

# 猪口蹄疫的实验室检测技术及防控措施

管花 李碧英

云南省石屏县动物卫生与疫病防控中心

DOI:10.32629/as.v9i1.3600

**[摘要]** 作为一种由口蹄疫病毒所引发的高传染性动物疫病,猪口蹄疫深度影响着全世界养猪业。因其具有传播速度快、危害系数高、跨境传入风险叠加的特点,有针对性的实验室检测技术以及有效的防控措施成为抑制猪口蹄疫蔓延的关键。基于此,本文系统介绍了猪口蹄疫的实验室检测技术,包括病毒分离鉴定、血清学检测、分子生物学检测,并给出可操作性高的诸如疫苗防疫、生物安全、疫情监测等防控措施,旨在为猪口蹄疫的防控提供理论依据和实践指导。

**[关键词]** 猪口蹄疫; 实验室; 检测; 防控

中图分类号: S851.34 文献标识码: A

## Laboratory detection technology and prevention and control measures for porcine foot-and-mouth disease

Hua Guan Biying Li

Animal health and disease prevention and control center of Shiping County, Yunnan Province

**[Abstract]** As a highly contagious animal disease caused by the foot-and-mouth disease virus, porcine foot-and-mouth disease has a profound impact on the global pig farming industry. Due to its rapid transmission speed and high hazard coefficient, targeted laboratory detection techniques and effective prevention and control measures have become crucial in curbing the spread of porcine foot-and-mouth disease. Based on this, this article systematically introduces laboratory detection techniques for porcine foot-and-mouth disease and provides scientific prevention and control measures, aiming to provide theoretical basis and practical guidance for the prevention and control of porcine foot-and-mouth disease.

**[Key words]** swine foot-and-mouth disease; laboratory; detection; prevention and control

猪口蹄疫是由口蹄疫病毒所造成的一种急性、热性、高度接触性传染病。倘若猪只感染此病毒,不仅会导致其生长性能下降甚至死亡,还会引发大规模的疫情扩散,给养猪业带来重大的经济损失。实验室检测技术能够在最大限度上准确诊断猪口蹄疫,进一步为疫情的早期发现、及时控制提供科学依据。而有效的防控措施则是遏制疫情传播、保障养猪业健康发展的重要保障。深入研究猪口蹄疫的实验室检测技术及防控措施,对于维护养猪业的生产安全具有重要意义。

### 1 猪口蹄疫的实验室检测技术

#### 1.1 病毒分离鉴定

作为诊断猪口蹄疫的常用方法,病毒分离鉴定是将采集自疑似感染猪的病料接种至易感细胞,观察细胞病变情况判断口蹄疫病毒的存在与否。该检测技术包括样本前处理、病毒增殖与特征性病变观察三个关键环节。样本前处理阶段,采用pH7.2-7.6的PBS缓冲液研磨病料,经0.22 μm滤膜除菌后,接种于单层培养的BHK-21或IB-RS-2细胞系。在细胞培养过程中,口

蹄疫病毒通过识别细胞表面整联蛋白受体侵入宿主细胞,并在胞浆内完成基因组复制与衣壳蛋白组装。24-48小时内,可观察到特征性细胞病变效应,诊断特异性可达100%。

#### 1.2 血清学检测

(1) 酶联免疫吸附试验: 酶联免疫吸附试验具有灵敏度高、特异性强、操作简便等优点,其是在抗原抗体特异性结合原理的基础上,利用96孔聚苯乙烯微孔板作为固相载体,通过物理吸附或化学交联方式将纯化的口蹄疫病毒结构蛋白或非结构蛋白包被于板孔表面。酶联免疫吸附试验共分为三个阶段: 第一阶段,待检血清中的特异性抗体与包被抗原结合; 第二阶段,加入辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的种属特异性二抗; 第三阶段,通过TMB或OPD底物催化产生可定量检测的显色产物,显色强度与抗体含量呈正相关。该技术检测灵敏度可达ng级,批内变异系数小于10%,能够准确定量血清中IgG和IgM抗体效价<sup>[1]</sup>。针对结构蛋白的酶联免疫吸附试验主要用于疫苗免疫效果评估,而非结构蛋白检测则可区分自然感染与疫苗接种抗体。现代酶联免

