

畜禽重大疫病免疫防制 研究进展

谢庆阁 翟中和 主编



中国农业科技出版社

畜禽重大疫病免疫防制研究进展

谢庆阁 翟中和 主编

中国农业科技出版社

(京)新登字 061 号

图书在版编目(CIP)数据

畜禽重大疫病免疫防制研究进展/谢庆阁,翟中和主编.
北京:中国农业科技出版社,1996.5
ISBN 7-80119-205-2

I. 畜… I. ①谢… ②翟… II. 畜禽-兽疫-免疫学-研究-进展
IV. S852.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(96)第 08536 号

责任编辑	冯志杰
出版发行	中国农业科技出版社 (北京海淀区白石桥路 30 号 邮编:100081)
经 销	新华书店北京发行所发行
印 刷	中央民族大学印刷厂
开 本	787×1092 毫米 · 1/16 印张:15.75
印 数	1—550 册 字数:393 千字
版 次	1996 年 5 月第 1 版 1996 年 5 月第 1 次印刷
定 价	50.00 元

《畜禽重大疫病免疫防制研究进展》编委会

主 编： 谢庆阁 翟中和

副主编： 王长江 邵英德

编 委：（以姓氏笔划为序）

姓 名	职务/职称	工作单位
王长江	调研员	农业部畜牧兽医司
邵英德	处 长	中国农业科学院兰州兽医研究所
沙玉圣	副处长	农业部畜牧兽医司
张喜武	处 长	农业部畜牧兽医司
陈溥言	教 授	南京农业大学
武 华	副 研	中国兽药监察所
郑兆鑫	教 授	复旦大学
蒋金书	教 授	北京农业大学
韩高举	副司长	农业部畜牧兽医司
童光志	研究员	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
谢庆阁	研究员	中国农业科学院兰州兽医研究所
翟中和	院 士	北京大学生命科学学院

序

改革开放以来,我国畜牧业取得了举世瞩目的成就。到80年代后期,肉、蛋已基本达到了供需平衡,扭转了长期以来供给严重紧缺的局面。1995年肉、蛋、奶产量分别达到5000万吨、1677万吨和873万吨,分别比1978年增长4.8倍、6.2倍和5.9倍,肉、蛋产量已名列世界首位。肉、蛋、奶人均占有量也迅速上升,1995年分别达到41.2公斤、13.8公斤和5.5分斤,肉、蛋人均占有量已超过世界平均水平。畜牧业已成为发展农村经济,增加农民收入,带动农民致富奔小康的支柱产业。

然而,畜禽疫病一直是畜牧业发展中一个非常突出的问题。目前,我国猪、鸡的死亡率分别为10%和20%~30%,两种畜禽因病死亡所造成的经济损失每年高达数百亿元。纵观国内外疫病防治技术的发展,免疫预防是控制和消灭畜禽疫病的最重要的手段之一。多年来,国家为此投入了巨大的财力进行研究,并收到了良好的经济效益。但是,由于对基础性研究,尤其是应用基础研究重视不够,很难在提高重大疫病免疫防制的研究水平和改进免疫防制手段上产生重大突破,致使一些长期困扰畜牧业发展的重大疫病未得到有效的控制和消灭,甚至有蔓延、扩大的趋势,如猪瘟、鸡新城疫等。随着国际交往的增多,又传入了一些新病,更增加了兽医防疫的难度。1994年,在国家科委的大力支持下,“畜禽重大疫病免疫防制基础研究”被列为国家攀登计划工程与技术研究科学重大基础研究项目,这是兽医界的一件大喜事,对兽医工作者也是一个很大鼓舞。该研究项目紧紧抓住影响疫病免疫预防技术水平的抗原分析与选择、抗原浓缩、抗原大量繁殖和免疫修饰剂等关键技术环节进行研究,无疑是抓住了疫病防制技术的核心。

为了进一步提高研究工作的水平,项目首席科学家组织承担专题任务的研究人员撰写了《畜禽重大疫病免疫防制研究进展》一书。不难看出作者查阅了大量的国内外资料,调查研究了生产实际中存在的主要问题,并进行了深入的分析和阐述,具有较高的学术水平,对该项目及相关项目的研究工作具有重要的指导作用。希望通过攀登计划实施项目,能在畜禽重大疫病防制技术上取得重大突破,为保障我国畜牧业的持续稳定发展,争取到2000年新增1000万吨肉类做出较大的贡献。

