

免疫学和分子生物学技术在猪传染性胃肠炎诊断中的应用进展

谢立兰¹,方六荣²,方华为¹,张军林¹,安康²,肖少波^{2*}

(1. 武汉生物工程学院 应用生物技术研究中心,武汉 430415;2. 华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室,武汉 430070)

[收稿日期] 2015-12-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 02-0056-07 [中图分类号] S852.65

[摘要] 近年来,与猪传染性胃肠炎(TGE)类似的肠道传染病日益增多,以病理组织学观察和临床症状为主要指标的传统方法已不能进行准确的判断,众多学者建立了大量的免疫学和分子生物学新方法。文章就主要免疫学技术(病毒中和实验、酶联免疫吸附试验、胶体金技术)和分子生物学技术(反转录-聚合酶链式反应、反转录环介导等温扩增技术、基于纳米颗粒和DNA探针技术的超灵敏PCR方法)在TGE诊断中的最新应用研究进行了综述,以期为进一步防控该病提供参考。

[关键词] 猪传染性胃肠炎;免疫学技术;分子生物学技术;诊断

基金项目: 国家自然科学基金(31402181)

作者简介: 谢立兰,讲师,从事动物病毒分子生物学与免疫学研究。

通讯作者: 肖少波。E-mail: vet@mail.hzau.edu.cn

液一般都采用静置培养,因而表2接入菌数所占比例完全能覆盖兽用生物制品种子液常用的1%~3%接菌量^[3],表明按此标准的接菌量对整个振荡培养中培养菌数影响不大。

由生长曲线获得的细菌培养参数,在此参数下可得出研制的合成培养基批次间相对稳定,培养菌数优于普通肉汤。由于牛肉汤难以质量标准化,因此3批普通肉汤培养菌数差异大^[3-4]。同时运用合成培养基培养的菌体对小鼠的安全检验及对家兔的免疫攻毒结果与普通肉汤一致,符合《规程》^[3]中“仔猪副伤寒活疫苗制造及检验规程”的要求。另外合成培养基保存28 d,其培养菌数与当天新配制培养基一致。因此,初步试验表明,研制的合成培养基质量稳定,培养菌数高,而且不改变菌体的安全性及免疫原性,可替代普通肉汤。当然,合成培养基在发酵生产中的实用性有待进一步研究。

本文采用实验室最常用的培养器具(试管和三角瓶),首次系统建立了静置和振荡培养仔猪副伤寒活疫苗生产用菌株的生长曲线。明确了37℃静置培养24 h或37℃、200 r/min振荡培养12 h,可

获得培养菌体稳定期。在此参数下,初步完成了培养基的比较筛选和应用评价。上述工作的完成,为我国兽用细菌类疫苗合成培养基的筛选研究提供了经验借鉴,从而进一步为实现兽用细菌类疫苗高密度培养工艺化改造奠定基础。

参考文献:

- [1] 刘芹防,崔尚金.猪沙门氏菌病原学、流行病学、诊断及防治进展[J].猪业科学,2009,12:24-28.
- [2] 陆承平.兽医微生物学(第四版)[M].北京:中国农业出版社,2007:107-113.
- [3] 农业部兽用生物制品规程委员会.中华人民共和国兽用生物制品规程(二〇〇〇版)[S].
- [4] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995:6-181.
- [5] 张培德,夏晴,陈石根.一种适合于溶葡萄球菌酶发酵生产和分离纯化的半合成培养基的建立[J].复旦学报(自然科学版),1996,2:157-162.
- [6] 中国兽药典委员会.中华人民共和国兽药典三部(二〇一〇版)[S].
- [7] 杨正时,房海.人及动物病原细菌学[M].石家庄:河北科学技术出版社,2003:497-544.