疫吸附试验系统已实现自动化操作,单个检测周期缩短至2.5小时,通量达400样本/板,显著提升了大规模血清学监测效率。在方法学优化方面,采用重组表达抗原替代传统病毒培养抗原,既提高抗原纯度,又降低生物安全风险。

(2) 胶体金免疫层析法:该方法基于免疫层析原理,是利用胶体金纳米颗粒的高电子密度和表面等离子共振效应实现信号可视化。即采用柠檬酸三钠还原法制备粒径20~40 nm的胶体金颗粒,与纯化的口蹄疫病毒单克隆抗体共价结合形成金标抗体复合物。层析系统由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成,检测线与质控线分别包被FMDV重组抗原和羊抗鼠IgG抗体。检测过程中,待测血清样本沿层析膜毛细作用迁移,金标抗体与样本中FMDV抗体形成免疫复合物,在检测线处被固定抗原捕获形成肉眼可见的红色条带。

### 1.3 分子生物学检测

(1) 反转录聚合酶链反应:反转录聚合酶链式反应具体操作包括:采用Trizol试剂或商业化核酸提取试剂盒从临床样本中分离病毒RNA,通过逆转录酶在42℃条件下合成cDNA第一链。针对口蹄疫病毒高度保守的3D聚合酶基因或5' UTR区域,设计特异性引物。这些引物需经过严格筛选和验证,以确保与目标序列的高度互补性和特异性结合。利用热启动Taq DNA聚合酶,进行35~40个循环的指数扩增,每个循环包括高温变性、低温退火和中温延伸三个阶段,以特异性扩增目标基因片段。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳检测,若出现与预期大小相符的特异性条带,则可判定样本中存在口蹄疫病毒核酸。该技术的诊断灵敏度可达 $10^2$ ~ $10^3$  拷贝/ $\mu$ L,较传统病毒分离方法提高100倍<sup>[2]</sup>。

(2) 环介导等温扩增技术:环介导等温扩增技术是通过链置换型DNA聚合酶在恒温条件下实现核酸高效扩增。该技术针对口蹄疫病毒基因组保守区域设计6条特异性引物,形成茎环结构扩增子。反应体系在63℃恒温条件下反应30分钟,Bst DNA聚合酶通过链置换活性实现指数级扩增,检测限可达10拷贝/ $\mu$ L。结果判定基于副产物焦磷酸镁沉淀导致的浊度变化,可通过实时浊度仪监测扩增曲线,或通过肉眼观察溶液浑浊度进行判断。羟基萘酚蓝显色法可使阳性反应体系由紫色变为蓝色,实现可视化检测。

(3) 核酸序列依赖性扩增技术:核酸序列依赖性扩增技术是一种基于等温扩增原理的核酸扩增方法。该技术体系包含三种核心酶:AMV逆转录酶、T7 RNA聚合酶和RNase H。通过两条特异性引物,该技术能够实现靶RNA的指数级扩增。其中,上游引物的5'端包含T7启动子序列,下游引物在AMV逆转录酶的作用下合成cDNA的第一条链。随后,RNase H降解RNA-DNA杂交链中的RNA模板,使得下游引物能够启动第二链cDNA的合成。最终,T7 RNA聚合酶以双链DNA为模板,转录产生大量反义RNA扩增子。对于结果检测,可通过电化学发光探针或实时荧光分子信标实现。倘若在检测过程中发现扩增信号,说明在样本中存在靶RNA,即口蹄疫病毒的核酸。