曾动陆

一九九六年五月八日

前 言

我国兽医科技领域中的一个重要研究项目——畜禽重大疫病免疫防制基础研究,在农业部畜牧兽医司的精心组织下,经过众多兽医学专家和广大同行专家的努力,通过了多轮论证和答辩,于1994年在国家科委立项,纳入了攀登计划B类项目工程与技术科学重大基础性研究计划。众所周知,攀登计划是我国最高层次的科学研究计划之一。该项目的确立,是国家科委对兽医科学事业的重视和支持,也是我国兽医科技界的一件大喜事。作为项目专家委员会的首席科学家,我愿借《畜禽重大疫病免疫防制研究进展》一书出版之际,代表参加本项目研究的广大兽医科技工作者和相关科研人员,向国家科委和曾关心支持该课题立项的专家、学者致以深切的谢意。

根据项目建议书和计划任务书的要求,畜禽重大疫病免疫防制基础研究以危害性最大的畜禽病毒病为主要研究对象,兼顾畜禽寄生虫病,针对重大疫病免疫防制中存在的共性问题开展基础研究和基础性工作。其研究成果应起到牵一发而动全身的效应,全面提高我国兽医防疫水平。应该说,这个要求是很高的,甚至是很难达到的。研究的关键是找出重大疫病中带全局性的共性问题。综观国内外动物疫病防制的现状和发展趋势,研究的核心就是研制和正确使用安全有效的疫苗。比较国内外动物用疫苗的生产和应用状况,我们确定了三个主攻方向。第一是病毒遗传变异,第二是抗原制造和浓缩工艺,第三是免疫修饰剂。该项目的4个课题11个专题就是根据这个思路设立的。课题1研究重要畜禽病毒的遗传变异,以猪瘟和鸡新城疫等重要畜禽病毒为材料,分析不同时期流行毒株的核酸差异和抗原变化,建立参考毒株库;课题2研究抗原制造和浓缩工艺,以重要畜禽病毒为材料,研究影响病毒复制的因素,选用新的细胞株和培养液,开发抗原浓缩的物理、化学和生物学方法;课题3研制免疫修饰剂,包括疫苗用佐剂、免疫增强剂、抗原保护和稀释剂;课题4研究重要寄生虫的体外培养技术和免疫机理,该题在项目中独立性较强,但与前三个课题亦有内在联系,研究结果可以互为应用。

为了准确地把握研究方向和重点,项目专家委员会顾问翟中和院士曾提议,在开题前,每个子专题负责人撰写一篇本子专题的综述文章,汇集成册,既可以使研究者熟悉相关论题的现状,又可供同行参考。专家委员会采纳了他的建议,本书就是这些综述文章的汇编。全书收录文章20多篇,内容涉及重要畜禽

病毒的分子结构、基因组功能、抗原组成、致病机理和免疫应答;抗原制备和浓缩工艺;免疫修饰剂的研制、开发和利用;某些重要畜禽寄生虫病的防制现状和免疫研究。从文章的结构、内容和文字叙述来看,每篇综述都是经过仔细斟酌后才发稿的。但是由于编者的知识深度和广度所限,只对少数文章作了微小的删改和补充,对多数文章未敢妄动,均予全文录用。这样做也有好处,可以充分发扬学术民主,尊重作者的学术观点,求同存异,活跃学术气氛。例如,一个子专题往往有两个以上的作者在异地同时撰文,在同一个问题上导出截然不同的结论,但他们都有资料依据。所以在阅读本书时,凡遇此种情况,请读者认真琢磨,并欢迎作者交换看法和批评指正。

最后,在此书即将出版之际,我们不应忘记该研究项目的建议人殷震院士、孔繁瑶教授和蔡宝祥教授。三位兽医界德高望重的专家虽未承担本项目研究任务,但为该项目的上马提出了有份量的建议。他们这种甘为人梯,让后来人攀登兽医科技高峰的精神十分令人敬佩并永远值得我们学习。

谢庆周

一九九六年三月

目 录

第一篇 重大畜禽疫病病毒遗传变异

口蹄疫病毒的抗原变异·····	卢永干等(3)
口蹄疫病毒抗原位点研究及应用·····	赵启祖等(14)
FMDV 基因组分析和抗 FMDV 疫苗·····	丁恩雨等(24)
猪瘟和猪瘟病毒分子生物学·····	付烈振等(32)
猪瘟病毒及其疫苗研究·····	丁明孝等(41)
猪瘟病毒和猪瘟的防制·····	刘湘涛等(51)
猪瘟防制研究的回顾与展望·····	王在时(64)
鸡传染性法氏囊病病毒的分子生物学·····	刘 爵等(93)
鸡新城疫病毒遗传变异·····	曹殿军等(102)
鸡传染性支气管炎病毒的分子生物学研究·····	江国托等(111)

第二篇 高浓度抗原制造工艺

高浓度口蹄疫病毒抗原制造工艺·····	张永光等(121)
提高制苗抗原浓度的物理与化学技术研究·····	张益民等(131)