(编辑:侯向辉)

Progress on the Application of Immunology and Molecular Biology Techniques in Diagnosing of Transmissible Gastroenteritis

XIE Li - Lan¹, FANG Liu - Rong², FANG Hua - wei¹, ZHANG Jun - lin¹, AN Kang², XIAO Shao - bo^{2*}

(1. Center of Applied Biotechnology, Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan 430415, China;

2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: With the increase of viral diarrhea of pigs, it's difficult to make accurate diagnosis for transmissible gastroenteritis (TGE) by the traditional methods depending on pathological changes and clinical symptoms. In recent years, many scholars have done a lot of research about the diagnosis and detection methods of TGE, especially in immunological methods and molecular biology techniques. Accordingly, some immunological methods (virus neutralization, ELISA, immune colloidal gold technique) and molecular biology techniques (RT-PCR, reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, ultrasensitive nanoparticle DNA probe-based PCR assay) developed in diagnosis of TGE were reviewed and summarized in the thesis, in order to provide reference for the prophylaxis of TGE.

Key words: transmissible gastroenteritis; immunological technique; molecular biotechnology; diagnosis

猪传染性胃肠炎 (Transmissible Gastroenteritis, TGE) 是由猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible Gastroenteritis Virus, TGEV) 引起的以严重腹泻、呕吐和脱水为临床特征的传染病,是危害世界养猪业的重要疾病之一^[1]。该病由 Doyle 和 Hutchings 于 1946 年在美国首次报道,几年之内在世界各个国家和地区均有发现。为此,各国学者对 TGE 的诊断方法进行了大量研究,并建立了病毒分离、荧光抗体技术、免疫电子显微镜技术、病毒中和试验、酶联免疫吸附试验、核酸探针和多聚酶链式反应等大量方法^[2]。近年来,该病在我国的发病率呈上升趋势,疫区也逐步扩大,并与猪轮状病毒病、猪流行性腹泻混合感染,给养猪业造成了严重的经济损失^[3],国内学者对 TGE 的诊断特别是该病与其他肠道腹泻病毒病的鉴别诊断方法进行了进一步的研究,诊断方法主要集中于免疫学方法和分子生物学方法。本文就近年来诊断该病的免疫学和分子生物学技术进行综述,为进一步深入研究提供参考。

1 免疫学方法

1.1 病毒中和实验 Carbery 等人于 1969 年根据病毒与相应的抗体结合后会失去对易感动物或细

胞的致病力的原理建立了病毒中和实验 (virus neutralization, VN),该方法以直观性著称,长期以来被广泛用于多种病毒病的检测。然而,一些研究表明用中和实验检测 TGEV 抗体时,与猪呼吸道冠状病毒 (porcine respiratory coronavirus, PRCV) 抗体存在交叉反应,这可能是因为 TGEV 和 PRCV 的序列相似度较高,导致中和实验检测 TGEV 的特异性不强。此外,Neelson 等^[4]比较了 VN 实验与 ELISA 试验检测 TGEV 抗体,当用细胞培养或肠道分离的 TGEV 感染猪并对其血清进行检测时,结果发现:ELISA 检测阳性结果比 VN 实验检测阳性结果分别早 3 d 和 1 d,表明病毒中和实验的敏感性不强^[5]。综上可见病毒中和实验在用于检测 TGEV 时表现出了特异性差和敏感性不强等缺点,因此限制了该方法在 TGE 诊断中的进一步应用。

1.2 ELISA 试验 ELISA 试验较之以往的血清学方法 (如:VN 实验) 具有敏感性高、特异性强和高通量检测样本等特点,是当前应用最广泛的一种免疫学检测方法。周仲芳等于 1997 年率先以杆状病毒表达的 TGEV 纤突蛋白 (S 蛋白) 建立了阻断 ELISA 方法检测 TGEV^[6],并进一步证实该方法可

