

## 前 言

伪狂犬病(pseudorabies, PR; Aujeszky's disease, AD)是危害猪、牛、羊、狗、猫、家兔等多种家畜和野生动物的一种急性传染病。除猪以外的动物感染伪狂犬病病毒后,主要是以发热、奇痒和脑脊髓炎症状为特征,以死亡为结局,并呈散发形式。本病对养猪业危害最大,猪感染后可引起妊娠母猪流产、产死胎和木乃伊胎;仔猪大量死亡,15日龄内死亡率为100%,断奶仔猪死亡率10%~20%,种猪不育,母猪返情,空怀,公猪睾丸发炎肿胀、萎缩、失去种用能力;育肥猪增重缓慢、饲料报酬降低。本病呈世界性分布。

本标准规定的病原学诊断方法主要用于死亡动物的病料检测和活体动物的鼻拭子样品检测,其中聚合酶链反应具有快速、灵敏的特点,可用于大批样品的检测。血清学诊断主要用于非免疫动物的诊断、血清流行病学调查和免疫动物的抗体水平监测。中和试验特异性强,是国际通用的法定方法,可用于口岸进出口检疫;胶乳凝集试验,简便快速、敏感性高、特异性强,适用于基层现场检测;酶联免疫吸附试验适用于实验室大批样品检查、产地检疫、流行病学调查和无本病健康猪群的建立。

本标准的附录A、附录B、附录C、附录D都是标准的附录,附录E是提示的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准由华中农业大学畜牧兽医学院负责起草,农业部动物检疫所参加起草。

本标准主要起草人:陈焕春、何启盖、李晓成、吴斌、方六荣、金梅林、邱德新、吴美州。

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 18641--2002

## 伪狂犬病诊断技术

Diagnostic techniques for Aujeszky's disease

### 1 范围

本标准规定了伪狂犬病的诊断方法。

本标准适用于猪、羊、犬、猫等及其他易感动物伪狂犬病的诊断。其中病毒分离鉴定、聚合酶链式反应、家兔接种试验适用于伪狂犬病病毒的检测；中和试验、酶联免疫吸附试验适用于非免疫动物伪狂犬病抗体的检测以及免疫后抗体水平的监测；胶乳凝集试验适用于实验室和现场对伪狂犬病抗体的早期检测。

### 2 病毒分离鉴定

#### 2.1 试验材料

改良最低要素营养液(DMEM)培养基配方见附录A(标准的附录),仓鼠肾细胞(BHK<sub>21</sub>)或猪肾细胞系(PK-15)细胞,新生犊牛血清,青霉素,链霉素,0.22 μm 微孔滤膜,细胞培养瓶。

#### 2.2 操作步骤

2.2.1 病料的采集:对死亡病畜或活体送检并处死的动物,以无菌手术采集大脑、三叉神经节、扁桃体、肺等组织,冷藏送实验室检测。

2.2.2 样品处理:待检组织在灭菌乳钵内剪碎,加入灭菌玻璃砂研磨,用灭菌生理盐水或DMEM培养液(见附录A)制成1:5乳剂,反复冻融三次,经3 000 r/min离心30 min后,取上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤,加入青霉素溶液至最终浓度为300 IU/mL、链霉素为100 μg/mL, -70℃保存作为接种材料。

2.2.3 病料接种:将病料滤液接种已长成单层的BHK<sub>21</sub>细胞(或PK-15细胞),接种量为培养液量的10%,37℃恒温箱中吸附1 h,加入含10%新生犊牛血清(已经过56℃水浴灭活30 min,过滤除菌,无支原体)的DMEM培养液,置37℃温箱中培养。

2.2.4 观察结果:接种后36 h~72 h,细胞应出现典型的细胞病变效应(CPE),表现为细胞变圆,拉网、脱落。如第一次接种不出现细胞病变,应将细胞培养物冻融后盲传三代,如仍无细胞病变,则判为伪狂犬病病毒检测阴性。

2.2.5 病毒的鉴定:将出现细胞病变的细胞培养物,用聚合酶链反应或家兔接种试验,或作进一步鉴定。

### 3 聚合酶链反应

#### 3.1 试验材料

蛋白酶K,十二烷基硫酸钠(SDS),苯酚,三氯甲烷,异戊醇(分析纯),溴化乙锭(EB),TEN缓冲液〔见附录B(标准的附录)〕。

引物:扩增伪狂犬病毒基因中434~651碱基对(bp)之间217 bp基因片段,序列为:上游引物P1:

