

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4303—2023

动物盖塔病毒感染诊断技术

Diagnostic techniques for animalgetah virus infection

2023-02-17 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



目 次

前言 II

引言 III

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 生物安全措施 1

6 临床诊断 1

 6.1 流行特点 1

 6.2 临床症状 1

 6.3 病理变化 2

 6.4 结果判定 2

7 样品采集与处理 2

 7.1 样品采集 2

 7.2 样品处理 2

8 实验室诊断 2

 8.1 病毒分离 2

 8.2 RT-PCR 3

 8.3 荧光 RT-PCR 4

 8.4 间接 ELISA 抗体检测 5

 8.5 血清中和试验(噬斑减少中和试验) 6

9 综合判定 7

附录 A(规范性) 病毒分离相关溶液的配制 8

附录 B(资料性) 盖塔病毒 RT-PCR、荧光 RT-PCR 相关引物和探针 9

附录 C(规范性) 核酸检测试验用溶液配制 10

附录 D(规范性) 酶联免疫吸附试验和血清中和试验用溶液的配制 11

附录 E(资料性) 血清中和试验(噬斑减少中和试验)测定示例 12

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。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

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：中国动物卫生与流行病学中心、云南省畜牧兽医科学院。

本文件主要起草人：徐天刚、王静林、左媛媛、李楠、孟锦昕、张慧、何于雯、戈胜强、李阳、王淑娟、吴晓东、王志亮。



引 言

盖塔病(Getah Virus Disease)是由披膜病毒科甲病毒属盖塔病毒(Getah Virus, GETV)引起的一种虫媒性人畜共患病,主要通过蚊、蠓等吸血节肢动物叮咬马、猪等哺乳动物传播。猪作为一种中间宿主,对盖塔病毒的传播与扩散起到重要作用。该病感染宿主范围较为广泛,可引起人类和许多脊椎动物的无症状感染,自然条件下已知马和猪感染出现有临床症状,如马的热症、皮疹和水肿,母猪的繁殖障碍和新生仔猪死亡等。盖塔病主要流行于欧亚大陆和澳大利亚北部的太平洋沿岸地区,近年来我国多有报道并有蔓延扩散趋势。该病的发生有一定的季节性和地域性,与吸血节肢动物媒介的活跃期和活动范围相关,一旦传入可呈地方流行或暴发流行。本文件的实施对提高马和猪盖塔病的诊断和监测水平,及时采取防控措施,保护家畜健康和产业发展,将起到重要作用。

本文件诊断技术内容包括临床诊断、病原学诊断方法和血清学诊断方法。其中推荐的病原核酸 RT-PCR 检测方法与 SN/T 3198—2012《猪盖塔病 RT-PCR 检测技术规范》相比,具有检测宿主广,引物特异性好,与经典毒株、流行毒株匹配度更高的优势。

本文件的制定参考了国外相关文献并结合了我国有关研究成果。

动物盖塔病毒感染诊断技术

1 范围

本文件规定了马、猪盖塔病毒感染的临床诊断、样品采集与处理,以及病毒分离、RT-PCR、荧光 RT-PCR、间接 ELISA 抗体检测、血清中和试验等实验室诊断方法的技术要求。

本文件适用于马、猪盖塔病毒感染的诊断、检测、检疫、监测和流行病学调查。

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)适用本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

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。

CPE:细胞病变效应(Cytopathic Effect)

cDNA:互补脱氧核糖核酸(Complementary DNA)

DEPC:焦碳酸二乙酯(Diethyl Pyrocarbonate)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay)

GETV:盖塔病毒(Getah Virus)

MEM:最低限度必需氨基酸营养液(Minimum Essential Medium)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

PFU:噬斑形成单位(Plaque Forming Unit)

RT-PCR:反转录-聚合酶链式反应(Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction)

TAE:三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液(Tris-Acetic acid-EDTA Buffer)

