



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1698—2010
代替 SN/T 1698—2006

伪狂犬病检疫规范

Quarantine protocol for Aujeszky's disease

2010-11-01 发布

2011-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替了 SN/T 1698—2006《猪伪狂犬病微量血清中和试验操作规程》。

本标准与 SN/T 1698—2006 相比,主要技术变化如下:

——本标准中第 4 章引用了 GB/T 18641—2002《伪狂犬病诊断技术》中第 3 章的内容;

——修改采用了 GB/T 18641—2002《伪狂犬病诊断技术》中第 2、4、7 章的内容;

——本标准中第 7 章代替了《猪伪狂犬病微量血清中和试验操作规程》(SN/T 1698—2006)。

本标准修改采用 OIE《陆生动物诊断试验与疫苗手册》(2008)中第 2.1.2 章制定,修改了病毒分离、PCR、血清中和试验的操作规程,增加了兔体接种试验、鉴别诊断 ELISA 方法、乳胶凝集试验、免疫荧光试验的操作规程。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:吕建强、卢体康、花群义、林志雄、张常印、姜焱、秦智锋、曹琛福、张彩虹、陶虹、阮周曦、田纯见。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1698—2006。

伪狂犬病检疫规范

1 范围

本标准规定了伪狂犬病的病毒分离鉴定、聚合酶链式反应、兔体接种试验、血清中和试验、酶联免疫吸附试验、乳胶凝集试验及免疫荧光试验的检疫技术规范。

本标准适用于进出境猪、羊、牛、犬、猫及其他易感动物伪狂犬病的检疫和诊断。

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 18641—2002 伪狂犬病诊断技术

3 病毒分离鉴定

3.1 试验材料及设备

DMEM 培养液、细胞生长液、细胞维持液配方见附录 A，猪肾细胞系细胞(PK-15)或仓鼠肾细胞(BHK21)、新生犊牛血清、青霉素、链霉素、0.22 μm 微孔滤膜、细胞培养瓶、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱等。

3.2 操作方法

3.2.1 样品采集

用于病毒分离的样品可以是活猪的口咽液、鼻液(拭子)或扁桃体活组织，或来源于死亡猪或表现临床症状猪的样本，其中脑和扁桃体样本是首选。对于潜伏感染的猪，三叉神经节是分离病毒最合适的部位。

牛感染该病的特征通常是搔痒，可以采集脊索的相应部位作为样本。

3.2.2 样品处理

在含抗生素(例如 200 IU/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)的细胞培养液或常规缓冲液中对以上样品进行匀浆处理，样品与液体的比例为 1 : 5，反复冻融 3 次后 3 000 r/min 低速离心 10 min 获得上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，然后利用其接种任何对伪狂犬病毒敏感的细胞培养系统。如果不立即接种细胞分离病毒，可以将其置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存作为接种材料。

3.2.3 接种细胞

分离该病毒常使用猪肾细胞系(PK-15)，接种前采用细胞生长液培养细胞，接种后使用的细胞维持液应该含有抗生素，例如 200 IU/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素。

将样品滤液接种到已长成单层的 PK-15 细胞上，接种量为最终培养维持液的 10%，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中吸附 1 h，然后加入 DMEM 培养维持液，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养，逐日观察。

3.3 观察结果

通常伪狂犬病毒诱导产生的细胞病变效应(CPE)出现在接种后的 24 h~72 h 内,因此用于接种的细胞培养物应维持 5 d~6 d。

当接种样品滤液后出现 CPE 时,表现为细胞变圆、聚集,成网状、细胞层脱落,有时形成合胞体。在没有明显 CPE 时,应盲传三代,如仍然无 CPE 出现,则伪狂犬病毒分离检测为阴性。

3.4 病毒鉴定

对于出现 CPE 的细胞培养物进行病毒鉴定,可以采用病毒中和试验、免疫荧光试验或聚合酶链式反应,出现阳性结果即可判定为伪狂犬病毒分离鉴定阳性。

4 聚合酶链式反应(PCR)

按照 GB/T 18641—2002 中的操作方法进行。

5 兔体接种试验

5.1 试验动物

选择健康成年家兔,经血清中和试验、乳胶凝集试验、琼脂扩散试验或酶联免疫吸附试验检测,证实为伪狂犬病抗体阴性。

5.2 样品处理

无菌采集疑为该病死亡或扑杀动物的脑组织、扁桃体、淋巴结,混合后剪碎,用组织匀浆器研磨,用灭菌生理盐水配成 1 : 5 乳悬液,反复冻融 3 次后,以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液加入青霉素和链霉素溶液,最终浓度分别为 200 IU/mL 和 100 μ g/mL,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中作用 12 h,作为待检样品。

