

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4137—2022

猪细小病毒病诊断技术

Diagnostic techniques for porcine parvovirus infection

2022-07-11 发布

2022-10-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

目 次

前言 III

引言 IV

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 流行病学和临床诊断 1

 5.1 总则 1

 5.2 流行病学 1

 5.3 临床症状 1

 5.4 病理变化 2

 5.5 流行病学和临床诊断结果判定 2

6 样品采集及处理 2

 6.1 仪器 2

 6.2 耗材 2

 6.3 试剂 2

 6.4 样品采集处理 2

7 病毒分离 2

 7.1 仪器 2

 7.2 耗材 2

 7.3 试剂 3

 7.4 样品处理 3

 7.5 病毒分离鉴定 3

8 聚合酶链式反应(PCR) 3

 8.1 试验材料及设备 3

 8.2 操作方法 3

 8.3 质控标准 5

 8.4 结果判定 5

9 血凝和血凝抑制试验(HA-HI) 5

 9.1 仪器 5

 9.2 耗材 5

 9.3 试剂 5

 9.4 HA 操作方法 5

 9.5 HI 操作方法 6

 9.6 质控标准 7

 9.7 结果判定 7

10 间接 ELISA 检测 7

 10.1 仪器 7

 10.2 耗材 7

 10.3 试剂 7

10.4	操作方法	7
10.5	质控标准	8
10.6	结果计算和判定	8
11	综合判断	8
附录 A(资料性)	猪细小病毒感染流产、死胎特征图	9
附录 B(资料性)	磷酸盐缓冲液配制	10
附录 C(资料性)	猪细小病毒分离鉴定	11
附录 D(资料性)	PCR 检测引物及溶液配制	12
附录 E(资料性)	血凝与血凝抑制试验(HA-HI)	13

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。

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：青岛农业大学、中国动物卫生与流行病学中心、青岛市畜牧兽医研究所、青岛市动物疫病预防控制中心、内蒙古农业大学。

本文件主要起草人：杨瑞梅、单虎、张洪亮、李军伟、吴发兴、魏战勇、赵永刚、秦志华、张瑞华、张传美、温永俊、杨洋、刘丽蓉、杨培培、刘迎春、段笑笑。

引 言

猪细小病毒病(Porcine Parvovirus Infection)由猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV)引起的母猪繁殖障碍性传染病,主要表现为受感染的母猪,特别是初产母猪及血清学阴性经产母猪发生流产,产死胎、畸形胎、木乃伊胎、弱仔及屡配不孕等,而母体通常无其他临床症状,其他年龄的猪感染后一般不表现明显的临床症状。

该病的传染源主要为病猪和带毒猪。感染猪可通过粪、尿、精液等途径排毒,通过消化道和呼吸道传播给易感猪,也可经交配感染。妊娠母猪可以经胎盘传播给胎儿,导致胎儿发病、死亡。

PPV 在分类上属于细小病毒科(*Parvoviridae*)细小病毒属,仅有 1 种血清型。迄今已经发现 7 种不同的细小病毒群能够感染猪,包括经典的猪细小病毒 1 型即 PPV1 和猪的新型细小病毒 PPV2~PPV7 型。PPV1 感染猪主要出现流产,产死胎、木乃伊胎以及不孕等临床症状。而 PPV2~PPV7 感染猪后是否致病尚不清楚,且在我国流行率低。PPV2~PPV7 的临床意义和基本流行病学,包括传播途径、致病机制、临床症状和病理变化等尚未明确。因此,本文件中的诊断技术仅是针对 PPV1 型。

适于分离猪细小病毒的样品是妊娠 70 d 前流产的木乃伊胎儿和可疑感染的公猪精液。对组织样品进行病毒分离,可以作出阳性诊断。也可通过聚合酶链反应(PCR)进行病毒核酸检测。若未接种疫苗的动物体内检出特异性抗体,即可作出阳性诊断,这种方法对症状不典型病例和未采到妊娠 70 d 前流产胎儿的病例十分有用。

