



中华人民共和国国家标准

GB/T 21675—2022

代替 GB/T 21675—2008

非洲马瘟诊断技术

Diagnostic techniques for African horse sickness

2022-12-30 发布

2023-07-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 I

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 2

6 临床诊断 2

 6.1 易感动物 2

 6.2 临床症状 2

 6.3 病理变化 3

 6.4 临床判定 3

7 样品采集与处理 3

 7.1 样品采集 3

 7.2 样品处理 3

8 实验室诊断 3

 8.1 病原分离和鉴定 3

 8.2 RT-PCR 方法 4

 8.3 通用型 Real-time RT-PCR 方法 6

 8.4 型特异性 Real-time RT-PCR 方法 7

 8.5 间接 ELISA 抗体检测方法 8

 8.6 阻断 ELISA 抗体检测方法 9

9 综合判定 10

附录 A（规范性） 病毒分离相关溶液的配制 11

附录 B（资料性） 核酸检测用引物、探针序列信息 12

附录 C（规范性） 核酸检测相关溶液的配制 14

附录 D（规范性） 酶联免疫吸附试验相关溶液的配制 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 GB/T 21675—2008《非洲马瘟诊断技术》，与 GB/T 21675—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了“缩略语”一章(见第 4 章)；
- 增加了“生物安全措施”(见第 5 章)；
- 增加了“通用型 Real-time RT-PCR 方法”(见 8.3)；
- 增加了“型特异性 Real-time RT-PCR 方法”(见 8.4)；
- 增加了“阻断 ELISA 抗体检测方法”(见 8.6)；
- 删除了“乳鼠分离”(见 2008 年版的 4.1.4)；
- 删除了“微量补体结合反应”(见 2008 年版的 4.2.2)。

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

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、内蒙古自治区动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：吴晓东、李林、徐天刚、胡永新、邹艳丽、包静月、李金明、任炜杰、赵永刚、王淑娟、刘珊、巩明霞、左媛媛、于小静、马立峰、王建龙、王志亮。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2008 年首次发布为 GB/T 21675—2008；
- 本次为第一次修订。

引 言

非洲马瘟(African horse sickness,AHS)是由非洲马瘟病毒(African horse sickness virus,AHSV)引起的马科动物的一种非接触性传染的病毒性传染病,以呼吸系统和循环系统变化为特征,常使马、骡等致死,至少有2种库蠓可传播本病。AHSV属呼肠孤病毒科环状病毒属。目前已知该病有9个血清型。世界动物卫生组织(WOAH)将其列为须通报动物疫病。我国将其规定为一类动物疫病。

本病发生有一定的季节性和地域性,多见于温热潮湿季节,一旦传入常呈地方流行或暴发流行,传播迅速。厚霜、地势高燥、自然屏障等影响媒介昆虫繁殖或活动的气候、地理条件,可使本病显著减少。

本文件诊断技术内容包括临床诊断、病原学诊断方法和血清学诊断方法。

本文件的修订参考了WOAH《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2019),并结合了我国相关技术研究新成果。

非洲马瘟诊断技术

1 范围

本文件规定了非洲马瘟的临床诊断、样品采集与处理,以及病毒分离和鉴定、RT-PCR、通用型 Real-time RT-PCR、型特异性 Real-time RT-PCR、间接 ELISA 抗体检测、阻断 ELISA 抗体检测等实验室诊断方法的技术要求。

本文件适用于马、骡、驴和其他马科动物 AHS 的诊断、检测、检疫、监测和流行病学调查。

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。

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。

ABTS: 2, 2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (2, 2'-azino-di-[3-ethyl-benzothiazoline]-6-sulphonic acid)

AHS: 非洲马瘟 (African horse sickness)

AHSV: 非洲马瘟病毒 (African horse sickness virus)

CPE: 细胞病变效应 (cytopathic effect)

Ct: 循环阈值 (cycle threshold)

Cy5: 花青色荧光染料 (cyanine 5)

DMAB: 二甲基胺硼烷 [3-(dimethylamino) benzoic acid]

DEPC: 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid)

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

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxy-fluorescein)

HRP: 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase)

MBTH: 3-二甲基氨基苯甲酸 (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine)

MEM: 最低限度必需氨基酸营养液 (minimum essential medium)

MGB: 脱氧核糖核酸小沟结合物 (minor groove binder)

OD: 光密度 (optical density)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)

Real-time RT-PCR:实时反转录-聚合酶链反应(real-time reverse transcription-polymerase chain reaction)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-PCR:反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction)

SDS:十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)

TAE:三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液(Tris-acetic acid-EDTA buffer)