5.3 接种试验动物

将待检样品经颈部皮下注射接种,每只家兔接种 1 mL~2 mL。

5.4 结果观察及判定

5.4.1 伪狂犬病毒感染阳性

被接种动物在接种后 24 h~48 h 注射部位出现奇痒,家兔啃咬注射局部,导致皮肤溃烂,家兔尖叫、口吐白沫,最终死亡。

5.4.2 伪狂犬病毒感染阴性

观察 5 d 后,接种家兔仍健活且无奇痒症状,判为阴性。

6 血清中和试验

6.1 试验材料及设备

细胞:选用对伪狂犬病毒敏感的细胞,例如 PK-15 细胞系或原代肾细胞。

细胞培养液:根据细胞种类不同选用不同培养液,例如 PK-15 细胞的培养液可以是加 10% 胎牛血

清的 DMEM 培养液。

标准伪狂犬病病毒株,适宜保存于一70℃或更低的温度,或冻干保存于4℃。

标准阳性血清和标准阴性血清。

37℃二氧化碳培养箱等。

6.2 预备试验

利用 Reed & Muench 法或 Kärber 法测定病毒的 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose), 参见附录 B。

6.3 正式试验

6.3.1 定性试验

6.3.1.1 将样品血清置于 56℃水浴 30 min,破坏血清中的补体。

6.3.1.2 将未稀释的血清加入到 96 孔细胞培养板中,每份 3 孔,每孔 50 μL。

6.3.1.3 每孔加入 50 μL 含有 100 TCID₅₀/50 μL(或 2 000 TCID₅₀/mL)的伪狂犬病毒液,振荡后置于 37℃二氧化碳培养箱中 1 h。

6.3.1.4 每孔加入 150 μL 细胞悬液,细胞浓度约为 1.5×10^5 细胞/mL,轻微振荡使细胞均匀分布在孔的底部,然后置于 37℃二氧化碳培养箱中(或密封细胞板后置于 37℃恒温培养箱中)。

6.3.1.5 每次检测应设置如下对照:

- 病毒对照:将 100 TCID₅₀/50 μL 的病毒液作 1:1、1:10、1:100、1:1 000 的稀释,每个稀释度的病毒液设 8 孔重复,每孔加 50 μL,在加入 50 μL 培养液后置于 37℃二氧化碳培养箱中 1 h,以 6.3.1.4 的方式加入细胞悬液后培养;
- 细胞对照:至少作 2 孔重复,每孔加 100 μL 培养液及 150 μL 浓度约为 150 000 细胞/mL 的细胞悬液;
- 阳性血清对照:使用已知伪狂犬病毒中和抗体滴度(T)的血清,作 4T、2T、T、T/2、T/4 五个稀释度,每个稀释度至少作 2 孔重复,每孔 50 μL,以 6.3.1.3、6.3.1.4 的方式分别加入病毒悬液、细胞悬液后培养;
- 阴性血清对照:以 6.3.1.2、6.3.1.3、6.3.1.4 的方式操作;
- 被检血清对照:为了验证待检血清是否有细胞毒性作用而设立此对照,每份待检血清 50 μL,加入 50 μL 培养液后置于 37℃二氧化碳培养箱中 1 h,然后以 6.3.1.4 的方式加入细胞悬液后培养。

6.3.1.6 在试验后 48 h 和 72 h,分别利用倒置显微镜(100×)观察 96 孔细胞培养板,检查细胞孔中是否有毒性反应和 CPE,只有如下对照结果成立才能判定待检样品的试验结果:

- 病毒对照:病毒悬液的滴度应该在 30 TCID₅₀/50 μL~300 TCID₅₀/50 μL 之间;
- 细胞对照:细胞对照孔的细胞正常、无变化;
- 阳性血清对照:测得的血清抗体滴度应与预期滴度相当(波动在 1 个滴度范围之内);
- 阴性血清对照:没有 CPE 出现;
- 被检血清对照:被检血清的 CPE 检查应考虑其对细胞毒性作用的可能。

6.3.1.7 待检血清的检测会出现如下结果:

- 在 3 d 内,3 孔均出现 CPE 的,判为阴性;
- 在第 3 天,3 孔均未出现 CPE 的,判为阳性;
- 在第 3 天,3 孔中只有 1 孔出现 CPE 的,判为可疑,需要重新检测;

