

# 猪副伤寒的中药防治研究进展

龚诗淼<sup>1,2</sup>, 杨植<sup>2</sup>, 王煜轩<sup>1</sup>, 刘晓晔<sup>1,2</sup>, 董虹<sup>1,2</sup>

(1. 北京农学院 兽医学中医药北京市重点实验室, 北京 昌平 102206; 2. 北京农学院 北京市中兽药工程技术研究中心, 北京 昌平 102206)

**摘要:**猪副伤寒是一种主要引起仔猪腹泻的细菌性疾病,主要症状为败血症和坏死性肠炎,给畜牧养殖行业造成巨大经济损失。该病主要病原沙门菌侵袭肠道时,诱导上皮细胞凋亡,损伤肠道屏障,且诱发巨噬细胞和内皮细胞焦亡,造成过度炎症,并抑制中性粒细胞溶菌酶释放,减弱机体抗菌能力。中医认为该病系湿热内蕴,弥漫三焦,脏腑气滞血瘀,水谷精微无法吸收,机体无力抗邪。目前,该病治疗以抗生素为主,但随着耐药问题日益加重及“减抗”、“替抗”政策的施行,清热类中药逐渐被应用于猪副伤寒的防治,且疗效确切。本文总结了中药防治细菌性肠道疾病、调控革兰阴性菌感染和调控细胞焦亡信号通路以控制炎症的相关研究,重点讨论了中药对肠道损伤修复的调控作用,揭示了中药能够从修护肠道屏障和抗炎以“扶正”,抑制细菌以“祛邪”2个方面调控猪副伤寒,提出猪副伤寒用药应以清热类为主,同时根据症状选择小复方更贴合临床,与抗生素协同使用或可提高疗效,减缓细菌耐药性产生,为中药防控猪副伤寒提供参考,为该病临床诊治提供依据。

**关键词:**清热类中药; 猪副伤寒; 肠道炎症; 细胞焦亡

中图分类号:S853.7

文献标志码:A

文章编号:0529-6005(2024)01-0079-08

## Research Progress on Prevention and Treatment of Swine Paratyphoid by Traditional Chinese Medicine

GONG Shimiao<sup>1,2</sup>, YANG Zhi<sup>2</sup>, WANG Yuxuan<sup>1</sup>, LIU Xiaoye<sup>1,2</sup>, DONG Hong<sup>1,2</sup>

(1. Beijing Key Laboratory of TCM, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;  
2. Beijing Engineering Research Center of CVM, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract:** Swine paratyphoid is a bacterial disease that primarily causes diarrhea in piglets, characterized by septicemia and necrotizing enteritis, resulting in significant economic losses in the livestock industry. The main pathogen of this disease, *Salmonella*, invades the intestinal tract, induces apoptosis of epithelial cells, damages the intestinal barrier, triggers macrophage and endotheliocyte pyroptosis, leading to excessive inflammation. It also inhibits the release of neutrophil lysozymes, weakening the host antibacterial ability. In Traditional Chinese Medicine (TCM), this disease is considered to involve internal damp-heat, diffuse disturbance of the triple energizers, stagnation of qi and blood stasis, and an inability of the body to absorb water and grain essence, resulting in weakened resistance to pathogens. Currently, antibiotics are the mainstay of treatment, but with the increasing problem of antibiotic resistance and the implementation of the policy of "reducing resistance" and "replacing resistance", heat-clearing TCM is gradually being applied in the prevention and treatment of swine paratyphoid, showing significant efficacy. This paper summarizes relevant research on TCM in the prevention and control of bacterial enteric diseases, regulation of Gram-negative bacterial infections, and modulation of pyroptosis signaling pathways to control inflammation. It focuses on the regulatory effects of TCM on intestinal damage repair, revealing that TCM can regulate swine paratyphoid by repairing the intestinal barrier, anti-inflammatory effects for "nourishing the positive", inhibiting bacteria for "expelling the pathogenic". The paper suggests that the main use of TCM for swine paratyphoid should be heat-clearing, and the selection of small compound prescriptions based on symptoms would be more clinically applicable. The synergistic use of TCM with antibiotics may enhance efficacy and slow down the development of bacterial resistance. This provides a reference for TCM prevention and control of swine paratyphoid and a basis for clinical diagnosis and treatment of this disease.

收稿日期:2023-03-01

基金项目:十四五重点研发计划(2022YFD1801103);北京市家畜创新团队(BAIC05-2022);北京市自然科学基金项目(6212005);北京市自然科学基金项目(6224060)

作者简介:龚诗淼(1999-),女,硕士生,研究方向为中兽药抗菌机制,E-mail:shimiao@bua.edu.cn

通信作者:刘晓晔,E-mail:xiaoyeliu@bua.edu.cn;董虹,E-mail:donghongbua@163.com

**Key words:** heat-clearing traditional Chinese medicine ; swine paratyphoid ; intestinal inflammation ; pyroptosis

**Corresponding authors:** LIU Xiaoye , E-mail : xiaoyeliu@bua.edu.cn ; DONG Hong , E-mail : donghongbua@163.com

肠道是机体消化和吸收营养物质最主要的场所,也是抵抗病原菌入侵机体的第一道防线。集约化养殖模式下,消化系统疾病尤其是肠道疾病频发,严重制约了畜禽养殖业的发展。猪副伤寒是临床猪细菌性肠道传染病之一,多引起仔猪腹泻、肠炎和败血症等,其主要病原沙门菌属胞内寄生,清除难度大。

沙门菌侵袭肠道后诱导肠道上皮细胞凋亡,破坏肠道屏障,进一步诱导肠道巨噬细胞和内皮细胞焦亡,引发肠道炎症并抑制中性粒细胞溶菌酶释放,不利于病原体清除。同时,沙门菌不仅有宿主广泛性,还是人类食源性感染的主要病原,具有重要的公共卫生意义,对人类健康造成极大的威胁。中医认为,猪副伤寒属湿热内蕴,湿、热稽留三焦,水谷之精无法吸收,导致水道运化不畅,机体无力抗邪<sup>[1]</sup>。利用清热类药物辨证施治,不仅可以发挥中药毒副作用小、药物残留低的优势,还能替代抗生素在临床中广泛应用,降低猪副伤寒治疗成本,保障猪肉食品安全,具有良好的治疗和应用前景。

本文对猪副伤寒的危害、特点和防治现状以及该病的中医辨证进行了探讨,并检索了中药调控细菌性肠道疾病、革兰阴性菌感染和细胞焦亡的相关文献,分析清热类药物可用于猪副伤寒的诊治和防控,以期对猪副伤寒临床用药提供参考依据。

## 1 猪副伤寒的危害、特点和防治现状

**1.1 猪副伤寒对我国养猪业的危害和特点** 据农业农村部公示,2017年四季度全国共报告发生猪病25种,报告发病数前三的猪病为猪流行性腹泻、传染性胃肠炎和猪副伤寒。其中,猪副伤寒传染性强、感染率高,且常与猪瘟和猪繁殖与呼吸综合征等发生混合感染,产生巨大的经济损失。猪副伤寒主要病原沙门菌属胞内寄生,不易受免疫系统控制,因此该病的防治具有难度,且作为人畜易感病原,沙门菌对人类食品安全也具有极大危害。目前,我国畜禽养殖过程中大规模实施以抗生素为主的抗菌治疗策略,其中70%~80%的抗生素用于肠道细菌性疾病的治疗。然而,抗生素在养殖端的大量不合理使用致使细菌耐药性突变加速,而新型抗菌药物研发相对滞后,致使畜禽养殖中细菌性疾病防控面临更大的挑战;除此之外,抗生素的不合理使用还会破坏畜禽肠道微环境,打破肠道正常微生物系统平衡,降低畜禽免疫力,且其残留问题影响

动物源性食品安全。

猪副伤寒急性型常表现败血症症状,慢性型多以坏死性肠炎为特征,有时出现卡他性或干酪性肺炎<sup>[2]</sup>。该病的病原主要是鼠伤寒沙门菌、猪霍乱沙门菌和猪伤寒沙门菌<sup>[3]</sup>。病猪和无症状带菌猪是主要传染源,可经分泌物和生殖道排菌,本病主要经消化道感染。健康猪带菌(特别是鼠伤寒沙门菌)较为普遍,当受外界因素影响或动物抵抗力下降时,常导致内源性感染。该病四季均可发生,阴雨潮湿季节多发<sup>[4]</sup>,主要侵害6月龄以下仔猪,尤以1~4月龄仔猪多发。该病临床以腹泻为主要特征,粪便中含有泡沫,便酸臭,患猪体温升高、畏寒,被毛无光泽。

在致病机制方面,当沙门菌入侵猪肠道时,侵袭肠上皮细胞,诱发Caspase-8介导的细胞凋亡,造成肠道屏障损伤,且沙门菌在细胞中大量增殖后扩散至肠腔中感染更多细胞。随病程加深,沙门菌在肠上皮细胞内增殖,释放大量的内毒素,入侵肠壁固有层中的巨噬细胞,激活Caspase-1介导的细胞焦亡通路并释放炎症因子,造成肠道炎症(图1)。

本课题组前期研究表明,中性粒细胞(Polymorphonuclear neutrophils, PMNs)能够通过跨内皮细胞迁移募集于感染或损伤区域,释放溶菌酶,利于病原的清除<sup>[5-8]</sup>。沙门菌侵染上皮细胞造成炎症后,炎症组织释放的特殊分子作用于内皮细胞,增加细胞表面黏附分子表达水平,与PMNs上的糖蛋白结合,随后通过不断地形成和中断这些黏附分子的相互作用,使PMNs沿着血管内皮缓慢移动,并跨内皮细胞迁移至趋化因子浓度高的炎症部位,释放溶菌酶等因子抵抗病原。沙门菌识别并结合内皮细胞膜上的特异性受体,破坏血管内皮细胞屏障功能,导致内皮细胞焦亡,虽然PMNs迁移增多,但溶菌酶的激活受到抑制,机体对沙门菌的抵抗能力降低(图2)。

**1.2 猪副伤寒的防治现状** 目前,治疗猪副伤寒的主要药物是盐酸多西环素、氟苯尼考、恩诺沙星、复方磺胺对甲氧嘧啶钠和土霉素等抗生素类药物<sup>[9]</sup>。但抗生素的应用有诸多风险,如剂量安全问题、长期应用的耐药性问题、药物残留问题和食源性污染等,使养殖业面临巨大考验。近年来,随着“减抗”、“替抗”等政策的实施与推进,中药在养殖业中作用愈加重要,无论用于防治疾病还是饲料添加,其效果均得到了临床验证。

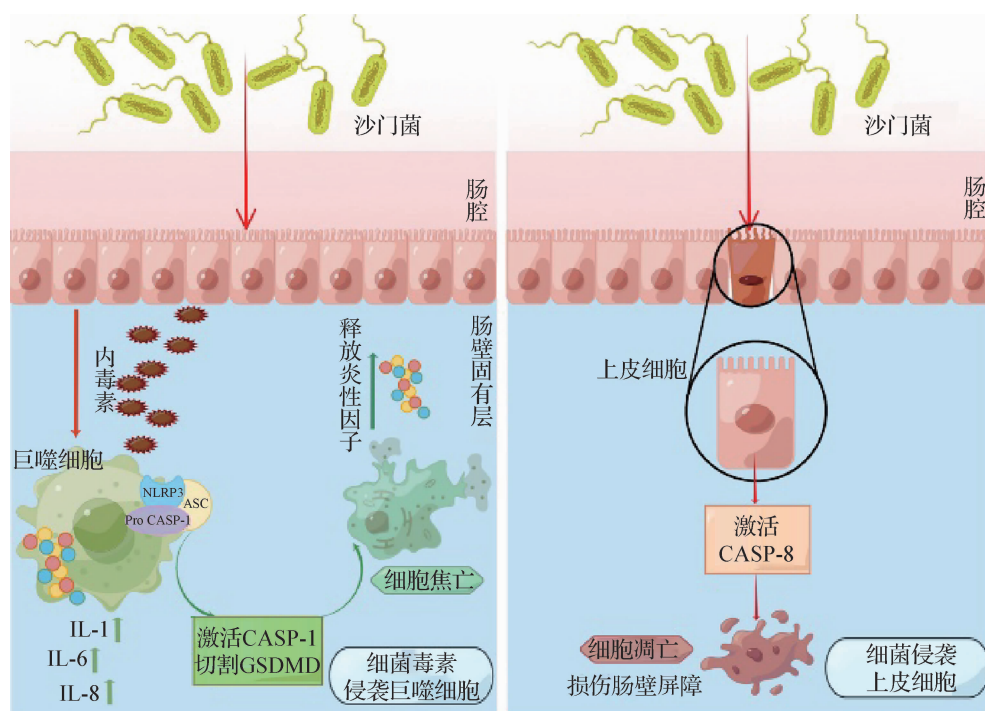


图 1 沙门菌侵袭肠道机制示意图(由 Figdraw 绘制)

Fig. 1 Schematic diagram of *Salmonella* invasion of intestinal tract mechanism (Drawn by Figdraw)

NLRP3: NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; ASC: 凋亡相关斑点样蛋白; Pro-CASP-1: 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 前体; CASP-1: 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1; CASP-8: 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 8; IL-1: 白细胞介素 1; IL-6: 白细胞介素 6; IL-8: 白细胞介素 8; GSDMD: Gasdermin 家族蛋白 D

NLRP3: NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD; Pro-CASP-1: Pro-cysteiny aspartate specific proteinase-1; CASP-1: Caspase-1; CASP-8: Caspase-8; IL-1: Interleukins-1; IL-6: Interleukins-6; IL-8: Interleukins-8; GSDMD: Gasdermin D

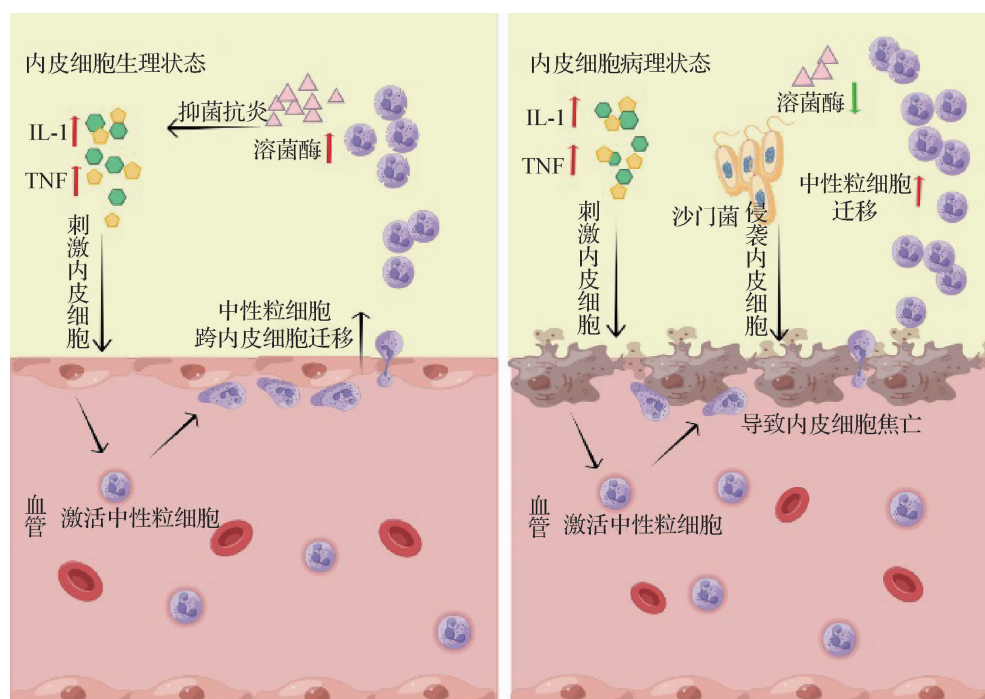


图 2 沙门菌侵袭内皮细胞机制示意图(由 Figdraw 绘制)

Fig. 2 Schematic diagram of *Salmonella* invasion of endothelial cells mechanism (Drawn by Figdraw)

IL-1: 白细胞介素 1; TNF: 肿瘤坏死因子

IL-1: Interleukins-1; TNF: Tumor necrosis factor

有学者应用组方治疗猪副伤寒,方剂以黄芩、栀子、连翘、黄柏和黄连等清热药为主,辅以猪苓和泽泻等化湿药,疗效显著<sup>[10]</sup>。通过对比分析发现,多个治疗猪副伤寒的组方<sup>[11-12]</sup>中清热药占比较大,并辅以补虚药,符合中医扶正祛邪的治则。有临床研究表明,以清热药为主的中药复方,以汤剂口服的效果优于散剂<sup>[13]</sup>。一些商品化中草药药剂已被证实用于治疗猪副伤寒具有较好的临床疗效<sup>[14]</sup>,可见中药治疗猪副伤寒行之有效。

## 2 中医辨证和中药调控思路

2.1 猪副伤寒的中医辨证 中医理论认为,猪副伤寒系湿热内蕴所致,湿热之邪弥漫三焦。因肺合皮毛,高热不下且呼吸困难、皮肤有紫斑属上焦湿热范畴;脾脏、肝脏和肺脏等脏器气血瘀滞,腹痛、下痢属中焦湿热范畴;肾脏充血、肿大属下焦湿热范畴。湿热共同作用于脏腑,致使脏器气血瘀滞,伴有高热、腹痛、下痢,秽浊郁腐。湿易郁气机,热易化燥伤阴,因此“扶正祛邪,清热养阴”为该病的主要治疗原则。

2.2 恢复机体机能以“扶正”,提高机体抵抗力

2.2.1 改善屏障功能,增强防御能力 肠壁屏障作为肠道免疫防线,可以防御和抵制病原入侵,中药的应用可以改善肠壁屏障功能,增强肠道的免疫能力,从“扶正”角度抵御病原。中药及其有效成分能够通过不同机制对肠壁屏障功能进行调节,复方大承气汤加强分泌型免疫球蛋白 A (Secretory immunoglobulin A, sIgA) 的合成和分泌<sup>[15]</sup>、血必净调控凋亡基因 P53 的表达<sup>[16]</sup>,均是通过保护肠壁黏膜以增强屏障功能;苦参碱通过增强紧密连接蛋白表达对肠壁黏膜屏障进行修复<sup>[17]</sup>;四君子汤通过促进杯状细胞分泌黏蛋白以降低肠壁黏膜通透性<sup>[18]</sup>,从而增加肠道对病原的防御能力,减少病邪入侵。

内皮细胞作为血管屏障,其表面黏附因子能够与 PMNs 表面糖蛋白相互作用,促进 PMNs 跨内皮迁移至炎症部位。研究表明,白头翁汤能够通过 Toll 样受体 4-细胞外调节蛋白激酶 (Toll-like receptor 4-extracellular regulated protein kinases, TLR4-ERK1/2) 信号通路缓解内皮细胞炎症反应<sup>[19]</sup>,从而保证 PMNs 正常跨内皮迁移,释放溶菌酶。

综上所述,中药能够通过增强肠壁屏障有效抵御沙门菌对仔猪肠道的侵袭,同时保护作为血管屏障的内皮细胞,保证细胞功能,加强机体抵御沙门菌侵袭的能力。

2.2.2 调节肠道微环境,提高免疫力 肠道中的微生物群会受猪品种、生长阶段和所处空间位置等因

素的影响,肠道微生物群对肠道健康发挥重要作用,菌种组成和丰度的变化会导致肠道稳定状态改变,降低肠道抵抗力,使得病原有机可乘。中药能够调节肠道菌群,恢复肠道有益微生物丰度,增强肠道防御能力。如表 1 所示,大量研究表明,不同类型的方剂及中药有效成分能够通过调节肠道菌群的调节,恢复肠道健康稳定状态以抵御病邪入侵。

综上所述,中药能够通过调节患猪肠道菌群,增加有益菌丰度,建立肠道微生物屏障,为机体抵抗沙门菌助力,从而防控猪副伤寒。

2.2.3 调节细胞内环境,减轻肠道炎症 肠道炎症发生时,细胞内存在大量炎性因子,炎性因子过多会使细胞内阴阳失衡,导致细胞功能过度。可通过调节细胞内环境,减少细胞内炎性因子,为细胞“扶正”,从而达到恢复细胞机能的目的,进而减轻肠道炎症。在中医范畴,肠道炎症具有多种证候,依据传统中医因证施治的原则,对不同证候的治疗应通过辩证选用不同的方剂,同时根据患畜的具体症状对组方药物进行加减。肠道炎症是一系列复杂证候,传统中医辨证理论可将其大致分为:大肠湿热证、脾虚湿蕴证、脾肾阳虚证、脾气亏虚证、寒热错杂证和热毒炽盛证<sup>[41]</sup>。肠道炎症是猪副伤寒最主要的症状,其特征更符合上述辨证中的大肠湿热和热毒炽盛。

芪英汤可降低妊娠母猪白细胞介素 6 (Interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 分泌水平,解热毒,从而降低低胎次母猪的死胎率、弱胎率和死亡率<sup>[42]</sup>;白头翁汤通过抑制 TLR4-ERK1/2 信号通路缓解内毒素脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 所诱导的大鼠肠黏膜微血管内皮细胞 (Rat intestinal mucosa microvascular endothelial cells, RIMVECs) 炎症反应<sup>[19]</sup>,发挥抗炎作用以调节细胞内环境,恢复细胞机能;白薇水煎液能够较好地保护肠黏膜,抑制 LPS 所致血清中淀粉样蛋白 A (Serum amyloid A, SAA)、卵转铁蛋白 (Ovotransferrin, OVT)、 $\alpha$ -1-酸性糖蛋白 ( $\alpha$ -1-acid glycoprotein, AGP) 和 IL-1 $\beta$  的高表达<sup>[43]</sup>,以“祛邪”。大肠湿热证应用清热化湿方,不仅可以减轻肠道炎症,还能增加肠道益生菌丰度<sup>[44-46]</sup>;热毒炽盛证应用清热解毒方,可明显缓解葡聚糖硫酸钠 (Dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的小鼠肠道炎症,恢复肠道内乳酸菌丰度<sup>[33-34]</sup>,有益菌能够调节肠道内环境,进而调节细胞内环境,从而减轻炎症,达到“祛邪”的目的。清热化湿和清热解毒方剂的应用也符合猪副伤寒辨证下的清热治则。



表 1 近 5 年中药调节肠道菌群相关研究

Table 1 Research on regulation of intestinal flora by traditional Chinese medicine in recent 5 years

类型 Type	药物 Drug	作用机制 Action mechanism	参考文献 Reference
中药有效成分	小檗碱	抑制细菌生物膜	[20]
中药有效成分	党参总皂苷	调节肠道微生物群和酸碱度	[21]
中药有效成分	白及寡糖	调节肠道微生物群	[22]
中药有效成分	丹皮酚	调节肠道微生物群	[23]
药对	黄芪-红花	调节肠道微生物群	[24]
药对	黄连-大黄	调节肠道微生物群	[25]
药对	黄芩-黄连	调节肠道微生物群	[26]
药对	茯苓-泽泻	调节肠道微生物群	[27]
补益方剂	参苓白术散	调节肠道微生物群	[28]
补益方剂	加味四君子汤	调节肠道微生物群	[29]
补益方剂	加味人参乌梅汤	调节肠道微生物群	[30]
补益方剂	芪红通痹方	调节肠道微生物群	[31]
清热方剂	黄连解毒汤	调节肠道微生物群	[32]
清热方剂	白头翁汤	调节肠道微生物群	[33]
清热方剂	三黄熟艾汤	调节肠道微生物群	[34]
温里方剂	乌梅丸	调节肠道微生物群	[35]
温里方剂	小建中汤	热敏通道瞬时感受器电位香草素亚型 1-P 物质/ 降钙素基因相关肽 (TRPV1-SP/CGRP)	[36]
温里方剂	小建中汤加减	调节肠道微生物群	[37]
温里方剂	理中汤	调节肠道微生物群	[38]
解表方剂	柴芪汤	调节肠道菌群	[39]
解表方剂	藿香正气口服液	调节肠道菌群	[40]