用于 TGEV 和 PRCV 的鉴别诊断^[7]。Carmen 等进而运用 Svanova Biotech 公司的 TGEV/PRCV 阻断 ELISA 试剂盒检测了大量样本,证实阻断 ELISA 方法用于 TGEV 的血清学检测方法可靠、简便^[8],奠定了该方法为进出口检验检疫中常用方法的重要地位。由于运用纯化的全病毒作为包被抗原建立的试剂盒^[8]存在抗原获得量低,纯化困难等缺点,López 等对鉴别 TGEV/PRCV 的阻断 ELISA 方法进行了优化^[9]。PRCV 与 TGEV 的唯一区别在于 PRCV 的 S 基因中缺失 B、C 位点,根据该原理利用杆状病毒表达 S 蛋白建立的抗原捕获阻断 ELISA 方法检测 TGEV,通过对 600 份血清样品进行检测发现,其检测结果与单独检测 TGEV 和 PRCV 的已有商品试剂盒 100% 吻合,对两种病毒检测的特异性分别达到 100% 和 92.06%^[9]。近期,国内学者尹杰等人则以表达、纯化的 TGEV S 基因 B、C 抗原基因的重组蛋白作为诊断抗原建立了检测 TGEV 抗体的间接 ELISA 方法,该间接 ELISA 方法特异性和重复性良好,敏感性比血清中和试验高,有望用于 TGEV 的保护性抗体水平检测^[10]。

由于已建立的阻断 ELISA 商品化诊断试剂盒价格昂贵,不适于我国临床诊断的广泛应用^[11]。近几年来国内学者对 TGEV 的 ELISA 检测方法进行了大量研究。基于病毒蛋白作为包被抗原的主要成果有:宋振辉等应用表达的重组 TGEV 衣壳蛋白(N 蛋白)建立了间接 ELISA 方法^[11],通过对 62 份血清样品进行检测发现,该方法与国外 Svanova TGEV/PRCV 试剂盒的符合率为 93.5%。类似的,屈月^[12]选用抗 TGEV N 蛋白的单抗和多抗血清建立双抗体夹心 ELISA 方法,该方法具有较好的稳定性和准确性,与其他猪病病毒反应无交叉性。另外,牟春晓等以 S 基因主要抗原位点 A 和 D 为基础建立了间接 ELISA 方法,该方法与纯化的 TGEV 包被的间接 ELISA 的符合率也较好^[13]。另一方面,考虑到当前申报的 TGEV 抗体 ELISA 检测试剂盒均检测血清中 IgG 抗体,而分泌性免疫球蛋白 A (IgA)在肠道黏膜免疫起着重要作用,是肠道免疫中的主要抗体分子,且韩国已经研制出了检测乳汁

PED - IgA 抗体的 ELISA 试剂盒。我国的蒋凤英^[14]和闫贵伟^[15]等分别以纯化的 TGEV 和重组的 N 蛋白为抗原建立了猪母乳抗 TGEV IgA 抗体检测方法,对 TGEV 阳性乳汁样品的最低检测浓度分别为 1:320 和 1:160,弥补了猪传染性胃肠炎 IgA 抗体检测空白,具有较好的应用前景^[15]。

1.3 胶体金技术 胶体金免疫技术是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术^[16]。由于具有检测时间短、试剂和样本用量少等特点,胶体金免疫技术在生物学各领域得到了广泛的应用^[16]。畅丹^[17]和屈月^[12]先后采用柠檬酸三钠法制备 20 nm 胶体金颗粒标记抗 TGEV N 蛋白的单克隆抗体(McAb),并分别以纯化的抗 TGEV N 蛋白的多克隆抗体(PcAb)和羊抗鼠 IgG 作为检测线和质控线成功研制出了一种检测 TGEV 的胶体金免疫层析试纸条。该试纸条可检测 100 TCID₅₀的 TGEV 病毒培养液,且 4℃密封保存 90 d 后仍能有效检测样品,适合于基层推广^[17]。常亮等^[18]通过优化胶体金的稀释液等措施对 TGEV 的胶体金快速检测条进行了改进,优化后的试纸条在常温下可保存 1 年,并可检测出 TGE 病料中的 TGEV,检测结果与韩国的商品化试纸条一致,有望用于生产实际。

