

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1953—2025

代替 NY/T 1953—2004

猪附红细胞体病诊断技术

Diagnostic technique for *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*)
infection

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



目 次

前言 II

引言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语..... 1

5 生物安全措施 1

6 临床诊断 1

7 样品采集、保存与运输 2

8 涂片镜检 2

9 PCR 检测方法 2

10 实时荧光 PCR 检测方法 4

11 荧光 RAA 检测方法 5

12 间接 ELISA 抗体检测方法 6

13 阻断 ELISA 抗体检测方法 7

14 综合判定 8

附录 A(规范性) PCR 反应溶液的配制 9

附录 B(资料性) 猪附红细胞体 PCR 扩增产物电泳图、荧光 PCR 及荧光 RAA 扩增曲线图 10

附录 C(资料性) 重组表达猪附红细胞体 p40 蛋白的制备及鉴定 12

附录 D(资料性) 猪附红细胞体阳性对照(阳性血清)、阴性对照(阴性血清)的制备及鉴定 13

附录 E(规范性) ELISA 反应溶液的配制 14

附录 F(资料性) 猪附红细胞体 p40 单克隆抗体的制备..... 15

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 NY/T 1953—2010《猪附红细胞体病诊断技术规范》，与 NY/T 1953—2010 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了标准名称(见标准名称,2010 年版的标准名称)；
- b) 更改了范围(见第 1 章,2010 年版的第 1 章)；
- c) 增加了规范性引用文件(见第 2 章)；
- d) 增加了缩略语(见第 4 章)；
- e) 增加了生物安全措施(见第 5 章)；
- f) 增加了疑似猪附红细胞体感染判定(见 6.4)；
- g) 增加了样品采集、保存与运输(见第 7 章)；
- h) 删除了样品的采集(见 2010 年版的 2.3.3)；
- i) 增加了疑似猪附红细胞体感染判定(见 8.3)；
- j) 更改了核酸提取(见 9.5,2010 年版的 2.3.5)；
- k) 增加了荧光 RAA 检测方法(见第 11 章)；
- l) 增加了间接 ELISA 抗体检测方法(见第 12 章)；
- m) 增加了阻断 ELISA 抗体检测方法(见第 13 章)；
- n) 更改了综合判定(见第 14 章,2010 年版的第 3 章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：河南省动物疫病预防控制中心、河南省畜产品质量监测检验中心、青岛立见生物科技有限公司、苏州吉玛基因股份有限公司。

本文件主要起草人：闫若潜、吴志明、班付国、王淑娟、马震原、刘梅芬、王东方、刘影、赵雪丽、朱前磊、方先珍、王英华、袁淑萍、刘先敏、柴茂、杨海波、王翠、刘敏、曹伟伟、刘光辉、苗连叶、王华俊、苑述友、房大学、孙荣钊、赵美雪、张利平、靳冬、国立浩。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2010 年首次发布为 NY/T 1953—2010；

——本次为第一次修订。



引 言

猪附红细胞体病是由猪附红细胞体[*Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*)]寄生于猪红细胞表面或游离于血浆、组织液及脑脊液中引起的人畜共患传染性疾病。猪附红细胞体可引起患猪出现发烧、皮肤红紫、贫血、黄疸、咳嗽等一系列症状,造成猪群生产性能下降、免疫力低下、死亡率增加。该病不仅制约了我国畜牧业健康发展,也对人类健康和公共卫生安全造成威胁,我国将其列为三类动物疫病。

随着对猪附红细胞体病诊断需求的增加和诊断技术的发展,现行《猪附红细胞体病诊断技术规范》(NY/T 1953—2010)已不能满足实际生产需要,需增加荧光 RAA 等病原学现场快检方法、ELISA 等血清学检测方法。由于目前尚无针对猪附红细胞体病的疫苗,因此,疑似猪附红细胞体感染动物经检测抗体阳性即可确诊感染。

猪附红细胞体病诊断技术

1 范围

本文件规定了猪附红细胞体病的生物安全措施,临床诊断,样品采集、保存与运输,涂片镜检,实时荧光 PCR 检测方法,荧光 RAA 检测方法,间接 ELISA 抗体检测方法,阻断 ELISA 抗体检测方法,综合判定。

本文件适用于对猪附红细胞体病的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethy pyrocarbonate)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphates)

ELISA:酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay)

E. suis:猪附红细胞体(*eperythrozoon suis*)

OD:光密度(optical density)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

RAA:重组酶介导等温核酸扩增技术(recombinase aided amplification)

5 生物安全措施

进行猪附红细胞体实验室检测时,如样品处理、核酸提取等,生物安全措施应按照 GB 19489 的规定执行。

6 临床诊断

6.1 流行病学

6.1.1 易感动物

不同年龄、性别、品种的猪均易感,还可感染人及绵羊、牛、鼠、猫等多种动物。

6.1.2 传染源

发病猪和隐性感染猪是本病的传染源。

6.1.3 传播途径

主要通过吸血昆虫传播,或通过血液污染的针头和器械传播,也可垂直传播。

6.1.4 发病规律

本病一年四季均可发生,尤其是夏秋季节。

6.2 临床症状

6.2.1 发热,体温升高到 $40^{\circ}\text{C}\sim 42^{\circ}\text{C}$,食欲下降,精神委顿,呼吸困难,排棕红色尿液。