而随着沙门菌入侵病猪肠道,激活巨噬细胞和内皮细胞经典焦亡通路,炎症小体和焦亡蛋白的活化一方面促进 IL-1 $\beta$  等炎性因子分泌,另一方面激活 Gasdermin D (GSDMD),导致细胞膜打孔,释放炎性因子,加剧炎症。有学者认为,与机体一样,细胞也存在阴阳属性<sup>[47]</sup>,若阴阳失衡,会导致细胞状态改变。细胞焦亡过程是动态的,当细胞受到危险信号激活时,若细胞功能正常,细胞属阳胜于阴;当受到过度激活后,细胞功能受到抑制,出现阴胜于阳。属“阴”的物质不断增长,“阳”的机能不断减退,细胞内物质过度耗竭,则会出现阴阳离决,细胞死亡<sup>[48]</sup>。

目前,已有许多学者对中药调控细胞焦亡的机制进行了深入的探究,其中中药有效成分的作用在多组织中得到了验证,白芍总苷可能抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associatec protein 3, NLRP3) 介导的 Caspase-1 依赖的心肌细胞焦亡<sup>[49]</sup>;大黄素可以缓解缺氧条件下的 NLRP3 介导的 Caspase-1 依赖的细胞焦亡<sup>[50]</sup>;白藜芦醇可以通过 NLRP3 通路降低肺部的细胞焦亡<sup>[51]</sup>;益母草可缓解大脑组织的细胞焦亡<sup>[52]</sup>;丹参酮 II A<sup>[53]</sup>、冬凌草甲素<sup>[54]</sup> 和雷公藤多

苷<sup>[55]</sup> 亦可通过 NLRP3 通路减轻细胞焦亡;姜黄素能够拮抗氧化三甲胺诱导的静脉血管内皮细胞焦亡和线粒体功能障碍<sup>[56]</sup>;天然黄酮类化合物异荛草素可以抑制 Caspase-1 的表达从而预防焦亡性肝损伤<sup>[57]</sup>;黄连素能够抑制细胞活性氧的产生,从而减少 Caspase-1 引起的非酒精性脂肪肝模型中细胞焦亡的发生<sup>[58]</sup>;灯盏花乙素能改善血管内皮细胞损伤,其机制是通过下调 NLRP3/Caspase-1 通路<sup>[59]</sup>。

除此之外,中药组方也具有调控细胞焦亡的效果,清心解瘀方可抑制 NLRP3 炎症小体活化引起的细胞焦亡<sup>[60]</sup>;调肺饮可改善呼吸道症状,其机制可能与抑制 NLRP3 mRNA/NLRP3/IL-1 $\beta$  细胞焦亡通路表达相关<sup>[61]</sup>;参苏饮可通过抑制 NLRP3 炎性小体的活化减轻肺部细胞焦亡<sup>[62]</sup>;二陈汤<sup>[63]</sup>、清燥救肺汤<sup>[64]</sup>、桂枝芍药知母汤<sup>[65]</sup> 和蛭龙活血祛瘀胶囊<sup>[66]</sup> 亦是 通过 NLRP3 通路发挥药效。

针对肠道细胞焦亡和炎症的研究表明,参苓白术散可通过下调 Caspase-1 和 Casepase-11 两条细胞焦亡通路中相关指标以缓解溃疡性结肠炎<sup>[67]</sup>;黄芪可通过抑制硫氧还蛋白互作蛋白,减少 Caspase-1 表达,从而减轻肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 诱导的细胞焦亡<sup>[68]</sup>;加味三黄汤灌肠液可以降低

NLRP3 的表达从而抑制 Caspase-1 活化,以治疗溃疡性结肠炎<sup>[69]</sup>;中药复方溃结灵也是通过调控 Caspase-1 通路减少溃疡性结肠炎所致细胞焦亡<sup>[70]</sup>,通过抑制焦亡蛋白以减少炎症因子的表达,调控肠道炎症。抑制肠道中沙门菌诱导的细胞焦亡水平,可以限制沙门菌的感染<sup>[71]</sup>。

综上所述,沙门菌入侵肠道细胞时造成细胞焦亡,破坏细胞内环境,释放大量炎症因子,加剧肠道炎症。中药一方面通过调节细胞内环境,另一方面通过抑制沙门菌感染后细胞焦亡水平,以限制炎症进一步发展,不仅能够缓解炎症,恢复细胞正常机能状态,达到“扶正”的目的,也能有效避免抗生素导致的耐药问题,更适合养殖业的长期用药。

### 2.3 消除病原以“祛邪”,改善机体内环境

2.3.1 阻断或减弱细菌毒力因子,控制肠道感染  
细菌性肠道疾病的发展是一个复杂的过程,细菌入侵肠道后大量增殖并释放毒素,损伤肠道。中药可通过调控细菌生物膜的形成、破坏细胞膜和细胞壁、抑制菌体内酶活性、干预蛋白质合成、影响相关基因表达和阻断群体感应系统等多种方式抑制细菌,应用中药“祛邪”,直接作用于病原,控制病程进一步发展,其效果在多种感染肠道的细菌抑制探究中得到证实。猪副伤寒主要病原沙门菌属革兰阴性菌,类比多种中药抑制革兰阴性菌的辨证治疗,可为猪副伤寒的中药诊治提供参考。

黄酮类中药能够通过抑制溶血素基因编码、基因转录或直接中和溶血素等途径抑制细菌<sup>[72]</sup>;黄连可通过抑制鸡源大肠杆菌主动外排系统,降低其生物膜黏附性,从而起到抑菌作用<sup>[73]</sup>;五倍子、五味子、乌梅、诃子、女贞子、石榴皮、苏木和黄芩均对导致犊牛腹泻的多重耐药沙门菌具有良好的抑制作用<sup>[74]</sup>;白头翁、夏枯草和白夏汤能够抑制铜绿假单胞菌感染,促进患者创面愈合<sup>[75]</sup>;白头翁、金银花、五倍子、秦皮、黄连和大青叶对临床分离大肠杆菌具有体外抑制作用<sup>[76]</sup>;诃子、五味子和黄连对猪源大肠杆菌不仅发挥抑菌作用,还能提高大肠杆菌对抗菌药的敏感性<sup>[77]</sup>;五倍子、黄芩、金银花和山楂对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用较强,对白色念珠菌也有一定的抑制作用<sup>[78]</sup>;含有穿心莲、黄连和连翘的中药复方可能通过破坏菌体结构,抑制细菌呼吸代谢以抑制 O2 型鸡大肠杆菌临床分离株<sup>[79]</sup>;黄芩与五倍子配伍对抑制多重耐药鲍曼不动杆菌有协同作用<sup>[80]</sup>;榆枢散组方能够通过破坏细菌结构完整性起到抑制大肠杆菌的作用<sup>[81]</sup>。同样,中药也可与抗菌药物协同作用,含扶正透邪解毒化痰

方的大鼠血清联合抗生素能够抑制多重耐药铜绿假单胞菌<sup>[82]</sup>;黄芩、五倍子、乌梅、秦皮和五味子通过消除耐药沙门菌的耐药作用联合  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物起到抗菌作用<sup>[83]</sup>。

以上研究中以清热类中药为主,其不仅能够抑制革兰阴性菌,还对同为肠道疾病病原的犊牛源沙门菌和猪源大肠杆菌等起到抑制作用,同时还能够减轻沙门菌的耐药性。此外,猪副伤寒辨证属湿热内蕴,清热类中药也符合辨证下的治则。清热药还具有抗菌、抗炎、抗病毒、解热和抗肿瘤等药理作用。通过已有研究可以推断,清热类中药可能通过抑制细菌作用减轻沙门菌的入侵,从而减少毒力因子的释放,降低肠道损伤程度,有效控制肠道感染,有利于机体清除病原。

## 3 小结与展望

猪副伤寒主要病原沙门菌对公共安全危害极大。沙门菌属革兰阴性菌,通过类比其他革兰阴性菌感染、细菌性肠道疾病和炎症的中医辨证治疗,发现清热类药物及组方应用比例较高,作用机制研究明确,且符合猪副伤寒的中医辨证。

根据中医辨证,猪副伤寒属湿热稽留三焦,水道运化受阻致使机体无法尽水谷精微之用,无力抗邪,其用药原则应以清热除湿为主,同时辅以补益类药物以增强机体抗邪能力。中药一方面能够从改善肠道屏障、调节肠道菌群、减轻肠道炎症、抑制细胞焦亡角度对机体进行“扶正”,另一方面从抑制细菌角度进行“祛邪”,不仅能调动机体发病部位的抗病能力,还能直接对病原起到抑制作用,具有良好的应用价值。

应用中药对症治疗,可缓解细菌耐药问题,并保障用药安全。猪副伤寒用药多以复方为主,但养殖中应用成本相对较高,且对于新兽药的开发和应用,成分过于复杂不利于明确作用机理和品控。因此,对于猪副伤寒的临床防治,选择 3~5 味中药构成的清热类小复方更符合临床实际应用,不仅保证了用药安全,还具有药效优于单味药,成本低于大组方的优点。此外,病情严重时可将中药与抗菌药物协同使用,在提高疗效的同时缓解耐药性的产生,综合防治猪副伤寒。

### 参考文献:

- [1] 杨铁矛,赵化锋,张梅英,等. 仔猪副伤寒的辨证论治[J]. 中兽医医药杂志,2004(3):37-38.
- [2] 李晓燕. 猪副伤寒病临床症状及治疗方法[J]. 畜禽业,2021,

- 32(11):100+102.
- [3] 潘莽,邓治邦. 仔猪副伤寒沙门菌致病性及耐药机制研究进展[J]. 动物医学进展,2009,30(2):93-97.
- [4] 王鑫玉. 猪副伤寒的流行病学、临床症状、鉴别诊断及防治措施[J]. 现代畜牧科技,2021(5):86-87.
- [5] 胡屹屹,穆祥,胡元亮. 白头翁汤及其主要成分对 LPS 诱导内皮细胞分泌 NO、E-selectin 和 IL-8 的影响[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(1):145-151.
- [6] 胡屹屹,穆祥,胡元亮. 白头翁汤对内毒素诱导血管内皮细胞基因表达谱的影响[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(10):1675-1684.
- [7] 刘晓晔,张涛,董虹,等. 白头翁汤对大鼠跨内皮迁移的中性粒细胞溶菌酶的影响[J]. 畜牧兽医学报,2014,45(1):142-146.
- [8] 王明明,杨舒,董虹,等. 白头翁汤通过保护微血管内皮细胞的完整性及 PMNs 迁移杀菌功能的影响[J]. 畜牧兽医学报,2016,47(4):836-843.
- [9] 周悦斌. 猪副伤寒流行病学、鉴别诊断及防控[J]. 畜牧兽医学:电子版,2020(8):94-95.
- [10] 杨彦华. 猪副伤寒病的中西医结合治疗[J]. 中国动物保健,2021,23(9):6+8.
- [11] 刘春莉,刘志安,王丽萍. 猪副伤寒的预防和治疗[J]. 畜牧兽医科技信息,2016(11):77.
- [12] 候红霞. 猪副伤寒与猪气喘病混合感染诊治[J]. 畜牧兽医学:电子版,2020(11):136-137.
- [13] 孟庆友. 猪副伤寒的中药疗法[J]. 山东畜牧兽医,2013,34(6):33-34.
- [14] 魏军强. 猪副伤寒的中西药治疗措施[J]. 猪业观察,2020(6):20-21.
- [15] 莫佳丽. 小肠梗阻大鼠模型肠道菌群的变化及复方大承气汤对其影响[D]. 天津:天津医科大学,2020.
- [16] 张云杰. 血必净注射液对小肠缺血再灌注大鼠肠道免疫屏障的影响[D]. 济南:山东中医药大学,2008.
- [17] 闫昕. 溃疡性结肠炎大鼠肺肠同病的屏障共损伤机制及中药单体干预作用研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013.
- [18] 单涛. 肠梗阻解除后肠粘膜屏障变化及四君子汤对其影响的实验研究[D]. 天津:天津医科大学,2010.
- [19] 贺尚文,王月明,张慧,等. 白头翁汤通过抑制 TLR4-ERK1/2 信号通路缓解 LPS 诱导的微血管内皮细胞炎症反应[J]. 畜牧兽医学报,2021,52(8):2317-2325.
- [20] 续晨冉. 小檗碱对沙门氏菌 I 型菌毛及其细菌生物膜的抑制作用[D]. 长沙:湖南师范大学,2021.
- [21] 杨乃喜. 妊娠期饲喂泰山磐石散和 TSC 对腹泻仔猪肠道炎症及对仔猪腹泻的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2021.
- [22] 胡白飞. 白及寡糖基于肠道菌群代谢改善糖脂代谢紊乱的药效机制研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2021.
- [23] 施晓艳. 肠源性脂多糖对骨桥蛋白介导的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血管平滑肌细胞增殖的影响及丹皮酚的作用[D]. 合肥:安徽中医药大学,2022.
- [24] 王凯. 黄芪红花配伍调控肠道菌群影响胆汁酸代谢发挥脑保护作用的机制研究[D]. 咸阳:陕西中医药大学,2021.
- [25] 陈源. 基于肠道菌群-炎症反应途径探讨黄连大黄药对干预 2 型糖尿病的作用机制研究[D]. 成都:成都中医药大学,2020.
- [26] 张博荀. 基于“肠道菌群-黏膜屏障”研究“黄芩-黄连”药对治疗 T2DM 的疗效机制及配伍效应[D]. 成都:成都中医药大学,2020.
- [27] 任琦. 对药茯苓-泽泻干预血脂异常痰浊证大鼠 AMPK 通路和肠道菌群的机制研究[D]. 广州:广州中医药大学,2021.
- [28] 刘凯文. 基于高通量测序探讨参苓白术散对脾气亏虚型泄泻肠道菌群的影响[D]. 北京:北京中医药大学,2019.
- [29] 夏修文. 四君子汤加味与脾虚型 IBS-D 肠道菌群共培养体外代谢研究[D]. 成都:成都中医药大学,2019.
- [30] 管志伟. 加味人参乌梅汤调控腹泻大鼠肠道菌群结构和功能的宏基因组学研究[D]. 成都:成都中医药大学,2021.
- [31] 杜阳. 芪红通痹方治疗糖尿病周围神经病变的药效及机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2022.
- [32] 靳瑾,周知然. 黄连解毒汤对溃疡性结肠炎患者肠道菌群的影响[J]. 中医学报,2020,35(7):1520-1523+1559.
- [33] Chen X Q, Lv X Y, Liu S J. Baitouweng decoction alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by regulating intestinal microbiota and the IL-6/STAT3 signaling pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 265:113357.
- [34] Wu Z C, Zhao Z L, Deng J P, et al. Sanhuang Shu'ai decoction alleviates DSS-induced ulcerative colitis via regulation of gut microbiota, inflammatory mediators and cytokines[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 125:109934.
- [35] 李克亚,王真权,彭美瑶. 乌梅丸治疗溃疡性结肠炎(脾肾虚寒,寒中蕴热证)的疗效及对肠道微生态的影响[J]. 中医药导报,2020,26(16):85-89.
- [36] 刘甜甜. 小建中汤对高脂饮食诱导的肠道炎症的抗炎镇痛作用机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2021.
- [37] 陈建. 复方中药添加剂影响仔猪肠道炎症、菌群结构和营养物质表观消化率的研究[D]. 南昌:江西农业大学,2020.
- [38] Zou J, Shen Y, Chen M, et al. Lizhong decoction ameliorates ulcerative colitis in mice via modulating gut microbiota and its metabolites[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(13):5999-6012.
- [39] 彭龙. 代谢综合征并发症回顾性研究及柴芪汤调控代谢综合征肠道菌群机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2021.
- [40] 吴彻. H9N2 禽流感病毒继发细菌感染的作用机制及调控策略研究[D]. 广州:华南农业大学,2019.
- [41] 张玉雯,王佳佳,巴寅颖,等. 中医药调节溃疡性结肠炎常见证候肠道菌群的研究进展[J]. 世界中药, 2022(20):2953-2958.
- [42] 郭大伟,侯思鲁,池宇佳,等. 芪英汤和子甘汤中药复方促进母猪繁殖性能和断奶仔猪生长性能的临床研究[J]. 畜牧兽医学报,2022,53(6):1994-2004.
- [43] 李秋月,韦东来,贺尚文,等. 白薇对 LPS 诱导的鸡小肠损伤及炎症因子的表达[J]. 北京农学院学报, 2020, 35(4):93-96.
- [44] Yang Y, Chen G, Yang Q, et al. Gut microbiota drives the attenuation of dextran sulphate sodium-induced colitis by Huangqin decoction[J]. Oncotarget, 2017, 8(30):48863-48874.
- [45] Hu J, Huang H, Che Y, et al. Qingchang Huashi Formula attenuates DSS-induced colitis in mice by restoring gut microbiota-metabolism homeostasis and goblet cell function[J]. Journal of Eth-

- nopharmacology, 2021, 266: 113394.
- [46] 刘丽, 康安, 刘春样, 等. 清肠化湿方对溃疡性结肠炎小鼠炎症及肠道菌群的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(1): 47-53.
  - [47] 温泉, 黎晖, 田瑞敏, 等. 细胞之阴阳理论[J]. 中医杂志, 2014, 55(13): 1081-1085.
  - [48] 黄文姗, 薛皓方, 古展鑫, 等. 细胞焦亡的中医研究进展与评述[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(8): 1961-1963.
  - [49] 郑亚萍, 刘春杰. 白芍总苷对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞焦亡及 NLRP3 炎症小体表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(8): 910-914.
  - [50] 王凯, 施思, 雷少青, 等. 大黄素对缺氧条件下人脐静脉内皮细胞焦亡的影响[J]. 中国中医急症, 2018, 27(12): 2076-2078 + 2088.
  - [51] 刘莹. 白藜芦醇对肺动脉高压大鼠保护作用机制的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
  - [52] 郑志君, 王贤英, 梁辉. 益母草碱对慢性脑缺血大鼠认知功能的影响[J]. 中成药, 2018, 40(9): 2045-2048.
  - [53] 蔡琳, 易小波, 袁利邦, 等. 丹参酮 II A 通过 NLRP3 炎症体信号通路对小胶质细胞糖氧剥夺/再灌注损伤的保护作用[J]. 四川大学学报: 医学版, 2016, 47(5): 660-664.
  - [54] 何鸿宾. 冬凌草甲素抑制 NLRP3 炎症小体并缓解相关疾病的作用及机制探究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2018.
  - [55] 郑健豪, 钟继红, 曹海军, 等. 雷公藤多苷通过 NOXs-ROS-NLRP3 炎症小体信号通路抑制结肠炎症[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(9): 1653-1659.
  - [56] 赵金理. 姜黄素拮抗氧化三甲胺致血管内皮细胞焦亡及其机制研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2020.
  - [57] 李学毅. 异羟草素对苯并(a)芘诱导的小鼠肝损伤及肠道菌群紊乱的调节作用研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2020.
  - [58] 麦炜健. 黄连素通过活性氧/TXNIP 轴抑制非酒精性脂肪性肝炎模型炎症小体的激活及后续的细胞焦亡作用[D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
  - [59] 杨佳乐, 沈祥春. 灯盏花乙素通过抑制 NLRP3/Caspase-1 信号通路改善 LPS + ATP 诱导内皮细胞炎症反应和细胞焦亡[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(8): 1196-1201.
  - [60] 鞠建庆. 清心解瘀方调控巨噬细胞焦亡稳定动脉粥样硬化易损斑块的机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
  - [61] 李海霞. 自拟调肺饮对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者 NLRP3 mRNA/NLRP3/IL-1 $\beta$  细胞焦亡通路的影响[J]. 环球中医药, 2019, 12(8): 1268-1271.
  - [62] 张发君, 马萍, 徐春肖, 等. 参苏饮对“肺气虚外感”大鼠肺组织 IL-1 $\beta$  和 IL-18 影响实验研究[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(5): 17-20.
  - [63] 尚立芝, 季书, 王国强, 等. 二陈汤加味通过抑制 NLRP3 通路对慢性阻塞性肺疾病的防治作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23): 56-64.
  - [64] 杨璐, 吴振起. 清燥救肺汤对肺炎支原体感染小鼠 NLRP3 炎症小体相关因子表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(4): 318-324.
  - [65] Zhou G Q, Chen G, Yang J, *et al.* Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction attenuates monosodium urate crystal-induced inflammation through inactivation of NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 283: 114707.
  - [66] 刘孟楠, 任维, 罗钢, 等. 蛭龙活血通瘀胶囊对 U937 巨噬细胞焦亡的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(10): 2371-2374.
  - [67] 黎增权. 参苓白术散对葡聚糖硫酸钠诱导的 C57BL/6 J 小鼠溃疡性结肠炎的细胞焦亡通路的影响[D]. 广州: 华南农业大学, 2022.
  - [68] 郝晋芳. 黄芪皂苷通过 TXNIP 抑制肠道病毒 71 型诱导的凋亡、焦亡的作用机制研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2021.
  - [69] 殷秀雯. 加味三黄汤灌肠对实验性溃疡性结肠炎大鼠 NLRP3/Caspase-1/IL-1 $\beta$  影响的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
  - [70] 黎思欣. 溃结灵对 UC 大鼠肠道内 Caspase-1 介导细胞焦亡的作用研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
  - [71] 原海波, 周丽婷, 吴超逸, 等. 沙门菌感染与 Caspase-8 介导的宿主细胞调控性死亡研究进展[J]. 微生物与感染, 2021, 16(4): 261-269.
  - [72] 贺尚文, 侯思鲁, 李秋月, 等. 黄酮类中药抗细菌溶血素研究进展[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(3): 611-617.
  - [73] 王芝超. 基于大肠杆菌  $\beta$ -内酰胺类药物耐药消除机制的中药组方研究[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2021.
  - [74] 刘勃兴, 赵安奇, 柳翠翠, 等. 犍牛腹泻沙门菌抗菌药敏感性试验与中药体外抑菌试验[J]. 中国兽医杂志, 2021, 57(3): 26-30.
  - [75] 查朱青. 白夏汤湿渍对创面铜绿假单胞菌感染的干预作用及临床疗效研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
  - [76] 罗怡琳, 田浪, 许娃丽, 等. 14 种中药对临床大肠杆菌的体外抑菌效果[J]. 中国兽医杂志, 2021, 57(12): 91-96.
  - [77] 王婧文, 谭贻鸿, 高昊天, 等. 5 味中药对猪源大肠杆菌体外抑菌效果及耐药性的影响[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(4): 370-375.
  - [78] 刘小凤, 侯雯倩, 刘东玲, 等. 7 种单味中药及其组方体外抑菌效果及复方溶液脱色方法研究[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(10): 791.
  - [79] 张瀚元. 复方中药对鸡大肠杆菌病的治疗效果及其机理研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2018.
  - [80] 王婧, 李彦明, 黄志云, 等. 7 种中药联合应用对多重耐药鲍曼不动杆菌的体外抗菌活性影响[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(28): 28-30.
  - [81] 郭海涛. 榆杞散抑制产 ESBLs 大肠杆菌的作用及临床疗效研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
  - [82] 马洁. 扶正透邪解毒化瘀方对 MDRPA 的抑菌作用及免疫损伤的部分干预机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
  - [83] 曹正花. 中药对沙门氏菌  $\beta$ -内酰胺类药物耐药性影响的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.