第三篇 免疫修饰剂

免疫佐剂研究·····	龚人雄等(143)
免疫刺激复合物·····	支海兵(151)
免疫增强剂研究·····	支海兵(161)
抗原保护剂及其稀释液研究·····	王 栋等(169)

第四篇 寄生虫体外培养技术和免疫机理

鸡球虫免疫学研究·····	蒋金书等(181)
球虫体外培养·····	蒋金书等(191)
旋毛虫体外培养·····	窦兰清等(208)
旋毛虫感染的免疫应答及免疫机理·····	柴忠威等(218)

附录

畜禽重大疫病免疫防制基础研究项目专家委员会名单·····	(241)
畜禽重大疫病免疫防制基础研究项目管理办法·····	(242)

第一篇

重大畜禽疫病病毒遗传变异

口蹄疫病毒的抗原变异

卢永干

(中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州 730046)

口蹄疫(FMD)位列国际兽疫局(OIE)公布的烈性传染病 A 表之首,其病原为口蹄疫病毒(FMDV),可感染猪、牛、羊等 30 多种偶蹄动物。几个世纪以来,在全世界范围内无数次爆发和流行,造成了巨大的经济损失。本世纪初,曾因恶性 FMD 肆虐使欧洲的牧场主谈“虎”色变。口蹄疫对畜牧业生产造成的危害十分严重。

FMD 病毒除直接接触传染外,水、空气及各种染毒草料物品都可能传播疫病。康复动物可能长期带毒,肉类及其它畜产品都可能成为 FMD 的疫源,再加 FMD 病毒的多型性,使防控工作十分艰难。FMD 流行对成年动物的死亡率虽不很高,但由此引起肉、奶产量的减少相当可观。一旦发生 FMD,必须采取封锁隔离疫点疫区,扑杀销毁或无害化处理病畜和可疑的感染动物,消毒处理皮、毛、肉品和畜舍及环境,加强检疫,禁止或限制动物流动和畜产品流通,以及每年定期给畜群进行免疫接种等防制措施。这样必然要耗费巨大的人力、物力、财力。FMD 还导致禁止活畜和肉类及其它畜产品的出口贸易,造成的经济损失和政治影响则更大。

一、FMD 病毒的结构和抗原位点

FMD 病毒属于小 RNA 病毒科,呈球形,直径 30nm 左右,分子质量 $6.9 \times 10^6 \text{u}$,由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 四种结构蛋白的各 60 个拷贝构成的衣壳,包裹着一条单股正链 RNA 组成。完整病毒颗粒的沉降系数为 146S。中空病毒颗粒(空衣壳)的沉降系数为 75S。在结构上,75S 颗粒与完整病毒颗粒相似,也是由结构蛋白 VP0(未裂解的 VP2 和 VP4),VP1 和 VP3 各 60 个拷贝组成,但不含 RNA。亚病毒颗粒(衣壳亚单位)的沉降系数为 12S,它是 VP1、VP2 和 VP3 的五聚体。将完整病毒颗粒重悬在酸性介质中,或加热可获得 12S。

FMD 病毒基因组由大约 8500 个核苷酸组成的单链线状 RNA。从 5'-末端大约 2000bp 开始为病毒蛋白编码区。编码结构蛋白 VP4、VP2、VP3 和 VP1 的基因区段分别命名为 1A、1B、1C 和 1D(跨越第 2000~4000bp)。比较分析 7 个不同血清型 FMD 病毒基因组核苷酸序列后发现,1C 和 1D 区段变异最大。FMD 病毒的型别(抗原差异)是由病毒粒子外部构象决定的,即抗原的差异是由蛋白结构决定的。那些决定病毒抗原性的蛋白结构小区段被称为抗原位点。实验表明,对胰酶敏感的 FMD 病毒抗原位点集中在显示血清型差异的 VP1 上^[10]。Strohmer 等^[38]证明,由 VP1 的第 146~154 和第 201~213 氨基酸构成 FMD 病毒抗

原位点。Rowlands 等^[33]通过对 4 个 A₁₂ 突变株的研究证实, VP1 第 141~160 氨基酸是 FMD 病毒的主要抗原位点。更多的研究资料证明, VP1 第 40~60, 129~171, 193~204 残基是潜在的, 有决定意义的抗原位点。许多 O、A 和 C 型毒株在这些区段的氨基酸组成不同, 构成型的抗原差异^[6, 11, 12, 27, 44]。

