

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4104—2015

### 猪支原体肺炎检疫技术规范

Quarantine protocol for *Mycoplasma hyopneumoniae*

2015-02-09 发布

2015-09-01 实施



中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准负责起草单位：中华人民共和国重庆出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、重庆动物疫病预防控制中心、西南大学、重庆正大有限公司。

本标准主要起草人：聂福平、杨俊、张强、李应国、曾政、王昱、肖进文、程光胜、王豪举、夏明星。

# 猪支原体肺炎检疫技术规范

## 1 范围

本标准规定了猪支原体肺炎的病理学诊断方法、病原分离和鉴定方法、间接血凝试验、酶联免疫吸附试验、聚合酶链式反应试验。

本标准适用于猪支原体肺炎的检疫、诊断、流行病学调查。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

WS 233—2002 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**猪支原体肺炎(Mycoplasma hyopneumoniae)**

猪支原体肺炎又称猪气喘病,猪地方流行性肺炎,是由猪肺炎支原体引起的一种接触性呼吸系统传染病,是造成养猪业经济损失最重要的疾病之一。该病以咳嗽和气喘为主要临床特征,病变部位主要在肺部,可见心叶、中间叶和尖叶有融合性支气管肺炎变化。该病广泛流行于世界各地,欧洲、亚洲、美洲以及大洋洲等主要养猪国家和地区均有发生。

## 4 实验室生物安全要求

4.1 检测工作中的个人防护参照 GB 19489。

4.2 实验室应遵循 GB 19489 和 WS 233—2002 对生物安全 2 级(BSL-2)实验室的生物安全要求。

4.3 使用过的实验用品应遵照 GB 19489 对废弃物的处理要求进行无害化处理。

## 5 临床和病理学诊断

### 5.1 临床症状

猪支原体肺炎是一种发病率高死亡率低的慢性呼吸道传染病,主要临床症状为慢性干咳。新发病猪群常呈急性,张口喘气,痉挛性阵咳,体温升高不明显。咳嗽持续几周甚至数月,育肥猪咳嗽最严重。部分患猪呈腹式呼吸,喘息沟明显。患猪食欲减退,消瘦,被毛粗糙,生长停滞。该病病程主要分急性、

慢性两种类型。

## 5.2 病理学特征

主要病变见于肺、肺门淋巴结和纵隔淋巴结。急性死亡患猪肺有不同程度的水肿和气肿。肉眼病变类似于膨胀不全的肺,尤其在疾病的慢性阶段。特征性病变是两肺的心叶、尖叶和膈叶前缘发生对称性的实变,肺门淋巴结肿大,肺中间叶实变,以及肺门淋巴结肿大、增生。病变最初为粟粒大至豆大呈均匀散布,逐渐扩展而融合成支气管肺炎。病变部界限明显,灰白色,无弹性,呈“胰样”“鱼肉样”。切开时,内有大量泡沫。其他器官无明显变化。

## 5.3 病理组织学检查

典型病变组织通过常规的病理学检查,支气管和细支气管上皮组织纤毛数量减少,小支气管周围的肺泡扩大,泡腔充满多量炎性渗出物,肺泡间组织有淋巴样细胞增生。急性病例中,扩张的泡腔内充满浆液性渗出物,杂有单核细胞、中性粒细胞、少量淋巴细胞和脱落的肺泡上皮细胞。慢性病例中,其肺泡腔内的炎性渗出物中主要是淋巴细胞浸润。

## 5.4 X线检查

X线检查对本病的诊断有重要价值,对可疑患猪进行X线透视,可做出诊断。在X线检查时,猪只以直立背胸位为主,侧位或斜位为辅。病猪在肺野的内侧区以及心膈角区呈现絮状及片状阴影。

