

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 537—2023

代替 NY/T 537—2002

猪传染性胸膜肺炎诊断技术

Diagnostic techniques for porcine contagious pleuropneumonia

2023-02-17 发布

2023-06-01 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

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 537—2002《猪放线杆菌胸膜肺炎诊断技术》。与 NY/T 537—2002 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了“缩略语”(见第4章)；
- b) 增加了“临床诊断”(见第5章)；
- c) 增加了“PCR 检测”(见第8章)；
- d) 增加了“实时荧光 PCR 检测方法”(见第9章)；
- e) 增加了“综合结果判定说明”(见第12章)；
- f) 增加了“胸膜肺炎放线杆菌形态图”(见附录B)；
- g) 删除了“补体结合试验”(见2002年版的第4章)；
- h) 修改了“酶联免疫吸附试验”(见第11章,2002年版的第6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：中国动物卫生与流行病学中心、河南科技大学、江苏省农业科学院、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、山东畜牧兽医职业学院、青岛市即墨区畜牧业发展服务中心。

本文件主要起草人：魏荣、张慧、周俊明、汪洋、盖文燕、徐天刚、刘丽蓉、孙翔翔、王岩、魏甜甜、董雅琴、刘爽、倪艳秀、吴发兴、何奇松、熊毅。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2002年首次发布为 NY/T 537—2002；
- 本次为第一次修订。

引 言

猪传染性胸膜肺炎(porcine pleuropneumonia)是由胸膜肺炎放线杆菌引起的一种猪的急性呼吸道传染病。发病猪以急性出血性纤维素性肺炎和慢性纤维素性坏死性胸膜炎为主要特征。急性病例病死率高,慢性病例能耐过,表现出消瘦和生长发育不良。目前,该病在世界上养猪国家广泛存在。

胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)属于巴氏杆菌科放线杆菌属。根据对辅酶 I (NAD)的依赖性,分为生物 I 型和生物 II 型;根据荚膜多糖及脂多糖的抗原性差异,目前将本菌分为 19 个血清型。通常 1~12、15~19 型为生物 I 型,生物需要依赖 NAD,大多数 13 型和 14 型属于生物 II 型,生长不依赖 NAD。不同血清型甚至同一血清型中不同菌株之间的毒力有差异,一般 1 型、5 型、9 型及 11 型毒力最强,2 型、3 型、6 型、8 型、12 型及 15 型为中等毒力或低毒力。我国 APP 主要流行血清型为 1 型、2 型、3 型、4 型、5 型、7 型。

猪传染性胸膜肺炎诊断技术

1 范围

本文件规定了猪传染性胸膜肺炎临床诊断、样品采集和运送、病原分离与鉴定、PCR 检测、实时荧光 PCR 检测、琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验的技术要求和规范。

本文件适用于猪传染性胸膜肺炎的诊断、检疫、检测、监测和流行病学调查等。

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）适用于本文件。

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

卫星现象 Satellite phenomenon

挑取 APP 菌落接种于血琼脂表面，用金黄色葡萄球菌点种或垂直划线，在 37℃ 5%~10% CO₂ 条件下培养 24 h~48 h。越靠近金黄色葡萄球菌菌落生长的本菌菌落越大，越远的越小甚至不见菌落生长，即所谓“卫星现象”，也称 V 因子需要试验。

3.2

β 溶血 βhemolysis

菌落周围形成完全透明的溶血环，红细胞完全溶解，称为 β 溶血。相对的，在菌落周围形成不透明的草绿色溶血环，红细胞未溶解，血红蛋白变成绿色，称为 α 溶血。

3.3

胸膜肺炎放线杆菌含重复子毒素 Actinobacillus pleuropneumoniae RTX, Apx

APP 可产生 4 种毒素，分别为 Apx I、Apx II、Apx III、Apx IV，均为重要的毒力因子，具有细胞毒性或溶血性，是一种穿孔毒素，属于含重复子毒素(repeats in toxin, RTX)家族。其中，Apx IV 存在于所有血清型，且只在猪体内产生。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

APP: 胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)

PBS: 磷酸盐缓冲液(Phosphate-buffered saline buffer)

TSB: 胰蛋白大豆肉汤(Trypticase soy broth)

NAD: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸，也称 V 因子(Nicotinamide adenine dinucleotide)

CAMP: 协同溶血试验(Christie-Atkins-Munch-peterson)

Apx: 胸膜肺炎放线杆菌含重复子毒素(*Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX)

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

DNA: 脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸(Deoxy-ribonucleoside triphosphate)

TE: Tris-EDTA 缓冲液(Tris-EDTA buffer)

TAE: TAE 缓冲液(Tris-acetic-EDTA buffer)

ELISA: 酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immune sorbent assay)

HRP: 辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)

TMB: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)

IPTG: 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)

