

DB43

湖 南 省 地 方 标 准

DB43/ T 959.2—2014

异种移植用无指定病原体（ Designated Pathogen Free, DPF ）医用供体猪 第2部分：微生物学监测

Medical grade DPF donor pig for xenotransplantation

Part 2: Microbiological surveillance

2014-10-27 发布

2014-12-26 实施

湖南省质量技术监督局 发布

目 次

前言 II

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 2

4 微生物学等级..... 2

5 检测要求..... 2

6 检测程序..... 3

7 检测方法..... 3

8 检测规则..... 5

9 结果判定..... 6

10 判定结论..... 6

11 样本保存..... 6

附录 A (规范性附录) 牛分枝杆菌 PCR 检测方法..... 7

附录 B (规范性附录) 细胞内鸟型分枝杆菌 PCR 检测方法..... 9

附录 C (规范性附录) 新型隐球菌 DNA 实时荧光定量 PCR 检测..... 10

附录 D (规范性附录) 抗荚膜组织胞浆菌抗体 ELISA 检测方法..... 11

附录 E (规范性附录) 猪兰氏类圆线虫病镜检法诊断..... 12

附录 F (规范性附录) 布氏姜片吸虫镜检法诊断..... 13

附录 G (规范性附录) 猪脑心肌炎病毒间接 ELISA 检测..... 14

附录 H (规范性附录) 人流感病毒多重 PCR 检测..... 15

附录 I (规范性附录) 猪巨细胞病毒 FQ-PCR 检测 17

附录 J (规范性附录) 疱疹病毒核酸检测..... 19

参考文献..... 21

前 言

本部分按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

《异种移植用无指定病原体 (Designated Pathogen Free, DPF) 医用供体猪》分为五个部分：

- 第 1 部分：遗传质量控制；
- 第 2 部分：微生物学监测；
- 第 3 部分：配合饲料；
- 第 4 部分：病理学诊断规范；
- 第 5 部分：环境与设施。

本部分为《异种移植用无指定病原体 (Designated Pathogen Free, DPF) 医用供体猪》的第 2 部分。

本部分由湖南省科技厅实验动物管理办公室提出并归口。

本部分起草单位：中南大学湘雅三医院，湖南赛诺生物科技有限责任公司。

本部分主要起草人：王维、易受南、俞远京、胡鹏志、郭飞、郭旭丽。

异种移植用无指定病原体（Designated Pathogen Free, DPF）医用供体猪

第2部分：微生物学监测

1 范围

本部分规定了异种移植用无指定病原体（Designated Pathogen Free, DPF）医用供体猪微生物学等级分类、检测要求、检测程序、检测方法、检测规则、结果判定、判定结论、样本保存等。

本部分适用于异种移植用 DPF 医用供体猪微生物学等级监测。

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，仅所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 14926.1 实验动物 沙门氏菌检验方法
- GB/T 14926.4 实验动物 皮肤病原真菌检测方法
- GB/T 14926.8 实验动物 支原体检测方法
- GB/T 14926.27 实验动物 小鼠腺病毒检验方法
- GB/T 14926.30 实验动物 兔轮状病毒检测方法
- GB/T 14926.46 实验动物 钩端螺旋体检测方法
- GB/T 14926.47 实验动物 志贺氏菌检测方法
- GB/T 14926.48 实验动物 结合分枝杆菌检测方法
- GB/T 14926.56 实验动物 狂犬病病毒检测方法
- GB/T 16551 猪瘟诊断技术
- GB/T 17013 包虫病诊断标准及处理原则
- GB/T 18090 猪繁殖与呼吸综合征诊断方法
- GB/T 18448.1 实验动物 体外寄生虫检测方法
- GB/T 18448.2 实验动物 弓形虫检测方法
- GB/T 18448.6 实验动物 蠕虫检测方法
- GB/T 18638 流行性乙型脑炎诊断技术
- GB/T 18641 伪狂犬病诊断技术
- GB/T 18646 动物布鲁氏菌病诊断技术
- GB/T 18647 动物球虫病诊断技术
- GB/T 18935 口蹄疫诊断技术
- GB/T 19200 猪水泡病诊断技术
- GB/T 19915.1 猪链球菌 2 型平板和试管凝集试验操作规程
- GB/T 19915.2 猪链球菌 2 型分离鉴定操作规程

GB/T 19915.3 猪链球菌 2 型 PCR 定型检测技术
GB/T 19915.7 猪链球菌 2 型荧光 PCR 检测方法
GB/T 21674 猪圆环病毒聚合酶链反应试验方法
GB/T 22333 日本乙型脑炎病毒反转录聚合酶链 反应试验方法
GB/T 22915 口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测方法
GB/T 22917 猪水泡病病毒荧光 RT-PCR 检测方法
GB/T 27536 猪流感病毒分离与鉴定方法
NY/T 537 猪放线杆菌胸膜肺炎诊断技术
NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法
NY/T 545 猪痢疾诊断技术
NY/T 546 猪萎缩性鼻炎诊断技术
NY/T 548 猪传染性胃肠炎诊断技术
NY/T 550 动物和动物产品沙门氏菌检测方法
NY/T 564 猪巴氏杆菌病诊断技术
NY/T 679 猪繁殖和呼吸综合征免疫酶试验方法
SN/T 0420 出口猪肉旋毛虫检验方法消化法
SN/T 1379.1 猪瘟单克隆抗体酶联免疫吸附试验
SN/T 1396 弓形虫病间接血凝试验
SN/T 1446.1 猪传染性胃肠炎阻断酶联免疫吸附试验
SN/T 1919 猪细小病毒病红细胞凝集抑制试验操作规程
SN/T 3499 新孢子虫病检疫技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 异种移植用 DPF 医用供体猪 `medical grade DPF donor pig for xenotransplantation`