# 6 病理分离和鉴定

## 6.1 材料准备

- 6.1.1 A26肉汤:制备方法见附录A。
- 6.1.2 固体培养基:制备方法见附录A。
- 6.1.3 厌气肉肝汤:制备方法见附录A。
- 6.1.4 血琼脂平板:按GB 4789.28的方法配制。
- 6.1.5 Hank's液:配制方法见附录A。
- 6.1.6 0.25%鸡红细胞液:制备方法见附录A。
- 6.1.7 灭菌干棉拭子。

## 6.2 病料采集

- 6.2.1 活体病料采集:用棉拭子深擦拭病猪的喉头或鼻腔,采集呼吸道分泌物。
- 6.2.2 死后病料采集:无菌采取病键交界处肺组织。

## 6.3 病原分离

将病肺组织剪成小于 $2\text{ mm}^3$ 的碎块,浸入Hank's液中洗涤,除去血液和组织碎块,取3块~5块浸泡在盛有5 mL A26肉汤的试管中;棉拭子浸入10 mL A26肉汤中清洗,并压出棉花中残液,再经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤除菌,将滤液分装于试管中。将上述试管置于含5%~10%  $\text{CO}_2$ 环境或用胶塞塞紧管口,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下进行培养。1代~3代分离时,须每经3 d~5 d,以20%的接种量连续进行移植;4代~5代以后,再经5 d~7 d连续转移以提高分离率。同时应设厌气肉肝汤、血琼脂平板作为细菌检查的对照。

通过连续传代,当培养物出现有规则的变化时,应涂片镜检;同时将液体培养物作适当稀释后再接



种于固体培养基上,在含 5%~10% CO<sub>2</sub> 环境中 37 ℃ 下培养 3 d~10 d。培养时应逐日在低倍镜下观察,若出现圆形、边缘整齐、似露滴状、中央有颗粒、稍隆起的小菌落,判为可疑菌落,需进一步进行鉴定。

## 6.4 生化鉴定

### 6.4.1 溶血试验

挑取可疑菌落接种含猪或鸡红细胞的固体培养基上培养 2 d~3 d,如为猪肺炎支原体,则菌落周围无溶血现象。

### 6.4.2 精氨酸试验

挑取可疑菌落接种于含精氨酸及酚红指示剂的液体培养基中,由于猪肺炎支原体不能分解精氨酸产生氨,故如果指示剂不变色,试验为阴性,反之,则猪肺炎支原体为阳性。

### 6.4.3 薄膜和斑点形成试验

挑取可疑菌落接种于含马血清的固体培养基上,由于猪肺炎支原体不能分解其中的脂肪酸,故如果在固体培养基上菌落的表面和周围不能形成薄膜和斑点,试验为阴性,反之,则猪肺炎支原体为阳性。

### 6.4.4 红细胞吸附试验

将 0.25% 鸡红细胞液滴加于可疑菌落上,静止后弃去红细胞液,用生理盐水冲洗 2 次~3 次,用低倍镜检查,如为猪肺炎支原体,可见菌落表面和周围吸附有大量红细胞。

### 6.4.5 结果判定

以上试验皆为阳性者判为猪肺炎支原体。

## 7 间接血凝试验

### 7.1 材料准备

7.1.1 96 孔(12×8)V 型反应板,微量移液器,微量振荡器等。

7.1.2 猪肺炎支原体纯化灭活抗原,阳性血清,阴性血清。

7.1.3 致敏红细胞:为猪肺炎支原体纯化灭活抗原致敏的雄性绵羊红细胞。

7.1.4 稀释剂:含 1% 健康兔血清 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)。

### 7.2 操作方法

#### 7.2.1 血清的处理

取被检血清 0.2 mL 于无菌小试管中,56 ℃ 水浴 30 min 灭活,冷却后加入 0.3 mL 2% 戊二醛红细胞悬液,摇匀,置 37 ℃ 水浴 30 min,离心后吸出血清供检验用。阳性血清、阴性血清的处理同被检血清。