2 分子生物学诊断

2.1 反转录 - 聚合酶链式反应(RT - PCR)技术

2.1.1 RT - PCR RT - PCR 技术是将病毒 RNA 模板进行反转录,再以反转录产物进行 PCR 以检测病毒的方法^[2]。早在 1997 年,Paton 等^[19]根据 TGEV 和 PRCV 的 S 基因设计引物,成功建立了检测 TGEV 的最早的 RT - PCR 方法。李军等首次在国内对 RT - PCR 反应条件进行优化,建立了可检出 1 pg TGEV RNA 的 RT - PCR 方法,经过对 56 份猪腹泻粪样的检测证实该方法准确、可靠^[20]。此后,一些学者针对病毒的 N 蛋白基因序列也建立了检测 TGEV 的 RT - PCR 方法^[21-22],其中以王黎等报道的方法较好,其检测灵敏度可达 pg 级(10 pg)^[22]。

2.1.2 多重 RT - PCR 多重 PCR 是在一个反应

体系中加入一对以上的引物以同时扩增多种靶序列的方法, 自 Chamberlain 等人首次创立该方法以来^[23], 已被广泛应用于多种病原微生物的同时检测或鉴定。由于与 TGEV 能够产生相似临床症状和病理变化的病原体较多, 而如何在混合感染的样品中同时鉴定多种病原微生物显得非常重要, TGEV 与其他肠道病毒的多重 RT-PCR 也获得了极高的关注。

Kim 等首先建立了同时诊断粪便中 TGEV 和猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 的多重 RT-PCR 方法^[24], 该方法可检测到 10 TCID₅₀ 的最低病毒载量。邹勇等^[25]根据 PEDV S 基因、猪轮状病毒 (porcine group A rota virus, RV) VP7 基因和 TGEV S 基因序列分别设计了三对引物, 建立了最早鉴别 TGEV、PEDV 和轮状病毒的重重 RT-PCR 方法, 该鉴别方法简单、快速、特异性好, 可检测到 1 pg 的 TGEV RNA。Song 等^[26]使用与邹勇等^[25]不同的三对引物对 TGEV、PEDV 和 RV 进行多重 RT-PCR, 并检测了 2004 年 1 月至 2005 年 5 月间韩国的 157 份急性仔猪胃肠炎样品, 再分别与单独检测三种病毒的 RT-PCR 结果比较, 结果显示: 该方法对三种病毒检测的特异性均为 100%, 检测 TGEV 的灵敏度可达 100%。随后等多个研究小组均对检测 PEDV、TGEV 和 RV 的多重 RT-PCR 检测方法进行了进一步的探索和优化^[27-29]。张坤等建立的多重 RT-PCR 方法敏感性较好, 能够检测到 35 pg 的 TGEV-PEDV-RV 三联苗的混合 RNA^[30], 进一步应用该方法对华中地区 75 份腹泻猪粪样进行的检测结果表明该方法的敏感性高、特异性强 (检测 TGEV 的敏感性均为 100%), 可用于腹泻样品中 PEDV、TGEV 和 RV 的检测^[30]。焦洋^[31]在国内首次建立了同时快速鉴别诊断 PEDV、TGEV 和猪博卡病毒 (Porcine bocavirus, PBoV) 的多重 RT-PCR 方法, 经临床样品检测其检测 PEDV、TGEV 和猪博卡病毒的最高敏感度分别为 20 pg、35 pg 和 10 pg, 且特异性均良好, 可以应用于临床检测。Zhao 等^[32]则建立了同时检测 PEDV、TGEV、RV 和猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 的多重 RT-PCR 方法,