猪细小病毒病诊断技术

1 范围

本文件规定了猪细小病毒病的流行病学和临床诊断、病理变化、病毒分离、聚合酶链式反应、血凝-血凝抑制试验、间接 ELISA 抗体检测试验的技术要求。本文件是针对细小病毒科细小病毒属猪细小病毒 1 型,即为临床引起繁殖障碍的猪细小病毒病的诊断。

本文件适用于猪细小病毒病的诊断和流行病学调查等。

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/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

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:

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

HA:血凝试验(Hemagglutination Test)

HAU:血凝单位(Hemagglutination Unit)

HI:血凝抑制试验(Hemagglutination Inhibition Test)

OD 值:光密度值(Optical Density)

PBS:磷酸盐缓冲溶液(Phosphate Buffer Saline)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

PPV:猪细小病毒(Porcine Parvovirus)

pH:氢离子浓度(Hydrogenion Concentration)

5 流行病学和临床诊断

5.1 总则

根据该病的流行病学、临床症状和病理变化,可以作出初步诊断,但确诊需要通过实验室诊断。

5.2 流行病学

5.2.1 猪是唯一的已知宿主;病猪和带毒猪是主要的传染源。

5.2.2 PPV 可水平传播和垂直传播,经口鼻、交配、胎盘感染是最主要的传播途径;感染母猪所产的木乃伊胎、死胎和活仔猪中一般病毒含量很高。

5.2.3 该病呈现明显的胎次差异,主要见于初产母猪。

5.3 临床症状

5.3.1 临床症状表现为母猪的繁殖障碍,产死胎、弱胎、木乃伊胎(见附录 A),母猪除繁殖障碍外无其他明显的症状。

5.3.2 母猪还表现多次发情不受孕。公猪性欲和受精率无明显影响。

5.4 病理变化

5.4.1 母猪流产时,肉眼可见轻度子宫内膜炎和胎盘部分钙化,胎儿在子宫内有被溶解和吸收的现象。

5.4.2 大多数死胎、死仔或弱仔皮下充血或水肿,胸腹腔积有淡红色或淡黄色渗出液,有的肝、脾、肾肿大质脆或萎缩发暗。

5.5 流行病学和临床诊断结果判定

易感动物出现上述流行病学、临床症状和病理变化,可初步判定为疑似 PPV 感染病例。

6 样品采集及处理

6.1 仪器

6.1.1 高压蒸汽灭菌锅。

6.1.2 组织匀浆机或研磨皿。

6.1.3 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

6.1.4 高速冷冻离心机。

6.1.5 天平。

6.1.6 微量移液器($200\text{ }\mu\text{L}\sim 1\,000\text{ }\mu\text{L}$)。

6.1.7 生物安全柜。

6.2 耗材

6.2.1 5 mL 灭菌离心管。

6.2.2 灭菌剪刀。

6.2.3 灭菌镊子。

6.2.4 棉拭子。

6.3 试剂

6.3.1 除特别说明以外,本文件所用试剂均为分析纯,试验用水符合 GB/T 6682 的规定。

6.3.2 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L , pH 7.2)(见附录 B)。

6.4 样品采集处理

6.4.1 除特别说明以外,本文件样品采集符合 NY/T 541 的规定。

6.4.2 采集样品包括流产胎儿、木乃伊胎的实质器官(如心、肝、脾、肺、肾)或流产母猪的阴道分泌物。

6.4.3 用无菌镊子和剪刀取流产胎儿、木乃伊胎的实质器官(如心、肝、脾、肺、肾),去掉表面的筋膜,剪碎,用研钵研碎,加入磷酸盐缓冲液,制成 $1:(5\sim 10)$ 的悬液,加入 1% 青霉素、链霉素溶液($10\,000\text{ IU/mL}$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜处理。冻融 3 次, $3\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min,取上清液 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

6.4.4 用无菌棉拭子轻轻旋转插入流产母猪阴道 $2\text{ cm}\sim 4\text{ cm}$ 刮取阴道内容物,阴道拭子放入离心管,用 2 mL 磷酸盐缓冲液浸润,反复挤压后, $3\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min,取上清液 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

6.4.5 采集后的样品处理均在生物安全柜中进行。

7 病毒分离

7.1 仪器

7.1.1 5% CO_2 培养箱。

7.1.2 生物安全柜。

7.1.3 微量移液器($200\text{ }\mu\text{L}\sim 1\,000\text{ }\mu\text{L}$ 、 $20\text{ }\mu\text{L}\sim 200\text{ }\mu\text{L}$)。

