



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 27621—2024

代替 GB/T 27621—2011

## 马鼻肺炎诊断技术

Diagnostic techniques for equine rhinopneumonitis

2024-11-28 发布

2025-06-01 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 .....	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 临床诊断 .....	2
6 样品采集、处理与保存 .....	2
7 实时荧光 PCR .....	4
8 病毒分离鉴定 .....	5
9 微量血清中和试验 .....	7
10 EHV-1/4 通用抗体间接 ELISA .....	9
11 EHV-1/4 分型鉴别间接 ELISA .....	10
12 综合判定 .....	12
附录 A (规范性) 试剂配制方法 .....	13
附录 B (资料性) 核酸检测用引物、探针序列信息 .....	14



## 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 27621—2011《马鼻肺炎病毒 PCR 检测方法》，与 GB/T 27621—2011 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 删除了 EHV 的 PCR 检测(见 2011 年版的第 7 章)；
- 增加了临床诊断(见第 5 章)；
- 增加了样品采集、处理与保存(见第 6 章)；
- 增加了实时荧光 PCR(见第 7 章)；
- 更改了病毒分离鉴定(见第 8 章,2011 年版的第 6 章)；
- 增加了微量血清中和试验(见第 9 章)；
- 增加了 EHV-1/4 通用抗体间接 ELISA(见第 10 章)；
- 增加了 EHV-1/4 分型鉴别间接 ELISA(见第 11 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：上海海关动植物与食品检验检疫技术中心、青岛海关技术中心、新疆农业大学、江苏农牧科技职业学院、广州海关技术中心。

本文件主要起草人：王艳、朱来华、刘建华、郑小龙、李健、胡月、武彩红、冯之航、薛俊欣、蔡一村、林颖峥、张强、王群、吴晓薇。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2011 年首次发布为 GB/T 27621—2011；
- 本次为第一次修订。

## 引 言

根据世界动物卫生组织(WOAH)中《陆生动物诊断试验和疫苗手册》定义,马鼻肺炎(Equine rhinopneumonitis, ER)是由亲缘关系密切的马甲疱疹病毒 1 型(Equid alphaherpesvirus-1, EHV-1)和马甲疱疹病毒 4 型(Equid alphaherpesvirus-4, EHV-4)引起的马属动物的几种高度传染性疫病的总称,在世界马群中呈地方性流行。EHV-1 感染被列入 WOAH 名录。

马甲疱疹病毒 1 型和马甲疱疹病毒 4 型隶属于疱疹病毒科  $\alpha$  亚科疱疹病毒水痘病毒属。病毒呈球形或不规则球形,直径为 120 nm~200 nm,内含 20 面体核衣壳。

EHV-1 感染马主要症状为上呼吸道感染、流产、新生驹死亡和神经症状;EHV-4 只感染马,引起发热、嗜睡、厌食、下颌淋巴结病变和大量浆液性、黏液脓性鼻腔分泌物等呼吸道症状。

马鼻肺炎诊断技术包括临床诊断、病原学检测和血清学检测方法。

本文件的修订参考了《陆生动物诊断试验与疫苗手册》(WOAH)的有关内容,并结合了我国相关技术研究新成果。



# 马鼻肺炎诊断技术

## 1 范围

本文件描述了 EHV-1 感染和 EHV-4 感染的临床诊断、样品采集与处理,以及实时荧光 PCR、病毒分离鉴定、微量血清中和试验、间接 ELISA 的方法。

本文件适用于 EHV-1 感染和 EHV-4 感染的诊断、监测。

## 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

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。

BHK-21:乳仓鼠肾细胞(Baby Hamster Kidney-21)

CPE:细胞病变反应(Cytopathic Effect)

Ct 值:循环阈值(Cycle Threshold)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

EDTA·Na<sub>2</sub>:乙二胺四乙酸二钠盐(Ethylene Diamine Teraacetic Acid Disodium Salt)

E-derm:马真皮成纤维细胞系(Equine-dermis Cell)

EHV-1:马疱疹病毒-1 型(Equine Herpesvirus-1)

EHV-4:马疱疹病毒-4 型(Equine Herpesvirus-4)

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

MDBK:牛肾细胞(Bovine Kidney Cell)

MEM:最低需要培养基(Minimum Essential Medium)

OD 值:光密度值(Optical Density)

PBS:磷酸盐缓冲生理盐水(Phosphate Buffer Saline)

PCR:聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction)

RK-13:兔肾细胞系(Rabbit Kidney Cell)

TCID<sub>50</sub>:半数组织感染量(Median Tissue Culture Infective Dose)