经人工饲养与培育，遗传背景明确或者来源清楚，12 月龄体重宜不超过 50kg，不携带世界卫生组织（World Health Organization, WHO）指定供体动物应排除的潜在感染或条件致病和感染性人畜共患疾病病原，必须利用生物安全屏障环境防止病原体感染，不得使用抗生素或疫苗，用于医用异种移植供体、科学研究、教学、生产和质量控制鉴定以及其他科学实验的小型猪。

4 微生物学等级

异种移植用 DPF 医用供体猪微生物学等级为医用供体无指定病原体级。

5 检测要求

5.1 临床观察

外观检查无异常。

5.2 微生物检测项目

异种移植用 DPF 医用供体猪病原微生物检测项目见表 1。

6 检测程序

检测程序见图 1。

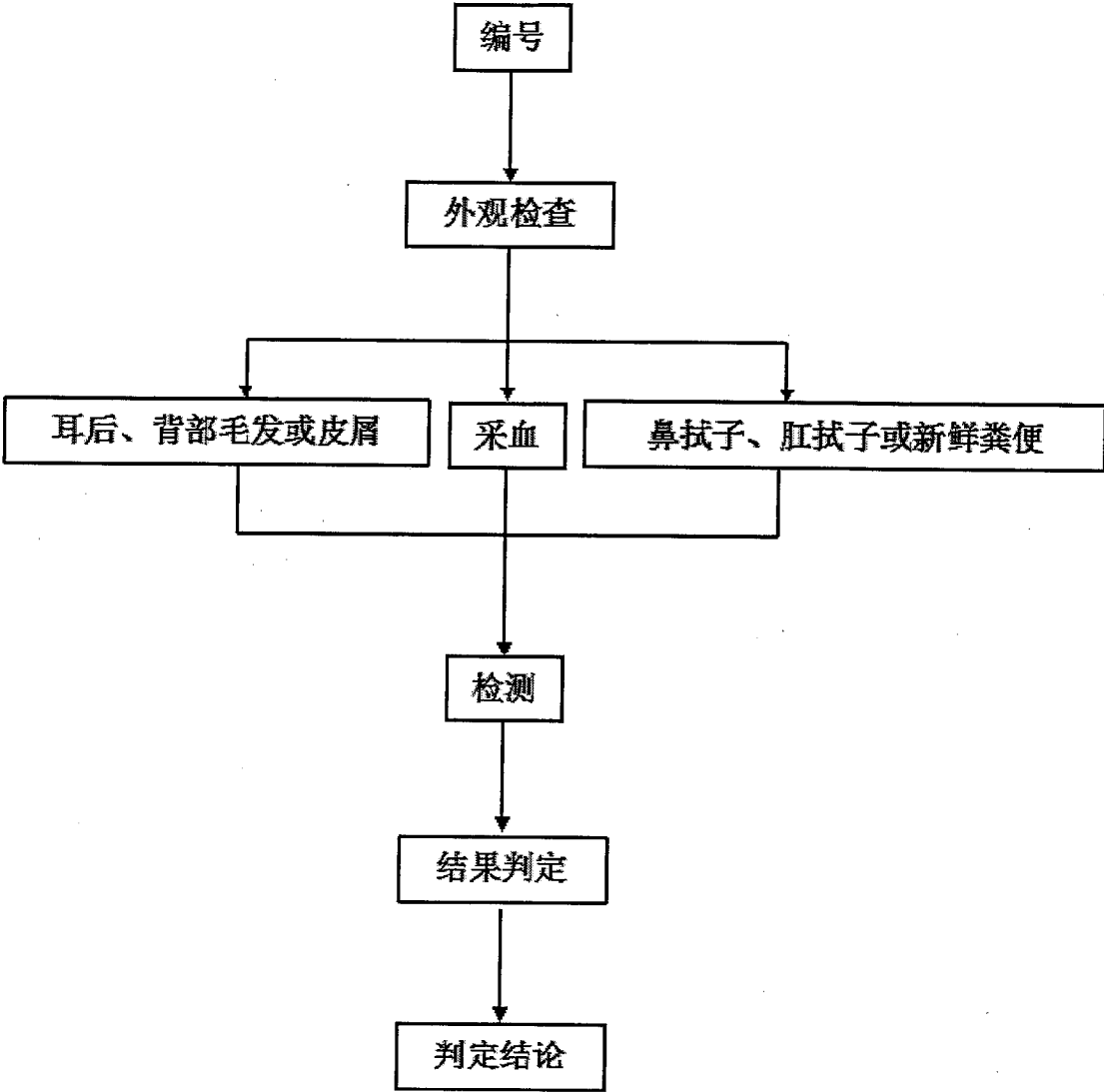


图 1 异种移植用 DPF 医用供体猪检测程序

结合临床症状和实验室检查结果，需要进一步确证时，可取特定样本进行检测。

7 检测方法

检测方法见表 1。

表 1 异种移植用 DPF 医用供体猪病原微生物检测项目及检测方法

类型	序号	检测项目	检测方法
细菌类 Bacterium	1	布鲁氏菌 <i>Brucella spp</i>	GB/T 18646
	2	钩端螺旋体 <i>Leptospira spp</i>	GB/T 14926.46