6.2.2 感染初期皮肤潮红,后期背部及四肢末梢发绀,特别是耳廓边缘发绀。

6.2.3 贫血,全身皮肤及可视黏膜苍白或黄染。

6.2.4 慢性病猪表现消瘦、苍白,部分猪出现荨麻疹或病斑型皮肤变态反应。

6.2.5 血液稀薄,凝固不良,红细胞数量减少。

6.2.6 新生仔猪衰竭,母猪繁殖障碍。

6.3 病理变化

6.3.1 贫血和黄疸,全身肌肉色泽变淡,脂肪及肺、胸腔、胃、肠、膀胱等内脏器官浆膜有不同程度的黄染。

6.3.2 淋巴结、脾脏、肝脏肿大;肾脏肿大,质地变脆,外观黄染。

6.3.3 膀胱蓄积棕红色尿液,黏膜黄染。

6.4 结果判定

符合 6.1 中描述的流行病学特征,且出现 6.2 中 3 种及以上的临床症状,同时可观察到 6.3 中的任一病理变化,可判为疑似猪附红细胞体感染。

7 样品采集、保存与运输

7.1 样品的采集

7.1.1 镜检样品

自耳静脉或前腔静脉无菌采血,将采集的新鲜血样进行涂片染色镜检。

7.1.2 抗凝血样品

用无菌注射器先吸入 0.1% 肝素 0.5 mL~1 mL,再自耳静脉或前腔静脉采集 10 倍量血液,快速混匀后转入无菌离心管中,编号备用。可用于 PCR 检测、实时荧光 PCR 检测、荧光 RAA 检测。

7.1.3 血清样品

自耳静脉或前腔静脉无菌采血,每头应不少于 5 mL,无菌分离血清,装入 2 mL 离心管中,编号备用。可用于 ELISA 检测。

7.2 保存与运输

样品采集后置中保温箱中,加入预冷的冰袋,宜 24 h 内运送到实验室。样品密封后在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下保存应不超过 24 h,如超过 24 h 应冷冻保存。

8 涂片镜检

8.1 涂片染色镜检

将采集的新鲜血样直接涂片,采用吉姆萨染色镜检,猪附红细胞体感染猪红细胞表面可见紫红色小体或圆点;健康猪红细胞形态规则,边缘光滑,染色均匀。

8.2 结果判定

符合 8.1,判定为疑似猪附红细胞体感染。

9 PCR 检测方法

9.1 试剂

9.1.1 TE 缓冲液、阳性对照、阴性对照、无核酸酶水、TAE 缓冲液、1.2 % 的琼脂糖凝胶,配制方法按照附录 A 的规定执行。

9.1.2 商品化 DNA 提取试剂盒。

9.1.3 $6\times$ 上样缓冲液。

9.1.4 DNA 分子量标准。

9.2 仪器设备

9.2.1 核酸提取仪。

9.2.2 PCR 扩增仪。

9.2.3 台式低温高速离心机(最大转速 12 000 *g* 以上)。

9.2.4 电泳仪和水平电泳槽。

9.2.5 凝胶成像系统或紫外透射仪。

9.2.6 微量可调移液器(0.1 μL ~0.25 μL 、0.5 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL 等不同规格)。

9.3 引物

上游引物 *E. suis*-P1:5'-ATTTACCGCATGGTAGATATTTG-3'；

下游引物 *E. suis*-P2:5'-AGAAACTTTCCACTCTTCTCAC-3'。

扩增产物大小为 666 bp。

9.4 样品处理

取 500 μL 待检样品加入 1.5 mL 离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 *g* 离心 20 min,弃上清,沉淀中加入 400 μL TE 缓冲液溶解。取阳性对照、阴性对照各 1 μL ,分别加入 400 μL TE 缓冲液,混匀。

9.5 核酸提取

采用商品化 DNA 提取试剂盒按照说明书提取样品及阳性对照、阴性对照中的核酸,或用核酸提取仪提取核酸。如在 2 h 内检测可将提取的核酸置于冰上保存,否则应置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

9.6 PCR 扩增

9.6.1 配制 PCR 反应体系

PCR 体系配制见表 1。体系配好后盖紧 PCR 反应管,并做好标记。

表 1 PCR 体系配制表

试剂成分	加入体积
10 $\times$ PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})	2.5 μL
2.5 mmol/L dNTPs	2 μL
Ex Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.25 μL
<i>E. suis</i> -P1(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
<i>E. suis</i> -P2(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
无核酸酶水	16.25 μL
总体积	22 μL

9.6.2 PCR 反应

9.6.2.1 将 22 μL PCR 反应混合液加入到 PCR 管,将 3 μL DNA 模板加入到 PCR 管,并设阳性对照、阴性对照及空白对照。

9.6.2.2 加入模板后,密封反应管,充分混匀,瞬时离心。

9.6.2.3 将 PCR 管放在 PCR 仪中,按如下条件运行扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,64 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

9.6.2.4 反应结束后取出产物置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

9.7 PCR 扩增产物的电泳检测

9.7.1 取 5 μL ~10 μL PCR 扩增产物和 1 μL ~2 μL 6 $\times$ 电泳上样缓冲液混合后,连同 5 μL DNA 分子量标准分别加到 1.2 % 的琼脂糖凝胶各孔中。

