

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 548—2002

猪传染性胃肠炎诊断技术

Diagnostic techniques for transmissible gastroenteritis

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis,简称 TGE)是由冠状病毒属中的猪传染性胃肠炎病毒导致的高度传染性猪胃肠道病。以呕吐、水样腹泻为临床特征,不同年龄的猪都易感,但一周龄以内的仔猪死亡率可达 100%,随着年龄的增大,死亡率逐渐下降。大多数养猪国家都有本病发生,给养猪业造成巨大的经济损失。世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health (英),Office International des Epizootic (法),OIE]将 TGE 定为 B 类传染病,是我国法定检疫的疫病。

本标准主要参考了世界动物卫生组织《诊断试验和疫苗标准手册》(2000)及国内外发表的同类研究试验报告。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:马思奇、王明、冯力、佟有恩。

猪传染性胃肠炎诊断技术

1 范围

本标准规定了猪传染性胃肠炎的病毒分离鉴定与检测病毒抗原的直接免疫荧光法、双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)及检测血清抗体的中和试验、间接 ELISA 试验技术。

本标准适用于对猪传染性胃肠炎的临床诊断、产地检疫及流行病学调查等。

2 材料准备

2.1 器材

倒置显微镜、冷冻离心机、微孔滤膜、滤器、细胞培养瓶、盖玻片、温箱、荧光显微镜、冰冻切片机、载玻片、滴管、定量加液器、微量吸液器及配套吸头、96孔或40孔聚乙烯微量反应板、单通道、8通道微量吸液器及配套吸头、二氧化碳培养箱、微量振荡器及小培养瓶、酶标测试仪等。

2.2 溶液的配制

0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液、细胞培养液、病毒培养液、HEPES 液、0.1%伊文斯蓝原液、磷酸盐缓冲甘油、洗液、包被稀释液、样品稀释液、酶标抗体稀释液、底物溶液、终止液,配制方法见附录 A。

2.3 试剂

荧光抗体(FA),猪抗 TGE-IgG 及猪抗 TGE-IgG-HRP,病毒抗原和标准阴、阳性血清,抗原和酶标抗体。

2.4 细胞

仔猪肾原代细胞或 PK₁₅、ST 细胞系。细胞培养液,配制方法见附录 A。

3 病毒分离鉴定

3.1 病毒分离

3.1.1 病料采集

采病仔猪空肠两端扎住,取其内容物及小肠用于分离病毒,样品冷冻保存。

3.1.2 病料处理

将采集的小段空肠剪碎及肠内容物用含青霉素 10000IU、链霉素 10 000 μg/mL 的磷酸盐缓冲液(PBS)液(见第 A.1 章)制成 5 倍悬液,在 4℃条件下 3 000 r/min 离心 30 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,分装,-20℃保存备用。

3.1.3 接种及观察

将过滤液(病毒培养液的 10%)(见第 A.3 章)接种细胞单层上,在 37℃吸附 1 h 后补加病毒培养液,逐日观察细胞病变(CPE),连续 3 d~4 d,按 CPE 变化情况可盲传 2 代~3 代。

3.2 病毒鉴定

CPE 变化的特点:细胞颗粒增多,圆缩,呈小堆状或葡萄串样均匀分布,细胞破损,脱落。对不同细胞培养物,CPE 可能有些差异。分离病毒用细胞瓶中加盖玻片培养,收毒时取出盖玻片(包括接毒与不接毒对照片)用直接荧光法做鉴定。鉴定方法和结果判定见第 4 章。

4 直接免疫荧光法

4.1 样品

组织标本:从急性病例采取空肠(中段)、扁桃体、肠系膜淋巴结任选一种组织;慢性、隐性感染病例

采取扁桃体。

4.2 操作方法

4.2.1 标本片的制备

将组织样本制成 $4\ \mu\text{m}\sim 7\ \mu\text{m}$ 冰冻切片。或将组织标本制成涂片：扁桃体、肠系膜淋巴结用其横断面涂抹片；空肠则刮取粘膜面做压片。标本片制好后，风干。于丙酮中固定 15 min，再置于 PBS 中浸泡 10 min~15 min，风干。

细胞培养盖玻片：将接毒 24 h~48 h 的盖玻片及阳性、阴性对照片在 PBS 中洗三次，风干。于丙酮中固定 15 min，再置于 PBS 中浸泡 10 min~15 min，风干。

4.2.2 染色

用 0.02% 伊文思蓝溶液（见第 A.5 章）将 FA 稀释至工作浓度（1:8 以上合格）。4 000 r/min 离心 10 min，取上清液滴于标本上，37℃ 恒温恒湿染色 30 min，取出后用 PBS 冲洗三次，依次为 3 min、4 min、5 min，风干。

4.2.3 封固

滴加磷酸盐缓冲甘油（见第 A.6 章），用盖玻片封固。尽快做荧光显微镜检查。如当日检查不完则将荧光片置 4℃ 冰箱中，不超于 48 h 内检查。

4.3 结果判定

被检标本的细胞结构应完整清晰，在阳性、阴性对照片成立时判定，细胞核暗黑色，胞浆呈苹果绿色判为阳性，所有细胞浆中无特异性荧光判定为阴性。

按荧光强度划为四级：

- a) ++++：胞浆内可见闪亮的苹果绿色荧光；
- b) +++：胞浆内为明亮的苹果绿色荧光；
- c) ++：胞浆内呈一般苹果绿色荧光；
- d) +：胞浆内可见微弱荧光，但清晰可见。

