



中华人民共和国国家标准

GB/T 18641—2018
代替 GB/T 18641—2002

伪狂犬病诊断方法

Diagnostic method for pseudorabies

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18641—2002《伪狂犬病诊断技术》。与 GB/T 18641—2002 相比,主要技术变化如下:

- 增加了检测猪伪狂犬病病毒 gB 抗体的阻断 ELISA 方法;
- 增加了检测伪狂犬病病毒野毒 gE-PCR 方法。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:华中农业大学、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:何启盖、库旭钢、吴斌、陈品、方六荣、李晓成、姜雯、孟宪荣、范盛先、刘正飞、吴发兴、吴美洲、陈焕春。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 18641—2002。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

引 言

伪狂犬病(Pseudorabies, Pr; Aujeszky's disease, AD)是由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PrV)引起的一种多种动物共患传染病,可危害猪、牛、羊、犬、猫、家兔、小鼠、狐狸和浣熊等多种动物,呈世界性分布。该病对养猪业的危害最为严重,病毒感染后,妊娠母猪出现流产、产死胎和木乃伊胎;15日龄内仔猪出现神经症状,致死率100%;断奶仔猪出现神经症状和呼吸道症状,致死率10%~20%;生长猪和育肥猪出现呼吸道症状,增重缓慢、饲料报酬低;种母猪发生返情和空怀,屡配不孕;公猪出现睾丸炎性肿胀或萎缩,失去种用能力。除猪外,其他动物感染伪狂犬病病毒后,可出现体温升高、奇痒和脑脊髓炎等临床症状,最终死亡,但呈散发形式。

本标准规定的常规血清学技术可用于非免疫动物的诊断、血清流行病学调查和免疫动物抗体检测。其中,中和试验特异性强,是国际贸易中通用的法定方法,用于口岸进出口检疫;乳胶凝集试验简便快速、敏感性高,适用于基层单位对该病的现场检测和筛查;酶联免疫吸附试验(ELISA)包括全病毒抗原ELISA(PrV-ELISA)和gB-ELISA方法,适用于实验室开展大批血清样品抗体检测。本标准中的gE-ELISA鉴别诊断方法,可区分伪狂犬病病毒gE基因缺失疫苗免疫猪和自然感染猪,因此,可用于猪群野毒感染的诊断和流行病学调查。本标准中规定的3种ELISA方法仅用于检测猪血清中的伪狂犬病病毒抗体,不适用于检测其他动物血清中伪狂犬病病毒抗体。

本标准规定的病原学诊断方法用于检测死亡和剖检动物的病料、流产胎儿组织(如扁桃体、肺脏和脑组织等)、活体动物的扁桃体、鼻拭子和公猪精液中的伪狂犬病病毒。其中,病毒分离鉴定限于有条件的实验室使用,聚合酶链式反应具有快速和灵敏的特点,可同时检测大批样品,但需注意样品交叉污染。家兔接种试验需在有隔离和消毒条件的动物房中进行。

伪狂犬病诊断方法

1 范围

本标准规定了伪狂犬病的血清中和试验、乳胶凝集试验、伪狂犬病病毒抗体 ELISA (PrV-ELISA)、猪伪狂犬病 gB-ELISA (阻断法) 和 gE-ELISA (阻断法) 等抗体检测方法及病毒分离鉴定、聚合酶链式反应和家兔接种试验等病原检测方法。

本标准适用于猪、牛、羊、犬、猫及其他易感动物的伪狂犬病诊断、检疫、免疫抗体评估和流行病学调查等。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件, 其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 678 猪伪狂犬病免疫酶试验方法

3 血清中和试验(采用固定病毒稀释血清法)

3.1 仪器

3.1.1 二氧化碳培养箱。

3.1.2 生物安全柜。

3.1.3 微量移液器。

3.2 耗材

3.2.1 细胞培养瓶。

3.2.2 96 孔细胞培养板。

3.2.3 吸管。

3.2.4 移液器吸头。

3.3 试剂

3.3.1 DMEM 培养液(见附录 A)。

3.3.2 0.25% 胰酶(见附录 A)。

3.3.3 PK-15 细胞。

3.3.4 伪狂犬病阳性血清。

3.3.5 阴性血清。

3.3.6 伪狂犬病病毒(野毒株)。

3.4 操作步骤

3.4.1 病毒半数细胞培养物感染量(TCID₅₀)的测定

3.4.1.1 病毒培养和收获

将伪狂犬病病毒(野毒株)接种于长成单层的 PK-15 细胞,接种量为液体培养基的 1/10 体积,37 ℃ 培养,待出现病变后,将细胞培养物冻融,离心去除细胞碎片,收获病毒。

3.4.1.2 病毒效价测定

3.4.1.2.1 用 DMEM 培养液将伪狂犬病病毒作连续 10 倍稀释,即 10^{-1} 、 10^{-2} ~ 10^{-9} 稀释,每个病毒稀释度取 100 μL 加入 96 孔细胞培养板中。每个病毒稀释度接 8 个孔。

