

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4235—2015

### 猪戊型肝炎检疫技术规范

Quarantine protocol for swine hepatitis E

2015-05-26 发布

2016-01-01 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。

本标准起草单位：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国北京出入境检验检疫局、上海市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：鱼海琼、张强、乔彩霞、罗长保、赵吟、蔡先全、刘佩红、周锦萍、李树清、吴晓薇。

## 猪戊型肝炎检疫技术规范

### 1 范围

本标准规定了猪戊型肝炎的临床诊断、酶联免疫吸附试验、实时荧光聚合酶链式反应检测技术。  
本标准适用于猪戊型肝炎的诊断和流行病学调查。

### 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/T 18088 出入境动物检疫采样

GB/T 19489 实验室 生物安全通用要求

### 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HEV:戊型肝炎病毒

BSA:牛血清白蛋白

HRP:辣根过氧化物酶

OD值:光密度值

ELISA:酶联免疫吸附试验

荧光 RT-PCR:实时荧光聚合酶链式反应

### 4 试剂

- 4.1 HEV 阳性对照血清。
- 4.2 HEV 阴性对照血清。
- 4.3 HEV 抗原。
- 4.4 牛血清白蛋白。
- 4.5 HRP 标记的兔抗猪 IgG。
- 4.6 0.01 mol/L PBS 缓冲液。
- 4.7 抗原稀释液(见附录 A)。
- 4.8 洗涤液(见附录 A)。
- 4.9 吐温-20。
- 4.10 封闭液(见附录 A)。
- 4.11 显色剂(见附录 A)。
- 4.12 终止液(见附录 A)。
- 4.13 TRIZOL。
- 4.14 三氯甲烷。

- 4.15 异丙醇: -20℃预冷。
- 4.16 0.1%DEPC水。
- 4.17 75%乙醇。
- 4.18 RNA酶抑制剂(40 U/ $\mu$ L)。
- 4.19 *Taq* DNA聚合酶(5 U/ $\mu$ L)及相应10 $\times$ 缓冲液。
- 4.20 M-MLV反转录酶(200 U/ $\mu$ L)及相应5 $\times$ 反转录反应缓冲液。
- 4.21 dNTP(2.5 mmol/L)。
- 4.22 MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)。

## 5 设备

- 5.1 二级生物安全柜。
- 5.2 高压灭菌锅。
- 5.3 微量移液器。
- 5.4 酶标仪。
- 5.5 洗板机。
- 5.6 高速冷冻离心机。
- 5.7 荧光PCR仪。

## 6 临床诊断

### 6.1 流行病学

戊型肝炎的流行病学特点与甲肝相似,参见B.1。

### 6.2 临床症状及病理变化

猪自身感染HEV临床症状并不明显,参见B.2。

### 6.3 初步诊断

根据临床症状、病理变化和流行病学可以作出初步判断,进一步诊断应采集样品进行实验室检测。该病原属人畜共患病原,涉及病原的检测应在二级生物安全实验室进行,样品保存和废弃物处理应按照GB/T 19489生物安全要求进行。

## 7 实验室检测

### 7.1 酶联免疫吸附试验(间接ELISA)

#### 7.1.1 原理

96孔微量板的奇数列包被有戊型肝炎病毒衣壳蛋白重组抗原,偶数列则未包被。检测样品和对照样品加入到反应孔内,每个样至少加平行的两孔(一个奇数孔和一个偶数孔)。如果血清中存在特异性抗体,会形成抗原-抗体复合物。洗板后,加入HRP标记的酶结合物,该酶标结合物与HEV抗原抗体复合物结合,形成抗原-抗体-酶复合物。洗去过剩的酶结合物,加入底物液,样品中特异性抗体的数量就会在奇数、偶数孔间出现颜色差异:如果存在抗体,加入终止液后蓝色液体会变成黄色;如果没有抗体,则无色。



7.1.2 样品采集制备

按照 GB/T 18088, 无菌操作采集动物血, 每头不少于 5 mL, 自然凝固后无菌分离血清, 分装, 加盖密封后冷藏保存。样品 1 周内检测可存放于 2℃~8℃, 超过 1 周应置于 -20℃。

7.1.3 操作步骤

- 7.1.3.1 使用前将所有试剂平衡至室温(21±5)℃, 将反应板/条做好标记, 阴性对照孔 A1、A2、B1、B2, 阳性对照孔 C1、C2、D1、D2。
- 7.1.3.2 用多通道移液器加 190 μL 样品稀释液至所有样品孔。
- 7.1.3.3 加 10 μL 阴性对照至 A1、A2、B1、B2 孔; 加 10 μL 阳性对照至 C1、C2、D1、D2 孔; 加 10 μL 待检血清到其他剩余的孔, 各加两孔, 微量振荡器混匀。
- 7.1.3.4 密封微量反应板, 室温(21±5)℃反应(45±4) min。
- 7.1.3.5 用 300 μL/孔洗液洗板 3 次, 最后一次拍干以去除残留洗液。
- 7.1.3.6 将酶标结合物用酶稀释液 10 倍稀释后, 加 100 μL 至所有样品孔, 微量振荡器混匀。
- 7.1.3.7 密封微量反应板, 室温(21±5)℃反应(30±3) min。
- 7.1.3.8 同上洗板。
- 7.1.3.9 加 100 μL 底物液至所有样品孔。
- 7.1.3.10 密封微量反应板, 室温(21±5)℃避光反应(15±2) min 至颜色变化。
- 7.1.3.11 加 100 μL 终止液至所有孔终止反应, 终止液添加顺序与底物溶液添加顺序相同。
- 7.1.3.12 振荡混匀, 用酶标仪在 450 nm 条件下读取 OD 值, 15 min 内完成结果读取。

