

## 六种检测猪瘟病毒方法的比较

王向鹏<sup>1,2</sup>, 张兴娟<sup>2</sup>, 孙元<sup>2</sup>, 李娜<sup>2</sup>, 贺番<sup>2</sup>, 常天明<sup>2</sup>, 李宏宇<sup>2</sup>, 杨增岐<sup>1\*</sup>, 仇华吉<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 西北农林科技大学 动物医学院, 杨凌 712100)

(<sup>2</sup> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室, 哈尔滨 150001)

**摘要:**【目的】本研究旨在比较 6 种检测猪瘟病毒方法的优缺点。【方法】应用病毒分离、胶体金免疫层析试纸条、抗原捕捉 ELISA、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、TaqMan 荧光定量 RT-PCR(RT-qPCR)和反转录-环介导等温扩增方法(RT-LAMP)等 6 种方法,分别对 50 份疑似猪瘟病料中的猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)进行检测。【结果】结果表明:RT-qPCR 和 RT-LAMP 方法检出阳性样品数为 13 份,RT-PCR 为 11 份,病毒分离为 10 份,抗原捕捉 ELISA 为 9 份,胶体金试纸条为 8 份;6 种方法均检测为阳性 8 份,均为阴性 37 份。【结论】结果提示,在对猪瘟病毒进行检测时,RT-qPCR、RT-LAMP 和 RT-PCR 由于其灵敏性高,可作为首选检测方法,但操作时需要避免假阳性的出现;病毒分离方法虽然操作繁琐,但结果准确,是确诊猪瘟必不可少的检测方法;抗原捕捉 ELISA 和胶体金试纸条检测时间较短,由于其敏感性较低所限,主要用于对畜群进行检测,不适合个体检测。

**关键词:** 猪瘟病毒;检测方法;优缺点

**中图分类号:** Q93-3   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-07-1087

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起猪的一种急性、发热性、接触性传染病。其特征为发病急、高热稽留和毛细血管壁变性,传染性强、病死率高<sup>[1]</sup>。世界动物卫生组织(OIE)将其列入报告疫病,并规定为国际贸易重要检疫对象。在猪瘟临床诊断方面,由于猪瘟野毒不同毒株毒力不同,且由其它病原的混合感染,特别是与猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)和猪圆环病毒 2 型(PCV2)的混合感染,使得通过临床症状和病理变化很难对猪瘟进行确诊<sup>[2]</sup>。因此建立准确、快速有效的实验室诊断方法,对于猪瘟的预防和控制有着重要的意义。

本实验室已建立 6 种检测 CSFV 的方法:病毒分离与鉴定、胶体金免疫层析试纸条、抗原捕捉

ELISA、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、TaqMan 荧光定量 RT-PCR(RT-qPCR)和反转录-环介导等温扩增方法(RT-LAMP)。其中病毒分离用于、检测病料中的病毒粒子,胶体金和抗原捕捉 ELISA 用于检测病料中的猪瘟病毒抗原,后 3 种方法用于检测病料中的病毒核酸。以上 6 种诊断方法各有优缺点,为了评价以上 6 种检测方法,本研究以 50 份疑似猪瘟病毒感染的病料为待检材料,用 6 种方法分别进行检测,重点比较各种检测方法的灵敏性,以期找到检测 CSFV 的最佳方法。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病料和细胞:**猪瘟病毒感染阳性病料、阴性

**基金项目:** 国家科技支撑计划(2006BAD06A03)

\* 通信作者。杨增岐, Tel: +86-29-87091106, Fax: +86-29-87091032, E-mail: yzq1106@nwsuaf.edu.cn; 仇华吉, Tel/Fax: +86-451-85935041, E-mail: huajiqu@hvri.ac.cn