5'-CAGGAGGACGAGCTGGGGCT-3',下游引物 P2:5'-GTCCACGCCCCGCTTGAAGCT-3'。

### 3.2 操作步骤

3.2.1 样品的采集:对于病死或扑杀动物,取大脑和三叉神经节、扁桃体、肺等组织;对于待检活猪,用已灭菌的棉签,伸入猪鼻腔中,采取鼻粘液,即为鼻拭子,冷藏条件下送实验室检测。

3.2.2 样品处理 每份样品分别处理。采病料经组织研磨器充分研磨,按 1:5 用 TEN 缓冲液(见附录 B 中 B1)悬浮收集于离心管内,反复冻融 3 次,7 000 r/min 离心 5 min,如样品为鼻拭子,则加入 2 mL TEN 缓冲液,充分挤压,取出棉拭子,7 000 r/min 离心 5 min,取上清液 472.5  $\mu$ L,加入 25  $\mu$ L 10% 十二烷基硫酸钠(见附录 B 中 B4)和 2.5  $\mu$ L 的 20 mg/mL 蛋白酶 K(见附录 B 中 B3),50 C 水浴摇床上放置 2 h 后加入等量的饱和酚溶液 500  $\mu$ L,涡旋 20 s。离心取上清液,加等量的酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)抽提一次,再用等量的三氯甲烷:异戊醇(24:1)抽提一次,最后用两倍的无水乙醇沉淀,真空抽干后加入 20  $\mu$ L 双蒸水溶解(此即为“模板”),-20 C 贮存备用。

3.2.3 聚合酶链反应(PCR)的操作程序:先将制备的模板 DNA 置 100 C 水浴 10 min 作变性处理,然后立即放于冰浴中。PCR 反应体系(按摩尔浓度计算)为:总体积 25  $\mu$ L,含有 50 mmol/L(氯化钾)(KCl),10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)(pH9.0),0.1%三羟甲基氨基甲烷溶液(0.1% Triton X-100),100  $\mu$ mol/L dNTPs,0.35  $\mu$ mol/L 引物,2 mol/L 氯化镁(MgCl<sub>2</sub>),及 0.5 U 台克(Taq) DNA 聚合酶,2  $\mu$ L 模板 DNA。

最后加入矿物油约 20  $\mu$ L 覆盖。

扩增条件为:94 C 变性 3 min,进入循环,94 C 60 s,65 C 60s,72 C 60s,40 个循环后 72 C 延伸 5 min。

3.2.4 PCR 产物的检测:将样品分别加于 1%琼脂凝胶板的各样品孔中,有一孔加标准阳性样品,每孔 10  $\mu$ L~15  $\mu$ L PCR 扩增产物,进行电泳,溴化乙锭(见附录 B 中 B2)染色,在紫外光下观察结果。电泳区带迁移率与标准阳性样品区带迁移率相同的待检样品应判为阳性。为进一步进行 PCR 扩增产物的特异性鉴定,可取 PCR 产物用 Sal I 酶切,酶切产物在 2%琼脂糖凝胶上电泳,溴化乙锭染色,在紫外光下观察并与标准分子量相对照,阳性样品可出现 140 bp 和 77 bp 两个片段。

## 4 家兔接种试验

### 4.1 家兔的选择

选择健康成年家兔,用血清中和试验、胶乳凝集试验、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。

### 4.2 病料的采集及处理

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 2~3 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 100 IU/mL 和 100  $\mu$ g/mL,置 4 C 冰箱中作用 12 h,作为待检样品。

### 4.3 病料接种

将待检样品经颈部皮下注射接种,每只家兔接种 1 mL~2 mL。

### 4.4 结果观察和判定

4.4.1 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。

4.4.2 伪狂犬病毒感染阴性:接种家兔仍健活,判为阴性。

## 5 血清中和试验

### 5.1 试验材料

0.25%胰酶(胰蛋白酶 250 mg 加入 100 mL 汉克氏(Hanks)液中,充分溶解后,过滤除菌,-20 C 保存),PK-15 细胞;伪狂犬病阳性血清、阴性血清、伪狂犬病标准弱毒株;96 孔细胞培养板。

## 5.2 操作步骤

### 5.2.1 病毒半数组织培养感染量(TCID<sub>50</sub>)的测定

5.2.1.1 病毒培养和收获:将伪狂犬病毒标准毒株接种于长成单层的PK-15细胞,接种量为培养液的十分之一,37℃培养,待出现病变后,冻融,收获病毒。

5.2.1.2 病毒的滴定:用DMEM培养液将伪狂犬病毒作连续10倍稀释,即 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ ……每个稀释度取100 μL加入96孔细胞培养板中,随后加入经0.25%胰蛋白酶消化的PK-15细胞悬液100 μL(细胞含量以 $10^5$ 个/mL左右为宜),每个稀释度作8个重复,并设正常细胞培养对照。置37℃5%二氧化碳培养箱中。