5 生物安全措施

进行马、猪盖塔病毒感染的诊断、检测时,如动物剖检、样品采集与处理、核酸提取等,按照 GB 19489 的规定执行。

6 临床诊断

6.1 流行特点

6.1.1 盖塔病毒感染可致马、猪出现明显临床症状。

6.1.2 盖塔病毒可在蚊、蠓等吸血节肢动物媒介体内复制并通过叮咬马、猪等动物进行传播。

6.1.3 盖塔病在马、猪中的暴发时间往往与蚊、蠓等吸血节肢动物媒介的季节高峰期相吻合。每年 6 月—9 月通常为该病流行期,气候湿热地区为高流行区域。

6.2 临床症状

6.2.1 病马临床症状

6.2.1.1 马主要表现为高烧不退,体温持续 $38.5^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$,一般经历 7 d~14 d 的发病过程后症状消失,体温恢复正常,通常预后良好。

6.2.1.2 马后肢跗关节水肿和僵硬,颌下淋巴结肿胀和轻度疼痛、精神抑郁、轻度黄疸、阴囊水肿。荨麻疹偶见,多表现为 3 mm~5 mm 大小不等的丘疹,常见于颈肩部、前肢、臀部、股部和小腿部。

6.2.2 病猪临床症状

6.2.2.1 成年猪表现为轻度发热和厌食。

6.2.2.2 母猪表现为繁殖障碍、产死胎等症状,部分严重者呈犬坐姿势或出现神经症状,最后全身衰竭死亡。

6.2.2.3 新生仔猪表现为皮肤充血发红、肌肉震颤、精神不振、腹泻、排出棕黄色稀粪,呈现较高的死亡率。

6.3 病理变化

6.3.1 马、猪脾脏淋巴细胞和淋巴结可见增生、肿大和淤血,偶发皮肤炎症。

6.3.2 马、猪的脑、肝和骨骼肌易受侵袭,骨骼肌可发生退化、萎缩、坏死和肌纤维的炎性病变。

6.4 结果判定

符合 6.1 且出现 6.2 和 6.3 所述情形,可初步判定为疑似盖塔病毒感染。若进一步确诊,应采样进行实验室诊断。

7 样品采集与处理

7.1 样品采集

7.1.1 组织样品

无菌采集马的肺、肝、脾、肾、淋巴结、脊髓组织;采集猪的脾、淋巴结以及死亡胎儿 25 g~50 g,装入样品保存管,加入 50% 甘油-PBS 保存液,使保存液液面没过样品,加盖封口,冷冻保存。

7.1.2 血液样品

无菌采集处于发热期的马或猪的肝素抗凝血、EDTA 抗凝血以及无添加剂全血各 1 管,每管应不少于 3 mL。密封后冷藏保存。

7.2 样品处理

7.2.1 组织样品

取发病或死亡动物肺、肝、脾、肾、淋巴结、脊髓等组织或死亡胎儿脏器约 2 g,剪碎后加入 10 mL PBS 溶液(含青霉素 1 000 IU/mL 和链霉素 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)充分研磨,制成 1:5 的组织悬浮液, 4°C 冰箱中浸提 4 h。取 2 mL 上清液用超声波裂解处理(100 μA , 1 min~2 min)或反复冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。标记编号后立即进行病原检测或冷冻保存。

7.2.2 血液样品

7.2.2.1 肝素抗凝血:取肝素抗凝血 200 μL ,加入 1 mL PBS, 1 000 r/min 离心 10 min,吸出上层血浆。标记编号后立即进行病原检测或冷冻保存。

7.2.2.2 EDTA 抗凝血:无须处理,标记编号后立即进行病原检测或冷冻保存。

7.2.2.3 无添加剂全血:按常规方法制备血清,标记编号后立即进行抗体检测或冷冻保存。

8 实验室诊断

8.1 病毒分离

8.1.1 主要仪器和器材

8.1.1.1 生物安全柜。

8.1.1.2 CO_2 细胞培养箱。

- 8.1.1.3 倒置生物显微镜。
- 8.1.1.4 台式低温高速离心机。
- 8.1.1.5 研钵和研杵(或组织匀浆机)。
- 8.1.1.6 24孔细胞培养板。