其检测病毒敏感性分别为 2.17×10^3 、 2.1×10^3 、 1.74×10^4 和 1.26×10^4 拷贝, 且特异性较好。

2.1.3 巢式 RT-PCR (RT-nPCR) 巢式 RT-PCR 又称套式 RT-PCR, 是在 RT-PCR 的基础上再设计一对或多对引物对模板进行扩增, 进而可以提高反应的敏感性和特异性。检测 TGEV 的 RT-nPCR 方法由韩国学者 Kim 首创^[24], 运用该方法可对 TGEV 和 PEDV 进行鉴别诊断, 并可用于粪便样品的现场直接检测。韩国的 Jung 等人建立了多重 RT-nPCR 同时检测 TGEV 和 PEDV, 该方法对人工感染和自然感染猪的空肠组织中 TGEV 检测的结果与原位杂交技术完全吻合, 且对 TGEV 的检测敏感度可达 2.4×10^{-4} TCID₅₀/mL^[33]。Salem 等进一步建立的多重 RT-nPCR 成功的完成了 TGEV/PEDV/RV 的鉴别诊断, 并运用该方法对 127 份样品进行了检测^[34]。

2.1.4 荧光定量 RT-PCR 传统的 PCR 技术因其不能对病毒核酸进行精准定量而只能进行定性分析, 从而在很大程度上制约了 PCR 检测标准的建立^[35]。近年来, 荧光定量 RT-PCR 方法因其具有定量准确、敏感性更高 (可以检测到几个拷贝/ μ L 的病毒核酸)、特异性更好等优点, 在 TGEV 诊断应用中取得了较大进展^[2]。Chen 等^[36]以 Invitrogen 公司的 LUX (light upon extension, LUX) 引物为基础建立了检测 TGEV 的荧光定量 PCR 方法, 其敏感性比常规 RT-PCR 方法提高了 10 倍。白兴华等^[37]首次以包含部分 N 基因序列的重组质粒为标准品成功建立了 TGEV 的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法, 该方法的检测敏感性达到 15.3 拷贝/ μ L, 优于 Invitrogen 公司的 LUX 引物法。此后, 国内外多个课题组也陆续对检测 TGEV 的荧光定量 RT-PCR 进行进一步探索, 并建立了多个检测灵敏度较高 (检测灵敏度 ≤ 10 拷贝/ μ L) 的快速检测方法^[38-40]。

自 Kim 等^[41]于 2007 年首次建立多重实时荧光定量 PCR 对 TGEV 和 PEDV 进行了同时检测以来, 检测 TGEV 与其他肠道腹泻相关病毒的多重实时荧光定量 PCR 方法取得了较大的进步。陈小金

分别以 PEDV、TGEV、RV 的 ORF3 基因、S 基因和 VP7 基因为靶基因建立了检测 3 种病毒的 SYBR Green-I 实时荧光定量 PCR 方法,最低检测下限分别为 85、68 和 13 拷贝/ μL ,且特异性和重复性良好^[42]。吴洋进一步对这三种病毒的多重实时荧光定量 PCR 进行了优化,检测的灵敏度上取得了很大进步,其检测 TGEV 的最低下限为 32 拷贝/ μL ,已在临床诊断上具有重要意义^[43]。

2.2 反转录环介导等温扩增(RT-LAMP)技术

2000 年,日本科学家 Notomi 等发明了环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP),因该技术具有较高的敏感性与特异性,加之无须特殊仪器设备、操作简单、检测快速等优点,所以它已被广泛应用。RT-LAMP 技术是 LAMP 技术的一种延伸。Li 等首次将这种技术应用于 TGEV 的检测,作者首先根据 TGEV N 基因设计引物建立了 RT-LAMP 方法^[44],该方法可以区分 TGEV、PEDV、RV 和猪伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)的感染,不需要高精尖仪器并且操作流程简单,易于推广。高睿泽进一步对引物进行优化,改进了 TGEV 的 RT-LAMP 快速检测方法,在 63℃ 恒温下作用 50 min,使 TGEV N 基因获得了高效率特异性扩增,可检测到 131.4 fg/ μL 的目标,具有极高的灵敏性^[45]。

