

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1953—2010

猪附红细胞体病诊断技术规范

Diagnostic technique for *Mycoplasma suis*(*Eperythrozoon suis*)

2010-09-21 发布

2010-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181) 归口。

本标准起草单位:河南省动物疫病预防控制中心。

本标准起草人:吴志明、闫若潜、张志凌、张健、刘光辉、苗连叶、盛敏、方先珍、谢彩华、刘梅芬、王东方、王英华。

猪附红细胞体病诊断技术规范

1 范围

本标准规定了猪附红细胞体病诊断技术。

本标准适用于对猪附红细胞体病的诊断。

2 诊断方法

2.1 猪附红细胞体病的临床诊断

2.1.1 流行病学特点

猪附红细胞体除感染猪外,还可感染人及绵羊、牛、鼠、猫等多种动物,为人畜共患病原体。发病猪和隐性感染猪是本病的传染源。不同年龄、性别、品种的猪均易感。本病一年四季均可发生,尤其是夏、秋季节。主要通过吸血昆虫传播,或通过血液污染的针头和器械传播,也可垂直传播。

2.1.2 临床症状指标

2.1.2.1 发热,体温升高到 40℃~42℃,食欲下降,精神委顿,呼吸困难,排棕红色尿液。

2.1.2.2 感染初期皮肤潮红,后期背部及四肢末梢发绀,特别是耳廓边缘发绀。

2.1.2.3 贫血,全身皮肤及可视黏膜苍白或黄染。

2.1.2.4 慢性病猪表现消瘦、苍白,部分猪出现荨麻疹或病斑型皮肤变态反应。

2.1.2.5 血液稀薄,凝固不良,红细胞数量减少。

2.1.2.6 母猪繁殖障碍。

2.1.3 病理变化指标

2.1.3.1 全身肌肉色泽变淡,脂肪及肺、胸腔、胃、肠、膀胱等内脏器官浆膜有不同程度的黄染。

2.1.3.2 淋巴结、脾脏、肝脏肿大;肾脏肿大,质地变脆,外观黄染。

2.1.3.3 膀胱蓄积棕红色尿液,黏膜黄染。

2.2 猪附红细胞体的涂片染色镜检

2.2.1 直接涂片镜检

自耳静脉或前腔静脉无菌采血,将采集的新鲜血样加等量的生理盐水稀释后,吸取一滴置载玻片上,加盖玻片,置 400 倍(10×40)光学显微镜下观察。猪附红细胞体感染猪可见红细胞发生形态学变化,呈锯齿状、菜花状或星芒状等;健康猪红细胞形态规则。

2.2.2 涂片染色镜检

无菌自耳静脉或前腔静脉采血后抹片,经甲醇固定 3 min~5 min 并干燥后,浸入盛有姬姆萨染色液(见附录 A)的染色缸中染色 30 min,取出水洗,洗干水分,置 400 倍(10×40)光学显微镜下观察。猪附红细胞体感染猪红细胞呈波浪状、星芒状、锯齿状改变,且周围有染成紫红色的小体(图 1A);健康猪红细胞形态规则,边缘光滑,染色均匀(图 1B)。

2.3 猪附红细胞体的 PCR 检测

2.3.1 试剂和材料

除另有规定外,所用生化试剂均为分析纯。

2.3.1.1 TE 缓冲液(见附录 A)、20% SDS、5% CTAB(十六烷基三甲基溴化铵),以上试剂常温保存。

2.3.1.2 10 mg/mL 溶菌酶、5 mol/L NaCl、Tris 饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)、0.1%肝素、1×核

A B

图 1 猪血液涂片,姬姆萨染色(400×)

酸电泳缓冲液(见附录 A),以上试剂 4℃ 保存。

2.3.1.3 20 mg/mL 蛋白酶 K,异丙醇,75%乙醇,DNA 分子量标准,6×电泳上样缓冲液,以上试剂 -20℃ 保存。

2.3.1.4 阳性对照、阴性对照(见附录 A)。

2.3.1.5 PCR 扩增用上、下游引物序列见附录 B。

2.3.1.6 猪附红细胞体 PCR 诊断反应体系组成、说明及使用注意事项见附录 C。

2.3.2 仪器设备

PCR 扩增仪,高速冷冻离心机(离心力在 12 000×g 以上),核酸电泳仪和水平电泳槽,恒温水浴锅,2℃~8℃冰箱,-20℃冰箱,单道微量移液器(0.5 μL~10 μL;2 μL~20 μL;20 μL~200 μL;100 μL~1 000 μL),凝胶成像系统(或紫外透射仪),真空干燥器(非必备)。