9.7.2 5 V/cm 恒压下电泳 30 min,将电泳结束后将凝胶置于凝胶成像系统或紫外透射仪中观察结果,进行判定并做好试验记录。

9.8 试验成立条件

当阴性对照不出现条带、阳性对照出现约 666 bp 特异性扩增条带(见附录 B 中的 B.1),试验成立;否则,试验不成立。

9.9 结果判定

在试验成立的前提下,如果被检样品的 PCR 产物电泳后在 666 bp 位置上出现特异性扩增条带,判为猪附红细胞体核酸阳性;若条带极弱,应复检 1 次,再次出现 666 bp 大小条带判定为猪附红细胞体核酸阳性;否则,判为阴性。

10 实时荧光 PCR 检测方法

10.1 试剂

10.1.1 阳性对照、阴性对照、无核酸酶水,配制方法按照附录 A 的规定执行。

10.1.2 商品化 DNA 提取试剂盒。

10.2 仪器设备

10.2.1 核酸提取仪。

10.2.2 实时荧光 PCR 仪。

10.2.3 台式低温高速离心机(最大转速 12 000 g 以上)。

10.2.4 微量可调移液器(0.1 μL ~0.25 μL 、0.5 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL 等不同规格)。

10.3 引物和探针

上游引物 *E. suis*-P3:5'-ACTGTCCCTACATA CTGGTTCTTG-3';

下游引物 *E. suis*-P4:5'-AGGAGAGGGTCACCCAGATC-3';

TaqMan 探针 *E. suis*-Probe1:5'-FAM-AGCCTCACTGCGTCCAAGTTCA-BHQ1-3'。

10.4 核酸提取

同 9.5。

10.5 实时荧光 PCR 扩增

10.5.1 配制实时荧光 PCR 反应体系

PCR 体系配制见表 2。体系配好后盖紧 PCR 反应管,并做好标记。

表 2 实时荧光 PCR 体系配制表

试剂成分	加入体积
10 $\times$ PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})	2.5 μL
2.5 mmol/L dNTPs	2 μL
Ex <i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.25 μL
<i>E. suis</i> -P3(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
<i>E. suis</i> -P4(20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
<i>E. suis</i> -Probe1(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0 μL
无核酸酶水	15.25 μL
总体积	22 μL

10.5.2 实时荧光 PCR 反应

10.5.2.1 将 22 μL PCR 反应混合液加入到荧光 PCR 管,将 3 μL cDNA 模板加入到荧光 PCR 管,并设阳性对照、阴性对照及空白对照。

10.5.2.2 加入模板后,密封反应管,充分混匀,瞬时离心。

10.5.2.3 将荧光 PCR 管放入荧光 PCR 仪中,按如下条件运行扩增程序:95 ℃ 预变性 2 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 40 s,共 40 个循环,在每个循环的延伸结束时进行 FAM 荧光信号收集。

10.6 试验成立条件

阳性对照的 C_t 值应 <30 且出现特异性扩增曲线(见 B.2),阴性对照应无 C_t 值或 C_t 值 ≥ 40 且无特异性扩增曲线,试验成立;否则,试验不成立。

10.7 结果判定

10.7.1 在试验成立的前提下,被检样品 C_t 值 ≤ 30 且出现特异性扩增曲线,判为猪附红细胞体核酸阳性。

10.7.2 当无 C_t 值或 C_t 值 >32 且无特异性扩增曲线,判为猪附红细胞体核酸阴性。

10.7.3 当 $30 < C_t$ 值 ≤ 32 且出现特异性扩增曲线,判为疑似。疑似样品应复检 1 次,若 C_t 值 ≤ 30 且出现特异性扩增曲线即判为猪附红细胞体核酸阳性;否则判为猪附红细胞体核酸阴性。

11 荧光 RAA 检测方法

11.1 试剂

11.1.1 RAA 反应预混液。

11.1.2 280 mmol/L 乙酸镁。

11.1.2 除不需要 TAE 核酸电泳缓冲液、6 $\times$ 上样缓冲液、DNA 分子量标准外,其他试剂同 9.1。

11.2 仪器设备

11.2.1 恒温荧光基因检测仪或荧光定量 PCR 仪。

11.2.2 台式低温高速离心机(最大转速 12 000 g 以上)。

11.2.3 微量可调移液器(0.1 μ L $\sim$ 0.25 μ L;0.5 μ L $\sim$ 10 μ L;2 μ L $\sim$ 20 μ L;20 μ L $\sim$ 200 μ L;100 μ L $\sim$ 1 000 μ L等不同规格)。

11.3 引物和探针

上游引物 *E. suis*-P5:5'-TCTGGCGGACTCCAGATCTGGGTGACCCTC-3';

下游引物 *E. suis*-P6:5'-TGCAAGGCCTGAGTGAATATCCGCTGATGC-3';

探针 *E. suis*-Probe2:CTGAGCCCCTGCCTCTCAGAACCCGCCTCC[FAM-dT][THF]G[BHQ1-dT]CCATCTGAAATTGCC。

11.4 核酸提取

同 9.5。

11.5 核酸扩增

11.5.1 配制荧光 RAA 反应体系

每个样品配制 44.5 μ L 荧光 RAA 反应混合液,体系配制见表 3。

表 3 荧光 RAA 反应体系配制表

试剂成分	加入体积
RAA 反应预混液	29.6 μ L
<i>E. suis</i> -P5(20 μ mol/L)	2 μ L
<i>E. suis</i> -P6(20 μ mol/L)	2 μ L
<i>E. suis</i> -Probe2(10 μ mol/L)	1 μ L
无核酸酶水	9.9 μ L
总体积	44.5 μ L