# 疱疹病毒利用宿主蛋白高效复制机理 及其抑制剂研究进展

田文骏, 游婧铃, 王晓佳  
(中国农业大学动物医学院, 北京 海淀 100193)

**摘要:**疱疹病毒的入侵、转录和蛋白合成等多个生命活动,都需要利用宿主细胞蛋白和微环境进行。该过程一般会导致细胞蛋白的合成和降解、修饰、细胞定位改变,以及与其他蛋白相互作用等一系列变化。本文从病毒感染引起的细胞凋亡和自噬体系、泛素-蛋白酶体系、核-质转运体系、生物合成体系和病毒诱导的先天免疫反应几个层面,综述病毒劫持或干扰细胞正常生命活动的研究进展,探讨病毒与宿主细胞的相互作用关系,并对目前抗疱疹病毒药物靶点和机制进行总结,以期设计新型抗病毒制剂提供资料。

**关键词:**疱疹病毒; 细胞凋亡; 细胞自噬; 核质转运; 蛋白翻译; 抗病毒药物

中图分类号:S855.3

文献标志码:A

文章编号:0529-6005(2024)03-0090-07

## Advances in Mechanism of Herpesvirus Efficient Replication Utilizing Host Proteins and Its Inhibitors

TIAN Wenjun, YOU Jingling, WANG Xiaojia  
(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Various life activities of herpesviruses, such as invasion, transcription, and protein synthesis, rely on the utilization of host cell proteins and microenvironments. This process generally leads to a series of changes, including the synthesis and degradation of cellular proteins, modifications, cellular localization, and interactions with other proteins. This article reviews the research progress of virus hijacking or interfering with normal activities of cells and discussed the interaction between virus and host cell from the aspects of virus-induced cellular apoptosis and autophagy systems, ubiquitin-proteasome systems, nucleocytoplasmic transport systems, biosynthesis systems, and virus-induced innate immune responses, and summarizes the current targets and mechanisms of anti-herpesvirus drugs, aiming to provide information for the design of novel antiviral agents.

**Key words:** herpesvirus; apoptosis; autophagy; nucleocytoplasmic transport; protein translation; antiviral drug

**Corresponding author:** WANG Xiaojia, E-mail: wangxj@cau.edu.cn

疱疹病毒科病毒感染每年在全世界造成严重的人类和动物发病及死亡。疱疹病毒科病毒以单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)为代表,HSV是一种有包膜的双链DNA病毒,基因组全长约152 kb,编码80多个开放阅读框。HSV感染会引起多种疾病,包括口腔疱疹、结膜炎、生殖道炎症和不同程度的疱疹性脑炎<sup>[1]</sup>。在动物临床中,猪伪狂犬病毒(Porcine pseudorabies virus, PRV)是对经济动物威胁最大的疱

疹病毒科病毒,其感染猪主要引起仔猪脑炎和母猪生殖障碍<sup>[2]</sup>,根据近几年的临床报道,PRV可以突破种间屏障向人类社会传播<sup>[3]</sup>。目前,只有少数药物被批准用于治疗单纯疱疹病毒感染,如阿昔洛韦(Aciclovir, ACV),ACV在体内代谢为阿昔洛韦-三磷酸后,可与疱疹病毒DNA聚合酶结合从而终止病毒复制<sup>[4]</sup>。近年来,HSV突变引起的耐药性对病毒感染的治疗仍然是一个重要的挑战<sup>[5]</sup>。为解决HSV的耐药问题,研究人员运用一系列蛋白质组学策略,如高通量筛选体系、蛋白质芯片和免疫共沉淀等技术,鉴定病毒感染前后结构和功能发生显著变化的细胞蛋白,这些细胞蛋白参与重要的细胞活动,表明其在病毒复制周期中发挥着重要作用。以此为依据开发的靶向宿主的抗病毒药物(Host-targeting antivirals, HTAs),可以减少病毒耐药性的发生<sup>[6]</sup>。HTAs可以通过同时靶向病毒蛋白和细胞蛋白的双抑制策略,进一步降低由于病

收稿日期:2023-02-07

基金项目:国家自然科学基金项目(32172821)

作者简介:田文骏(1994-),男,博士生,主要从事病毒致病机理和抗病毒药物研究,E-mail:s20193050744@cau.edu.cn

游婧铃(1998-),女,硕士生,主要从事病毒致病机理研究,E-mail:944126738@qq.com

注:游婧铃与田文骏对本文具有同等贡献

通信作者:王晓佳,E-mail:wangxj@cau.edu.cn

毒变异产生的耐药问题<sup>[7]</sup>。本文综述了病毒劫持或干扰上述细胞蛋白的研究进展,及相应靶点的抗病毒药物的研究进展,为深入了解病毒和宿主细胞的相互作用关系、发现病毒作用靶位以推广临床可用的新型抗病毒制剂提供参考。如图 1 所示,疱疹病毒进入细胞后,病毒蛋白可以操纵或劫持细胞蛋白,从而阻断

细胞活动(如抑制细胞自噬、抑制先天免疫、沉默细胞基因转录和劫持细胞蛋白翻译),并促进自身复制。如图 2 所示,1~7 和 a~g 阶段分别表示 HSV 和 PRV 从入侵细胞到释放出胞过程中病毒蛋白对细胞活动的影响,1~7 阶段中 HSV 对细胞活动影响的机制如表 1 所述。

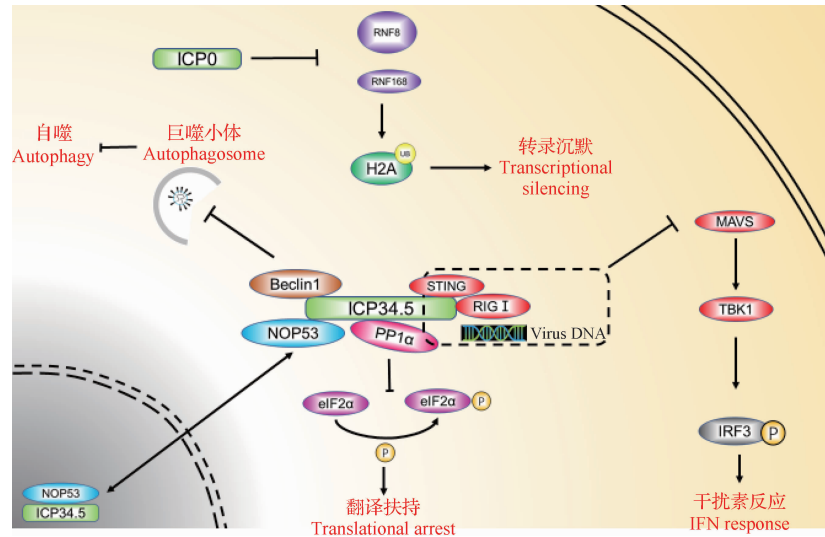


图 1 疱疹病毒操纵细胞蛋白示意图

Fig. 1 Schematic diagram of herpesvirus manipulating cellular proteins

Ub: 泛素; P: 磷酸基团; ICP0: 感染细胞蛋白 0; ICP34.5: 感染细胞蛋白 34.5; RNF8: 环指蛋白 8; RNF168: 环指蛋白 168; H2A: 组蛋白 H2A; STING: 干扰素基因刺激蛋白; RIG-I: 视黄酸诱导基因 I 样受体家族; PP1 $\alpha$ : 蛋白磷酸酶 1 $\alpha$ ; NOP53: 核仁蛋白 53; eIF2 $\alpha$ : 真核翻译起始因子 2 $\alpha$ ; MAVS: 线粒体抗病毒信号蛋白; TBK1: TANK 结合激酶 1; IRF3: 干扰素调节因子 3

Ub: Ubiquitin; P: Phosphoric acid group; ICP0: Infected cell protein 0; ICP34.5: Infected cell protein 34.5; RNF8: RING finger protein 8; RNF168: RING finger protein 168; H2A: Histone H2A; STING: Stimulator of interferon genes; RIG-I: Retinoic acid-inducible gene I; PP1 $\alpha$ : Protein phosphatase-1 $\alpha$ ; NOP53: Nucleolar protein 53; eIF2 $\alpha$ : Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ ; MAVS: Mitochondrial antiviral signaling proteins; TBK1: TANK-binding kinase 1; IRF3: Interferon regulatory factor 3

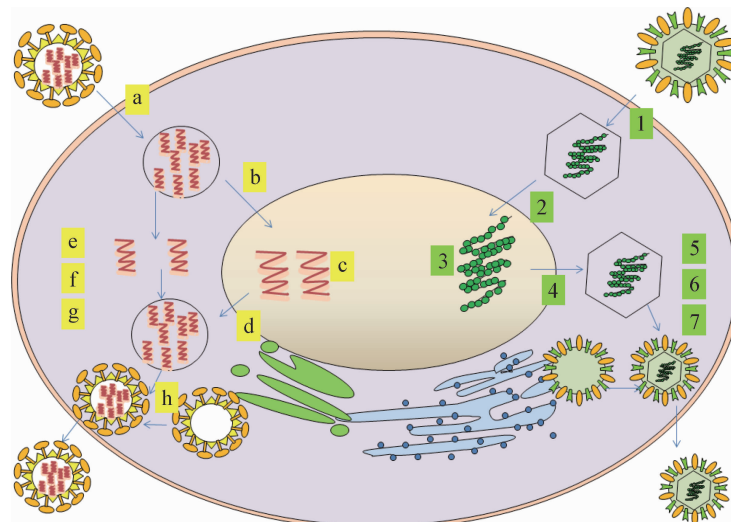


图 2 HSV(1~7) 和 PRV(a~g) 病毒蛋白在生命周期不同阶段对细胞活性的影响

Fig. 2 Effects of HSV (1-7) and PRV (a-g) viral proteins on cellular activities at different stages of viral lifecycle

1~7 和 a~g 过程注解见表 1

Annotations for 1-7 and a-g process are explained in Table 1

表 1 疱疹病毒蛋白在不同阶段对细胞活性的影响  
Table 1 Effects of herpesvirus proteins on cellular activities at different stages

图 2 中标示 Label in Fig. 2	疱疹病毒蛋白 Herpes virus proteins	作用靶位 Target	作用机理 Mechanism	参考文献 Reference
1	ICP0	泛素化修饰 Ubiquitylation modification	利于病毒早期入侵 Promoting early viral vasion	[8]
2	ICP4/pUL25/pUL36	Importin- $\alpha$ /Nup214/Nup358	促进病毒基因入核复制 Promoting viral gene import and replication	[9-10]
3	ICP0	泛素化修饰 Ubiquitylation modification	促进病毒基因转录 Promoting viral gene transcription	[8]
4	ICP27	CRM1/Nup62	促进病毒基因出核合成蛋白 Promoting viral gene export and protein synthesis	[11]
5	ICP0	泛素化修饰 Ubiquitylation modification	干扰宿主先天免疫反应 Interfering with host innate immune response	[8]
6	US3	模拟 PKB Simulating PKB	干扰细胞凋亡 Inhibiting apoptosis	[12]
7	ICP34. 5	自噬蛋白 Beclin1 Beclin1	抑制细胞自噬 Inhibiting autophagy	[13]

注:ICP0:感染细胞蛋白 0; ICP4:感染细胞蛋白 4; pUL25:长独特区编码蛋白 25; pUL36:长独特区编码蛋白 36; Importin- $\alpha$ :核输入蛋白  $\alpha$ ; Nup214:核通道蛋白 214 kDa; Nup358:核通道蛋白 358 kDa; ICP27:感染细胞蛋白 27; CRM1:染色体区域维持蛋白 1; Nup62:核通道蛋白 62 kDa; US3:短独特区编码蛋白 3; PKB:蛋白激酶 B; ICP34. 5:感染细胞蛋白 34. 5  
Note:ICP0:Infected cell protein 0; ICP4:Infected cell protein 4; pUL25:Unique long region protein 25; pUL36:Unique long region protein 36; Nup214:Nucleoporin 214 kDa; Nup358:Nucleoporin 358 kDa; ICP27:Infected cell protein 27; CRM1:Chromosomal region maintenance 1; Nup62:Nucleoporin 62 kDa; US3:Unique short region protein 3; PKB:Protein kinase B; ICP34. 5:Infected cell protein34. 5

1 细胞凋亡和自噬体系

细胞凋亡 (Apoptosis) 和自噬 (Autophagy) 是主要的程序性细胞死亡形式,同时可作为宿主在细胞水平抵御病毒感染的一种机制,通过直接干扰病毒的复制或清除受感染细胞,从而限制病毒的复制和扩散。然而,这种自我牺牲方式往往无法一直进展下去,病毒在与宿主相互斗争的过程中,建立了一套操纵细胞活动的程序和对策,比如,病毒能够通过抑制或延缓受感染细胞过早死亡,建立持续性感染<sup>[14]</sup>;还可通过促进细胞程序性死亡,干扰病毒抗原提呈,或杀死未感染的免疫细胞。

1.1 病毒诱导的细胞凋亡过程 细胞凋亡可通过内源性和外源性两条途径进行,内源性途径被认为保守存在于多细胞动物中,而外源性途径则被认为是脊椎动物所特有的。其中,外源性凋亡途径对于先天免疫和适应性免疫的调控十分重要,例如,病毒感染树突状细胞或自然杀伤细胞后,会使这些细胞快速产生抗病毒免疫反应,上调凋亡相关因子配体 (Factor related suicide ligand, FasL)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) 和 TNF 相关的凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL),诱导感染细胞发生凋亡<sup>[15]</sup>。PRV 感染可诱导猪体内细胞凋亡,病毒感染后激活细胞氧化应激引起自由基增加,并以剂量和时间依赖性方式诱导促凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤 (B-cell lymphoma,

Bcl) 家族蛋白的表达,特异性 DNA 损伤传感器和组蛋白 H2AX 磷酸化的表达也显著增加,进而激活检查点激酶 1/2 和抑癌基因 p53 的表达,诱导细胞凋亡<sup>[16]</sup>。咖啡因是一种已知的 DNA 损伤抑制剂,被发现可以抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 的激活,阻止 PRV 诱导的细胞凋亡;此外,抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸被证明可以防止细胞活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的产生,保护 DNA 不被切割,从而阻止病毒诱导的细胞凋亡<sup>[17]</sup>。

内源性凋亡途径中, Bcl-2 家族蛋白,包括抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白,可调控线粒体结构和功能的稳定性,发挥凋亡“主开关”的作用。很多病毒蛋白,例如,疱疹病毒中爱泼斯坦-巴尔病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) BamHI H 片段右可读框 1 (BamHI H rightward reading frame 1, BHRF1) 编码的早期基因和卡波西肉瘤疱疹病毒 Bcl-2 蛋白以及腺病毒的 E1B-19K 蛋白都具有 Bcl-2 活性,可通过抑制细胞凋亡过程,促进自身复制。单纯疱疹病毒-1 (Herpes simplex virus 1, HSV-1) 病毒蛋白激酶 US3,可通过诱导促凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 基因相关启动子 (Bcl-2 associated death promoter, Bad) 发生磷酸化,阻止凋亡发生<sup>[12]</sup>。研究还发现,许多病毒感染细胞后均可激活磷脂酰肌醇-3-激酶 (Phosphatidylinositol-3-kinases, PI3K)/蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB) (PI3K/PKB) 通路,进而通过诱导细胞增殖分化避免细胞凋亡,从而促进自身复制<sup>[18]</sup>。如图 2 中

过程6所示,HSV-1在复制早期可受到凋亡影响,直到病毒表达了与PKB功能相近的US3蛋白,抑制了细胞凋亡的进程<sup>[19]</sup>。

**1.2 病毒诱导的细胞自噬过程** Bcl-2家族蛋白通过相互作用调控细胞自噬,这些功能也被病毒利用,通过病毒蛋白对自噬过程进行调控,促进自身复制。例如,HSV-1的毒力蛋白感染细胞蛋白34.5(Infected cell protein 34.5, ICP34.5)可与自噬相关蛋白Beclin-1结合(图1),直接阻止自噬溶酶体的形成<sup>[13]</sup>。黄芩苷(Baicalin)等自噬抑制剂可通过减弱自噬相关蛋白(Autophagy-related protein, Atg)5-Atg12形成复合体并调控微管相关蛋白1轻链3(Microtubule-associated protein 1 slight chain 3, LC3)功能,抑制流感病毒复制<sup>[20]</sup>。

据报道,HSV-1急性感染后,感觉神经元附近抗原阴性的神经元含有类似自噬体和自溶酶体积累的结构,最终形成LC3簇,这种积累抑制了细胞自噬,此外,HSV-1感染会下调初级神经元中自噬关键蛋白液泡分选相关蛋白4(Vacuolar protein sorting-associated protein 4, Vps4)的转录和翻译,同时激活信号转导与转录激活因子1(Signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)和LC3<sup>[21]</sup>。由此可见,HSV-1可以通过多种途径调节细胞自噬从而促进自身复制,为寻找病毒抑制剂提供潜在靶点。

## 2 泛素-蛋白酶体系

泛素化修饰与蛋白质降解和功能调控密切相关。泛素化修饰涉及活化酶E1、结合酶E2和连接酶E3的一系列反应。近年来越来越多的证据表明,病毒以多种方式作用于泛素-蛋白酶体系,例如,有些病毒需要利用该体系完成入侵、复制、装配和出芽过程;有些病毒编码泛素模拟蛋白以干扰或降解对病毒复制不利的细胞蛋白;还有些病毒可利用该体系扭转或降解宿主免疫系统<sup>[22]</sup>。

据报道,HSV-1入侵阶段,多功能蛋白感染细胞蛋白0(Infected cell protein 0, ICP0)可利用泛素-蛋白酶体系,在病毒穿透细胞过程中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。HSV-1的ICP0含有环指(RING)结构域,因此具有泛素连接酶的功能,ICP0可泛素化修饰转录抑制因子早幼粒白血病蛋白(Promyelocytic leukemia protein, PML)和DNA损伤反应蛋白环指蛋白8/168(RING finger protein 8/168, RNF8/RNF168),以促进病毒基因转录,增强病毒复制<sup>[23]</sup>(图1和图2)。作为细胞周期重要转录因子,p53是一种不稳定蛋白,受到应激性刺激后变稳定,导致细胞生长

阻滞或凋亡,因此,p53是多种病毒复制的共同障碍。疱疹病毒可通过泛素-蛋白酶体系将p53灭活或降解,从而阻止凋亡发生<sup>[24]</sup>。疱疹病毒去泛素化酶在病毒感染中越来越重要,EBV编码的大被膜蛋白BPLF1具有去泛素化酶活性,可以调节病毒DNA复制和修复。Atkins等通过分子筛选确定了BPLF1的抑制剂,即苏拉明(Suramin),降低了约90%的病毒传染性,对细胞活力没有明显的影响,为EBV感染的特异性治疗提供了一种新的途径<sup>[9]</sup>。此外,卡波西肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)的K3/K5蛋白具有E3酶活性,可泛素化主要组织相容性复合体-I(Major histocompatibility complex-I, MHC-I),使其从细胞表面降解,以干扰其抗原提呈功能。

## 3 核-质转运体系

核质转运为真核细胞的基本生命活动之一,其通过一套有效的分子机制来调控细胞内生物大分子在细胞核-质间有效的转运,从而维持细胞整体活动的正常运转。核孔复合体(Nuclear pore complex, NPC)是细胞核内外物质交换的主要通道,蛋白在胞浆内合成后通过NPC进入胞核,这个过程除了需要核孔蛋白、胞浆内核转运受体和三磷酸鸟苷酶(Guanosine triphosphatase, GTPase)等蛋白参与外,蛋白的结构特征亦发挥重要作用:一方面,不同蛋白拥有各自特殊的核定位信号(Nuclear localization signal, NLS),可被核输入蛋白(如Importin- $\alpha/\beta$ )所识别,进而引导蛋白主动转运进入细胞核;另一方面,蛋白输出细胞核,则要通过核输出信号(Nuclear export signal, NES)和核输出受体(如CRM1)的介导(图2)。

在病毒感染过程中,病毒和细胞蛋白在细胞核质之间穿梭的现象非常普遍,一些病毒在宿主细胞中复制时需要将自身的遗传物质、病毒复制相关蛋白和部分结构蛋白输入宿主细胞核内,大部分病毒蛋白利用宿主的核-质转运机制完成自身的运输过程。本课题组发现,多功能病毒蛋白ICP34.5在多个水平上干扰或破坏几种细胞途径,包括利用核仁蛋白53(Nucleolar protein 53, NOP53)出核,促进真核起始因子2 $\alpha$ (Eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ )去磷酸化,从而有利于病毒复制(图1),NOP53基因敲除后,显著减轻了HSV-1感染小鼠的组织损伤和炎症反应,降低了病毒载量<sup>[10]</sup>。

**3.1 病毒蛋白核-质转运** HSV-1的感染细胞蛋白27(Infected cell protein 27, ICP27)借助于核通道蛋



白 62 kDa (Nucleoporin 62 kDa, Nup62), 将病毒 mRNA 输出细胞核, 以进行病毒蛋白合成<sup>[11]</sup> (图 2)。HSV-1 的长独特区编码蛋白 (Unique long region protein, pUL) 36 和 pUL25, 可在核孔蛋白核通道蛋白 214 kDa (Nucleoporin 214 kDa, Nup214) 和核通道蛋白 358 kDa (Nucleoporin 358 kDa, Nup358) 共同识别下, 促使病毒基因输入细胞核<sup>[25]</sup>。有研究表明, 在神经元中, Importin  $\alpha$ 1 是 HSV-1 ICP4 蛋白入核和核衣壳组装的关键蛋白<sup>[26]</sup>。如上所述, 病毒组分的出入核是病毒复制的关键一环, 随着对 HSV-1 复制机制的研究, 会发现越来越多潜在的药物靶点, 为临床治疗 HSV-1 感染提供依据。

HSV-1 病毒核糖核蛋白 (Viral ribonucleoprotein, vRNP) 复合体的形成, 由病毒 RNA、RNA 聚合酶和核蛋白组成。来普霉素 B (Leptomycin B, LMB) 作为 CRM1 的特异性抑制因子, 可通过阻止 vRNP 从细胞核向细胞质的输出, 抑制 DNA 病毒的复制。尽管 LMB 具有一定的抗病毒效果, 但在动物试验中观察到较为明显的毒性<sup>[11]</sup>, 因此, 需要对其进行进一步的研究和改进, 以提高其在控制病毒感染中的治疗价值。作为 CRM1 的同源体, 核输出蛋白 1 (Exportin 1, XPO1) 介导富含亮氨酸的核输出信号依赖的细胞蛋白的转运过程, 以进行细胞正常生命活动。KPT-335 (亦称 Verdinexor) 是 XPO1 的小分子拮抗剂, 体内研究表明, KPT-335 可以减少肺内病毒颗粒和细胞炎性因子的产生, 并且没有观察到明显的毒性, 因此, KPT-335 具有潜在的应用前景<sup>[27]</sup>。