2.3.3 样品的采集

采样过程中样本不得交叉污染,采样及样品前处理过程中应戴一次性手套、口罩、帽子。

2.3.3.1 取样工具

一次性无菌注射器、离心管。离心管应经 121℃、15 min 高压灭菌并烘干。

2.3.3.2 采样方法

用无菌注射器先吸入 0.1%肝素 0.5 mL~1 mL,再自耳静脉或前腔静脉采集 10 倍量血液,快速混匀后转入无菌离心管中,编号备用。

2.3.3.3 存放与运送

采集或处理的样品在 2℃~8℃条件下保存应不超过 24 h;采集的样品密封后,采用保温壶或保温桶加冰密封,尽快运送到实验室。

2.3.4 样品的处理

取 500 μL 待检样品加入 1.5 mL 离心管中,4℃条件下 12 000×g 离心 20 min,弃上清,沉淀中加入 400 μL TE 缓冲液溶解。取阳性对照、阴性对照各 1 μL,分别加入 400 μL TE 缓冲液,混匀。

2.3.5 样品 DNA 的制备

2.3.5.1 取 n 个 1.5 mL 灭菌离心管,其中, n 为待检样品数加一管阳性对照及一管阴性对照之和,对每个离心管进行编号。

2.3.5.2 每管加入 15 μL 溶菌酶,然后分别加入待检样品、阴性对照、阳性对照各 200 μL,反复吸打混匀(一份样品换用一个吸头),混匀后 37℃水浴 1 h。

2.3.5.3 每管加入 10 μL 蛋白酶 K 溶液和 35 μL SDS 液,56℃水浴 30 min。

2.3.5.4 每管加入 100 μL 5 mol/L 的 NaCl 溶液和 160 μL 5% CTAB 溶液,65℃水浴 10 min。

2.3.5.5 每管加入等体积的酚/氯仿/异戊醇混合液,充分颠倒混匀,4℃条件下 12 000×g 离心 10 min。

2.3.5.6 取与本标准 2.3.5.1 中相同数量的 1.5 mL 灭菌离心管,加入 150 μ L 在 -20°C 预冷的异丙醇,对每个管进行编号。吸取本标准 2.3.5.5 离心后各管中的上清液 150 μ L 转移至相应的管中(注意不要吸出中间层),颠倒混匀。

2.3.5.7 4°C 条件下 $12\,000\times g$ 离心 15 min。轻轻倒去上清,倒置于吸水纸上吸干液体,不同样品应置于吸水纸不同地方。加入 1 mL 75%乙醇,轻轻洗涤。

2.3.5.8 4°C 条件下 $12\,000\times g$ 离心 5 min。轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干。

2.3.5.9 4°C 条件下 $12\,000\times g$ 离心 30 s,将管壁上的残余液体甩到管底部,用微量移液器尽量将其吸干,一份样品换一个吸头,吸头不要碰到有沉淀一面,真空抽干 3 min~5 min 或室温干燥 10 min。不宜过于干燥,以免 DNA 难以溶解。

2.3.5.10 加入 10 μ L TE 缓冲液,轻轻混匀,溶解管壁上的 DNA, $2\,000 g$ 离心 5 s, -20°C 冻存备用。

2.3.6 PCR 扩增

配制与本标准 2.3.5.1 中相同数量的 PCR 反应体系 n 管,向每管中加入 2.3.5.10 中相应 DNA 4 μ L。经充分混匀后瞬时离心,使液体全部聚集于管底,加入 25 μ L 的石蜡油覆盖液面(若 PCR 仪具有热盖加热功能时,PCR 反应管中也可不加石蜡油,但推荐采用加石蜡油的方法),并对每个管进行相应的编号。

PCR 扩增条件: 95°C 预变性 5 min, 94°C 45 s, 64°C 45 s, 72°C 45 s 共 35 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。扩增反应结束后取出放置于 4°C 。

2.3.7 PCR 扩增产物的电泳检测

称取 1.2 g 琼脂糖加入 100 mL 核酸电泳缓冲液中加热,充分溶化后稍放凉,加入适量的溴化乙锭(终浓度 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),倒入胶槽制备凝胶板。在电泳槽中加入核酸电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。取 5 μ L~10 μ L PCR 扩增产物和 1 μ L~2 μ L $6\times$ 上样缓冲液混合后,分别加样到凝胶孔。5 V/cm 恒压下电泳 30 min 左右。将电泳好的凝胶放到紫外透射仪或凝胶成像系统上观察结果,进行判定并做好试验记录。