11.4.3 荧光 RAA 反应

11.4.3.1 将 44.5 μL 荧光 RAA 反应混合液加入到荧光 RAA 反应管中,将 3 μL DNA 模板加入到反应管中,将 2.5 μL 乙酸镁加在反应单元管盖上,混合均匀。每次进行荧光 RAA 扩增时均应设立阳性对照、阴性对照及空白对照。

11.4.3.2 加入模板后,密封反应管,充分混匀,瞬时离心。

11.4.3.3 将所有反应管放入荧光恒温检测仪中,按如下条件运行扩增程序:39 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 1 个循环;39 $^{\circ}\text{C}$ 30s,共 40 个循环,在每个循环的延伸结束时进行荧光信号收集。

11.5 试验成立条件

阳性对照起峰时间 ≤ 10 min(C_t 值 ≤ 30)且出现特异性起峰曲线(见 B.3),阴性对照无起峰时间或阴性对照起峰时间 > 15 min(C_t 值 > 40)且无特异性起峰曲线,试验成立;否则应重新进行试验。

11.6 荧光 RAA 结果判定

在试验成立的前提下,被检样品起峰时间 ≤ 12 min(C_t 值 ≤ 36)且出现特异性起峰曲线,则判为猪附红细胞体核酸阳性;被检样品无起峰时间或被检样品起峰时间 > 12 min(C_t 值 > 36)且无特异性起峰曲线,则判定为猪附红细胞体核酸阴性。

12 间接 ELISA 抗体检测方法

12.1 试剂

12.1.1 包被抗原:大肠杆菌系统重组表达的猪附红细胞体 p40 蛋白,制备及鉴定方法见附录 C。

12.1.2 酶标抗体:辣根过氧化物酶标记的羊抗猪二抗。

12.1.3 对照:猪附红细胞体抗体阳性对照(阳性血清)、阴性对照(阴性血清),制备方法见附录 D。

12.1.4 PBS、包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、酶结合物稀释液、终止液,配制方法按照附录 E 的规定执行。

12.1.5 底物溶液:商品化即用型 TMB 底物溶液。

12.2 仪器设备

12.2.1 酶标仪。

12.2.2 恒温箱。

12.2.3 洗板机或洗涤瓶。

12.2.4 96 孔酶标板。

12.2.5 U 形 96 孔稀释板。

12.2.6 微量可调移液器(2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

12.3 试验程序

12.3.1 抗原包被

用包被缓冲液将猪附红细胞体重组 p40 蛋白稀释至终浓度 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,加入 96 孔酶标板进行抗原包被,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 1 次后拍干,300 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入封闭缓冲液,37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 1 次后拍干。

12.3.2 操作步骤

12.3.2.1 待检血清与阴性对照、阳性对照血清使用样品稀释液做 50 倍稀释。

12.3.2.2 酶标板上对照和待检样品的分布图,见表 4。50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,在 A1、B1 加入稀释后的阳性对照血清,在 C1、D1 加入稀释后的阴性对照血清,从 E1、F1 开始按顺序在其余孔加入稀释后的待检血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。

12.3.2.3 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤液清洗 4 次,1 $\times$ 洗涤液 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。

12.3.2.4 每孔加入 1 $\times$ 酶标抗体,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

12.3.2.5 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤缓冲液清洗 4 次,1 $\times$ 洗涤液 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。

- 12.3.2.6 每孔加入底物溶液,50 μL/孔,室温避光作用 10 min。
- 12.3.2.7 每孔加入 50 μL 终止液,终止反应。
- 12.3.2.8 用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔 OD 值。

表 4 样品加样记录表(推荐模式)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	S5										
B	P	S6										
C	N	S7										
D	N	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										
注:P 为阳性对照孔;N 为阴性对照孔;S1、S2、S3、S4 等为待检样品孔,其余类推。												

12.4 试验成立条件

阳性对照 OD_{450nm} 值>0.800,且阴性对照 OD_{450nm} 值<0.100,试验成立;否则,应重新进行试验。

12.5 结果判定

在试验成立的前提下,S/N 值的计算:S/N=待测样品 OD_{450nm} 值/阴性对照 OD_{450nm} 值。如果 S/N 值≥2.1,应判定为猪附红细胞体抗体阳性;如果 S/N 值<2.1,应判定为猪附红细胞体抗体阴性。

13 阻断 ELISA 抗体检测方法

13.1 试剂

- 13.1.1 包被抗原:重组表达的猪附红细胞体 p40 蛋白,制备及鉴定方法见附录 C。
- 13.1.2 酶标抗体:辣根过氧化物酶标记的 p40 蛋白单抗,制备方法见附录 F。
- 13.1.3 对照:猪附红细胞体阳性对照(阳性血清)、阴性对照(阴性血清),制备方法见附录 D。
- 13.1.4 包被液:PBS、包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、酶结合物稀释液、终止液,配制方法按照附录 E 的规定执行。
- 13.1.5 底物溶液:商品化即用型 TMB 底物溶液。

13.2 仪器设备

见 12.2。

13.3 试验程序

13.3.1 包被

用包被缓冲液将猪附红细胞体重组 p40 蛋白稀释至终浓度 0.25 μg/mL,每孔 100 μL 包被,37℃饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 1 次后拍干,300 μL/孔加入封闭缓冲液,37℃饱和湿度下吸附 2 h,用洗涤缓冲液洗板 1 次后拍干。