表1 异种移植用DPF医用供体猪病原微生物检测项目及检测方法 (续)

类型	序号	检测项目	检测方法
细菌类 Bacterium	3	猪痢疾蛇样螺旋体 <i>Serpul-mahydysenteriae</i>	NY/T 545
	4	牛型分枝杆菌 <i>Mycobacterium bovis</i>	附录A
	5	结核分枝杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	GB/T 14926.48
	6	细胞内鸟型结核分枝杆菌复合物 <i>Mycobacterium avium-intracellulare complex</i>	附录B
	7	猪肺炎支原体 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	GB/T 14926.8
	8	沙门氏菌 <i>Salmonella typhi</i>	GB/T 14926.1; NY/T 550
	9	志贺氏菌 <i>Shigella</i>	GB/T 14926.47
	10	支气管败血波氏杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	NY/T 546
	11	多杀巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>	NY/T 546; NY/T 564
	12	猪胸膜肺炎放线杆菌 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	NY/T 537
	13	猪链球菌2型 <i>Streptococcus suis type 2</i>	GB/T 19915.1-3; GB/T 19915.7
真菌类 Fungi	14	皮肤病原真菌 <i>Pathogenic dermal fungi</i>	GB/T 14926.4
	15	新型隐球菌 <i>Cryptococcus neoformans</i>	附录C
	16	荚膜组织胞浆菌 <i>Histoplasma capsulatum</i>	附录D
寄生虫类 Parasites	17	体外寄生虫 <i>Ectozoa</i>	GB/T 18448.1
	18	猪蛔虫 <i>Ascaris suum</i>	GB/T 18448.6
	19	棘球绦虫 <i>Echinococcus sp.</i>	GB/T 17013
	20	等孢球虫属 <i>Isospora sp</i>	GB/T 18647
	21	猪兰氏类圆线虫 <i>Strongyloides ransomi</i>	附录E
	22	弓形虫 <i>Toxoplasma gondii</i>	GB/T 18448.2; SN/T 1396
	23	旋毛虫 <i>Trichinella spiralis</i>	SN/T 0420
	24	新孢子虫 <i>Neospora</i>	SN/T 3499
	25	布氏姜片吸虫 <i>Fasciolopsis buski</i>	附录F
病毒类 Viruses	26	猪腺病毒 <i>Adenovirus(porcine)</i>	GB/T 14926.27
	27	猪脑心肌炎病毒 <i>Encephalomyocarditis virus</i>	附录G
	28	猪流感病毒 <i>Porcine Influenza virus</i>	GB/T 27536
	29	人流感病毒 <i>Human Influenza viruses</i>	附录H
	30	猪巨细胞病毒 <i>Porcine cytomegalovirus</i>	附录I
	31	疱疹病毒 <i>Porcine gama-herpesvirus</i>	附录J
	32	猪繁殖与呼吸综合征病毒 <i>Porcine reproductive andrespiratory syndrome virus</i>	GB/T 18090; NY/T 679
	33	猪细小病毒 <i>Procine parvovirus</i>	SN/T 1919
	34	轮状病毒 <i>Rotavirus</i>	GB /T 14926.30

表1 异种移植用 DPF 医用供体猪病原微生物检测项目及检测方法 （续）

类型	序号	检测项目	检测方法
病毒类 Viruses	35	伪狂犬病病毒 Pseudorables virus	GB/T 18641
	36	狂犬病病毒 Rabies virus	GB/T 14926.56
	37	口蹄疫病毒 Foot and mouth disease virus	GB/T 18935; GB/T 22915
	38	猪瘟病毒 Classical swine fever virus	GB/T 16551; SN/T 1379.1
	39	日本乙型脑炎病毒 Japaneses encephalitis virus	GB/T 18638; GB/T 22333
	40	猪圆环病毒2型 Porcine circovirus type 2	GB/T 21674
	41	猪传染性胃肠炎病毒 Porcine transmissible gastroenteritisvirus	NY/T 548; SN/T 1446.1
	42	猪水泡病病毒 Swine vesicular disease virus	GB/T 19200; GB/T 22917