2.3.8 结果分析

2.3.8.1 试验结果成立条件

猪附红细胞体核酸阳性对照的 PCR 产物,经电泳后在 666 bp 位置出现特异性条带,同时阴性对照 PCR 产物电泳后在 666 bp 位置没有条带(见附录 D),则该次试验结果成立;否则,结果不成立。

2.3.8.2 阳性

在本次试验结果成立的前提下,如果样品的 PCR 产物电泳后在 666 bp 的位置上出现特异性条带,判定为猪附红细胞体核酸阳性;若条带极弱,建议作一次复核试验,再次出现 666 bp 大小条带判定为猪附红细胞体核酸阳性;否则,判为阴性。

2.3.8.3 阴性

在本次试验结果成立的前提下,如果样品的 PCR 产物电泳后在 666 bp 位置未出现特异性条带,判定为猪附红细胞体核酸阴性。

2.4 猪附红细胞体的实时荧光 PCR 检测

2.4.1 试剂和材料

2.4.1.1 除不需要 2.3.1 中的 DNA 分子量标准、 $1\times$ 核酸电泳缓冲液、 $6\times$ 电泳上样缓冲液外,其他试剂同 2.3.1。

2.4.1.2 实时荧光 PCR 扩增用上、下游引物及荧光探针序列见附录 B。

2.4.1.3 猪附红细胞体实时荧光 PCR 诊断反应体系的组成、说明及使用注意事项见附录 E。

2.4.2 仪器设备

除不需要 2.3.2 中 PCR 扩增仪、凝胶成像系统(或紫外透射仪)外,其他仪器设备同 2.3.2,并需要增加荧光定量 PCR 仪 1 台。

2.4.3 样品的采集和处理

同 2.3.3 和 2.3.4。

2.4.4 样品 DNA 的制备

同 2.3.5。

2.4.5 实时荧光 PCR 扩增

2.4.5.1 在检测区进行。

2.4.5.2 配制与本标准 2.4.4 中相同数量的实时荧光 PCR 反应体系 n 管,向每管中加入 2.4.4 中相应 DNA $2\ \mu\text{L}$,充分混匀后并使液体全部聚集于管底,按照要加样品的顺序摆放好实时荧光 PCR 反应管。

注:不要用笔在荧光 PCR 反应管上直接编号,以免影响荧光信号的收集。

2.4.5.3 将本标准 2.4.5.2 中加样后的实时荧光 PCR 反应管放入实时荧光定量 PCR 仪内,并记录样本摆放顺序。

2.4.5.4 反应参数设置:第一阶段,预变性 $94^{\circ}\text{C}/5\ \text{min}$;第二阶段, $94^{\circ}\text{C}/30\ \text{s}$, $60^{\circ}\text{C}/30\ \text{s}$,40 个循环,在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测,荧光模式设为 FAM/TAMRA 双标记模式。

2.4.6 结果分析

2.4.6.1 结果分析条件设定

2.4.6.1.1 读取检测结果,阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点。

2.4.6.1.2 不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

2.4.6.2 质控标准

阴性对照的检测结果显示没有特异性扩增曲线,且 C_t 值 >32.0 或无,阳性对照的 C_t 值应 ≤ 30.0 (见附录 D);如阴性对照和阳性条件不满足以上条件,此次实验视为无效。

2.4.6.3 结果描述及判定

2.4.6.3.1 阳性

C_t 值 ≤ 30.0 ,而且出现特定的扩增曲线,表明样品中存在猪附红细胞体。

2.4.6.3.2 阴性

C_t 值 >32 或无,并且无特异性的扩增曲线,并且阳性对照扩增曲线 C_t 值 <30 ,则判定为阴性。

2.4.6.3.3 可疑

$32.0 \geq C_t$ 值 >30.0 的样本应重做,重做结果无 C_t 值或 C_t 值 >32.0 者为阴性,否则为阳性。

2.4.6.4 无效扩增

如果阳性对照没有扩增曲线,或者阴性对照有 C_t 值 <30 的扩增曲线,判定本次试验无效,需要分析试验失败原因,并重新试验。

3 综合判定

3.1 疑似

符合诊断方法 2.1.2 临床症状指标三条以上(含三条),或符合诊断方法 2.1.3 病理变化指标一条以上,或诊断方法 2.2 中任何一项结果为阳性。

3.2 确诊

符合结果判定 3.1,且诊断方法 2.3 或 2.4 结果为阳性。

附录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 姬姆萨染色液

取姬姆萨染料 0.6 g 加入 50 mL 甘油中,置 55℃~60℃水浴中 1.5 h~2 h 后,加入 50 mL 甲醇,静置 1 d 以上,过滤后即成姬姆萨染色液原液,贮存备用。临染色前,于每毫升蒸馏水中加入上述原液一滴,即成姬姆萨染色液。