#### 7.2.2 血凝试验

见表 1。

SN/T 4104—2015

表 1 猪肺炎支原体间接血凝试验

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀释倍数	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1 280	1 : 2 560		对照
稀释剂	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25		25
被检血清	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	弃去 25	
2%致敏红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25		25
作用时间 及温度	震荡 30 s 后,室温(18℃~25℃)静置 2 h											
判定举例		++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-		-

7.2.3 操作步骤

7.2.3.1 用微量移液器先向反应板每孔中加入 25 μL 稀释剂,再向第 1 孔加入 25 μL 已处理好的被检清,充分混匀后,吸取 25 μL 加入第 2 孔……依次做倍比连续稀释至第 10 孔(血清的稀释倍数为 1 : 5、1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320、1 : 640、1 : 1 280、1 : 2 560),混匀后从第 10 孔中取出 25 μL 弃去。

7.2.3.2 向每孔中加入 25 μL 2% 致敏红细胞,血清的最终稀释倍数为 1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320、1 : 640、1 : 1 280、1 : 2 560、1 : 5 120。同时,应设立阴、阳性血清对照及敏化红细胞空白对照。

7.2.3.3 置微型振荡器上震荡 30 s 后,室温静置 2 h,观察结果。

7.3 结果判定

7.3.1 试验成立条件

敏化红细胞对照无自凝现象,阳性对照血清抗体价>1 : 20(++);阴性对照血清抗体价<1 : 5(-)时表明试验成立。

7.3.2 判定标准

判定标准如下:

- a) ++++:红细胞 100%凝集,在孔底凝集浓缩成团,面积较大;
- b) +++:红细胞 75%凝集,在孔底形成较厚凝集,面积较大,卷边或呈锯齿状;
- c) ++:红细胞 50%凝集,其余不凝集的红细胞在孔底中央集中成较大的圆点;
- d) +:红细胞 25%凝集,不完全沉于孔底,周围有散在少量的凝集;
- e) -:红细胞呈点状沉于孔底,周边光滑。

7.3.3 判定

被检血清抗体价≥1 : 10(+)者,判为阳性;被检血清抗体价<1 : 5(-)者,判为阴性;介于二者之间者判为可疑。将可疑猪隔离饲养 1 个月后再做检验,若仍为可疑反应,按照阳性反应判定。



## 8 酶联免疫吸附试验

### 8.1 材料准备

本标准所用水应符合 GB/T 6682 中二级水的规格。下列试剂除特殊规定外,均指分析纯试剂。

- 8.1.1 酶标检测仪。
- 8.1.2 恒温培养箱。
- 8.1.3 可调微量移液器(1 μL~10 μL, 50 μL~200 μL, 50 μL~1 000 μL)。
- 8.1.4 洗板机。
- 8.1.5 猪肺炎支原体抗原:由指定单位提供。
- 8.1.6 猪肺炎支原体阳性对照血清、猪肺炎支原体阴性对照血清:由指定单位提供。
- 8.1.7 辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗猪抗体:由指定单位提供。
- 8.1.8 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 B。