5 临床诊断

5.1 流行病学

5.1.1 易感动物

对猪具有高度宿主特异性,各年龄猪均易感。

5.1.2 传染源

带菌猪、病猪及其分泌物是本病的传染源。病菌主要存在于肺脏病变部位、扁桃体、支气管、鼻分泌物中。

5.1.3 传播途径

主要传播途径是通过猪与猪的直接接触或短距离飞沫传播。

5.1.4 流行特点

一年四季均可发生,秋末春初季节变化时多发。饲养环境突然改变、密集饲养、通风不良、气候突变及长途运输等诱因可引起本病。猪场或猪群之间的传播,多由引进或混入带菌猪、慢性感染猪所致,集约化猪场往往呈跳跃式急性暴发,死亡率高。

5.2 临床症状

5.2.1 最急性型

本病临床症状因动物的年龄、免疫状态、疫病状态、环境因素及对病原的易感程度等不同而呈现差异。猪群中一头或几头猪只突然发病。体温升高达 41℃~42℃,并可出现短期呕吐。鼻、耳、眼及后躯皮肤常发绀,最后阶段出现严重呼吸困难,临死前常从口、鼻流出血性泡沫状分泌物。有时未见任何症状即突然死亡。

5.2.2 急性型

病猪体温升高,可达 40.5℃~41℃,精神委顿,喜卧少动,饮食不振。有咳嗽、喘气、呼吸困难等严重呼吸道症状。

5.2.3 亚急性型或慢性型

病猪体温可能无明显变化,常呈现间歇性咳嗽,呼吸异常、食欲不振、增重减少。疾病暴发初期,母猪常出现流产(可能由发热引起)。个别猪只出现中耳炎。若混合感染猪流感病毒、巴氏杆菌、支原体等其他呼吸道病原时,病程恶化,病死率明显增加。

5.3 病理特征

5.3.1 剖检后的肉眼变化主要是纤维素性肺炎,可呈单侧、双侧、大叶性、弥漫性或多灶性,肺炎区色深,有出血点或斑块状出血,中等硬度,略有弹性,急性、亚急性和慢性病例可见肺部纤维素性渗出物。

5.3.2 纤维素性胸膜炎明显,急性和慢性病例均可见胸腔含有带血色的液体,胸膜有粘连区,气管和支气管充满带血色的黏液性泡沫分泌物。

5.3.3 组织学变化以肺组织坏死、出血、中性粒细胞浸润、血管栓塞、广泛水肿和纤维素性渗出为特征,坏死区周围发生巨噬细胞浸润和纤维化。

5.4 结果判定

易感动物出现 5.2.1 或 5.2.2 或 5.2.3 至少一项临床症状且符合 5.1 流行病学及 5.3 病理特征,判定为 APP 感染疑似病例。

6 样品采集和运送

6.1 耗材

6.1.1 无菌棉拭子。

6.1.2 灭菌管。

6.1.3 医用防护服。

6.2 试剂

6.2.1 PBS,按照附录 A 中 A.1 描述的方法配制。

6.2.2 30%甘油磷酸盐缓冲液,按照 A.2 描述的方法配制。

6.3 活体病料采集

按照 NY/T 541 规定的方法采样。用棉拭子伸入鼻腔采集分泌物,将该鼻拭子样品端置于含有 1 mL PBS 或 30%甘油磷酸盐缓冲液的灭菌管中。

6.4 尸体病料采集

无菌采集具有典型病变的肺、肺门淋巴结、扁桃体、气管或鼻腔分泌物。最急性感染死亡的病猪,除采集上述病料外,还可取脾、血液病料,置于无菌密封袋或密封容器中。

6.5 样品运送

按照 NY/T 541 规定的方法运输。采集的样品,在 2℃~8℃条件下保存时间应不超过 24 h。

7 病原分离与鉴定

7.1 仪器设备和耗材

7.1.1 生物安全柜。

7.1.2 CO₂恒温培养箱。

7.1.3 光学显微镜。

7.1.4 微量可调移液器(0.1 μL~10 μL、2 μL~20 μL、10 μL~100 μL 和 100 μL~1 000 μL 各 1 支)。

7.1.5 10 mL 无菌试管。

7.1.6 吸头。

7.1.7 接种环。

7.2 试剂

7.2.1 血琼脂,按照 A.3 描述的方法配制。

7.2.2 巧克力琼脂,按照 A.4 描述的方法配制。

7.2.3 TSB,按照 A.5 描述的方法配制。

7.2.4 商品化革兰染色试剂。

7.2.5 NAD 储存液,按照 A.6 描述的方法配制。

7.2.6 商品化新生牛血清。

7.2.7 尿素琼脂,按照 A.7 描述的方法配制。

7.2.8 商品化微量生化鉴定管(D-木糖、甘露醇、棉子糖、阿拉伯胶糖等)。

7.3 分离培养

在生物安全柜中用接种环无菌蘸取采集的样品划线接种于血琼脂表面,再用金黄色葡萄球菌作交叉划线,在 37℃ 5%~10% CO₂条件下培养 24 h~48 h,形成菌落后依据 7.4~7.8 鉴定。