8 检测规则

8.1 检测频率

每6个月至少检测一次。

8.2 抽样

8.2.1 方式

选择6月龄以上的异种移植用 DPF 医用供体猪用于检测，随机抽样。

8.2.2 数量

根据异种移植用 DPF 医用供体猪群体大小，抽样数量见表2。

表2 抽样数量

群体大小	抽样数量
<50头	5%
50-100头	3%
100-500头	2%
>500头	1%

8.2.3 方法

8.2.3.1 按病毒、细菌、真菌、寄生虫检测要求联合采样。

8.2.3.2 采样方法按照 NY/T 541 以及医学采样程序进行。

8.3 样本标识要求

样本要求有明显标识，写明检品名称、品系、等级、数量、编号、栏舍及检测项目等内容，安全送

达实验室。

9 结果判定

9.1 合格判定

按各个微生物检测项目结果判定方法判定检测结果，抗体检测项目，血清抗体阴性为合格，抗原和核酸检测项目，未见阳性为合格。

10 判定结论

所有项目的检测结果均合格，判为符合 DPF 等级标准。否则，判为不符合 DPF 等级标准。

11 样本保存

11.1 样本资料、样本来源、动物编号、样本种类及编号，按医学病理资料档案管理规范保存。保存时间为 1 年。

11.2 检测样本应一式两份，其中一份应该保存于液氮罐中，保存器具应该标志清晰，符合病理标本保存规范。

附录 A
(规范性附录)
牛分枝杆菌 PCR 检测方法

A1 原理

以牛分枝杆菌 16SrRNA 基因和 IS6110 基因为靶序列, 建立双重 PCR 方法。

A2 样品采集

A2.1 样品类型

有明显的结节状、干酪样坏死组织的猪病变组织

A2.2 样品采集

用无菌剪刀剪取病料组织约 0.5-1g, 置无菌 1.5mlEP 管中; 加入 400 μ l 的组织消化液和蛋白酶 K (终浓度为 1mg/ml); 55 $^{\circ}$ C, 水浴 8h, 其间间隔半小时颠倒 EP 管几次, 以使病料组织与消化液充分反应; 8000rpm, 离心 5min, 取上清液置另一无菌 1.5mlEP 管中; 加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 液体, 反复颠倒几次; 12000rpm, 离心 10min, 取上层液体于一无菌 1.5mlEP 管中; 重复抽提 1 次; 加入等体积的异丙醇, 充分混匀后, 置-20 $^{\circ}$ C 30min; 12000rpm, 离心 10min, 弃上清; 沉淀用 70% 乙醇清洗, 并置 37 $^{\circ}$ C, 至乙醇挥发完全; 加入 30 μ l TE, 并加入 RNA 酶, 37 $^{\circ}$ C, 放置 40min; 将所得液体作为模板, 并置-20 $^{\circ}$ C 保存。

A3 操作步骤

A3.1 引物的设计

参照 *Mycobacterium bovis* AF2122/97 [gi:31742509] 基因序列设计出 16SrRNA 基因和 IS6110 基因引物。引物序列如下:

16SrRNA P1:5' -CACATGCAAGTCGAACGGAAGG-3'

16SrRNA P2:5' -GCCCGTATCGCCGCACGCT-3'

扩增片段大小约为 584bp。

IS6110P1:5' -GGCTTGCCGGGTTTGA-3'

IS6110P2:5' -TTGTACCGACGCCTACGCT-3'

扩增片段大小约为 309bp。

A3.2 PCR 反应

根据引物设计时, oligo6.0 软件提供的建议 T_m 值, PCR 反应体系为: 模板 2 μ l (1.75pg-1.75 μ g), 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ l, dNTPs 2 μ l, IS6110 引物各 0.5 μ l (5pM), 16SrRNA 引物各 1.5 μ l (15pM), 蒸馏水 14 μ l, *Taq* 酶 0.5 μ l (2.5U); 体系总体积为 25 μ l。

PCR 扩增的反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 59.5 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 30 个循

环，最后延伸 7min，4℃保存。

A3.3 PCR 扩增产物的鉴定

0.8%的琼脂糖，电压 120V，电泳 12-15min，在凝胶成像系统中检测。

A4 结果判定

按照设定的双重 PCR 反应体系和扩增条件，如果出现大小 309bp 的 IS6110 基因和约 584bp 的 16SrRNA 基因的目的片段说明 PCR 结果阳性。

附录 B
(规范性附录)
细胞内鸟型分枝杆菌 PCR 检测方法

B1 原理

以鸟型分枝杆菌特异性插入序列 IS1245，设计一对特异性引物，用于检测和鉴定皮肤组织中鸟型分枝杆菌。

B2 样品采集

B2.1 样品类型

猪皮肤组织

B2.2 样品采集

无菌条件下取上述组织 1g 左右，置入 1.5ml 洁净 EP 管。

B3 操作步骤

B3.1 组织处理

将皮肤组织去脂、剪碎，用组织研磨器研磨后补加适量蒸馏水，制成组织匀浆 2ml，低速离心后取上清液，2 倍连续稀释后装于微量离心管中。

B3.2 PCR 扩增和检测

扩增插入序列 IS1245:

引物 1 为 5' -GCCGCCGAAACGATCTAC-3'

引物 2 为 5' -AGGTGGCGTCGAGGAAGAC-3'