TE:TE 缓冲液(Tris-EDTA)

## 5 临床诊断

### 5.1 流行病学

5.1.1 马属动物是 EHV-1 和 EHV-4 的自然宿主。各种年龄的马均可感染,常发生于青年马匹,2 岁以下幼驹发病最多。

5.1.2 病马和恢复后的带毒马是本病的主要传染源。病毒存在于病马的鼻液、血液和粪便,以及流产马的胎膜、胎液和胎儿组织内。

5.1.3 EHV-1 存在于病马流产时的排出物中,通过直接接触(包括交配)和间接接触传播,可经子宫感染胎儿;EHV-4 存在于病马的鼻腔分泌物中,常经呼吸道和消化道传播。

### 5.2 临床症状

5.2.1 EHV-1 和 EHV-4 可引起呼吸系统原发性感染,导致呼吸道疾病,主要表现为发热、食欲不振、沉郁、流涕和呼吸困难。

5.2.2 EHV-1 可引起流产,也有个别报道可从流产胎儿分离得到 EHV-4。怀孕母马感染后突然发生不明原因的流产,同时伴有发热、沉郁等症状,流产胎儿一般为死胎,产出为活胎的多在数日后死亡。

5.2.3 EHV-1 感染还能引起神经症状。早期表现为突然共济失调、轻度瘫痪、尾部僵硬、尿失禁等,大多伴有发热、流产、呼吸系统症状。

### 5.3 病理变化

5.3.1 在气管、胃和小肠中有胶冻样黏膜皱壁,小肠的孤立淋巴滤泡和集合淋巴结肿大,有些地方出现浅表性烂斑或较深的溃疡。

5.3.2 早期流产的胎儿发生严重的自溶。后期流产的胎儿体表外观新鲜,皮下常有不同程度的水肿和出血,可视黏膜黄染。心肌出血,肺水肿和胸、腹水增量,脾脏肿大。肝包膜下散在针尖大到粟粒大灰黄色坏死灶。

5.3.3 表现血管炎、出血、血栓、缺血性神经元损伤等症状。

### 5.4 结果判定

出现上述流行病学特征、临床症状和病理变化的病例,可初步判定为疑似 EHV-1 感染或 EHV-4 感染,应进一步进行实验室检测确诊。

## 6 样品采集、处理与保存

### 6.1 仪器设备

6.1.1 组织研磨器。

### 6.2 试剂材料

6.2.1 一次性采血管(含有抗凝剂)。

6.2.2 一次性采血管(不含有抗凝剂)。

6.2.3 一次性采血针。

6.2.4 一次性采样拭子(鼻咽拭子)。

6.2.5 MEM 培养基。

- 6.2.6 PBS,按照附录 A 中 A.1 配制。
- 6.2.7 10 mL 采样管。
- 6.2.8 1.5 mL 离心管。
- 6.2.9 10 mL 注射器。
- 6.2.10 微孔滤膜器(0.45  $\mu\text{m}$ )。
- 6.2.11 抗生素储存液溶液,按照 A.2 配制。
- 6.2.12 组织研磨器。
- 6.2.13 淋巴细胞分离液(商品化试剂)。

### 6.3 样品采集

#### 6.3.1 样品的采集

按 NY/T 541 的要求执行。

#### 6.3.2 鼻咽拭子

以无菌鼻咽采样拭子探入动物鼻咽进行采样(最好在呼吸道症状急性期采集),放入 3 mL 预冷 PBS 或 MEM 于灭菌的 10 mL 采样管中。

#### 6.3.3 组织样品

无菌采集流产病例的胎盘或胎儿的肝、肺、胸腺、脾等。有神经症状死亡的动物采集脑或脊髓等组织样品或脑脊髓液。

#### 6.3.4 抗凝全血

用一次性采血针采集血液 10 mL~20 mL 放入一次性采血管(含有抗凝剂);抗凝剂可以使用柠檬酸盐、肝素或 EDTA,EDTA 是 PCR 检测的首选抗凝剂。

#### 6.3.5 血清

用一次性采血针采集血液 3 mL~5 mL 放入一次性采血管(不含抗凝剂)中。

### 6.4 样品保存

所有样本应置于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下,立即送往检测实验室,不能在 24 h 内处理的样品应置于-20  $^{\circ}\text{C}$ 。若需长期保存,应置于-70  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 6.5 样品处理