凡出现 a)~d) 不同强度荧光者均判定为阳性，当无特异性荧光，细胞浆被伊文思蓝染成红色，胞核黑红色者则判为阴性。

5 双抗体夹心 ELISA

5.1 材料准备

5.1.1 洗液、包被稀释液，样品稀释液、酶标抗体稀释液、底物溶液、终止液配制方法见附录 A。

5.1.2 待检样品：取发病猪粪便或仔猪肠内容物。用浓盐水 1:5 稀释，3 000 r/min 离心 20 min，取上清液，分装，-20℃ 保存备用。

5.2 操作方法

5.2.1 冲洗包被板：向各孔注入洗液（见第 A.7 章），浸泡 3 min，甩干，再注入洗液，重复三次。甩去孔内残液，在滤纸上吸干。

5.2.2 包被抗体：用包被稀释液（见第 A.8 章）稀释猪抗 TGE-IgG 至使用倍数，每孔加 100 μL ，置 4℃ 过夜，弃液，冲洗同 5.2.1。

5.2.3 加样品：将制备的被检样品用样品稀释液（见第 A.9 章）做 5 倍稀释，加入两个孔，每孔 100 μL ，每块反应板设阴性抗原、阳性抗原及稀释液对照各两孔，置 37℃ 作用 2 h，弃液，冲洗同 5.2.1。

5.2.4 加酶标抗体：每孔加 100 μL 经酶标抗体稀释液（见第 A.10 章）稀释至使用浓度的猪抗 TGE-IgG-HRP，置 37℃ 2 h，冲洗同 5.2.1。

5.2.5 加底物溶液：每孔加新配制的底物溶液（见第 A.11 章）100 μL ，置 37℃ 30 min。

5.2.6 终止反应:每孔加终止液(见第 A.12 章)50 μL ,置室温 15 min。

5.3 结果判定

用酶标测试仪在波长 492 nm 下,测定吸光度(OD)值,阳性抗原对照两孔平均 OD 值 >0.8 (参考值),阴性抗原对照两孔平均 OD 值 ≤ 0.2 为正常反应。按以下两个条件判定结果: P/N (被检抗原 OD 值/标准阴性抗原 OD 值)值 ≥ 2 ,且被检抗原两孔平均 OD 值 ≥ 0.2 判为阳性,否则为阴性。如其中一个条件稍低于判定标准,可复检一次,最后仍按两个条件判定结果。

6 血清中和试验

6.1 指示病毒

指示病毒毒价测定后立即小量分装,置 -30°C 冻存,避免反复冻融,使用剂量为 $500\text{TCID}_{50} \sim 1\,000\text{TCID}_{50}$ 。

6.2 样品

被检血清,同一动物的健康(或病初)血清和康复三周后血清(双份),单份血清也可以进行检测,被检样品需 56°C 水浴灭活 30 min。

6.3 溶液配制

稀释液、细胞培养液、病毒培养液、HEPES 液,配制方法见附录 A。

6.4 操作方法

6.4.1 常量法:用稀释液按倍比法稀释血清,与稀释至工作浓度的指示毒等量混合,置 37°C 感作 1 h(中间摇动 2 次)。选择长满单层的细胞瓶,每份样品接 4 个培养瓶,再置 37°C 吸附 1 h(中间摇动 2 次)。取出后加病毒培养液,置 37°C 温箱培养,逐日观察细胞病变(CPE)72 h \sim 96 h 最终判定。每批试验设标准阴、阳性血清对照,病毒抗原和细胞对照各 2 瓶,均加工作浓度指示毒,阴、阳性血清做 2^{-6} 稀释。

6.4.2 微量法:用稀释液倍比稀释血清,每个稀释度加 4 孔,每孔 50 μL ,再分别加入 50 μL 工作浓度指示毒,经微量振荡器振荡 1 min \sim 2 min,置 37°C 中和 1 h 后,每孔加入细胞悬液 100 μL (15 万 \sim 20 万个细胞/mL),微量板置 37°C 二氧化碳培养箱,或用胶带封口置 37°C 温箱培养,72 h \sim 96 h 判定结果,对照组设置同常量法。

6.5 结果判定

在对照系统成立时(病毒抗原及阴性血清对照组均出现 CPE,阳性血清及细胞对照组均无 CPE),以能保护半数接种细胞不出现细胞病变的血清稀释度作为终点,并以抑制细胞病变的最高血清稀释度的倒数来表示中和抗体滴度。