50 μ l PCR 反应体系含 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ l, 25mmol/L MgCl₂ 5 μ l, dNTPs 200 μ mol/L, 引物各 1 μ mol/L, 模板 DNA 10 μ l, TaqDNA 聚合酶 1U。循环条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 其后按 94 $^{\circ}$ C 30s, 65 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 扩增产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 花青素染色, 用紫外检测仪观察结果并摄影。

B4 结果判定。

出现 427bp 扩增带为阳性, 未见 427bp 扩增带为阴性。

附录 C
(规范性附录)
新型隐球菌 DNA 实时荧光定量 PCR 检测

C1 原理

以新型隐球菌的 ITS 基因序列中一段高度保守序列为目的序列，设计出特异引物和探针，应用实时荧光定量 PCR 技术进行检测。

C2 样品采集

C2.1 样品类型

猪肺部分泌物

C2.2 样品采集

对送检的猪解剖后用棉拭子取下肺部的分泌物，用 PBS 洗脱棉拭子，洗下的液体经冻融三次，离心取上清，加入双抗保存备用。

C3 操作步骤

C3.1 引物的设计

根据新型隐球菌的基因序列设计引物为：

FP:5' -TTACCTGTTGGACTTGGATTTGG-3'

RP:5' -CATAGGCCCGCGAACTTATT-3'

C3.2 DNA 的提取

取气管分泌物上清加入 SDS 和蛋白酶 K，50℃水浴 1h，每 15 分钟摇一次。用酚及酚氯仿抽提，乙醇沉淀，用 20ul 无菌双蒸水溶解备用。在反应体系中加入 5ul 模板，总量为 50ul。

C3.3 目的基因的扩增

以 50 μl PCR 反应体系进行反应：10×PCR Buffer（含 15mmol/L MgCl₂）5 μl，dNTP mixture（10 μmol/L）1 μl，TaqDNA 聚合酶（5U/μl）0.4 μl、DNA 模板 2 μl，上下游引物各 3 μl，加 ddH₂O 至 50 μl，于扩增仪扩增，循环条件：94℃ 5min，94℃ 30s、58℃ 1min 共 40 个循环。

C4 结果判定

取 5 μl PCR 产物于 1.5%琼脂糖（含 10% GoldView）中，5V/cm 电压电泳 60-75min，紫外透视仪上检测，荧光条带在 124bp 处即为阳性。

附录 D
(规范性附录)
抗荚膜组织胞浆菌抗体 ELISA 检测方法

D1 原理

用中国药品生物制品检定所研制的荚膜组织胞浆菌蛋白提取物 (purified protein from *Histoplasma capsulatum*, P-HTPM) 为抗原, 建立检测猪血清中抗真菌荚膜组织胞浆菌抗体的酶联免疫吸附试验。

D2 样品采集

D2.1 样品类型

猪血清

D2.2 样品采集

无菌条件下用一次性注射器取耳静脉血 3ml-5ml, 置于试管中, 分离血清, 待检。

D3 操作步骤

D3.1 用 $1\mu\text{g}$ /孔的抗原包被酶标板, $50\mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育 2h。

D3.2 弃去孔中液体, 加入洗涤液 (含 0.05%Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4PBS、PBST), $300\mu\text{l}$ /孔, 洗涤 3 次, 每次 3min。

D3.3 扣干。

D3.4 加入封闭液 (含 5%犊牛血清的 PBST), $100\mu\text{l}$ /孔, 37°C 封闭 30min。

D3.5 弃去封闭液, 加入待检血清 (稀释度为 1:1000), $100\mu\text{l}$ /孔, 37°C 作用 30min。

D3.6 洗涤 3 次 (方法同前)。

D3.7 扣干。

D3.8 加入 1:10000 的酶标抗体 (二抗) $100\mu\text{l}$ /孔, 37°C 作用 45min。

D3.9 洗涤 3 次。

D3.10 扣干。

D3.11 加入底物 TMB 显色液, $100\mu\text{l}$ /孔, 室温避光显色 10-15min。

D3.12 每孔加入 $50\mu\text{l}$ 2mol/L H_2SO_4 终止反应。

D3.13 测定吸光度值, 按照下列公式计算 P/N 值: $\text{P/N 值} = \text{阳性对照孔 OD 均值} / \text{阴性对照孔 OD 均值}$ 。

D4 结果判定

当被检样品的 A 值 >0.135 时, 判定为阳性; 当样品的 A 值在 $0.059-0.135$ 之间时, 判定为可疑; 当样品的 A 值 <0.059 时, 判定为阴性。

附录 E
(规范性附录)
猪兰氏类圆线虫病镜检法诊断

E1 原理

消化道蠕虫粪学检查。

E2 样品采集

E2.1 样品类型

猪粪便

E2.2 样品采集

从猪舍地面及猪直肠分别采集猪的粪样。

E3 操作步骤

E3.1 饱和食盐水漂浮法检查

取粪样 10g 溶于饱和食盐水中，用玻璃棒搅拌均匀后用 40 目的金属筛反复过滤，除去大的粪渣，将滤液置于大试管中，让液面突出于试管口，静止 30min 后蘸取液面制压片，在 40 倍显微镜下检查。