3.4.1.2.2 每孔加入 100 μL 经 0.25% 胰酶消化的 PK-15 细胞悬液(细胞含量以 10^5 个/mL 左右为宜)。设非接毒、加等量 DMEM 的正常细胞培养对照。

3.4.1.2.3 细胞 96 孔板置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

3.4.1.2.4 逐日观察接毒细胞的病变,观察 4 d~5 d,记录每个病毒稀释度接种细胞的细胞病变(CPE)孔数。在观察期内,未接种病毒的细胞应无 CPE。

3.4.1.3 TCID₅₀ 计算

按照 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID₅₀(见附录 B)。

3.4.2 血清中和抗体效价的测定

3.4.2.1 血清灭活

将无溶血、清亮的待检血清置于 56 ℃ 水浴,灭活 30 min。

3.4.2.2 血清稀释

在细胞培养板孔中加入 50 μL DMEM 培养液,随后在第 1 孔中加入待检血清 50 μL 混匀后,用微量移液器取出 50 μL 加至第 2 孔中,混匀后再取出 50 μL 加至第 3 孔中,依此类推,直至第 10 孔(将混合液弃去 50 μL),血清稀释度即为 1:2、1:4、1:8~1:1 024,每份待检血清稀释度作 4 个重复。

3.4.2.3 加入病毒

将 50 μL 含 200 个 TCID₅₀ 的病毒液加到不同稀释度的血清孔中,37 ℃ 作用 1 h。

3.4.2.4 接种细胞

每孔中加入 100 μL PK-15 细胞悬液(细胞含量以 3×10^5 个/mL~ 5×10^5 个/mL 左右为宜),置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

3.4.2.5 设立对照组

3.4.2.5.1 病毒对照组

每次试验均应设病毒对照。将 200 TCID₅₀ 病毒液作 10 倍、100 倍、1 000 倍稀释。每孔加入 50 μL 不同稀释度的病毒液、50 μL DMEM 培养液和 100 μL PK-15 细胞悬液。每个稀释度病毒 4 个重复。

3.4.2.5.2 血清对照组

用已知中和效价的阳性血清、阴性血清与相同滴度的病毒孵化后,接种 PK-15 细胞;同时设正常培养的细胞对照。

3.4.2.6 结果观察

逐日观察,记录病变和非病变的孔数,共观察 4 d~5 d。1 000 倍稀释病毒(0.2 TCID_{50})对照组不引起细胞病变,100 倍稀释病毒(2 TCID_{50})对照组应有 0~2 孔细胞病变,10 倍稀释病毒(20 TCID_{50})对照组均应有细胞病变;阳性血清、阴性血清和正常细胞对照成立,待检血清对 PK-15 细胞应无毒性,测定结果方有效,否则该试验不成立。

3.4.2.7 结果判定

按照 Reed-Muench 方法(见附录 B)计算抗体效价,如血清中和效价 $\geq 1:2$,可判定为伪狂犬病抗体阳性。

4 乳胶凝集试验

4.1 仪器

10 μL ~50 μL 微量移液器。

4.2 耗材

4.2.1 移液器吸头。

4.2.2 洁净干燥载玻片。

4.2.3 洁净牙签。

4.3 试剂

4.3.1 伪狂犬病病毒乳胶凝集抗原(使用前轻轻摇匀)。

4.3.2 伪狂犬病阳性和阴性血清,稀释液(见附录 C)。

4.4 操作步骤

4.4.1 对照试验

取等量的乳胶凝集试验抗原(约 20 μL)分别与阴性血清、阳性血清在洁净的玻片上混合,混合液直径以不超过 1.0 cm 为宜。如阴性血清与抗原混合后不出现凝集,而阳性血清与抗原混合后出现相当于或高于 50%凝集程度,则对照试验成立。

4.4.2 待检血清处理

待检血清不必经热灭活或其他方式灭活,但应清亮透明,无溶血。

4.4.3 待检血清的检测

将待检血清用稀释液倍比稀释后,各稀释度取 15 μL ~20 μL 与等量胶乳凝集抗原在洁净干燥的载玻片上用牙签搅拌充分混合,混合液直径以不超过 1.0 cm 为宜。静置,在 1 min~3 min 内观察混合液的凝集现象。

4.4.4 判定标准

100%凝集程度:混合液透亮,凝集颗粒聚集在液滴的边缘。

75%凝集程度:混合液透明,出现大的凝集颗粒。

50%凝集程度:混合液略浑浊,凝集颗粒较细。

25%凝集程度:混合液浑浊,有少量凝集颗粒。

不凝集:待检血清与抗原混合后,呈浑浊状态,无可见凝集颗粒。

4.4.5 结果判定

4.4.5.1 待检血清倍比稀释后,分别与抗原混合,如出现 50%凝集程度,该血清判为伪狂犬病抗体阳性,否则判为抗体阴性。以出现 50%凝集程度的血清最高稀释倍数为该血清的抗体效价。

4.4.5.2 本方法检测感染或免疫后产生的早期抗体 IgM。当 IgM 消失后,本方法检测为阴性。此时,可用 3.4.2“血清中和试验(适用于所有动物待检血清检测)”或 5.2 或 5.3 或 5.4 的“酶联免疫吸附试验检测(仅适用于猪血清)”,可能出现以下 3 种结果:

- a) 任何一种方法为阴性,判为伪狂犬病抗体阴性;
- b) 任何一种方法为可疑,建议在间隔 2 周后再用血清中和试验或 ELISA 检测,如这两种方法均为阴性或可疑,判为阴性;
- c) 血清中和试验和酶联免疫吸附试验均为阳性或某一种方法为阳性,判为伪狂犬病病毒抗体阳性。

5 酶联免疫吸附试验

5.1 抗体检测项目分类

本试验包含检测猪伪狂犬病病毒抗体 ELISA(PrV-ELISA)、猪伪狂犬病病毒 gB 抗体 ELISA(gB-ELISA)和猪伪狂犬病病毒 gE 抗体 ELISA(gE-ELISA)方法。这三种 ELISA 方法均只能用于猪血清中伪狂犬病病毒不同抗体的检测,因为其他动物检测没有正式的阴、阳性判定标准。

5.2 PrV-ELISA

5.2.1 仪器设备

5.2.1.1 酶标仪。

5.2.1.2 恒温培养箱。

5.2.1.3 微量移液器。

5.2.2 耗材

5.2.2.1 酶标板。

5.2.2.2 移液器吸头。

5.2.2.3 实验用水(本标准所用水应符合 GB/T 6682 中二级水的规格)。

5.2.3 试剂

5.2.3.1 抗原(纯化后灭活的伪狂犬病病毒)。

5.2.3.2 酶标抗体(HRP 标记兔抗猪 IgG 抗体)。

5.2.3.3 阴性血清。

5.2.3.4 阳性血清。

5.2.3.5 待检血清。

5.2.3.6 洗涤液(配制方法见附录 C)。

5.2.3.7 抗原包被液(配制方法见附录 C)。

- 5.2.3.8 封闭液(配制方法见附录 C)。
- 5.2.3.9 四甲基联苯胺(TMB)底物溶液(配制方法见附录 C)。
- 5.2.3.10 终止液(配制方法见附录 C)。
- 5.2.3.11 样品稀释液(配制方法见附录 C)。

5.2.4 操作步骤

5.2.4.1 包被

用包被液将抗原稀释到工作浓度后加入酶标板孔内,每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。

5.2.4.2 洗涤

弃去孔内液体,用洗涤液洗 3 次,每次 3 min,用吸水纸拍干。

5.2.4.3 封闭

各孔中加入封闭液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h。按 5.2.4.2 步骤洗涤。
如等效采用商品化试剂盒,可省去 5.2.4.1~5.2.4.3 步骤。

5.2.4.4 加入待检血清和阴性、阳性血清对照

待检血清用稀释液进行 1:40 倍稀释,加入抗原孔中,每孔 100 μL ;同时将阴性血清对照和阳性血清对照各加入 3 个抗原孔中,分别标记为 A_1 、 A_2 、 A_3 和 A_4 、 A_5 、 A_6 孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h,重复 5.2.4.2 步骤。

5.2.4.5 加入酶标抗体

用样品稀释液将酶标抗体按工作浓度稀释,每孔加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h,重复 5.2.4.2 步骤。

5.2.4.6 加入底物

每孔加入 100 μL TMB 溶液,室温避光显色 25 min。

5.2.4.7 终止反应

每孔加入 50 μL 终止液终止反应。

5.2.4.8 读取吸光度值(OD_{490})

在酶标仪上于 490 nm 波长条件下,测定吸光度值。

5.2.4.9 结果判定

5.2.4.9.1 按式(1)计算血清检测值与阳性对照血清检测值之比(S/P)值:

$$S/P = \frac{SC_x - NC_x}{PC_x - NC_x} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

SC_x —— 样品 A_{490} ;

NC_x —— $(A_1 \text{OD}_{490} + A_2 \text{OD}_{490} + A_3 \text{OD}_{490})/3$;

$PC_x = (A_4 OD_{490} + A_5 OD_{490} + A_6 OD_{490}) / 3$ 。

5.2.4.9.2 如果 $S/P \geq 0.5$, 则判为抗体阳性。

5.2.4.9.3 如果 $S/P < 0.5$, 则判为抗体阴性。

5.3 猪伪狂犬病病毒 gB-ELISA(阻断法)

5.3.1 仪器

5.3.1.1 酶标仪。

5.3.1.2 恒温培养箱。

5.3.1.3 微量移液器。

5.3.2 耗材

5.3.2.1 酶标板。

5.3.2.2 移液器吸头。

5.3.2.3 实验用水(本标准所用水应符合 GB/T 6682 中二级水的规格)。

5.3.3 试剂

5.3.3.1 猪伪狂犬病病毒 gB 重组蛋白为抗原的 ELISA 包被板。

5.3.3.2 辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗猪伪狂犬病病毒 gB 单克隆抗体。

5.3.3.3 阴性血清。

5.3.3.4 阳性血清。

5.3.3.5 待检血清。

5.3.3.6 四甲基联苯胺(TMB)底物溶液。

5.3.3.7 洗涤液。

5.3.3.8 终止液(配制方法见附录 C)。

5.3.4 操作步骤

5.3.4.1 稀释待检血清

用样品稀释液将待检血清、阴性对照、阳性对照作 1:1 倍稀释(即 100 μ L 血清加 100 μ L 稀释液), 其中阴性对照、阳性对照各做 2 个重复, 分别标记为 A₁、A₂ 和 B₁、B₂。