**作者简介:** 王向鹏(1985-),男,河南洛阳人,硕士研究生,主要研究方向为动物疫病防治。E-mail: wangxiangpeng2003@126.com

**收稿日期:** 2010-01-10; **修回日期:** 2010-03-15

病料及临床上疑似 CSFV 病料(脾脏、淋巴结、扁桃体、全血和血清)共 50 份、PK15 传代细胞均由哈尔滨兽医研究所猪传染病研究室保存并提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** DMEM 购自 Invitrogen 公司,胎牛血清购自 PAA 公司,猪瘟病毒 E2 蛋白单克隆抗体 6E10<sup>[3]</sup>由哈尔滨兽医研究所猪传染病研究室保存并提供, FITC 标记山羊抗鼠 IgG 抗体购自 Sigma 公司;猪瘟病毒抗原 ELISA 试剂盒购自 IDEXX 公司;猪瘟病毒抗原胶体金检测试纸条由哈尔滨兽医研究所猪传染病研究室制备并提供; QIAamp Viral RNA Kit 提取试剂盒购自 Qiagen 公司; AMV 反转录酶以及 PCR 试剂均购自 TaKaRa 公司;本实验所需引物由 Invitrogen 公司合成。高速台式低温离心机为 Eppendorf 公司产品,电热恒温水浴锅购自上海精宏实验设备有限公司,酶标仪 (Model 680)和 PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品,荧光定量 PCR 仪 (RotorGene3000) 购自 Corbett 公司,紫外凝胶成像系统购自 Gene 公司,荧光倒置显微镜购自 Nikon 公司。

**1.1.3 引物:**各种核酸检测方法所需引物序列如表 1 所示。

表 1 检测 CSFV 所需引物和探针序列

Primers	Sequences (5'→3')	Genomic positions
P1	TRACCAAYGCAYATGWCAGAAGTACC	11053 - 11077
P2	AGTCGACTTCCTGGTTTCACTTG	11628 - 11651
P3	GAAGTGGGCTAGCCATG	86 - 102
P4	ACTGTCTGTACTCAGGAC	166 - 184
P5	FAM-AGGACTAGCAAACGGAGG GACTAGCCG-TAMARA	110 - 136
P6	CCCTGACCATGCATATGWCAG	11050 - 11070
P7	CATCCCCGCACACATGAAT	11241 - 11259
P8	AGGTTGTCCRCTGCCTCTTTG- CCCCGAATCWGTGCCGA	11118 - 11138 11076 - 11092
P9	ACACAAGCGCAGGCAATAGCAT- CTCTTGTAGGGTACTCCCGT	11140 - 11161 11202 - 11221

## 1.2 病毒分离

取病猪脾脏一块,剪碎后充分研磨,加 3 倍体积的 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 溶液制成乳液,反复冻融 3 次,11 000 × g 4℃ 离心 10 min,取上清用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。将无菌滤液接种于长成单层的 PK15 细胞,37℃ 吸附 1.5 h 后,加入含有 2% 胎牛血清的 DMEM 维持液,48 h 后用间接免疫荧光试验检测猪瘟病毒的增殖情况:用单抗 6E10 作为一抗, FITC 标记山羊抗鼠 IgG 作为二抗,在荧光显微镜下观察,如见细胞有绿色荧光则判为阳性,无绿色荧光则为阴性,同时设立接种 CSFV 石门株

病毒和不接病毒的正常 PK15 细胞分别作为阳性和阴性对照<sup>[4]</sup>。

## 1.3 胶体金免疫层析试纸条

将待检样品按照参考文献<sup>[5]</sup>处理后,取 100 μL 样品液加入胶体金免疫层析试纸条<sup>[6]</sup>的样品孔,15 min 后观测结果,当试纸条的检测线和质控线处均出现红色条带时样品判为阳性,仅质控线出现红色条带判为阴性。

## 1.4 抗原捕捉 ELISA

各种组织样品的处理按照试剂盒操作说明书进行。ELISA 检测具体操作步骤如下:每个检测孔(包被了羊抗 CSFV 多抗)加入 25 μL CSFV 单抗,加 75 μL 阳性、阴性对照和经过处理后的待检样品,室温孵育过夜倒掉孔内样品,用洗涤液洗涤 5 次,加 100 μL 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体于各孔中,室温温育 1 h,洗涤后每孔加 100 μL TMB,避光显色 10 min,加 100 μL 终止液终止反应,测定每孔的 OD<sub>450</sub> 值,样品结果判定按照说明书进行。