7.2 耗材

7.2.1 细胞培养瓶。

7.2.2 10 mL 吸管。

7.3 试剂

7.3.1 除特别说明以外,本文件所用试剂均为分析纯,试验用水符合 GB/T 6682 的规定。

7.3.2 胎牛血清。

7.3.3 PK-15 传代细胞或 ST 传代细胞。

7.3.4 DMEM 细胞培养液(见附录 C 中的 C.2)。

7.3.5 DMEM 细胞维持液(见 C.3)。

7.3.6 0.25%胰蛋白酶溶液(见 C.4)。

7.3.7 青、链霉素双抗溶液(含青霉素、链霉素各 10 000 IU/mL)。

7.4 样品处理

无菌采集初产母猪 70 日龄以内流产胎儿、木乃伊胎按照 6.4.3 样品处理液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌备用。

注:以上操作在生物安全柜中进行。

7.5 病毒分离鉴定

7.5.1 将 PK-15 细胞或 ST 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 细胞培养液 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 2 d~3 d 长满单层,经 0.25%胰蛋白酶消化传代。

7.5.2 接毒按照 5%~10%的细胞悬液体积比例将 7.4 中制备的滤液同步接种于含青霉素和链霉素终浓度为 100 IU/mL 的 PK-15 传代细胞或 ST 传代细胞悬液中(3×10^5 个/mL~ 4×10^6 个/mL),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

7.5.3 接毒培养后 24 h,更换成含 2%胎牛血清的 DMEM 维持液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养,并逐日观察细胞病变(CPE),主要的 CPE 为:细胞聚集,呈网状,细胞发生圆缩、溶解,出现弥漫性颗粒样变化,直至细胞破碎等。

7.5.4 如无 CPE,细胞培养 3 d~5 d 后长满单层为第一代毒,按常规细胞传代方法用胰酶消化并连续传代培养,至第 4 代仍无 CPE 判定为阴性。

7.5.5 若细胞聚集、萎缩、变窄,呈网状,待病变达到 80%左右收获病毒液,冻融 3 次后,无菌分装到 1.5 mL 管中,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。出现以上特异性 CPE 可初步判定为病毒分离阳性,但需要进一步用 PCR 或 HA-HI 试验鉴定是否为 PPV。

8 聚合酶链式反应(PCR)

8.1 试验材料及设备

8.1.1 试验仪器

PCR 热循环仪、电泳仪、紫外线凝胶成像仪、微量移液器(200 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、2 μL ~20 μL 、0.5 μL ~10 μL)、高速冷冻离心机(转速 $\geq 12\ 000$ r/min)。

8.1.2 主要试剂

1 $\times$ TAE 电泳缓冲液、2%琼脂糖凝胶、6 $\times$ 核酸电泳加样缓冲液(见附录 D 中的 D.2~D.4)。

8.1.3 结构蛋白 NS1 基因保守区引物

浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$,见 D.1。

8.1.4 PCR 试剂

Ex Taq DNA 聚合酶、1.25 mmol/L 的 dNTP、10 $\times$ PCR buffer(缓冲液)。商品化的 PCR 试剂盒可以用来进行 PCR 反应体系的制备。

8.2 操作方法

8.2.1 样品处理

8.2.1.1 阳性对照

经胰酶消化长成单层的 PK-15 细胞,同步接种 PPV,待细胞 70%病变后终止培养,−20 ℃和 37 ℃反复冻融 3 次以上,收集病毒液备用。

8.2.1.2 阴性对照

同时设不接毒的 PK-15 细胞作为阴性对照,与阳性对照同时终止培养,−20 ℃和 37 ℃反复冻融 3 次以上,收集细胞液备用。

8.2.1.3 病料样品或细胞培养物

病料处理按 6.4.3 和 6.4.4 进行。

PK-15 细胞培养物,反复冻融 3 次,收集培养液备用。

8.2.1.4 公猪精液

采集 2 mL 公猪精液,反复冻融 3 次备用。

8.2.2 病毒 DNA 的提取和纯化

8.2.2.1 病毒 DNA 的提取和纯化按 8.2.2.2 或 8.2.2.3 进行。

8.2.2.2 试剂盒提取取经 8.2.1 前处理的可疑病料样品按照商品化病毒 DNA 提取试剂盒提取病毒 DNA。

8.2.2.3 酚-氯仿抽提法提取 DNA 如下:

- 取经 8.2.1 前处理的样品各 400 μL 加入 1.5 mL 离心管中,加入 10 μL 的蛋白酶 K(20 mg/mL)50 ℃消化 2 h,12 000 r/min 离心 10 min;
- 将上清液转移到一新的离心管中,加入等体积的 Tris 饱和酚,充分振荡混匀,12 000 r/min 离心 5 min;
- 取上层水相转移入一新的离心管中,加入等体积的酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)混匀后,12 000 r/min 离心 5 min(重复此步骤一次);
- 取上层水相转移入一新的离心管中,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,在 −20 ℃放置 2 h 或室温放置 30 min 沉淀病毒 DNA;
- 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,用 70%乙醇洗涤沉淀,自然风干;
- 用 20 μL 含 RNaseA 的 TE 溶解沉淀,−20 ℃保存备用。

8.2.3 PCR 检测

8.2.3.1 PCR 反应体系

在超净工作台中按表 1 剂量要求在 0.2 mL PCR 管中依次加入 PCR 反应试剂。同时设不加模板空白对照、已知阳性对照及正常猪组织或者 PK15(或 ST)正常细胞处理上清作为模板的阴性对照,每管总体积 25 μL 体系,样品充分混匀后,瞬时离心 10 s 备用。

表 1 PCR 反应体系

试剂	用量, μL
灭菌水	18
DNTPs(2.5 mmol/L)	2
10×Ex Taq DNA 聚合酶缓冲液	2.5
Ex Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.5
正向引物(25 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
反向引物(25 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
模板 DNA(10 ng/ μL ~20 ng/ μL)	1
总量	25

8.2.3.2 扩增程序及反应条件

将 PCR 管置于 PCR 仪上按如下程序扩增:95 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。

8.2.3.3 PCR产物琼脂糖凝胶电泳检测

将5 μL 的6 $\times$ 核酸电泳加样缓冲液加入PCR产物中,混匀后取10 μL 加入使用1 $\times$ TAE缓冲液配制的2%琼脂糖凝胶中,电泳30 min~40 min。电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪中观察结果。

8.3 质控标准

阴性对照和空白对照未出现目的条带,阳性对照出现特异性的329 bp目的条带,满足以上两个条件,实验结果成立。

8.4 结果判定

8.4.1 待测样品电泳后在相应的329 bp位置上有条带者,可判为PPV阳性。必要时,可取PCR扩增产物进行测序验证,测序结果与已公开发表的PPV特异性片段序列(见附录D)进行比对,序列同源性在95%以上,可判定待测样品PPV核酸阳性。

8.4.2 待测样品电泳后无329 bp特异性条带的判为阴性。

8.4.3 若出现与扩增长度不同大小的条带为非特异性反应,需要重复实验,2次实验均为非特异条带可判定为阴性。

9 血凝和血凝抑制试验(HA-HI)