由于杂交瘤细胞培养的成功和在 FMD 病毒研究中的应用, 建立了许多细胞株, 并由它们获得一系列只与单个抗原位点起反应的抗体, 即单克隆抗体, 从而使有关 FMD 病毒表面抗原的研究更加简捷有效。谢庆阁和 McCahon 等^[45]; Stave^[37]利用中和单克隆抗体分别测定了 O1 Kaufbeureu 和 O1 Brugge 病毒的表面抗原位点。这两个小组的研究证明, 在病毒表面有三个空间位置截然不同的抗原位点。值得重视的是, 其中二个是由两个或多个衣壳蛋白区段折叠在一起形成的构象所决定的。并且发现, 在多克隆抗体中, 只要与某病毒的三个抗原位点中的任何一个起反应, 就能中和那个病毒。在常规亚型鉴定时, 共同享有一个抗原位点的病毒属一个亚型; 而与二个不同亚型的参考毒株拥有共同抗原位点的野毒株, 可能被定为两个亚型。由此推理, 某些野毒株可能与三个参考毒株拥有共同的抗原位点, 那么这些毒株可能定为三个亚型, 这必然造成亚型鉴定的混乱。假如 FMD 病毒粒子表面有三个以上空间位置分离(独立)的抗原位点, 而且各自呈现不同的特性, 那么一维亚型分类的基本原理是绝对不能成立了。参看图 1, 野毒株 X、Y、Z 可能被鉴定为一个以上亚型。

二、FMD 病毒的血清型和亚型

多型性是 FMD 病毒的主要特点之一。法国学者 Vallee 和 Carre(1922)最先发现和证实 FMD 病毒具有免疫生物学多型性。即动物无论感染哪一型(如 A 型或 O 型)FMDV 后, 发病的临床症状和病理解剖特征相同, 但病愈后动物只遗留有对引起疾病的这一型病毒的免疫性。这种多型性概念使以往 FMD 流行过程中见到的同一头牲畜可在短期内反复发生典型 FMD 的现象得以解释。这两位学者以法国 Oise 和德国 Ardonnen 两个行政区名的第一个字母 O 和 A 命名当时已发现的两个型。德国学者 Waldmann 和 Trantwein 曾将这两型病毒命名为 A 和 B 型。1926 年这两位德国学者又发现了另一个新型, 并命名为 C 型, 从此开始了 FMD 病毒分型鉴定的历史。本世纪 30 年代在南部非洲罗得西亚发现的三株 FMD 病毒, 经设在英国的 FMD 世界咨询实验室(WRL)十多年的研究后证实, 它们与已知的 O、A 和 C 型都不同, 被命名为 SAT(南非) I、II、III 型。1954 年英国学者从巴基斯坦又分离到新型毒株, 鉴定并命名为 Asia I(亚洲 I)型。至此 FMD 病毒共出现了七个不交互免疫的血清型(又称为正型)。那些最早被确认的毒株也被确立为 FMD 病毒的标准毒株。

最初的定型方法是动物(用本动物牛或实验动物豚鼠)交叉感染(保护)试验。大约 20 年后, 随着豚鼠高免血清制备成功和补体结合试验(CFT)的建立, 才应用血清学试验取代动物诊断试验。在每个血清型里有许多毒株, 以它所属的血清型加上发现的地点和时间来命名。以示同型内各毒株的区别。如 Asia I 巴基斯坦/54; Asia I 以色列/63。

在应用 CFT 定型和使用疫苗的过程中发现, 有些毒株虽然同属一个血清型, 但它们的抗原性存在着不同程度的差异, 有必要将同型 FMD 病毒株再划分成抗原性相近的群或亚型。经过 20 多年的探索, 研究工作者深刻认识了亚型鉴定的潜在价值, 在 1968 年第 19 次

FMD 国际会议上,英国学者 Brooksby^[9]和法国学者 Fontainl 提出区分亚型的意义和标准。

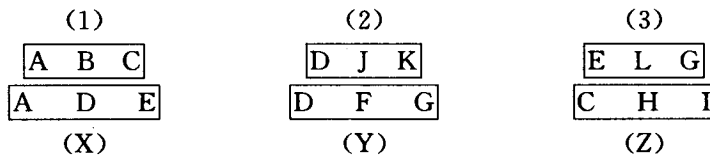


图1 字母 A—L 代表 FMDV 表面抗原位点

参考毒株(1)、(2)、(3)、之间没有共同抗原位点,代表三个不同亚型;野毒株(X)、(Y)、(Z)之间没有共同抗原位点,代表不同的野毒株。但野毒株(X)与参考毒株(1)、(2)、(3)、各有一个共同位点(A、D、E);野毒株(Y)与参考毒株(1)和(3)各有一个共同位点(B和G);野毒株(Z)仅与参考毒株(1)共有一个位点。

应用 CFT 分别测定抗血清 A 与同源病毒(毒株 A)和异源病毒(毒株 B)的混合物结合补体的量,抗血清 B 与同源病毒(毒株 B)和异源病毒(毒株 A)的混合物结合补体的量,再按下列公式计算出 r_1 和 r_2 值。