7.1.4 结果分析

7.1.4.1 数据计算

依据式(1)分别计算每一份样品的净 OD 值:  
$$\text{净 OD 值} = \text{OD 值}_{\text{奇数孔}} - \text{OD 值}_{\text{偶数孔}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:  
净 OD 值 ——被检样品的真实光密度值。  
OD 值<sub>奇数孔</sub> ——奇数列微孔的光密度值。  
OD 值<sub>偶数孔</sub> ——偶数列微孔的光密度值。

7.1.4.2 有效性判断

- 当下列条件成立时, 本试验有效:
- a) 阳性对照平均净 OD 值应大于 0.350。
  - b) 阳性对照平均净 OD 值与阴性对照平均净 OD 值比值应大于 3。

7.1.4.3 结果判定

根据式(2)计算每一份样品的 S/P 值:  
$$S/P = \text{净 OD}_{\text{sample}} / \text{净 OD}_{\text{PC}} \dots\dots\dots (2)$$

式中:  
S/P ——被检样品与阳性对照真实光密度值的比值。  
净 OD<sub>sample</sub> ——被检样品微孔真实的光密度值。  
净 OD<sub>PC</sub> ——阳性对照微孔真实的光密度值。

SN/T 4235—2015

判定如下：

- a) 当 S/P 小于或等于 0.6 时判为阴性；
- b) 当 S/P 大于或等于 0.7 时判为阳性；
- c) 当 S/P 小于 0.7 且大于 0.6 时判为可疑。

7.2 酶联免疫吸附试验(双抗原夹心 ELISA)

7.2.1 原理

以 HEV 的 ORF2 和 ORF3 融合抗原包被微孔反应板,加入待检样品,再加入 HRP 标记的 HEV 保守抗原片段。如果样品中含有 HEV 抗体,则能与包被在反应板上的融合抗原和酶标 HEV 保守抗原片段结合,形成“抗原-抗体-抗原-HRP 复合物”,加入底物产生显色反应,反之则无显色反应。

7.2.2 样品采集制备

同 7.1.2。

7.2.3 包被反应板的制备

7.2.3.1 用抗原稀释液(见 A.1)稀释 HEV ORF2 和 ORF3 融合抗原至工作浓度 1.0 μg/mL,取 96 孔微量反应板,每孔加入 100 μL,封板,2℃~8℃过夜。使用前弃去板中包被液,加洗涤液(见 A.2)洗板 3 次,每次 1 min,拍干。

7.2.3.2 每孔加入封闭液 150 μL,封板后 37℃温育 60 min。

7.2.3.3 将反应板中封闭液(见 A.3)吸干,用铝箔纸密封,2℃~8℃保存备用。

7.2.4 正式试验

7.2.4.1 每孔加入 50 μL 待检血清;设阴、阳性对照各 2 孔,每孔加入对照血清各 50 μL。

7.2.4.2 每孔加入 HRP 标记的兔抗猪 IgG 50 μL,振荡混匀,封板,置 37℃温育 60 min。

7.2.4.3 弃去孔内液体,用洗涤液注满各孔,甩干,重复 5 次后拍干。

7.2.4.4 每孔加显色剂(见 A.4)100 μL,振荡混匀,封板,置 37℃温育 15 min。

7.2.4.5 每孔加终止液(见 A.5)50 μL,混匀。

7.2.4.6 取波长 450 nm(使用双波长酶标仪时,参考波长 630 nm),读取各孔 OD 值。

7.2.5 结果判定

7.2.5.1 有效性判断

阳性对照 OD 值大于等于 0.8,阴性对照 OD 值小于等于 0.15 时,检测有效。

7.2.5.2 判定标准

根据式(3)计算临界值：

临界值 = 0.25 + 阴性对照平均 OD 值 ..... ( 3 )