5.3.4.2 血清孵育

将稀释血清 100 μ L 加入抗原孔中, 18 $^{\circ}$ C~26 $^{\circ}$ C 作用 1 h。

5.3.4.3 洗涤

甩掉板孔中的溶液, 每孔加 300 μ L 洗涤液, 洗涤 3 次。

5.3.4.4 加入酶标抗体

加入辣根过氧化物酶标记的抗猪伪狂犬病病毒 gB 单克隆抗体, 室温(18 $^{\circ}$ C~26 $^{\circ}$ C)作用 20 min, 洗涤 3 次。

5.3.4.5 加入底物

每孔加入 100 μ L TMB 底物溶液, 室温避光显色 15 min。

5.3.4.6 终止反应

每孔加入 50 μL 终止液,终止反应。

5.3.4.7 读取吸光度值(OD_{650})

在酶标仪上于 650 nm 波长条件下测定吸光度值。

5.3.4.8 结果计算和判定

5.3.4.8.1 对照组中,阴性血清平均 OD 值减去阳性血清平均 OD 值之差大于 0.30 时,试验有效。

5.3.4.8.2 按式(2)计算待检血清样品 OD_{650} 与阴性对照血清 OD_{650} 之比(S/N)值:

$$S/N = \frac{SC_x}{NC_x} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

SC_x ——样品 OD_{650} ;

NC_x ——($A_1 \text{OD}_{650} + A_2 \text{OD}_{650}$)/2。

5.3.4.8.3 当 $S/N > 0.70$ 时,判为猪伪狂犬病病毒(gB)抗体阴性。

5.3.4.8.4 当 $S/N < 0.60$ 时,判为猪伪狂犬病病毒(gB)抗体阳性。

5.3.4.8.5 当 S/N 值为 0.60~0.70 时,判为猪伪狂犬病病毒(gB)抗体可疑。可于 9 d~14 d 后再采血,重复检测,如仍为可疑,可判为阴性。

5.4 猪伪狂犬病病毒 gE-ELISA(阻断法)

按照 NY/T 678 中“gE-ELISA”的操作方法进行。

5.4.1 仪器

5.4.1.1 酶标仪。

5.4.1.2 恒温培养箱。

5.4.1.3 微量移液器。

5.4.2 耗材

5.4.2.1 酶标板。

5.4.2.2 移液器吸头。

5.4.2.3 实验用水(本标准所用水应符合 GB/T 6682 中二级水的规格)。

5.4.3 试剂

5.4.3.1 猪伪狂犬病病毒 gE 重组蛋白为抗原的 ELISA 包被板。

5.4.3.2 辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗猪伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体。

5.4.3.3 阴性血清。

5.4.3.4 阳性血清。

5.4.3.5 待检血清。

5.4.3.6 四甲基联苯胺(TMB)底物溶液。

5.4.3.7 洗涤液。

5.4.3.8 终止液(配制方法见附录 C)。

5.4.4 操作步骤

5.4.4.1 稀释待检血清

用样品稀释液将待检血清、阴性血清、阳性血清作 1:1 倍稀释(即 100 μL 血清加 100 μL 稀释液),其中阴性血清、阳性血清等分别做 2 个重复,分别标记为 A_1 、 A_2 和 B_1 、 B_2 。

5.4.4.2 血清孵育

将稀释血清 100 μL 加入抗原孔中,18 $^{\circ}\text{C}$ ~26 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h。

5.4.4.3 洗涤

甩掉板孔中的溶液,每孔加 300 μL 洗涤液,洗涤 3 次。

5.4.4.4 加入酶标抗体

加入辣根过氧化物酶标记的抗猪伪狂犬病病毒 gE 单克隆抗体,室温(18 $^{\circ}\text{C}$ ~26 $^{\circ}\text{C}$)作用 20 min,洗涤 3 次。

5.4.4.5 加入底物

每孔加入 100 μL TMB 底物溶液,室温避光显色 15 min。

5.4.4.6 终止反应

每孔加入 50 μL 终止液终止反应。

5.4.4.7 读取吸光度值(OD_{650})

在酶标仪上于 650 nm 波长条件下测定吸光度值。

5.4.4.8 结果计算和判定

5.4.4.8.1 对照组中,阴性血清平均 OD 值减去阳性血清平均 OD 值之差大于 0.30 时,试验有效。

5.4.4.8.2 按式(3)计算待检血清样品 OD_{650} 与阴性对照血清 OD_{650} 之比(S/N)值:

$$S/N = \frac{SC_x}{NC_x} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

SC_x —— 样品 A_{650} ;