## 1.5 RT-PCR

**1.5.1 引物合成:**按照参考文献<sup>[7]</sup>合成一对引物 P1/P2,引物序列见表 1,用于扩增 CSFV NS5B 区 599 bp 目的片段。

**1.5.2 病毒 RNA 的提取与 RT-PCR:**取 140 μL 样品,用 QIAamp Viral RNA Kit 提取试剂盒提取病毒 RNA,具体操作步骤参考说明书。最后提取的 RNA 用 50 μL AVE 洗脱。反转录体系为 30 μL,内含 10 μL RNA、6 μL 5 × RT buffer、3 μL dNTP Mixture (10 mmol/L)、3 μL 50 μmol/L 9-mer 随机引物、10 U AMV 和 20 U RNA 酶抑制剂,补去离子 H<sub>2</sub>O 至总体积为 30 μL。42℃ 水浴 1 h,然后 70℃ 10 min。制备好的 cDNA 置于 -20℃ 保存备用。

PCR 反应体系为 30 μL:3 μL cDNA、3 μL 10 × PCR buffer、2 μL 2.5 mmol/L dNTP、上下游引物 P1 和 P2 各 1 μL (10 μmol/L)、0.25 μL (5 U/μL) EX Taq DNA 聚合酶、用去离子 H<sub>2</sub>O 补至 30 μL。PCR 程序为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 40 s,30 个循环;72℃ 10 min。反应结束后取 PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳,凝胶成像系统分析结果。

## 1.6 RT-qPCR

按照参考文献<sup>[8]</sup>合成一对引物 P3/P4 和一条探针 P5,引物及探针序列见表 1。预期扩增产物大小为 99 bp。病毒 RNA 的提取和 cDNA 的合成参考

1.5.2 进行。标准品为本实验室构建含有 CSFV 石门株 5' 端非编码区的重组质粒 pOK/F1-4<sup>[9]</sup>。用紫外分光光度计定量后稀释至  $10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。反应体系为  $25\ \mu\text{L}$ :  $2\ \mu\text{L}$  cDNA,  $2.5\ \mu\text{L}$   $10\times$  EX Taq Buffer,  $2\ \mu\text{L}$  dNTP ( $2\ \text{mmol/L}$ ),  $7\ \mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  ( $25\ \text{mmol/L}$ )、引物 P3/P4 各  $1\ \mu\text{L}$  ( $10\ \mu\text{mol/L}$ )、探针 P5 ( $10\ \mu\text{mol/L}$ )  $0.5\ \mu\text{L}$ 、HotStart EX Taq 聚合酶  $1\ \text{U}$ 、用去离子  $\text{H}_2\text{O}$  补足至  $25\ \mu\text{L}$ 。反应条件为:  $95^\circ\text{C}$   $2\ \text{min}$ ;  $95^\circ\text{C}$   $10\ \text{s}$ ,  $60^\circ\text{C}$   $45\ \text{s}$ , 40 个循环。退火延伸时检测荧光信号。其中样品 Ct 值小于 35 判为阳性, 处于 35 和 38 之间为可疑, 大于 38 为阴性。

### 1.7 RT-LAMP

按照参考文献<sup>[10]</sup>合成 4 条引物, 其中 P6/P7 为外引物, P8/P9 为内引物, 引物序列见表 1。病毒 RNA 的提取和 cDNA 的合成参考 1.5.2 进行。LAMP 反应体系为  $25\ \mu\text{L}$ : 含  $2\ \mu\text{L}$  cDNA、 $12\ \text{U}$  Bst

DNA 聚合酶、 $2.5\ \mu\text{L}$   $10\times$  Thermo Buffer、 $2.5\ \mu\text{L}$  Betaine ( $5\ \text{mol/L}$ )、 $5\ \mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  ( $25\ \text{mmol/L}$ )、 $2.5\ \mu\text{L}$  dNTP ( $2.5\ \text{mmol/L}$ )、外引物 P6/P7 各  $0.5\ \mu\text{L}$  ( $10\ \mu\text{mol/L}$ )、内引物 P8/P9 各  $5\ \mu\text{L}$  ( $10\ \mu\text{mol/L}$ )、用去离子  $\text{H}_2\text{O}$  补足至  $25\ \mu\text{L}$ 。反应条件为  $62^\circ\text{C}$   $1\ \text{h}$ ;  $80^\circ\text{C}$   $2\ \text{min}$ 。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果