(4) 交叉引物扩增方法:该方法是一种基于多引物交叉作用

的等温核酸扩增方法。采用4条特异性引物(交叉引物CP1/CP2、检测引物DP1/DP2),在Bst DNA聚合酶作用下于63℃恒温反应60分钟。CP1与CP2的3'端分别互补于靶序列不同区域,5'端则带有彼此互补的交叉序列,形成引物二聚体模板实现自持续扩增循环。口蹄疫病毒的检测是通过特异性识别病毒基因组中高度保守的5'-UTR或3D区域实现的,即实时浊度监测中反应体系浊度值突增且曲线呈“S”型上升;羟基萘酚蓝显色反应由紫色变为天蓝色;琼脂糖凝胶电泳出现特征性阶梯条带。

## 2 猪口蹄疫的防控措施

### 2.1 疫苗免疫

疫苗免疫是预防猪口蹄疫的关键措施,接种疫苗可诱导猪产生特异性免疫反应,生成保护性抗体,以有效抵御口蹄疫病毒入侵。就目前而言,口蹄疫疫苗主要有灭活疫苗与合成肽疫苗两种类型。其中,灭活疫苗经口蹄疫病毒灭活处理后制成,具备高安全性与良好免疫原性,能激发猪产生持久免疫保护;合成肽疫苗则通过化学合成特定抗原肽段制成,具有高安全性、稳定性以及较小的免疫副反应,但免疫效果相对较弱,需多次免疫方能达成较好的保护效果<sup>[3]</sup>。

疫苗免疫的实施需依据猪群年龄、免疫状态及疫苗种类等要素,制定免疫程序。在一般情况下,仔猪于30~40日龄接受初免,间隔3~4周后实施二免,此后每4~6个月免疫一次。在免疫过程中,必须确保疫苗质量与保存条件适宜,严格遵循疫苗说明书操作,以保障免疫效果。免疫完成后,还需定期开展免疫效果监测,借助检测猪血清中抗体水平来评估免疫成效,及时甄别免疫失败猪只并采取补免措施。

为保障疫苗免疫的有效性,首先在疫苗选择上,要根据猪群的具体情况和疫病流行趋势,选择合适的疫苗类型。对于规模较大的猪场,可考虑采用多价灭活疫苗,以覆盖多种血清型的口蹄疫病毒,提高免疫保护范围。而对于免疫效果相对较弱的合成肽疫苗,可通过优化免疫程序,如增加免疫次数或调整免疫间隔,来增强其保护效果。其次,在免疫操作环节,应严格遵循疫苗说明书的要求,确保疫苗的正确使用。疫苗的保存条件至关重要,需按照规定的温度和环境要求进行保存,避免疫苗失效。同时在接种过程中,要确保疫苗的剂量准确,接种部位正确,以保证疫苗能够充分发挥作用<sup>[4]</sup>。最后,在免疫效果监测方面,应建立完善的监测体系。定期采集猪血清样本,采用酶联免疫吸附试验或病毒中和试验等方法检测抗体水平,评估免疫效果。对于抗体水平较低或免疫失败的猪只,应及时进行补免,并分析原因,调整免疫策略。

### 2.2 生物安全措施

生物安全是预防猪口蹄疫传播的重要防线,猪场需构建完善的生物安全体系,从多方面加强管理,有效阻断病毒传入与传播路径。

在人员管理方面,猪场工作人员应定期接受健康检查,患有传染病的人员严禁入场。入场人员需更换专用工作服与鞋,经消毒通道进入猪舍,并严格遵循操作规程。外来人员入场应严格限