$r_1 = (\text{血清 A} + \text{毒株 B}) \text{ 结合补体的量} : (\text{血清 A} + \text{毒株 A}) \text{ 结合补体的量}$

$r_2 = (\text{血清 B} + \text{毒株 A}) \text{ 结合补体的量} : (\text{血清 B} + \text{毒株 B}) \text{ 结合补体的量}$

$r_1 \times r_2$ 的积(交叉结合值)介于 0~1.0 之间。如交叉结合值在 0.5~1.0 之间,表示毒株 A 和 B 同属一个亚型;交叉结合值在 0.1~0.5 之间,这两个毒株属于关系密切的不同亚型;交叉结合值在 0.01~0.1 之间,这两个毒株属于关系疏远的不同亚型;当交叉结合在 0.01 以下时,表示这两个毒株属于不同血清型。根据这个标准,至 1970 年 WRL 鉴定 FMD 病毒共有七个血清型,60 多个亚型。在鉴定过程中也出现了令人进退两难、难以认可的结果。如已知中东三个毒株伊拉克 24/64,伊朗 1/65 苏联 1/65 在流行病学上关系密切,都属 A₂₂ 亚型;但苏联 1/65 和伊拉克 24/64,苏联 1/65 和伊朗 1/65 的交叉结合值都低于 0.5。

Ubertini 等^[40]在对流感病毒,脊髓灰质炎病毒和口蹄疫病毒的抗原变化作了多年的比较研究后,建议用 R 值($R = 100 / r_1 \times r_2$)代替交叉结合值($r_1 \times r_2$)。

Anderson 等(1974)曾在肯尼亚十多年采集和研究 FMD 流行毒株的抗原变异。他们也用 R% 表示那些毒株的相互关系,并重新规定了亚型之间的界限为:(1)不同亚型 $R \leq 40$ (10~32);(2)相关而不同的亚型 $R = 40 \sim 60$ (32~70);(3)相同亚型 $R \geq 60$ (70 或以上)。(括号内的数值是按 Brooksby 1968 年规定标准计算出的 R 值)他们强调这个标准是公正合理的。研究主要是为了选择适用的疫苗。希望疫苗能保护牛群抵抗新出现病毒株的侵袭。他们还发现,在流行过程中野毒株的抗原性是逐渐迁移的,即它们与亲本毒株的差异是逐渐扩大的。在肯尼亚的十年研究中,他们共鉴定出 3 株不同的 O 亚型,6 株不同的 A 亚型,2 株不同的 SAT I 亚型和 1 株 C 亚型。

Forman^[16]进一步发展了这样的设想:在一个血清型里的 FMD 病毒株构成一个抗原谱。而且证明亚型之间的界线是连续的,并不形成易于分辨的各自分离的抗原群。他应用 CFT 比较了 16 株 SAT I 病毒,其中 7 株已经被确认,每一株代表 SAT I 的一个亚型。利用 16 个毒株的不同组合求得 R 值;如应用 Brooksby 的最初标准区分亚型,几乎每一个毒株都

可能出现在不同的亚型里。为此,他引入了参考毒株的概念。任何两个参考毒株的 $R \leq 25\%$, 它们才各代表一个亚型。如果野毒株与参考毒株的 $R > 25\%$, 那么它们是相关的。按照这个标准,某些毒株会出现在一个以上的亚型里。Forman 还概括了 FMD 病毒亚型的新定义;在一个血清型内抗原关系密切的毒株群(组)。一个亚型里的所有毒株都与一个特定的参考毒株相关,其 $R > 25\%$ 。根据它与参考毒株的相互关系,一个毒株可能被划分在一个以上的亚型群里。

至 1977 年已鉴定出 32 个 A 亚型,11 个 O 亚型,5 个 C 亚型,7 个 SAT I 亚型,3 个 SAT II 亚型,4 个 SAT III 亚型和 3 个 Asia I 亚型。为了确定野毒株的亚型,必须与型内所有已知亚型参考毒株逐一比较它们的抗原性,随着亚型的不断增多,比较试验的工作量越来越大,耗费的时间也越来越多。往往在疫病爆发后很长时间,甚至在被控制后才获得亚型鉴定结果。Pereira(1977)在对送到 WRL 的野毒株的亚型鉴定资料分析后提出,亚型鉴定可能出现的问题主要有三个。

第一,试验本身不稳定,误差大。为了符合统计学的要求,每个试验需要重复许多次。他引用了 Rweyemann 等^[34]的规定,如果 r_1 值是 0.6,为了确认与 1.0 差异显著,应用 CFT,必须重复 8 次,如应用 VNT,必须重复 15 次;如要比较不同实验室利用不同血清和细胞培养系统获得的结果,问题会更加复杂。