发病后三周以上的康复血清抗体滴度是健康(或病初)抗体滴度的 4 倍,或单份血清的中和抗体滴度达 1:8 或以上,则判为阳性。

7 间接 ELISA

7.1 操作方法

7.1.1 冲洗包被板:向各孔注入洗液,浸泡 3 min,再注入洗液,重复 3 次,甩干孔内残液,在滤纸上吸干。

7.1.2 抗原包被:用包被稀释液稀释抗原至使用浓度,包被量为每孔 100 μL ,置 4°C 冰箱湿盒内 24 h,弃掉包被液,用洗液冲洗 3 次,每次 3 min。

7.1.3 加被检及对照血清:将每份被检血清样品用血清稀释液(见第 A.9 章)做 1:100 稀释,加入 2 个孔,每孔 100 μL ,每块反应板设阳性血清、阴性血清及稀释液对照各 2 孔,每孔 100 μL 。盖好包被板置 37°C 湿盒内 1 h,冲洗同 7.1.2 项。

7.1.4 加酶标抗体:用酶标抗体稀释液将酶标抗体稀释至使用浓度,每孔加 100 μL ,置 37°C 湿盒内 1 h,冲洗同 7.1.2。

7.1.5 加底物溶液:每孔加新配制的底物溶液 100 μL ,在室温下避光反应 5 min~10 min。

7.1.6 终止反应:每孔加终止液 50 μL 。

7.2 结果判定

7.2.1 目测法

阳性对照血清孔呈鲜明的桔黄色,阴性对照血清孔无色或基本无色,被检血清孔凡显色者即判抗体阳性。

7.2.2 比色法

用酶标测试仪,在波长 492 nm 下,测定各孔 OD 值,阳性血清对照两孔平均 OD 值 >0.7 (参考值),阴性血清对照两孔平均 OD 值 ≤ 0.183 为正常反应。按以下标准判定结果:OD 值 ≥ 0.2 为阳性;OD 值 < 0.183 为阴性;OD 值在 $0.183\sim 0.2$ 之间为疑似。对疑似样品可复检一次,如仍为疑似范围,则看 P/N 值, $P/N \geq 2$ 判为阳性, $P/N < 2$ 判为阴性。

附录 A
(规范性附录)
溶液的配制

A.1 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)的配制

A.1.1 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液:

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	71.64 g
无离子水	加至 1 000 mL

A.1.2 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液:

磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	31.21 g
无离子水	加至 1 000 mL

A.1.3 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液	360 mL
0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液	140 mL
氯化钠(NaCl)	38 g
无离子水	加至 5 000 mL

4℃保存。

A.2 细胞培养液的配制

含 10% 灭活犊牛血清的 1 640 营养液,加 100 IU/mL 青霉素及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素,用 5.6% 碳酸氢钠(NaHCO_3)调 pH 值至 7.2,如需换液则血清含量为 5%。

A.3 病毒培养液的配制

1 640 培养液中加下列成分使最终浓度达到:

1% HEPES 缓冲液

1% 二甲基亚砜(DMSO)

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰酶(原代肾细胞为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

100 IU/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素

以 5.6% 碳酸氢钠(NaHCO_3)调 pH 至 7.2

A.4 HEPES 液的配制

称取 0.238 5 g HEPES 溶于 100 mL 无离子水中,用 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)调整 pH7.0~7.2,过滤后置 4℃备用。

A.5 0.1% 伊文斯蓝原液的配制

称取伊文斯蓝 0.1 g 溶于 100 mL 0.02 mol/L pH7.2 PBS(见第 A.1 章)中,4℃保存,使用时稀释成 0.02% 浓度。

A.6 磷酸盐缓冲甘油的配制

量取丙三醇 90 mL,0.02 mol/L pH7.2 PBS 10 mL,振荡混合均匀,4℃保存。

A.7 洗液的配制

量取 50 μ L 吐温-20,加入 100 mL 0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液(见第 A.1 章)中。

A.8 包被稀释液的配制

A.8.1 0.1 mol/L 碳酸钠液:称取碳酸钠 10.6 g,加无离子水至 1 000 mL。

A.8.2 0.1 mol/L 碳酸氢钠液:称取碳酸氢钠 8.4 g,加无离子水至 1 000 mL。

A.8.3 量取 0.1 mol/L 碳酸钠液 200 mL,0.1 mol/L 碳酸氢钠液 700 mL,混合即成。

A.9 样品稀释液的配制

加 0.05%吐温-20 及 1%明胶的 0.02 mol/L pH7.2 碳酸缓冲液。

A.10 酶标抗体稀释液的配制

加 0.05%吐温-20,1%明胶及 5%灭活犊牛血清的 0.02 mol/L pH7.2 磷酸缓冲液。

A.11 底物溶液的配制

A.11.1 pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液:称取柠檬酸 21.01 g,加无离子水至 1 000 mL,量取 243 mL 与 0.2 mol/L 磷酸氢二钠液(见第 A.1 章)257 mL 混合,于 4℃冰箱中保存不超过一周。

A.11.2 称取 40 mg 邻苯二胺,溶于 100 mL pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液中(用前从 4℃冰箱中取出,在室温下放置 20 min~30 min),待溶解后,加入 150 μ L 过氧化氢,根据试验需要量可按此比例增减。

A.12 终止液的配制

2 mol/L 硫酸,量取浓硫酸 4 mL 加入 32 mL 无离子水混匀。