A.2 TE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

A.3 1×核酸电泳缓冲液

Tris 碱 24.2 g、冰乙酸 5.71 mL、10 mL 0.5 mol/L EDTA(pH8.0),加蒸馏水定容至 100 mL,使用时用蒸馏水作 50 倍稀释,即为 1×核酸电泳缓冲液。

A.4 阳性对照

猪附红细胞体功能性结构蛋白编码基因 ORF2 的 pGEM-T easy 重组质粒(1.0×10^8 拷贝/ μL)。

A.5 阴性对照

pGEM-T easy 空质粒(1.0×10^8 拷贝/ μL)。

附 录 B
(规范性附录)

猪附红细胞体 PCR 及实时荧光 PCR 诊断方法所用引物

B. 1 猪附红细胞体 PCR 扩增用上、下游引物序列见表 B. 1。

表 B. 1 猪附红细胞体 PCR 扩增用上、下游引物序列

引物名称	引物浓度	引物序列	扩增片段大小
PCR 扩增上游引物	20 pmol/ μ L	5'-ATTTACCGCATGGTAGATATTTG-3'	666 bp
PCR 扩增下游引物	20 pmol/ μ L	5'-AGAAACTTTCCTCTCTCAC-3'	

B. 2 猪附红细胞体实时荧光 PCR 扩增用上、下游引物及探针序列见表 B. 2。

表 B. 2 猪附红细胞体实时荧光 PCR 扩增用上、下游引物及探针序列

	浓度	序列	扩增片段大小
实时荧光 PCR 扩增上游引物	0.4 μ mol/L	5'-ACTGTCCTACATACTGGTTCTTG-3'	86 bp
实时荧光 PCR 扩增下游引物	0.4 μ mol/L	5'-AGGAGAGGGTCACCCAGATC-3'	
实时荧光 PCR TaqMan 探针	0.8 μ mol/L	FAM-5'-AGCCTCACTGCGTCCAAGTTC A-3'-TAMRA	

附 录 C
(资料性附录)

猪附红细胞体 PCR 诊断反应体系组成、说明及使用注意事项

C.1 猪附红细胞体 PCR 诊断试剂盒组成见表 C.1。

表 C.1 猪附红细胞体 PCR 诊断试剂盒组成

组成成分	数 量
PCR 反应体系	20 管(21 μ L/管)
阳性对照	2 mL
阴性对照	2 mL
TE 缓冲液(pH8.0)	10 mL
溶菌酶(10 mg/mL)	340 μ L
蛋白酶 K(20 mg/mL)	240 μ L
20%SDS	2 mL
5 M NaCl	3 mL
5%CTAB	4 mL
酚/氯仿/异戊醇混合液	20 mL
异丙醇	12 mL
75%的乙醇	12 mL
50 倍 TAE 电泳缓冲液	40 mL
溴化乙锭溶液	50 μ L
上样缓冲液	100 μ L
石蜡油	2 mL

C.2 说明

C.2.1 PCR 反应体系成分:10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})2.5 μ L,2.5 mmol dNTPs 2 μ L,PCR 扩增上游引物 0.5 μ L,PCR 扩增下游引物 0.5 μ L,ExTaq DNA 聚合酶 0.5 μ L(2.5U),水 15.0 μ L,总体积为 21 μ L。

C.2.2 PCR 反应体系中含猪附红细胞体特异性引物对、ExTaq 酶及各种离子。

C.3 使用时的注意事项

C.3.1 由于阳性样品中模板浓度相对较高,注意检测过程中不得交叉污染。

C.3.2 注意防止试剂盒组分受污染。不同批次试剂盒勿混用。

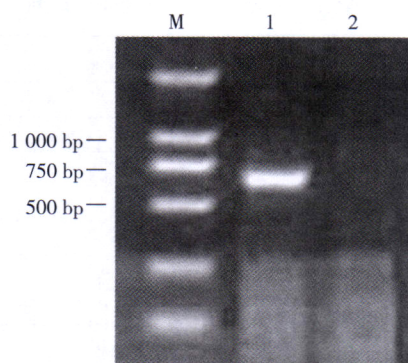
C.3.3 请按照说明书要求分别在 4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C 保存不同的试剂,试剂盒有效期为 6 个月。使用时在室温下融化,暂放置于冰上,使用后立即放回。

C.3.4 PCR 反应体系应避免反复冻融,在使用前应瞬时离心,以保证反应液集中在管底。

附录 D
(资料性附录)