5.2.1.3 TCID<sub>50</sub>计算:逐日观察细胞病变和对照,共观察3 d~4 d天,并记录细胞病变孔数。按照Reed-Muench法计算病毒的TCID<sub>50</sub>[见附录E(提示的附录)]。

### 5.2.2 中和试验

5.2.2.1 血清的处理:将无菌采集的待检血清置56℃水浴灭活30 min。

5.2.2.2 血清的稀释:在细胞培养板各孔中加入50 μL DMEM培养液,随后在第1孔中加入待检血清50 μL混合后,用微量移液器取出50 μL,加到第2孔中,混匀后取出50 μL再加入第3孔中,依此类推,直至第10孔(将混合液弃去50 μL),血清稀释度即为1:2、1:4、1:8……1:1 024,每份待检血清稀释度作3个重复。

5.2.2.3 加入病毒:将50 μL含200个TCID<sub>50</sub>的病毒液加到不同稀释度的血清孔中,37℃作用1 h。

5.2.2.4 每血清孔中加入100 μL经胰蛋白酶消化分散的PK-15细胞悬液(细胞含量以 $10^5$ 个/mL左右为宜)。

### 5.2.2.5 设立对照组

5.2.2.5.1 病毒回归试验:每次试验每一块板上都设立病毒对照,先将200 TCID<sub>50</sub>/50 mL病毒液作1、10、100、1 000倍稀释,每个稀释度作4孔,每孔加100 μL病毒液,然后每孔100 μL PK-15细胞悬液。

5.2.2.5.2 阳性血清、阴性血清、待检血清和正常细胞对照。

5.2.2.6 结果观察:逐日观察,记录病变和非病变孔数,共观察7天。病毒回归试验中0.1 TCID<sub>50</sub>应不引起细胞病变,而100 TCID<sub>50</sub>应引起细胞病变,阳性血清、阴性血清、待检血清和正常细胞对照成立,测定结果方有效,否则该试验不能成立。

### 5.2.3 计算抗体中和效价

观察后确定能对细胞培养50%保护的血清最大稀释度,计算抗体中和效价。如抗体效价为1:2及1:2以上,则判为伪狂犬病抗体阳性。

## 6 酶联免疫吸附试验

### 6.1 试验材料

抗原、酶标抗体、阴性血清、阳性血清;底物邻苯二胺-过氧化氢(OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)溶液,抗原包被液、封闭液、冲洗液、终止液配制方法见附录C(标准的附录),酶标反应板。

### 6.2 操作步骤

#### 6.2.1 包被

用包被液(见附录C中C2)将抗原稀释到工作浓度加入酶标板孔内,每孔100 μL,37℃作用1 h后置4℃冰箱过夜。

#### 6.2.2 洗涤

弃去孔内液体,用冲洗液(见附录C中C1)洗3次,每次3 min,用吸水纸拍干。

#### 6.2.3 封闭

各孔加入封闭液(见附录C中C3)100 μL,37℃作用1 h。按6.2.2步骤洗涤。

#### 6.2.4 加入待检血清和阴性、阳性血清对照

待检血清经 56℃ 30 min 灭活后,用冲洗液作 1:40 稀释,加入抗原孔中,每孔 100 μL;同时将阴性血清对照和阳性血清对照各加入三个抗原孔中,分别记为  $A_1, A_2, A_3$  和  $A_4, A_5, A_6$  孔。37℃ 作用 1 h,重复 6.2.2 步骤。

#### 6.2.5 加入酶标抗体

用冲洗液将酶标抗体按工作浓度稀释,每孔加入 100 μL,37℃ 作用 1 h,重复 6.2.2 步骤。

#### 6.2.6 加入底物邻苯二胺-过氧化氢(OPD- $H_2O_2$ )(见附录 C 中 C4)

每孔 100 μL,室温避光显色 25 min。

#### 6.2.7 终止反应

每孔加入 50 μL 终止液(见附录 C 中 C5)终止反应。

#### 6.2.8 测定透光值(OD)值

在酶联免疫检测仪上于 490 nm 波长处测定光吸收值。

#### 6.2.9 结果的判定

##### 6.2.9.1 阴性对照光吸收值(OD)3 孔( $A_1, A_2, A_3$ )的平均值( $NC_x$ )按式(1)计算:

$$NC_x = \frac{A_1 OD_{490} + A_2 OD_{490} + A_3 OD_{490}}{3} \quad \dots\dots\dots(1)$$