**3.2 病毒蛋白细胞质运输** 疱疹病毒基因表达、DNA 复制、衣壳组装和基因组包装都发生在细胞核中, 成熟的核衣壳在核膜内包装, 然后脱包膜进入细胞质。核衣壳一旦进入细胞质, 就会沿着微管到达细胞器, 随后产生成熟的感染性病毒颗粒, 后者被分类到感觉神经元末端或上皮细胞连接处, 再传播到未感染细胞。HSV-1 出芽前利用细胞器膜构建其囊膜, 出芽后向未感染细胞传播<sup>[28]</sup>。白藜罗醇 (Diphyllin) 是一种从热带植物中提取的化合物, 目前研究认为其可以作为囊泡  $H^+$ -ATP 酶的有效抑制剂<sup>[29]</sup>。包括疱疹病毒和黄病毒科的寨卡病毒在内的多种囊膜病毒, 会通过受体介导的内吞作用进入宿主细胞, 引起内体酸化, 从而成功建立入侵过程, 因此, 白藜罗醇也可作为部分囊膜病毒的广谱抑制剂。小分子 6-脱氧葡萄糖-白藜罗醇 (6-deoxyglucose-diphyllin, DGP) 可防止靶细胞内体/溶酶体酸化, 从而抑制寨卡病毒和细胞膜的融合<sup>[30]</sup>。

## 4 生物合成体系

病毒复制需要挟持宿主细胞的蛋白翻译系统, 在真核细胞中, 蛋白质翻译过程包括 3 个步骤: 起始、延伸和终止。真核生物的翻译起始涉及真核起始因子家族 (Eukaryotic initiation factors, eIFs)。由 eIF4A、eIF4E 和 eIF4G 组成的 eIF4F 吸收小核糖体亚基, 并与 mRNA 5' 端 m7GTP 残基结合, 进行帽依赖翻译。许多病毒利用宿主 eIFs 启动病毒蛋白翻译, 因此, eIFs 及其磷酸化是潜在的抗病毒药物靶点。

丝裂原激活的蛋白激酶作用激酶 (Mitogen activated protein kinase interacting kinase, MNK) 对 eIF4E 第 209 位丝氨酸的磷酸化修饰是肿瘤增殖所必需的, 此外, 其磷酸化修饰与促进一些病毒蛋白的翻译和复制有关, 包括疱疹病毒<sup>[31]</sup>。因此, 针对 p-eIF4E 的抑制剂具有用于抗癌和抗病毒治疗的潜在可能性。本课题组发现, RAF265 可以降低 p-eIF4E 的水平, 以抑制 HSV-1 病毒蛋白的合成, 在小鼠试验中, 小鼠按 10 mg/(kg · d) 剂量口服 RAF265, 连续 3 d, 可降低小鼠大脑中 30% 的病毒载量, 并可以减轻感染小鼠体内的炎症反应<sup>[32]</sup>。RAF265 以前被用于治疗黑色素瘤和其他鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌性同源体 B1 (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, B-Raf) 编码蛋白的第 600 位密码子对应的缬氨酸被谷氨酸替代 (V600E), 即 B-Raf V600E 突变的癌症, 并且有报道表明, RAF265 的细胞毒性显著低于索拉非尼和其他抗癌药物<sup>[29]</sup>。RAF265 的活性为将这种抗肿瘤药物转化为抗病毒药物提供了应用前景。本课题组还发现, 生物碱高三尖杉酯碱 (Homoharringtonine, HHT) 可通过抑制 eIF4E 的磷酸化, 减少病毒 mRNA 的翻译, 从而抑制包括 HSV-1 在内的多种病毒复制<sup>[33]</sup>。因此, 靶向细胞翻译及其信号通路的药物有望用于广谱抗病毒药物的开发。

## 5 先天免疫反应

宿主先天免疫系统能够通过细胞因子将免疫细胞招募到病原体感染部位, 并激活适应性免疫系统, 这对于控制致病性感染至关重要。病毒感染会激活干扰素调节因子 3/7 (Interferon regulatory factor 3/7, IRF3/IRF7) 和核转录因子- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B), 介导干扰素 (Interferon, IFN) 和炎性因子的表达, 启动先天免疫反应。IFN 由病毒感染的细胞产生, 与细胞表面 IFN 受体结合, 诱导数百

种 IFN 刺激基因 (IFN-stimulated genes, ISGs) 产物上调。干扰素和炎症因子在调节先天免疫反应以控制病毒感染中发挥重要作用。

5.1 病毒蛋白对抗感染时的宿主防御反应 病毒一方面利用宿主细胞完成自身复制,另一方面还需逃避细胞免疫反应以优化复制过程。为了确保有效复制,HSV-1 编码几种病毒蛋白以对抗感染时的宿主防御反应,HSV-1 ICP0 在病毒感染早期,可劫持人类免疫系统的感应器蛋白——干扰素诱导蛋白 16 (Interferon-inducible protein 16, IFI16),使后者迁移至细胞质,最终困在病毒粒子中<sup>[34]</sup>。ICP0 还可与 NF- $\kappa$ B 结合,以抑制 TNF- $\alpha$  介导的 NF- $\kappa$ B 信号激活<sup>[35]</sup>。水痘-带状疱疹病毒 (Varicella zoster virus, VZV) 的 ORF61 蛋白可通过泛素化降解 IRF3,抑制细胞先天免疫<sup>[36]</sup>。对这些机理的了解有助于进一步认识疱疹病毒如何进行免疫逃避,从而寻找合适的药物以防治宿主免疫功能被病毒破坏。

5.2 病毒逆转或干扰宿主免疫系统 病毒感染可诱导体内炎症,NF- $\kappa$ B 在炎症和病毒感染相关基因的调控中发挥着重要作用,疱疹病毒能够通过激活 NF- $\kappa$ B 通路促进自身复制。蛋白酶体抑制剂硼替佐米 (PS-341/bortezomib) 是一种抗癌药物,可阻断 NF- $\kappa$ B 激活,研究结果表明,PS-341 可降低多种疱疹病毒的入侵和复制<sup>[37]</sup>。

越来越多的报道表明,病毒可利用泛素-蛋白酶体系调节宿主免疫反应,也可模拟泛素连接酶功能靶向泛素化修饰并降解细胞的抗病毒蛋白,这也是病毒进行免疫逃避的主要手段之一。杨梅素 (Myricetin) 是一种多羟基黄酮化合物,是各种人类食物的主要成分之一,也被称为膳食类黄酮。Myricetin 通过直接灭活病毒、激活宿主抗病毒防御、激活 NF- $\kappa$ B 和丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路以及细胞因子基因的表达激活宿主抗病毒防御,从而抑制 PRV 感染<sup>[38]</sup>。最近在调节宿主免疫反应方面,抗病毒药物的发展大大促进了病毒学和药剂学领域的发展,并对人类和动物的卫生保健做出了重大贡献。

## 6 展望

自 2013 年以来,只有 12 种药物被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于病毒感染的治疗;其中只有 1 种用于疱疹病毒中巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 的治疗,10 种用于丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒感染的治疗,1 种用于流感病毒的治疗。现有药物在控

制其他病毒感染方面的局限性和使用抗病毒药物新出现的耐药性表明,迫切需要有效的药物用于病毒感染的治疗。疱疹病毒是严重威胁公共卫生的重要病原,特别是在免疫力较低的人群中。虽然抗病毒治疗的需求迅速增长,抗病毒药物的审批却非常缓慢。开发一种新药可能需要 15 年左右的时间,花费数十亿美元,高昂的研发成本是抗病毒药物发展缓慢的重要原因。从数百种化合物中鉴定出有应用价值的临床前药物中,大约有 10% 可能被批准临床使用,大约 30% 的新药在临床试验中未能通过安全协议。体外研究可以确定目标病毒株,确定易受病毒感染的宿主细胞范围,并揭示专门用于控制病毒感染的额外分子靶点。宿主分子靶标的价值可以通过 RNA 干扰或 CRISPR/Cas9 等方法基因敲除或突变后进行评估。体内研究可确定最大耐受剂量和副作用、控制病毒感染的功效和血浆中药物浓度的药代动力学,以便重新建立治疗病毒疾病有效和安全的方案。

老药新用是将已经获得 FDA 批准的药物用于开发治疗病毒感染的药物,由于这些药物基本经历了 I 期和/或 II 期临床试验,并且已经建立了毒性特性,因此将其重新用于抗病毒治疗可能为开发抗病毒药物提供一种高效、经济和安全的方法。当然,为了重新利用药物,如抗癌药物和其他药物,研究人员仍然需要通过体外、体内和临床研究,以确定一种候选药物治疗病毒疾病的价值。一般来说,病毒感染是一种急性发病过程,对于病毒感染的用药剂量可能需要比治疗最初靶向慢性疾病时的使用剂量更高,才能有效抑制急性感染,因此,需要仔细确定改用药物的给药途径和毒性。病毒感染不仅会改变宿主的免疫系统,还会改变宿主器官的功能,从而干扰药物的药理作用或引起额外的副作用。因此,研究能够靶向病毒成分、调节细胞机制和减轻不良反应的联合疗法,以达到提高抗病毒疗效、降低病毒耐药性、最小化毒性和副作用的最佳结果。研究与病毒侵染相关的细胞蛋白,是发现并确定抗病毒制剂新靶点的有效策略。

近十几年以来,科学家们鉴定了一些涉及生物学现象多个方面的细胞蛋白,在病毒-宿主相互作用过程中的特性、细胞定位、结构和功能均发生显著变化。在深入了解病毒劫持或干扰宿主细胞蛋白的基础上,靶向设计抗病毒策略,有望促进宿主细胞在与病毒对抗中占据优势地位。

参考文献:

[1] 田文骏,郑成,王晓佳. 单纯疱疹病毒 I 型最新研究进展—病

- 原学、防控及应用[J]. 生命科学研究, 2020, 24(5): 425-430.
- [2] 路金金, 王晓佳. 伪狂犬病毒致病机理与防控技术研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(6): 60-64.
  - [3] Liu Q, Kuang Y, Li Y, *et al.* The epidemiology and variation in pseudorabies virus: a continuing challenge to pigs and humans[J]. *Viruses*, 2022, 14(7): 1407-1463.
  - [4] Sauerbrei A. Acyclovir resistance in herpes simplex virus type 1 encephalitis: a case report[J]. *Journal of Neurovirology*, 2017, 23(4): 638-639.
  - [5] Ji X, Li Z. Medicinal chemistry strategies toward host targeting antiviral agents[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2020, 40(5): 1519-1557.
  - [6] Li C C, Wang X J, Wang H R. Repurposing host-based therapeutics to control coronavirus and influenza virus[J]. *Drug Discovery Today*, 2019, 24(3): 726-736.
  - [7] Lesch M, Luckner M, Meyer M, *et al.* RNAi-based small molecule repositioning reveals clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(3): e1007601.
  - [8] Boutell C, Sadis S, Everett R D. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated ring finger domain act as ubiquitin E3 ligases *in vitro* [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(2): 841-850.
  - [9] Atkins S L, Motaib S, Wiser L C, *et al.* Small molecule screening identifies inhibitors of the Epstein-Barr virus deubiquitinating enzyme, BPLF1[J]. *Antiviral Research*, 2020, 173: 104649.
  - [10] Meng W, Han S C, Li C C, *et al.* Multifunctional viral protein g34. 5 manipulates nucleolar protein NOP53 for optimal viral replication of HSV 1[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9: 103.
  - [11] Malik P, Tabarraei A, Kehlenbach R H, *et al.* Herpes simplex virus ICP27 protein directly interacts with the nuclear pore complex through NUP62, inhibiting host nucleocytoplasmic transport pathways[J]. *Journal of Biology Chemistry*, 2012, 287(15): 12277-12292.
  - [12] Munger J, Roizman B. The US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death in the absence of other viral proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2001, 98(18): 10410-10415.
  - [13] Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, *et al.* HSV-1 ICP34. 5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein[J]. *Cell Host & Microbe*, 2007, 1(1): 23-35.
  - [14] Fuentes-Gonzalez A M, Contreras-Paredes A, Manzo-Merino J, *et al.* The modulation of apoptosis by oncogenic viruses[J]. *Virology Journal*, 2013, 10(1): 182-199.
  - [15] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity[J]. *Nature Review Immunology*, 2001, 1(2): 135-145.
  - [16] Ming X, Bo Z, Miao Y, *et al.* Pseudorabies virus kinase UL13 phosphorylates H2AX to foster viral replication[J]. *FASEB Journal*, 2022, 36(3): e22221.
  - [17] Lai I H, Chang C D, Shih W L. Apoptosis induction by pseudorabies virus via oxidative stress and subsequent DNA damage signaling[J]. *Intervirology*, 2019, 62(3-4): 116-123.
  - [18] Diehl N, Schaal H. Make yourself at home; viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Viruses*, 2013, 5(12): 3192-3212.
  - [19] Poon A P, Benetti L, Roizman B. US3 and US3. 5 protein kinases of herpes simplex virus 1 differ with respect to their functions in blocking apoptosis and in virion maturation and egress[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(8): 3752-3764.
  - [20] Zhu H Y, Han L, Shi X L, *et al.* Baicalin inhibits autophagy induced by influenza A virus H3N2[J]. *Antiviral Research*, 2015, 113: 62-70.
  - [21] Cabrera J R, Manivanh R, North B J, *et al.* The ESCRT-related ATPase Vps4 is modulated by interferon during herpes simplex virus 1 infection[J]. *mBio*, 2019, 10(2): e02567-18.
  - [22] Mattosio D, Segré C V, Chioocca S. Viral manipulation of cellular protein conjugation pathways: the SUMO lesson[J]. *World Journal of Virology*, 2013, 2(2): 79-90.
  - [23] Lilley C E, Chaurushiya M S, Boutell C, *et al.* A viral E3 ligase targets RNF8 and RNF168 to control histone ubiquitination and DNA damage responses [J]. *EMBO Journal*, 2010, 29(5): 943-955.
  - [24] Bogdanow B, Phan Q V, Wiebusch L. Emerging mechanisms of G<sub>1</sub>/S cell cycle control by human and mouse cytomegaloviruses [J]. *mBio*, 2021, 12(6): e0293421.
  - [25] Abaitua F, Hollinshead M, Bolstad M, *et al.* A nuclear localization signal in herpesvirus protein VP1-2 is essential for infection via capsid routing to the nuclear pore [J]. *Journal Virology*, 2012, 86(17): 8998-9014.
  - [26] Döhner K, Ramos-Nascimento A, Bialy D. Importin  $\alpha 1$  is required for nuclear import of herpes simplex virus proteins and capsid assembly in fibroblasts and neurons[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(1): e1006823.
  - [27] Perwitasari O, Johnson S, Yan X, *et al.* Verdinexor, a novel selective inhibitor of nuclear export, reduces influenza A virus replication *in vitro* and *in vivo* [J]. *Journal of Virology*, 2014, 88: 10228-10243.
  - [28] Ahmad I, Wilson D. HSV-1 cytoplasmic envelopment and egress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 5969.
  - [29] Štefánik M, Bhosale D S, Haviernik J, *et al.* Diphyllin shows a broad-spectrum antiviral activity against multiple medically important enveloped RNA and DNA viruses [J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 354.
  - [30] Martinez-Lopez A, Persaud M, Chavez M P, *et al.* Glycosylated diphyllin as a broad-spectrum antiviral agent against Zika virus [J]. *EBioMedicine*, 2019, 47: 269-283.
  - [31] Herdy B, Jaramillo M, Svitkin Y V, *et al.* Translational control of the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B and production of type I interferon by phosphorylation of the translation factor eIF4E [J]. *Nature Immunology*, 2012, 13(6): 543-550.
  - [32] Li C C, Chi X J, Wang J, *et al.* Small molecule RAF265 as an antiviral therapy acts against HSV-1 by regulating cytoskeleton rearrangement and cellular translation machinery [J]. *Journal of Medical Virology*, 2022, 95(1): e28226.
  - [33] Dong H J, Wang Z H, Meng W, *et al.* The natural compound homoharringtonine presents broad antiviral activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Viruses-Basel*, 2018, 10: 606.
  - [34] Dell'oste V, Gatti D, Gugliesi F, *et al.* Innate nuclear sensor IFI16 translocates into the cytoplasm during early stage of *in vitro* HCMV infection and is entrapped in the egressing virions during late stage[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(12): 6970-6982.
  - [35] Zhang J, Wang K, Wang S, *et al.* Herpes simplex virus 1 E3 ubiquitin ligase ICP0 protein inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation by interacting with p65/RelA and p50/NF- $\kappa$ B1[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(23): 12935-12948.
  - [36] Lang Z W, Zhang L J, Zhang S J, *et al.* A clinicopathological study on 3 cases of severe acute respiratory syndrome[J]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2003, 32: 201-204.
  - [37] Lee B H, Tebaldi G, Pritchard S M, *et al.* Host cell neddylation facilitates alphaherpesvirus entry in a virus-specific and cell-dependent manner [J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(5): e0311422.
  - [38] Hu H Y, Hu Z Q, Zhang Y Y, *et al.* Myricetin inhibits pseudorabies virus infection through direct inactivation and activating host antiviral defense [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 985108.

(责任编辑 冯茹)

# 我国青藏高原地区家畜弓形虫感染情况的 Meta 分析

蔡其健, 李冰洁, 周金林, 曹杰, 周勇志, 张厚双  
(中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 闵行 200241)

**摘要:**为了系统分析我国青藏高原地区常见家畜的弓形虫感染情况,本研究利用 Web of Science、中国知网数据库 (CNKI) 等 6 个数据库,检索有关我国青藏高原地区 (以青海省和西藏自治区为主) 家畜 (牛、羊和猪) 弓形虫感染率的文献,检索的时间范围从建立数据库至 2022 年 10 月 1 日。由 2 位评价者采用独立双盲方法进行文献筛选,提取数据资料并交叉校对、评价纳入研究的质量后,采用 Stata 16.0 软件进行 Meta 分析,通过 Meta 亚组分析和 Meta 回归分析探究合并结果的异质性来源,并评估发表偏倚。结果显示,共筛选获得 29 篇文献,3 种家畜的研究皆存异质性 (牛:  $I^2 = 98.5\%$ ; 羊:  $I^2 = 98.5\%$ ; 猪:  $I^2 = 96.7\%$ ), 异质性来源提示为采样范围和采样区域;合并后牛、羊和猪的弓形虫感染率分别为 11% (95% CI = 7% ~ 15%)、13% (95% CI = 8% ~ 19%) 和 14% (95% CI = 8% ~ 20%);关于羊和猪的研究都具有发表偏倚 ( $P < 0.05$ ),关于牛的研究无发表偏倚 ( $P > 0.05$ )。结果表明,我国青藏高原部分地区 3 种常见的家畜普遍存在弓形虫感染的情况。

**关键词:**弓形虫病; 青藏高原; 家畜; 感染率; Meta 分析

中图分类号: S855.9

文献标志码: A

文章编号: 0529-6005(2024)03-0104-10

## Meta-Analysis of *Toxoplasma gondii* Infection in Livestock in the Qinghai-Tibet Plateau Region of China

CAI Qijian, LI Bingjie, ZHOU Jinlin, CAO Jie, ZHOU Yongzhi, ZHANG Houshuang  
(Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

**Abstract:** In order to systematically analyze the prevalence of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) infection in common livestock in the Qinghai-Tibet Plateau region of China, this study utilized six databases, including Web of Science and China National Knowledge Infrastructure (CNKI), to retrieve literature on the prevalence of *T. gondii* infection in livestock (cattle, sheep, and pigs) in the Qinghai-Tibet Plateau region (mainly Qinghai Province and the Tibet Autonomous Region). The search period ranged from the establishment of the databases to October 1, 2022. Two evaluators independently screened the literature using a double-blind method, extracted and cross-checked data, evaluated the quality of the included studies, and performed a Meta-analysis using Stata 16.0 software. Meta-subgroup analysis and Meta-regression analysis were conducted to explore the sources of heterogeneity in the combined results. Finally, publication bias was assessed. The results showed that a total of 29 articles were screened. There was heterogeneity in the studies of all three livestock species (cattle:  $I^2 = 98.5\%$ ; sheep:  $I^2 = 98.5\%$ ; pigs:  $I^2 = 96.7\%$ ), and the sources of heterogeneity were found to be the sampling range and sampling area. The combined *T. gondii* infection rates for cattle, sheep, and pigs were 11% (95% CI = 7% - 15%), 13% (95% CI = 8% - 19%), and 14% (95% CI = 8% - 20%), respectively. Studies on sheep and pigs showed publication bias ( $P < 0.05$ ), while studies on cattle did not exhibit publication bias ( $P > 0.05$ ). The results indicate that *T. gondii* infection is prevalent in cattle, sheep, and pigs in certain areas of the Qinghai-Tibet Plateau region of China.