NC_x —— $(A_1 \text{OD}_{650} + A_2 \text{OD}_{650})/2$ 。

5.4.4.8.3 当 $S/N > 0.70$ 时,判为猪伪狂犬病病毒(gE)抗体阴性。

5.4.4.8.4 当 $S/N < 0.60$ 时,判为猪伪狂犬病病毒(gE)抗体阳性。

5.4.4.8.5 当 S/N 值为 0.60~0.70 时,判为猪伪狂犬病病毒(gE)抗体可疑。可于 9 d~14 d 后再采血,重复检测,如仍为可疑,判为阳性。

6 病毒分离鉴定

6.1 仪器

6.1.1 高速冷冻离心机。

6.1.2 组织匀浆器(或研钵)。

6.1.3 生物安全柜。

6.1.4 微量移液器。

6.2 耗材

6.2.1 直径为 0.45 μm 滤膜的滤器。

6.2.2 细胞培养瓶。

6.2.3 吸管。

6.2.4 移液器吸头。

6.3 试剂

6.3.1 DMEM 培养基和 0.25% 胰酶溶液(见附录 A)。

6.3.2 磷酸盐缓冲液。

6.3.3 仓鼠肾细胞系(BHK-21)或猪肾细胞系(PK-15)细胞。

6.3.4 犊牛血清。

6.3.5 青霉素。

6.3.6 链霉素。

6.4 操作步骤

6.4.1 病料采集

对死亡病畜或活体送检处死的动物,采集脑组织(应含有三叉神经节)、肺脏和扁桃体等组织,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏条件下运输送检。

6.4.2 样品处理

待检组织(可等体积混样或单独处理)剪碎并匀浆后,与 DMEM 制成 1:5 悬剂,反复冻融 3 次,10 000 $\times g$ 离心 10 min 后,取上清液加双抗(青霉素溶液终浓度为 300 IU/mL、链霉素终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)过夜或 4 $^{\circ}\text{C}$ 处理 4 h,再经孔径为 0.45 μm 滤膜过滤,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存作为接种材料。

6.4.3 病料接种细胞

将病料滤液接种至已长成单层的 BHK-21 细胞(或 PK-15 细胞),接种量为所加培养液量的 1/10,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中吸附 1 h,加入含 10% 犊牛血清(血清要求无支原体污染,预先经 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min 后使用)的 DMEM 培养液,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,逐日观察细胞病变。

6.4.4 结果判定

接种后 36 h~72 h,如细胞出现变圆、拉网、脱落等现象,可初步判定阳性(病料中含有伪狂犬病病毒)。如第一次接种未出现细胞病变,应将细胞培养物冻融后,按 6.4.3 盲传 3 代,如仍无细胞病变,判为阴性(病料中无伪狂犬病病毒)。

6.4.5 病毒鉴定

将出现细胞病变的细胞培养物,用已知的伪狂犬病病毒阳性血清做病毒中和试验鉴定病毒,用聚合酶链式反应(第 7 章)或家兔感染试验(第 8 章)进一步鉴定。

7 聚合酶链式反应

7.1 仪器

- 7.1.1 组织匀浆机(或研钵)。
- 7.1.2 高速冷冻离心机。
- 7.1.3 生物安全柜。
- 7.1.4 PCR 仪。
- 7.1.5 凝胶成像系统。
- 7.1.6 水浴锅。
- 7.1.7 分析天平。
- 7.1.8 微量移液器。

7.2 耗材

- 7.2.1 移液器吸头。
- 7.2.2 EP 管。
- 7.2.3 PCR 反应管。

7.3 试剂

- 7.3.1 DNA 提取试剂盒。
- 7.3.2 琼脂糖。
- 7.3.3 TEN 缓冲液(见附录 A)。
- 7.3.4 溴化乙锭(EB)(见附录 A)或新型核酸染料(EB 替代物)。

7.4 引物序列

7.4.1 伪狂犬病病毒 gD 基因检测

引物序列:上游引物 P1: 5'-CAGGAGGACGAGCTGGGGCT-3', 下游引物 P2: 5'-GTCCACGCCCCGCTGAAGCT-3'。扩增靶序列是伪狂犬病病毒 gD 基因 434~650 nt 间的片段,扩增产物大小 217 bp。可用于检测伪狂犬病病毒,但不能区分猪伪狂犬病基因缺失活疫苗株和野毒株。

7.4.2 伪狂犬病病毒 gE 基因检测

引物序列:上游引物 P3: 5'-TTTGGATCCATGCGGCCCTTTCTG-3', 下游引物 P4: 5'-TTTGAATTCTTACGACACGGCGTCGCA-3', 扩增靶序列是伪狂犬病病毒 gE 基因 79~446 nt 间的片段,扩增产物大小为 368 bp,能区分猪伪狂犬病 gE 基因缺失活疫苗株和野毒株。

7.5 操作步骤

7.5.1 样品的采集

对于病死或剖杀的动物,取脑组织(含三叉神经节)、扁桃体等组织;对于待检活猪,用灭菌棉签伸入猪鼻腔中(以棉签棉花部分全部插入鼻腔为准),同一方向转动 3 次,获取鼻黏液,即为鼻拭子;用扁桃体取样器采集成年种猪扁桃体;采集公猪精液(检测前需用灭菌 PBS 做 10 倍稀释)。4 ℃~8 ℃冷藏条件下运输送检。

