, 1990(5): 20-24.
- [19] 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疫, 1997(2): 32-34.
- [20] 朱维正,郑瑞峰. 猪流行性腹泻血清学诊断法的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1990(1): 16-19.
- [21] 郑芳园. 猪流行性腹泻病毒间接 ELISA 方法的建立和病毒样颗粒的构建及免疫特性分析[D]. 南京:南京农业大学, 2014.
- [22] 张清真,陶洁,殷秀辰,等. 猪流行性腹泻病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 上海农业学报, 2017, 33(1): 134-137.
- [23] 王晨燕,王隆柏,吴学敏,等. 猪流行性腹泻病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 福建农业学报, 2017, 32(8): 823-827.
- [24] 朱玉婵. 免疫胶体金技术在鸭坦布苏病毒和快速定量检测 Asia1 型口蹄疫病毒中的应用[D]. 保定:河北农业大学, 2014.
- [25] 陈一鸣. 胶体金免疫层析法在畜禽产品兽药残留检测中的应用[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2017, 33(5): 215.
- [26] 魏艳秋. 猪流行性腹泻病毒单克隆抗体胶体金免疫层析检测方法的建立[D]. 保定:河北农业大学, 2015.
- [27] 张利勃,周铁忠,王坤,等. 猪流行性腹泻病毒胶体金抗体检测技术的建立及其应用[J]. 中国农学通报, 2011, 27(3): 374-377.
- [28] 卿柳庭,屈小玲. 核酸探针和 PCR 技术在食品检验中的应用[J]. 动物医学进展, 2000, 21(1): 22-24.
- [29] 王兴旺,胥彬. 核酸探针技术及其在分子药理学中的应用[J]. 中国药理学通报, 1996(5): 402-405.
- [30] 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.
- [31] 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]. Journal of virological methods, 2005, 123(2): 141-146.
- [32] 李劫. 猪流行性腹泻病毒感染性 cDNA 克隆的构建及 S 基因突变对弱毒株体外增殖和致病性的影响[D]. 北京:中国农业大学, 2017.
- [33] 石坚,王飞,苏丹萍,等. PEDV 经典毒株与变异毒株套式 RT-PCR 鉴别检测方法的建立及应用[J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(7): 99-102.
- [34] 施开创,龙飞翔,栗艳琼,等. 猪流行性腹泻病毒强毒株和疫苗株多重 RT-PCR 鉴别检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2017(1): 1-8.
- [35] 刘琪,冯晓声,周如月,等. 鉴别猪流行性腹泻疫苗毒株与野毒株巢式 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 广东畜牧兽医科技, 2015, 40(2): 36-38.
- [36] 沈思思,汤承,岳华,等. 猪流行性腹泻病毒恒温隔板式荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2017(4): 466-470.
- [37] 邢娜. 快速检测 TGEV 和 PEDV 早期感染的 UNDP-PCR 方法的建立[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2016.
- [38] 李亚青. 猪流行性腹泻病毒 ORF3 基因的变异分析及其荧光定量 RT-PCR 检测方法的研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2016.
- [39] 劳秀杰,王静静,郑东霞,等. 猪流行性腹泻病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2016(1): 62-66.
- [40] 刘邓,贾泽颖,张丹,等. 猪流行性腹泻病毒、传染性胃肠炎病毒和轮状病毒多重实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(15): 45-50.
- [41] 刘清岱,王金菊,王勇. 纳米粒子 PCR 研究进展[J]. 生物学通报, 2010, 45(2): 1-3.
- [42] 沈鹤柏,卢敏,杨仲南,等. 基于金纳米粒子的聚合酶链反应[J]. 科学通报, 2005, 50(12): 1190-1194.
- [43] 朱禹. PEDV 检测纳米 PCR 方法的建立及其分子流行病学调查[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2017.
- [44] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic acids research, 2000, 28(12): 1-7.
- [45] 罗亚坤,梁琳,王静,等. 猪流行性腹泻病毒环介导等温扩增检测方法的建立及应用[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(2): 344-349.
- [46] 田野,张祥斌,宋延华,等. 猪流行性腹泻病毒 RT-LAMP 方法的建立及应用[J]. 中国兽医杂志, 2017(8): 38-40.
- [47] 时建立,彭结,王莉莉,等. 猪流行性腹泻病毒 LAMP 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(7): 82-85.