**Key words:** toxoplasmosis; Qinghai-Tibetan Plateau; livestock; infection rate; Meta-analysis

**Corresponding author:** ZHANG Houshuang, E-mail: zhanghoushuang@caas.cn

收稿日期: 2023-01-31  
基金项目: 国家重点研发计划项目-政府间国际科技创新合作重点专项 (2017YFE0108600)  
作者简介: 蔡其健 (1997-), 男, 硕士生, 主要从事生物统计学和动物病原分子生物学方面的研究, E-mail: xuanyunca@ sina. com  
通信作者: 张厚双, E-mail: zhanghoushuang@ caas. cn

弓形虫病 (Toxoplasmosis) 又名弓形体病, 引起发病的病原是刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*, *T. gondii*)。弓形虫已经被证实对温血动物具有感染能力, 人、畜禽和许多种野生动物均为中间宿主。弓形虫病呈世界性分布, 古巴、法国、英国、新加坡、东非和巴西等国家和地区人体感染率较高, 我国各



省区市也有人体弓形虫感染的报告<sup>[1]</sup>;世界各地关于动物弓形虫病的流行病学调查越来越多,病例报告的重心由人弓形虫感染合并其他疾病逐渐转向人畜感染共同关注。弓形虫急性致死性疾病常引起家畜发热、呼吸困难、神经症状和极度虚弱等,母畜发病则可造成流产和导致问题新生胎。弓形虫感染对猪和羊的危害较大,尤其是猪,可引起暴发性流行和大批死亡,对畜禽造成严重影响,给养殖业带来较大的经济损失。弓形虫的流行分布广泛、涉及动物众多。目前,已有的调查研究证实了青藏高原地区牦牛、羊、马、鸭、猪、兔、鸡、犬、猫、旱獭、鹿、熊和豚鼠共 13 种动物体内均存在弓形虫的感染<sup>[2]</sup>,表明青藏高原部分地区弓形虫宿主动物种类多。从青海省野生动物旱獭等检出弓形虫阳性证明了青海省存在弓形虫病的自然疫源地<sup>[2]</sup>,大部分弓形虫感染报道与家畜相关,表明青藏高原地区家畜的弓形虫感染问题已经普遍存在且逐步引起重视。本研究旨在系统评估我国青藏高原地区常见家畜的弓形虫感染情况。

## 1 材料与方法

1.1 数据收集和检索策略 检索 PubMed、Web of Science、Embase、中国知网数据库(CNKI)、万方知识数据库和维普网数据库共 6 个数据库中有关我国青藏高原地区(以青海省和西藏自治区为主)家畜(牛、羊和猪)弓形虫感染率的文献,选定检索时间为建库至 2022 年 10 月 1 日。另外,尽可能联系纳入文献的部分参考文献,追溯一些可靠的相关文献。检索的关键词为弓形虫、刚地弓形虫。PubMed 检索策略:{"*Toxoplasma*" [Mesh]} OR ("*Toxoplasmosis*" [Mesh]) OR (*Toxoplasma gondii* [Title/Abstract])} AND {"Animals" [Mesh]} OR (Animal [Title/Abstract])} AND {(Qinghai-Tibetan Plateau [Title/Abstract]) OR (Qinghai [Title/Abstract]) OR (Tibet [Title/Abstract])}。CNKI 检索策略:[SU=(弓形虫+弓形体) OR TKA=(弓形虫)] AND [TKA=(青藏高原+青海+西藏)]。

1.2 文献纳入和排除标准 纳入标准:(1)已公开发表的原始研究;(2)原始研究的内容为弓形虫感染率的横断面研究或涉及该地区家畜感染率的相关研究;(3)有明确的血清学诊断方法和诊断标准;(4)研究对象为动物。排除标准:(1)研究中采集的样本容量小于 100;(2)数据内容不充分、不完善;(3)综述、Meta 分析、病例报告、会议摘要和科技著作;(4)研究对象仅含野生动物或人;(5)研究中设

置有其他干预。

1.3 文献信息提取和质量评估 由 2 位评价者采用独立双盲方法进行文献筛选、提取数据资料并交叉校对,若发现异处,则商定检查并协调分歧。数据资料提取项目包括:研究的篇目、第一作者、出版年份、搜集的样本容量和阳性样本数。研究的质量评价采用澳大利亚循证卫生保健中心的横断面研究评价标准<sup>[3]</sup>,得分可分为 3 个阶层,其中得分 $\leq 6$ 分为低质量研究,6 分 $<$ 得分 $\leq 13$ 分为中等水平研究,13 分 $<$ 得分 $\leq 20$ 分为高质量研究。

1.4 统计分析 采用 Stata 16.0 软件进行 Meta 分析和统计学处理,计算合并弓形虫感染的事件阳性率(感染率)、效应量和 95% 置信区间(Confidence interval, CI)。用  $I^2$  统计量评估研究间的异质性大小并且选择合并模型,若  $I^2 \leq 50\%$ ,研究间以固定效应模型合并结果;若  $I^2 > 50\%$ ,提示研究间存在较大异质性,则采用随机效应模型合并结果。对文献的异质性进行亚组分析和 Meta 回归分析,通过依次排除 1 篇研究后合并效应量的方式对纳入文献进行敏感性分析。利用漏斗图和 Begger 线性回归法检验评估文献的发表偏倚,以  $P < 0.05$  为具有统计学意义的发表偏倚。

## 2 结果

2.1 文献检索 将 6 个数据库检索到的 287 篇文献进行整理筛选,通过剔除重复文献和快速审阅篇名、摘要后,筛查并排除文献 111 篇,剩余 78 篇下载全文,在阅读全文和比较评分之后又排除了不符合要求的文献 19 篇和低质量研究 30 篇,最终得符合要求的文献 29 篇(图 1)。纳入的 29 个研究中,3 种家畜的研究样本总数分别为牛 10 663 例、羊 7 401 例、猪 2 999 例,检出的牛、羊和猪的弓形虫阳性样本总数分别为 1 304、895 和 457 例。

2.2 纳入文献的信息提取和质量评估 29 篇文献报道中搜集的全部样本主要来源于青藏高原地区的青海省和西藏自治区,个别研究包含来源于四川省西部地区的样本。纳入的所有研究质量评价分数均大于 8 分,且都为横断面研究,所纳入的牛、羊和猪弓形虫感染率研究的基本特征如表 1~3 所示。

2.3 合并三类家畜弓形虫感染率 29 篇文献报道了总体样本源自我国青藏高原地区的 3 种家畜的弓形虫感染率,3 种家畜的研究皆存有较大异质性(牛: $I^2 = 98.5\%$ ,羊: $I^2 = 98.5\%$ ,猪: $I^2 = 96.7\%$ ),故采用随机效应模型合并。事件阳性率 Meta 分析

合并结果如图 2~4 所示,牛弓形虫感染血清阳性率为 11% (95% CI = 7% ~ 15%),羊弓形虫感染血清阳性率为 13% (95% CI = 8% ~ 19%),猪弓形虫感染血清阳性率为 14% (95% CI = 8% ~ 20%)。

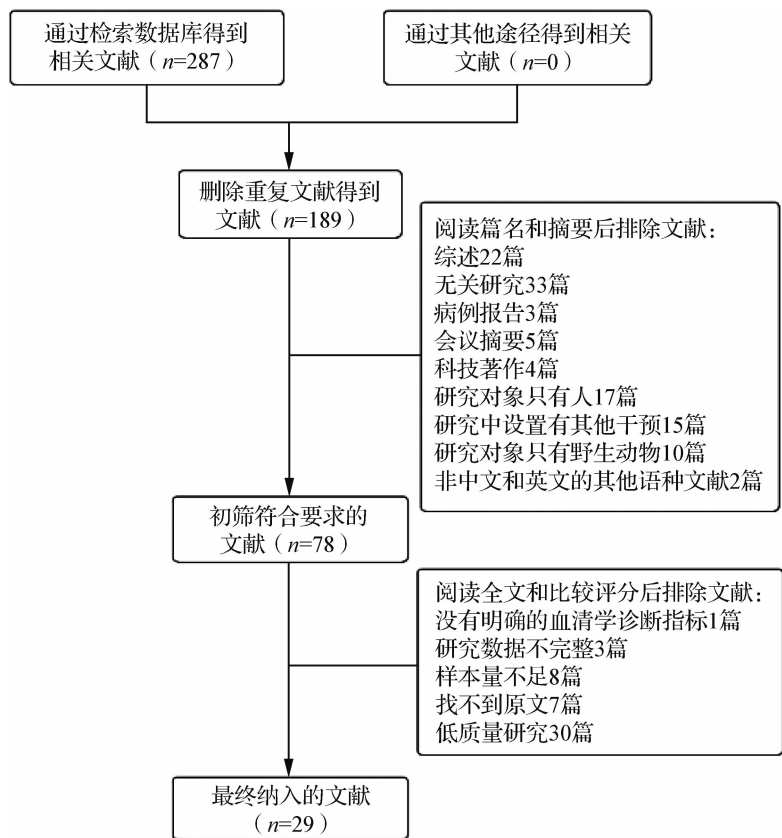


图 1 文献筛选过程  
Fig. 1 Literature screening process

表 1 纳入的牛弓形虫感染率研究的基本特征

第一作者 First author	出版年份 Publication year	研究类型 Research type	样本容量 Sample size	阳性样本数 Positive sample number	阳性率(%) Positive rate	评分(分) Score
李晓卉 <sup>[4]</sup>	2004	横断面	160	11	6.88	9
Liu Jie <sup>[5]</sup>	2008	横断面	946	112	11.84	12
张晓强 <sup>[6]</sup>	2010	横断面	214	13	6.07	10
陈世堂 <sup>[7]</sup>	2010	横断面	614	47	7.65	11
蔡进忠 <sup>[2]</sup>	2011	横断面	635	51	8.03	13
Liu Quan <sup>[8]</sup>	2011	横断面	650	228	35.08	14
Wang Meng <sup>[9]</sup>	2012	横断面	1 603	133	8.30	12
李坤 <sup>[10]</sup>	2014	横断面	116	14	12.07	10
Li Kun <sup>[11]</sup>	2014	横断面	1 641	410	24.98	11
陈长江 <sup>[12]</sup>	2017	横断面	400	9	2.25	11
李长云 <sup>[13]</sup>	2018	横断面	900	15	1.67	11
Sun Tao <sup>[14]</sup>	2021	横断面	2 784	261	9.38	13

表 2 纳入的羊弓形虫感染率研究的基本特征						
Table 2 Basic characteristics of included studies on the prevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> infection in sheep						
第一作者 First author	出版年份 Publication year	研究类型 Research type	样本容量 Sample size	阳性样本数 Positive sample number	阳性率(%) Positive rate	评分(分) Score
傅义娟 <sup>[15]</sup>	2003	横断面	180	14	7.78	9
蔡其刚 <sup>[16]</sup>	2010	横断面	2 402	56	2.33	13
Liu Quan <sup>[17]</sup>	2010	横断面	580	173	29.83	14
Wu Songming <sup>[18]</sup>	2011	横断面	455	26	5.71	10
马国璧 <sup>[19]</sup>	2011	横断面	220	16	7.27	9
蔡进忠 <sup>[2]</sup>	2011	横断面	692	54	7.80	13
赵全邦 <sup>[20]</sup>	2011	横断面	210	46	21.90	9
李万财 <sup>[21]</sup>	2012	横断面	930	118	12.69	10
王晓燕 <sup>[22]</sup>	2015	横断面	200	12	6.00	10
黄荣 <sup>[23]</sup>	2015	横断面	282	60	21.28	11
Liu Zikui <sup>[24]</sup>	2015	横断面	1 250	320	25.60	14

表 3 纳入的猪弓形虫感染率研究的基本特征						
Table 3 Basic characteristics of included studies on the prevalence of <i>Toxoplasma gondii</i> infection in pigs						
第一作者 First author	出版年份 Publication year	研究类型 Research type	样本容量 Sample size	阳性样本数 Positive sample number	阳性率(%) Positive rate	评分(分) Score
马利青 <sup>[25]</sup>	2003	横断面	199	4	2.01	11
晁学元 <sup>[26]</sup>	2008	横断面	100	12	12.00	10
董永森 <sup>[27]</sup>	2010	横断面	557	37	6.64	11
蔡进忠 <sup>[2]</sup>	2011	横断面	348	41	11.78	13
Wu Songming <sup>[28]</sup>	2012	横断面	427	97	22.72	12
高文勋 <sup>[29]</sup>	2016	横断面	454	116	25.55	10
Li Rongrong <sup>[30]</sup>	2017	横断面	454	98	21.59	14
才格加 <sup>[31]</sup>	2019	横断面	460	52	11.30	11

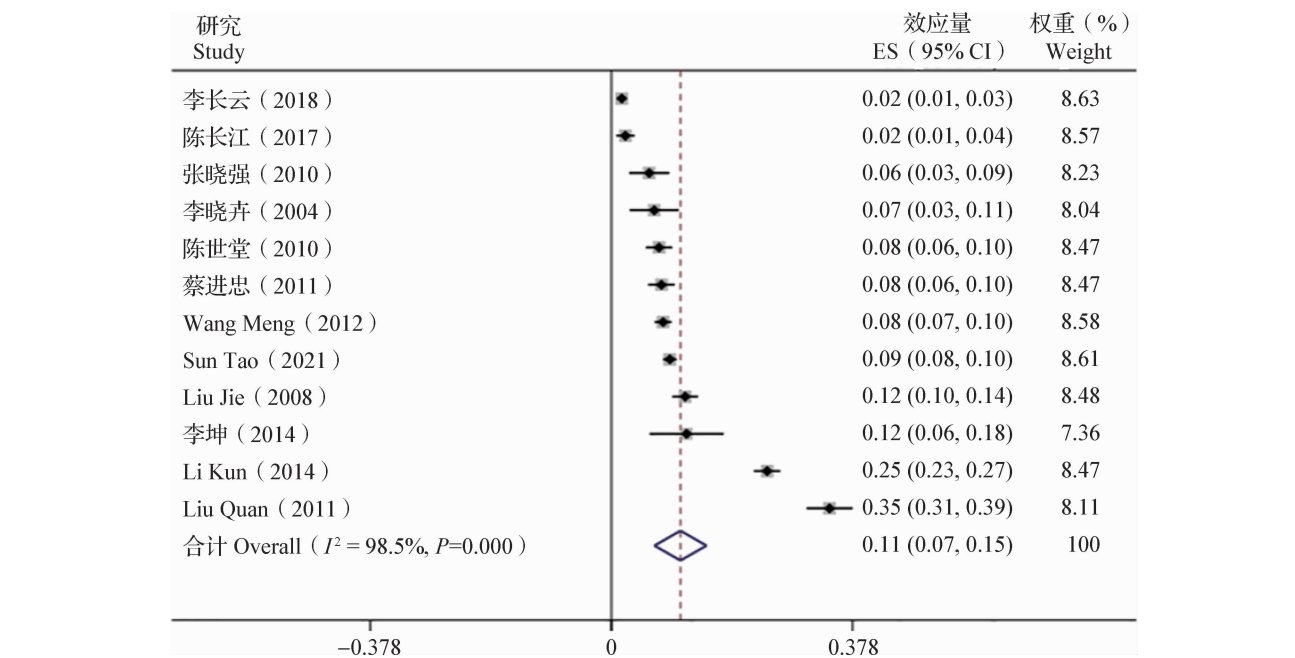


图 2 牛弓形虫感染率的 Meta 分析森林图

Fig. 2 Meta-analysis forest plot of *Toxoplasma gondii* infection rate in cattle

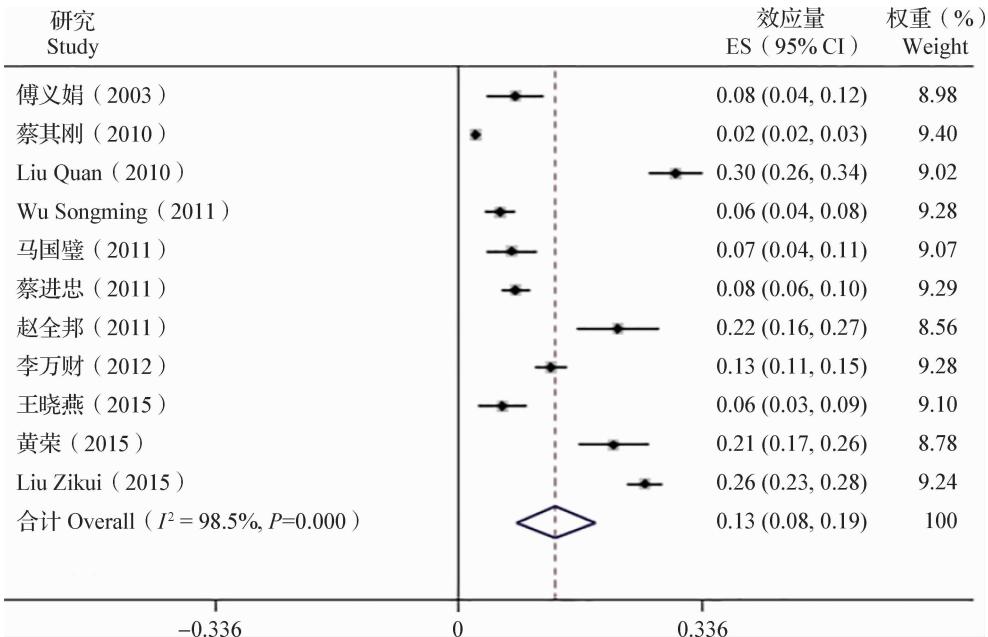


图 3 羊弓形虫感染率的 Meta 分析森林图

Fig. 3 Meta-analysis forest plot of *Toxoplasma gondii* infection rate in sheep

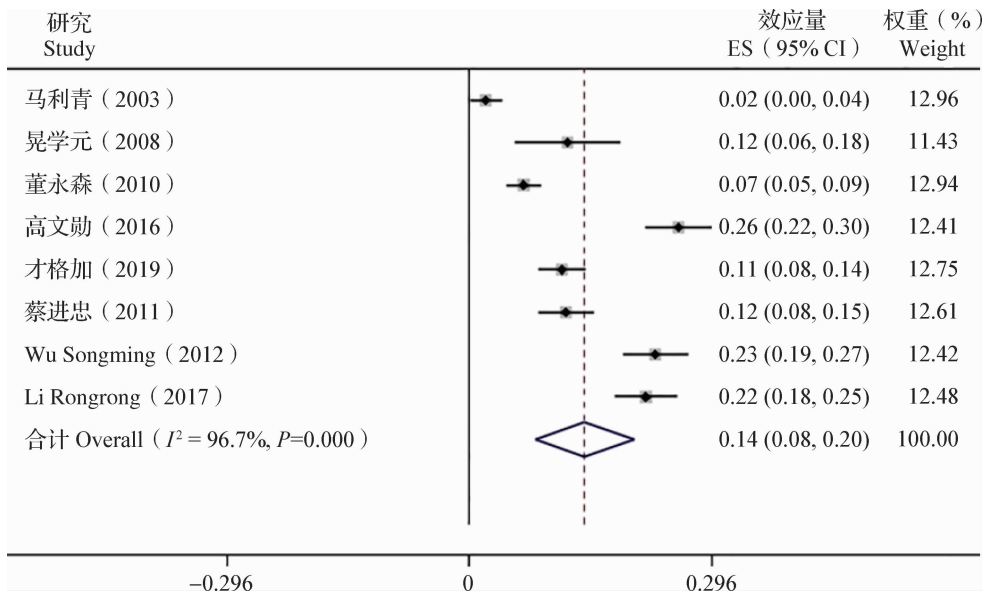


图 4 猪弓形虫感染率的 Meta 分析森林图

Fig. 4 Meta-analysis forest plot of *Toxoplasma gondii* infection rate in pigs

2.4 Mate 亚组分析 通过不同研究的基本情况提取其中相应的明确敏感特征,对不同动物研究按照样本量、采样范围和采样区域等类别指标或其中部分类别进行亚组分析。结果如表 4 ~ 6 所示,牛弓形虫:青海南部和西藏地区牛弓形虫感染率(20%)比青海北部(3%)和混合地区(9%)高,采样范围多县/市混合的感染率(15%)比一县/市(3%)高,牧区感染率(15%)比农区(4%)高,随着样本量的减少(>1 000 组、> 500 且 ≤ 1 000 组、≤500 组),牛弓形虫感染率有所降低(14% > 13% > 6%);羊弓形虫:青海海西地区羊弓形虫感染率最高(18%),青海南部和西藏地区感染率最低(6%),样本量 > 500 的感染率(16%)大于样本量 ≤ 500(11%)的感染率,采样范围多县/市混合的感染率(15%)比一县/市的感染率(12%)高;猪弓形虫:来源于西藏地区的猪弓形虫感染率(23%)远大于青海地区的感染率(8%),样本量 > 400 的感染率(17%)更高。



表 4 牛弓形虫感染情况 Meta 亚组分析  
Table 4 Meta-subgroup analysis of *Toxoplasma gondii* infection in cattle

类别特征 Category characteristics	研究个数 Number of research	$I^2$ 值( % ) $I^2$ value	感染率和 95% CI( % ) Infection rate and 95% CI
采样区域			
青海北部	4	76.3	3(2,5)
青海南部和西藏	4	99.0	20(7,33)
混合地区	4	68.8	9(8,11)
样本量			
≤500	4	81.4	6(2,10)
>500 且 ≤1 000	5	98.9	13(5,21)
>1 000	3	98.5	14(6,22)
采样范围			
一县/市	4	76.3	3(2,5)
多县/市混合	8	98.1	15(10,20)
区域特征			
农区	2	78.8	4(2,9)
牧区	6	99.3	15(5,24)
混合	4	23.9	9(8,10)

表 5 羊弓形虫感染情况 Meta 亚组分析  
Table 5 Meta-subgroup analysis of *Toxoplasma gondii* infection in sheep

类别特征 Category characteristics	研究个数 Number of research	$I^2$ 值( % ) $I^2$ value	感染率和 95% CI( % ) Infection rate and 95% CI
采样区域			
青海海西	3	88.2	18(11,25)
青海南部和西藏	3	0	6(5,8)
混合地区	5	99.2	15(4,25)
样本量			
≤500	6	91.5	11(6,16)
>500	5	99.3	16(6,25)
采样范围			
一县/市	6	92.7	12(7,17)
多县/市混合	5	99.2	15(4,25)

表 6 猪弓形虫感染情况 Meta 亚组分析  
Table 6 Meta-subgroup analysis of *Toxoplasma gondii* infection in pigs

类别特征 Category characteristics	研究个数 Number of research	$I^2$ 值( % ) $I^2$ value	感染率和 95% CI( % ) Infection rate and 95% CI
采样区域			
青海	5	90.7	8(4,13)
西藏	3	3.6	23(21,26)
样本量			
≤400	3	93.1	8(1,16)
>400	5	96.6	17(10,25)

2.5 Meta 回归分析 进一步对 Meta 亚组分析结果进行 Meta 回归的显著性检验,从而验证亚组的正确性并阐明异质性来源。针对不同动物研究提取的亚组类别特征,对样本量、采样范围和采样区域等进行 Meta 回归分析。结果如表 7 ~ 9 所示,在牛的研究中,采样范围的差异有显著性( $P = 0.010$ ),

表明采样范围有差异的研究之间会得到明显不同的感染率;在羊的研究中,仅采样区域的差异具有显著性( $P = 0.020$ ),表明不同地区采集的样本会得到明显不同的估计风险值;在猪的研究中,也仅是采样区域的差异有显著性( $P = 0.013$ ),其他类别特征皆无明显差异。

表 7 牛弓形虫感染情况 Meta 回归分析  
Table 7 Meta-regression analysis of *Toxoplasma gondii* infection in cattle

类别特征 Category characteristics	Meta 回归系数 Meta regression coefficient	95% 置信区间(%) 95% CI	P 值 P value
采样区域	-0.054	-0.111 ~ 0.002	0.051
样本量	0.004	-0.076 ~ 0.084	0.906
采样范围	0.335	0.108 ~ 0.563	0.010
区域特征	-0.072	-0.166 ~ 0.021	0.111

表 8 羊弓形虫感染情况 Meta 回归分析  
Table 8 Meta-regression analysis of *Toxoplasma gondii* infection in sheep

类别特征 Category characteristics	Meta 回归系数 Meta regression coefficient	95% 置信区间(%) 95% CI	P 值 P value
采样区域	-0.057	-0.100 ~ -0.015	0.020
样本量	0.043	-0.142 ~ 0.229	0.604
采样范围	-0.002	-0.063 ~ 0.060	0.953

表 9 猪弓形虫感染情况 Meta 回归分析  
Table 9 Meta-regression analysis of *Toxoplasma gondii* infection in pigs

类别特征 Category characteristics	Meta 回归系数 Meta regression coefficient	95% 置信区间(%) 95% CI	P 值 P value
样本量	0.009	-0.089 ~ 0.108	0.816
采样区域	0.144	0.045 ~ 0.243	0.013

2.6 敏感性分析 采用依次排除 1 篇研究后重新合并效应量的方式对纳入文献进行敏感性分析,结果如图 5 ~ 7 所示,3 种家畜的相应研究逐一去除

后,合并的效应量都稳定处在不去除任何研究的合并效应量的 95% 置信区间内,提示 Meta 分析的结果无明显波动。

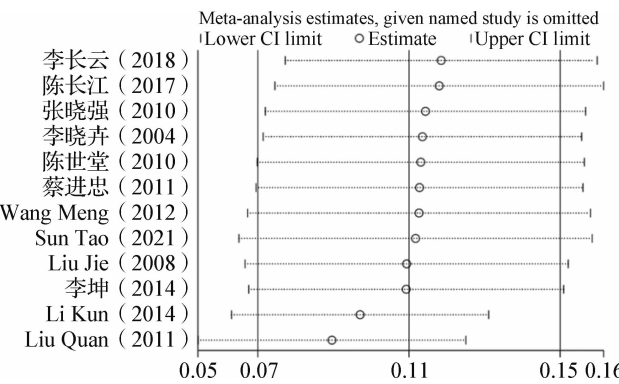


图 5 牛弓形虫感染率的敏感性分析  
Fig. 5 Sensitivity analysis of *Toxoplasma gondii* infection rate in cattle