#### 6.5.1 核酸检测用样品

- 6.5.1.1 鼻咽拭子:鼻咽拭子浸出液可直接用于 PCR 检测或进行核酸提取后进行荧光 PCR 检测。
- 6.5.1.2 组织样品:取待检组织样品 2.0 g 于组织研磨器中充分研磨,加 10 mL PBS 混匀,在 4  $^{\circ}\text{C}$  下 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液转入无菌的 1.5 mL 离心管中,编号,进行核酸提取后进行荧光 PCR 检测。
- 6.5.1.3 全血样品:可直接提取核酸后进行荧光 PCR 检测,也可按照淋巴细胞分离液说明书提取外周单核细胞后进行荧光 PCR 检测,待检。

#### 6.5.2 病毒分离鉴定用样品

- 6.5.2.1 鼻咽拭子:将鼻咽拭子浸出液转移至无菌的 10 mL 注射器,将液体从拭子挤入无菌试管,也可

将浸出液通过灭菌的 0.45 μm 微孔滤膜器过滤入无菌试管,待检。

6.5.2.2 组织样品:将待检肝、肺、淋巴结等组织样品混合,在无菌条件下用灭菌的解剖剪将组织块剪碎成约 1 mm<sup>3</sup> 小块,置于无菌平皿中。加入含 1% 抗生素储存液的无血清 MEM 培养基,置于组织研磨器中研磨,1 000 r/min 离心 10 min,吸出上清,经无菌的 0.45 μm 微孔滤膜器过滤,取滤过液,保存、待检。

### 6.5.3 血清样品

自然凝固后无菌分离血清或 2 000 r/min 离心 5 min,取上清,待检。

## 7 实时荧光 PCR

### 7.1 仪器与设备

7.1.1 荧光 PCR 仪。

7.1.2 高速台式离心机。

7.1.3 瞬时离心机。

7.1.4 混匀器。

7.1.5 冰箱(2 ℃~8 ℃、-20 ℃)

### 7.2 试剂与材料

7.2.1 DNA 提取试剂盒。

7.2.2 荧光 PCR 预混液(探针法)。

7.2.3 透明薄壁 PCR 管(0.2 mL)或八联管。

7.2.4 引物和荧光探针:序列见附录 B,加 TE 水配制成 100 μmol/L 的储存液和 10 μmol/L 工作液。

7.2.5 阳性对照:EHV-1 或者 EHV-4 DNA 或者病毒分离培养物。

7.2.6 阴性对照:RK-13 等正常细胞对照或马鼻肺炎阴性动物鼻拭子液。

7.2.7 微量移液器(10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)。

7.2.8 吸头(1 000 μL、200 μL、20 μL、10 μL)。

### 7.3 DNA 提取

7.3.1 待检样品使用 6.5.1 中处理的样品。

7.3.2 按商品化 DNA 提取试剂盒的操作说明书,提取模板 DNA,提取的 DNA 应迅速进行 PCR 扩增,或置于-20 ℃冰箱保存。

### 7.4 实时荧光 PCR 反应

#### 7.4.1 反应体系

从试剂盒中取出相应的各种试剂,置于冰上融化,按照荧光 PCR 反应试剂配制反应体系,在样本处理区加入模板 DNA 样本。同时设置阴性对照和阳性对照。按表 1 配制相应反应体系。

表 1 实时荧光 PCR 反应体系

组分	体积/μL
2×实时荧光 PCR 缓冲液	10
上游引物	0.8

表 1 实时荧光 PCR 反应体系 (续)

组分	体积/ $\mu\text{L}$
下游引物	0.8
探针	0.4
模板 DNA	2
无核酸酶水	6
总体积	20

#### 7.4.2 反应程序

振荡混匀后瞬时离心后,置荧光 PCR 扩增仪内进行扩增。按下列程序进行反应: 37 °C 污染消化 2 min; 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 60 s, 40 个循环, 在每一个循环的 60 °C 收集荧光信号。

注: 反应体系、时间和温度随所用试剂盒的不同而适当改变。

#### 7.4.3 结果判定

##### 7.4.3.1 试验成立条件

阳性对照的 Ct 值应 $\leq 30$ , 且出现典型的扩增曲线, 阴性对照无 Ct 值或 Ct 值 $\geq 40$  且无典型扩增曲线, 则试验结果成立; 否则, 试验不成立。

##### 7.4.3.2 判定指标

被检样本 Ct 值 $\leq 35$ , 且出现典型的扩增曲线, 判定为 EHV-1 或 EHV-4 核酸阳性; 当无 Ct 值或 Ct 值 $\geq 40$ , 判为阴性; 当  $35 < \text{Ct 值} < 40$  且出现典型的扩增曲线, 判为疑似。对疑似样本, 应重复检测, Ct 值 $< 40$  且出现典型的扩增曲线即判为核酸阳性; 否则, 判定为核酸阴性。