7.5.2 样品处理与模板制备

组织病料用组织匀浆器或研钵处理后,按 1:5 比例用 TEN 缓冲液(见附录 A.3)充分混悬,收集于离心管内,反复冻融 3 次,10 000×g 离心 10 min;鼻拭子样品,则加入 1 mL TEN 缓冲液涡旋 10 min 后挤压棉签,混悬液 10 000×g 离心 5 min,取上清液;精液样品,先用 PBS 做 10 倍稀释,方可用于核酸提取。

取组织或鼻拭子样品的上清液或稀释好的精液,按 DNA 试剂盒说明书提取 DNA 模板,−20 ℃贮存备用。

7.5.3 聚合酶链式反应(PCR)的操作程序

7.5.3.1 扩增伪狂犬病 gD 基因 PCR 反应体系

总体积 25.0 μL, MIX 12.5 μL, 引物 P1、P2 各 1.0 μL(10 μmol/L), H₂O 5.5 μL, DNA 模板 5.0 μL。扩增条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃ 30 s, 65 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 35 个循环后 72 ℃延伸 10 min。

7.5.3.2 扩增伪狂犬病 gE 基因 PCR 反应体系

总体积 25.0 μL, MIX 12.5 μL, 引物 P3、P4 各 1.0 μL(10 μmol/L), H₂O 5.5 μL, DNA 模板 5.0 μL。扩增条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 35 个循环后 72 ℃延伸 10 min。

7.5.4 PCR 产物的检测与判定

7.5.4.1 将 8 μL~10 μL PCR 扩增产物加入含有溴化乙锭(EB)或新型核酸染料(作为 EB 替代物)的 1%琼脂糖凝胶的各电泳孔中(设阳性和阴性样品扩增对照孔),电泳后,在凝胶成像系统或紫外光下观察结果。

7.5.4.2 当阳性对照和被检样品的扩增产物大小为 217 bp(必要时需要测序,目的序列参见附录 D),可判定为伪狂犬病病毒阳性,但不能区分 gE 基因缺失疫苗毒株和野毒株。

7.5.4.3 当阳性对照和被检样品的扩增产物大小为 368 bp(必要时需要测序,目的序列参见附录 D),可判定被检样品为伪狂犬病病毒野毒阳性。如不出现该扩增产物,但满足 7.5.4.2 中的阳性结果,判定被检样品为 gE 基因缺失疫苗毒株,否则,判为扩增反应失败。

8 家兔感染试验

8.1 试验目的及生物安全要求

本法用于疑似伪狂犬病患动物组织检测和分离病毒的鉴定。要求在良好隔离条件和消毒措施的动物房实施,试验结束后要对场地和用具实施彻底消毒。

8.2 家兔的选择

选择健康成年家兔(至少 4 只),经血清中和试验或胶乳凝集试验证实为伪狂犬病病毒抗体阴性。

8.3 病料的采集、处理及接种

无菌采集病猪扁桃体和患病动物脑组织(含有三叉神经节),用生理盐水或 PBS 液制成 20%~30% 匀浆液,反复冻融 3 次后 10 000×g 离心 10 min,取 1 mL~2 mL 上清液颈部皮下接种家兔(2 只);如接种物为疑似伪狂犬病病毒的细胞培养物,则取 1 mL~2 mL,同样皮下接种家兔(2 只)。同时设立接种等量生理盐水或 PBS 或培养基的对照家兔。

8.4 结果观察和判定

8.4.1 伪狂犬病病毒阳性

接种后 24 h~48 h,家兔在注射部位出现奇痒,表现为家兔舔(啃)咬注射局部,导致皮肤溃烂;呼吸困难、尖叫、四肢麻痹、痉挛等症状,病程 2 d~5 d,最终死亡。对照家兔无任何临床症状,健活。可初步判定病料或细胞培养物中含有伪狂犬病病毒。

8.4.2 伪狂犬病病毒阴性

在接种后 1 周,病料悬液或细胞培养物接种家兔不出现任何症状,健活;同时,对照家兔无任何临床症状,健活。可判定病料(或细胞培养物)中不含伪狂犬病病毒。

9 综合判定

当 5.4.4.8 结果阳性,可判定为猪伪狂犬病野毒感染抗体阳性;当 7.5.4.2 结果为阳性,可判定为伪狂犬病野毒病原阳性。其余各项结果为阳性,可判断为伪狂犬病病毒感染(或免疫)阳性,但无法区分是疫苗毒株还是野毒株所致。

附录 A

(规范性附录)