VIC:2'-氯-7'苯基-1,4-二氯-6-羧基-荧光素(2'-chloro-7'phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein)

5 生物安全措施

进行 AHS 诊断、检测时,如动物剖检、样品采集与处理、核酸提取等,按照 GB 19489 的规定执行。

6 临床诊断

6.1 易感动物

所有马科动物均可感染。已知马的易感性最高,病死率可高达 95%。骡的易感性次之。驴仅出现轻微发热反应。斑马具有抵抗力,除发热外其他临床症状不明显,可隐性带毒。

6.2 临床症状

6.2.1 最急性型或肺型

常见于马等高度易感动物,急性发作。潜伏期 3 d~5 d。特征为严重的渐进性呼吸道症状,初期仅表现为发热反应,最高体温可达 40℃~41℃,持续 1 d~2 d 降至常温,之后出现不同程度的呼吸困难,可见前腿分开,头前伸,鼻孔扩大。通常出汗较多,最后可见痉挛性咳嗽,同时从鼻孔流出泡沫样黄色液体,因自身浆液性液体而溺死。该型存活率通常不到 5%。

6.2.2 急性型或混合型

肺型和心型混合存在,临床多见。潜伏期 5 d~7 d。病初肺部有轻微症状,然后头部和颈部出现明显水肿,最后死于心力衰竭,或出现亚急性型症状,然后突发呼吸困难和其他临床表现。通常发热后 3 d~6 d 死亡,死亡率可达 70%。

6.2.3 亚急性型或水肿型、心型

潜伏期 7 d~14 d。发热持续 3 d~6 d,病初有发热反应,体温可达 39℃~41℃。发热后期,出现特征性水肿。水肿首先出现于颈部、眼上窝和眼睑,以后可扩展至嘴唇、面颊、舌部、下颌骨间、咽喉区,有时从颈部至胸部出现皮下水肿。严重时胸部和肩部都出现水肿。晚期可见结膜和舌腹侧、皮下出血点。最后变得烦躁不安,死于心力衰竭。一般在发热反应后 4 d~8 d 内死亡,死亡率约 50%。康复动物于 3 d~8 d 内水肿逐渐消失。

6.2.4 温和型

潜伏期 5 d~14 d。后期表现弛张热(39℃~40℃),持续 5 d~8 d。可能出现结膜轻度出血、脉搏加快、轻微厌食和精神抑郁。其他临床症状不明显。常见于具有抵抗力的马科动物,如斑马和驴。

6.3 病理变化

6.3.1 常见皮下和肌肉组织间出现胶样浸润,并以眶上窝和喉头尤为显著。

6.3.2 胃底黏膜肿胀,一直延伸至小肠前部。

6.3.3 咽、气管、支气管充满黄色浆液和泡沫,肺部、胸膜下和肺间质水肿,约有 2/3 病例表现为急性水肿。亚急性病例头部、颈部和肩部水肿严重。

6.3.4 心内膜和心包膜有血点和出血瘀斑、心肌变性。部分病例可见胸腔和心包积存大量黄白色-红色液体,淋巴结肿大、肝和胃出血。

6.4 临床判定

6.4.1 易感动物出现上述临床症状和病理变化,可临床判定为疑似 AHS 病例。

6.4.2 进一步确诊应采集发病期有明显临床症状动物的全血、血清及脾、肺、淋巴结等组织脏器,如有可能,应同时采集同一流行病学单元内其他未见明显临床症状易感动物的全血、血清进行实验室诊断。

7 样品采集与处理

7.1 样品采集

7.1.1 组织样品:无菌采集发病或死亡动物脾、肺、淋巴结等组织 25 g~50 g,装入样品保存管,加入 50%甘油-PBS 保存液,使保存液液面没过样品,加盖封口,冷冻保存。

7.1.2 血液样品:无菌采集发热动物 EDTA 抗凝血及无抗凝剂添加全血,每匹不少于 5 mL,密封后冷藏保存。

7.2 样品处理

7.2.1 组织样品

取脾、肺、淋巴结等组织病料各 2 g,剪碎后加入 10 mL PBS(含青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 μ g/mL)或细胞完全营养液充分研磨,制成 10%的组织悬浮液,4 $^{\circ}$ C 冰箱浸提 4h,3 000 r/min 离心 30 min,取上清液备用。经处理的样品当天使用,使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存,剩余样品置-80 $^{\circ}$ C 保存。

7.2.2 血液样品

7.2.2.1 EDTA 抗凝血:取 EDTA 抗凝血 200 μ L,用无菌 PBS 洗涤 2 次~3 次(1 000 r/min,离心 5min)收获红细胞,按 1:10 比例加入灭菌双蒸水进行裂解,再次离心(2 000 r/min,离心 5 min)取上清液,用 0.45 μ m 滤膜过滤备用。经处理的样品当天使用,使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存,剩余样品置-80 $^{\circ}$ C 保存。