##### 7.4.3.3 序列测定与比对

为了进一步验证检测结果, 可用荧光 PCR 上下游引物进行扩增, 并对产物进行序列测定, 并与已公开发表的 EHV-1 或 EHV-4 特异性片段序列进行同源性比对分析, 以确证检测结果。

## 8 病毒分离鉴定

### 8.1 仪器与设备

- 8.1.1 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(37 °C)。
- 8.1.2 冰箱(2 °C~8 °C、-20 °C、-70 °C)。
- 8.1.3 倒置显微镜。
- 8.1.4 生物安全柜。
- 8.1.5 恒温水浴锅(37 °C)。
- 8.1.6 离心机。

## 8.2 试剂与材料

- 8.2.1 胎牛血清。
- 8.2.2 MEM 培养基。
- 8.2.3 抗生素储存液溶液,按照 A.2 配制。
- 8.2.4 细胞染色液,按照 A.3 配制。
- 8.2.5 RK-13、BHK-21 或 MDBK。
- 8.2.6 马皮细胞或原代马胎儿肾细胞。
- 8.2.7 EHV-1 型和 EHV-4 型标准毒株。
- 8.2.8 细胞培养瓶。
- 8.2.9 微量可调移液器(100  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$ )。
- 8.2.10 胰酶。
- 8.2.11 细胞维持液,按照 A.4 配制。

## 8.3 试验程序

### 8.3.1 单层细胞的制备

EHV-4 分离应使用马源细胞培养才能获得有效分离,EHV-1 分离可使用多种细胞培养。用含 10%胎牛血清、1%抗生素储存液溶液的 MEM 培养基复苏 E-derm 等马源细胞和 RK-13、BHK-21 或 MDBK 等非马源细胞。使用胰酶等消化细胞,使细胞终浓度为每毫升  $5 \times 10^4$  个细胞。将稀释后的细胞加入 96 孔细胞培养板(100  $\mu\text{L}$ /孔),或取 8 mL~10 mL 接种至 25 mL 细胞培养瓶中。5% (体积分数)  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  培养至单层细胞。

### 8.3.2 样品接种

取 6.5.2 中的过滤液 0.5 mL 接种到 25  $\text{cm}^2$  细胞瓶中单层细胞上或取 50  $\mu\text{L}$  至 96 孔培养板中单层细胞上,5% (体积分数) $\text{CO}_2$  细胞培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h,移去上清液,细胞单层用 PBS 冲洗 2 次,加入 10 mL 维持液(25  $\text{cm}^2$  细胞瓶)或 100  $\mu\text{L}$ (96 孔培养板),置于 5% (体积分数) $\text{CO}_2$  细胞培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  继续孵育。

### 8.3.3 对照设置

设置阴性对照和阳性对照。阴性对照,不接种样品,仅加入 0.5 mL 维持液;阳性对照,接种 0.5 mL 的 60 倍稀释的标准病毒。

### 8.3.4 镜检观察

每天在倒置显微镜下观察细胞状态,记录观察结果。马甲疱疹病毒引起的 CPE 表现为细胞圆缩、脱落、裂解。

### 8.3.5 盲传

培养物培养 7 d 后,若无 CPE,培养物冻融一次,取 0.5 mL 在新的单层细胞上盲传一次。

### 8.3.6 细胞染色

培养物培养 7 d 后,若无 CPE,另可倒去培养液,加入细胞染色液,放置 15 min 后,自来水冲洗。完

整单层细胞染成蓝色,而被病毒感染破坏的细胞染色时形成不着色的空斑。

## 8.4 结果判定

### 8.4.1 试验成立条件

检查各种对照试验,阴性对照正常,无 CPE 或细胞染成蓝色;阳性对照出现明显的 CPE 或细胞不着色,试验成立。

### 8.4.2 结果观察

被检样品出现明显的 CPE,表现为细胞圆缩、脱落、裂解,或者细胞不着色,则判为病毒分离阳性,作进一步的鉴定;被检样品没有明显的 CPE,则判为阴性。

## 8.5 病毒鉴定

收集含有病毒的细胞悬液,按照第 7 章所列方法进行鉴定。

## 9 微量血清中和试验

### 9.1 仪器与设备

- 9.1.1 生物安全柜。
- 9.1.2 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(37 ℃)。
- 9.1.3 倒置显微镜。
- 9.1.4 冰箱(2 ℃~8 ℃、-20 ℃、-70 ℃)。
- 9.1.5 恒温水浴锅(37 ℃)。