13.3.2 操作步骤

- 13.3.2.1 待检血清与阴性对照、阳性对照使用样品稀释液做 2 倍稀释。
- 13.3.2.2 酶标板上对照和待检样品的分布图,见表 5。50 μL/孔,在 A1、B1 加入稀释后的阳性对照血清,在 C1、D1 加入稀释后的阴性对照血清,从 E1、F1 开始按顺序在其余孔加入稀释后的待检血清,37℃孵育 60 min。
- 13.3.2.3 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤液清洗 4 次,1×洗涤液 300 μL/孔。
- 13.3.2.4 每孔加入 1×酶标抗体,50 μL/孔,37℃孵育 30 min。
- 13.3.2.5 弃去反应孔中的液体,每孔用洗涤缓冲液清洗 4 次,1×洗涤液 300 μL/孔。

13.3.2.6 每孔加入底物溶液,50 μL /孔,室温避光作用 10 min。

13.3.2.7 每孔加入 50 μL 终止液,终止反应。

13.3.2.8 用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔 OD 值。

表 5 样品加样记录表(推荐模式)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	S5										
B	P	S6										
C	N	S7										
D	N	S8										
E	S1	S9										
F	S2	S10										
G	S3	S11										
H	S4	S12										
注:P 为阳性对照孔;N 为阴性对照孔;S1、S2、S3、S4 等为待检样品孔,其余类推。												

13.4 试验成立条件

阳性对照 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值 >1.000 ,且阴性对照 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值 <0.200 ,试验成立;否则,应重新进行试验。

13.5 结果判定

在试验成立的前提下, S/N 值的计算: $S/N = (\text{阴性对照 } \text{OD}_{450\text{nm}} \text{ 值} - \text{待测样品 } \text{OD}_{450\text{nm}} \text{ 值}) / (\text{阴性对照 } \text{OD}_{450\text{nm}} \text{ 值} - \text{阳性对照 } \text{OD}_{450\text{nm}} \text{ 值})$ 。如果 S/N 值 ≥ 0.4 ,应判定为猪附红细胞抗体阳性;如果 S/N 值 < 0.4 ,应判定为猪附红细胞抗体阴性。

14 综合判定

14.1 疑似

符合 6.4 和/或 8.2,可判为疑似猪附红细胞体感染。

14.2 确诊

符合 14.1,且经 PCR 检测方法(第 9 章)、实时荧光检测 PCR 方法(第 10 章)、荧光 RAA 检测方法(第 11 章)任一项判为核酸阳性的,或经间接 ELISA 抗体检测方法(第 12 章)或阻断 ELISA 抗体检测方法(第 13 章)任一项检出抗体阳性的,可确诊为猪附红细胞体感染。

附 录 A

(规范性)

PCR 反应溶液的配制

A.1 TE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol/L EDTA(pH 8.0), 充分混匀。

A.2 阳性对照

猪附红细胞体功能性结构蛋白编码基因 ORF2 的 pGEM-T easy 重组质粒(1.0×10^5 拷贝/ μL)。

ORF2 目的片段基因序列为: 5'-ATGGAGCATACCTGGGCCTGGAGAGCACCAGGTTGGTCTT TACAAAAGGGGGCACCAGAAAGGCGAGGTTCTGCAAACCTGTGTACCCTTTTCACAATCTCCA CTGCTAGCTAGCTGTCCACTTTCCAGACAACCCCCCCCCAAAAACACAAACACCCCCCCCCCCC CCCAcAAGCACACAAACACACACACACACACCTTTCCTGGTAAACAGGAAGTGTGAGTAG GACCTAAAAAATGAAGCACCAGTTTGCCCTGAGAACTGTCCCTACATACTGGTTCTTGCCCAG CCTCACTGCGTCCAAGTTCCAGATCTGGCGGACTCCAGATCTGGGTGACCCTCTCCTGAGCCCC TGCTCTCAGAACCCGCCTCCTGGTCCATCTGAAATTGCCACTGCAGTAGCTCAAACTGAGG TCCTAAAGCCGAGCATCAGCGGATATTCACCTCAGGCCTTGACAGGGTGATGGAGGACGACTG TCCTCCGGCAGCCTCATCTCCTCGCAGCGCCATCCAGCGGTGAGACAGCAAGGGCACCCTGGGC AGAGATTGCTGGCCAGGCACCCCTGAAACCTGGTGGGAGGATTCCAAGCCTGAAGCCGTCCC TTCTCCATCCACCCACCCCTAAAATTAGGACACATCTATCTCCTGCACCTTCCCAC-3'。

A.3 阴性对照

pGEM-T easy 空质粒(1.0×10^5 拷贝/ μL)。

A.4 无核酸酶水

量取 1 mL 的 DEPC, 加入去离子水定容至 1 000 mL, 充分混匀, 将瓶盖拧松后置于 37℃ 放置过夜, 高压灭菌。

A.5 1×TAE 核酸电泳缓冲液

称取 24.2 g Tris 碱, 加入 5.71 mL 的冰乙酸和 10 mL 的 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0), 加蒸馏水定容至 100 mL, 使用时用蒸馏水作 50 倍稀释, 即为 1×TAE 核酸电泳缓冲液。