细胞培养和 PCR 反应常用溶液配制

A.1 DMEM 培养液配制

A.1.1 量取去离子水 950 mL,置于一定的容器中。

A.1.2 将 10.0 g DMEM 粉剂加于 15 ℃~30 ℃的去离子水中,边加边搅拌。

A.1.3 每 1 000 mL 培养液加 3.7 g 碳酸氢钠(NaHCO₃)。

A.1.4 加水至 1 000 mL,用 1 mol/L NaOH 或 HCl 调 pH 值至 6.9~7.0,在过滤前应盖紧容器瓶塞。

A.1.5 用 0.22 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌。4 ℃保存备用。

A.2 0.25%胰酶溶液配制

胰蛋白酶 250.00 mg 加入 100 mL Hanks 液中,充分溶解后,用 0.22 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌,-20 ℃保存。

A.3 TEN 缓冲液配制

依次称量下列成分,充分混合溶解,即可。

三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)(pH 8.0)	1 210.00 mg(10 mmol/L)
乙二胺四乙酸(EDTA)(pH 8.0)	372.00 mg(1.0 mmol/L)
三蒸水	1 000 mL

A.4 溴化乙锭溶液配制

溴化乙锭	1.0 g
三蒸水	100 mL

用磁力搅拌器搅拌数小时以确保其溶解,然后用铝箔包裹容器或转移至棕色瓶中,室温保存。

注:溴化乙锭是强诱变剂,并有中度毒性,使用含有这种染料的溶液时务必戴上手套,称量染料时要戴面罩。建议采用 EB 替代物作为本反应扩增产物的显色剂。

附录 B

(规范性附录)

病毒半数细胞培养感染量(TCID₅₀)和血清中和抗体(NA)的计算(按 Reed-Muench 法)

B.1 病毒半数细胞培养感染量(TCID₅₀)

TCID₅₀指在培养板孔或试管内引起半数细胞病变或死亡(cytopathic effect,CPE)所需的病毒量。

B.2 TCID₅₀计算方法

B.2.1 距离比的计算

按式(B.1)计算距离比(D):

$$D = \frac{C_x - 50\%}{C_x - D_x} \quad \text{.....(B.1)}$$

式中:

C_x——高于50%病变百分数;

D_x——低于50%病变百分数。

B.2.2 TCID₅₀的计算

按式(B.2)计算 TCID₅₀:

$$\lg \text{TCID}_{50} = E_x + F_x \quad \text{.....(B.2)}$$

式中:

E_x——高于50%病变率所对应的最高稀释度的对数;

F_x——距离比×(低于50%病变率所对应的最低稀释度的对数与高于50%病变率所对应的最高稀释度的对数之差)。

B.2.3 TCID₅₀计算方法示例

接种后细胞病变累计的计算方法数据演示见表 B.1。

表 B.1 接种后细胞病变累计的计算方法数据演示

病毒稀释度	细胞病变		累计孔数		细胞孔数	出现细胞病变百分数/%
	出现细胞病变孔数	不出现细胞病变孔数	出现细胞病变	不出现细胞病变		
10 ⁻¹	8	0	51	0	51	(51/51)100
10 ⁻²	8	0	43	0	43	(43/43)100
10 ⁻³	8	0	35	0	35	(35/35)100
10 ⁻⁴	8	0	27	0	27	(27/27)100
10 ⁻⁵	8	0	19	0	19	(19/19)100
10 ⁻⁶	6	2	11	2	13	(11/13)84.6

表 B.1 (续)

病毒稀释度	细胞病变		累计孔数		细胞孔数	出现细胞病变百分数/%
	出现细胞病变孔数	不出现细胞病变孔数	出现细胞病变	不出现细胞病变		
10^{-7}	4	4	5	6	11	(5/11)45.4
10^{-8}	1	7	1	13	14	(1/14)7.1
10^{-9}	0	8	0	21	21	(0/21)0

从表 B.1 可见,该病毒的 TCID₅₀ 在 10^{-6} (84.600) 和 10^{-7} (45.400) 之间,首先按式(B.1)计算距离比:

$$\text{距离比} = \frac{84.6 - 50}{84.6 - 45.4} = 0.88$$

将式(B.1)计算的距离比数值代入式(B.2)计算 TCID₅₀:

$$-\lg \text{TCID}_{50} = -6 + 0.88 \times (-1) = -6.88$$

所以:TCID₅₀ = $10^{-6.88}$ / 0.1 mL

B.3 血清中和抗体(NA)计算方法

B.3.1 距离比的计算

按式(B.3)计算距离比(D):

$$D = \frac{C_x - 50\%}{C_x - D_x} \quad \dots\dots\dots (B.3)$$

式中:

C_x —— 高于 50% 保护率的百分数;

D_x —— 低于 50% 保护率的百分数。

B.3.2 中和抗体的计算

按式(B.4)计算中和抗体(NA):

$$-\lg \text{NA} = E_x + F_x \quad \dots\dots\dots (B.4)$$

式中:

E_x —— 高于 50% 保护率所对应的最高血清稀释度的对数;