##### 6.2.9.2 阳性对照 OD3 孔( $A_4, A_5, A_6$ )平均值( $PC_x$ )按式(2)计算:

$$PC_x = \frac{A_4 OD_{490} + A_5 OD_{490} + A_6 OD_{490}}{3} \quad \dots\dots\dots(2)$$

##### 6.2.9.3 血清检测值与阳性对照血清检测值之比( $S/P$ )值按式(3)计算:

$$S/P = \frac{\text{样品 } A_{490} - NC_x}{PC_x - NC_x} \quad \dots\dots\dots(3)$$

如  $S/P \geq 0.5$ ,则判为抗体阳性;如  $S/P < 0.5$ ,则判为抗体阴性。

## 7 胶乳凝集试验

### 7.1 试验材料

伪狂犬病胶乳凝集抗原、伪狂犬病阳性血清、阴性血清,稀释液配制方法见附录 D(标准的附录)。

### 7.2 操作步骤

#### 7.2.1 对照试验

取等量的胶乳凝集试验抗原(约 20 μL)分别与阴性血清、阳性血清在洁净的玻璃片上混合,如分别出现如下判定标准中的不凝集和等于或高于 50%凝集,则对照组成立,可进行待检血清的检测。

#### 7.2.2 待检血清处理

待检血清不须热灭活或其他方式的灭活处理。

待检血清的检测:将待检血清用稀释液(见附录 D)作倍比稀释后,各取 15 μL 与等量胶乳凝集抗原在洁净干燥的玻璃片上用竹签搅拌充分混合,在 3 min~5 min 内观察结果。

#### 7.2.3 判定标准

可能出现以下几种凝集结果,即:

100%凝集:混合液透亮,凝集颗粒聚集在液滴的边缘;

75%凝集:混合液几乎透明,出现大的凝集颗粒;

50%凝集:凝集颗粒较细,液滴略浑浊;

25%凝集:有少量凝集颗粒,混合液浑浊;

0 凝集:无凝集颗粒出现,混合液呈乳白色均匀一致的浑浊。

#### 7.2.4 结果的判定

以出现 50%凝集程度的血清最高稀释倍数为该血清的抗体效价,其值  $\geq 1:2$  判为伪狂犬病抗体阳

性,否则判为抗体阴性。如为阴性,可用血清中和试验或酶联免疫吸附试验进一步检测,可能出现以下三种结果:

如为阴性,则判为伪狂犬病抗体阴性;

如为可疑,建议在间隔2周后再检测,如这三种方法均为阴性或可疑,判为阴性;如这三种方法中任何一种方法为阳性,则判为阳性;

如中和试验和酶联免疫吸附试验均为阳性或某一种方法为阳性,均可判为伪狂犬病抗体阳性。

## 附录 A

(标准的附录)

## DMEM(高糖)培养液的配制

- A1 量取去离子水 950 mL,置于一定的容器中。
- A2 将 DMEM 粉剂 10 g 加于 15℃~30℃ 的去离子水中,边加边搅拌。
- A3 每 1 000 mL 培养液加 3.7 g 碳酸氢钠(NaHCO<sub>3</sub>)。
- A4 加水至 1 000 mL,用 1 mol/L(氢氧化钠)(NaOH)或盐酸(HCl)将培养液 pH 值调至低于 pH6.9~7.0,在过滤之前应盖紧容器瓶塞。
- A5 立即用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌,4℃冰箱保存备用。

## 附录 B

(标准的附录)

## 聚合酶链反应溶液的配制

## B1 TEN 缓冲液

氯化钙(CaCl <sub>2</sub> )	11.00 mg(1 mmol/L)
三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)(pH8.0)	1 210.00 mg(10 mmol/L)
乙二胺四乙酸(EDTA)(pH8.0)	372.00 mg(1.0 mmol/L)
三蒸水	1 000 mL

## B2 溴化乙锭溶液

溴化乙锭	1.0 g
三蒸水	100 mL

磁力搅拌数小时以确保其溶解,然后用铝箔包裹容器或转移至棕色瓶中,保存于室温。

注:溴化乙锭是强诱变剂,并有中度毒性,使用含有这种染料的溶液时务必戴上手套,称量染料时要戴面罩。

## B3 蛋白酶 K(20 mg/mL)(贮存液)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)(pH7.8)	1.2 mg(0.01 mmol/L)
乙二胺四乙酸(EDTA)	1.86 mg(0.005 mmol/L)
(SDS)	5.0 g
三蒸水	1 000 mL