第二,抗原优势(显性)问题。为了获得 r_1 和 r_2 ,要制备被比较的两个毒株的抗血清。原先设想各个血清与异源毒株的反应程度相似,(即 $r_1 \approx r_2$)。但实际上这两个值往往相差很大。Stellman 等(1972)证明,在选择疫苗毒株时,这种“优势”即广谱抗原性具有重要意义,并试图用下列公式计算的 D 值表示这种不对称数量关系:

$$D = 100 \sqrt{r_1/r_2}.$$

第三,就是 Forman^[16]和 Arrowsmith^[34]已经确认的,亚型并不形成分隔的群,在抗原性上是连续的,趋向于相互融合。

Rweyemann 等^[34]比较了 CFT 和 VNT 获得的 r 值,证明这两种试验有很大的差异。试验应该用疫苗毒株制备的抗血清,而不是用原始的野外分离物制备的抗血清。他们强调亚型鉴定本身的意义,而不是将亚型鉴定作为病毒株分类的一种方法。并建议停止使用 R 值,只用 r_1 值表示野外分离物与一系列参考毒株的相互关系。

三、补体结合试验和病毒中和试验

最初,检测和鉴定 FMD 病毒的方法是动物交叉感染试验。随着实验动物(主要是豚鼠和乳鼠)和细胞培养系统在 FMD 病毒研究中的应用,豚鼠高免血清的制备成功,建立了多种可取代动物试验的血清学试验。其中主要有检测病毒,如采自发病动物的组织样品(水泡液、水泡皮等)及其适应实验动物或细胞培养物后的含毒病料的补体结合试验(CFT),以及检测动物血清抗体的病毒中和试验(VNT)。

(一)补体结合试验(CFT, complement fixation test)

CFT 包括(1)红细胞(成年健康绵羊红血球),(2)溶血素(兔抗绵羊红细胞血清),(3)补体(成年健康雄性豚鼠血清),(4)抗血清(FMD 病毒 O、A、C、Asia I 等各型标准毒株制备的

豚鼠高免血清),和(5)被检抗原五种要素,构成红细胞-溶血素和抗血清-被检抗原两个抗原-抗体系统。在有补体存在的条件下,溶血素能溶解红细胞。这三者构成的溶血系统,在CFT中起“显示”作用。因为FMD病毒抗原-抗体结合时,虽不形成肉眼可见的反应产物,如沉淀,凝集等,但必要有补体参与反应。如果CFT中的被检抗原与某型抗体发生特异性结合,补体就参与这一反应,因而溶血系统缺乏补体,红细胞不再被溶解,CFT结果则为阳性;反之,被检抗原未与抗血清结合,反应混合液中的补体就参与溶血系统,使红细胞溶解,试验结果则为阴性。各反应要素的用量为0.2ml的CFT又称为常量试验。60年代为适应亚型鉴定的需要,建立了微量CFT,试验用V-形底96孔微量滴定板,各要素的用量减少为50 μ l。

CFT具有良好的特异性和可重复性。自1943年成功地用于FMD病毒分型鉴定以来,一直被WRL和各FMD研究或定型中心应用至今。但是,CFT存在以下缺点。

(1)敏感性不高,需要高浓度抗原参与反应。病毒抗原量大约相当于 $10^5 \sim 10^6$ TCID₅₀/ml或 ~ 500 ng/ml病毒蛋白才能被检出。在疫病流行后期采集的样品中,和利用细胞培养物分离病毒时都较难达到如此高的病毒含量。

(2)由于前带现象和抗-补体作用使CFT失败。原始上皮组织悬液和BHK₂₁细胞上清液都有这种抗补体作用。虽然样品稀释后可以消除这种抑制作用,但可能因抗原含量的减少使试验结果转为阴性。

(3)被检样品有很大的局现性。典型发病时采集并保鲜冷藏运至定型实验室的牛舌皮,猪蹄部水泡皮,水泡液能直接用于CFT;而加了抗凝剂的血液样品,O/P液,唾液,和加有甘油保存液的样品,通常先要接种乳鼠或细胞培养物1~3代后,方可用CFT定型。

(4)CFT结果用肉眼观察判定,难免带有主观性,可因操作人员的不同产生某些误差。

(5)CFT是一种相对复杂的试验,所用试剂需要精确标定。例如,补体需要制成最合适的稀释度,否则会产生过强或过弱的反应,使结果发生混乱。某些试剂保存期短,如溶血系统必须在试验进行当天新鲜制备。这些因素使CFT不易标准化。

(二)病毒中和试验(VNT,virus neutralization test)