### 8.2 采样

被检动物无菌采血 5 mL,待血液凝固后,2 000 g 离心 10 min,分离血清,血清-20 ℃保存。

### 8.3 操作方法

- 8.3.1 包被抗原:将猪支原体肺炎抗原包被液稀释成工作浓度,包被酶标板,每孔 100 μL,加盖后,置 4 ℃冰箱包被过夜。
- 8.3.2 封闭:次日取出酶标板,弃去液体后,每孔加入洗液 300 μL 洗板,共 3 次~5 次;加入 1% BSA 封闭液(或稀释液),每孔 100 μL,置 37 ℃恒温箱封闭 1 h。
- 8.3.3 洗板:取出酶标板弃去液体后,每孔加入洗液 300 μL 洗板,共 3 次~5 次。最后一次倒置拍干。
- 8.3.4 加样:被检血清用稀释液作 1:40 稀释,每份血清加 2 孔,每孔 100 μL。同时设立:猪支原体肺炎标准阳性血清(阳性对照)、标准猪阴性血清(阴性对照)、空白对照。阳性、阴性血清对照同被检血清一样,用稀释液作 1:40 稀释,每个对照加 2 孔,每孔 100 μL。空白对照同样加 2 孔,每孔加 100 μL 稀释液,室温(18 ℃~25 ℃)下作用 30 min。
- 8.3.5 洗板:按 8.3.3 操作。
- 8.3.6 加辣根过氧化物酶标记的抗猪抗体:用稀释液将酶标抗体稀释成工作浓度,每孔 100 μL,室温(18 ℃~25 ℃)下作用 30 min。
- 8.3.7 洗板:按 8.3.3 操作。
- 8.3.8 加酶底物溶液:每孔加 100 μL,室温(18 ℃~25 ℃)下作用 15 min。
- 8.3.9 终止反应:取出反应板,每孔加 100 μL 终止反应液终止反应。
- 8.3.10 测吸光值:用酶标仪在 650 nm 波长下,以空白对照为参照,测定其吸光值(OD)。

### 8.4 结果计算

- 8.4.1 只有在阳性对照平均值减去阴性对照平均值的差值 $\geq 0.15$ 、阴性对照平均值 $\leq 0.15$ 时,检测结果才有效。
- 8.4.2 计算平均吸光度值。被检样品和各对照的两孔吸光度值之和除以 2。
- 8.4.3 计算 S/P 值。样本的 S/P 值按式(1)计算。

$$S/P = \frac{\text{样品} \bar{A} - NC \bar{x}}{PC \bar{x} - NC \bar{x}} \dots\dots\dots (1)$$

SN/T 4104—2015

式中：

$S/P$ ——样品的平均 OD 值-阴性对照的平均 OD 值与阳性对照的平均 OD 值-阴性的平均 OD 值的比值；

$NC \bar{x}$ ——阴性对照的平均 OD 值；

$PC \bar{x}$ ——阳性对照的平均 OD 值。

8.5 判定标准

判定标准如下：

- 阳性反应：被检血清相对平均吸光度值( $S/P$  值)大于 0.40；
- 阴性反应：被检血清相对平均吸光度值( $S/P$  值)小于 0.30；
- 疑似反应：被检血清相对平均吸光度值( $S/P$  值)大于 0.30 但小于 0.40；
- 所有的疑似反应均需重做或采用其他方法进行比较确认。

9 聚合酶链式反应(套式 PCR)

9.1 材料准备

- 9.1.1 PCR 扩增仪。
- 9.1.2 电泳仪。
- 9.1.3 凝胶成像系统。
- 9.1.4 高速冷冻离心机。
- 9.1.5 可调微量移液器(0.1  $\mu\text{L}$ ~2.5  $\mu\text{L}$ 、0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ )。
- 9.1.6 琼脂糖。
- 9.1.7 溴化乙锭(EB)。
- 9.1.8 *Taq* 酶。
- 9.1.9 2.5 mmol/L dNTP。
- 9.1.10 DEPC 水。
- 9.1.11 分子量指示物：100 bp~2 000 bp DNA marker。
- 9.1.12 PBS、Tris-乙酸电泳缓冲液、琼脂糖凝胶、6 $\times$ 加样缓冲液、10 $\times$ PCR 缓冲液，见附录 C。

9.2 引物序列

引物序列见表 2。

表 2 引物序列

引物	核苷酸序列(5'~3')	产物大小
F1	GCCATTCGCTTATATGGTGA	706 bp
P1	CGCTTTAGTACCGATATGGG	
F2	GATGTTATTTTTGAGACTTGC	375 bp
P2	AGCAATCATCAGTTTTGCTTG	



### 9.3 操作步骤

#### 9.3.1 样品

被检菌株、淋巴结、肺等组织样品及鼻拭子。

#### 9.3.2 样品处理

9.3.2.1 菌株:挑取可疑菌落于 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)中,制成菌悬液或液体培养物。