### 9.2 试剂与材料

- 9.2.1 胎牛血清。
- 9.2.2 MEM 培养基。
- 9.2.3 胰酶。
- 9.2.4 抗生素储存液溶液,按照 A.2 配制。
- 9.2.5 细胞维持液,按照 A.4 配制。
- 9.2.6 细胞培养液,按照 A.5 配制。
- 9.2.7 RK-13 或 BHK-21 或 MDBK。
- 9.2.8 E derm 或原代马胎儿肾细胞。
- 9.2.9 EHV-1 型和 EHV-4 型标准毒株。
- 9.2.10 细胞培养瓶。
- 9.2.11 15 mL 离心管。
- 9.2.12 10 mL 注射器。
- 9.2.13 微量可调移液器(100 μL、1 000 μL)。
- 9.2.14 微量细胞培养板(96 孔)。
- 9.2.15 一次性移液管(1 mL、10 mL)。

9.3 试验方法

9.3.1 血清样品的灭活

试验前将 6.5.3 中血清样品置于 56 °C 水浴中灭活 30 min。

9.3.2 病毒滴度测定

9.3.2.1 中和病毒制备

将保持于液氮中的标准种毒株取出置于 4 °C 缓慢融化,将融化的种毒用细胞维持液做 60 倍稀释后,取 1 mL 接种于长成单层 RK-13(EHV-1)或 E-derm(EHV-4)细胞的细胞瓶中,37 °C 吸附 1 h,然后,先用维持液洗涤一次,再加入维持液,37 °C 培养 36 h~48 h,当 50%~75%细胞出现 CPE,即可收获病毒培养液,分装成 1 mL 后 -70 °C 冻存备用。

9.3.2.2 病毒滴度测定

9.3.2.2.1 滴度测定

在微量细胞培养板(96 孔)每孔加 100 μL 细胞培养液,用维持液将冻存病毒做 10 倍系列稀释,将 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>...10<sup>-8</sup> 稀释度病毒液分别取 25 μL 加入细胞培养板,每个稀释度重复 8 孔。每孔 100 μL 细胞(5×10<sup>5</sup> 个/mL),置 37 °C CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养,48 h 后初判,96 h 终判。如细胞对照正常,接种病毒的细胞出现 CPE,记录试验数据。

9.3.2.2.2 计算病毒滴度

以 Kärbe 法计算该批病毒的滴度。

病毒滴度按公式(1)计算:

lgTCID<sub>50</sub> = L - d(s - 0.5) ..... (1)

式中:

lgTCID<sub>50</sub> ——半数组织感染量对数值;

L ——最高稀释度的对数;

d ——稀释度对数之间的差;

s ——阳性孔比率和。

9.3.3 中和试验

9.3.3.1 在 96 孔细胞培养板上每孔加 40 μL 无血清的 MEM。取每一被检血清 40 μL,加于 A 行和 B 行两重复孔内。第 1 排作为血清毒性对照,第 2 排是被检血清的第 1 次稀释。从 B 行开始向下做倍比稀释,即混合后取 40 μL,加入下一孔,充分混合,同法依次稀释,直至最后一孔。同一血清加两孔做平行试验,每板可测定 6 个血清样。

9.3.3.2 每孔加 40 μL 适当稀释的 EHV-1 或 EHV-4 病毒(100TCID<sub>50</sub>/孔),A 排除外。血清的最终稀释度在加入病毒后的起始稀释度为 1 : 4。

9.3.3.3 另取一对照板,应包括已知滴度的阴性血清对照和阳性血清对照、细胞对照、病毒对照。病毒对照(病毒回归试验)用于计算使用中病毒精确用量的病毒滴定验证。

9.3.3.4 细胞培养板放置于 5%(体积分数) CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 37 °C 孵育 1 h。

9.3.3.5 将孵育好的细胞培养板,每孔移取 50 μL 至新的培养板中。每孔加 50 μL 备好的 E-derm 或

RK-13 细胞悬液( $5 \times 10^5$  个/mL), 5%(体积分数) CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中 37 ℃ 孵育 2 d~5 d。

9.3.3.6 镜检观察: 每天在倒置显微镜下观察细胞状态, 记录观察结果。马甲疱疹病毒引起的 CPE 表现为细胞圆缩、脱落、裂解。

9.3.3.7 细胞染色: 培养物培养 4 d~7 d 后, 若无 CPE, 另可倒去培养液, 加入 100 μL 细胞染色液, 放置 15 min 后, 自来水冲洗。完整单层细胞染成蓝色, 而被病毒破坏的单层细胞不着色。