猪附红细胞体 PCR 扩增产物电泳图及实时荧光 PCR 扩增曲线图

D.1 猪附红细胞体 PCR 扩增产物电泳图见图 D.1。



注：M. DL2 000 DNA Marker；1. 猪附红细胞体阳性对照；2. 阴性对照

图 D.1 猪附红细胞体 PCR 扩增产物电泳图

D.2 猪附红细胞体实时荧光 PCR 扩增曲线图见图 D.2。

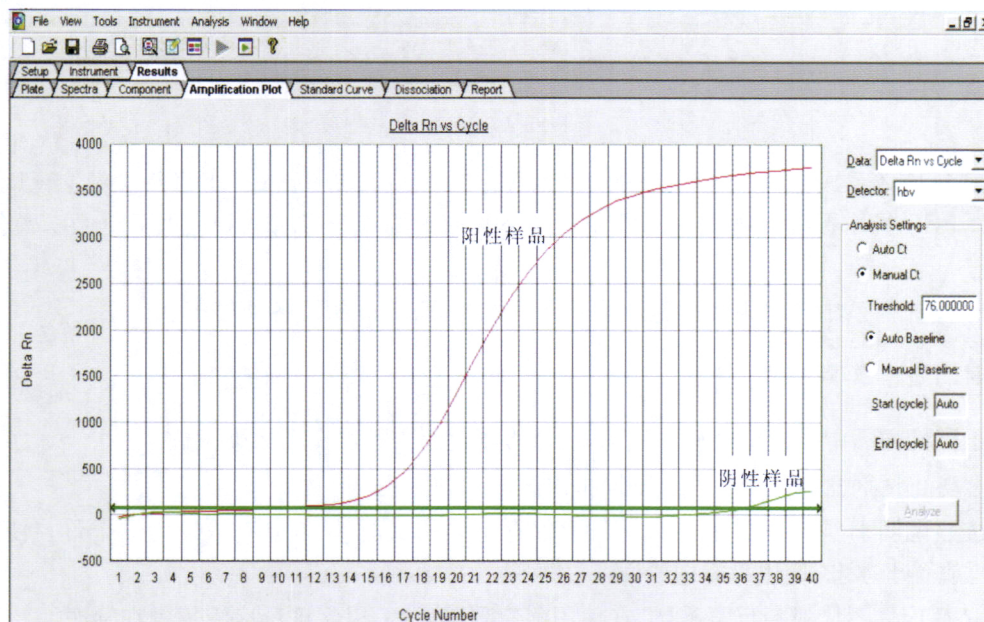


图 D.2 猪附红细胞体实时荧光 PCR 扩增曲线图

附录 E

(资料性附录)

猪附红细胞体实时荧光 PCR 诊断反应体系组成、说明及使用注意事项

E.1 猪附红细胞体实时荧光 PCR 诊断试剂盒组成

见表 E.1。

表 E.1 猪附红细胞体实时荧光 PCR 诊断试剂盒组成

组成成分	数 量
PCR 反应液	20 管(23 μ L/管)
阳性对照	2 mL
阴性对照	2 mL
TE(pH8.0)	10 mL
溶菌酶(10 mg/mL)	340 μ L
蛋白酶 K(20 mg/mL)	240 μ L
20%SDS	2 mL
5 M NaCl	3 mL
5%CTAB	4 mL
酚/氯仿/异戊醇混合液	20 mL
异丙醇	12 mL
75%的乙醇	12 mL

E.2 说明

实时荧光 PCR 反应体系成分:10 \times PCR Buffer(含 Mg^{2+}),2.5 μ L;2.5 mmol dNTPs,2 μ L;猪附红细胞体实时荧光 PCR 扩增用上、下游引物各 0.5 μ L(0.4 μ mol/L),TaqMan 荧光探针 1 μ L(0.8 mmol/L),ExTaq 酶 0.25 μ L(1.25 U),无菌双蒸水(ddH₂O)16.25 μ L,均匀混合,总体积为 23 μ L。

E.3 使用时的注意事项

- E.3.1 由于阳性样品中模板浓度相对较高,注意检测过程中不得交叉污染。
- E.3.2 注意防止试剂盒组分受污染。不同批次试剂盒勿混用。
- E.3.3 请按照说明书要求分别在 4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C 保存不同的试剂,试剂盒有效期为 6 个月。使用时在室温下融化,暂放置于冰上,使用后立即放回。
- E.3.4 PCR 反应体系应避免反复冻融,在使用前应瞬时离心,以保证反应液集中在管底。