制,确需进入时,必须经过严格的消毒程序,包括更换防护装备、洗手消毒等,并在专人陪同下进入指定区域,避免接触猪只。在车辆管理方面,猪场应设立专门的车辆消毒通道,所有入场车辆必须进行全面的消毒,涵盖车轮、车厢等部位<sup>[5]</sup>。运输饲料、猪只等车辆应专车专用,避免交叉污染。车辆消毒后,需在指定区域停放,等待进一步检查与处理。在物资管理方面,所有入场物资必须经过严格的消毒处理,确保无病毒污染。猪场应建立完善的物资消毒制度,根据不同物资类型采用紫外线消毒、熏蒸消毒等方法。饲料应在入场前进行高温消毒,兽药与设备需进行表面消毒,确保安全后方可入场。在猪只管理方面,猪场应实行全进全出的饲养管理制度,避免不同批次猪只之间的交叉感染。新引进的猪只必须经过严格的检疫和隔离观察,确保无口蹄疫感染后方可混群饲养。隔离期间,应密切监测猪只健康状况,发现异常及时处理。同时需定期对猪舍、场地、设备等进行消毒,保持猪场的清洁卫生。猪舍内应每日进行清扫与消毒,场地每周进行一次全面消毒,设备使用前后均需消毒。消毒剂应定期更换,确保消毒效果<sup>[6]</sup>。

### 2.3 疫情监测与应急管理

在临床观察方面,工作人员应每日对猪群进行仔细观察,一旦发现猪只出现发热、跛行等症状,应立即隔离患病猪只,并采集病料送实验室进行检测。病料采集应包括水疱液、水疱皮、口腔拭子等,确保样本的代表性和完整性。实验室检测需在具备生物安全条件的设施中进行,采用病毒分离、血清学检测、分子生物学检测等方法,准确判断猪口蹄疫病毒的感染情况。

在病原学检测方面,猪场应定期对猪群进行抽样检测,制定科学的抽样方案,确保样本覆盖不同年龄段、不同生产阶段的猪只。检测方法的选择需根据疫情监测目标和实验室条件综合考虑。病毒分离适用于病毒株鉴定和毒力研究,血清学检测可用于评估免疫效果和监测抗体水平,分子生物学检测则可快速、准确地检测病毒核酸,适用于疫情早期快速诊断。

疫情应急管理是防控猪口蹄疫的重要环节,猪场应制定完善的应急预案,一旦发生猪口蹄疫疫情,应立即启动应急预案,

按照规定程序进行疫情报告,并在动物防疫部门的指导下,对患病猪只进行扑杀和无害化处理,对疫点、疫区进行严格的封锁、消毒和隔离,防止疫情的扩散蔓延。并且要对受威胁区的猪只进行紧急免疫,加强疫情监测和防控措施,确保疫情得到有效控制。

### 3 结语

作为严重的传染病,在对猪口蹄疫进行检测和防控时需要运用多种可行的技术与措施。病毒分离鉴定、血清学检测、分子生物学检测等实验室检测技术的进步为猪口蹄疫的快速诊断提供有力支持。在防控措施方面,疫苗免疫和生物安全措施是抑制病毒传播的重要防线,疫情监测与应急管理是及时发现和控制疫情的重要保障。只有将二者进行有机结合,才能有效降低猪口蹄疫的发病率和危害程度,保障养猪业的健康稳定发展。

### [参考文献]

- [1]侯光生.猪口蹄疫防控技术现状及措施[J].农家科技,2024(38):79-81.
- [2]沈玉柱.猪口蹄疫抗体水平快速检测技术在兽医实践中的应用研究[J].中国动物保健,2024,26(5):26-27.
- [3]蒋精超.猪口蹄疫的诊断及综合防治措施[J].中国畜牧业,2024(22):103-104.
- [4]曹楠,李瑞银,刁润南,等.猪口蹄疫的诊断和防控[J].今日畜牧兽医,2024,40(12):33-35.
- [5]张明飞.规模猪场口蹄疫抗体效价的检测方法[J].畜牧业环境,2024(6):106-107.
- [6]陈元钧.猪口蹄疫的诊断方法及综合防控措施[J].畜牧业环境,2024(20):88-89.

### 作者简介:

管花(1975--),女,彝族,云南石屏人,本科,高级畜牧师,研究方向:动物疫病防控及饲养管理。

李碧英(1970--),女,彝族,云南石屏人,本科,高级畜牧师,研究方向:动物疫病防控及饲养管理。