VNT也称为血清中和试验(SNT)。利用血清抗体对病毒的特异性中和作用,使病毒失去对易感动物或敏感细胞的感染能力。根据接种病毒-血清混合物的动物发病死亡数,或产生CPE的细胞管数来判定血清中所含抗体量和型别。中和的方式有两种。(1)固定血清稀释病毒法。十倍系列稀释的病毒液与等体积的血清混合,以对照(阴性对照血清)组与试验(被检血清)组的LD₅₀或TCID₅₀之差的反对数表示被检血清的中和指数。(2)固定病毒稀释血清法。二倍或四倍系列稀释的血清与100~1000LD₅₀(或TCID₅₀)病毒量混合。以保护50%动物不死亡(或细胞管不出现病变)的血清稀释度为终点,由死亡(病变)和存活动物(细胞管)数查表计算中和指数。检测病毒-血清混合物的方法有四种。(1)乳鼠中和试验。病毒-血清混合物接种对FMD病毒很敏感的4~5日龄乳鼠,观察5~7天,每天至少二次记录乳鼠发病死亡数。(2)细胞中和试验。病毒-血清混合物接种适合FMD病毒增殖,并可出现典型CPE,已经形成融合单层的BHK₂₁或IB-RS-2细胞管。连续观察2~3天,记录出现CPE的细胞管数。(3)微量细胞中和试验。应用96孔平底细胞培养板,可在加入病毒-血清混合物的同时,加入制备好的细胞悬液,每孔总量不超过0.2ml。培养板加盖置于CO₂培养箱中继续培养三天。第三天观察各孔细胞单层的CPE。(4)空斑减少中和试验。在接种病毒

一血清混合物的细胞单层上复盖营养琼脂层,使感染病毒又病变的细胞被限制在一个小范围内;因细胞病变后不能摄取琼脂培养基中的活性染料(中性红),在未病变的正常细胞的红色背景上衬托出白色的“空斑”。以不加血清的病毒对照瓶的产斑数与被检血清中和病毒后的空斑数之差表示结果。

中和试验的特异性和敏感性都很好,几十年来一直被世界各国公认并广泛应用。其不足之处是:(1)重复性不够理想。这是因为试验用细胞对病毒感染的敏感性受多种因素,主要是犊牛血清的影响常发生改变,进而影响试验结果。(2)细胞培养技术相对复杂,需要一定的设备和技术条件,且易受各种因素的影响,如有毒物质,细菌和霉菌污染常使培养失败或生长不良。(3)试验需用有感染性的活病毒,所以必须在严格安全保障的条件下才能进行。(4)试验周期长,最快也要4~5天才能获得结果。(5)由于各实验室所用细胞系的培养条件各不相同,所得结果难以比较。

四、酶联免疫吸附试验(ELISA)

除CFT和VNT外,在FMD研究中也应用间接血凝,正向血凝,VIA琼扩等试验。由于它们在特异性,敏感性或重复性方面存在某些缺陷,限制了其使用价值和范围。近十多年中,等电点聚焦电泳,RNA T₁酶寡核苷酸指纹图谱分析,核酸探针,病毒基因组核苷酸序列分析等新型生物技术在FMD病毒研究,尤其是毒株抗原差异的生化特征研究方面取得了令人瞩目的成就。但应用这些新技术要有一定的专用设备和生物活性试剂、同位素等,目前还不可能作为常规的检测和定型方法。比上述生化分析法更具实用价值,比CFT和VNT更快速又准确可靠的诊断方法是酶联免疫吸附试验(ELISA)。

自从Voller和他的同事在1976年最先建立起检测病毒的ELISA以来,它在医学和兽医学领域中被广泛应用。1979年Abu Elzein和Crowther^[2]首次报道检测FMD病毒抗原的ELISA试验。在此后几年间,Hamblin等^[18]Have等^[23]Ouldrige等^[30]研究小组都在这方面作了许多探索,积累了大量的宝贵资料,但他们一直未能证实用ELISA检测FMD病毒如何优于CFT。直到1987年Roeder和Le Blanc Smith^[32]对Hamblin等^[18]建立的间接夹心ELISA作了重要改进,Ferris等^[15]利用送到WRL的检测样品,应用改进的ELISA和CFT同时进行对比试验长达近一年时间后,ELISA才被WRL确认为检测FMD病毒的有效方法。

(一)间接夹心ELISA (Indirect Sandwich ELISA)

间接夹心ELISA主要包括(1)捕获抗体,兔抗FMD病毒146s血清;(2)被检抗原,送检的怀疑含FMD病毒的组织样品悬液或细胞培养液等;(3)检测抗体,豚鼠抗FMD病毒146s血清;(4)酶—抗体(抗某种动物检测抗体)结合物,最常用辣根过氧化物酶(HRP)—兔抗豚鼠球蛋白抗体(IgG);(5)显色底物,邻苯二胺(OPD)加0.05% H_2O_2 ;(6)中止反应液,1.25M H_2SO_4 。试验开始,首先将捕获抗体用包被缓冲液稀释后包被96—孔U—形底聚苯乙烯微量滴定板。因此,捕获抗体又称为包被抗体。这种以抗体而不是抗原固定于固相载体表面的方法,解决了直接ELISA和间接ELISA中常遇到的因抗原难以被固定,或发生变性失