2.3 基于纳米颗粒和 DNA 探针技术的超灵敏 PCR 方法(UNDP-PCR)

在动物疾病的诊断中常用的分子生物学方法还有很多,如核酸探针杂交技术等,该方法可以定性或定量检测特异的病毒核酸,在 TGE 的临床诊断中已取得较大进展^[35],并逐步建立了放射性标记探针(P^{32} 和 S^{35} 等)和非放射性标记探针(生物素、辣根过氧化物酶和地高辛等)检测 TGEV 的两大类方法。在病毒感染早期,由于病毒尚未大量复制而导致样本中的病毒载量较低,当其病毒含量低于已有检测方法(如实时荧光定量 RT-PCR 等)的底线时将可能造成检测结果呈假阴性。Huang 等于 2014 年根据生物条形码技术(Biobar code assay, BCA)原理,首次将磁性微粒、金纳米颗粒和核酸探针技术相结合建立了基于纳

米颗粒和 DNA 探针技术的超灵敏 PCR 方法(ultrasensitive nanoparticle DNA probe-based PCR assay, UNDP-PCR)应用于 PCV2 的检测^[46]。该方法是通过先将偶联有特异 DNA 探针的磁性微粒(Magnetic microparticles, MMP)与样品杂交从而富集样本核酸,即放大病毒的模板数量,得到 MMP-病毒核酸复合体;再将包被有病毒特异性核酸识别标签的金纳米颗粒与 MMP-病毒核酸复合体杂交,形成“三明治”模型,使样本核酸的信号得到第二次放大;最后,选择相应的方法把核酸识别标签洗脱下来并作为模板进行 PCR 扩增,由于被洗脱下来的核酸标签是待检核酸信号的放大,因此极大的提高了检测的灵敏度^[46]。运用该方法检测 PCV2 病毒核酸的灵敏度为 10 拷贝/mL,是普通 PCR 的近 500 倍^[46]。随后,该课题组又建立了同时检测 PCV2 和 TGEV 的多重 UNDP-PCR 方法^[47],该方法不仅使 TGEV 检测方法的灵敏度得到了更大的提高(可检测出的最低病毒量为 20 拷贝/mL),同时开创了同时检测 DNA 病毒和 RNA 病毒的超灵敏检测技术,相信该技术将会被迅速运用于不同病毒和不同领域的检测。

3 结语

综上所述,在对 TGE 的实验室诊断技术的研究中,近几年来集中于免疫学方法和分子生物学方法的研究成果较多。其中分子生物学方法因其具有高效、快速、准确等诸多优点而在实验室得到广泛应用,尤其是荧光定量 RT-PCR,比普通的 RT-PCR 更敏感,特异性更高。但受到仪器设备的限制,分子生物学的诊断方法目前还无法应用于临床现地诊断。

近年来,免疫胶体金技术以其灵敏、特异和快捷等特点迅速发展起来,国外已开发出 TGEV 胶体金快速诊断试剂盒,方便快捷,非常适用于临床现地检测。我国建立的 TGEV 胶体金抗体检测试纸条在特异性、灵敏度和稳定性等方面都已取得很大进步,不仅能检测出病料中的 TGEV,且对不同样品的检测结果与韩国的胶体金试剂盒一致^[18],非常适用于基层单位。因此,使诊断试剂商品化是我国