- d) 在第 3 天,出现 CPE 的小斑时,判为可疑,需要重新检测;
- e) 在待检血清对照孔及测试孔有细胞毒性效应的,判为可疑,需要重新检测。

注:在试验后 16 h 替换新鲜培养液将降低细胞毒性效应,同时不影响特异性抗体的滴度。

6.3.2 定量试验

- 6.3.2.1 将样品血清置于 56 ℃ 水浴 30 min,破坏血清中的补体。
- 6.3.2.2 在 96 孔细胞培养板上待检血清区域,每孔加入 50 μL 培养液,然后加入 50 μL 待检血清进行系列倍比稀释,每个稀释度作 3 孔重复,在最后一个稀释孔中混匀后弃去 50 μL。
- 6.3.2.3 除病毒对照及每份样品的待检血清对照之外,其余孔中加入 50 μL 含有 100 TCID₅₀/50 μL (或 2 000 TCID₅₀/mL) 的伪狂犬病毒液。随后的操作参照 6.3.1.3、6.3.1.4。
- 6.3.2.4 检测对照设置同 6.3.1.5。
- 6.3.2.5 结果判读是在试验后 48 h 和 72 h,分别利用倒置显微镜(100×)观察 96 孔细胞培养板,检查细胞孔中是否有毒性反应和 CPE,计算血清抗体效价。
血清抗体效价≥1:2,判为伪狂犬病中和抗体阳性。
血清抗体效价大于 1:1 而小于 1:2,判为可疑,应采用 ELISA 或乳胶凝集试验验证结果,或者重新采样检测,间隔期至少 8 d。
血清抗体效价小于 1:1,判为阴性。

7 酶联免疫吸附试验(ELISA)

7.1 检测全病毒抗体 ELISA

7.1.1 试验材料及设备

完整伪狂犬病毒抗原、酶标抗体、伪狂犬病阳性血清、阴性血清;抗原稀释液、洗涤液、样品稀释液、酶标结合物稀释液、底物液、终止液配制方法参见附录 B;酶标反应板、37 ℃ 恒温培养箱、酶标仪。

7.1.2 操作方法

7.1.2.1 包被抗原

以完整伪狂犬病毒抗原作为包被酶标反应板的抗原。

7.1.2.2 包被酶标反应板

用抗原稀释液稀释抗原,通过方阵滴定法确定最佳包被抗原浓度作为工作浓度。将工作浓度的抗原加到 96 孔酶标反应板上,每孔 200 μL,于 4 ℃ 包被 18 h,然后用洗涤液洗板 3 次,包被好的酶标反应板置于-20 ℃ 或-70 ℃ 保存备用。

7.1.2.3 检测程序

利用样品稀释液按 1:30 稀释待检样品、阳性血清、阴性血清,加入到包被好的酶标反应板上,每孔 100 μL,阳性对照和阴性对照分别作 3 孔重复,于 37 ℃ 放置 30 min。弃去板中溶液,用洗涤液洗板 3 次。每孔加入 100 μL 用酶标结合物稀释液稀释到工作浓度的酶标结合物,于 37 ℃ 放置 30 min。弃去板中溶液,用洗涤液洗板 3 次,最后一次洗完后应用吸水纸拍干。加入 100 μL 合适的底物溶液(如邻苯二胺-过氧化氢),室温避光显色 25 min 后,每孔加入 50 μL 终止液终止显色。在酶标仪上测定 490 nm 波长的光吸收值(OD₄₉₀)。

7.1.3 结果判定

可采用 S/P 值作为临界值进行结果判定,先计算阴性对照 OD_{490} 平均值(NC)和阳性对照 OD_{490} 平均值(PC), S/P (样品检测 OD_{490} 值与阳性对照 OD_{490} 平均值之比)=(样品 OD_{490} 值-NC)/(PC-NC)。当 $S/P \geq 0.5$,判为抗体阳性;当 $S/P < 0.5$,判为抗体阴性。

7.2 鉴别检测 ELISA

7.2.1 试验材料及设备

伪狂犬病毒 gE 蛋白、酶标抗体、抗伪狂犬病 gE 蛋白阳性血清、抗伪狂犬病 gE 蛋白阴性血清;抗原包被液、洗涤液、样品稀释液、酶标结合物稀释液、底物液、终止液配制方法参见附录 B;酶标反应板、37 °C 恒温培养箱、酶标仪。