8.1.2 主要试剂

- 8.1.2.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.4),按照附录 A 中 A.1 的规定配制。
- 8.1.2.2 50%甘油-PBS 保存液,按照 A.2 的规定配制。
- 8.1.2.3 青霉素,浓度为 10 000 IU/mL。
- 8.1.2.4 链霉素,浓度为 10 000 μ g/mL。
- 8.1.2.5 细胞完全营养液和维持液,按照 A.3 的规定配制。

8.1.3 病毒分离

将 BHK-21(或 Vero、C6/36 等敏感传代细胞系)加入 24 孔细胞培养板,培养至长满单层。用无菌 PBS 洗涤细胞 3 次后,每孔接种 0.2 mL 疑似病畜的组织研磨上清液,或 50 μ L 制备的血浆样品(加入不含胎牛血清的细胞维持液至 0.2 mL 终体积),37 $^{\circ}$ C(适用于 BHK-21、Vero 细胞)或 28 $^{\circ}$ C(适用于 C6/36 细胞)吸附 60 min 后弃掉液体,加入含 2%胎牛血清的细胞维持液,每孔 1 mL,在细胞培养箱中培养,并逐日观察是否出现细胞病变(CPE)。初代分离若未出现 CPE,应盲传 3 代,每代连续观察 7 d。

8.1.4 病毒鉴定

将出现 CPE 的细胞悬液选用 8.2 或 8.3 所述方法进行核酸鉴定和分析。

8.1.5 结果判定

- 8.1.5.1 细胞盲传 3 代未见细胞病变,且经 8.1.4 所述方法检测为阴性者,判定为病毒分离阴性。
- 8.1.5.2 出现细胞病变,且经 8.1.4 所述方法检测为阳性者,判定为病毒分离阳性。

8.2 RT-PCR

8.2.1 主要仪器和器材

- 8.2.1.1 PCR 扩增仪。
- 8.2.1.2 台式低温高速离心机。
- 8.2.1.3 电泳仪和水平电泳槽。
- 8.2.1.4 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。
- 8.2.1.5 研钵和研杵(或组织匀浆机)。
- 8.2.1.6 微量可调移液器(2.5 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L 等不同规格)。
- 8.2.1.7 PCR 扩增管。
- 8.2.1.8 无 RNA 酶离心管和枪头。

8.2.2 引物与试剂

- 8.2.2.1 引物(序列信息见附录 B 中的 B.1)。
- 8.2.2.2 商品化病毒 RNA 提取试剂盒。
- 8.2.2.3 反转录酶(200 U/ μ L)。
- 8.2.2.4 核糖核酸酶(RNase)抑制剂(40 U/ μ L)。
- 8.2.2.5 dNTPs 混合物(10 mmol/L)。
- 8.2.2.6 预混 *Taq* 酶。
- 8.2.2.7 DL 2 000 DNA 分子质量标准。
- 8.2.2.8 DEPC 处理水(按照附录 C 中 C.1 的规定配制)。
- 8.2.2.9 TAE 缓冲液(按照 C.2 和 C.3 的规定配制)。

8.2.2.10 1%琼脂糖凝胶(按照 C.4 的规定配制)。

8.2.2.11 阳性对照样品:含有盖塔病毒的 EDTA 抗凝血或细胞培养物。

8.2.2.12 阴性对照样品:健康动物的 EDTA 抗凝血、正常细胞培养物或 DEPC 处理水。

8.2.3 试验程序

8.2.3.1 病毒 RNA 提取

采用商品化病毒 RNA 提取试剂盒提取血液、组织、细胞培养物等各类样本中的病毒核酸,或用自动化核酸提取仪提取各类样本中的病毒核酸。如在 2 h 内检测,可将提取的核酸置于冰上保存;否则,应置于一80℃保存。