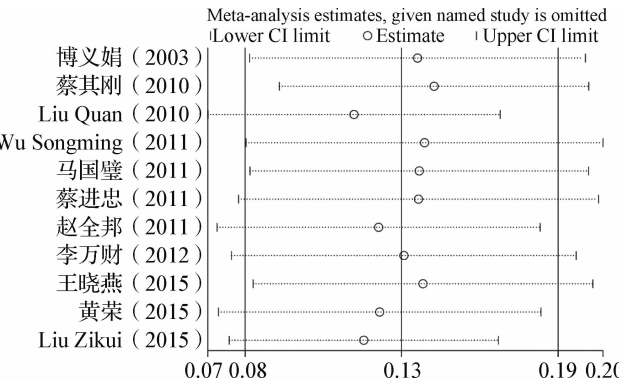


图 6 羊弓形虫感染率的敏感性分析  
Fig. 6 Sensitivity analysis of *Toxoplasma gondii* infection rate in sheep

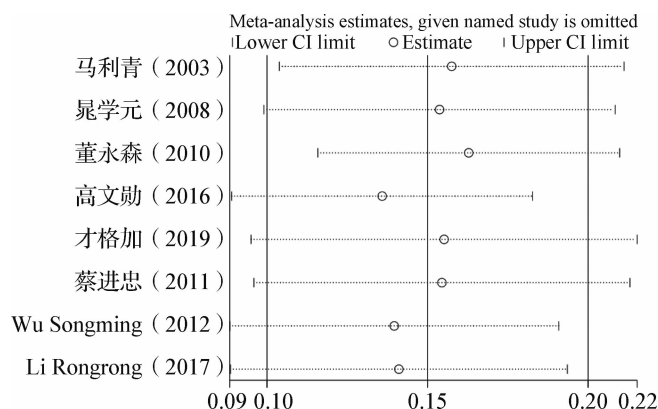


图7 猪弓形虫感染率的敏感性分析

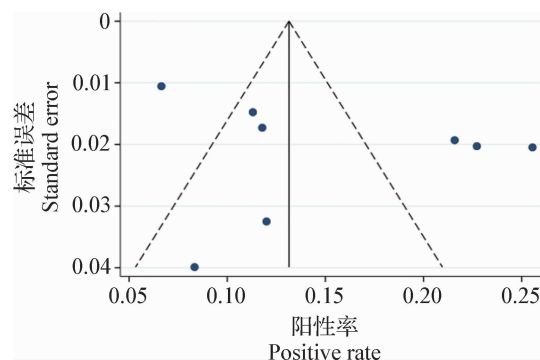
Fig. 7 Sensitivity analysis of *Toxoplasma gondii* infection rate in pigs

图10 猪弓形虫感染率的发表偏倚漏斗图

Fig. 10 Funnel plot of publication bias for *Toxoplasma gondii* infection rate in pigs

2.7 文献发表偏倚评价 对所有纳入的29篇文献按照研究对象分类分别进行发表偏倚的检验,结果如图8~10所示,三者的漏斗图分布都不均匀,对称程度较差。Begger 线性回归检验的结果显示,关于羊和猪的研究都具有发表偏倚( $P < 0.05$ ),关于牛的研究未见明显的发表偏倚( $P > 0.05$ )。

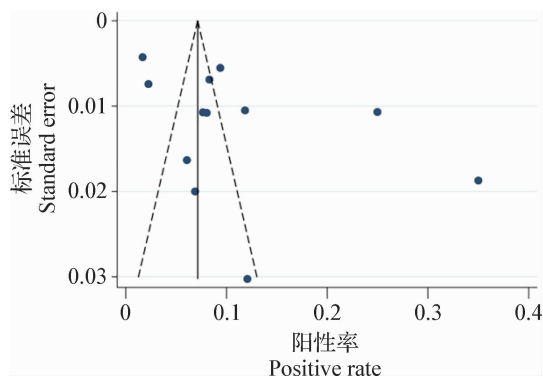


图8 牛弓形虫感染率的发表偏倚漏斗图

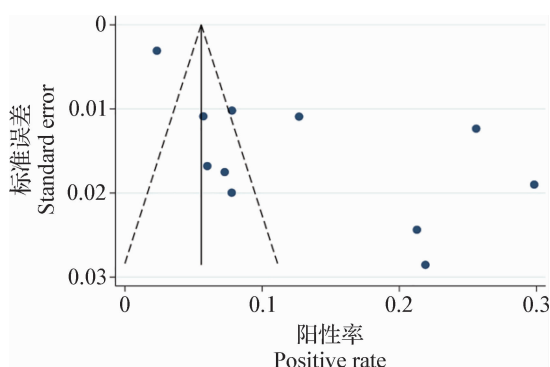
Fig. 8 Funnel plot of publication bias for *Toxoplasma gondii* infection rate in cattle

图9 羊弓形虫感染率的发表偏倚漏斗图

Fig. 9 Funnel plot of publication bias for *Toxoplasma gondii* infection rate in sheep

### 3 讨论

本研究通过无对照单臂的 Meta 分析合并得到我国青藏高原地区部分家畜的弓形虫感染情况,在青藏高原地区常见的家畜群体中,牛的弓形虫感染率为11%,羊的弓形虫感染率为13%,猪的弓形虫感染率为14%。其中猪的弓形虫感染更为普遍,牛对弓形虫感染具有相对抗性,因此牛弓形虫阳性血清检出率普遍较低。2000年以后,世界各地关于家畜弓形虫病的流行病学调查不断增多。2014年, Matsuo 等通过弓形虫抗体检测发现,日本的牛弓形虫感染率约为7.3%,猪约为5.2%,但在家禽和马属动物中暂未发现感染<sup>[32]</sup>; Al-Kappany 等在研究中发现,埃及各省绵羊弓形虫病的真实患病率介于4.1%~26%<sup>[33]</sup>; Pagmadulam 等在2018—2019年分别调查了蒙古国山羊和绵羊群体的弓形虫感染情况,结果显示,山羊总体阳性率为32%,绵羊为34.8%<sup>[34]</sup>。我国新疆地区家畜感染弓形虫的情况比较严重,米晓云等于2007年通过间接血凝的方法检测新疆地区猪、羊和牛弓形虫感染情况,结果显示,阳性率分别为66.39%、33.33%和31.94%<sup>[35]</sup>,表明新疆地区家畜弓形虫感染率持续偏高。弓形虫病作为动物第三类疫病,在人类患病群体和家畜中应当引起相同的重视。弓形虫感染引起家畜流产的病例报道也有很多,有诸多血清学调查研究表明,绵羊和山羊有广泛接触弓形虫的情况,弓形虫病是全世界绵羊和山羊流产的主要原因<sup>[36]</sup>。弓形虫在野生动物群体中传播具有便利性,可利用自然环境迅速传播,我国青藏高原地区的野生动物资源的多态性及其分布的广泛性为弓形虫的传播提供了有利的生物条件,因此可以推测部分家畜感染弓形虫的情况与野生动物存在因果关联。

本研究还通过 Meta 亚组分析和 Meta 回归分析探究了各研究异质性的来源,经异质性检验得 3 种家畜的弓形虫感染率研究皆有显著的异质性,结果显示,在牛弓形虫感染率的类别特征中仅有采样范围是明确的异质性来源,于一县/市采样的研究和多县/市混合采样的研究所得到的感染率有明显差异,多县/市混合的感染率高于于一县/市,推测出现这种情况的原因是各地区感染率本身就存在差异,采样范围更广的调查往往会纳入感染率较高的地区。虽然牧区牛的感染率比农区要高,但在部分研究中样本来源具有混合特性,因此平衡了在亚组分析中该类别特征感染率的差异,回归结果也表明区域特征并非异质性来源。猪弓形虫感染率的研究中明确的异质性来源是采样区域,西藏地区的合并感染率远高于青海地区,分析原因可能是青海地区猪的弓形虫感染由于规模化养殖程度较高而能够得到有效的控制,但西藏地区较多农户以散养为主要养殖方式,猪只活动范围广,活动时间自由,食物成分复杂,与流浪动物的接触频繁,触及外界环境卵囊而感染弓形虫的概率提高,因此西藏地区猪群可能成为高风险群体。在羊的弓形虫感染率研究中,异质性来源也与采样区域高度相关。不同动物具有群体的数量特征(包括年龄、性别构成、群体规模、密集程度等)、分布的环境特征(包括地理差异、独立的气候影响、人工干预程度等)、生物节律特征和动物社会学特征等,这些特征诱发潜在的危险因素或间接与患病产生机会关联。Pagmadulam 等的研究中年龄被认为是山羊弓形虫血清阳性的危险因素<sup>[34]</sup>。源自塞尔维亚的研究通过多自变量逻辑回归评估了多种家畜感染弓形虫的风险,表明牛感染的危险因素包括所处地理位置气候更潮湿、牛群规模更小,半开放式的养殖环境也比完全封闭的养殖环境更易造成感染;在绵羊中,母羊的感染风险较高;在猪群中,成年动物和育肥猪具有较高感染风险<sup>[37]</sup>,这些结论与本研究感染率偏高的类别特征仅有较少的因素交集,提示今后相关的流行病学调查可以重点关注上述研究中提到的家畜年龄、性别、群体规模和养殖环境等因素,把样本来源进行详细统计描述,为弓形虫患病危险因素评估提供更多证据。本研究还注意到在采样区域的流行病学调查中,采样范围在一定程度上影响感染率的调查结果,提示流行病学调查对采样点的选择应当予以明确的细节特征,最终按相同特征进行分组统计比较。

青藏高原地区由于平均海拔高、气候环境复

杂、草场面积大、野生动物和放牧动物分布广等众多因素,家畜弓形虫病的防治仍然是个考验,建立有秩序的牧场和规律化的放牧有助于疾病防控。总体上,整个青藏高原地区的弓形虫流行病学研究一直都在有效开展,但由于地理环境和试验条件等因素的限制导致研究数量有限。为进一步扩大完善青藏高原地区弓形虫病的血清学检测数据;更准确地评估我国青藏高原地区家畜弓形虫感染情况,需要进一步开展未报道区域的筛查工作和相关研究。

#### 参考文献:

- [1] 汪明. 重视人畜共患寄生虫病,保护人类健康[C]//全国人畜共患病学术研讨会论文集. 北京:中华预防医学会人畜共患病学术研讨会,2006:42-49.
- [2] 蔡进忠,李春花. 青海家畜弓形虫病血清学调查与流行情况分析[J]. 中国兽医杂志,2011,47(1):45-46.
- [3] Zeng X,Zhang Y,Kwong J S,*et al.* The methodological quality assessment tools for preclinical and clinical studies,systematic review and meta-analysis, and clinical practice guideline: a systematic review [J]. Journal of Evidence-Based Medicine, 2015, 8 (1): 2-10.
- [4] 李晓卉. 青海牦牛弓形体病的血清学调查[J]. 中国草食动物,2004,24(4):30-31.
- [5] Liu J,Cai J Z,Zhang W,*et al.* Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in yaks (*Bos grunniens*) in Qinghai, China [J]. Veterinary Parasitology, 2008, 152 (3-4): 330-332.
- [6] 张晓强,李万财,陆艳. 青海天峻县牦牛弓形虫病的血清学调查和分析[J]. 畜牧与兽医,2010,42(1):107-108.
- [7] 陈世堂,王谢忠,沈得贵. 青海省牦牛弓形体病的血清学调查[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(8):192-193.
- [8] Liu Q,Cai J Z,Zhao Q,*et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in yaks (*Bos grunniens*) in northwestern China [J]. Tropical Animal Health and Production, 2011, 43(4): 741-743.
- [9] Wang M,Wang Y H,Ye Q,*et al.* Serological survey of *Toxoplasma gondii* in Tibetan mastiffs (*Canis lupus familiaris*) and yaks (*Bos grunniens*) in Qinghai, China [J]. Parasitology Vectors, 2012, 5:35.
- [10] 李坤,姜文腾,韩照清,等. 2012—2013 年青藏高原地区牦牛弓形虫血清检测报告[J]. 中国奶牛,2015,33(8):26-27.
- [11] Li K,Gao J,Shahzad M,*et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in yaks (*Bos grunniens*) on the Qinghai-Tibetan Plateau of China [J]. Veterinary Parasitology, 2014, 205(1-2): 354-356.
- [12] 陈长江,范秀兰,谈明禄,等. 青海省湟源县规模奶牛场布病、衣原体病和弓形虫病血清学调查分析[J]. 青海畜牧兽医杂志,2017,47(1):33-35.
- [13] 李长云,铁富萍,才仁卓玛. 青海海晏县牦牛弓形虫血清抗体检测[J]. 中国兽医杂志,2018,54(5):52-53.
- [14] Sun T,Rahman S U,Cai J Z,*et al.* Seroprevalence and associated

- risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in yaks (*Bos grunniens*) on the Qinghai-Tibetan Plateau of China [J]. *Parasite*, 2021, 28:43.
- [15] 傅义娟. 青海省猪牛羊弓形虫病的血清抗体检测[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(9):69-70.
- [16] 蔡其刚, 马利青. 青海省绵羊弓形虫病的 ELISA 诊断方法的建立及血清学调查[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(3):39-40.
- [17] Liu Q, Ma R, Zhao Q, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Tibetan sheep in northwestern China [J]. *Journal Parasitology*, 2010, 96(6):1222-1223.
- [18] Wu S M, Danba C, Huang S Y, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Tibetan sheep in Tibet, China [J]. *Journal Parasitology*, 2011, 97(6):1188-1189.
- [19] 马国璧, 马利青, 王戈平, 等. 青海省动物弓形虫病的血清学检测[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2011, 41(3):25-26.
- [20] 赵全邦, 胡广卫, 李静, 等. 青海省德令哈地区羊弓形虫病血清学调查[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2011, 56(2):51.
- [21] 李万财. 藏羊的弓形虫、衣原体和布鲁菌病的血清抗体检测[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(2):58-59.
- [22] 王晓燕, 李秀萍, 才让南杰, 等. 青海省河南县欧拉型藏羊流产类疾病血清学检测[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2015, 45(4):8-10.
- [23] 黄荣, 李秀萍, 王光华, 等. 青海刚察绵羊几种病原的检测[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(4):46-48.
- [24] Liu Z K, Li J Y, Pan H. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in small ruminants in China [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2015, 118(4):488-492.
- [25] 马利青, 王戈平, 阎高峰. 青海省西宁地区猪弓形体病的血清学调查[J]. 家畜生态, 2003, 24(4):34-35.
- [26] 晁学元, 郭全辉. 青海乐都猪弓形虫病血清学调查[J]. 中国兽医杂志, 2008, 56(5):40.
- [27] 董永森, 潘英卿, 范秀兰, 等. 青海省猪弓形虫病血清流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010, 53(24):83-84.
- [28] Wu S M, Ciren D, Huang S Y, et al. First report of *Toxoplasma gondii* prevalence in Tibetan pigs in Tibet, China [J]. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 2012, 12(8):654-656.
- [29] 高文勋, 李坤, 韩照清, 等. 西藏部分地区藏猪弓形虫血清检测报告[J]. 湖北畜牧兽医, 2016, 37(3):5-6.
- [30] Li R R, Li K, Wang X Q. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in Tibetan pigs in Nyingchi, Tibet, China [J]. *Pakistan Journal of Zoology*, 2017, 49:407-409.
- [31] 才格加, 张君, 王锦文, 等. 青海省海南地区猪弓形虫病血清学调查及分析[J]. 家畜生态学报, 2019, 40(3):69-71.
- [32] Matsuo K, Kamai R, Uetsu H, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan [J]. *Parasitology International*, 2014, 63(4):638-639.
- [33] Al-Kappany Y M, Abbas I E, Devleesschauwer B, et al. Seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Egyptian sheep and goats [J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14(1):120.
- [34] Pagmadulam B, Myagmarsuren P, Yokoyama N, et al. Seroepidemiological study of *Toxoplasma gondii* in small ruminants (sheep and goat) in different provinces of Mongolia [J]. *Parasitology International*, 2020, 74:101996.
- [35] 米晓云, 巴音查汗, 李文超. 新疆猪、牛、羊弓形虫病的血清学调查[J]. 中国兽医寄生虫病, 2007, 15(2):22-24.
- [36] Kolören Z, Dubey J P. A review of toxoplasmosis in humans and animals in Turkey [J]. *Parasitology*, 2020, 147(1):12-28.
- [37] Klun I, Djurković-Djaković O, Katić-Radivojević S, et al. Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia; seroprevalence and risk factors [J]. *Veterinary Parasitology*, 2006, 135(2):121-131.

(责任编辑 冯茹)



# 非洲猪瘟检测方法研究进展

陈画菡<sup>1,2,3,4</sup>, 朱君海<sup>1,2,3,4</sup>, 高飞<sup>1,2,3,4</sup>, 简伟俊<sup>1,2,3,4</sup>, 黄丽红<sup>1,2,3,4</sup>, 亓文宝<sup>1,2,3,4</sup>

[1. 华南农业大学兽医学院 动物疫病防控全国重点实验室, 广东 广州 510642; 2. 国家非洲猪瘟区域实验室(广州), 广东 广州 510642; 3. 农业农村部人畜共患病重点实验室, 广东 广州 510642; 4. 人兽共患病防控制剂国家地方联合工程实验室, 广东 广州 510642]

**摘要:**非洲猪瘟(ASF)是由非洲猪瘟病毒(ASFV)引起的猪的一种急性、热性、高度接触性传染病。ASF 疫情的暴发,严重威胁全球生猪养殖业安全,给全球造成巨大的经济损失。目前尚未开发出安全有效的 ASF 疫苗,因此,及时、准确的 ASF 实验室诊断成为疫情防控的重要手段。ASF 现有检测方法包括血清学检测、聚合酶链式反应(PCR)、等温扩增技术和规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关系统(CRISPR/Cas)等,其中,血清学检测、PCR 检测和 CRISPR/Cas 都需要专业人员和设备,而等温扩增技术受限于单一类型的检测样品,且灵敏度较低,因此 ASF 现有检测方法无法同时达到灵敏度高,又快速、简便、可用于现场检测的要求。相较之下,ASF 新型检测方法可以达到便捷、高效、省时省力以及可以在现场实现快速检测的优势,其中,生物传感器无需专业人员操作,人工智能(AI)可减少人员成本,并可用于疫情的早期监测,基于磁珠的技术无需复杂的设备,微流体技术可实现高通量快速检测,磁流体装置可解决核酸污染的问题。随着科技的进步,基于免疫层析试纸条和各类传感器的 ASF 新型检测方法将蓬勃发展。本文总结了 ASF 现有检测方法,并综述了近 5 年 ASF 新型检测方法的发展情况,以期对 ASF 疫情的科学防控提供参考。

**关键词:**非洲猪瘟; 新型检测方法; 生物传感器; 人工智能; 微流体技术; 磁流体装置

中图分类号:S858.28

文献标志码:A

文章编号:0529-6005(2024)05-0091-10

## Research Progress of Detection Methods for African Swine Fever

CHEN Huahan<sup>1,2,3,4</sup>, ZHU Junhai<sup>1,2,3,4</sup>, GAO Fei<sup>1,2,3,4</sup>, JIAN Weijun<sup>1,2,3,4</sup>,  
HUANG Lihong<sup>1,2,3,4</sup>, QI Wenbao<sup>1,2,3,4</sup>

[1. State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. African Swine Fever Regional Laboratory of China (Guangzhou), Guangzhou 510642, China; 3. Key Laboratory of Zoonoses, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510642, China; 4. National and Regional Joint Engineering Laboratory for Medicament of Zoonoses Prevention and Control, Guangzhou 510642, China]

**Abstract:** African swine fever (ASF) is an acute, febrile, highly contagious infectious disease in pigs caused by African swine fever virus (ASFV). The outbreak of ASF seriously threatens the safety of the global pig farming industry, causing significant economic losses worldwide. Currently, there is no safe and effective vaccine against ASF, timely and accurate ASF laboratory diagnosis has become an essential tool for epidemic prevention and control. Existing ASF detection methods include serological testing, polymerase chain reaction (PCR), isothermal amplification technology, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats and associated system (CRISPR/Cas). However, serological testing, PCR, and CRISPR/Cas require specialized personnel and equipment, while isothermal amplification technology is limited by the type of samples tested and has lower sensitivity. Therefore, existing ASF detection methods cannot simultaneously achieve high sensitivity, rapidity, simplicity, and suitability for on-site testing. In contrast, novel ASF detection methods offer advantages in terms of convenience, efficiency, time and labor savings, and rapid on-site testing. For example, biosensors do not require specialized personnel for operation, artificial intelligence (AI) can reduce labor costs, and they can be used for early epidemic monitoring. Techniques based on magnetic beads do not require complex equipment, microfluidic technology enables high-throughput rapid detection, and magnetic fluid devices can address nucleic acid

收稿日期:2023-06-29

基金项目:国家自然科学基金项目(31941014);广东省重点研发计划项目(2019B020211003)

作者简介:陈画菡(1995-),女,硕士生,主要从事非洲猪瘟诊断技术的研究,E-mail:huahanchen@stu.scau.edu.cn

通信作者:亓文宝,E-mail:qiwenbao@scau.edu.cn

contamination issues. With the advancement of technology, novel ASF detection methods based on immunochromatographic test strips and various sensors are flourishing. This article summarizes existing ASF detection methods and reviews the development of novel ASF detection methods over the past five years, aiming to provide reference for the scientific prevention and control of ASF.