9.3.2.2 组织样品及鼻拭子:取组织 0.5 g~1 g 剪碎,加入 1 mL PBS 缓冲液,匀浆。鼻拭子在 1 mL PBS 缓冲液中反复挤压。分别将挤下的液体和组织匀浆液 100 g 离心 5 min,弃沉淀。取菌悬液或上清液按照市售的基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。其他等效的商品化 DNA 提取试剂盒或方法也可以采用。

#### 9.3.3 对照设立

对照设立如下:

- a) 阳性对照用猪肺炎支原体标准菌株 DNA,或已知猪肺炎支原体阳性组织制备的模板;
- b) 阴性对照用胸膜肺炎放线杆菌菌株 DNA,或已知猪肺炎支原体阴性组织制备的模板;
- c) 空白对照等用等体积的 DEPC 水代替模板。

#### 9.3.4 PCR 反应体系

总体积 25  $\mu$ L,10 $\times$ PCR 反应缓冲液 2  $\mu$ L;氯化镁 2  $\mu$ L;dNTP 1.5  $\mu$ L;每轮相应引物各 0.5  $\mu$ L,模板 1  $\mu$ L,阳性和阴性对照 10 ng~20 ng DNA;第一轮用 1 单位 *Taq* DNA 聚合酶,第二轮用 0.5 单位 *Taq* DNA 聚合酶;补水至 25  $\mu$ L。

#### 9.3.5 PCR 反应程序

第一轮 PCR 使用引物 F1/P1,96  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,56  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 5 min。

取第一轮 PCR 反应产物 1  $\mu$ L,用引物 F2/P2 进行 PCR 扩增,95  $^{\circ}$ C 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,56  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 5 min。

#### 9.3.6 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

取产物 5  $\mu$ L 与 1  $\mu$ L 6 $\times$ 加样缓冲液混合,加样于含 EB 的 1.5%琼脂糖凝胶中。在 1 $\times$ TAE 缓冲液中,3 V/cm~4 V/cm 电泳约 30 min,当溴酚蓝到达底部时停止电泳,用凝胶成像系统分析结果。阳性、阴性、空白对照和 DNA 标准分子质量对照品同样电泳。

#### 9.3.7 结果判定

阳性对照会出现 706 bp 和 375 bp 特异的 DNA 片段;阴性和空白对照均没有该核酸带。对照成立才能进行判定。

待测样品经 PCR 扩增后,在 706 bp 和 375 bp DNA 位置上有核酸带,判为阳性样品。套式 PCR 第一轮 706 bp 有带,第二轮在 375 bp 有带;经第一轮 PCR 反应无扩增的样品再进行第二轮反应。阳性样品 PCR 产物应通过核酸序列测定,并与标准参考序列比对,进行确诊。

无核酸带或带的大小不在 706 bp 和 375 bp DNA 位置上,判为阴性样品。

10 实时荧光 PCR

10.1 材料准备

- 10.1.1 荧光定量 PCR 仪。
- 10.1.2 高速冷冻离心机。
- 10.1.3 漩涡混匀器。
- 10.1.4 可调微量移液器(0.1  $\mu\text{L}$ ~2.5  $\mu\text{L}$ , 0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ )。

10.2 引物序列

引物序列见表 3。

表 3 引物序列

引物	核苷酸序列(5'~3')
Forward primer	CGGAAATTCCTTCCTTTA
Reverse primer	TCAGGGTTAATATCAATAATTC
Taqman probe	(FAM)AAGTCCTTGATTCAATTGCTGC(TAMRA)

10.3 操作步骤

10.3.1 样品

被检菌株、淋巴结、肺等组织样品及鼻拭子。

10.3.2 样品处理

参见 9.3.2。

10.3.3 对照设立

对照设立如下：

- a) 阳性对照用猪肺炎支原体标准菌株 DNA,或已知猪肺炎支原体阳性组织制备的 DNA 为模板；
- b) 阴性对照用胸膜肺炎放线杆菌菌株 DNA,或已知猪肺炎支原体阴性组织制备的 DNA 为模板；
- c) 空白对照等用等体积的水代替模板。