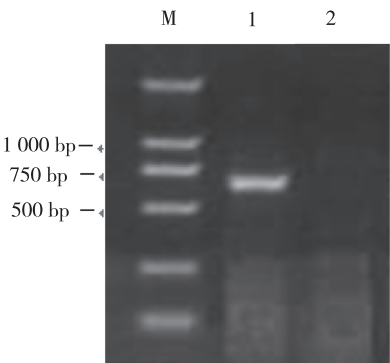
A.6 1.2% 的琼脂糖凝胶

称取 0.6 g 琼脂糖, 置于 200 mL 锥形瓶中, 加入 50 mL 1×TAE 缓冲液, 加热溶解, 冷却至 50℃~60℃ 时加入 2.5 μL 溴化乙锭溶液, 混匀后倒入胶槽内自然凝固。

附 录 B
(资料性)

猪附红细胞体 PCR 扩增产物电泳图、荧光 PCR 及荧光 RAA 扩增曲线图

B.1 猪附红细胞体 PCR 扩增产物电泳图见图 B.1。



标引序号说明：
M—— DL2000 DNA Marker；
1——猪附红细胞体阳性对照；
2——阴性对照。

图 B.1 猪附红细胞体 PCR 扩增产物电泳图

B.2 猪附红细胞体荧光 PCR 扩增曲线见图 B.2。

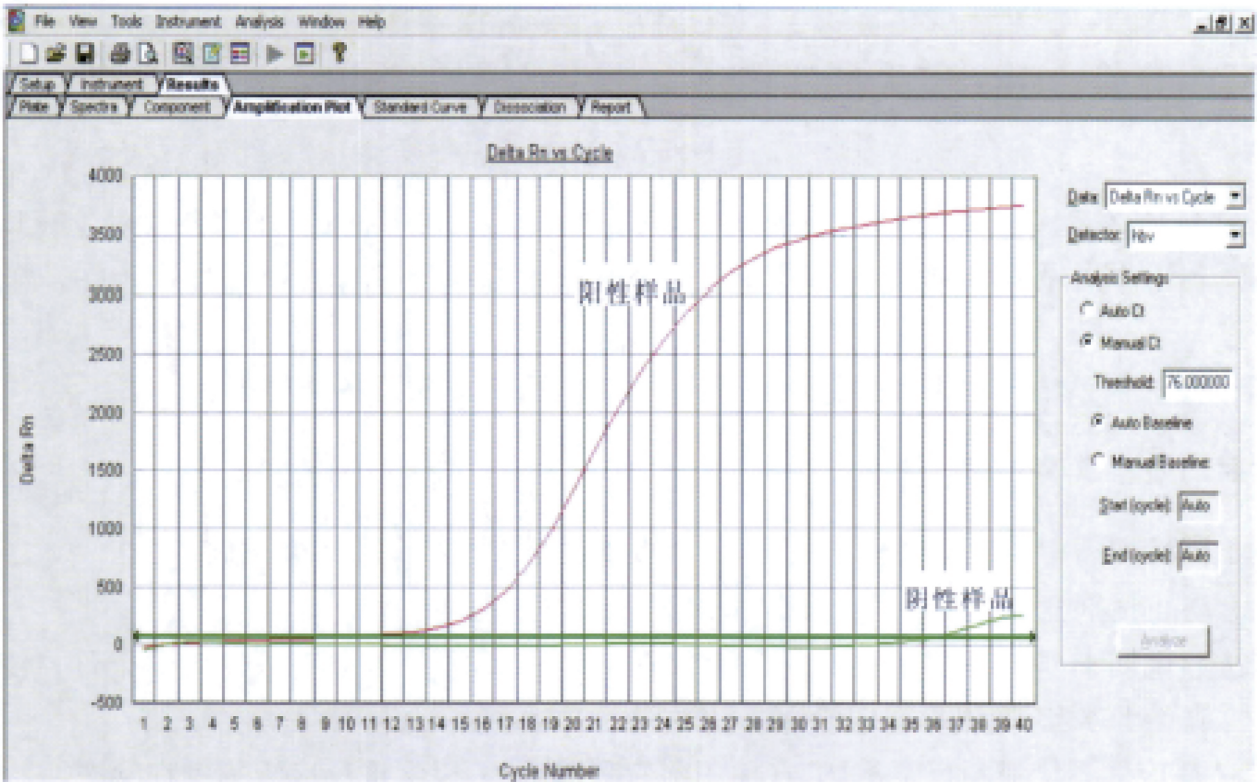


图 B.2 猪附红细胞体荧光 PCR 扩增曲线

B.3 猪附红细胞体荧光 RAA 扩增曲线见图 B.3。

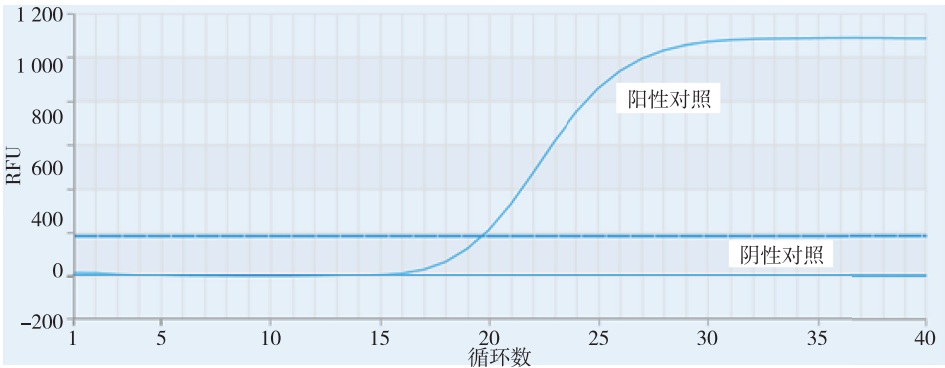


图 B. 3 猪附红细胞体荧光 RAA 扩增曲线

附 录 C

(资料性)