9.1 仪器

9.1.1 冷冻离心机。

9.1.2 8通道或12通道微量移液器(20 μL ~200 μL)。

9.2 耗材

9.2.1 与多通道移液器配套的取样量程范围为20 μL ~200 μL 的吸头。

9.2.2 底部角度为90°的V型96孔血凝板。

9.2.3 1.5 mL离心管。

9.2.4 一次性液体加样槽。

9.2.5 恒温水浴锅。

9.3 试剂

9.3.1 除特别说明以外,本文件所用试剂均为分析纯,试验用水符合GB/T 6682的规定。

9.3.2 0.6%豚鼠红细胞悬液(见附录E中的E.1)。

9.3.3 稀释液:用灭菌的0.01 mol/L pH 7.2磷酸盐缓冲液(PBS)。配方见附录B。

9.3.4 25%白陶土(见E.2)。

9.3.5 阳性对照:HA效价 $\geq 1:32$ 的病毒液。

9.3.6 阴性对照:正常猪组织样品处理上清。

9.3.7 病毒待检样品:6.4.3或6.4.4中样品收集上清或7.5.5中病毒分离细胞培养液。

9.3.8 PPV阳性血清:血凝抑制抗体效价 $\geq 1:256$ 。

9.4 HA操作方法

9.4.1 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2)1 L,即为HA-HI缓冲液。

9.4.2 在96孔V型血凝板上,从第1孔至第11孔,用移液器每孔加入磷酸盐缓冲液25 μL 。

9.4.3 用移液器吸取待检样品25 μL ,从第1排孔(纵列)起,依次做倍比稀释,至第11个倍数孔,弃去加液器内25 μL 液体(稀释倍数依次为2、4、8、16、32、...、2 048)。

9.4.4 1~11孔每孔加入25 μL 磷酸盐缓冲液;12孔为红细胞对照,加入磷酸盐缓冲液50 μL 。

9.4.5 每孔加入0.6%豚鼠红细胞悬液50 μL ,立即在微量板振荡器上轻微振荡摇匀1 min,室温(18 $^{\circ}\text{C}$ ~28 $^{\circ}\text{C}$)放置1 h后判定结果。

9.4.6 每次测定应设已知血凝效价的猪细小病毒阳性对照和阴性对照,方法同上,对照及待检样品每个样品重复 3 次试验确定最终结果。

9.4.7 血凝试验(HA)示例见表 2。

表 2 PPV 微量血凝试验操作(HA)

单位为微升

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀释倍数(log ₂)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	红细胞对照
PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0
抗原(倍比稀释)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	弃 25 0
PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50
0.6%红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
作用时间及温度	室温 1 h											
判定举例	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	—	—	—	—

9.4.8 结果判定

9.4.8.1 PPV 阳性对照血凝效价与已知效价相差小于 1 个滴度,阴性对照无凝集,试验方可成立。

9.4.8.2 红细胞凝集相的判定:

- a) 红细胞均匀地平铺于孔底者可判为“++++”;
- b) 基本上与 a)相同,但边缘有下滑皱缩者判为“+++”;
- c) 红细胞于孔底形成环状或小团、四周有小凝集块者为“++”;
- d) 红细胞于孔底形成团块但边缘不整齐或有少量小凝集者为“+”;
- e) 红细胞于孔底形成小团块、边缘整齐光滑、稀释液清亮者为“—”。

9.4.8.3 以“++”凝集的最高稀释度作为 HA 效价。

9.5 HI 操作方法

9.5.1 4 个血凝单位病毒液配制。以病毒 HA 效价为 1 : 256 为例,4 个血凝单位=256/4=64(即 1 : 64)。取磷酸盐缓冲液 9 mL,加病毒液 1 mL,即成 1 : 10 稀释度。将 1 : 10 稀释液混匀后吸取 1 mL 加入磷酸盐缓冲液 5.4 mL 中,使最终浓度为 1 : 64。

9.5.2 血清处理见 E.3。

9.5.3 在 96 孔 V 型微量血凝板上,用固定病毒稀释血清法,自第 1 孔至第 10 孔,用移液器每孔加入磷酸盐缓冲液 25 μ L,第 11 和第 12 孔分别为 4 单位 PPV 病毒培养液(即抗原对照)与加 PBS 的红细胞对照。

9.5.4 第 1 排孔(纵列)加入 25 μ L 9.5.2 中处理的血清,混合均匀,并依次进行倍比稀释,至第 10 排孔,最后第 10 排孔弃去 25 μ L 液体;在第 1 孔至第 11 孔中,每孔加入 25 μ L 4 个血凝单位的待测病毒液,第 12 孔加入 25 μ L PBS,将反应板在微量板振荡器上振荡混匀,封板以防止液体蒸发,置于 4 $^{\circ}$ C 18 h 或 25 $^{\circ}$ C 3 h 或 37 $^{\circ}$ C 2 h。

9.5.5 每孔加入 0.6%豚鼠红细胞悬液 50 μ L,将反应板在微量板振荡器上振荡混匀,置于室温(18 $^{\circ}$ C~28 $^{\circ}$ C)1 h,待 PPV 细胞病毒对照出现红细胞凝集时观察结果。