9.3.3.8 检查细胞对照、阳性血清对照、血清细胞毒性对照中细胞是否正常或染成蓝色, 而阴性血清对照和病毒对照是否出现 CPE 或不着色, 同时病毒对照中每孔加入的病毒量是否在  $10^{1.5}$  TCID<sub>50</sub> ~  $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub> 之间。

## 9.4 结果判定

9.4.1 各种对照试验成立, 细胞对照、阳性血清对照、血清细胞毒性对照中细胞正常(无 CPE)或染成蓝色, 而阴性血清对照和病毒对照出现 CPE 或不着色, 同时病毒对照中病毒滴度与原测定滴度相差仍在  $10^{1.5}$  TCID<sub>50</sub> ~  $10^3$  TCID<sub>50</sub> 之间, 说明病毒稀释浓度符合微量血清中和试验的工作浓度。

9.4.2 未见细胞病变, 判定为病毒中和试验阳性; 病毒完全被中和(无 CPE)的血清最高稀释度是该血清的终点滴度。

9.4.3 出现细胞病变, 判定为病毒中和试验阴性。

9.4.4 微量血清中和试验主要基于急性期和恢复期双份血清的抗体效价是否显著上升(4 倍或以上)。出现临床症状(急性期)时应尽快采血, 作为第一份血样, 2 周~4 周后(恢复期)采集第二份血样。对比急性期和恢复期的两份血清抗体效价, 如效价升高 4 倍或以上, 则判定为动物近期 EHV 感染。

## 10 EHV-1/4 通用抗体间接 ELISA

### 10.1 仪器与设备

10.1.1 酶标仪。

10.1.2 洗板机。

10.1.3 恒温箱。

10.1.4 微孔板快速振荡器。

### 10.2 试剂与材料

10.2.1 EHV-1/4 型通用抗原。

10.2.2 包被液, 按照 A.6 配制。

10.2.3 PBST 洗涤液, 按照 A.7 配制。

10.2.4 封闭液, 按照 A.8 配制。

10.2.5 阳性对照血清(商品化试剂)。

10.2.6 阴性对照血清(商品化试剂)。

10.2.7 兔抗马 IgG 辣根过氧化物酶结合物(简称酶标抗体, 商品化试剂)。

10.2.8 底物溶液(商品化试剂)。

10.2.9 终止液, 按照 A.9 配制。

10.2.10 加样槽。

10.2.11 可调微量移液器(1 μL、100 μL)。

10.2.12 96 孔酶标板。

### 10.3 试验方法

- 10.3.1 用包被液稀释 EHV-1/4 型通用抗原,包被 96 孔酶标板,每孔 100 μL,置于 4 °C 过夜。
- 10.3.2 弃去孔内液体,每孔加入 300 μL PBST 洗涤液,甩去孔内 PBST 洗涤液,在洁净的吸水纸上轻拍干,如此重复洗 3 次;也可用洗板机进行洗板。
- 10.3.3 加入封闭液,每孔 200 μL,置 37 °C 恒温箱孵育 90 min。
- 10.3.4 同 10.3.2 进行第二次洗板。
- 10.3.5 用稀释液 1 : 100 稀释 6.5.3 中血清样品,每孔加入 100 μL;同样,分别取阳性对照血清、阴性对照血清 1 : 100 稀释后,依次加入每孔 100 μL(设置复孔)。每块板设阴性对照血清和阳性对照血清各两孔。37 °C 孵育 1 h。
- 10.3.6 同 10.3.2 进行第三次洗板。
- 10.3.7 用 PBST 稀释液将酶标抗体稀释至工作浓度,每孔加 100 μL,室温(10 °C ~ 30 °C)孵育 30 min。
- 10.3.8 同 10.3.2 进行第四次洗板。
- 10.3.9 每孔加 100 μL 新配制的底物溶液,室温(10 °C ~ 30 °C)避光孵育 15 min。
- 10.3.10 每孔加 100 μL 终止液,终止反应。
- 10.3.11 每孔加入终止液后 5 min 内读取 OD<sub>405nm</sub> 值(波长 405 nm 处的光密度值)。

### 10.4 样品 S/P 值计算方法

样品 S/P 值按公式(2)计算:

$$S/P = \frac{OD_s - OD_{\bar{N}C}}{OD_{\bar{P}C} - OD_{\bar{N}C}} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- S/P —— 样品数值;
- OD<sub>s</sub> —— 样品 OD 值;
- OD<sub>PC</sub> —— 阳性对照平均 OD 值;
- OD<sub>NC</sub> —— 阴性对照平均 OD 值。

