



中华人民共和国国家标准

GB/T 27640—2011

马痘诊断技术

Diagnostic techniques for horsepox disease

2011-12-30 发布

2012-04-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

中华人民共和国
国家标准
马痘诊断技术
GB/T 27640—2011

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 17 千字
2012年3月第一版 2012年3月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44372 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 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：中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人：梁成珠、朱来华、肖西志、郑小龙、邓明俊、岳志芹、毕道荣、梁君妮、徐彪。

马痘诊断技术

1 范围

本标准规定了马痘临床诊断、病毒分离与鉴定等诊断技术要求。
本标准适用于马痘的诊断。

2 临床检查

2.1 临床特征

病马于系部和球节处的皮肤上出现丘疹,随后变为水疱,最后为脓疱,并干涸而结痂。由于局部疼痛,可引起跛行,病马一般不显全身症状;有的病马于唇内侧、齿龈、舌、舌系带、颊部等粘膜上发生痘疹,也是先发丘疹,继而水疱和脓疱,脓疱破裂形成浅的溃疡;母畜外生殖器水肿,并在皮肤和粘膜上形成水疱、脓疱和溃疡,公畜的病变表现为阴茎、包皮和龟头上的痘疹样病变。

2.2 初步判定

2.2.1 根据临床特征可作出病马感染马痘的初步判定。

2.2.2 最终判定应进行病毒分离鉴定。

3 病毒分离

3.1 样品采集和运送要求

采取病变部位的渗出液、水疱液和溃疡部位组织作为采集对象,尽量无菌采集,采集后低温送实验室进行病毒分离。

3.2 病毒分离试验

3.2.1 所需仪器、设备

3.2.1.1 CO₂ 培养箱。

3.2.1.2 II级生物安全柜。

3.2.1.3 倒置显微镜。

3.2.1.4 带冷冻功能的离心机。

3.2.2 材料准备

3.2.2.1 细胞培养基 DMEM。

3.2.2.2 HeLa 细胞。

3.2.2.3 Hanks 液(Hanks 液,见 A. 1;含抗生素,见 A. 4)。

3.2.2.4 小牛血清。

3.2.2.5 待检马组织:采取病变部渗出液、水疱液或丘疹和溃疡部组织作为标本,用 Hanks 液配制成 1:10 悬液,以 1 500 r/min 离心 10 min,取上清备用。

3.2.2.6 接种方法:用含 10%小牛血清的 DMEM 培养液培养 HeLa 细胞,待细胞长成单层后弃去培养液。将 3.2.2.5 中的待检组织接种 HeLa 细胞,然后加入含 5%小牛血清的 DMEM 培养液。CO₂ 培养箱内 37 ℃,48 h 后观察细胞病变。

3.3 判定

如果 48 h 后出现明显的细胞病变,如细胞圆缩、聚集,可进一步做病毒鉴定。正常的 HeLa 细胞为多角形,贴壁生长。

4 电子显微镜检查

4.1 材料准备

4.1.1 戊二醛,碳网膜,三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA),磷钨酸(pH7.2),滤纸,载玻片。

4.1.2 病毒液或待检病料,如病变部位的渗出液或水疱液。

4.2 负染操作方法

4.2.1 用戊二醛固定待检病料。

4.2.2 负染方法为:取一滴待检病料于载玻片上,将碳网膜漂浮于液滴上 1 min,再置于一滴三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA)缓冲液中浸泡 20 s,然后用一滴 1%的磷钨酸(pH7.2)染色 10 s。取出碳网膜,用滤纸吸干膜上液体,待自然干燥后镜检。

4.3 判定

电镜下见到砖形或大卵圆形,有一个双凹面的核心体,同时具有包膜。观察到上述结果,可判定为马痘感染。

5 分子生物学检测

5.1 材料准备

5.1.1 待检样品材料

分离的病毒、病毒感染的细胞或所采集的病料,如病变部位的渗出液或水疱液。

5.1.2 仪器设备

PCR 仪,恒温水浴锅,电泳仪,冷冻离心机,凝胶成像系统或其他类似设备(观察电泳结果),微波炉或相关仪器(琼脂糖凝胶的制备),超声波破碎仪,-20 ℃冰箱。

5.1.3 试剂

0.25%胰蛋白酶溶液(见 A.2),RNase,70%乙醇,TaqDNA 聚合酶,PBS 缓冲液,酚三氯甲烷,引物,dNTPs,去离子水,加样缓冲液,电泳缓冲液,溴化乙锭溶液(见 B.3)或相关染料(现在已经有溴化乙锭的替代产品,而且无致癌性,如 Gel Red)。缓冲液的配方见附录 B。