重组表达猪附红细胞体 p40 蛋白的制备及鉴定

C.1 重组菌株的诱导表达与纯化

将切除信号肽的猪附红细胞体 p40 基因插入 pET-32a 原核表达载体并转化入大肠杆菌,构建 *E. coli*-pET-32a-p40 重组表达菌。将 *E. coli*-pET-32a-p40 接种于含有 Amp+(100 μ g/mL) LB 固体培养基中,置于 37℃ 培养过夜,挑取单菌落接种于含 Amp+(100 μ g/mL) LB 液体培养基,置于 37℃、220 r/min 摇床振荡培养至 OD_{600nm} 在 0.5~0.6,取 1 mL *E. coli*-pET-32a-p40 菌液作为诱导前对照,随后再加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,置于 37℃ 220 r/min 的摇床中振荡培养 8 h。取 1 mL 诱导表达好的菌液至离心管内,8 000 g 离心 3 min,去掉上清,用 PBS 洗涤一次后加入 30 μ L PBS 重悬细菌,再加 10 μ L 4×SDS 蛋白上样缓冲液,混匀后煮沸 10 min,4℃ 条件下以 10 000 g 离心 1 min,取 5 μ L 进行 10% 的 SDS-PAGE 电泳,确定在分子量 46 kDa 大小处表达出目的蛋白(r-p40),用 Western blot 方法分析 r-p40 蛋白的抗原性。收集剩下的菌液表达并纯化 r-p40 蛋白,纯化后的 r-p40 蛋白经浓度测定,每毫升蛋白量应不低于 0.05 mg。

C.2 重组表达猪附红细胞体 p40 蛋白的反应性及特异性鉴定

将纯化的 r-p40 蛋白用包被缓冲液稀释成 0.5 μ g/mL 包被 ELISA 板,用间接 ELISA 方法测定,与猪附红细胞体抗体阳性血清的 S/N 值应 $\geq$ 2.1;而与非洲猪瘟病毒(ASFV)抗体阳性血清、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)抗体阳性血清、猪瘟病毒(CSFV)抗体阳性血清、猪伪狂犬病毒(PRV)抗体阳性血清、猪流行性腹泻病毒(PEDV)抗体阳性血清、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)抗体阳性血清、猪 δ 冠状病毒(PDCoV)抗体阳性血清及 pET-32a 空载体大肠杆菌 BL21plysS(空载体蛋白)抗体阳性血清的 S/N 值均应 $<$ 2.1。

附录 D

(资料性)

猪附红细胞体阳性对照(阳性血清)、阴性对照(阴性血清)的制备及鉴定

D.1 猪附红细胞体抗原的制备

无菌采集感染猪附红细胞体猪的前腔静脉抗凝血,采用淋巴细胞分离液经 3 000 *g* 离心 20 min 分离出抗凝血中的白细胞、血小板及细胞碎片等组分,然后收集红细胞泥;用 PBS 悬浮,置于 0.15%吐温-20 及 3%EDTA 的 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液中,50 ℃水浴中热致敏 30 min,1 600 *g* 离心 10 min 收集上清液。经 1.2 μ m 滤器过滤后,滤液 12 000 *g* 离心 1 h,沉淀即为猪附红细胞体,沉淀经 PBS 反复离心洗涤 3 次后去除残余宿主血浆蛋白,加 1 mL PBS 重悬沉淀,超声波裂解 10 min,经 2 000 *g* 离心 10 min,取上清液即为猪附红细胞体抗原,−20 ℃保存。

D.2 猪附红细胞体抗体阳性对照(阳性血清)制备

用猪附红细胞体免疫小型猪(首免加入弗氏完全佐剂,二免加入弗氏不完全佐剂),最后一次免疫 2 周后心脏采血分离血清;用纯化 r-p40 蛋白包被 ELISA 板检测抗体效价,以测定孔 OD 值(S)/阴性对照孔 OD 值(N) ≥ 2.1 判为阳性, $S/N < 1.5$ 判为阴性。测定猪血清抗体效价 $\geq 1:16\,000$ 时,大量采集全血分离血清,56 ℃ 30 min 水浴补体灭活后分装于 2 mL 冻存管中,每管 1 mL,−70 ℃ 冰箱保存,作为猪附红细胞体抗体阳性对照(阳性血清)。

D.3 猪附红细胞体抗体阴性对照(阴性血清)制备

选择猪附红细胞体抗体阴性小型猪(用纯化 r-p40 蛋白包被 ELISA 板检测抗体为阴性)采集全血,分离血清,灭活后作为猪附红细胞体抗体阴性对照(阴性血清)。

附 录 E
(规范性)
ELISA 反应溶液的配制

E.1 包被液(含 0.05 mol/L CBS,pH 9.6)

称取 1.59 g 碳酸钠(Na_2CO_3 ,分析纯)、2.93 g 碳酸氢钠(NaHCO_3 ,分析纯),加纯化水定容至 1 000 mL。

E.2 洗涤液(含 0.01 mol/L PBS,0.05% 吐温-20,pH 7.4)