7.2.2.2 无抗凝剂添加全血:按常规方法制备血清。使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存,剩余样品置-20 $^{\circ}$ C 保存。

8 实验室诊断

8.1 病原分离和鉴定

8.1.1 主要仪器和器材

8.1.1.1 生物安全柜。

8.1.1.2 恒温 CO₂ 细胞培养箱。

8.1.1.3 倒置生物显微镜。

- 8.1.1.4 台式低温高速离心机。
- 8.1.1.5 研钵和研杵(或组织匀浆机)。
- 8.1.1.6 细胞培养瓶。

8.1.2 主要试剂

- 8.1.2.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.4),按照附录 A 中 A.1 配制。
- 8.1.2.2 50%甘油-PBS 保存液,按照 A.2 配制。
- 8.1.2.3 青霉素,浓度为 10 000 IU/mL。
- 8.1.2.4 链霉素,浓度为 10 000 μ g/mL。
- 8.1.2.5 细胞完全营养液和维持液,按照 A.3 配制。

8.1.3 病毒分离

8.1.3.1 将处理过的样品上清液接种仓鼠肾细胞(BHK-21)、非洲绿猴肾细胞(Vero)等哺乳动物细胞或蚊子细胞(C6/36)等昆虫细胞,按常规方法分离病毒。每个样品接种 2 瓶细胞,另外设对照细胞 2 瓶。

8.1.3.2 接种 BHK-21 等哺乳动物细胞后,37 $^{\circ}$ C 吸附 60 min,再加入含 2%胎牛血清的细胞维持液,37 $^{\circ}$ C 培养并逐日观察。如接种后 2 d~10 d 不出现细胞变圆或脱落等细胞病变效应(CPE),应继续盲传 3 代。

8.1.3.3 若接种 C6/36 蚊子细胞,无 CPE 产生,但在接种 5 d~7 d 后的细胞培养上清液中可检测到病原核酸。可将此细胞培养上清液再次接种 BHK-21 等哺乳动物细胞,培养 1 代~2 代后可出现明显 CPE。

8.1.4 病毒鉴定

收获出现 CPE 的细胞培养物悬液,反复冻融 3 次,2 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液,选用 8.2 或 8.3 所述方法进行核酸鉴定和分析。

8.1.5 结果判定

- 8.1.5.1 细胞盲传 3 代未见细胞病变,且经 8.2 或 8.3 所述方法检测为阴性者,判定为病毒分离阴性。
- 8.1.5.2 出现细胞病变,且经 8.2 或 8.3 所述方法检测为阳性者,判定为病毒分离阳性。

8.2 RT-PCR 方法

8.2.1 主要仪器和器材

- 8.2.1.1 PCR 扩增仪。
- 8.2.1.2 台式低温高速离心机。
- 8.2.1.3 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。
- 8.2.1.4 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。
- 8.2.1.5 研钵和研杵(或组织匀浆机)。
- 8.2.1.6 微量可调移液器(2.5 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L 等不同规格)。
- 8.2.1.7 无 RNA 酶离心管和枪头。
- 8.2.1.8 PCR 扩增管。

8.2.2 引物及主要试剂

- 8.2.2.1 引物(序列信息见附录 B 中 B.1)。

- 8.2.2.2 DEPC 处理水,按照附录 C 中 C.1 配制。
- 8.2.2.3 TAE 缓冲液,按照 C.2 和 C.3 配制。
- 8.2.2.4 1%琼脂糖凝胶,按照 C.4 配制。
- 8.2.2.5 一步法 RT-PCR 反应缓冲液。
- 8.2.2.6 酶混合液(含反转录酶、*Taq* 酶和 RNase 抑制剂等)。
- 8.2.2.7 上样缓冲液。
- 8.2.2.8 阳性对照:体外转录法制备的 AHSV RNA 片段或 AHSV 细胞培养物。
- 8.2.2.9 阴性对照:BHK-21 等正常细胞对照或 AHSV 阴性动物 EDTA 抗凝血。

8.2.3 操作方法

8.2.3.1 病毒核酸提取

采用核酸提取试剂盒提取各类样本中的病毒核酸,或用自动化核酸提取仪提取各类样本中的病毒核酸。如在 2h 内检测可将提取的核酸置于冰上保存,否则应置于 -80°C 冰箱保存。