8.2.3.2 cDNA 的制备

在含有 8 μL RNA 的 PCR 扩增管内,加入随机引物[pd(N)6]1 μL,10 mmol/L dNTPs 混合物 1 μL,轻敲管壁以混匀,瞬时离心,65℃条件下水浴 10 min,然后立即置于冰浴中 2 min。在含有 RNA 的 PCR 管内,依次加入 1 μL 的反转录酶、4 μL 的 5×反转录酶缓冲液、0.5 μL 的核糖核酸酶(RNase)抑制剂、4.5 μL 的 DEPC 处理水,使反应终体积为 20 μL,轻敲管壁以混匀反应体系,瞬时离心,30℃ 10 min,42℃ 60 min,70℃ 15 min。将制备好的 cDNA 立即进行目的基因扩增或冷冻保存备用。

8.2.3.3 基因扩增

配制 25 μL 反应体系所需试剂如下:

- a) 2.5 μL 的 cDNA 模板;
- b) 12.5 μL 的预混 Taq 酶;
- c) 0.5 μL 的引物 GETV240F(20 pmol/μL);
- d) 0.5 μL 的引物 GETV835R(20 pmol/μL);
- e) 9.0 μL 的 DEPC 处理水。

瞬时离心后,置于 PCR 扩增仪内进行扩增。扩增程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,30 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存扩增产物。

8.2.3.4 电泳

RT-PCR 反应结束后,取反应产物 8 μL,DL 2 000 分子质量标准 5 μL,分别在 1%琼脂糖凝胶中电泳,100 mA 电泳 20 min,用凝胶成像仪观察结果并拍照保存。

8.2.4 试验成立的条件

阳性对照样品的 PCR 产物出现 596 bp 特异性扩增条带,阴性对照和空白对照无扩增条带出现(引物二聚体除外)时,试验成立。

8.2.5 结果判定

被检样品 PCR 产物出现 596 bp 扩增条带时,可判定样品为盖塔病毒核酸阳性;否则为阴性。

8.3 荧光 RT-PCR

8.3.1 主要仪器和器材

- 8.3.1.1 荧光 PCR 扩增仪。
- 8.3.1.2 台式低温高速离心机。
- 8.3.1.3 研钵和研杵(或自动匀浆机)。
- 8.3.1.4 PCR 扩增管。
- 8.3.1.5 微量可调移液器(2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL 等不同规格)。
- 8.3.1.6 无 RNA 酶离心管和枪头。

8.3.2 引物、探针及主要试剂

- 8.3.2.1 引物和探针(序列信息见 B.2)。
- 8.3.2.2 病毒 RNA 提取试剂盒。
- 8.3.2.3 荧光 RT-PCR 试剂盒。

8.3.2.4 阳性对照样品:含有盖塔病毒的 EDTA 抗凝血或细胞培养物。

8.3.2.5 阴性对照样品:健康动物的 EDTA 抗凝血、正常细胞培养物或 DEPC 处理水。

8.3.3 试验程序

8.3.3.1 病毒 RNA 提取

同 8.2.3.1。

8.3.3.2 荧光 RT-PCR 扩增

按商品化荧光 RT-PCR 试剂盒说明书操作。将有关试剂在室温下融化,2 000 r/min 离心 5 s。每个样品配制 20 μ L 反应体系,配制如下:

- a) 10.0 μ L 的 $2\times$ 一步法荧光 RT-PCR 缓冲液;
- b) 0.4 μ L 的 *Taq* 酶(5 U/ μ L);
- c) 0.4 μ L 的反转录酶混合物;
- d) 0.4 μ L 的 Rox 参比染料;
- e) 0.4 μ L 的引物 GETV-F(10 pmol/ μ L);
- f) 0.4 μ L 的引物 GETV-R(10 pmol/ μ L);
- g) 0.4 μ L 的探针 GETV-P(10 pmol/ μ L);
- h) 2.0 μ L 的模板 RNA;
- i) 5.6 μ L 的 DEPC 处理水。

将荧光 RT-PCR 反应板(或管)封板(或盖紧管盖)标记后混匀,瞬时离心,放入荧光 PCR 扩增仪内进行扩增。注意:反应体系可依据所用试剂盒的不同而适当改变。扩增程序如下:42 $^{\circ}$ C 反转录 5 min,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 34 s,40 个循环。设定程序在第三阶段每个循环的退火延伸时收集荧光信号。