7.4 培养特性

7.4.1 菌落特性

APP 为黏液型的小菌落,直径 0.5 mm~1 mm。多数菌株可产生稳定的 β 溶血。生物 I 型 APP 依

赖 NAD,包括 1~12 血清型、15~19 血清型,不能在血琼脂上生长,可在含有 NAD 或由共培养的葡萄球菌提供 NAD 的血琼脂上生长,产生“卫星现象”。生物 II 型不依赖 NAD,包括 13 血清型和 14 血清型,可在血琼脂上生长,不产生“卫星现象”。

7.4.2 卫星现象

挑取 APP 菌落接种于血琼脂表面,用金黄色葡萄球菌点种或垂直划线,在 37℃ 5%~10% CO₂ 条件下培养 24 h~48 h。越靠近金黄色葡萄球菌菌落生长的本菌菌落越大,越远的越小甚至不见菌落生长,即所谓“卫星现象”,也称 V 因子需要试验(见附录 B 中的 B.1)。

7.5 涂片染色镜检

取典型菌落作革兰染色,镜检显示为革兰阴性小球杆菌,两极着色(见 B.2)。

7.6 增殖培养

在生物安全柜中挑取 β 溶血或具有“卫星现象”的典型单菌落在巧克力琼脂上进行再次纯培养后,挑取单个菌落接种于添加 10% 新生牛血清和 10 μg/mL NAD 的 TSB 液体培养基中,37℃ 培养 24 h~48 h 至液体混浊。

7.7 生化鉴定

7.7.1 尿素酶试验

将分离菌接种于尿素琼脂斜面上,置于 37℃ CO₂ 恒温培养箱中培养 3 h~12 h,斜面变粉红色者为尿素酶试验阳性,否则为阴性。

7.7.2 CAMP 试验

在血琼脂上用具有 β 溶血的金黄色葡萄球菌划一横线,在此横线下隔 0.3 cm~0.5 cm 处划垂直线接种被检菌,置于 37℃ CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h,横线与垂直线相邻空间的溶血区明显增大者为阳性,否则为阴性。

7.7.3 糖发酵试验

将少量待检菌接种于糖发酵管培养液内,置于 37℃ CO₂ 恒温培养箱中培养 48 h~72 h,能分解某种糖会产酸或产酸产气。产酸时,可使颜色变黄,产气者于倒置小发酵管内出现气泡。发酵 D-木糖、甘露醇,不发酵棉子糖、阿拉伯胶糖者为阳性,否则为阴性。

7.8 核酸鉴定

对符合 7.4~7.7 的分离菌株,选用 PCR 检测(见第 8 章)或实时荧光 PCR 检测(见第 9 章)进行核酸鉴定。

7.9 血清型鉴定

对符合 7.4~7.8 的分离菌株,可用琼脂扩散实验(见第 10 章)进行血清型鉴定。

7.10 结果判定

病原分离培养形成的菌落符合 APP 培养特性、染色特征、生化特性且核酸阳性者,判定 APP 分离阳性。

8 PCR 检测

8.1 仪器设备和耗材

8.1.1 组织匀浆器或研钵。

8.1.2 生物安全柜。

8.1.3 冷冻离心机。

8.1.4 恒温水浴锅。

8.1.5 PCR 扩增仪。

8.1.6 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

8.1.7 凝胶成像系统或紫外透射仪。

- 8.1.8 微量可调移液器(0.1 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、10 μL ~100 μL 和 100 μL ~1 000 μL 各 1 支)。
- 8.1.9 吸头。
- 8.1.10 PCR 管。
- 8.1.11 1.5 mL 无菌离心管。

8.2 试剂

- 8.2.1 PBS,按照 A.1 描述的方法配制。
- 8.2.2 消化液 I 和消化液 II,按照 A.8 描述的方法配制。
- 8.2.3 酚/氯仿/异戊醇混合液,按照 A.9 描述的方法配制。
- 8.2.4 75%乙醇。
- 8.2.5 TE 缓冲液,按照 A.10 描述的方法配制。
- 8.2.6 商品化 PCR 反应试剂盒。
- 8.2.7 1×TAE 电泳缓冲液,按照 A.11 描述的方法配制。
- 8.2.8 商品化上样缓冲液。
- 8.2.9 琼脂糖。
- 8.2.10 DNA 相对分子量标准物 Marker DL 2 000。
- 8.2.11 无菌双蒸水(ddH₂O)。
- 8.2.12 阴、阳性对照:分别为灭菌的 TSB 培养基和灭活的 APP 菌株。
- 8.2.13 上、下游引物;按照附录 C 中 C.1 的描述合成。

8.3 样品处理

8.3.1 组织样品

用无菌剪刀和镊子剪取典型病变组织 0.5 g~1.0 g,加入 0.5 mL~1 mL PBS,于组织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨,将组织悬液转入无菌离心管中备用。