今后发展 TGE 诊断技术的一个方向。同时,因为各种诊断方法都有其优点,也存在不足,在传统检测方法的基础上,多种不同诊断技术综合运用以进一步提高检测灵敏度和特异性也将是今后相关研究的一个重要发展方向。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1997: 671-703.
- [2] 杨金生,刘云志,柴方红,等. 猪传染性胃肠炎诊断技术的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012,39(5):195-198.
- [3] 殷相平,任晓峰,柳纪省. 猪传染性胃肠炎病毒致病机制的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2013,21(1):39-43.
- [4] 王树成,赵祥平,董志珍,等. 二种方法检测猪传染性胃肠炎病毒抗体的比较[J]. 中国畜禽传染病, 1997,(2):32-34.
- [5] Nelson L D, Kelling C L. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of transmissible gastroenteritis virus antibody in swine sera[J]. American Journal of Veterinary Research, 1984, 45(8):1654-1657.
- [6] 周仲芳, Peggy L, 李力复. 杆状病毒表达的猪传染性胃肠炎病毒钉状糖蛋白在其血清学诊断上的应用[J]. 中国兽医科技, 1997,27(8):3-6.
- [7] Sestak K, Zhou Z F, Shoup D I, *et al.* Evaluation of the baculo-virus-expressed S glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) as antigen in a competition ELISA to differentiate porcine respiratory coronavirus from TGEV antibodies in pigs[J]. J Vet Diagn Invest, 1999, 11(3):205-214
- [8] Carman S, Josephson G, McEwen B, *et al.* Field validation of a commercial blocking ELISA to differentiate antibody to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus and to identify TGEV-infected swine herds[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2002, 14(2):97-105.
- [9] López L, Venteo A, García M, *et al.* Antigen-capture blocking enzyme-linked immunosorbent assay based on a baculovirus recombinant antigen to differentiate transmissible gastroenteritis virus from porcine respiratory coronavirus antibodies[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2009, 21(5):598-608.
- [10] 尹杰,杨恒,曹三杰,等. 猪传染性胃肠炎病毒 S 基因 B、C 位点的克隆与表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2015,51(1):7-10.
- [11] 宋振辉,郭万柱,张鸮俊. 猪传染性胃肠炎病毒核衣壳蛋白的表达及在 ELISA 中的初步应用[J]. 农业生物技术学报, 2009,17(2):201-205.
- [12] 屈月. TGEV 双抗体夹心 ELISA 方法建立与胶体金免疫层析试纸条的制备[D]. 东北农业大学,2013.
- [13] 牟春晓,朱立麒,邢宪平,等. 猪传染性胃肠炎病毒基因主要抗原位点和的原核表达及间接检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2015,45(4):356-360.
- [14] 蒋凤英,邹勇,何锡忠,等. 猪母乳中抗猪传染性胃肠炎病毒 IgA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014,36(7):551-554.
- [15] 闫贵伟,库旭钢,陈淑华,等. 猪乳汁中抗猪传染性胃肠炎病毒 IgA 抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2015,37(1):31-34.
- [16] 牟林琳,刘洁,廖园园,等. 犬狂犬病毒抗体胶体金检测试纸卡的研制[J]. 中国兽药杂志, 2015,49(7):26-29.
- [17] 畅丹. 猪传染性胃肠炎病毒胶体金免疫层析试纸条的研制[D]. 东北农业大学,2008.
- [18] 常亮,陈伯祥,杨明,等. 猪传染性胃肠炎免疫胶体金诊断试剂条的研制[J]. 畜牧兽医杂志, 2014,33(6):22-24,27.
- [19] Paton D, Ibata G, Sands J, *et al.* Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus[J]. Journal of Virological Methods, 1997, 66(2):303-309.
- [20] 李军,林继煌,陆承平,等. RT-PCR 检测猪传染性胃肠炎病毒[J]. 中国兽医学报, 2001,21(3):246-248.
- [21] 张作华,曲哲会,陈宏智,等. 传染性胃肠炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2015,(3):131-133.
- [22] 王黎,李碧,周远成,等. 猪传染性胃肠炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用[J]. 中国兽医学报, 2015,35(2):191-194.
- [23] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(23):11141-11156.
- [24] Kim L, Chang K O, Sestak K, *et al.* Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2000, 12(4):385-388.
- [25] 邹勇,钱永清,唐永兰,等. 猪流行性腹泻、猪传染性胃肠炎