8.2.3.2 病毒核酸预变性

将 $5\ \mu\text{L}$ 样品核酸加热至 95°C 变性 5 min,然后冰浴 3 min。

8.2.3.3 反应体系配制

配制 $25\ \mu\text{L}$ 反应体系所需试剂如下:

- $12.5\ \mu\text{L}$ 的 $2\times$ 一步法 RT-PCR 反应缓冲液;
- $1.0\ \mu\text{L}$ 的正向引物 S7P1($10\ \mu\text{mol/L}$);
- $1.0\ \mu\text{L}$ 的反向引物 S7P2($10\ \mu\text{mol/L}$);
- $1.0\ \mu\text{L}$ 的酶混合液;
- $5.0\ \mu\text{L}$ 预变性的病毒核酸;
- $4.5\ \mu\text{L}$ 的 DEPC 处理水。

瞬时离心后,置 PCR 扩增仪内进行扩增。每次检测应设置阳性对照和阴性对照。

8.2.3.4 反应程序设置

50°C 反转录 30 min; 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 1 min, 55°C 退火 1.5 min, 72°C 延伸 1.5 min,40 个循环; 72°C 终延伸 7 min。

8.2.3.5 RT-PCR 扩增产物电泳

将 $5\ \mu\text{L}$ 的 $6\times$ 上样缓冲液加入至 RT-PCR 产物中,混匀后取 $8\ \mu\text{L}$ 加入至使用 $1\times$ TAE 缓冲液配制的 1%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。

8.2.3.6 试验成立条件

阳性对照应出现 1 179 bp 大小的特异性的扩增条带,阴性对照应无任何扩增条带。

8.2.3.7 结果判定

被检测样品出现 1 179 bp 大小的特异性的扩增条带,且与阳性对照条带分子质量大小相符,则该样品判为 AHSV 核酸阳性;被检样品无特异性的扩增条带,则判为 AHSV 核酸阴性。

8.3 通用型 Real-time RT-PCR 方法

8.3.1 主要仪器和器材

- 8.3.1.1 荧光 PCR 扩增仪。
- 8.3.1.2 台式低温高速离心机。
- 8.3.1.3 研钵和研杵(或自动匀浆机)。
- 8.3.1.4 微量可调移液器(2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。
- 8.3.1.5 无 RNA 酶离心管和枪头。
- 8.3.1.6 PCR 扩增管。

8.3.2 引物、探针及主要试剂

- 8.3.2.1 引物和探针(序列信息见 B.2)。
- 8.3.2.2 一步法 Real-time RT-PCR 反应缓冲液。
- 8.3.2.3 酶混合液(含反转录酶、*Taq* 酶和 RNase 抑制剂等)。
- 8.3.2.4 DEPC 处理水。
- 8.3.2.5 阳性对照:体外转录法制备的 AHSV RNA 片段或 AHSV 细胞培养物。
- 8.3.2.6 阴性对照:BHK-21 等正常细胞对照或 AHSV 阴性动物 EDTA 抗凝血。

8.3.3 操作方法

8.3.3.1 病毒核酸提取

同 8.2.3.1。



8.3.3.2 病毒核酸预变性

同 8.2.3.2。

8.3.3.3 反应体系配制

配制 25 μL 反应体系所需试剂如下:

- 12.5 μL 的 $2\times$ 一步法 Real-time RT-PCR 反应缓冲液;
- 1.0 μL 的上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$);
- 1.0 μL 的下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$);
- 0.5 μL 的探针(10 $\mu\text{mol/L}$);
- 1.0 μL 的酶混合液;
- 5.0 μL 的预变性核酸;
- 4.0 μL 的 DEPC 处理水。

盖紧 PCR 管盖或封膜,瞬时离心后,置荧光 PCR 扩增仪内进行扩增。每次检测应设置阳性对照和阴性对照。

注意:反应体系可依据所用试剂盒的不同而适当改变。

8.3.3.4 反应程序设置

50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 45 s,40 个循环,在每一个循环的 60 $^{\circ}\text{C}$ 时收集 FAM 荧光信号。

注意:反应时间和温度可依据所用试剂盒的不同而适当改变。

8.3.4 试验成立条件

阳性对照的 Ct 值应 ≤ 30 且出现特异性扩增曲线,阴性对照无 Ct 值且无特异性扩增曲线,试验结果有效;否则应重新进行试验。

8.3.5 结果判定

被检样品 Ct 值 < 36 且出现特异性扩增曲线,判定为 AHSV 核酸阳性。无 Ct 值,则判为 AHSV 核酸阴性。当 $36 \leq \text{Ct 值} \leq 40$ 且出现特异性扩增曲线,则判为可疑。可疑样品应重新检测,重新检测结果无特异性扩增曲线或无 Ct 值则为 AHSV 核酸阴性,Ct 值 ≤ 40 且有明显特异性扩增曲线则判为 AHSV 核酸阳性。