9.5.6 每次测定应设 PPV 抗原对照和红细胞对照,方法同 9.5.1~9.5.6,对照及待检样品每个样品重复至少 3 次后确定结果。

9.5.7 血凝抑制试验(HI)示例见表 3。

表 3 PPV 微量血凝抑制试验操作

单位为微升

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血清稀释倍数($\times$ 10)	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	抗原对照	红细胞对照

表 3 (续)

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
被检血清倍比稀释	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0	0
4 血凝单位抗原	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	PBS 25
作用时间及温度	置于 4 ℃ 18 h 或 25 ℃ 3 h 或 37 ℃ 2 h											
0.6% 红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
作用时间及温度	置于室温 1 h											
判定举例	—	—	—	—	—	+++	++++	++++	++++	++++	++++	—
注: 阳性血清及阴性血清对照稀释同被检血清。												

9.6 质控标准

当抗原对照孔(第 11 孔)完全凝集,红细胞对照孔不凝集,PPV 阳性血清血凝抑制效价与已知效价相差小于 1 个滴度,试验方可成立。

9.7 结果判定

9.7.1 以完全抑制 4 HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 抗体效价。

9.7.2 用于检测血清抗体时,被检血清的红细胞凝集抑制价在 1:40 以上者判为阳性。

9.7.3 用于检测抗原,抗原血凝活性可被 PPV 阳性血清特异性地抑制时,判为含有猪细小病毒。

10 间接 ELISA 检测

10.1 仪器

10.1.1 酶标检测仪。

10.1.2 洗板机。

10.1.3 振荡器。

10.1.4 冰箱。

10.1.5 恒温培养箱。

10.2 耗材

10.2.1 96 孔微量反应板。

10.2.2 8 道或 12 道移液器(50 μL ~300 μL)、单道移液器(0.5 μL ~10 μL 、20 μL ~200 μL 、200 μL ~1 000 μL)。