10.3.4 反应体系

10.3.4.1 荧光 PCR 反应体系配置(在体系配置区),按以下顺序依次加入: Premix Ex Taq (probe qPCR)(2X) 10  $\mu\text{L}$ , PCR Forward Primer 10  $\mu\text{mol/L}$  0.4  $\mu\text{L}$ , PCR Reverse Primer (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , 荧光探针溶液 0.8  $\mu\text{L}$ , ROX Reference Dye II (50X) 0.4  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 5.0  $\mu\text{L}$ , 补水至 20  $\mu\text{L}$ 。

注: 如果对多个样本( $n$ =拟进行的 PCR 管数,包括阴性、阳性对照)进行检测,建议根据样本数按每份加主反应液 19  $\mu\text{L}$  及 1  $\mu\text{L}$  的酶混液,配置  $n+1$  或  $n+2$  个反应体系,混合均匀后,然后分装到每个 0.2 mL 反应管。

10.3.4.2 上述分装好的 PCR 反应管中分别加入模板 DNA,先加入阴性对照(每管 5  $\mu\text{L}$ ),再分别加标本 RNA(每管 5  $\mu\text{L}$ ),最后加入阳性对照(每管 5  $\mu\text{L}$ )。

10.3.4.3 荧光 PCR 反应(在核酸扩增区):将加好样的 PCR 反应管分别转移到荧光定量 PCR 检测仪上进行扩增反应,程序设置为以 ABI 7500 Fast 型荧光定量 PCR 检测仪为例说明,将荧光信号设置为:Reporter Dye:FAM,Quencher Dye:NONE,Passive Reference:ROX。荧光 PCR 扩增程序的设置见表 4,反应总体积为 20  $\mu$ L。

表 4 扩增程序

步骤	反应温度	时间	是否采集荧光信号	循环数
变性	95 $^{\circ}$ C	3 min	否	1
扩增及荧光收集	95 $^{\circ}$ C	15 s		40
	60 $^{\circ}$ C	45 s	是	

### 10.3.5 结果判定

10.3.5.1 阴性对照 Ct 值应显示 0 或  $\geq 40$ ,阳性对照 Ct 值应  $\leq 36$  并有明显的扩增曲线,否则此次检测结果无效,需重做。

10.3.5.2 在阴性对照和阳性对照都成立的情况下:

检测样品 Ct 值  $\leq 36$ ,具有明显的扩增曲线,结果有效,可直接报告样品核酸阳性。

36 < 检测样品 Ct 值 < 40,需进行一次重复实验,若 Ct 值仍介于 36 和 40 之间,且曲线有明显的指数增长特性,同时阴性对照的 Ct 值为 0,可报告样品核酸阳性;否则,报告样品核酸阴性。

检测样品 Ct 值 > 40,无明显的扩增曲线,则报告样品核酸阴性。

### 10.3.6 结果描述

荧光 PCR 阳性结果表示样品核酸阳性;荧光 PCR 阴性结果表示样品核酸阴性。

## 11 综合判断

根据流行病学资料、临床症状、病理变化特征以及实验室检查结果的综合分析进行诊断;确诊则需要依靠抗体检查或病原分离。

## 12 防止污染

检验过程中应采取必要的防止交叉污染的措施,特别是 PCR 检测过程中应严格遵循 PCR 操作要求。



**附 录 A**  
(规范性附录)  
**培养基及试剂的配制**

**A.1 A26 肉汤****A.1.1 成分**

1%水解乳蛋白 Hank's 液	500 mL
牛心消化汤	250 mL
犏牛血清/健康马血清	200 mL
50%葡萄糖	20 mL
酵母浸出液	10 mL
青霉素	20 万 IU
1%醋酸铊	2.5 mL
1%酚红	2 mL
1%辅酶 I	10 mL