E3.2 尼龙筛淘洗法检查

取粪样 25g 置于大烧杯中，用常水溶解并用玻璃棒充分搅拌均匀后，经金属筛反复过滤，除去大的粪渣，将滤液置入 260 目的尼龙筛内，用清水反复淘洗，直至淘洗液澄清透明位置，吸取尼龙筛内沉积物制压片，在 10 倍和 40 倍显微镜下检查。

E4 结果判定

E4.1 饱和食盐水漂浮法

经饱和食盐水漂浮法对猪的粪便进行检查，从直肠采取的粪样中查到虫卵，椭圆形，无色透明，卵壳薄，大小为 $(42-53) \mu\text{m} \times (24-32) \mu\text{m}$ ，内有幼虫。鉴定为兰氏类圆线虫卵。

E4.2 经尼龙筛淘洗法

对猪的粪便进行检查，从地面采集的粪样中查到虫体，虫体细小，呈乳白色，毛发状，镜下透明，食道短，呈柱状，有两个食道球，虫体大小为 $(3.1-4.6) \text{mm} \times (0.055-0.080) \text{mm}$ 。鉴定为兰氏类圆线虫的杆型幼虫。

附录 F
(规范性附录)
布氏姜片吸虫镜检法诊断

F1 原理

消化道蠕虫粪学检查。

F2 样品采集

F2.1 样品类型

猪新鲜粪便

F2.2 样品采集

从猪舍地面及猪直肠分别采集猪的粪样。

F3 操作步骤

F3.1 直接涂片法

先取 2-3 滴蒸馏水（或 50% 的甘油水）于载玻片上，再用火柴棒取新鲜的粪便混合均匀，去除污秽后，用低倍镜检查。

F3.2 沉淀法

取 5-10g 的粪便于烧杯中加 20ml 水，用筛过滤后，装入离心机然后倒上清液，再进行离心，反复数次，取沉淀渣滴于玻片上，用低倍镜检查。

F4 结果判定

采用以上两种方法对猪的粪便进行检查，从地面采集的粪样中查到虫体或虫卵，虫体肥厚、背腹扁平、前端狭窄、后端钝圆，形似鲜姜之切片；虫卵长椭圆形、淡黄色、卵壳薄均匀、前端卵盖扁小不易看出，长宽比约为 $130-145\mu\text{m} \times 85-97\mu\text{m}$ ，鉴定为布氏姜片吸虫阳性。

附录 G
(规范性附录)
猪脑心肌炎病毒间接 ELISA 检测

G1 原理

由于 2C 蛋白为猪脑心肌炎病毒的非结构蛋白，参与病毒的复制，因此在病毒复制时才会产生该蛋白并刺激机体产生抗体，通过重组 2C 蛋白为包被抗原建立检测猪脑心肌炎病毒抗体间接 ELISA 方法。

G2 样品采集

G2.1 样品类型

猪血清

G2.2 样品采集

无菌条件下用一次性注射器取耳静脉血 3ml-5ml，置于试管中，分离血清，待检。

G3 操作步骤

G3.1 将重组蛋白 2C 用包被液 (0.05mol/L、pH9.6 的碳酸盐缓冲液) 稀释为适当浓度按 100 μ l/孔包被酶标板，37℃孵育 1h 后 4℃过夜。

G3.2 弃去孔中液体，加入洗涤液 (含 0.05% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 PBS、PBST)，300 μ l/孔，洗涤 3 次，每次 3min。

G3.3 扣干。

G3.4 加入封闭液 (含 5%犊牛血清的 PBST)，100 μ l/孔，37℃封闭 1h。

G3.5 弃去封闭液，加入待检血清 (一抗)，100 μ l/孔，37℃作用 45min。

G3.6 洗涤 3 次 (方法同前)。

G3.7 扣干。

G3.8 加入适当稀释的酶标抗体 (二抗) 100 μ l/孔，37℃作用 45min。

G3.9 洗涤 3 次。

G3.10 扣干。

G3.11 加入底物 TMB 显色液，100 μ l/孔，室温避光显色 10-15min。

G3.12 每孔加入 50 μ l 2mol/L H_2SO_4 终止反应。

G3.13 测定 OD_{450nm} 光吸收值，按照下列公式计算 P/N 值：P/N 值=阳性对照孔 OD 均值/阴性对照孔 OD 均值。

G4 结果判定

当被检样品的 OD 值>0.27 时，判定为阳性；当样品的 OD 值<0.27 时，判定为阴性。

附录 H
(规范性附录)
人流感病毒多重 PCR 检测

H1 原理

根据流感病毒 HA 基因和 M 基因设计引物, 进行 RT-PCR 方法检测。

H2 样品采集

H2.1 样品类型

鼻咽拭子

H2.2 样品采集

标本采集后, 冷冻 12h 内运送至实验室, 24h 内进行流感病毒分离培养和快速检测试验。

H3 操作步骤

H3.1 多重 PCR 引物设计

分别设计扩增引物扩增 HA 全基因片段:

H1F-5' -agcaaaagcaggggaaaata-3'
H1R-5' -aacaagggtgtttttcctca-3'
H3F-5' -agcaaaagcaggggataattc-3'
H3R-5' -ctcaaatgcaaattgtgcacc-3'
BF-5' -gggacatgaacaacaagatgc-3'
BR-5' -tgtcagctattatggagctg-3'