### 2.1 猪瘟病毒分离结果

间接免疫荧光试验结果表明, 在接种病毒的 PK15 细胞, 猪瘟病毒主要分布在细胞质和细胞膜上。其中 1、5、17、22、25、33、38、42、45、48 号 10 份病料处理液接种 PK15 细胞后, 细胞有绿色荧光, 判为猪瘟阳性; 其余病料接种 PK15 后, 未见有绿色荧光, 判为阴性 (图 1)。

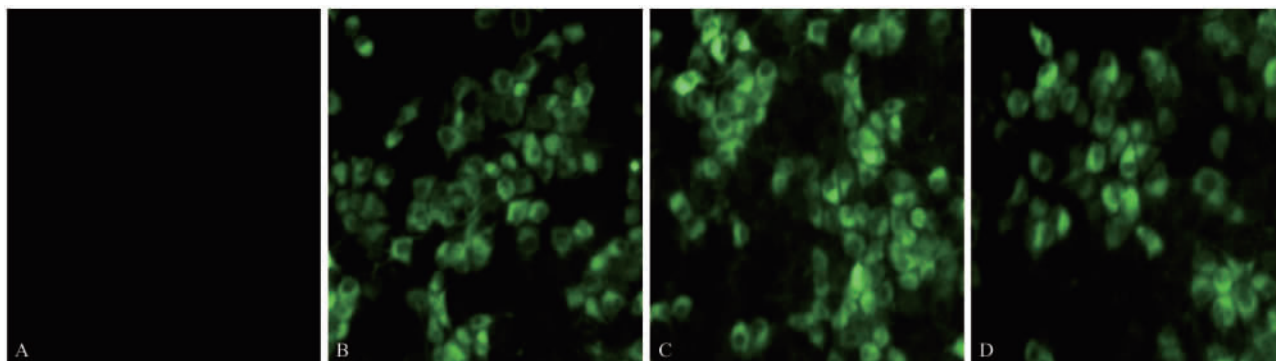


图 1 PK15 细胞接种猪瘟病料后间接免疫荧光试验检测结果

Fig. 1 Detection of CSFV cultured in PK15 cells by IFA. The judgment was performed as described in material and methods. A: Negative control; B: Positive control; C: Inoculation sample 1; D: Inoculation sample 33.

### 2.2 胶体金免疫层析试纸条检测结果

将处理好的样品加入试纸条的样品检测孔, 15 min 后观察结果。其中 1、5、17、22、25、33、42 和

48 号样品均在试纸条上出现两条清晰的红色条带, 判为阳性; 其余样品仅在质控线处出现一条红色条带结果判为阴性。部分检测结果如图 2 所示。

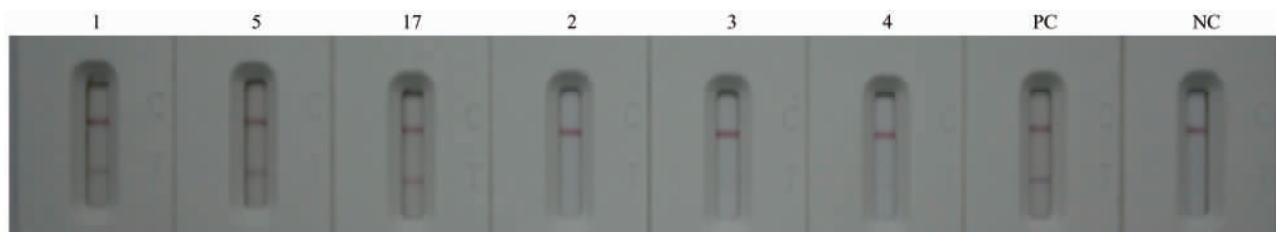


图 2 胶体金免疫层析试纸条检测结果

Fig. 2 Detection of CSFV in clinical samples by colloidal gold immunochromatographic strip. 1: Positive; 5: Positive; 17: Positive; 2: Negative; 3: Negative; 4: Negative; PC: Positive control; NC: Negative control.