加入蛋白酶 K,使成为 20 mg/mL,即为贮存液。使用浓度为 50 μg/mL。

## B4 10%十二烷基硫酸钠(SDS)溶液的配制

在 90 mL 水中溶解 10 g 电泳级十二烷基硫酸钠,加热至 68℃助溶,加入浓盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2,加水定容至 100 mL,分装备用。

## 附录 C

(标准的附录)

## 酶联免疫吸附试验溶液的配制

## C1 冲洗液

含 0.05%吐温-20(Tween-20)pH7.4 的磷酸盐缓冲液。

将下列试剂按次序加入 1 000 mL 体积的容器中,充分溶解即成。

氯化钠(NaCl)	8.0 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	0.2 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2.9 g
吐温-20(Tween-20)	0.5 mL
加蒸馏水至	1 000 mL
<b>C2 抗原包被液</b>	
0.025 mol/L, pH9.6 碳酸盐缓冲液。	
碳酸钠( $\text{NaCO}_3$ )	1.59 g
碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )	2.93 g
蒸馏水	1 000 mL
<b>C3 封闭液</b>	
冲洗液	100 mL
牛血清白蛋白(BSA)	0.1 g
<b>C4 底物溶液邻苯二胺-过氧化氢(OPD-<math>\text{H}_2\text{O}_2</math>)</b>	
<b>C4.1 0.1 mol/L pH5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液</b>	
将下列试剂按次序加入 1 000 mL 体积的容器中,充分溶解即成。	
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	71.6 g
柠檬酸	19.2 g
蒸馏水	1 000 mL
<b>C4.2 底物溶液</b>	
0.1 mol/L pH5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液	100 mL
邻苯二胺(OPD)	40 mg
30%过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	0.15 mL
此液对光敏感,应避免强光直射。现配现用。	
<b>C5 终止液</b>	
2 mol/L 硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	
硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	22.2 mL
蒸馏水	177.8 mL

## 附录 D

(标准的附录)

## 血清稀释液

(0.1 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液)

将下列试剂按次序加入 1 000 mL 体积的容器中:

氯化钠(NaCl)	8.02 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	3.87 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.163 g
氯化钾(KCl)	0.201 g
加双蒸馏水至	1 000 mL

混匀后,充分溶解,最后加入叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )防腐,其终浓度为万分之一。



附录 E

(提示的附录)

病毒半数组织培养感染量 TCID<sub>50</sub> 的计算

(按 Reed-Muench 法)

举例说明:

表 E1

病毒稀释度	细胞病变		累计孔数		细胞孔数	出现细胞病变百分比/%
	出现细胞病变孔数	不出现细胞病变孔数	出现细胞病变	不出现细胞病变		
10 <sup>-1</sup>	8	0	51	0	51	(51/51)100
10 <sup>-2</sup>	8	0	43	0	43	(43/43)100
10 <sup>-3</sup>	8	0	35	0	35	(35/35)100
10 <sup>-4</sup>	8	0	27	0	27	(27/27)100
10 <sup>-5</sup>	8	0	19	0	19	(19/19)100
10 <sup>-6</sup>	6	2	11	2	13	(11/13)84.6
10 <sup>-7</sup>	4	4	5	6	11	(5/11)45.4
10 <sup>-8</sup>	1	7	1	13	14	(1/14)7.1
10 <sup>-9</sup>	0	8	0	21	21	0.0

从表 E1 可见该病毒的 TCID<sub>50</sub> 在 10<sup>-6</sup> (84.6%) 和 10<sup>-7</sup> (45.4%) 之间, 首先按式 (E1) 计算距离比:

$$\text{距离比} = \frac{\text{高于 50\% 病变百分数} - 50}{\text{高于 50\% 病变百分数} - \text{低于 50\% 病变百分数}} \dots\dots\dots (E1)$$

$$-\lg \text{TCID}_{50} = \text{高于 50\% 稀释度对数} + \text{距离比} \times \text{稀释度对数}$$

代入公式: 距离比 =  $\frac{84.6 - 50}{84.6 - 45.4} = 0.88$

$-\lg \text{TCID}_{50} = -6 + 0.88 \times (-1) = -6.88$

所以:  $\text{TCID}_{50} = 10^{-6.88} / 0.1 \text{ mL}$

由于病毒的稀释倍数是 10<sup>-1</sup> 倍, 其稀释倍数的对数是 (-1), 因此可将上式获得的距离比 (0.88) 加引起细胞病变孔数高于细胞培养孔数 50% 的病毒稀释度的对数 (6) 上, 因此该病毒的 TCID<sub>50</sub> 应是 10<sup>-6.88</sup> / 0.1 mL。