### 10.5 试验成立条件

阳性对照血清两孔平均 OD<sub>405 nm</sub> 值大于 1.0,阴性对照血清两孔平均 OD<sub>405 nm</sub> 值小于 0.3 时,反应成立。

### 10.6 结果判定

计算血清样本的 S/P 值。若被检血清样本的 S/P 值 ≥ 0.3,判定为 EHV-1 或/和 EHV-4 抗体阳性。被检血清样品的 S/P 值 < 0.3,判定为 EHV-1 和 EHV-4 抗体阴性。

注:采用等效商品化试剂盒检测,按照使用说明书进行。

## 11 EHV-1/4 分型鉴别间接 ELISA

### 11.1 仪器与设备

- 11.1.1 酶标仪。
- 11.1.2 洗板机。

11.1.3 恒温箱。

11.1.4 微孔板快速振荡器。

## 11.2 试剂与材料

11.2.1 EHV-1 抗原:提纯的 EHV-1 特异性重组蛋白抗原。

11.2.2 EHV-4 抗原:提纯的 EHV-4 特异性重组蛋白抗原。

11.2.3 包被液,按照 A.6 配制。

11.2.4 PBST 洗涤液,按照 A.7 配制。

11.2.5 封闭液,按照 A.8 配制。

11.2.6 EHV-1 阳性对照血清和 EHV-4 阳性对照血清(商品化试剂)。

11.2.7 阴性对照血清(商品化试剂)。

11.2.8 兔抗马 IgG 辣根过氧化物酶结合物(简称酶标抗体,商品化试剂)。

11.2.9 底物溶液(商品化试剂)。

11.2.10 终止液,按照 A.9 配制。

11.2.11 加样槽。

11.2.12 单孔道和多孔道可调微量移液器(1  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ )。

11.2.13 96 孔酶标板。

## 11.3 试验方法

11.3.1 用包被液稀释 EHV-1 或 EHV-4 抗原,包被 96 孔酶标板,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 16 h~24 h。

11.3.2 弃去孔内液体,每孔加入 300  $\mu\text{L}$  PBST 洗涤液,甩去孔内 PBST 洗涤液,在洁净的吸水纸上轻拍干,如此重复洗 3 次;也可用洗板机进行洗板。

11.3.3 加入封闭液,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,置 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱孵育 90 min。

11.3.4 同 11.3.2 进行第二次选板。

11.3.5 用稀释液 1 : 100 稀释 6.5.3 中血清样品。分别取阳性对照血清、阴性对照血清和稀释后待检血清样品各 100  $\mu\text{L}$  依次加入每孔(设置复孔),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。

11.3.6 同 11.3.2 进行第三次选板。

11.3.7 用 PBST 稀释液将酶标抗体稀释至工作浓度,每孔加 100  $\mu\text{L}$ ,室温(10  $^{\circ}\text{C}$ ~30  $^{\circ}\text{C}$ )孵育 30 min。

11.3.8 同 11.3.2 进行第四次选板。

11.3.9 每孔加 100  $\mu\text{L}$  新配制的底物溶液,避光室温(10  $^{\circ}\text{C}$ ~30  $^{\circ}\text{C}$ )放置 10 min。

11.3.10 每孔加 100  $\mu\text{L}$  终止液,终止反应。

11.3.11 每孔加入终止液后 5 min 内读取 OD<sub>405nm</sub> 值。

## 11.4 样品 S/P 值计算方法

样品 S/P 值计算同 10.4。

## 11.5 试验成立条件

阳性对照血清两孔平均 OD<sub>405nm</sub> 值大于 1.0,阴性对照血清两孔平均 OD<sub>405nm</sub> 值小于 0.3 时,反应成立。

## 11.6 结果判定

计算血清样本的 S/P 值。若被检血清样本的 S/P 值  $\geq 0.3$ ,判定为 EHV-1 或 EHV-4 抗体阳性。

被检血清样品的  $S/P$  值  $< 0.3$ , 判定为 EHV-1 或 EHV-4 抗体阴性。

注：采用等效商品化试剂盒检测，按照使用说明书进行。

## 12 综合判定

12.1 依据第 5 章做出初步诊断，判为疑似 EHV-1 感染或者 EHV-4 感染。

12.2 经第 7 章或第 8 章方法检测为阳性时，判定为 EHV-1 感染或者 EHV-4 感染。

12.3 经第 9 章、第 10 章或第 11 章方法检测单份样品为阳性结果时，表明被检动物曾发生既往感染或疫苗接种，应间隔 14 d~28 d 再次采样，采用第 9 章的诊断方法，当中和抗体效价升高 4 倍或 4 倍以上时，且在第一次采样前 28 d 内未进行相应疫苗接种，则可判定为 EHV-1 或者 EHV-4 新近感染。