8.3.2 鼻及气管分泌物

鼻拭子在 0.5 mL~1 mL PBS 中反复挤压,12 000 r/min 离心 5 min,沉淀用 200 μL PBS 重悬备用。

8.3.2 增菌培养物

按照 7.3~7.6 所述方法进行病原分离培养,并吸取增菌培养物 500 μL 于无菌离心管中,12 000 r/min 离心 5 min,沉淀用 200 μL PBS 重悬备用。

8.4 组织样品 DNA 的制备

- 8.4.1 分别取上述处理后样品、阴性对照、阳性对照各 100 μL ,加入到 1.5 mL 无菌离心管,再在每管中加入 500 μL 消化液 I 和 10 μL 消化液 II,反复吹打混匀,置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下水浴 30 min~60 min。
- 8.4.2 分别加入 500 μL 酚/氯仿/异戊醇混合液,混匀,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,分别吸取离心后的上层清液转移至新的 1.5 mL 无菌离心管中。
- 8.4.3 加入等体积-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇,混匀,室温放置 15 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,轻轻倒去上清液,倒置吸水纸上,吸干液体。
- 8.4.4 加入 700 μL 75%乙醇,轻轻混匀;4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 30 s,轻轻倒去上清液,将管壁上的残余液体离心,用微量加样器尽量将其吸干,不要碰触沉淀,置于室温条件下干燥 10 min。
- 8.4.5 加入 10 μL TE 缓冲液,轻轻混匀,溶解 DNA,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。也可采用商品化的试剂盒提取 DNA。

8.5 鼻及气管分泌物和增菌培养物 DNA 的制备

取鼻及气管分泌物或增菌培养物,12 000 r/min 离心 5 min。弃去上清液,沉淀用 50 μL 无菌 ddH₂O 重悬,于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。

8.6 PCR 反应

PCR 反应体系见表 1。

表 1 PCR 反应体系

组分	体积, μL
10 $\times$ PCR buffer(Mg^{2+} Plus)	2.5
dNTPs(2.5 mmol/L)	2.0
上游引物(工作浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
下游引物(工作浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
模板 DNA	2.0
Taq 酶(5 U/ μL)	0.2
无菌 ddH ₂ O	16.3

将 PCR 管放入 PCR 扩增仪进行扩增。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。

8.7 凝胶电泳

取 PCR 扩增产物和 DNA 相对分子量标准物 Marker DL 2 000 各 5 μL ,于 1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳,100 V~120 V 恒压电泳 20 min~40 min,在凝胶成像系统上观察结果,并做好记录。

8.8 结果判定

8.8.1 成立条件

阴性对照未扩增出任何条带,阳性对照扩增出 377 bp 的条带,则试验成立(见附录 D)。

8.8.2 结果判定

在阴性对照和阳性对照试验结果成立的前提下,如果样品扩增出 377 bp 的特异性条带,判定该样品 APP 核酸阳性。

9 实时荧光 PCR 检测

9.1 仪器设备和耗材

9.1.1 实时荧光定量 PCR 仪。

9.1.2 微量可调移液器(0.1 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、10 μL ~100 μL 和 100 μL ~1 000 μL 各 1 支)。

9.1.3 吸头。

9.1.4 PCR 管。

9.2 试剂

9.2.1 商品化实时荧光定量 PCR 反应试剂盒。

9.2.2 上、下游引物及探针,按照 C.2 描述的方法合成。

9.2.3 无菌双蒸水(ddH₂O)。

9.2.4 阴、阳性对照:分别为灭菌的 TSB 培养基和灭活的 APP 菌株。

9.3 样品处理

样品处理见 8.3。

9.4 样品 DNA 的制备

样品 DNA 的制备见 8.4。

9.5 实时荧光 PCR 反应

实时荧光 PCR 反应体系见表 2。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

组分	体积, μL
Premix Ex Taq	12.5
上游引物(工作浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
下游引物(工作浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
探针	0.5
模板 DNA	2.0
无菌 ddH ₂ O	9.0

实时荧光 PCR 反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 并收集荧光信号,循环 40 次。

9.6 结果判定

9.6.1 阈值设定

阈值(threshold)设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点,不同仪器可根据仪器噪声情况进行调整。

9.6.2 成立条件

阴性对照应没有 C_t 值显示或显示 C_t 值 ≥ 40.0 ;阳性对照的 C_t 值 <30.0 且出现特定的扩增曲线(见附录 E)。否则,实验视为无效。

9.6.3 结果判定

检测样本 C_t 值 <30.0 ,且出现特定的扩增曲线,判定为核酸阳性。检测样本 $30.0 \leq C_t$ 值 <40.0 时重复一次,如果仍为 $30.0 \leq C_t$ 值 <40.0 且出现特定的扩增曲线,判定为核酸阳性;否则判定为核酸阴性。检测不到样本 C_t 值或 $C_t \geq 40.0$,判定为核酸阴性。