### 2.3 抗原捕捉 ELISA 检测结果

根据检测试剂盒判定结果标准, 阳性对照的  $OD_{450}$  应大于 0.500, 阴性对照的  $OD_{450}$  值应小于阳性对照  $OD_{450}$  值的 20%, 实验成立。其中样品  $OD_{450}$  值

与阴性对照  $OD_{450}$  值之差大于或等于 0.300, 结果判定为阳性; 两者之差小于 0.20, 则为阴性; 处于 0.200 和 0.300 之间结果判为可疑。根据判定标准, 1、5、17、22、25、33、38、42、48 号病料判为阳性,

45 号病料为可疑,其余病料为阴性。

**2.4 RT-PCR 检测结果**

根据琼脂糖凝胶电泳结果(图 3),1、5、6、17、

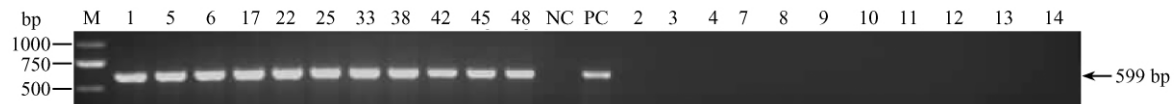


图 3 猪瘟病料 RT-PCR 检测结果

Fig. 3 Detection of CSFV in clinical samples by RT-PCR. M; DL2000 DNA marker; 1, 5, 6, 17, 22, 25, 33, 38, 42, 45, 48; Positive; NC; Negative control; PC; Positive control; 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14; Negative.

**2.5 RT-qPCR 检测结果**

RT-qPCR 扩增曲线显示:RT-PCR 检测为阳性的 11 个样品(1、5、6、17、22、25、33、38、42、45、48 号)仍为阳性,15 号和 34 号样品经过 RT-qPCR 检测结果为阳性(图略)。

**2.6 RT-LAMP 检测结果**

根据琼脂糖凝胶电泳结果,阳性样品有特异性的梯形条带(图 4),阴性样品则无。RT-LAMP 检测结果为 50 份样品中有 13 份阳性样品(1、5、6、15、17、22、25、33、34、38、42、45、48 号),其余样品为阴性,与 RT-qPCR 检测结果相符。

**2.7 六种检测方法敏感性的比较**

50 份样品中,8 份经 6 种检测方法检测均为阳性,37 份均检测为阴性。38 号和 45 号样品经病毒分离证实为阳性,但经胶体金试纸条检测为阴性,可能是由于胶体金试纸条灵敏度较低所致;45 号样品经抗原捕捉 ELISA 检测结果判为可疑,可能是由于样品保存不当所致。经上述 3 种方法检测均为阴性的 3 份样品(6 号、15 号和 34 号)经核酸扩增为阳性,但仍有 2 份样品(15 号和 34 号)经 RT-PCR 检

22、25、33、38、42、45、48 号病料经 RT-PCR 检测为阳性,PCR 产物大小和预期相符为 599 bp,其他病料未见扩增片段,结果为阴性。

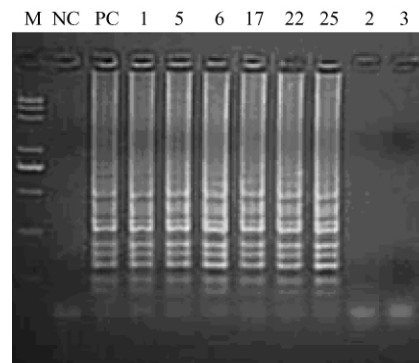


图 4 猪瘟病料 RT-LAMP 检测结果

Fig. 4 Detection of CSFV in clinical samples by RT-LAMP. M; Trans 2K Plus II DNA marker; NC; Negative control; PC; Positive control; 1, 5, 6, 17, 22, 25; Positive; 2, 3; Negative.