8.4 型特异性 Real-time RT-PCR 方法

8.4.1 主要仪器和器材

同 8.3.1。

8.4.2 引物、探针及主要试剂

8.4.2.1 引物和探针

序列信息见 B.2。9 种血清型引物和探针分为 3 种组合,其中组合 1 包括血清 1 型、3 型和 4 型;组合 2 包括血清 2 型、5 型和 9 型;组合 3 包括血清 6 型、7 型和 8 型。

8.4.2.2 一步法 Real-time RT-PCR 反应缓冲液。

8.4.2.3 酶混合液(含反转录酶、*Taq* 酶和 RNase 抑制剂等)。

8.4.2.4 DEPC 处理水。

8.4.2.5 阳性对照:体外转录法制备的 AHSV RNA 片段或 AHSV 细胞培养物。

8.4.2.6 阴性对照:BHK-21 等正常细胞对照或 AHSV 阴性动物 EDTA 抗凝血。

8.4.3 操作方法

8.4.3.1 病毒核酸提取

按照 8.2.3.1 操作。

8.4.3.2 病毒核酸预变性

每个样品需分 3 个 PCR 管检测。取 5 μL 待检样品核酸溶液分别加入至 3 个 PCR 管,盖紧盖或封膜,95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min,然后冰浴 5 min。

8.4.3.3 反应体系配制

配制 25 μL 反应体系所需试剂如下:

- 12.5 μL 的 2 $\times$ 一步法 Real-time RT-PCR 反应缓冲液;
- 1.0 μL 的酶混合液;
- 3 种上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$,各 0.5 μL);
- 3 种下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$,各 0.5 μL);
- 3 种探针(10 $\mu\text{mol/L}$,各 0.3 μL);
- 5.0 μL 的预变性核酸;

——2.6 μL 的 DEPC 处理水。

盖紧 PCR 管盖或封膜,瞬时离心后,置荧光 PCR 扩增仪内进行扩增。每次检测应设置阳性对照和阴性对照。

注意:反应体系可依据所用试剂盒的不同而适当改变。

8.4.3.4 反应程序设置

50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 15 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 45 s,40 个循环,在每一个循环的在 60 $^{\circ}\text{C}$ 时收集 FAM、VIC 和 Cy5 荧光信号。

注意:反应时间和温度可依据所用试剂盒的不同而适当改变。

8.4.4 试验成立条件

每种血清型阳性对照 Ct 值应 ≤ 30 且出现特异性扩增曲线,阴性对照无 Ct 值且无特异性扩增曲线,试验结果有效;否则应重新进行试验。

8.4.5 结果判定

被检样品某个血清型的 Ct 值 < 36 且出现特异性扩增曲线,判定为该血清型 AHSV 核酸阳性。无 Ct 值,则判为 AHSV 该血清型核酸阴性。当 $36 \leq \text{Ct 值} \leq 40$ 且出现特异性扩增曲线,则判为该血清型可疑。可疑样品应重新检测,重新检测结果无特异性扩增曲线或无 Ct 值则为 AHSV 该血清型核酸阴性,Ct 值 ≤ 40 且有明显特异性扩增曲线则为该血清型 AHSV 核酸阳性。

8.5 间接 ELISA 抗体检测方法

8.5.1 主要仪器和器材

8.5.1.1 酶标仪。

8.5.1.2 恒温培养箱。

8.5.1.3 洗瓶或洗板机。

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

8.5.1.5 ELISA 反应板和枪头。

8.5.2 主要试剂

8.5.2.1 包被抗原:重组 AHSV VP7 蛋白。

8.5.2.2 酶标二抗:HRP 标记的兔抗马 IgG。

8.5.2.3 对照:AHS 阳性对照血清、AHS 阴性对照血清。

8.5.2.4 包被缓冲液:0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液,pH9.6,按照附录 D 中 D.1 配制。

8.5.2.5 洗涤缓冲液:含 0.05%吐温-20 的 0.01 mol/L PBS,pH7.4,按照 D.2 配制。

8.5.2.6 封闭缓冲液及抗体稀释液:含 3%牛血清白蛋白(BSA)的 0.01 mol/L PBS,pH7.4,按照 D.3 配制。

8.5.2.7 底物溶液:MBTH/DMAB 溶液,按照 D.4 配制。

8.5.2.8 终止液:1.5 mol/L 浓硫酸,按照 D.5 配制。

8.5.3 操作方法

8.5.3.1 包被酶标板:用包被缓冲液将重组 AHSV VP7 抗原稀释至终浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