10 琼脂扩散试验

10.1 仪器设备和耗材

10.1.1 水浴锅或微波炉。

10.1.2 打孔器。

10.1.3 载玻片。

10.1.4 恒温培养箱。

10.1.5 微量可调移液器(0.1 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、10 μL ~100 μL 和 100 μL ~1 000 μL 各 1 支)。

10.1.6 吸头。

10.1.7 试剂

10.1.8 琼脂糖。

10.1.9 氯化钠。

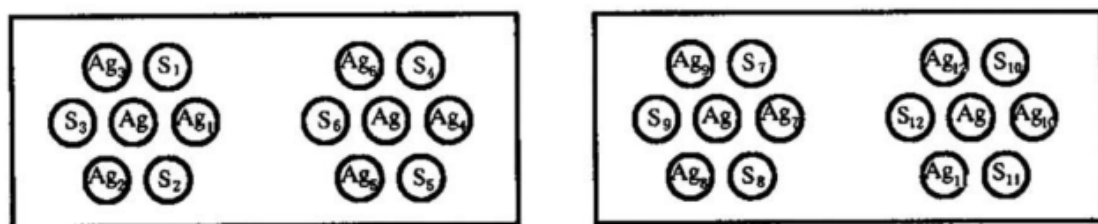
10.1.10 APP1~15 型单因子血清,见附录 F。

10.2 琼脂板的制备

10.2.1 取琼脂糖 1.0 g、氯化钠 0.85 g,加双蒸水至 100 mL,在沸水浴中溶化混匀。

10.2.2 按制板所需体积分装(如用 25.4 mm $\times$ 76.2 mm 载玻片,胶厚 2 mm,需加琼脂凝胶 3.87 mL),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

10.2.3 临用前,取分装好的 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存琼脂凝胶管,在沸水中溶化后,倒在水平玻璃板或载玻片上,凝固后按图 1 打孔,火焰封底。



标引序号说明：

Ag —— 待检多糖抗原；

Ag₁~Ag₁₂ —— 分别为 1~12 型标准株多糖抗原；

S₁~S₁₂ —— 分别为 1~12 型标准株单因子血清。

图 1 琼脂扩散试验示意图

10.3 加样

中间孔加待检菌多糖抗原(见附录 G),周边孔加 1~15 型单因子血清和对应型标准株多糖抗原(见附录 F),加量以加满为宜(见图 1)。加样完毕后,将凝胶板放入湿盒内置于 37 ℃ 恒温培养箱中反应,24 h 后观察并记录结果。

10.4 结果判定

被检抗原与单因子血清之间出现明显清晰的沉淀线,并与标准型抗原和单因子血清之间形成的沉淀线完全融合,即可判为该相关血清型。

11 酶联免疫吸附试验(ELISA)

11.1 仪器设备和耗材

11.1.1 酶标检测仪。

11.1.2 恒温培养箱。

11.1.3 洗板机。

11.1.4 酶标板。

11.1.5 微量可调移液器(0.1 μL~10 μL、2 μL~20 μL、10 μL~100 μL 和 100 μL~1 000 μL 各 1 支)。

11.1.6 吸头。

11.2 试剂

11.2.1 抗原包被液,按照 A.12 描述的方法配制。

11.2.2 洗涤液,按照 A.13 描述的方法配制。

11.2.3 封闭液,按照 A.14 描述的方法配制。

11.2.4 样品稀释液,按照 A.15 描述的方法配制。

11.2.5 商品化 TMB 显色液。

11.2.6 终止液,按照 A.16 描述的方法配制。

11.3 抗原与抗体

11.3.1 ApxIV 重组抗原

克隆 APP shope 4074 菌株(标准菌株血清 1 型) *apx IV* 编码基因(GenBank 序列号:AF021919)5 434 bp~6 511 bp 片段,插入表达载体 pET32a,经 IPTG 诱导、Ni 柱纯化获得高纯度的 ApxIV 重组蛋白,作为试验用抗原。

11.3.2 商品化辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗猪 IgG 抗体

按说明书稀释使用。

11.3.3 阴性对照血清

阴性对照血清来自未经 APP 疫苗免疫的健康猪,鼻拭子增菌物经 PCR 检测为 APP 抗原阴性, Apx IV-ELISA 检测的 OD 值应介于 0.13~0.2, 过滤分装该血清作为试验中的阴性对照血清。

11.3.4 阳性对照血清

选取未免疫健康猪,以纯化 ApxIV 重组蛋白 1 mg 配合 Gel 01 PR 佐剂免疫,共免疫 2 次,免疫间隔 14 d,末次免疫后 7 d 采血分离猪血清, ApxIV-ELISA 检测 OD 值与阴性对照血清 OD 值的比值应高于 2.5, 过滤分装该血清作为试验中的阳性对照血清。