5.2 病毒基因组 DNA 的制备

用 0.25%的胰酶消化感染病毒的 HeLa 细胞,3 000 r/min 离心 5 min,收集的细胞沉淀用 PBS 缓冲

液重悬,于 95 °C 水浴灭活 30 min。重复离心,收集沉淀。再用 2 mL PBS 缓冲液重悬细胞。将细胞至于冰浴,超声波粉碎,输出功率为 40 W,时间 3 min,每 5 s 暂停 5 s。细胞经破碎后加入 10 μ L RNase, 37 °C 反应 30 min。待溶液温度降至室温后,加入 400 μ L 酚三氯甲烷,混匀后于冰浴中放置 5 min,然后 13 000 r/min 离心 5 min,收集 DNA 沉淀。用 70% 乙醇洗沉淀一次。空气干燥沉淀,加入 100 μ L 去离子水溶解 DNA,分装保存于 -20 °C 冰箱中备用。本步骤也可采取相关商品化的病毒 DNA 提取试剂盒。采集的病料可采取同样的方法或用商品化试剂盒进行病毒 DNA 的提取。

5.3 痘苗病毒血细胞凝集素 HA(Hemagglutinin, HA)基因的 PCR 扩增

5.3.1 引物序列

上游引物:5'-ATG ACA CGA TTG CCA ATA C-3';

下游引物:5'-CTA GAC TTT GTT TTC TG-3'。

5.3.2 各反应物浓度

引物 25 pmol/ μ L, dNTPs 2.5 mmol/ μ L, TaqDNA 聚合酶 5 U/ μ L, 反应体系为 25 μ L。

5.3.3 扩增条件

93 °C, 5 min, 92 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 1 min。共 35 个循环。预扩增片段大小为 940 bp。

5.3.4 电泳

制备 1% 琼脂糖凝胶板,加样 6 μ L~8 μ L,电压 80 V~100 V,电流 40 mA~50 mA,电泳 30 min~40 min。

5.4 马痘病毒的 PCR 检测

5.4.1 引物序列

上游引物:5'-GAAAATCCAGATACAGCCACC-3';

下游引物:5'-ACGCTGAAACGGAACCTGTAT-3'。

5.4.2 各反应物浓度

引物 25 pmol/ μ L, dNTPs 2.5 mmol/ μ L, TaqDNA 聚合酶 5 U/ μ L, 反应体系为 25 μ L。

5.4.3 扩增条件

93 °C, 5 min, 93 °C, 30 s, 53 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 35 个循环。预片段大小为 637 bp。

5.4.4 电泳

制备 1% 琼脂糖凝胶板,加样 6 μ L~8 μ L,电压 80 V~100 V,电流 40 mA~50 mA,电泳 30 min~40 min。

5.4.5 结果判定

如果不出现 940 bp 和 637 bp 大小的片段,判定为阴性;如果出现 940 bp 和 637 bp 中的任何一个片段则判定为阳性,并对 PCR 产物进行测序,与参考毒株进行序列比对。

6 结果的综合判定

根据 2.2,可作出初步判定。确诊需要根据 4.3、5.4.5 进行最终判定,如果电子显微镜检查发现特征性病毒粒子可判为马痘阳性,否则为阴性;如果 PCR 检测结果为阳性,可判为马痘阳性,否则为马痘阴性。当 4.3 和 5.4.5 结果不一致时,以 5.4.5 结果为准。

附录 A
(规范性附录)
细胞培养用试剂的配制

A.1 汉克液(Hanks)(10倍浓缩液)**A.1.1 成分****A.1.1.1 成分甲**

| | |
|--|--------|
| 氯化钠 | 80.0 g |
| 氯化钾 | 4.0 g |
| 氯化钙 | 1.4 g |
| 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 2.0 g |

A.1.1.2 成分乙

| | |
|---|--------|
| 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) | 1.52 g |
| 磷酸二氢钾 | 0.6 g |
| 葡萄糖 | 10.0 g |
| 1%酚红 | 16 mL |

A.1.2 配制方法

按顺序将上述成分分别溶于双蒸水 450 mL 中,即配成甲液和乙液,然后将乙液缓缓加入甲液,边加边搅拌。补足双蒸水至 1 000 mL。用滤纸过滤后,加入三氯甲烷 2 mL,置 2 °C~8 °C 保存。