测为阴性。RT-qPCR 和 RT-LAMP 检测结果完全相符(表 2)。根据以上实验结果,敏感性最高的检测方法是 RT-qPCR 和 RT-LAMP,其次为常规 RT-PCR、病毒分离、抗原捕捉 ELISA 和胶体金免疫层析试纸条。

表 2 6 种检测方法检出阳性样品数比较

Table 2 Comparative detection of CSFV using virus isolation (VI), colloidal gold immunochromatographic assay (CGIA), antigen-capture ELISA (AC-ELISA), RT-PCR, TaqMan real-time RT-PCR (RT-qPCR) and RT-LAMP in clinical samples

No.	CGIA	AC-ELISA	VI	RT-PCR	RT-qPCR	RT-LAMP
1	+	+( $OD_{450} = 1.082$ )	+	+	+(Ct = 22.18)	+
5	+	+( $OD_{450} = 0.983$ )	+	+	+(Ct = 23.76)	+
17	+	+( $OD_{450} = 1.129$ )	+	+	+(Ct = 21.35)	+
22	+	+( $OD_{450} = 0.856$ )	+	+	+(Ct = 25.12)	+
25	+	+( $OD_{450} = 0.876$ )	+	+	+(Ct = 25.05)	+
33	+	+( $OD_{450} = 0.926$ )	+	+	+(Ct = 24.08)	+
42	+	+( $OD_{450} = 0.952$ )	+	+	+(Ct = 24.82)	+
48	+	+( $OD_{450} = 0.812$ )	+	+	+(Ct = 25.96)	+
38	-	+( $OD_{450} = 0.450$ )	+	+	+(Ct = 27.05)	+
45	-	±( $OD_{450} = 0.294$ )	+	+	+(Ct = 28.28)	+
6	-	-( $OD_{450} = 0.161$ )	-	+	+(Ct = 29.07)	+
15	-	-( $OD_{450} = 0.106$ )	-	-	+(Ct = 30.35)	+
34	-	-( $OD_{450} = 0.104$ )	-	-	+(Ct = 30.66)	+
Other samples	-	-( $OD_{450} < 0.200$ )	-	-	-(No Ct)	-
Total	8/50	9/50	10/50	11/50	13/50	13/50

### 3 讨论

在对猪瘟进行诊断时,病毒分离一直被认为是确诊猪瘟的“金标准”<sup>[11]</sup>。由于猪瘟病毒在培养细胞中增殖滴度较低,且不产生细胞病变效应(CPE),因此需要再通过免疫荧光试验(IFA)或过氧化物酶单层试验(IPMA)<sup>[12]</sup>进行检测是否有猪瘟病毒。目前用于分离猪瘟病毒的细胞主要是 PK15 和 SK6 细胞系。尽管病毒的分离和鉴定所需时间较长,且对操作者技术要求较高和易受检测者主观因素影响,但在猪瘟爆发时它仍然是对猪瘟进行确诊的必不可少的检测方法。猪瘟病毒进行分离时,病料保存的好坏、影响着病毒分离的成功与否。在本研究中 50 份病料采用病毒分离的方法确诊 10 份为阳性,而通过更为敏感的 RT-qPCR 检测有 13 份阳性,3 份样品病毒未分离成功很可能是由于病料保存不当引起的。所以采用病毒分离方法进行确诊猪瘟时,采集的病料要及早送往实验室,这样才能保证检测结果的准确性。

胶体金免疫层析检测技术是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新型体外诊断技术<sup>[13]</sup>,该诊断方法最大的优点就是简便快速,且适合基层的应用,通常将处理好的样品加入试纸条的样品孔,20 min 内即可判定结果。该方法的不足之处就是敏感性较低。本研究中采用胶体金试纸条检测方法在 50 份样品中检测出 8 份样品为阳性,与病毒分离方法相比,2 份样品未检出,可能是由于试纸条敏感性低所造成的。在临床上怀疑是猪瘟病毒感染时,结合猪瘟特有的临床症状和病理变化,可以作为辅助检测方法进行确诊。猪瘟病毒抗原捕捉 ELISA 检测具有快速、准确性高的优点,且适合进行大批量检测,受个人操作影响较小,结果具有可重复性,但其检测的敏感性也相对较低<sup>[14]</sup>,对检测样品的要求较高,如果病料保存不当,容易出现假阴性的结果。基于抗原检测为基础的胶体金免疫层析试纸条和抗原捕捉 ELISA 检测方法,由于其检测的敏感性低,主要适合于畜群检测,不适合个体检测。