真而导致试验失败的难题。当被检样品中含有 FMD 病毒抗原时,就被包被抗体捕获,并和随后加入的检测抗体结合,形成抗体-抗原-抗体特异性夹心式结合物。在加入酶-抗体结合物后与检测抗体特异性结合,因为酶的存在可使加入的底物显色。15~20 分钟后加入中止液,使反应同步停止,以便观察和正确判定结果。反应混合物呈现的颜色越深,表示抗原含量越高。每次试验必设(1)空白(缓冲液,Cb)对照,如平均 $OD_{Cb} \leq 0.1$,试验成立;(2)强阳性对照(C++),如 $OD_{c++} - OD_{Cb} > 1.0$;和(3)弱阳性对照(C+),如 $OD_{C+} - OD_{Cb} > 0.01$,试验成立。如样品与某型血清的 $OD_s - OD_{Cb} > 0.1$,而且 $OD_s > 2 \times OD_{其它型}$,则该样品判定为某型(阳性);反之,如 $OD_s - OD_{Cb} \leq 0.1$,则为阴性。

间接夹心 ELISA 用于 FMD 病毒检测和定型时,特异性与 CFT 相同,灵敏度更高。能检测出至少 2ng/ml 病毒抗原,敏感性是 CFT 的 125~250 倍。能直接利用送检的各种病料作定型抗原,没有 CFT 中因抗补体作用使定型失败的问题。送检上皮组织样品的检出率为 80%左右,远远高于 CFT (25~30%);接种细胞后出现 CPE 的细胞培养液的定型率为 100%,CFT 为 90%左右。如样品量足够,可在 3 小时内获得结果,可见诊断速度也比 CFT 快。节省试剂,重复性好易于标准化。例如 CFT 用 1:16 稀释的豚鼠高免血清,在 ELISA 中同样效价的豚鼠抗血清作 1:1000 稀释,免抗血清作 1:5000 稀释使用。这样一批抗血清用得时间长得多,减少了因试剂批次更换造成的试验结果误差。应用连接微机的酶标仪可使操作自动化,判读结果更少人为误差。

(二)液相阻断夹心 ELISA (LB-ELISA, Liquid-phase Blocking Sandwich ELISA)

Abu Elzein 和 Crowther^[1]、Crowther 和 Abu Elzein^[13]和 Franz 等^[17]曾应用间接 ELISA 测定感染动物和接种 FMD 疫苗动物血清中的抗体滴度。Lombard 和 Piroird^[25]应用灭活抗原包被在纸盘上的间接 ELISA、Have 和 Jensen^[23]应用反向夹心 ELISA,在检测 FMD 病毒抗体方面作了许多有益的尝试和探索。这些试验的敏感性和特异性良好,都能在一天内获得结果。但是没有获得 ELISA 抗体滴度与 VNT 结果的相关关系。各实验室采用不同类型的 ELISA,报告的结果各不相同,判定标准难以统一,在流行病学上无法应用。1986 年 Hamblin 等^[20]在前人的基础上,应用 McCullough 等^[29]的液相 ELISA 原理,仿效传统的 VNT,建立了定量检测 FMD 病毒型特异性血清抗体的液相阻断夹心 ELISA (Liquid-phase Blocking Sandwich ELISA, LB-ELISA)。这种 LB-ELISA 与检测抗原的间接夹心 ELISA 应用同一套试剂,二者的不同只是:被检血清用 ELISA 稀释液(PBST,含 0.05% Tween20 的 PBS)二倍连续稀释,与已知各型固定量的病毒抗原混合,放在 4℃ 湿盒中过夜,使之充分结合。试验开始,将上述被检血清-已知抗原混合液转入已用相应各型抗体包被好的微量滴定板孔中。此后逐一加入检测抗体,酶-抗抗体结合物,显色底物和中止反应液,最后用酶标仪判读结果等步骤与间接夹心 ELISA 相同。如被检血清含有某型抗体,必然与同型病毒抗原结合。将这种预先结合的混合液转入 ELISA 板孔后,如还有未被被检血清中的抗体结合的抗原剩余,就被包被抗体捕获,亦与随后加入的检测血清中的抗体结合。按试验孔呈现的颜色与抗原对照(未加血清)孔呈现颜色相比较来判定结果。颜色深浅的阴阳性对应关系正好和间接夹心 ELISA 相反:颜色越深,表示被检血清样品中的抗体含量越少。当被