11.4 抗原包被

用抗原包被液将纯化的 ApxIV 重组抗原稀释至 0.625 $\mu\text{g/mL}$,用移液器将稀释好的抗原加入到酶标板各孔内,100 $\mu\text{L/孔}$, 加盖于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 18 h~20 h。

11.5 洗涤

甩掉酶标板孔内的抗原包被液,加入洗涤液 200 $\mu\text{L/孔}$,室温(20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$)下浸泡 5 min,甩去洗涤液,在吸水纸上叩击,尽量排尽洗涤液。再重新加入洗涤液,按同法洗 2 次。

11.6 封闭

用移液器将封闭液加入酶标板各孔中,200 $\mu\text{L/孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 60 min。

11.7 洗涤

取出酶标板将其甩干,用洗涤液洗涤 3 次,方法同 11.5。

11.8 加样

待检血清、阳性对照血清和阴性对照血清用样品稀释液作 1:100 稀释,对照血清作复孔,100 $\mu\text{L/孔}$ 。加盖于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内孵育 90 min。

11.9 洗涤

取出酶标板将其甩干,用洗涤液洗涤 3 次,方法同 11.5。

11.10 加 HRP 标记羊抗猪 IgG 抗体

HRP 标记的羊抗猪 IgG 抗体用洗涤液按说明书稀释后使用,100 $\mu\text{L/孔}$ 。加盖于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内孵育 50 min。

11.11 洗涤

取出酶标板,将其甩干,用洗涤液洗涤 3 次,方法同 11.5。

11.12 加底物显色液

加入 TMB 显色液,100 $\mu\text{L/孔}$,室温避光反应 10 min。

11.13 终止反应

加入终止液,50 $\mu\text{L/孔}$ 。

11.14 结果判定

11.14.1 成立条件

终止反应后,15 min 内在酶标仪 450 nm 波长处,测定酶标板的每孔光吸收值。计算对照血清的平均 OD 值,当 P/N 值 ≥ 2.5 (P 为阳性对照平均 OD 值, N 为阴性对照平均 OD 值),并且 $0.2 > N > 0.13$ 时,则试验成立。

11.14.2 结果判定

计算每份被检血清 OD 值与阴性对照平均 OD 值的比值,则得出每份样品的 S/N 值 (S 为被检血清 OD 值, N 为阴性对照平均 OD 值)。判定标准:样品 S/N 值 ≥ 2.5 , 样品判定 APP 抗体阳性;样品 S/N 值 < 2.5 , 样品判定 APP 抗体阴性。也可采用商品化的 ApxIV-ELISA 试剂盒进行检测。

12 综合结果判定

12.1 出现 5.2.1 或 5.2.2 或 5.2.3 至少一项临床症状且符合 5.1 流行病学及 5.3 病理特征的发病猪,

可判定疑似猪传染性胸膜肺炎。

12.2 在 12.1 基础上,病原分离与鉴定(第 7 章)或 PCR 检测(第 8 章)或实时荧光 PCR 检测(第 9 章)任何一项检测阳性,可诊断为猪传染性胸膜肺炎。

12.3 在 12.1 基础上,酶联免疫吸附试验(ELISA)(第 11 章)抗体检测阳性的发病猪,可诊断为猪传染性胸膜肺炎。

附录 A

(规范性)

溶液的配制方法(试剂为分析纯及以上)

A.1 磷酸盐缓冲液(PBS)

称取 8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.2 g 氯化钾(KCl)、0.24 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、3.65 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$),加入 800 mL 双蒸水中溶解,调节溶液的 pH 至 7.2~7.4,加双蒸水定容至 1 000 mL。分装后,在 121 °C 灭菌 15 min~20 min,或过滤除菌,室温保存。

A.2 30%甘油磷酸盐缓冲液(pH 7.6)

取 30 mL 甘油、4.2 g 氯化钠(NaCl)、1.0 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、3.10 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、0.02%酚红 1.5 mL,加双蒸水定容至 100 mL。溶解后,调节溶液的 pH 至 7.6,121 °C 高压灭菌 15 min,冰箱中保存备用。

A.3 血琼脂

取营养琼脂 100 mL 煮沸溶解,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却到约 50 °C,以无菌方式加入脱纤维绵羊血 8 mL,摇匀,倾注无菌平皿。

A.4 巧克力琼脂

取营养琼脂 100 mL 煮沸溶解,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却到约 60 °C,以无菌方式加入脱纤维绵羊血 8 mL,置于 85 °C 水浴中 10 min~15 min,摇匀后倾注无菌平皿。

A.5 胰蛋白大豆肉汤(TSB)

取 30 g TSB,加双蒸水溶解并定容至 1 000 mL,121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min,2 °C~8 °C 条件下保存。使用前,加入 100 mL 无菌新生牛血清和 1 mL NAD 储存液(见 A.6)。