8.3.4 试验成立条件

阳性对照的 C_t 值应 <28 ,并出现典型的扩增曲线;阴性对照无 C_t 值并且无扩增曲线,试验结果有效。否则,应重新进行试验。

8.3.5 结果判定

被检样品 C_t 值 <35 ,且出现典型的扩增曲线,判定为盖塔病毒核酸阳性。无 C_t 值则判为盖塔病毒核酸阴性。当 $35\leq C_t$ 值 ≤ 40 ,判定为可疑,应重新检测;如出现典型的扩增曲线,且 C_t 值 ≤ 40 ,判定为盖塔病毒核酸阳性。

8.4 间接 ELISA 抗体检测

8.4.1 主要仪器和器材

- 8.4.1.1 酶标仪。
- 8.4.1.2 恒温培养箱。
- 8.4.1.3 洗瓶或洗板机。
- 8.4.1.4 微量可调移液器(2.5 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L 等不同规格)。
- 8.4.1.5 ELISA 反应板、枪头等。

8.4.2 主要试剂

- 8.4.2.1 包被抗原:经灭活和纯化处理的盖塔病毒细胞毒。
- 8.4.2.2 酶标二抗:辣根过氧化物酶标记的羊抗猪(或马)IgG。
- 8.4.2.3 对照:盖塔病毒阳性对照血清、盖塔病毒阴性对照血清。
- 8.4.2.4 包被液:0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液(按照附录 D 中 D.1 的规定配制)。
- 8.4.2.5 洗涤液:含 0.05%吐温-20、pH 7.4 的 PBS(按照 D.2 的规定配制)。
- 8.4.2.6 封闭液及抗体稀释液:含 3%牛血清白蛋白(BSA)的 pH 7.4 的 PBS(按照 D.3 的规定配制)。
- 8.4.2.7 底物溶液:TMB 溶液(按照 D.4 的规定配制)。

8.4.2.8 终止液:2 mol/L H_2SO_4 (按照 D.5 的规定配制)。

8.4.3 试验程序

8.4.3.1 抗原包被和封闭

将收获的盖塔病毒细胞毒经甲醛灭活后,按蔗糖密度梯度法超速离心纯化,获得的抗原用包被液稀释至终浓度为 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$,每孔 $100\ \mu\text{L}$ 包被 96 孔酶标板,4 °C 孵育过夜。洗涤液洗涤 3 次,每次 5 min。酶标板每孔加入 $200\ \mu\text{L}$ 封闭液,置于 37 °C 恒温培养箱中封闭 60 min,洗涤液洗涤 3 次,每次 5 min,甩干孔内残液,在吸水纸上拍干备用。

8.4.3.2 加样

将盖塔病毒阳性对照血清、阴性对照血清及待检血清用抗体稀释液分别作 1 : 400 倍稀释,酶标板每孔加入 $100\ \mu\text{L}$,阴、阳性对照各加 2 孔,37 °C 恒温培养箱中孵育 60 min,洗涤液洗涤 3 次,每次 5 min,甩干孔内残液,在吸水纸上拍干备用。

8.4.3.3 加酶标二抗

根据被检测动物种类不同,加入 1 : 3 000(或按照说明书推荐)稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗马或抗猪 IgG,每孔 $100\ \mu\text{L}$,37 °C 恒温培养箱中孵育 60 min,洗涤液洗涤 3 次,每次 5 min,甩干孔内残液,在吸水纸上拍干备用。

8.4.3.4 显色与终止

每孔加入底物溶液 $50\ \mu\text{L}$,避光显色 5 min。显色完毕后,每孔加入 $50\ \mu\text{L}$ 终止液终止反应,立即在酶标仪 450 nm 波长处读取结果。

8.4.4 试验成立条件

阳性对照血清的平均 $\text{OD}_{450} \geq 1.0$,阴性对照血清平均 $\text{OD}_{450} \leq 0.3$ 时,试验结果有效;否则,应重新进行试验。

8.4.5 结果判定

按下列公式计算样品 S/N 值: $S/N = \text{待检样品 } \text{OD}_{450} \text{ 值} / \text{阴性对照平均 } \text{OD}_{450} \text{ 值}$ 。