**附录 A**  
(规范性)  
试剂配制方法

**A.1 PBS(0.01 mol/L PBS, pH7.4)**

称取 8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.2 g 氯化钾(KCl)、1.42 g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、0.27 g 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),加去离子水溶解至 1 000 mL,调节 pH 至 7.4,103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min,室温(10 °C~30 °C)保存。

**A.2 抗生素储存液溶液**

用灭菌三蒸水配成每毫升 10 000 IU 青霉素和 10 mg 链霉素的抗生素贮存液,用微孔滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ )过滤除菌,分装成 2 mL/瓶,−20 °C 冻存备用。保存期不超过 60 d。

**A.3 细胞染色液**

2 mg/mL 结晶紫、10%(体积分数)福尔马林、45%(体积分数)甲醇和 45%(体积分数)水。

**A.4 细胞维持液**

含 2%灭活的无菌胎牛血清(FBS)的 MEM 培养基。

**A.5 细胞培养液**

含 10%灭活的无菌胎牛血清(FBS)的 MEM 培养基。

**A.6 包被液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6)**

称取 1.59 g 碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )、2.93 g 碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ ),将其溶于约 950 mL 去离子水中,调节 pH 至 9.6,定容至 1 000 mL。4 °C 保存备用。

**A.7 PBST 洗涤液(含 0.01 mol/L PBS 和 0.05 %吐温-20, PH7.4)**

称取 8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.2 g 氯化钾(KCl)、1.42 g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、0.27 g 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),0.5 mL 吐温-20,加去离子水溶解至 1 000 mL,调节 pH 至 7.4,现用现配。

**A.8 封闭液**

脱脂乳 5 g,加 PBST 定容至 100 mL,现用现配。

**A.9 终止液(2 mol/L 硫酸溶液)**

取分析纯浓硫酸(体积分数 95%~98%)22.2 mL 缓缓加入 177.8 mL 蒸馏水中,混匀即成 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止液。

附录 B

(资料性)

核酸检测用引物、探针序列信息

B.1 实时荧光 PCR 方法引物与探针

表 B.1 列出了实时荧光 PCR 引物信息。

表 B.1 实时荧光 PCR 引物信息表

扩增对象	引物名称	序列
EHV1 第一对引物(针对 ORF 基因)	EHV-1 F1	5'-CGTATTGGCATCTGAACCGC-3'
	EHV-1 R1	5'-CTACACGCCTTTGGTAGGG-3'
	EHV-1 P1	5'-FAM-CCCATAGTGGTACGCTCCGCCGATCTCT-BHQ1-3'
EHV1 第二对引物(针对 gC 基因)	EHV-1 F2	5'-GCGGGCTCTGACAACACAA-3'
	EHV-1 R2	5'-TTGTGGTTTCATGGGAGTGTGTA-3'
	EHV-1 P2	5'-FAM - TAACGCAAACGGTACAGAA-BHQ1-3'
EHV4 引物	EHV-4 F	5'-TAGCAAACACCCACTAATAATAGCAAG-3'
	EHV-4 R	5'-GCTCAAATCTCTTTATTTTATGTCATATGC-3'
	EHV-4 P	5'-JOE-CGGAACAGGAACTCACTTCAGAGCCAGC-BHQ1-3'

B.2 特异性扩增片段序列

B.2.1 EHV-1 第一对引物特异性扩增序列(99 bp)

CGTATTGGCATCTGAACCGCTTGAATACCCATAGTGGTACGCTCCGCCGATCTCTAC  
AGATTTTCATCGAGTTTATTGACCCTACCAAAGGCGTGTAG

B.2.2 EHV-1 第二对引物特异性扩增序列(64 bp)

GCGGGCTCTG ACAACACAAC TAACGCAAAC GGTACAGAAT CTACACACTC CCAT-  
GAAACCACAA

B.2.3 EHV-4 特异性扩增片段序列(96 bp)

TAGCAAACACCCACTAATAATAGCAAGCAGGCTGGCTCTGAAGTGAGTTCCTGTTCCGT  
TTGCGGCGCATATGACATAAAATAAAGAGATTTGAGC