- 和猪轮状病毒 RT-PCR 鉴别诊断技术研究[J]. 上海农业学报, 2003,19(2):82-84.
- [26] 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]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 2006, 18(3): 278-281.
- [27] 郭容利, 何孔旺, 倪艳秀, 等. PEDV、TGEV、PARV 多重 RT-PCR检测方法的建立及其应用[J]. 江苏农业学报, 2013,29(5):1065-1069.
- [28] 徐引弟, 张青娴, 李建林, 等. PEDV、TGEV、RV 多重 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽药杂志, 2014,48(11): 10-13.
- [29] 曹玉琴, 付丹, 杨尧, 等. PEDV-TGEV-RV 多重 RT-PCR 鉴别检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2015,45(9): 881-887.
- [30] 张坤. 猪病毒性腹泻多重 RT-PCR 诊断方法的建立和应用及猪轮状病毒的分离[D]. 华中农业大学, 2010.
- [31] 焦洋. 猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪博卡病毒多重 PCR 检测方法的建立[D]. 南京农业大学, 2013.
- [32] Zhao J, Shi B J, Huang X G, *et al.* A multiplex RT-PCR assay for rapid and differential diagnosis of four porcine diarrhea associated viruses in field samples from pig farms in East China from 2010 to 2012[J]. Journal of Virological Methods, 2013, 194(1/2):107-112.
- [33] Jung K, Kim J, Kim O, *et al.* Differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by multiplex RT-nested PCR and comparison with *in situ* hybridization[J]. Journal of Virological Methods, 2003, 108(1):41-47.
- [34] Salem A N B, Chupin Sergei A, Bjadovskaya Olga P, *et al.* Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses[J]. Journal of Virological Methods, 2010, 165(2):283-293.
- [35] 佟有恩, 刘芳萍. 猪传染性胃肠炎诊断技术的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2011,(4):19-22.
- [36] Chen R, Huang W, Lin Z, *et al.* Development of a novel real-time RT-PCR assay with LUX primer for the detection of swine transmissible gastroenteritis virus[J]. Journal of Virological Methods, 2004, 122(1):57-61.
- [37] 白兴华. TGEV TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及其 S 蛋白抗原位点的原核表达[D]. 中国农业科学院, 2007.
- [38] 董玲娟. TGEV Real-time PCR 检测方法的建立及 ORF7 蛋白亚细胞定位和对病毒增殖影响的研究[D]. 西北农林科技大学, 2012.
- [39] Yu Z Y, Xu X W, Sun B, *et al.* Development of taq man-based real-time PCR assay for detecting transmissible gastroenteritis virus and its application in vaccine evaluation[J]. Agricultural Science & Technology, 2014, 15(9): 1487-1490.
- [40] Vemulapalli R, Gulani J, Santrich C. A real-time TaqMan® RT-PCR assay with an internal amplification control for rapid detection of transmissible gastroenteritis virus in swine fecal samples[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 162(1/2): 231-235.
- [41] Kim S H, Kim I J, Pyo H M, *et al.* Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 146(1/2): 172-177.
- [42] 陈小金. PEDV、TGEV、PoRV SYBR Green I 实时荧光 PCR 诊断方法的探索[D]. 中国农业科学院, 2010.
- [43] 吴洋. 猪腹泻相关病毒多重和 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[D]. 东北农业大学, 2014.
- [44] Li P, Ren X. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of transmissible gastroenteritis virus[J]. Current Microbiology, 2011, 62(3):1074-1080.
- [45] 高睿泽, 白云云, 李训良, 等. 猪传染性胃肠炎病毒 RT-LAMP 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2015,45(6): 572-577.
- [46] Huang Y, Zhang X, Du Q, *et al.* Preclinical detection of porcine circovirus type 2 infection using an ultrasensitive nanoparticle DNA probe-based PCR assay[J]. PloS One, 2014, 9(5): e97869.
- [47] Huang Y, Xiang N, Wang Z G, *et al.* Ultrasensitive detection of RNA and DNA viruses simultaneously using duplex UNDP-PCR assay[J]. PloS One, 2015, 10(11): e0141545

(编辑:李文平)