RT-PCR 和 RT-qPCR 检测方法的敏感性高,在许多实验室这两种方法已经成为常规的检测 CSFV 的方法。同病毒分离方法相比,病毒核酸在猪感染

CSFV 的早期即可检测到<sup>[15]</sup>。RT-qPCR 的敏感性比 RT-PCR 更高,且能对病料中病毒核酸的拷贝数进行定量检测。CSFV 是 RNA 病毒,由于 RNA 易于降解,因此从病料中提取 RNA 这一步是实验成功的关键步骤<sup>[16]</sup>。不同厂家生产的 RNA 提取试剂盒对不同样品(细胞培养物、血清、血浆、全血和组织)中 RNA 的提取效率不同,因此针对不同的检测样品要选择提取 RNA 效率高的试剂盒。和其他检测方法相比,PCR 检测方法尽管敏感快速,但操作不当容易出现假阳性和假阴性的结果。出现假阳性的主要原因是样品模板之间的交叉污染;出现假阴性的原因主要在于在提取病毒核酸时由于操作不当引起的核酸降解。总之,RT-PCR 和 RT-qPCR 检测方法具有检出率高、准确性好的优点,检测时间也较短(4-6 h)。检测样品数量较少时,这两种检测方法可以作为首选。

RT-LAMP 是 2000 年发明的一项恒温核酸扩增技术<sup>[17]</sup>。该技术特异性强、灵敏度高、成本低。由于这种检测方法不需要 PCR 仪,仅需要一个恒温水浴锅即可完成核酸的扩增,因此特别适合基层部门的应用。本实验用 RT-LAMP 检测方法对 50 份样品进行检测,检测结果与 RT-qPCR 结果相符。在基层缺乏 PCR 仪的实验室可以采用这种方法对猪瘟病毒进行检测。由于其灵敏度高,因此在操作时要谨慎小心,操作不当很容易出现假阳性。

在上述 6 种检测猪瘟病毒方法中,其中病毒分离是诊断猪瘟的“金标准”,通过其他方法检测结果为阳性的病料,最好再采用病毒分离的方法进行符合检测,这样不仅有利于对猪瘟的最终确诊,而且分离的病毒还有助于进行猪瘟病毒的分型和流行病学分析。3 种核酸检测方法由于其敏感性高,可以作为检测猪瘟病毒的首选方法,RT-LAMP 方法由于不需要 PCR 仪,可以在基层推广使用。抗原捕捉 ELISA 和胶体金试纸条由于其敏感性较低,主要适合对畜群进行检测,不适合进行对单个样品进行检测。

### 参考文献

- [1] Moennig V. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Veterinary Microbiology*, 2000, 73(2-3):93-102.