8.5.3.2 洗板:酶标板用洗涤缓冲液洗涤 5 次,将酶标板在吸水材料上拍干。

8.5.3.3 封闭:酶标板每孔加入 200 μL 封闭缓冲液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。弃去孔内液体,将酶标板在吸水材料上拍干。

8.5.3.4 加样:将阳性对照血清、阴性对照血清和待检血清,用抗体稀释液做 1 : 25 稀释,酶标板每孔加入 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。按 8.5.3.2 冲洗酶标板。

8.5.3.5 加酶标二抗:用抗体稀释液将 HRP 标记的兔抗马 IgG 稀释至工作浓度,每孔加入 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。按 8.5.3.2 冲洗酶标板。

8.5.3.6 加底物溶液:每孔加入 100 μL 底物溶液,室温孵育 10 min。

8.5.3.7 加终止液:每孔加入 50 μL 终止液,终止显色反应。

8.5.3.8 读值:在酶标仪 600 nm 或 620 nm 波长处读取结果。

8.5.4 结果计算与判定

临界值 = 阴性对照读值 + 0.06 (该值为 30 份阴性血清的标准差);如待检血清光吸收值 < 临界值,判为阴性;如待检血清光吸收值 > 临界值 + 0.15,判为阳性;如临界值 $\leq$ 待检血清光吸收值 $\leq$ 临界值 + 0.15,判为可疑。对结果可疑样品应进行复检,如复检结果仍为可疑,则于 2 周后重新采样检测。

8.6 阻断 ELISA 抗体检测方法

8.6.1 主要仪器和器材

同 8.5.1。

8.6.2 主要试剂

8.6.2.1 包被抗原:同 8.5.2.1。

8.6.2.2 酶标二抗:HRP 标记的抗 VP7 单克隆抗体。

8.6.2.3 对照:AHS 阳性对照血清、AHS 阴性对照血清。

8.6.2.4 包被缓冲液:同 8.5.2.4。

8.6.2.5 洗涤缓冲液:同 8.5.2.5。

8.6.2.6 封闭缓冲液及抗体稀释液:同 8.5.2.6。

8.6.2.7 底物溶液:ABTS 底物溶液,按照 D.6 配制。

8.6.2.8 终止液:2% SDS,按照 D.7 配制。

8.6.3 试验程序

8.6.3.1 包被酶标板:用包被缓冲液将重组 AHSV VP7 抗原稀释终浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

8.6.3.2 洗涤:酶标板用洗涤液洗涤 5 次,将酶标板在吸水材料上拍干。

8.6.3.3 封闭:酶标板每孔加入 200 μL 封闭缓冲液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h。弃去孔内液体,将酶标板在吸水材料上拍干。

8.6.3.4 加样:将阳性对照血清、阴性对照血清和待检血清,用抗体稀释液做 1 : 5 稀释,酶标板每孔加入 100 μL ,阴、阳性对照各加 2 孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。按 8.6.3.2 洗涤酶标板。

8.6.3.5 加酶标二抗:用抗体稀释液将 HRP 标记的抗 VP7 单克隆抗体稀释至工作浓度,每孔加入 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。按 8.6.3.2 洗涤酶标板。

8.6.3.6 加底物溶液:每孔加入 100 μL 底物溶液,室温孵育 10 min。

8.6.3.7 加终止液:每孔加入 100 μL 终止液,终止显色反应。

8.6.3.8 读值:在酶标仪 405 nm 波长处读取结果。

8.6.4 阻断率计算方法

样品阻断率(blocking percentage)按式(1)计算:

$$BP_s = \frac{(OD_{405-NC} - OD_{405-S})}{(OD_{405-NC} - OD_{405-PC})} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

BP_s ——待检血清样品阻断率;

OD_{405-NC} ——阴性对照血清样品在 405 nm 波长处的 OD 值;

OD_{405-S} ——待检血清样品在 405 nm 波长处的平均 OD 值;

OD_{405-PC} ——阳性对照血清样品在 405 nm 波长处的平均 OD 值。

8.6.5 试验成立条件

阳性对照 $OD_{405-PC} < 0.2$, 且阴性对照 $OD_{405-NC} > 1.0$, 说明试验条件成立。

8.6.6 结果判定

在试验成立的前提下,待检样品阻断率 > 50 , 判为 AHSV 抗体阳性;样品阻断率 < 45 , 判为 AHSV 抗体阴性; $45 \leq$ 样品阻断率 ≤ 50 , 判为可疑。对结果可疑样品应进行复检,如复检结果仍为可疑,则于 2 周后重新采样检测。