F_x —— 距离比 × (低于 50% 保护率所对应的最低稀释度的对数与高于 50% 保护率所对应的最高稀释度的对数之差)。

B.3.3 血清中和抗体效价计算方法示例

接种后细胞病变累计的计算方法示例见表 B.2。

表 B.2 接种后细胞病变累计的计算方法数据演示

血清稀释度	CPE 孔数	无 CPE 孔数	累计		
			CPE 孔数	无 CPE 孔数	保护率/%
1 : 4 ($10^{-0.6}$)	0	4	0	9	100
1 : 16 ($10^{-1.2}$)	1	3	1	5	83
1 : 64 ($10^{-1.8}$)	2	2	3	2	40
1 : 256 ($10^{-2.4}$)	4	0	7	0	0
1 : 1 024 ($10^{-3.0}$)	4	0	11	0	0

从表 B.2 可见,该血清的稀释度在 $10^{-1.2}$ (83) 和 $10^{-1.8}$ (40) 之间,首先按式(B.3)计算距离比:

$$\frac{83 - 50}{83 - 40} = 0.7$$

将按式(B.3)计算的距离比数值按式(B.4)计算中和抗体效价。

$$= -1.2 + 0.7 \times (-0.6) = -1.66$$

$$= -1.66 \text{ 的反对数} = 1/46$$

即 1 : 46 稀释的待检血清可保护 50% 的组织培养细胞免于出现 CPE。



附录 C

(规范性附录)

酶联免疫吸附试验有关溶液的配制

C.1 洗涤液

洗涤液为含 0.05% 吐温-20(Tween-20) pH 7.4 的磷酸盐缓冲液, 配制方法如下:

将下列试剂依次加至容积为 1 000 mL 容器中, 充分溶解即成。

氯化钠 (NaCl)	8.0 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g
十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.2 g
吐温-20 (Tween-20)	0.5 mL
加蒸馏水定容至	1 000 mL

C.2 抗原包被液

包被液为 25 mmol/L、pH 9.6 碳酸盐冲液, 配制方法如下:

碳酸钠 (Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠 (NaHCO_3)	2.93 g
加蒸馏水定容至	1 000 mL

C.3 封闭液

在 100 mL 洗涤液中加入 0.1 g 牛血清白蛋白 (BSA) 即可。

C.4 底物溶液

C.4.1 pH 5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液

将下列试剂依次加入 1 000 mL 体积的容器中, 充分溶解即成。

十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	71.6 g
无水柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	19.2 g
加蒸馏水定容至	1 000 mL

C.4.2 0.75% H_2O_2

取 30% H_2O_2 1.25 mL, 加入蒸馏水, 使总体积达到 50 mL。

C.4.3 四甲基联苯胺 (TMB) 母液

取 200.00 mg TMB 溶解于 100 mL 无水乙醇中。-20 °C 保存。

C.4.4 底物溶液(临用时配制)

0.1 mol/L pH 5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液	9.5 mL
TMB 母液	0.5 mL
0.75% H ₂ O ₂	42 μL

此底物液对光敏感,应避免强光照射。现配现用。

C.5 终止液

终止液为 2 mol/L 硫酸(H₂SO₄),配制方法如下:

浓硫酸(H ₂ SO ₄)	22.2 mL
蒸馏水	177.8 mL

C.6 样品稀释液

样品稀释液为 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液,配制方法如下:

将下列试剂依次加至容积为 1 000 mL 的容器中:

氯化钠(NaCl)	8.02 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
十二水合磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	3.87 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.16 g
加蒸馏水定容至	1 000 mL

混匀后,充分溶解,最后加入 0.10 g 叠氮钠(NaN₃)防腐(其终浓度为 0.1 g/L)。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.liejian.com

附录 D

(资料性附录)

伪狂犬病病毒 gD 基因和 gE 基因的 PCR 扩增序列

D.1 伪狂犬病病毒 PCR 目的 gD 基因扩增产物 DNA 序列

CAGGAGGACGAGCTGGGGCTGCTCATGGTGGCCCCGGGGCGGTTCAACGAGGGCCAGT
ACCGGCGCCTGGTGTCCGTCGACGGCGTGAACATCCTCACCGACTTCATGGTGGCGCTCCCC
GAGGGGCAAGAGTGCCCGTTCGCCCCGCTGGACCAGCACCGCACGTACAAGTTCGGCGCGTG
CTGGAGCGACGACAGCTTCAAGCGGGGCGTGGACA

D.2 伪狂犬病病毒 PCR 目的 gE 基因扩增产物 DNA 序列

CCATGCGGCCCTTTTTGCTGCGCGCCGCGCAGCTCCTGGCGCTGCTGGCCCTGGCGCTCT
CCACCGAGGCCCGAGCCTCTCCGCCGAGACGCCCGGGCCCGTCACCGAGGTCCCCGAGTC
CCTCGGCCGAGGTCTGGGACGACCTCTCCACCGAGGCCGACGACGATGACCTAACGGCGAC
CTCGACGGCGACGACCGCCGCGCGGGCTTCGGCTCGGCCCTCGCATCCCTGAGGGAGGCGCCC
CCGGCCCATCTGGTGAACGTGTCCGAGGGCGCCAACTTCACCCCTGACGCGCGCGGCGACGG
CGCCGTGCTGGCCGGGATCTGGACGTTCTGCCCCGTCGCGGCTGCGACGCCGTGTCTCG

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 WWW.LIJIANDIAGNOSIS.COM