**A.1.2 制法**

以上各成分除青霉素外,其余各成分均应 105 kPa 高压灭菌 15 min 后冷冻或冷藏保存备用。使用时将以上各成分按比例混匀后,将 pH 调至 7.6。

牛心消化汤按 GB 4789.28 中 4.3 规定配制。

**A.2 固体培养基**

将 1%水解乳蛋白 Hank's 液与牛心消化汤按 A.1 中比例混合,将 pH 调至 7.6 后,加入 1%的琼脂,溶解后 105 kPa 高压灭菌 15 min,冷却至 56 ℃左右,加入 A.1.1 中的其他成分,倾注平皿。

**A.3 厌气肉肝汤****A.3.1 成分**

牛肉	1 份
牛(羊、猪)肝	1 份
蒸馏水	4 份
蛋白胨	1%
氯化钠	0.5%
葡萄糖	0.2%
小肝块	10%
石蜡	适量

**A.3.2 制法**

取除去脂肪及筋膜的牛肉,用绞肉机绞碎,与切成 100 g 左右的肝块各 1 份,加蒸馏水 4 份,充分搅



拌后,冷浸 20 h~24 h,煮沸 30 min~60 min,补足失去的水,用白棉布过滤,弃去肉渣,取出肝块。将滤液加入 1%蛋白胨和 0.5%氯化钠,加热融化,以 2 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液调整 pH 为 7.8~8.0,加热煮沸。以白棉布过滤煮沸后的液体,按量加入 0.2%葡萄糖,搅拌使其溶化。

将煮过的肝块洗净,切成小方块,用蒸馏水充分冲洗后,分装于试管中,其量约为预计分装肉汤量的 1/10。将滤液分装于含有肝块的试管中并加入适量石蜡,以 68.94 kPa 高压灭菌 30 min~40 min。经 37 °C 培养 24 h~48 h,应无菌生长。

#### A.4 Hank's 液的制备

##### A.4.1 甲液

###### A.4.1.1 甲液 I

氯化钠(NaCl)	160 g
氯化钾(KCl)	8 g
硫酸镁( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	2 g
氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	2 g
加蒸馏水至 800 mL。	

###### A.4.1.2 甲液 II

氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )	2.8 g
加蒸馏水至 100 mL。	

将上述两种溶液混合后,加蒸馏水至 1 000 mL,并加 2 mL 三氯甲烷作为防腐剂,保存于 4 °C 冰箱内。

##### A.4.2 乙液

磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	3.04 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.2 g
葡萄糖	20 g

将上述成分溶于 800 mL 蒸馏水中,再加入 100 mL 0.4%酚红液。加蒸馏水至 1 000 mL,并加 2 mL 三氯甲烷防腐,保存于 4 °C 冰箱中。

##### A.4.3 制法

按下述比例配制:

甲液	1 份
乙液	1 份
蒸馏水	18 份

105 kPa 灭菌 15 min 后,置 4 °C 冰箱内备用。使用时于 100 mL Hank's 液内加入 3.5%碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )液,将 pH 调至 7.2~7.6。

#### A.5 0.25%鸡红细胞液的制备

采集健康公鸡的抗凝血,2 000 g 离心 5 min,弃白细胞层及上清,沉淀加生理盐水混匀,2 000 g 离心 5 min,再弃白细胞层及上清,沉淀加生理盐水混匀,3 000 g 离心 8 min,弃白细胞层及上清,称重红细胞,加生理盐水配成 0.25%的鸡红细胞液。

附 录 B  
(规范性附录)  
ELISA 试剂的配制

**B.1 包被液(0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液, PBS)**

取 23.876 g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )溶解于少量的蒸馏水中,完全溶解后加蒸馏水定容至 1 000 mL,配制成 1/15 mol/L 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )。