注意:阻断率临界值可依据所用试剂盒的不同而做适当改变。

9 综合判定

9.1 经 6.4 判定为疑似 AHS 病例,8.2、8.3 任一项检测为 AHSV 核酸阳性的可判定为 AHS 确诊病例;若 8.2 检测为 AHSV 核酸阴性的,需按照 8.3 进行复检,若检出 AHSV 核酸阳性,可判为 AHS 确诊病例。

9.2 无明显临床症状的马科动物,8.2、8.3 任一项检测为 AHSV 核酸阳性的可判定为 AHS 感染;如 8.2 检测为 AHSV 核酸阴性的,需按照 8.3 进行复检,若检出 AHSV 核酸阳性,可判为 AHS 感染。

9.3 经 9.1 判定为 AHS 确诊病例或 9.2 判定为 AHS 感染,可再经 8.4 进行血清型鉴定。如检测为某血清型核酸阳性,可判定为该血清型核酸阳性;如同时出现几种血清型核酸阳性,可能为接种多价弱毒疫苗或混合感染。

9.4 经 8.5、8.6 任一项检测为 AHSV 抗体阳性的,可诊断为 AHSV 抗体阳性;如经 8.5 或 8.6 检测结果为疑似,应进行复检,如果仍为可疑,应于 2 周后重新采样检测。

附录 A
(规范性)
病毒分离相关溶液的配制

A.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)

称取 8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.20 g 氯化钾(KCl)、1.42 g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.27 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),加去离子水溶解至 1 000 mL,调整 pH 至 7.4,103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min,室温保存。

A.2 50% 甘油-PBS 保存液(pH 7.4)

将 0.01 mol/L PBS 与纯甘油(分析纯)等量混合,调整 pH 至 7.4,分装为小瓶,103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。室温或 4 °C 保存。

A.3 细胞完全营养液和维持液

A.3.1 MEM 基础营养液

称取 9.5 g MEM 干粉和 2.2 g 碳酸氢钠(NaHCO_3),加去离子水溶解至 1 000 mL,充分混匀,过滤除菌后 4 °C 保存备用。

A.3.2 200 mmol/L 谷氨酰氨溶液(母液)

称取 2.923 g 谷氨酰氨(L-glutanin),加去离子水配制成 100 mL 的溶液。

A.3.3 细胞完全营养液(pH 7.2)

取 900 mL 的 MEM 基础营养液加 100 mL 的灭活胎牛血清混合,配制成 1 000 mL 的溶液,加入青霉素至终浓度 100 IU/mL,链霉素至终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,谷氨酰氨至终浓度 2 mmol/L,4 °C 保存备用。

A.3.4 细胞维持液(pH 7.2)

1 000 mL 的 MEM 基础营养液,加入青霉素至终浓度 100 IU/mL,链霉素至终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,谷氨酰氨至终浓度 2 mmol/L,4 °C 保存备用。

附 录 B
(资料性)
核酸检测用引物、探针序列信息

B.1 RT-PCR 引物

表 B.1 列出了 RT-PCR 引物信息。

表 B.1 RT-PCR 引物信息表

引物名称	 引物序列(5'-3')	产物大小/bp	基因
S7 P1	GTTAAAATTCGGTTAGGATG	1 179	VP7
S7 P2	GTAAGTGTATTCGGTATTGA		