在试验成立的前提下,样品 S/N 值 ≥ 2.1 判定为盖塔病毒抗体阳性; S/N 值 ≤ 1.5 判为盖塔病毒抗体阴性; $1.5 < S/N$ 值 < 2.1 ,判为可疑。对结果可疑样品必须进行复检,如复检结果仍为可疑,则于 2 周后重新采样检测。

8.5 血清中和试验(噬斑减少中和试验)

8.5.1 主要仪器和器材

8.5.1.1 CO_2 细胞培养箱。

8.5.1.2 倒置生物显微镜。

8.5.1.3 微量振荡器。

8.5.1.4 6 孔细胞培养板。

8.5.1.5 微量可调移液器($2.5\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}$ 、 $200\ \mu\text{L}$ 、 $1\ 000\ \mu\text{L}$ 等不同规格)。

8.5.2 主要试剂

8.5.2.1 1%琼脂糖(按照 D.6 的规定配制)。

8.5.2.2 3%中性红(按照 D.7 的规定配制)。

8.5.2.3 细胞完全培养液和维持液(按照 A.3 的规定配制)。

8.5.3 试验程序

8.5.3.1 毒价测定

将盖塔病毒液用无血清细胞维持液作 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 稀释,取长满单层 BHK-21 细胞的 6 孔细胞培养板,吸出培养液,将 $10^{-3} \sim 10^{-8}$ 的病毒稀释液 $100\ \mu\text{L}$ 分别加入到 6 孔细胞培养板,37 °C 吸附 60 min。吸出细胞板内液体,加入第一层胶(含 1%琼脂糖和 2%胎牛血清的细胞维持液),每孔 3 mL,37 °C 培养 1 d ~ 2 d。当显微镜下观察出现噬斑时,加入第二层胶(含 1%琼脂糖、0.03%中性红溶液和含 2%胎牛血清的

细胞维持液),每孔 3 mL,6 h 后观察噬斑并计数。测定噬斑形成单位(PFU)。

8.5.3.2 中和试验

将待检血清于 56 ℃水浴 30 min 灭活。取血清 10 μL 和无血清细胞维持液 90 μL 混合,在 96 孔培养板上做连续倍比稀释。然后,加入 100 μL(含 200 个 PFU)的病毒液,经微量振荡器振荡 1 min~2 min,37 ℃中和作用 60 min。分别接种在已经长满单层 BHK-21 细胞的 6 孔板,37 ℃吸附 60 min,在试验中分别设有 0 个 PFU、10 个 PFU、50 个 PFU 和 100 个 PFU 对照。加入第一层胶(含 1%琼脂糖和含 2%胎牛血清的细胞维持液),37 ℃培养 1 d~2 d。当显微镜下观察出现噬斑时,加入第二层胶(含 1%琼脂糖、0.03%中性红溶液和 2%胎牛血清的细胞维持液),6 h 后观察噬斑并计数。

8.5.4 结果判定

8.5.4.1 计算中和抗体滴度

以 Reed 和 Muench 氏法计算(示例见附录 E):

距离比例=(高于 90%的噬斑百分数-90%)/(高于 90%的噬斑百分数-低于 90%的噬斑百分数)

90%噬斑抑制终点=高于 90%稀释度对数+距离比例×稀释系数的对数

8.5.4.2 判定

对照成立,以 90%抑制噬斑减少为滴定终点,血清抗体稀释滴度大于等于 1:10 的标本判为阳性。

9 综合判定

9.1 临床判定为疑似的易感动物,经 8.1 分离出盖塔病毒,或经 8.2、8.3 任一项检测为盖塔病毒核酸阳性的,可判定为盖塔病发病。

9.2 临床无明显特异症状的非免疫动物经 8.4、8.5 任一项检测为盖塔病毒抗体阳性的,可判定该动物曾经感染过盖塔病毒。若 8.4 和 8.5 检测结果不一致,以 8.5 检测结果为准。