A.1.3 使用方法

使用时,用双蒸水稀释 10 倍,107.6 kPa 灭菌 15 min,置 4 °C 保存备用。用前以 7.5%碳酸氢钠溶液调 pH 为 7.2~7.4。

A.2 0.25%胰蛋白酶溶液**A.2.1 成分**

| | |
|---|-------------|
| 氯化钠 | 8.0 g |
| 氯化钾 | 0.2 g |
| 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) | 1.12 g |
| 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 0.056 g |
| 碳酸氢钠 | 1.0 g |
| 胰蛋白酶(1:250) | 2.5 g |
| 双蒸水 | 加至 1 000 mL |

A.2.2 配制方法

放 2 °C~8 °C 冰箱过夜,待胰酶充分溶解后,用碳酸氢钠溶液调 pH 为 7.4~7.6。用 0.2 μm 的微

孔膜或 G6 型玻璃滤器滤过除菌。分装于小瓶中, -20 °C 保存。

A.3 EDTA-胰蛋白酶分散液(10 倍浓缩液)

A.3.1 成分

| | |
|------------------------------------|----------|
| 氯化钠 | 80.0 g |
| 氯化钾 | 4.0 g |
| 葡萄糖 | 10.0 g |
| 碳酸氢钠 | 5.8 g |
| 胰蛋白酶(1 : 250) | 5.0 g |
| 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na) | 2.0 g |
| 按顺序溶于双蒸水 900 mL 中, 然后加入下列各液: | |
| 1% 酚红溶液 | 2.0 mL |
| 青霉素(10 万 IU/mL) | 10.0 mL |
| 链霉素(10 万 $\mu\text{g}/\text{mL}$) | 10.0 mL |
| 补足双蒸水至 | 1 000 mL |

A.3.2 过滤除菌

用 0.2 μm 的微孔膜或 G6 型玻璃滤器滤过除菌。分装小瓶, -20 °C 保存。

A.3.3 分装

临用前, 用双蒸水稀释 10 倍, 适量分装于试管中, -20 °C 冻存备用。

A.3.4 使用方法

分散细胞时, 将细胞分散液取出融化后, 再置 35 °C ~ 37 °C 热水中预热, 并用 7.5% 碳酸氢钠调 pH 为 7.6 ~ 8.0。

A.4 抗生素溶液(1 万 IU/mL)

A.4.1 10 倍浓缩液

| | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| 青霉素 | 400 万 IU(80 万单位/瓶 × 5 瓶) |
| 链霉素 | 400 万 μg (100 万单位/瓶 × 4 瓶) |
| 双蒸水 | 40 mL |
| 溶液充分混合后, 分装小瓶, 放 -20 °C 保存。 | |

A.4.2 工作溶液

取上述浓缩液适量, 用双蒸水稀释 10 倍, 分装后放于 -20 °C 保存备用。

A.5 Tris-EDTA 缓冲液

10 mmol/L Tris · Cl, pH 7.5
1 mmol/L EDTA, pH 8.0

A.6 5%乳汉液

| | |
|-------|----------|
| 水解乳蛋白 | 5 g |
| 汉克氏液 | 1 000 mL |

完全溶解后适量分装,经 107.6 kPa 灭菌 15min,放 2℃~8℃保存备用,用时以 7.5%碳酸氢钠溶液调 pH 到 7.2~7.4。

附录 B
(规范性附录)
电泳用试剂的配制

B.1 10×加样缓冲液

20%(质量浓度) Ficoll 400
0.1 mol/L Na_2EDTA , pH8.0
1.0%(质量浓度) SDS
0.25%(质量浓度) 溴酚蓝
0.25%(质量浓度) 二甲苯青

B.2 50×TAE 电泳缓冲液

| | |
|--|---------|
| Tris 碱 | 242 g |
| 冰乙酸 | 57.1 mL |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 37.2 g |
| 加 H_2O 至 1 L。 | |

B.3 1 000×溴化乙锭溶液

| | |
|----------------------|--------|
| 溴化乙锭 | 50 mg |
| H_2O | 100 mL |

按 1 : 1 000 稀释配制凝胶和染色液,溶液应避光。

小心:溴化乙锭是一种诱变剂,必须小心操作。

B.4 PBS 缓冲液

| | |
|---------------------------|--------|
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0.2 g |
| Na_2HPO_4 | 1.42 g |
| KH_2PO_4 | 0.27 g |

溶于 1 L 去离子水中,调节 pH 至 7.4。高温高压灭菌,室温保存。



GB/T 27640—2011

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-44372

定价: 16.00 元