H1、H3 和乙型扩增产物分别 431bp、210bp 和 390bp。

H3.2 病毒 RNA 提取

提取病毒 RNA 作为 RT-PCR 模板, 用于反转录试验或置-20℃保存备用。

H3.3 病毒逆转录

用试剂盒进行病毒 RNA 逆转录。

H3.4 多重 PCR

反应体系 25 μ l, 各反应物浓度 10 $\times$ Buffer 2.5 μ l、MgCl₂ (25mM) 2 μ l、dNTP 2 μ l、Taq (5U/ μ l) 0.4 μ l、H 对引物 (10mM) 各 1.25 μ l、逆转录生成的 cDNA 4 μ l、加水到 25 μ l。反应程序: 94℃ 3min, 94℃ 30s, 51℃ 1min、68℃ 1min 共 35 个循环, 68℃ 10min。

H3.5 PCR 产物的鉴定

取 PCR 产物 5 μ l，加入上样孔后进行 1%琼脂糖凝胶电泳。

H4 结果判断

出现 431bp、210bp 或 390bp 条带，判定为阳性。

附录 I

(规范性附录)

猪巨细胞病毒 FQ-PCR 检测

11 原理

TaqMan 探针法是高度特异的定量 PCR 技术，是利用 Taq 酶的 3'→5' 外切核酸酶活性，切断探针，产生荧光信号。由于探针与模板是特异性结合，因此从荧光信号的强弱就可以判断模板数量。

12 样品采集

12.1 样品类型

病变组织

12.2 样品采集

无菌条件下取上述组织 1g 左右，置入 1.5ml 洁净 EP 管。

13 操作步骤

13.1 总 RNA 提取

1.5ml 样品离心管中，加入 1ml Trizol 试剂，静置 5min 或马上-70℃保存，12000rpm 离心 15min，分相为三层，取上清液至新 1.5ml 管，加入 200ul 氯仿，振荡混匀 30s，室温静置 3-5min 分层，12000rpm 离心 15min，取上清液至新 1.5ml 管，中间层和红色下层 4℃保存，便于提取 DNA 和蛋白，上清液加入约 0.5ml 的异丙醇（预冷），振荡混匀 30s，室温下静置 15min，12000rpm 离心 10min，弃上清，RNA 沉淀管底，如沉淀不明显，则再离心数秒吸出上清，加入 1ml75%乙醇（预冷），温和震荡悬浮沉淀，8000rpm 离心 5min，弃上清，短暂快速离心（5s），弃上清，室温放置 2min 晾干，沉淀加入 15μl DEPC 处理水，轻弹管壁溶解，少量样品 55-60℃水浴孵育 10-15min，测量 OD260/280 值后，样品放置-70℃保存。

13.2 反转录

0.2ml 离心管加入 1μl 总 RNA，1μl 随机引物 oligo (dt)，10μl DEPC 处理水，混匀，瞬时离心 5s，70℃水浴 5min，迅速冰浴 2min，瞬时离心，加入 4μl 5×Buffer，2μl 0.1M DTT，2μl 10Mm dNTPs，混匀，温浴 2min，加入 1μl 反转录酶，42℃温育 50min，70℃孵育 10min 灭活，-70℃冰箱保存。

13.3 引物与 TapMan 探针的设计与合成

设计一对特异引物 P1/P2 和 TapMan 探针：

P1:5' -TGGCACTGATACTTGACAAGC-3'

P2:5' -CTCCCGTGAAGCCGTAAA-3'

TapMan 探针:FAM-5' -CAGCTTGCCCTCAAGGTGACGTG-3' -TAMRA。

13.4 标准曲线的建立

用含 pGEMT/PCMV 重组质粒的溶液作标准品，10 倍稀释成 1.0×10^{10} – 1.0×10^0 拷贝/ μl ，共 11 个稀释度，以不同浓度的重组质粒为模板进行 FQ-PCR 敏感性试验。以起始模板数的对数为 X 轴，以 FQ-PCR 循环次数 Ct 值为 Y 轴作回归曲线，建立 PCMV 检测的标准曲线。

13.5 FQ-PCR 反应条件

采用 $5 \mu\text{mol/L}$ 的引物浓度和 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 的探针浓度对质粒标准品进行检测，双温循环及 60°C 的退火温度为最佳的循环条件。FQ-PCR 反应总体积为 $25 \mu\text{l}$ ，其中 $10 \times \text{ExTaq Buffer}$ $2.5 \mu\text{l}$ (Mg^{2+} 浓度为 2.0mmol/L)，dNTPs $2 \mu\text{l}$ ExTaq 酶 $0.25 \mu\text{l}$ ，上下游引物各 $0.5 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{mol/L}$)，探针 $0.25 \mu\text{l}$ ($10 \mu\text{mol/L}$)，模板 $1 \mu\text{l}$ ，ddH₂O $18.00 \mu\text{l}$ ，混合均匀，置荧光定量 PCR 仪上进行自动化扩增反应。反应程序为： 94°C 预变性 4min， 94°C 变性 15s， 60°C 退火延伸 40s，40 个循环。荧光模式设为 FAM/TAMRA 双标记模式。