7.2.2 简要操作流程

7.2.2.1 包被抗原

以伪狂犬病毒 gE 蛋白作为包被酶标反应板的抗原。

7.2.2.2 包被酶标反应板

用包被液稀释抗原,通过方阵滴定法确定最佳包被抗原浓度作为工作浓度。将工作浓度的抗原加到 96 孔酶标反应板上,每孔 200 μ L,于 4 °C 包被 18 h,然后用洗涤液洗板 3 次,包被好的酶标反应板置于一20 °C 或-70 °C 保存备用。

7.2.2.3 检测程序

检测操作见 7.1.2.3,结果判定见 7.1.3。

8 乳胶凝集试验

8.1 试验材料及设备

伪狂犬病乳胶凝集试验抗原:由灭活伪狂犬病毒致敏乳胶颗粒的悬液,呈白色均匀的乳状。
伪狂犬病标准阳性血清、伪狂犬病标准阴性血清,稀释液配制方法参见附录 B。
载玻片、微量移液器及吸头。

8.2 操作方法

8.2.1 对照试验

取 15 μ L~20 μ L 伪狂犬病乳胶凝集试验抗原,分别与等量阴性血清、阳性血清在洁净的玻片上混匀,如在 5 min 内分别出现如下判定标准中的不凝集和等于/高于 50%凝集,则对照组成立,可进行待检血清的检测。

8.2.2 待检血清的检测

不需对待检血清热灭活或其他方式的灭活处理即可进行定性检测。取 15 μ L 待检血清,与等量伪狂犬病乳胶凝集试验抗原在洁净干燥的载玻片上用竹签搅拌充分混合,在 3 min~5 min 内观察结果。

8.3 判定标准

反应后应出现以下几种凝集结果,以 50%以上凝集判为阳性结果:

- a) 100%凝集:混合液变清亮,凝集颗粒聚集在液滴的边缘;
- b) 75%凝集:混合液几乎变清亮,出现大的凝集颗粒;
- c) 50%凝集:混合液略混浊,出现较多的细小凝集颗粒;
- d) 25%凝集:混合液混浊呈乳白色,只出现少量的细小凝集颗粒;
- e) 0%凝集:混合液呈乳白色均匀一致的悬液,无凝集颗粒出现。

8.4 结果判定

待检血清出现 50%以上凝集,判为伪狂犬病抗体阳性,否则判为抗体阴性。在待检血清为抗体阴性,且血清来源动物接受过免疫接种的情况下,则可用血清中和试验或酶联免疫吸附试验进一步检测,对出现以下三种情况的结果判定:

- a) 血清中和试验或酶联免疫吸附试验结果为阴性,则判为伪狂犬病抗体阴性;
- b) 血清中和试验或酶联免疫吸附试验结果为可疑,应在间隔 2 周后再检测,在乳胶凝集试验、血清中和试验或酶联免疫吸附试验为阴性或可疑时,则判为阴性;三种方法中任一结果为阳性,则判为阳性;
- c) 血清中和试验或酶联免疫吸附试验结果为阳性,则判为伪狂犬病抗体阳性。

9 免疫荧光试验

9.1 试验材料及设备

伪狂犬病毒荧光抗体、猪伪狂犬病阳性血清、猪伪狂犬病阴性血清、伪狂犬病毒的敏感细胞系(如:PK15 细胞、BHK-21 细胞);荧光显微镜、冷冻切片机、恒温培养箱、离心机、高压灭菌器、微量移液器、洁净载玻片、盖玻片、眼科镊子。

9.2 操作方法

9.2.1 标本制作

对于新鲜采集的病料,可以制备触片、压片或冷冻切片;对于待检样品接种细胞后检测的,可以在接种时放置洁净无菌的载玻片来制备细胞飞片。随后用预冷的丙酮固定 10 min,自然干燥后冷藏备用。

9.2.2 免疫荧光检测

将上述处理的标本在 PBS 液中浸润,然后用吸水纸去除周边多余液体,放入湿盒。滴加工作浓度的伪狂犬病荧光抗体到待检标本上,37 ℃ 恒温箱中作用 30 min。随后用 PBS 液漂洗待检标本 3 次,每次 3 min,用吸水纸去除周边多余液体,自然干燥后于荧光显微镜下检查。

9.3 结果判定

在将待检冰冻切片、压片或组织培养玻片置于荧光显微镜下镜检判定结果时,应该注意出现荧光的颜色和在细胞中的分布部位。用异硫氰酸荧光黄(FITC)标记的荧光抗体,在荧光显微镜下应发出亮绿色荧光,凡是呈现暗绿色或黄色的荧光,则为非特异性荧光。阳性特异性荧光应该出现在细胞浆中,如果在细胞浆外或细胞核内出现荧光,则不能判为阳性。判定结果标准如下:

- a) 在细胞浆中出现亮绿或黄绿荧光者,判为阳性;
- b) 在细胞浆中未出现亮绿或黄绿荧光者,判为阴性;
- c) 在细胞浆中出现微弱亮绿或黄绿荧光者,判为可疑,需要进行重复试验。如果重复试验中,在细胞浆中依然出现微弱亮绿或黄绿荧光者,判为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
病毒分离鉴定溶液的配制

A.1 DMEM 培养液

取 DMEM 培养基粉末 13.5 g 溶于 950.0 mL 去离子水中,轻轻搅拌至完全溶解后,加入 3.7 g 碳酸氢钠(NaHCO_3),用 1.0 mol/L 盐酸(HCl)调 pH 值至 6.8~7.0,加去离子水定容至 1 000 mL,立即用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌后,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.2 DMEM 生长液

在 DMEM 培养液中加入 10% 的新生犊牛血清(经 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 灭能)、200 IU/mL 的青霉素,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.3 DMEM 维持液

在 DMEM 培养液中加入 3% 的新生犊牛血清(经 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 灭能)、200 IU/mL 的青霉素,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉素,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

附 录 B
(资料性附录)

病毒 TCID₅₀ 计算公式及酶联免疫吸附试验溶液的配制

B.1 病毒 TCID₅₀ 的计算

按照表 B.1(举例说明)进行细胞病变孔数等统计,计算出各个稀释度的细胞病变百分比。

表 B.1

病毒稀释度	细胞病变情况		累计孔数		细胞总孔数	出现细胞病变 百分比/%
	病变孔数	未病变孔数	病变孔数	未病变孔数		
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
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)0.0

按式(B.1)、式(B.2)计算该病毒的 TCID₅₀：

距离比 = $\frac{\text{高于 } 50\% \text{ 病变百分数} - 50}{\text{高于 } 50\% \text{ 病变百分数} - \text{低于 } 50\% \text{ 病变百分数}}$ (B.1)

-lgTCID₅₀ = 高于 50% 稀释度对数 + 距离比 × 稀释度对数(B.2)

从此列表中可见该病毒的 TCID₅₀在 10⁻⁶(84.6%)和 10⁻⁷(45.4%)之间,按上述公式计算：

代入公式:距离比 = $\frac{84.6 - 50}{84.6 - 45.4} = 0.88$
-lgTCID₅₀ = -6 + 0.88 × (-1) = -6.88
所以:TCID₅₀ = 10^{-6.88}/0.1 mL

注：由于稀释病毒时采用 10 倍系列稀释(10⁻¹)，其稀释度的对数是 -1；试验中，每孔加入的病毒液使用量是 0.1 mL。

B.2 抗原稀释液

分别称取三羟甲基氨基甲烷(Tris)12.114 g、乙二胺四乙酸(EDTA)0.585 g、氯化钠(NaCl)0.009 g，用 900 mL 双蒸水充分溶解，调节 pH 值至 9.6，最终定容至 1 000 mL。

B.3 洗涤液

在 900 mL 双蒸水中加入，混匀后定容至 1 000 mL。

B.4 样品稀释液(PBS/Tween)

首先称取磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)138 g 溶解于双蒸水中,并定容至 1 000 mL,配制 1 mol/L 的磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)贮液;称取磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)142 g 溶解于双蒸水中,并定容至 1 000 mL,配制 1 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)贮液。

取 280 mL 1 mol/L 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)贮液、720 mL 1 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)贮液、0.5 mL 吐温-20,混匀即为 pH7.2 的样品稀释液(PBS/Tween)。

B.5 酶标结合物稀释液

在 1 000 mL 样品稀释液(PBS/Tween)中加入 10 g 牛血清白蛋白(BSA)。

B.6 底物液(OPD/ H_2O_2)

首先配制 0.1 mol/L pH5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液,称取磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)71.6 g、柠檬酸 19.2 g,充分溶解于 900 mL 双蒸水中,并定容至 1 000 mL。

取邻苯二胺(OPD)0.04 g、30%过氧化氢(H_2O_2)0.15 mL,溶解于 0.1 mol/L pH5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液中,定容至 100 mL。底物溶液对光敏感,应避免强光直射,且现配现用。

B.7 终止液(2 mol/L 硫酸)

将 22.2 mL 硫酸(H_2SO_4)缓慢加入到 177.8 mL 双蒸水中混匀。