称取 0.2 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4 ,分析纯)、2.89 g 十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,分析纯)、8.0 g 氯化钠(NaCl ,分析纯)、0.2 g 氯化钾(KCl ,分析纯),0.5 mL 加入吐温-20,加纯化水定容至 1 000 mL。

E.3 封闭液

称取 1 g 牛血清白蛋白(BSA)、5 g 蔗糖,再加洗涤液定容至 100 mL。

E.4 样品稀释液

称取 1 g 酪蛋白(Casein)、5 g 氯化钠(NaCl ,分析纯),再加洗涤液定容至 100 mL。

E.5 酶结合物稀释液

称取 1 g 牛血清白蛋白(BSA),加入 400 μL Proclin 300,再加洗涤液定容至 100 mL。

E.6 终止液的配制

量取 442 mL 蒸馏水,量取 58 mL 硫酸(H_2SO_4 ,分析纯)缓慢加入蒸馏水中。

E.7 pH 7.2 0.01 mol/L PBS 的配制

称取 0.2 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4 ,分析纯)、2.89 g 十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,分析纯)、8.0 g 氯化钠(NaCl ,分析纯)、0.2 g 氯化钾(KCl ,分析纯),加纯化水定容至 1 000 mL,用氢氧化钠或盐酸调 pH 至 7.2。

附录 F

(资料性)

猪附红细胞体 p40 单克隆抗体的制备

F.1 免疫小鼠

将猪附红细胞体抗原与弗氏佐剂混合乳化,皮下多点注射免疫 Balb/c 小鼠 3 次,用间接 ELISA 方法测定免疫小鼠的血清抗体效价,以 $S/N \geq 2.1$ 时抗体的最大稀释度作为抗体效价。选取效价大于 1 : 100 000 的小鼠于细胞融合前 3 d 加强免疫 1 次。

F.2 细胞融合

选择状态良好且呈对数生长的 sp2/0 细胞 6 瓶~8 瓶,将细胞从瓶壁上轻轻吹打下来并转移到 50 mL 离心管中,以 1 000 g 离心 5 min。弃上清,用 5 mL 无血清 DMEM 培养液悬浮,用细胞计数板计数;脾细胞与骨髓瘤细胞 sp2/0 按细胞数量 1 : 5 混合均匀,1 000 g 离心 10 min,倒掉上清,轻弹管底使其疏松;在一个干净的烧杯中加入 37 ℃ 蒸馏水,将含有混合细胞的离心管置于水浴中,1 min 内逐滴加入 1 mL 37 ℃ 预热的聚乙二醇 PEG2 000,边滴加边旋转离心管,加完后温浴 90 s;在 1 min 内逐滴加入 1 mL 37 ℃ 预热的不完全 DMEM 培养液;在 1 min 内逐滴加入 2 mL 37 ℃ 预热的不完全 DMEM 培养液;在 1 min 内逐滴加入 4 mL 37 ℃ 预热的不完全 DMEM 培养液;再用 37 ℃ 预热的不完全 DMEM 培养液补加至 20 mL,1 000 g 离心 5 min,倒掉上清;将细胞沉淀重悬于 60 mL 20% 胎牛血清的 HAT 选择培养液中,以 100 μ L/孔加入含有饲养细胞的 96 孔细胞培养板中,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。

F.3 杂交瘤细胞的筛选

融合后第 5 d 用 HAT 培养液进行第一次半量换液,第 9 d 进行全换液,待细胞长到孔底的 1/4~1/3 时吸出 80 μ L 上清分别加至 r-p40 包被板进行 ELISA 检测,以 $S/N \geq 2.1$ 作为阳性判断标准,以免阳性血清作阳性对照,正常小鼠血清作阴性对照,对分泌上清检测为 r-p40 抗体阳性的细胞株进行克隆化培养。

F.4 杂交瘤细胞的克隆化

采用有限稀释法对检测阳性的杂交瘤细胞及时进行克隆化培养。制备饲养细胞,HT 培养液中制备饲养细胞层 100 μ L/孔;轻轻吹打混匀阳性杂交瘤细胞,细胞计数后调整细胞数至 10 个/mL;将杂交瘤细胞悬液 100 μ L/孔接种于含饲养细胞的 96 孔细胞培养板中,37 ℃、5% CO_2 培养箱中进行培养;每日观察并记录每孔细胞克隆数,待细胞长到孔底的 1/4~1/3 时,对细胞上清用单抗筛选用间接 ELISA 方法进行检测;选择克隆数少、 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值高的双阳性孔,将其再次克隆。经 3 次~4 次克隆化操作,直至所有克隆化细胞孔检测阳性率达 100% 时,即可确定获得分泌特异性单抗的杂交瘤细胞株。将克隆化的单克隆抗体杂交瘤细胞株扩大培养,分装冻存。

F.5 抗体纯化标记

采用体内诱生腹水法制备单克隆抗体,12 周龄~16 周龄健康 Balb/c 小鼠,每只小鼠腹腔注射弗氏不完全佐剂 0.5 mL,7 d~10 d 后每只小鼠腹腔接种 1×10^6 个~ 5×10^6 个杂交瘤细胞,经 7 d~10 d 后可见小鼠腹部明显膨大,无菌操作采集腹水。腹水以 8 000 g 离心 10 min,弃去上层脂肪层,收集中层腹水,采用免疫层析柱对抗体进行纯化,进行辣根过氧化物酶标记,通过间接 ELISA 测定效价后并分装保存于 -20 ℃。