取 9.074 g 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )溶解于少量的蒸馏水中,完全溶解后加蒸馏水定容至 1 000 mL,配制成 1/15 mol/L 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )。

取 8.5 g 氯化钠溶解于少量的蒸馏水中,完全溶解后加蒸馏水定容至 1 000 mL,配制成生理盐水。

取 1/15 mol/L 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )溶液 73 mL、1/15 mol/L 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )溶液 27 mL、生理盐水 566 mL 混匀后,用 1/15 mol/L 磷酸盐调 pH 至 7.2 即成包被液。

**B.2 稀释液**

每 100 mL 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 溶液中加入牛血清白蛋白(BSA)0.2 g~1 g,加 50  $\mu\text{L}$  吐温-20 (0.05% Tween-20),即成稀释液。

**B.3 洗液**

每 100 mL 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 溶液中加入 50  $\mu\text{L}$  吐温-20,即成洗液。

**B.4 酶底物溶液的配制**

取 21 g 柠檬酸加蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL,配制成 0.1 mol/L 柠檬酸。

取 71.6 g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )加蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL,配制成 0.2 mol/L 磷酸氢二钠。

取 0.1 mol/L 柠檬酸 24.3 mL、0.2 mol/L 磷酸氢二钠 25.7 mL,两溶液混合后加入 20 mg 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),充分溶解,临用前加 20  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,即成酶底物溶液。

**B.5 终止液(2% SDS 溶液)**

称取分析纯的十二烷基磺酸钠(SDS)3 g 加蒸馏水溶解并定容至 100 mL,混匀即成 2% SDS 溶液。

## 附 录 C

### (规范性附录)

### PCR 试剂的配制

#### C.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)的配制

##### C.1.1 酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )的配制:

磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 71.64 g

加蒸馏水定容至 1 000 mL。

##### C.1.2 0.2 mol/L 磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )的配制:

磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 31.21 g

加蒸馏水定容至 1 000 mL。

##### C.1.3 生理盐水的配制:

氯化钠( $\text{NaCl}$ )

8.5 g

加蒸馏水定容至 1 000 mL。

##### C.1.4 制法

0.2 mol/L 磷酸氢二钠 72 mL

0.2 mol/L 磷酸二氢钠 28 mL

生理盐水 1 900 mL

0.105 MPa 灭菌 15 min, 冷却后 4 °C 保存备用。

#### C.2 Tris-乙酸电泳缓冲液(50×TAE)的配制

三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱) 242 g

冰乙酸 57.1 mL

0.5 mol/L EDTA(pH 8.0) 100 mL

加蒸馏水定容至 1 000 mL, 混匀, 4 °C 保存备用。临用前作 50 倍稀释。

#### C.3 1×TAE 使用液的配制

50×TAE 20 mL

加蒸馏水定容至 1 000 mL, 混匀备用。

#### C.4 10 mg/L 溴化乙锭(EB)的配制

溴化乙锭(EB) 1 g

加蒸馏水定容至 100 mL, 磁力搅拌至完全溶解, 室温避光保存。

#### C.5 2%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖 2 g

加  $1\times$ TAE 定容至 100 mL, 完全融化后, 溶液冷却至  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 加 10 mg/L 溴化乙锭  $5\text{ }\mu\text{L}$  (终浓度  $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ), 轻轻混匀后, 倒板。

#### C.6 $6\times$ 加样缓冲液的配制

溴酚蓝	0.25 g
-----	--------

蔗糖	10 g
----	------

加蒸馏水定容至 100 mL,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### C.7 $10\times$ PCR 反应缓冲液 ( $10\times$ buffer)

Tris-HCl	100 mmol/L pH 9.0
----------	-------------------

氯化钾 (KCl)	100 mmol/L
-----------	------------

硫酸氨 ( $\text{NH}_4\cdot\text{SO}_4$ )	80 mmol/L
---------------------------------------	-----------

乙基苯基聚乙二醇 (NP40)	0.8%
-----------------	------