9.3 临床无明显特异症状的同群或具有流行病学相关性易感动物,采集血液或组织样品经 8.1、8.2、8.3 任一项检测为阳性的,可判定为盖塔病感染。

附 录 A
(规范性)
病毒分离相关溶液的配制

A.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)

称取 8.00 g 氯化钠(NaCl)、0.20 g 氯化钾(KCl)、1.42 g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.27 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),调整 pH 至 7.4,加去离子水定容至 1 000 mL,高压灭菌,室温保存。

A.2 50% 甘油-PBS 保存液(pH 7.4)

将 0.01 mol/L PBS 与纯甘油(分析纯)等量混合,调整 pH 至 7.4,分装为小瓶,高压灭菌,室温或 4 °C 保存。

A.3 细胞完全营养液和维持液

A.3.1 MEM 基础营养液

称取 9.5 g MEM 干粉和 2.2 g 碳酸氢钠(NaHCO_3),加去离子水定容至 1 000 mL,充分混匀,过滤除菌后 4 °C 保存备用。

A.3.2 200 mmol/L 谷氨酰氨溶液(母液)

称取 2.923 g 谷氨酰氨(L-glutanin),加去离子水配制成 100 mL 溶液。

A.3.3 细胞完全营养液(pH 7.2)

取 900 mL 的 MEM 基础营养液加 100 mL 的灭活胎牛血清混合,配制成 1 000 mL 的溶液,加入青霉素至终浓度 100 IU/mL,链霉素至终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,谷氨酰氨至终浓度 2 mmol/L,4 °C 保存备用。

A.3.4 细胞维持液(pH 7.2)

1 000 mL 的 MEM 基础营养液,加入青霉素至终浓度 100 IU/mL,链霉素至终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,谷氨酰氨至终浓度 2 mmol/L,4 °C 保存备用。

附 录 B
(资料性)

盖塔病毒 RT-PCR、荧光 RT-PCR 相关引物和探针

B.1 盖塔病毒 RT-PCR 检测引物

表 B.1 列出了盖塔病毒 RT-PCR 检测引物信息。

表 B.1 盖塔病毒 RT-PCR 检测引物

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小, bp	基因
GETV240F	TCCAACAGGCGTCACCATC	596	NS1
GETV835R	GCTTTCGGCTCTCGGTGTA		

B.2 盖塔病毒荧光 RT-PCR 检测引物和探针

表 B.2 列出了盖塔病毒荧光 RT-PCR 检测引物和探针信息。

表 B.2 盖塔病毒荧光 RT-PCR 检测引物和探针

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)	基因
GETV-F	CGCTTATCTGGACTTGGTCTG	129	NS4
GETV-R	GAAGGTACTGCGCTCCTGATT		
GETV probe	FAM-TCTGCCCCGCCAACTAAGATGTTAC-TAMRA		

B.3 引物和探针的稀释

开盖前,将新合成的引物或探针进行瞬时离心(12 000 r/min,30 s);用 DEPC 处理水溶解,加水量为 10×总纳摩尔数,充分混匀,此时引物或探针的浓度为 100 pmol/μL,可作为储存液,−20 ℃或以下温度保存;使用时,将 100 pmol/μL 的引物或探针储存液用 DEPC 处理水配制浓度为 20 pmol/μL(RT-PCR)或 10 pmol/μL(荧光 RT-PCR)的使用液,−20 ℃或以下温度保存。

附 录 C
(规范性)
核酸检测试验用溶液配制

C.1 DEPC 处理水

取 1 mL DEPC 加入去离子水至终体积 1 000 mL,充分混匀后将瓶盖拧松,置于 37 ℃放置过夜,高压灭菌。室温或 4 ℃保存备用。

C.2 50×TAE 储存液

取 242 g 的 Tris 碱、37.2 g 的 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、57.1 mL 的冰乙酸,加 800 mL 去离子水充分溶解,混匀后加去离子水定容至 1 000 mL。室温保存。

C.3 1×TAE 缓冲液

使用前,将 50×TAE 做 50 倍稀释即可。

C.4 1%琼脂糖凝胶

称取 1.0 g 琼脂糖放入 100 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液中,加热融化,待温度降至 60 ℃左右,加入 2.5 μL 核酸染料 Gold View(10 mg/mL),混匀后制备凝胶块。