10.2.3 吸管、量筒等。

10.3 试剂

10.3.1 纯化的 PPV 抗原包被微孔板(或表达纯化的 PPV 结构蛋白 VP2 包被微孔板)。

10.3.2 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗抗体。

10.3.3 阳性对照血清和阴性对照血清。

10.3.4 样品稀释液。

10.3.5 洗板液。

10.3.6 四甲基联苯胺(TMB)底物溶液。

10.3.7 终止液。

10.3.8 试剂盒应于 2 ℃~7 ℃ 保存。使用前,需将试剂恢复至室温(18 ℃~28 ℃),并混合均匀。

10.4 操作方法

10.4.1 被检血清

按常规方法采血并分离血清,置于4℃冰箱中备用。如需长期保持,应置于-20℃冰箱中。

10.4.2 待检血清的稀释

被检血清按所选试剂盒要求稀释,在振荡器上充分混匀后备用。

10.4.3 对照的设置

将阳性对照血清和阴性对照血清按所选试剂盒要求稀释后,分别加至包被板的相应孔中,并做好记录。

10.4.4 加样

在包被板的其他相应孔中按所选试剂盒要求加入工作浓度的被检样品,并做好记录。

10.4.5 感作

将包被板在振荡器上充分混匀后,按所选试剂盒要求的温度和时间进行感作。

10.4.6 洗板

10.4.6.1 洗液的稀释

用蒸馏水将浓缩洗板液稀释成工作浓度,混匀备用。

10.4.6.2 洗板

弃掉包被板各孔的液体,每孔加入约300 μL工作浓度的洗板液,按所选试剂盒要求的次数清洗微孔。最后一次清洗后,将包被板在吸水纸上轻拍,以去掉孔内剩余的液体。

10.4.7 加酶标结合物

按所选试剂盒要求,每孔加入工作浓度的辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体。

10.4.8 感作

将包被板在振荡器上充分混匀后,按所选试剂盒要求的温度和时间进行感作。

10.4.9 洗板

重复10.4.6的操作。

10.4.10 加底物

按所选试剂盒要求,每孔加入TMB底物溶液。

加入底物后,应观察所有孔内颜色变化是否正常。不正常的颜色变化包括孔内出现点状或片状的沉淀物。如果出现这种情况,这个孔的样品检测为无效。

10.4.11 感作

从加完第1孔开始计时,将包被板置于符合温度要求的黑暗处,按所选试剂盒要求的时间进行感作。

10.4.12 加终止液

按照加入底物的顺序,每孔按所选试剂盒要求加入终止液,终止颜色反应。

10.4.13 测定OD值

酶标仪以空气作为空白对照,按所选试剂盒要求的波长,测量和记录样品和对照的吸光度值(OD值)。吸光度值的测定应在加完终止液后2 min~20 min内进行。

10.5 质控标准

按所选试剂盒要求进行试验阴阳性对照的检测。如果测定结果无效,应该检查操作后重新检测。

10.6 结果计算和判定

按所选试剂盒要求进行结果的计算和判定。

11 综合判断

11.1 经5.5判定为疑似PPV感染病例,经病毒分离(见第7章)分离出PPV,或经PCR方法(见第8章)检测出PPV核酸,或HA和HI(见第9章)检测出病毒阳性的,可判定为猪细小病毒感染。

11.2 无明显临床症状的非免疫动物经HA和HI(见第9章)、ELISA(见第10章)任一项检测出猪细小病毒抗体的,可判定该动物曾经感染过PPV。

附录 A

(资料性)

猪细小病毒感染流产、死胎特征图

初产母猪妊娠 90 d 接种 27a 毒株(见图 A. 1)和 NADL-2 毒株(见图 A. 2)显示不同程度的流产病变。



图 A. 1 大小不一致的木乃伊胎和死胎



图 A. 2 大小较均一的死胎

附录 B

(资料性)

磷酸盐缓冲液配制

B.1 甲液:0.2 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)溶液

B.1.1 配制一

2 水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	35.61 g
去离子水	800 mL
充分搅拌溶解,加去离子水定容至 1 L,121 °C 高压灭菌 30 min,4 °C 保存备用。	

B.1.2 配制二

12 水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	71.64 g
去离子水	800 mL
充分搅拌溶解,加去离子水定容至 1 L,121 °C 高压灭菌 30 min,4 °C 保存备用。	

B.2 乙液:0.2 mol/L 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)溶液

B.2.1 配制一

1 水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	27.60 g
去离子水	800 mL
充分搅拌溶解,加去离子水定容至 1 L,121 °C 高压灭菌 30 min,4 °C 保存备用。	

B.2.2 配制二

2 水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	31.21 g
去离子水	800 mL
充分搅拌溶解,加去离子水定容至 1 L,121 °C 高压灭菌 30 min,4 °C 保存备用。	

B.3 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.2)

甲液	36 mL
乙液	14 mL
去离子水	700 mL
加入 9 g 氯化钠(NaCl),再用去离子水定容至 1 L,121 °C 高压灭菌 30 min,4 °C 保存备用。	

附 录 C
(资料性)
猪细小病毒分离鉴定

C.1 DMEM 培养液

DMEM 干粉	1 袋(终体积为 1 000 mL)
NaHCO ₃	3.7 g
超纯水	1 000 mL

用 0.22 μm 一次性滤器过滤到灭菌的盐水瓶中,封口,4℃保存备用。

C.2 DMEM 细胞培养液(含 10%胎牛血清)

DMEM 培养液	450 mL
胎牛血清(56℃ 30 min 灭能后)	50 mL
10 000 IU/mL 青霉素、链霉素双抗溶液	5 mL

C.3 DMEM 细胞维持液(含 2%胎牛血清)

DMEM 培养基	490 mL
胎牛血清(56℃ 30 min 灭能)	10 mL
10 000 IU/mL 青霉素、链霉素双抗溶液	5mL

C.4 0.25%胰酶溶液(ATV)

氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.40 g
葡萄糖(C ₆ H ₁₂ O ₆)	1.00 g
碳酸氢钠(NaHCO ₃)	0.58 g
胰蛋白酶	2.50 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA)	0.20 g
双蒸水或去离子水	1 000 mL

溶解后 0.22 μm 过滤除菌,定量分装。

附录 D

(资料性)