B.2 Real-time RT-PCR 引物和探针

表 B.2 列出了 Real-time RT-PCR 通用型引物和探针信息。

表 B.2 Real-time RT-PCR 引物和探针通用型信息表

引物/探针名称	引物序列(5'-3')	基因
VP7-R1	AGAGCTCTTGTGCTAGCAGCCT	VP7
VP7-R2	GAACCGACGCGACACTAATGA	
VP7-P	FAM-TGCACGGTCACCGCT-MGB	

表 B.3 列出了 Real-time RT-PCR 型特异性引物和探针信息。

表 B.3 Real-time RT-PCR 引物和探针型特异性信息表

引物探针组合	血清型	引物/探针名称	引物序列(5'-3')	基因
组合 1	1	1F	TGAACATAAAACAAACGGTGAGTGA	VP2
		1R	GGTTAGAGGCGCTCGGTTCT	
		1P	FAM-CAGTTGAAAAAGAAACAAG-MGB	
	3	3F	CAAATAATGGTACGTGGAGTAAGCA	
		3R	TTCTTCTTTTGTTCCTCGTTCAAA	
		3P	VIC-AAAGCGGAAGTTAAGAAG-MGB	
	4	4F	CATATAAAGGAGGTAACCGAGAACTG	
		4R	GGCATGGTTGTCCTCCATTT	
		4P	Cy5-AGAAAGCGCAAACCG-MGB	
组合 2	2	2F	ACATTGATAGGTTTAGCCGGAAGTT	
		2R	CACTTTTTGTGTTGTGTTTCGTTCCA	
		2P	FAM-CAAGAYGAATATTGATCCAA-MGB	
	5	5F	ACAAGAAAAAGGTACAAGAGCAGTTAGA	
		5R	CCATTACTTTATACGGTTCGTTATTGTT	
		5P	VIC-AGGCGCAAAAGAA-MGB	
	9	9F	CAGAGAGAGGATGCAGAAAGAACA	
		9R	CGCCATCAACTTGGATCTTTAAG	
		9P	Cy5-AGCGCGAATTCCAA-MGB	
组合 3	6	6F	TTAATCCGAACCACCAAACG	
		6R	GAGGTTTATTATTGTTGCCTTGC	
		6P	FAM-TGATCAAATGAATCGTGCGC-MGB	
	7	7F	GATGGCGGAAAAGCTAAAGGA	
		7R	GGCACTAGCATCGGACGATT	
		7P	VIC-AGCAACAGAAAAAC-MGB	
	8	8F	ACGGCGAAAATTGGAAAAAA	
		8R	TGCGCTTCATTCAAACGTTCT	
		8P	Cy5-ATAAGGCGGAAGTCC-MGB	

附录 C

(规范性)

核酸检测相关溶液的配制

C.1 DEPC 处理水

取 1 mL DEPC 加入去离子水至终体积 1 000 mL,充分混匀后将瓶盖拧松,置于 37 ℃放置过夜,高压灭菌。室温或 4 ℃保存备用。

C.2 50×TAE 贮存液

取 242 g 的 Tris 碱、37.2 g 的 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、57.1 mL 的冰乙酸,加 800 mL 去离子水充分溶解,混匀后加去离子水定容至 1 000 mL。室温保存。

C.3 1×TAE 缓冲液

使用前将 50×TAE 做 50 倍稀释即可。

C.4 1%琼脂糖凝胶

称取 1.0 g 琼脂糖放入 100 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液中,加热融化,待温度降至 60 ℃左右,加入 2.5 μL 核酸染料 Gold View(10 mg/mL),混匀后制备凝胶块。

附录 D

(规范性)

酶联免疫吸附试验相关溶液的配制

D.1 包被缓冲液——0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)

称取 0.318 g 碳酸钠(Na_2CO_3)、0.558 g 碳酸氢钠(NaHCO_3),加去离子水至总体积 200 mL,充分混匀,过滤除菌,室温保存备用。

D.2 洗涤缓冲液——含 0.05%吐温-20 的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)

取 0.5 mL 的吐温-20 加入 1 000 mL 的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中,充分混匀,现配现用。

D.3 封闭缓冲液及抗体稀释液——含 3%BSA 的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)

称取 3 g 牛血清白蛋白(BSA),加入 100 mL 的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中,充分混匀,现配现用。

D.4 底物溶液(DMAB/MBTH)

称取 1.33 g 的 3-二甲基氨基苯甲酸(DMAB),加去离子水定容至 100 mL。

称取 27.96 g 的 3-甲基-2-苯并噻唑酮脲(MBTH),加去离子水定容至 100 mL。

取配制好的 DMAB 溶液、MBTH 溶液各 10 mL,以及 5 μL 的过氧化氢(H_2O_2)混匀。现配现用。

D.5 终止液(1.5 mol/L H_2SO_4)

取 8.3 mL 浓硫酸(H_2SO_4)缓慢加入 91.7 mL 去离子水中,混匀。现配现用。

D.6 底物溶液(ABTS)

D.6.1 A 液(0.1 mol/L 柠檬酸/磷酸盐缓冲溶液,pH 4.0)

称取 28.4 g 的磷酸氢二钠(Na_2HPO_4),加去离子水定容至 1 000 mL。

称取 21.01 g 的柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$),加去离子水定容至 1 000 mL。

分别取上述配制的磷酸氢二钠溶液 7.71 mL 与柠檬酸溶液 12.29 mL 混合。

D.6.2 B 液(5 mg/mL ABTS 溶液)

称取 50 mg 的 ABTS,溶解于 10 mL 去离子水中。

D.6.3 用法

使用时,将 A 液、B 液按 9 : 1 的比例混合,并加入终浓度为 0.03%过氧化氢(H_2O_2)。现配现用。

D.7 终止液(2%SDS)

称取 2 g 的十二烷基硫酸钠(SDS),加入约 80 mL 去离子水,待加热充分溶解后,定容至 100 mL,室温保存。