A.6 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)贮存液

取 1 g NAD 溶解于 100 mL 双蒸水中,充分摇匀溶解后,0.22 μm 的细菌滤器过滤,分装于无菌离心管中,置于-20 °C 条件下保存 6 个月。

A.7 尿素琼脂

称取 1 g 蛋白胨、5 g 氯化钠(NaCl)、1 g 葡萄糖、2 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),加双蒸水溶解后加入 3 mL 0.4%酚红溶液混匀,调 pH 至 7.2 ± 0.1 ,加双蒸水定容至 1 000 mL。加入 20 g 琼脂后加热混匀,121 °C 高压灭菌 15 min,冷却至 50 °C~55 °C 后,加入过滤除菌的 20%尿素溶液 100 mL 至终浓度 2%,分装于灭菌试管中,置斜面备用。

A.8 消化液 I 和消化液 II

消化液 I:Tris-HCl(pH 8.0)终浓度为 10 mmol/L;EDTA(pH 8.0)终浓度为 25 mmol/L;SDS 终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$;NaCl 终浓度为 100 mmol/L。

消化液 II:100 mg 蛋白酶 K 溶解于 5 mL 灭菌双蒸水中。

A.9 酚/氯仿/异戊醇混合液

Tris 饱和酚-氯仿-异戊醇按 25:24:1 的比例混合。

A.10 TE 缓冲液

配置终浓度为 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)和 1 mmol/L EDTA(pH 8.0)的混合溶液,高压灭菌后,2℃~8℃保存备用。

A.11 1×TAE 电泳缓冲液

称取 242 g Tris 碱、57.1 mL 冰乙酸、100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0),溶解混匀后调 pH 至 8.0,用双蒸水定容至 1 000 mL,充分混匀后即为 50×TAE,4℃保存备用。使用前,用双蒸水将其做 50 倍稀释即为 1×TAE,现用现配。

A.12 抗原包被液(0.15 mol/L,pH 9.6 碳酸盐缓冲液)

取 4.876 g 碳酸钠(Na_2CO_3)、8.4 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)加双蒸水溶解并定容至 1 000 mL,121℃高压 15 min,4℃冰箱保存。

A.13 洗涤液(0.01 mol/L pH 7.4,PBS-Tween 20)

取 3.222 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、0.204 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、8.775 g 氯化钠(NaCl)、0.186 g 氯化钾(KCl)加双蒸水溶解并定容至 1 000 mL,再加入 0.5 mL Tween20。

A.14 封闭液

洗涤液内加入终浓度 1%明胶,热水溶解后,恢复至室温备用。

A.15 样品稀释液

洗涤液内加入终浓度 1%脱脂奶粉,溶解成浑浊液备用。

A.16 反应终止液(2 mol/L 硫酸)

取浓硫酸(纯度 98%)11 mL 加入 89 mL 双蒸水,静置冷却后备用。

附 录 B
(资料性)
APP 形态图

B.1 APP 菌落形态及卫星现象

见图 B.1。



图 B.1 APP 菌落形态及卫星现象

B.2 APP 革兰染色镜检形态图

见图 B.2。

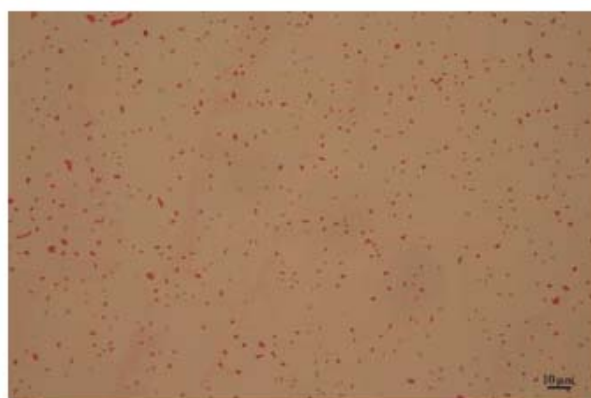


图 B.2 APP 革兰染色镜检形态图($\times 1\,000$)

附 录 C

(规范性)

PCR 检测引物及实时荧光 PCR 检测引物、探针

C.1 PCR 检测引物

表 C.1 列出了 PCR 检测引物信息。

表 C.1 PCR 检测引物

目的片段	引物名称	5' - 3'的序列	产物大小
<i>apx</i> ⅣA 基因	上游引物	GGGGACGTAACCTCGGTGATT	377 bp
	下游引物	GCTCACCAACGTTTGCTCAT	