**Key words:** African swine fever ; novel detection method ; biosensor ; artificial intelligence ; microfluidic technology ; magnetofluidic device

**Corresponding author:** QI Wenbao , E-mail : qiwenbao@scau.edu.cn

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的猪的一种急性、热性、高度接触性传染病,死亡率高达100%,是目前唯一已知的DNA虫媒病毒<sup>[1]</sup>。1921年,非洲东部的肯尼亚首次确诊了ASF疫情<sup>[2]</sup>,之后其传播仅限于非洲,直到1957年从西非传入葡萄牙<sup>[3]</sup>,并于1971年首次登陆古巴<sup>[4]</sup>,随后在美洲的多米尼加共和国<sup>[5]</sup>和海地<sup>[6]</sup>相继暴发。2007年,在东欧的格鲁吉亚发现了基因II型ASFV,之后其在东欧地区造成难以控制的传播<sup>[7]</sup>。2018年8月,我国确认首例ASF疫情<sup>[1]</sup>,仅2019年就给我国造成约1110亿美元的经济损失。自那之后,ASF继续在亚太地区传播,截至2023年5月,已影响中国、蒙古国、越南、柬埔寨和韩国等18个国家。近年来,我国又发现了基因缺失毒、减毒弱毒株和基因I型毒等病毒株,复杂的毒株生态给该病的诊断与防控带来了新的困难和挑战<sup>[8]</sup>。目前,ASF依然影响着全球多个地区,严重威胁全球生猪养殖业的安全,对世界粮食安全产生巨大的影响。

迄今为止,尚未开发出安全有效的ASF疫苗,也无商品化抗病毒药物。根据我国农业农村部印发的《非洲猪瘟疫情应急实施方案(第五版)》<sup>[9]</sup>,当发现生猪、野猪出现疑似ASF症状或异常死亡等情况时,应按照“可疑疫情—疑似疫情—确诊疫情”的程序认定和报告疫情。因此,准确及时的实验室诊断对于ASF疫情的认定和控制至关重要。ASF现有检测方法包括血清学方法、聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)、等温扩增技术和规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关系统(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associate system, CRISPR/Cas)等。本文总结了ASF现有检测方法,并综述了近5年ASF新型检测方法的发展情况,对相关方法的特点进行了简单介绍和总结,以期ASF的有效诊断和及时防控、现有方法的优化改进以及新方法的研究开发提供科学数据和思路。

## 1 ASF 现有检测方法

### 1.1 血清学检测 血清学检测方法包括酶联免疫

吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和侧流免疫层析技术(Lateral flow assay, LFA)等。近年来,血清学检测的研究重点集中在开发ASFV重组抗原上,以提高检测的灵敏度和特异性,例如,使用重组蛋白作为包被抗原以构建ELISA检测方法,或使用单克隆抗体检测样本中的抗原。抗原检测可用于多种类型样本中ASFV的快速检测,例如,利用重组蛋白p30不仅可以检测感染猪只免疫系统器官和血清样本中ASFV的特异性抗体,还可检测口腔液中的特异性抗体,其检测时间可缩短至30 min<sup>[10]</sup>。此外,一种或多种重组蛋白的联合使用,还可用于鉴别检测ASFV野毒株和基因缺失株,例如,重组蛋白CD2v可用于现场大规模、快速鉴别诊断ASFV野毒株和CD2v缺失株的感染<sup>[11]</sup>;利用p30蛋白建立的双抗原夹心ELISA方法具有良好的灵敏度和特异性<sup>[12]</sup>;利用重组蛋白p30、p54和p72建立的间接ELISA方法,比使用单独的病毒蛋白进行间接ELISA检测的灵敏度和特异性更高<sup>[13]</sup>;p30和CD2v联用的双重ELISA检测方法可用于检测ASFV野毒株和CD2v缺失株<sup>[14]</sup>;针对p30蛋白单克隆抗体建立的阻断ELISA方法,可明显缩短检测时间,提高检测灵敏度,极大提高诊断的灵敏度和特异性<sup>[15]</sup>。因此,在ELISA检测方法中,间接ELISA检测方法成本低,但存在交叉反应的可能;双夹心ELISA的灵敏度更高,但操作更加复杂,不适用于检测小分子样品;阻断ELISA具有更好的重复性和灵敏度,可用于检测抗体浓度较低的血清样品,但单克隆抗体的制备难度较大。

LFA是一种将免疫技术和色谱层析技术相结合的快速免疫分析方法,对于实现检测结果的可视化和缩短检测时间具有巨大帮助。现有技术可以使用重组抗原结合荧光免疫层析试纸条(Fluorescent immunochromatography test strip, FICTS)特异性检测抗ASFV抗体,其检测灵敏度与商品化ELISA试剂盒几乎一致<sup>[16]</sup>;将双链DNA(Double-stranded DNA, dsDNA)或单克隆抗体与金纳米颗粒(Au nanoparticles, AuNP)标记的寡核苷酸检测探针杂交,以此建立的胶体金免疫层析试纸条可用于ASFV的早

期诊断<sup>[17-18]</sup>。此外,将量子点微球免疫层析试纸条(Quantum dot microsphere-immunochromatography strip, QDM-ICS)与手持荧光免疫分析仪结合的免疫传感器,可以在 25 min 内完成 ASFV 检测,且灵敏度比 ELISA 高 1 个数量级,比胶体金免疫层析试纸条高 4 个数量级<sup>[19]</sup>。然而, LFA 对样品质量要求较高,当感染猪只死亡一段时间之后再采集血清进行检测、或检测样品的质量较差时, LFA 的灵敏度较低。因此, LFA 不能代替血清学检测、PCR 检测和等温扩增技术等检测方法,只能作为补充检测使用。

其他血清学检测方法,例如,以 p54 单克隆抗体建立的化学发光免疫分析法(Chemiluminescence immunoassay, CLIA),可以将检测时间缩短至 20 min<sup>[20]</sup>。荧光抗体试验(Fluorescent antibody test, FAT)可用于急性 ASF 的检测,并展现出高敏感度,但针对亚急性和慢性 ASF 的检测敏感度较低,因此一般作为辅助性检测方法<sup>[21]</sup>。时间分辨荧光免疫分析法(Time-resolved fluorescence immunoassay, TRFIA)是一种利用镧系元素独特的荧光特性建立的新型检测技术,可在 45 min 内完成检测,具有比 ELISA 检测法更高的灵敏度,并可用于口鼻分泌物的检测<sup>[22]</sup>。

然而,血清学检测方法对操作人员的技术和经验要求较高,且设备较贵、费时费力,难以在猪场开展 ASFV 的快速检测;且由于动物在感染 ASFV 后需要较长时间产生抗体,因此也无法在病毒感染的初期进行检测。

**1.2 PCR 检测** PCR 检测技术是通过使用 ASFV 特异性引物扩增出特定的核酸片段来判断是否含有 ASFV 基因,因其快速、灵敏度高和特异性好的优点而得到广泛应用,尤其适用于不适合进行病毒分离的样品。现有的 PCR 检测方法包括常规 PCR、实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR, qPCR)和微滴式数字 PCR(Droplet digital PCR, ddPCR)等。目前,主要以 ASFV E183L 和 B646L 基因序列来设计特异性引物,通过使用针对一个或多个基因序列设计的特异性引物来建立 PCR 检测方法,以达到更高的灵敏度和特异性。根据 ASFV B646L 基因(编码 p72 蛋白)C 端的 478 bp 核苷酸序列,可将 ASFV 划分为 24 种基因型。世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOA)推荐的常规 PCR 检测方法(针对 B646L 基因)在检测基因 II 型 ASFV 时灵敏度较低。因此,针对多个基因设计特异性引物,以使引物和病毒靶基因达到更高程度的匹配,进而提高 PCR 检测的灵敏度和特异性是目前

的重点发展方向,例如,重新设计靶向 B646L 基因序列构建的常规 PCR 检测方法,检出限比 WOA 推荐的常规 PCR 检测方法低 10 ~ 100 倍<sup>[23-24]</sup>;以 E183L<sup>[25]</sup>、B646L<sup>[26-27]</sup>、A137R<sup>[28]</sup>和 E296R<sup>[29]</sup>基因序列构建的 qPCR 检测方法可以达到更高的灵敏度。

根据针对多种基因序列设计的特异性引物而建立的双重 qPCR 和多重 qPCR 检测方法,在提高检测灵敏度的同时,还可用于区分不同 ASFV 病毒株,例如, Li 等<sup>[29]</sup>以 ASFV E296R 基因序列、Gao 等<sup>[30]</sup>以 ASFV B646L 和 E183L 基因序列构建的双重 qPCR 检测方法可用于区分 ASFV 基因 I 型和 II 型; Lin 等<sup>[31]</sup>针对 B646L、MGF360-14L 和 EP402R 基因的保守区开发的三重 qPCR, Guo 等<sup>[32]</sup>以 B646L 和 MGF505-2R 基因建立的双重 qPCR,都能够鉴别 ASFV 野毒株和基因缺失株。此外, Wang 等<sup>[27]</sup>分别根据猪  $\beta$ -肌动蛋白基因、ASFV B646L 基因序列构建的 qPCR 检测方法可以有效避免假阴性结果; Zhan 等<sup>[33]</sup>针对 ASFV B646L 和 B438L 基因的保守区建立的双重 RT-PCR 检测方法可以避免因环境中单个基因而引起的假阳性。将针对 ASFV 基因序列与其他猪源病毒基因序列的特异性引物联用,还可以同时鉴别检测 ASFV、猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)和非典型猪瘟病毒(Atypical porcine pestivirus, APPV)<sup>[34-36]</sup>等。

ddPCR 可显著提高检测的灵敏度和特异性,并可区分 ASFV 野毒株与 CD2v 缺失株感染。Wu 等<sup>[37]</sup>首次将 ddPCR 应用于 ASFV 检测中,基于 K205R 基因序列建立的 ddPCR 检测方法灵敏度是 qPCR 的 10 倍。在此基础上, Zhu 等<sup>[38]</sup>将 B646L 基因与 EP402R 基因引物探针联用,首次实现了利用双重 ddPCR 检测区分 ASFV 野毒株与 CD2v 缺失株感染。

研究表明,受污染的饲料和饲料原料是导致 ASFV 传播到新畜群和新地区的一条潜在途径<sup>[39]</sup>,因此针对饲料粉尘的检测可有效防控 ASFV<sup>[40]</sup>。此外,PCR 的检测对象除了血清样本、组织样本和粪便样本还包括厨余垃圾<sup>[24]</sup>。PCR 检测技术虽能特异性检测多种 ASFV 基因,并能鉴别诊断多种基因型、野毒株和基因缺失型毒株,但 PCR 检测需要专业的技术人员进行操作,同时需要匹配昂贵的检测仪器,目前在多数中小型猪场无法实现快速、便捷的 ASFV PCR 检测,该方法主要用于实验室检测,存在一定的局限性。

**1.3 等温扩增技术** 等温扩增技术是一种核酸体外扩增技术,其反应过程始终维持在恒定的温度

下,通过添加不同活性的酶和各自的特异性引物来达到快速扩增核酸的目的,包括环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶介导的等温扩增技术(Recombinase aided amplification, RAA)和重组酶聚合酶扩增技术(Recombinase polymerase amplification, RPA),具有操作简单、检测时间短和易于临床应用的特点。

LAMP 用于在等温条件下高效扩增核酸,而不受非靶向 DNA 共存的影响,目标序列具有高度特异性,可实现在现场使用,且分析速度可以达到 PCR 的 2 倍<sup>[41]</sup>,适用于致命性热带疾病流行的国家和资源匮乏的地区。目前,针对 ASFV 基因的 LAMP 检测时间最短仅需 20 min<sup>[42]</sup>,该方法大大缩短了检测时间,且检测过程中无需提取核酸,减少了产生假阳性和假阴性结果的可能,检测结果可以达到与 WOH 推荐的 RT-PCR 检测方法一致的效果<sup>[42-45]</sup>,灵敏度甚至是 WOH 推荐的常规 PCR 检测方法的 10 倍<sup>[46]</sup>。LAMP 检测结果通常结合可视化分析技术或横向流动试纸条(Lateral flow dipstick, LFD)来判定,结果读取更便捷和直观。然而,为解决个体对试验结果的主观判断而产生的偏差,目前也有研究将 LAMP 与图像处理、色相-饱和度-色明度(Hue-saturation-value, HSV)颜色模型相结合,只需使用简单的拍照设备即可得到检测结果<sup>[47]</sup>。

RAA 和 RPA 常与便携式仪器、LFD 相结合使用,检测时间最短只需 10 min<sup>[48]</sup>,可以实现在现场快速、便捷检测,且灵敏度和特异性与 WOH 推荐的 qPCR 检测方法一致,其中灵敏度甚至比 WOH 推荐的 qPCR 检测方法高 10 倍<sup>[49]</sup>。RPA 除了可用于血液样本和组织样本的检测外,还可以用于厨余垃圾的快速检测<sup>[48]</sup>。

与传统的 PCR 方法相比,基于等温扩增技术的 PCR 方法反应过程无需经历变性、退火和延伸等步骤,维持在较低温度下即可进行,可与便携式仪器联用,具有在资源较为匮乏地区推广使用的潜力。虽然,等温扩增技术可以实现在现场的快速、便捷检测,甚至仅使用水浴锅即可完成,但是, LAMP 为了实现结果的可视化,反应完成后需要在体系中添加染料,再使用灯具照射以读取结果,开盖过程可能造成气溶胶污染,且除全血和血清外,对于其他类型样品的检测效果并不理想<sup>[44]</sup>;相比之下, RAA 和 RPA 在反应结束后无需开盖,即可使用便携式蓝光检测仪器实现结果的可视化,没有气溶胶污染的风险。因此,应将等温扩增技术与便携式仪器、LFD 和 CRISPR/Cas 等检测技术结合,尽可能实现快速、

便捷、有效的检测。

**1.4 CRISPR/Cas** CRISPR/Cas 最早发现于 20 世纪 80 年代,是一种与规律成簇的间隔短回文重复序列相关(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associate, Cas)蛋白结合的天然适应性免疫系统,包括 1 个具有序列特异性的向导 RNA 和 1 个用于切割的 Cas 蛋白,二者形成的复合体能够识别并切割外源 DNA。Cas 蛋白,如 Cas12a、Cas13a 和 Cas14a,是一种原核脱氧核糖核酸酶,可以特异性结合靶 DNA,通过非特异性方式切割双标记探针来放大结合信号,从而达到检测所扩增 DNA 产物的目的。Cas12a 可以在向导 RNA (Guide RNA, gRNA)的介导下特异性识别靶 DNA,对其进行特异性顺式切割(Cis cleavage),同时对单链 DNA (Single-stranded DNA, ssDNA)进行非特异性反式切割(Trans cleavage)<sup>[50]</sup>;Cas13a 除了可以特异性识别靶 RNA,进行特异性顺式切割,并对单链 RNA (Single-stranded RNA, ssRNA)进行非特异性反式切割外,还可以对切割体系内的任意 ssRNA 进行非特异性侧枝切割(Collateral cleavage)<sup>[51]</sup>;而与 Cas12a 相比, Cas14a 可以靶向切割 ssDNA,无需受制于特定序列<sup>[52]</sup>。因此,CRISPR/Cas 可以用于检测特定核酸序列,并以其高灵敏度、高特异性、高碱基分辨率和核酸识别的可编程性为特点,被用于分子诊断中。研究表明,CRISPR/Cas12a 可用于 ASFV 的检测,利用高活性的规律成簇的间隔短回文重复序列 DNA (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats DNA, crDNA)可以实现比 qPCR 高 10 倍的灵敏度<sup>[53]</sup>;利用 ssDNA 连接荧光团淬灭剂(Fluorophore-quencher, FQ),可以在多种检测平台,如便携式蓝光照仪、自动凝胶成像分析系统等实现可视化检测<sup>[54]</sup>。针对 ASFV B646L 基因建立的 CRISPR/Cas12a 方法,可实现更高的灵敏度,与 RPA 方法结合可以将检测时间缩短至 50 min<sup>[55]</sup>,且无需提取核酸;在此基础上结合 FQ,可将检测时间缩短至 40 min<sup>[56]</sup>。另外,CRISPR/Cas12a 还可以与基于荧光的护理点系统(Point of care, PoC)<sup>[57]</sup>、横向流动生物传感器(Lateral flow biosensor, LFB)<sup>[58]</sup>和荧光生物传感器<sup>[59]</sup>相结合,以实现现场便捷检测。

此外, Wei 等<sup>[60]</sup>利用来源于瓦氏纤毛菌的 Cas13a 同源物(Leptotrichia wadei Cas13a, LwCas13a)的侧枝切割活性,实现了 CRISPR/Cas13a 在 ASFV 检测中的首次应用,结合 RAA 和 LFD 可以实现高灵敏度和可视化,整个检测过程可在 1 h 内完成。Ren 等<sup>[61]</sup>将利用 LwCas13a 建立的 CRISPR/



lwCas13a 方法,在激活其侧枝切割活性后与 RPA 和 LFD 结合,可以实现与 RT-PCR 一致甚至更高的灵敏度。

然而,CRISPR/Cas12a 常用两步法进行检测,检测过程需要转移液体,因此存在步骤复杂、易产生气溶胶污染等问题。虽可使用一锅法进行检测以避免上述问题,但由于该方法中 CRISPR/Cas12a 切割导

致扩增模板丢失,致使检测效率很低。有研究发现,在一锅法体系中加入甘油,可将检测灵敏度提高 2 个数量级,并可通过配备智能手机设备实现肉眼读数,适用于现场的快速检测<sup>[62]</sup>。尽管 CRISPR/Cas 在基因检测方面十分有效,但由于缺乏特异的探针切割机制,该方法的多重检测能力受到限制。

ASF 现有检测方法及其应用见图 1 和表 1。

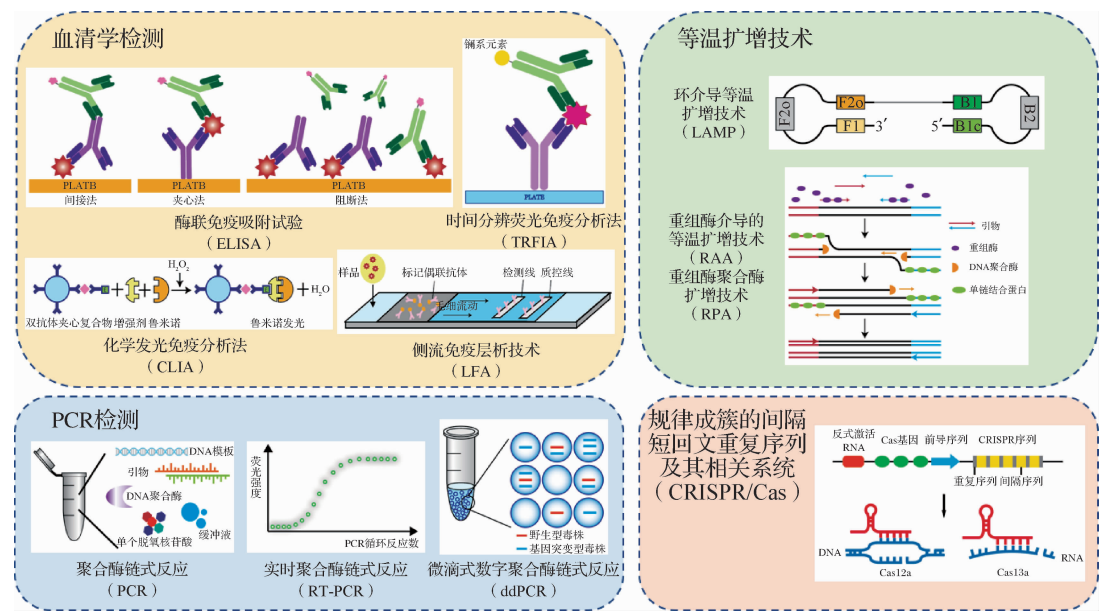


图 1 ASF 现有检测方法总结 (自绘)

Fig.1 Summary of existing ASF detection methods ( Self-drawn)

表 1 ASF 现有检测方法应用

Table 1 Application of existing ASF detection methods

检测方法 Detection method	灵敏度 Sensitivity	特异性 Specificity	检测时间 Detection time	样品类型 Sample type	评价 Comment
间接 ELISA	*	*	2 ~ 3 h	血清	灵敏度和特异性高,但易发生交叉反应
双夹心 ELISA	*	*	2 ~ 3 h	血清	灵敏度高,但操作复杂
双重 ELISA	*	*	2 ~ 3 h	血清	可区分 ASFV 野毒株和 CD2v 缺失株
阻断 ELISA	*	*	2 ~ 3 h	血清	操作复杂且繁琐
免疫印迹检测试验	*	*	2 ~ 3 h	免疫器官、血清	灵敏度高,但无法实现高通量检测
免疫荧光素酶沉淀试验 (MB-LIPS)	*	*	30 min	口腔液	检测时间短
荧光免疫层析试验 (QDs-FICA)	*	*	20 min	血清	检测时间短
化学发光免疫分析法 (CLIA)	*	*	20 min	血清	辅助检测手段
荧光抗体试验 (FAT)	***	***	75 min	血清	用于急性 ASF 检测,一般作为辅助检测手段
时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA)	**	**	45 min	口鼻分泌物	检测时间短,灵敏度比 ELISA 高
聚合酶链式反应 (PCR)	**	**	2 ~ 3 h	血清、厨余垃圾	常用的检测方法



续表					
检测方法 Detection method	灵敏度 Sensitivity	特异性 Specificity	检测时间 Detection time	样品类型 Sample type	评价 Comment
实时荧光定量 PCR (qPCR)	***	***	5 ~ 6 h	血液、组织样品、饲料、粉尘	灵敏度比 PCR 高
双重 qPCR	***	***	5 ~ 6 h	血液、组织样品、鼻拭子、环境拭子	可区分 ASFV 基因 I 型和 II 型,以及野毒株和基因缺失型毒株
多重 qPCR	***	***	5 ~ 6 h	冷冻猪肉制品、组织样品	可鉴别 ASFV 野毒株和基因缺失型毒株,区分 ASFV 和 CSFV
微滴式数字 PCR (ddPCR)	***	***	5 ~ 6 h	粪便、血清、组织样品	检测灵敏度最高,但仪器昂贵
双重 ddPCR	***	***	5 ~ 6 h	血清	可区分 ASFV 野毒株和基因缺失型毒株
环介导等温扩增技术 (LAMP)	***	***	20 ~ 45 min	全血、血清、熟猪肉、口腔拭子、直肠拭子	检测时间短,结果可视化,但显色效果可能受到血清中其他成分的影响
重组酶介导的等温扩增技术 (RAA)	***	***	15 ~ 25 min	全血、猪肉、组织样品	检测时间短、便捷,结果可视化
重组酶聚合酶扩增技术 (RPA)	***	***	10 min	全血、厨余垃圾	检测时间短、便捷,结果可视化
CRISPR/Cas12a	***	***	40 min ~ 2 h	病毒 DNA、全血、组织样品	灵敏度高、便捷,结果可视化
CRISPR/Cas13a	***	***	1 h	病毒 DNA、全血、组织样品	灵敏度高、便捷,结果可视化
胶体金免疫层析试纸条	*	*	10 ~ 20 min	血清	可用于 ASFV 早期诊断,作为辅助检测手段
荧光免疫层析试纸条 (FICTS)	*	*	10 min	血清	辅助检测手段
QDM 免疫层析试纸条 (QDM-ICS)	*	*	25 min	血清	辅助检测手段
注: * :一般水平; ** :中等水平; *** :最高水平 Note: * :General level; ** :Medium level; *** :Highest level					

2 ASF 新型检测方法

ASF 现有检测方法虽能达到较高的灵敏度,同时可鉴别检测多种基因型毒株,甚至可将检测时间缩短在 1 h 内,但无论是血清学检测、PCR 检测还是 CRISPR/Cas,都需要专业的技术人员或昂贵的检测仪器,无法在大部分中小型猪场实现快速、便捷的检测。等温扩增技术虽能实现快速、便捷的检测,但存

在气溶胶污染、检测灵敏度较低、无法满足多种样品检测的局限性。因此,ASF 现有检测方法无法既达到高灵敏度,又兼得快速、简便和现场检测。ASF 新型检测方法主要是基于生物传感器、人工智能( Artificial intelligence,AI)、磁珠、微流体技术和磁流体装置等所建立(表 2),其在 ASF 检测方面的应用虽不能同时解决上述所有问题,但或许能为检测方法的开发提供新思路,以实现高灵敏度、快速、便捷、实惠的检测。

表 2 ASF 新型检测方法应用  
Table 2 Application of novel ASF detection methods

检测方法 Detection method	快速检测 Rapid detection	可在猪场使用 Field usability	可视化 Visualization	提取核酸 Nucleic acid extraction	经济性 Economy
生物传感器	√	√	×	√	/
基于耳标的生物传感器	√	√	×	×	/
人工智能( AI)	√	√	√	×	×
磁珠	√	√	×	×	√
微流体技术	√	√	×	√	/
蜂巢芯片( Hive-chip)	√	×	√	×	/
技术结合 LAMP 技术					
纳米流控芯片数字 PCR (cdPCR)	×	×	/	√	×
磁流体装置	√	√	×	√	√
注:√:符合该特点; × :不符合该特点; / :未记载该特点 Note:√:Consistent with the characteristic; × :Dose not consistent with the characteristic; / :Not documented for the characteristic					