13.6 根据所得曲线作数据分析。

13.7 取部分 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，检测产物的特异性。

14 结果判定

以电泳阴性对照为标准，根据电泳结果判断是否有阳性产物。

附录 J
(规范性附录)
疱疹病毒核酸检测

J1 原理

选取一对猪疱疹病毒 I 型 (PHV) 特异性引物, 通过碱裂解法提取猪疱疹病毒 DNA, 后者在耐热 DNA 聚合酶 (*Taq* 酶) 作用下, 配以 SD-Buffer (内含 Mg^{2+} 、Tris-HCl 等)、四种核苷酸单体 (dNTPs) 等成分, 通过聚合酶链式反应体外扩增法对猪疱疹病毒进行体外扩增, 产物经凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯观察, 从而达到快速检测之目的。

J2 标本采集

J2.1 样本类型

血清或病毒液

J2.2 样本采集

发病猪脑、淋巴结、扁桃体、肾和脾等组织标本: 无菌条件下取上述组织 1g 左右, 置入 1.5ml 洁净 EP 管, 立即送检。血清: 用一次性无菌注射器抽取受检猪耳静脉或者前腔静脉静脉血 2-5ml, 静置斜放待血清析出, 10000rpm 离心 3min, 可取上清立即用于测试; 或吸取上部血清 (约 200 μ l) 转入无菌 1.5ml EP 管, 保存待检。

J3 操作步骤

J3.1 引物设计

设计引物序列

PHV-F:5' -GGGACGCTCTGATTAAGGAAT-3'

PHV-R:5' -CTTGGTGATCAGCAGCAGCTTG-3'

J3.2 DNA 提取

血清或病毒液, 常规市售 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 取提取液进行 PCR 扩增。

J3.3 PCR 扩增

反应总体积为 25 μ l, 其中 10 $\times$ Buffer 2.5 μ l (Mg^{2+} 浓度为 2.0mmol/L), dNTPs 2 μ l, Ex*Taq* 酶 0.25 μ l, 上下游引物各 0.5 μ l (10 μ mol/L), DNA 模板 1 μ l, ddH₂O 19.00 μ l, 混合均匀, 置荧光定量 PCR 仪上进行自动化扩增反应。按照下列条件扩增: 循环条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 53 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3min, 共 35 个循环。

J3.4 电泳检测

(1) 2%琼脂糖凝胶配制: 稀释 $50\times$ TAE 至 $1\times$ TAE, 称 4g 琼脂糖放于 500ml 锥形瓶中, $1\times$ TAE 200ml, 置入微波炉中加热溶解, 再加入 $20\mu\text{l}$ EB 充分混匀。在电泳槽内放好梳子, 倒入琼脂糖凝胶, 待凝固后使用。

(2) 电泳检测: 直接取 PCR 扩增产物 $15\mu\text{l}$, 用加样枪点样于琼脂凝胶孔中, 以 $5\text{V}/\text{cm}$ 电压, $1\times$ TAE 中电泳, 紫外灯下观察结果。

K4 检测结果判定

阴性无带出现 (引物带除外), 阳性出现 242bp 扩增带。若被检样品出现 242bp 扩增带, 即为猪疱疹病毒阳性, 否则为阴性。

参 考 文 献

- [1] 郭明星,朱堂明. 双重 PCR 方法检测牛分支杆菌引起的猪结核病的研究[C]. 第二届全国人畜共患病学术研讨会论文集, 2008.
- [2] 李晓杰, 吴勤学, 刘训荃. 鸟分支杆菌聚合酶链反应检测的研究[J]. 中国皮肤科杂志, 2003, 36(12): 679-681.
- [3] 程鹏飞, 蒋晓迪, 曹轩. 实时荧光定量 PCR 检测新生隐球菌 DNA 方法的建立[J]. 武汉大学学报(理学版), 2010, 56(3): 343-347.
- [4] 王璞, 陈保文, 罗永艾. ELISA 检测抗荚膜组织胞浆菌抗体方法的建立[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(2): 87-89.
- [5] 李国江, 荆海臣, 李沐森. 仔猪兰氏类圆线虫病的诊断与治疗[N]. 畜牧与兽医, 2010, 42(11): 103.
- [6] 钟跃南. 猪姜片吸虫病的诊断[J]. 福建农业, 2007, 9: 28.
- [7] 刘兰亚, 刘荣欣, 宋勤叶. 检测猪脑心肌炎病毒重组非结构蛋白 2C 间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(4): 525-528.
- [8] 季亚勇, 沙丹, 马广源. 多重 PCR 和单重 PCR 在流感病毒快速检测中的比较与应用[J]. 现代预防医学, 2010, 37(4): 758-760.
- [9] 拜廷阳, 赵德明, 吴志明. 猪巨细胞病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 检测的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(2): 169-174.
- [10] 蒋文明, 侯广宇, 李金平. 鸽疱疹病毒与腺病毒感染的 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2009, 30(8): 63-65.
-