- [ 2 ] Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *The Veterinary Journal*, 2003, 165(1):11-20.
- [ 3 ] 彭伍平. 利用噬菌体展示技术鉴定猪瘟疫病毒 E2 蛋白抗原表位. 中国农业科学院硕士学位论文, 2007.
- [ 4 ] 金美伶. 猪瘟疫病毒 JL-1(06) 株的分离鉴定及其全基因组序列分析. 延边大学硕士学位论文, 2008.
- [ 5 ] Kameyama K, Sakoda Y, Tamai K, Igarashi H, Tajima M, Mochizuki T, Namba Y, Kida H. Development of an immunochromatographic test kit for rapid detection of bovine viral diarrhea virus antigen. *Journal of Virological Methods*, 2006, 138(1-2):140-146.
- [ 6 ] 王向鹏, 孙元, 杨增岐, 仇华吉. 检测猪瘟疫病毒野毒的胶体金免疫层析方法的建立. *中国预防兽医学报 (Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine)*, 2010, 32(6):441-445.
- [ 7 ] 赵建军. 鉴别猪瘟疫病毒野毒株和兔化弱毒疫苗株的复合实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立与评价. 中国农业科学院硕士学位论文, 2007.
- [ 8 ] Zhao JJ, Cheng D, Li N, Sun Y, Shi ZX, Zhu QH, Tu CC, Tong GZ, Qiu HJ. Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology*, 2008, 126(1-3): 1-10.
- [ 9 ] 李国新, 李娜, 仇华吉, 朱庆虎, 李艳, 王明杰, 李继昌, 童光志. 猪瘟疫病毒石门株基因组全长 cDNA 的克隆与序列分析. *中国预防兽医学报 (Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine)*, 2006, 28(3): 275-278.
- [ 10 ] 张兴娟, 孙元, 刘大飞, 仇华吉. 猪瘟疫病毒野毒株 RT-LAMP 可视化检测方法的建立. *中国预防兽医学报 (Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine)*, 2009, 31(11):864-868.
- [ 11 ] Greiser-Wilke I, Blome S, Moennig V. Diagnostic methods for detection of classical swine fever virus—status quo and new developments. *Vaccine*, 2007, 25(30):5524-5530.
- [ 12 ] Anonymous. Classical swine fever. European Union diagnostic manual for classical swine fever (CSF) diagnosis. 2<sup>nd</sup> eds. Germany: Hanover, 2002: 15-19.
- [ 13 ] Tanaka R, Yuhi T, Nagatani N, Endo T, Kerman K, Takamura Y, Tamiya E. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 385(8): 1414-1420.
- [ 14 ] Dewulf J, Koenen F, Mintiens K, Denis P, Ribbens S, Kruif A. Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. *Journal of Virological Methods*, 2004, 119(2):137-143.
- [ 15 ] Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirmeler H, Depner K. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *Journal of Virological Methods*, 2005, 130(1-2):36-45.
- [ 16 ] Blacksell SD, Khounsy S, Westbury HA. The effect of sample degradation and RNA stabilization on classical swine fever virus RT-PCR and ELISA methods. *Journal of Virological Methods*, 2004, 118(1):33-37.
- [ 17 ] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12):e63.

# Comparison of six detection methods for classical swine fever virus

Xiangpeng Wang<sup>1,2</sup>, Xingjuan Zhang<sup>2</sup>, Yuan Sun<sup>2</sup>, Na Li<sup>2</sup>, Fan He<sup>2</sup>, Tianming Chang<sup>2</sup>, Hongyu Li<sup>2</sup>, Zengqi Yang<sup>1\*</sup>, Huaji Qiu<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(<sup>2</sup> Division of Swine Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] We investigated the advantages and disadvantages of six methods to detect classical swine fever virus (CSFV). [ **Methods** ] We used six methods, including the virus isolation, colloidal gold immunochromatographic assay (CGIA), antigen-capture ELISA (AC-ELISA), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), TaqMan real-time RT-PCR (RT-qPCR) and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP), to detect CSFV in 50 samples parallelly. [ **Results** ] The results showed that 13 samples were detected positive by RT-qPCR and RT-LAMP, 11 by PCR, 10 by virus isolation, 9 by AC-ELISA and 8 by CGIA, and 8 samples were detected positive and 37 samples negative by the six methods. [ **Conclusion** ] These results indicated that the 3 RNA-amplification assays could be used as the first choice for detection of CSFV due to the high sensitivity, while they were vulnerable to false positive results arising from sample to sample contaminations or from other contaminated sources. Although the virus isolation was time-consuming, it was still considered the “gold standard” and was indispensable for confirming CSF outbreaks. The rest two methods, AC-ELISA and CGIA, yielded the results in a short time yet their performance was hampered by a low sensitivity. Therefore, they were mainly used for herd diagnosis and not suitable for individual test for CSFV infection.

**Keywords:** classical swine fever virus; detection methods; advantages and disadvantages

(本文责编:王晋芳)

---

Supported by the National Key Projects of Science & Technology Supporting Programs (2006BAD06A03)

\* Corresponding authors. Zengqi Yang, Tel: +86-29-87091106, Fax: +86-29-87091032, E-mail: yzq1106@nwsuaf.edu.cn; Huaji Qiu, Tel/Fax: +86-451-85935041; E-mail: huajiqiu@hvri.ac.cn

Received: 10 January 2010/Revised: 15 March 2010