2.1 生物传感器 生物传感器将核苷酸杂交的特异性与电、光学或压电传感器的灵敏度相结合,利用不同捕获剂和物理传感器的组合来制作生物传感器,具有实时、无标签、快速、所需样本量小等优势,在未来有巨大的发展前景。目前,基于 ASFV DNA 和锁核酸(Locked nucleic acid, LNA)开发的用于快速检测 ASFV 的生物传感器,可避免 RT-PCR 需要的昂贵设备、熟练人员操作和耗时较长等问题<sup>[63]</sup>。通过植入耳标的生物传感器和加速器建立的一种新型 ASF 检测系统,能实时监测猪只的体温和运动情况,有助于 ASF 疫情的早期发现。未来研究将集中于将该生物传感器应用于 ASFV 毒株和基因型的检测,并制备便携式生物传感器<sup>[64]</sup>。

2.2 AI 技术 AI 技术逐渐重塑人类的日常生活,在未来也可能重塑兽医学的实践方式。目前,已经可以利用 AI 技术实现大规模猪群的 ASF 监测,将监测出的异常行为和信息记录到系统中,未来可应用于临床诊断。利用 AI 模型和三维(3 Dimensions, 3D)深度相机对猪场进行监测,能够帮助猪场以非接触的方式尽早发现 ASF 疫情,降低了人工观察和检测的人力成本,显著提高了猪场的管理效率<sup>[65]</sup>。但是,由于 AI 设备价格昂贵,深度图像检测具有低可及性和可用性,监测过程中可能发生误报,且野猪和家猪的身形和皮毛差异较大,因此对野猪的监测较为困难。为了减轻农户的负担,在未来将会对 3D 深度视频数据进行有效的处理,并与有关部门合作收集野猪数据,以达到更准确的监测效果。

2.3 磁珠 基于磁珠的多重分析技术(Bead-based multiplex assays, BBMA)是基于磁珠所建立的针对多种分析物的分析技术,适用于高通量、同时检测,可将重组蛋白包被于磁珠,用于检测样本中的抗体,或将 PCR 产物与含有特定探针的磁珠杂交用于检测,具有所需样本量小、无需昂贵试剂、多通路降低成本和劳动力等优势,在兽医领域主要用于病原体检测、基因分型、激素水平测量、疾病监测和疫苗评估<sup>[66]</sup>。

目前已开发基于磁珠和 ELISA 的均相光激化学发光免疫分析技术(Amplified luminescent proximity homogenous assay linked immunosorbent assay, AlphaLISA),依赖于 PerkinElmer 的放大发光近距离同质性分析(AlphaScreen®),并采用发光氧通道免疫分析技术,可以检测和量化各种样本中的多种靶点,具有灵敏度高、小型化、自动化、无需洗板、快速检测等优点<sup>[67]</sup>。通过利用 ASFV 的 p72、p30 蛋白和 CSFV 的 E2 蛋白作为抗原,进行三层珠基分析以

检测 ASFV 抗体,解决了目前 ASFV 和 CSFV 无法通过临床和尸体检测来鉴别诊断的问题<sup>[68]</sup>。此外,也可以将 CRISPR/Cas 与磁珠-量子点(Magnetic bead-quantum dot, MB-Qdot)结合,建立能够在现场便捷检测 ASFV 的方法<sup>[69]</sup>。未来可以将机器人移液和自动化微流体与磁珠分析技术相结合,进一步实现高通量检测。

2.4 微流体技术 微流体技术是一种以亚毫米级流体工程操作为基础的检测技术,可以将样品制备、分配和检测等步骤集成到具有微米级通道的芯片中,并使用微尺度设备精确地操纵流体,具有大幅减少样品体积、降低试剂成本等优势,在生物学研究领域具有巨大潜力<sup>[70]</sup>。利用微流体技术建立的便携式微流体-圆形荧光探针介导的等温核酸扩增系统(Circular fluorescent probe-mediated isothermal nucleic acid amplification, CFPA),克服了 PCR 检测操作复杂以及 LAMP 等方法因存在非特异性扩增易造成误诊等缺点,具有快速、高通量、便捷准确、可用于现场检测等优点<sup>[71]</sup>。将蜂巢芯片(Hive-chip)技术与 LAMP 技术相结合构建的多重可视化平台,以 AFSV 多个基因(B646L、B962L、C717R、D1133L 和 G1340L)作为检测靶点,可避免假阴性结果的出现<sup>[72]</sup>。有报道首次提出,利用纳米流控芯片数字 PCR(Chip digital PCR, cdPCR)技术进行 ASFV 检测具有更高的灵敏度和特异性<sup>[73]</sup>。微流体技术在未来可以与自动化液体工作站相结合,实现高通量样品的加载。

2.5 磁流体装置 磁流体装置由磁性颗粒、疏水性基底和表面活性物质组成,通过磁力、阻力、毛细力在开放的平面上进行液滴操作,可以用于捕获核酸,并在离散试剂液滴之间传输核酸,实现核酸提取、纯化和扩增,该设备一方面能大大简化核酸提取步骤,另一方面可以有效解决核酸污染问题<sup>[74]</sup>,具有用于前线医疗检测的潜力。有研究构建了便携式磁流体装置用于 ASFV 的即时检测,该设备采用液滴磁流体技术,自动从血液、组织或拭子样本中提纯 DNA,并利用快速热循环仪进行 RT-PCR,且所有操作都在廉价的一次性试剂盒里完成<sup>[75]</sup>。磁流体装置解决了现有检测耗时、昂贵的缺点,可以达到易于使用、高敏感性、无核酸污染的检测效果,可实现现场快速诊断。

### 3 小结与展望

ASF 自 1921 年在非洲首次被发现后,已对全球经济造成了巨大损失,由于目前尚无有效的疫苗和

特异性抗病毒药物,除了早期及时采取有效的生物安全措施之外,快速、准确、便捷的诊断方法也能为 ASF 防控提供一层保障。因此,及时、有效、准确的 ASF 检测方法对于 ASF 疫情的防控尤为重要。ASF 现有检测方法包括血清学检测、PCR 检测、等温扩增技术和 CRISPR/Cas 等,这些方法存在人员要求高、检测设备昂贵等缺陷,且血清学和 PCR 检测耗时较长。基于上述问题,ASF 新型检测方法的开发主要聚焦于达到便捷、高效、省时、省力的检测效果,例如,生物传感器可缩短检测时间,AI 可减少人员成本且可用于早期监测,基于磁珠的方法无需复杂设备,微流体技术可实现高通量快速检测,磁流体装置可解决核酸污染问题。2020 年,严重急性呼吸综合征冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)在全球肆虐,为了应对新型冠状病毒肺炎的大规模暴发,更多、更前沿的检测技术应运而生,其中,胶体金试纸条、生物传感器、光学传感器和电化学生物传感器等具有快速、高灵敏度、现场检测 SARS-CoV-2 的巨大潜力。

目前,大部分 ASFV 试纸条检测技术是利用金纳米颗粒标记的寡核苷酸探针建立的, Li 等<sup>[16]</sup>提出将 ASFV 抗原与荧光微球结合制备 FICTS,其检测效果与 ELISA 几乎一致。在 SARS-CoV-2 检测试纸条技术的研究中, Hu 等<sup>[76]</sup>提出将 LFA 与荧光纳米颗粒结合构建免疫层析试纸条,相较于胶体金免疫层析试纸条,能实现对低抗原浓度样品的高灵敏度检测,与 PCR 检测效果具有更高的一致性。在纳米技术蓬勃发展的当下,可以将 ASFV 抗原与荧光纳米颗粒结合,建立灵敏度更高的免疫层析试纸条,以实现更灵敏和便捷的 ASFV 检测。在生物传感器中,病毒富集、RNA 提取和浓缩以及 RNA 扩增和检测可集成到一次性传感器中,如微流控芯片等;此外,即时检测(Point-of-care test, POCT)免疫传感器在 SARS-CoV-2 核壳蛋白(Nucleocapsid protein, NP)和病毒颗粒检测中的作用也值得进一步探索<sup>[77]</sup>。Jia 等<sup>[73]</sup>首次将 cdPCR 技术应用于 ASF 检测中,从而达到更高的敏感度和特异性; He 等<sup>[57]</sup>将 CRISPR/Cas12a 技术与 POCT 结合,可以实现对 ASFV 的快速检测。随着生物传感器技术和芯片技术的不断发展,结合自动化移液工作站,ASF 检测技术或许可以在提高灵敏度的同时,实现高通量检测。

基于免疫层析试纸条和各类传感器的 ASF 检测技术具有巨大的发展潜力,在现场快速、准确、高灵敏度的 ASF 检测中具有良好的应用前景,值得进一步探索。总之,未来持续开发 ASF 新型检测方

法,对科学防控疫情、降低养殖成本、提高人民生活水平具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Zhou X, Li N, Luo Y, *et al.* Emergence of African swine fever in China, 2018 [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65 (6): 1482–1484.
- [2] Eustace Montgomery R. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony) [J]. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 1921, 34: 159–191.
- [3] Wesley R D, Tuthill A E. Genome relatedness among African swine fever virus field isolates by restriction endonuclease analysis [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 1984, 2(1): 53–62.
- [4] Tury E, Ramos J R, Urquiaga R. Pathological anatomic experiences in the African swine fever outbreak in Cuba in 1971 [J]. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 1973, 23 (4): 389–409.
- [5] Gonzales W, Moreno C, Duran U, *et al.* African swine fever in the Dominican Republic [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021, 68(6): 3018–3019.
- [6] Jean-Pierre R P, Hagerman A D, Rich K M. An analysis of African swine fever consequences on rural economies and smallholder swine producers in Haiti [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 960344.
- [7] Rowlands R J, Michaud V, Heath L, *et al.* African swine fever virus isolate, Georgia, 2007 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(12): 1870–1874.
- [8] Sun E, Huang L, Zhang X, *et al.* Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1): 2183–2193.
- [9] 农业农村部. 非洲猪瘟疫情应急实施方案(第五版) [Z]. 农牧发[2021]7号. 北京: 农业农村部, 2021-03-17.
- [10] Liu H, He P, Meng F, *et al.* A semiautomated luciferase immunoprecipitation assay for rapid and easy detection of African swine fever virus antibody [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(10): e0099021.
- [11] Niu Y, Zhang G, Zhou J, *et al.* Differential diagnosis of the infection caused by wild-type or CD2v-deleted ASFV strains by quantum dots-based immunochromatographic assay [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2022, 74(6): 1001–1007.
- [12] Wang M, Song J, Sun J, *et al.* Development of an effective double antigen sandwich ELISA based on p30 protein to detect antibodies against African swine fever virus [J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2170.
- [13] Li D, Zhang Q, Liu Y, *et al.* Indirect ELISA using multi-antigenic dominants of p30, p54 and p72 recombinant proteins to detect antibodies against African swine fever virus in pigs [J]. *Viruses*, 2022, 14(12): 2660.
- [14] Lv C, Zhao Y, Jiang L, *et al.* Development of a dual ELISA for the detection of CD2v-unexpressed lower-virulence mutational ASFV [J]. *Life*, 2021, 11(11): 1214.
- [15] Yu X, Zhu X, Chen X, *et al.* Establishment of a blocking ELISA detection method for against African swine fever virus p30 antibody [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 781373.
- [16] Li C, He X, Yang Y, *et al.* Rapid and visual detection of African swine fever virus antibody by using fluorescent immunochromatog-

- raphy test strip[J]. *Talanta*,2020,219:121284.
- [17] Wan Y, Shi Z, Peng G, *et al.* Development and application of a colloidal-gold dual immunochromatography strip for detecting African swine fever virus antibodies[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*,2022,106(2):799–810.
- [18] Zhang X, Liu X, Wu X, *et al.* A colloidal gold test strip assay for the detection of African swine fever virus based on two monoclonal antibodies against P30[J]. *Archives of Virology*,2021,166(3):871–879.
- [19] Li J, Bai Y, Li F, *et al.* Rapid and ultra-sensitive detection of African swine fever virus antibody on site using QDM based-ASFV immunosensor (QAIS) [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1189:339187.
- [20] Yang Y, Lv C, Fan J, *et al.* Development of a chemiluminescence immunoassay to accurately detect African swine fever virus antibodies in serum [J]. *Journal of Virological Methods*, 2021, 298:114269.
- [21] Oura C A, Edwards L, Batten C A. Virological diagnosis of African swine fever-comparative study of available tests [J]. *Virus Research*,2013,173(1):150–158.
- [22] Chen C, Lai H, Liang H, *et al.* A new method for detection African swine fever virus: time-resolved fluorescence immunoassay [J]. *Journal of Fluorescence*,2021,31(5):1291–1296.
- [23] Luo Y, Atim S A, Shao L, *et al.* Development of an updated PCR assay for detection of African swine fever virus[J]. *Archives of Virology*,2017,162(1):191–199.
- [24] Lee S, Kwon J, Kim B, *et al.* Development of an accurate and sensitive diagnostic system based on conventional PCR for detection of African swine fever virus in food waste[J]. *Indian Journal of Microbiology*,2022,62(2):293–306.
- [25] Trinh T B N, Truong T, Nguyen V T, *et al.* Development of a novel real-time PCR assay targeting *p54* gene for rapid detection of African swine fever virus (ASFV) strains circulating in Vietnam[J]. *Veterinary Medicine and Science*,2021,7(6):2268–2272.
- [26] Wang A, Jia R, Liu Y, *et al.* Development of a novel quantitative real-time PCR assay with lyophilized powder reagent to detect African swine fever virus in blood samples of domestic pigs in China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 67(1):284–297.
- [27] Wang Y, Xu L, Noll L, *et al.* Development of a real-time PCR assay for detection of African swine fever virus with an endogenous internal control [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020,67(6):2446–2454.
- [28] Yin D, Geng R, Lv H, *et al.* Development of real-time PCR based on *A137R* gene for the detection of African swine fever virus[J]. *Frontiers in Veterinary Science*,2021,8:753967.
- [29] Li X, Hu Y, Liu P, *et al.* Development and application of a duplex real-time PCR assay for differentiation of genotypes I and II African swine fever viruses [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*,2022,69(5):2971–2979.
- [30] Gao Q, Feng Y, Yang Y, *et al.* Establishment of a dual real-time PCR assay for the identification of African swine fever virus genotypes I and II in China [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022,9:882824.
- [31] Lin Y, Cao C, Shi W, *et al.* Development of a triplex real-time PCR assay for detection and differentiation of gene-deleted and wild-type African swine fever virus [J]. *Journal of Virological Methods*,2020,280:113875.
- [32] Guo Z, Li K, Qiao S, *et al.* Development and evaluation of duplex TaqMan real-time PCR assay for detection and differentiation of wide-type and *MGF505-2R* gene-deleted African swine fever viruses[J]. *BMC Veterinary Research*,2020,16(1):428.
- [33] Zhan Y, Zhang L, Lin Y, *et al.* Development and preliminary testing of a probe-based duplex real-time PCR assay for the detection of African swine fever virus[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2021,59:101764.
- [34] Nishi T, Okadera K, Fukai K, *et al.* Establishment of a direct PCR assay for simultaneous differential diagnosis of African swine fever and classical swine fever using crude tissue samples [J]. *Viruses*,2022,14(3):498.
- [35] Liu H, Shi K, Zhao J, *et al.* Development of a one-step multiplex qRT-PCR assay for the detection of African swine fever virus, classical swine fever virus and atypical porcine pestivirus [J]. *BMC Veterinary Research*,2022,18(1):43.
- [36] Liu H, Shi K, Sun W, *et al.* Development a multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of African swine fever virus, classical swine fever virus and atypical porcine pestivirus[J]. *Journal of Virological Methods*,2021,287:114006.
- [37] Wu X, Xiao L, Lin H, *et al.* Development and application of a droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for detection and investigation of African swine fever virus[J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*,2018,82(1):70–74.
- [38] Zhu J, Jian W, Huang Y, *et al.* Development and application of a duplex droplet digital polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *EP402R*-deleted and wild-type African swine fever virus [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9:905706.
- [39] Niederwerder M. Risk and mitigation of African swine fever virus in feed[J]. *Animals*, 2021,11(3):792.
- [40] Khanal P, Olcha M, Niederwerder M C. Detection of African swine fever virus in feed dust collected from experimentally inoculated complete feed using quantitative PCR and virus titration assays[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022,69(1):97–102.
- [41] Soliman H, Midtlyng P J, El-Matbouli M. Sensitive and rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplification[J]. *Journal of Virological Methods*,2009,158(1-2):77–83.
- [42] Wang D, Yu J, Wang Y, *et al.* Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and visual LAMP assay for detection of African swine fever virus (ASFV) [J]. *Journal of Virological Methods*,2020,276:113775.
- [43] Mee P T, Wong S, O Riley K J, *et al.* Field verification of an African swine fever virus loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay during an outbreak in Timor-Leste[J]. *Viruses*, 2020,12(12):1444.
- [44] Wang Y, Dai J, Liu Y, *et al.* Development of a potential penside colorimetric LAMP assay using neutral red for detection of African swine fever virus [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12:609821.
- [45] Tran D H, Tran H T, Le U P, *et al.* Direct colorimetric LAMP assay for rapid detection of African swine fever virus: a validation study during an outbreak in Vietnam [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*,2021,68(4):2595–2602.
- [46] Zuo L, Song Z, Zhang Y, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for on-site diagnosis of

- African swine fever virus [J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36 (2): 325–328.
- [47] Yu L, Chou S, Wu H, *et al.* Rapid and semi-quantitative colorimetric loop-mediated isothermal amplification detection of ASFV via HSV color model transformation [J]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2021, 54 (5): 963–970.
- [48] Zhai Y, Ma P, Fu X, *et al.* A recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick for rapid and specific detection of African swine fever virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2020, 285: 113885.
- [49] Zhang Y, Li Q, Guo J, *et al.* An isothermal molecular point of care testing for African swine fever virus using recombinase-aided amplification and lateral flow assay without the need to extract nucleic acids in blood [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 633763.
- [50] Swarts D C, Jinek M. Mechanistic insights into the *cis*- and *trans*-acting DNase activities of Cas12a [J]. *Molecular Cell*, 2019, 73 (3): 589–600.
- [51] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356 (6336): 438–442.
- [52] Harrington L B, Burstein D, Chen J S, *et al.* Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes [J]. *Science*, 2018, 362 (6416): 839–842.
- [53] Wang X, He S, Zhao N, *et al.* Development and clinical application of a novel CRISPR-Cas12a based assay for the detection of African swine fever virus [J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20 (1): 282.
- [54] Tao D, Liu J, Nie X, *et al.* Application of CRISPR-Cas12a enhanced fluorescence assay coupled with nucleic acid amplification for the sensitive detection of African swine fever virus [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9 (9): 2339–2350.
- [55] Li Z, Wei J, Di D, *et al.* Rapid and accurate detection of African swine fever virus by DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter assay [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2020, 52 (12): 1413–1419.
- [56] Fu J, Zhang Y, Cai G, *et al.* Rapid and sensitive RPA-Cas12a-fluorescence assay for point-of-care detection of African swine fever virus [J]. *PLoS One*, 2021, 16 (7): e0254815.
- [57] He Q, Yu D, Bao M, *et al.* High-throughput and all-solution phase African swine fever virus (ASFV) detection using CRISPR-Cas12a and fluorescence based point-of-care system [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 154: 112068.
- [58] Wu J, Mukama O, Wu W, *et al.* A CRISPR/Cas12a based universal lateral flow biosensor for the sensitive and specific detection of African swine-fever viruses in whole blood [J]. *Biosensors*, 2020, 10 (12): 203.
- [59] Tian T, Qiu Z, Jiang Y, *et al.* Exploiting the orthogonal CRISPR-Cas12a/Cas13a trans-cleavage for dual-gene virus detection using a handheld device [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 196: 113701.
- [60] Wei N, Zheng B, Niu J, *et al.* Rapid detection of genotype II African swine fever virus using CRISPR Cas13a-based lateral flow strip [J]. *Viruses*, 2022, 14 (2): 179.
- [61] Ren M, Mei H, Zhou M, *et al.* Development of a super-sensitive diagnostic method for African swine fever using CRISPR techniques [J]. *Virologica Sinica*, 2021, 36 (2): 220–230.
- [62] Lin M, Yue H, Tian T, *et al.* Glycerol additive boosts 100-fold sensitivity enhancement for one-pot RPA-CRISPR/Cas12a assay [J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94 (23): 8277–8284.
- [63] Biagetti M, Cuccioloni M, Bonfili L, *et al.* Chimeric DNA/LNA-based biosensor for the rapid detection of African swine fever virus [J]. *Talanta*, 2018, 184: 35–41.
- [64] Martinez-Aviles M, Fernandez-Carrion E, Lopez G J, *et al.* Early detection of infection in pigs through an online monitoring system [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64 (2): 364–373.
- [65] Ryu H W, Tai J H. Object detection and tracking using a high-performance artificial intelligence-based 3D depth camera; towards early detection of African swine fever [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2022, 23 (1): e17.
- [66] Christopher-Hennings J, Araujo K P C, Souza C J H, *et al.* Opportunities for bead-based multiplex assays in veterinary diagnostic laboratories [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25 (6): 671–691.
- [67] Chen D, Wang D, Wang C, *et al.* Application of an AlphaLISA method for rapid sensitive detection of African swine fever virus in porcine serum [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105 (11): 4751–4759.
- [68] Aira C, Ruiz T, Dixon L, *et al.* Bead-based multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies to African swine fever virus and classical swine fever virus [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, 6: 306.
- [69] Bao M, Jensen E, Chang Y, *et al.* Magnetic bead-quantum dot (MB-Qdot) clustered regularly interspaced short palindromic repeat assay for simple viral DNA detection [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12 (39): 43435–43443.
- [70] Sackmann E K, Fulton A L, Beebe D J. The present and future role of microfluidics in biomedical research [J]. *Nature*, 2014, 507 (7491): 181–189.
- [71] Ye X, Li L, Li J, *et al.* Microfluidic-CFPA chip for the point-of-care detection of African swine fever virus with a median time to threshold in about 10 min [J]. *ACS Sensors*, 2019, 4 (11): 3066–3071.
- [72] Zhu Y, Shao N, Chen J, *et al.* Multiplex and visual detection of African swine fever virus (ASFV) based on Hive-chip and direct loop-mediated isothermal amplification [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1140: 30–40.
- [73] Jia R, Zhang G, Liu H, *et al.* Novel application of nanofluidic chip digital PCR for detection of African swine fever virus [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 7: 621840.
- [74] Shin D J, Wang T. Magnetic droplet manipulation platforms for nucleic acid detection at the point of care [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2014, 42 (11): 2289–2302.
- [75] Chen L, Wen K, Chen F, *et al.* Portable magnetofluidic device for point-of-need detection of African swine fever [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93 (31): 10940–10946.
- [76] Hu R, Liao T, Ren Y, *et al.* Sensitive detecting antigen of SARS-CoV-2 by NIR-II fluorescent nanoparticles [J]. *Nano Research*, 2022, 15 (8): 7313–7319.
- [77] Ji T, Liu Z, Wang G, *et al.* Detection of COVID-19: a review of the current literature and future perspectives [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 166: 112455.