附 录 D

(规范性)

酶联免疫吸附试验和血清中和试验用溶液的配制

D.1 包被缓冲液——0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)

称取 0.318 g 碳酸钠(Na_2CO_3)、0.558 g 碳酸氢钠(NaHCO_3),调整 pH 至 9.6,加去离子水定容至 200 mL,充分混匀,过滤除菌,室温保存备用。

D.2 洗涤缓冲液——含 0.05%吐温-20 的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)

取 0.5 mL 的吐温-20(Tween-20),加入 1 000 mL 的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中,充分混匀,现用现配。

D.3 封闭液及抗体稀释液——含 3% BSA 的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)

称取 3 g 牛血清白蛋白(BSA),加入 100 mL 的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中,充分混匀,现用现配。

D.4 底物溶液(TMB 溶液)**D.4.1 A 液**

称取 20 mg 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),加入 10 mL 无水乙醇(分析纯)中,待充分溶解后加去离子水定容至 100 mL。用 0.45 μm 滤膜过滤后,避光 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 棕色瓶保存。

D.4.2 B 液

取 7.17 g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.93 g 的柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)和 0.64 mL 的过氧化氢尿素溶液(0.75%),加去离子水定容至 100 mL,调整 pH 至 5.0~5.4。

D.4.3 用法

使用时,将 A 液、B 液按 1:1 的比例混合,现用现配。

D.5 终止液(2 mol/L H_2SO_4)

将 11.10 mL 浓 H_2SO_4 缓慢加入 88.90 mL 去离子水中,混匀,冷却至室温。

D.6 1%琼脂糖

取 1.00 g 琼脂糖溶解于 100 mL 去离子水中,103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

D.7 3%中性红

取 3.00 g 中性红溶解于 100 mL 去离子水中,103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

附 录 E
(资料性)

血清中和试验(噬斑减少中和试验)测定示例

将待检血清灭活后做 1 : 10~1 : 160 倍比稀释,分别与稀释好的病毒(0.1 mL 含 200 个 PFU)等量混合,置 37 ℃作用 60 min,接种至已经长满单层 BHK-21 细胞的 6 孔板,每个稀释度接种 2 个孔,置 37 ℃作用 60 min,加入预热的第一层胶(含 1%琼脂糖和细胞维持液),37 ℃培养 1 d~2 d,当显微镜下观察出现噬斑时加入预热的第二层胶(含 1%琼脂糖、0.03%中性红溶液和细胞维持液),37 ℃继续培养,6 h 后观察噬斑并开始计数。结果按 Reed 和 Muench 氏法计算。示例如表 E. 1。

表 E. 1 测定示例数据

血清稀释度	噬斑数		平均 噬斑数	出现噬斑的 百分数	噬斑抑制的 百分数
	1 号	2 号			
1 : 10(10^{-1})	0	0	0	0	100
1 : 20($10^{-1.3}$)	3	3	3	6	94
1 : 40($10^{-1.6}$)	11	13	12	24	76
1 : 80($10^{-1.9}$)	19	21	20	40	60
1 : 160($10^{-2.2}$)	44	40	42	84	16
对照	51	49	50		

$$\begin{aligned} \text{距离比例} &= (\text{高于 } 90\% \text{ 的噬斑百分数} - 90\%) / (\text{高于 } 90\% \text{ 的噬斑百分数} - \text{低于 } 90\% \text{ 的噬斑百分数}) \\ &= (94 - 90) / (94 - 76) \\ &= 0.22 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 90\% \text{噬斑抑制终点} &= \text{高于 } 90\% \text{ 稀释度对数} + \text{距离比例} \times \text{稀释系数的对数} \\ &= -1.3 + 0.22 \times (-0.3) \\ &= -1.3 + (-0.066) \\ &= -1.366 \end{aligned}$$

即该份血清中和效价为 $10^{-1.366}$, 相当于血清作 1 : 23 稀释。