C.2 实时荧光 PCR 检测引物、探针

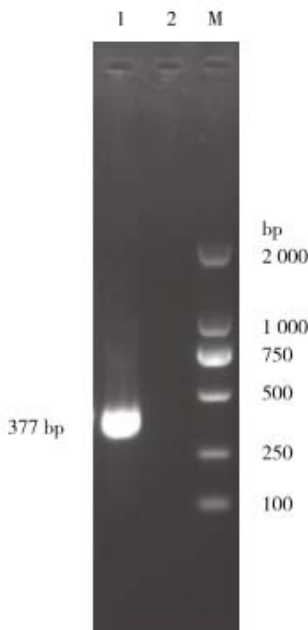
表 C.2 列出了实时荧光 PCR 检测引物及探针信息。

表 C.2 实时荧光 PCR 检测引物及探针

目的片段	引物名称	5' - 3'的序列	产物大小
<i>apx</i> ⅣA 基因	上游引物	GGGGACGTAACCTCGGTGATT	377 bp
	下游引物	GCTCACCAACGTTTGCTCAT	
	探针	FAM-CGGTGCGGACACCTATATCT-BHQ1	

附 录 D
(资料性)
PCR 检测判定电泳图例

PCR 检测判定电泳图例见图 D. 1。



标引序号说明：
M ——DL 2 000 Marker；
1 —— 阳性对照；
2 —— 阴性对照。

图 D PCR 检测判定电泳图例

附录 E
(资料性)
实时荧光 PCR 检测判定图例

E.1 实时荧光 PCR 检测判定图例

见图 E.1。

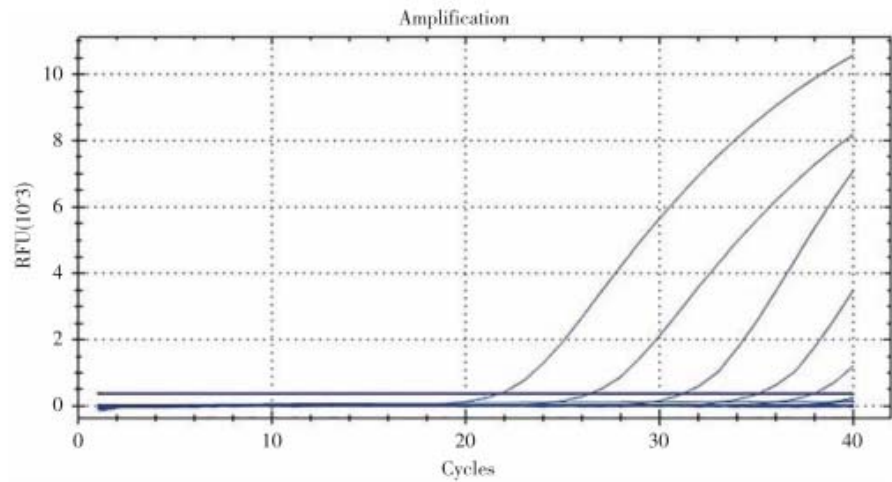


图 E.1 实时荧光 PCR 检测判定图例

E.2 说明

扩增曲线 APP 核酸浓度由左至右为 1 ng/μL、10⁻¹ ng/μL、10⁻² ng/μL、10⁻³ ng/μL、10⁻⁴ ng/μL，阴性对照没有 C_t 值显示。

附 录 F
(资料性)
单因子血清制备

F.1 免疫抗原的制备

将 APP 标准菌株划线于巧克力培养基,于 37℃培养 18 h,将琼脂表面的菌苔用含 0.3%福尔马林生理盐水洗下来,洗涤 2 次后,重悬至约 10%细胞悬液。

F.2 单因子血清制备

每种血清型 APP 抗原免疫健康新西兰大白兔 2 只。第一次免疫剂量为 0.5 mL/只,分 4 点~6 点背部皮下注射,之后 7 次免疫均为耳缘静脉注射,每只兔每次免疫剂量分别为 1 mL、2 mL、3 mL、3 mL、3 mL、3 mL、3 mL,免疫周期为 2 次/周。免疫完成 1 周后,采血分离血清。所有血清置于-20℃保存,长期保存应置于-80℃保存。

附 录 G
(资料性)
多糖抗原的提取

- G.1** 将接种在巧克力琼脂上的 APP 培养物用适量生理盐水洗下,以 4 000 r/min 离心 15 min,去上清液,再用生理盐水洗 1 次。
- G.2** 沉淀菌体按 1:15(V/V)加入双蒸水,混匀后置于 68 ℃ 水浴中,使瓶中菌液接近水浴温度,再加入等体积 68 ℃ 90%酚液,置于 68 ℃ 水浴 15 min~20 min,其间不断搅拌。
- G.3** 取出后在冰浴中冷却。
- G.4** 在 4 ℃ 下以 7 000 r/min 离心 20 min,离心后分 3 层,即水层、酚层和不溶解的部分。
- G.5** 小心吸取上部水层。
- G.6** 将酚层和不溶性物质加入与 B.2 中等量的 68 ℃ 双蒸水,搅拌后放入 68 ℃ 水浴 15 min~20 min,然后再重复 B.3~B.5 程序提取 1 次。
- G.7** 将 2 次收集的水层混合,即为 APP 琼脂扩散抗原。
-