PCR 检测引物及溶液配制

D.1 PCR 扩增引物序列

正向引物 PPV329F(NS1 基因 1175-1199):5'-ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGC-3';

反向引物 PPV329R(NS1 基因 1481-1504):5'-TATGTTCTGGTCTTTCTCGCATC-3';

扩增基因片段长度:329 bp。

D.2 1×TAE 电泳缓冲液

D.2.1 50×TAE 储存液

三羟甲基氨基甲烷(Tris) 242 g

乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA) H_2O 37.2 g

冰醋酸 57.1 mL

去离子水 800 mL

充分搅拌溶解,加去离子水定容至 1 L,室温保存。

D.2.2 1×TAE 使用液

50×TAE 储存液 10 mL

去离子水 490 mL

充分混匀即为琼脂糖凝胶电泳缓冲液。

D.3 2%的琼脂糖凝胶

琼脂糖 2.0 g

1×TAE 溶液 100 mL

充分混匀后,置于微波炉中温加热至凝胶完全溶化成液体。

D.4 6×核酸电泳加样缓冲液

乙二胺四乙酸(EDTA-Na_2) 0.88 g

溴酚蓝 50 mg

二甲苯腈蓝 FF 50 mg

去离子水 40 mL

甘油(丙三醇) 36 mL

充分搅拌均匀,用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0,用去离子水定容至 100 mL,室温保存。

D.5 扩增 329 bp 基因序列(PPV NADL-2 标准株,GenBank 登录号 NC_001718.1)

5'-ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGCATCAACAGGAAAAAGTATAATTGCTCAACACA
 TTGCAAACCTTAGTTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGCAGCCAATGTGAACTTTCCATTTAAT
 GACTGTACAAATAAAAACTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAACTTCTCTAACCAAGTAA
 ACCAATTCAAAGCCATATGTTTCAGGTCAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAAAGGAAG
 CAAACAAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGA
 ATAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATA-3'

附 录 E
(资料性)
血凝与血凝抑制试验(HA-HI)

E.1 0.6%豚鼠红细胞液配制

E.1.1 阿氏液

柠檬酸钠	8.0 g
柠檬酸	0.55 g
葡萄糖	20.5 g
NaCl	4.2 g
去离子水	800 mL

充分混匀后加去离子水定容至1 L,并经0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌或高压115 $^{\circ}\text{C}$,30 min,置于4 $^{\circ}\text{C}$

保存。

E.1.2 pH 7.2的磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.2)配制方法见附录B。

E.1.3 0.6%豚鼠红细胞悬液

成年健康豚鼠心脏采血,将采集豚鼠红细胞置于10倍体积的阿氏液(E.1.1)中,1 000 r/min离心10 min,弃上清液。加入5倍体积的pH 7.2的磷酸盐缓冲液洗涤,充分混匀后1 000 r/min离心10 min,弃上清液。如此反复洗涤3遍~5遍。用pH 7.2磷酸盐缓冲液配制成0.6%的红细胞悬液,再加入3%(V/V)经56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活30 min胎牛血清,即为0.6%豚鼠红细胞悬液。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

E.2 25%白陶土的制备

25%白陶土悬液(用于血凝抑制试验检测方法)取优质白陶土粉末25 g,加pH 7.2磷酸盐缓冲液至100 mL,105 kPa 20 min高压灭菌4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,可用1个月。临用前摇匀。

E.3 血凝抑制试验被检血清的处理

血清先经56 $^{\circ}\text{C}$ 30 min灭活,吸取0.1 mL血清加25%的白陶土0.3 mL(相当于4倍稀释),充分摇匀,置于室温20 min,其间摇动2次~3次,2 000 r/min离心10 min,吸出上清置于另一1.5 mL管,向上清液加红细胞泥25 μL ,充分摇匀,置于室温1 h,其间摇动数次,2 000 r/min离心10 min,上清液用作试验。处理的被检血清置于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下2 h~4 h内有效。

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
猪细小病毒病诊断技术
NY/T 4137—2022

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京科印技术咨询有限公司印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1.25 字数 25 千字

2022 年 8 月第 1 版 2022 年 8 月北京第 1 次印刷

书号: 16109 · 9028

定价: 42.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 4137—2022