式中：

临界值 —— 阴、阳性结果判定的界点数值。

阴性对照平均 OD 值 —— 阴性对照微孔光密度值的平均值。

判定标准如下：

- a) 待检样品 OD 值大于等于临界值,则判为阳性。
- b) 待检样品 OD 值小于临界值,则判为阴性。

### 7.3 荧光 RT-PCR 检测方法

#### 7.3.1 原理

采用 *Taq*Man 方法,针对 HEV 四个主要基因型毒株均高度保守的 ORF2 区域,设计合成一对引物和一条特异性的荧光素双标记探针。探针 5'端标记 FAM 荧光素为报告荧光基团(用 R 表示),3'端标记 TAMRA 荧光素为淬灭荧光基团(用 Q 表示),它在近距离内能吸收 5'端荧光基团发出的荧光信号。PCR 反应进入退火阶段时,引物和探针同时与目的基因片段结合,此时探针上 R 基团发出的荧光信号被 Q 基团所吸收,仪器检测不到荧光信号;而反应进行到延伸阶段时,*Taq* 酶的 5'→3'外切核酸酶功能将探针降解,探针上的 R 基团游离出来,所发出的荧光不再为 Q 基团所吸收而被检测仪所接收。随着 PCR 反应的循环进行,PCR 产物与荧光信号的增长呈现对应关系。

#### 7.3.2 引物和探针

引物和探针针对戊型肝炎病毒 ORF2 编码区高度保守序列设计,可由生物公司合成,纯度为 HPLC 级,用 DEPC 溶解至 10  $\mu$ mol/L 后,保存于 -20  $^{\circ}$ C 备用。引物、探针的名称、序列及位置参见表 C.1。

#### 7.3.3 质控物质

##### 7.3.3.1 阳性对照

克隆 HEV ORF2 基因片段,经体外转录后制备 cRNA 溶液,用做阳性对照;或 HEV 阳性猪肝脏,经研磨匀浆后,1 000 r/min 离心 5 min,上清经 1%福尔马林 37  $^{\circ}$ C 24 h 灭活后,用做阳性对照。

##### 7.3.3.2 阴性对照

HEV 阴性猪肝脏,经匀浆后,1 000 r/min 离心 5 min,取上清用做阴性对照。

##### 7.3.3.3 空白对照

DEPC 水溶液(见 C.2)。

#### 7.3.4 样品的采集制备

##### 7.3.4.1 猪肝样品

用无菌剪刀和镊子剪取待检样品 1.0 g 于研钵中充分研磨,再加 5.0 mL PBS 混匀,然后将组织悬液转入无菌离心管中,编号备用。

##### 7.3.4.2 猪胆汁

用无菌注射器直接吸取 500  $\mu$ L 至无菌离心管中,编号备用。

##### 7.3.4.3 猪粪便

取 0.1 g 固体粪便标本或 0.1 mL 液体粪便标本至 1.5 mL 无菌离心管中,再加入 1 mL PBS,置于漩涡振荡器混匀,编号备用。

##### 7.3.4.4 血清

用无菌注射器直接吸取 500  $\mu$ L 至无菌离心管中,编号备用。



## SN/T 4235—2015

## 7.3.4.5 存放与运送

采集或处理的样品在 2℃~8℃ 条件下保存不超过 24 h;若需长期保存,应放置-70℃ 冰箱,但应避免反复冻融(最多冻融 3 次)。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。

## 7.3.5 样品核酸的提取

7.3.5.1 取  $n$  个 1.5 mL 灭菌离心管,其中  $n$  为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和,对每个管进行编号标记。

7.3.5.2 每管加入 600  $\mu$ L 裂解液,然后分别加入待测样品、阴性对照和阳性对照各 200  $\mu$ L,一份样品换用一个吸头;再加入 200  $\mu$ L 三氯甲烷,混匀器上振荡混匀 5 s。于 4℃ 条件下,12 000 r/min 离心 15 min。

7.3.5.3 取与 7.3.5.1 中相同数量的 1.5 mL 灭菌离心管,加入 500  $\mu$ L 异丙醇(-20℃ 预冷),对每个管进行编号。吸取 7.3.5.2 离心后各管中的上清液转移至相应的管中,上清液至少吸取 500  $\mu$ L,注意不要吸出中间层,颠倒混匀。

7.3.5.4 于 4℃ 条件下,12 000 r/min 离心 15 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置)。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。加入 600  $\mu$ L 75%乙醇,颠倒洗涤。

7.3.5.5 于 4℃ 条件下,12 000 r/min 离心 10 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置)。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。

7.3.5.6 4 000 r/min 离心 10 s,将管壁上的残余液体甩到管底部,用微量加样器尽量将其吸干,一份样品换用一个吸头,吸头不要碰到有沉淀一面,室温干燥 3 min。不宜过于干燥,以免 RNA 不溶。

7.3.5.7 加入 11  $\mu$ L DEPC 水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,2 000 r/min 离心 5 s,冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增或放置于-70℃ 冰箱,将核酸转移至反应混合物配制区。

## 7.3.6 扩增试剂准备与配制

本步骤在反应混合物配制区进行。

每个测试反应体系需使用 15  $\mu$ L 荧光 RT-PCR 反应液,反应液配方见表 C.2。根据 7.3.5.1 中所设定的  $n$  值,计算各试剂的使用量,加入适当体积试管中,充分混合均匀后,向每个 PCR 管中各分装 15  $\mu$ L,转移至样品处理区。

## 7.3.7 加样

在样品处理区进行。在 7.3.6 的 PCR 管中分别加入制备好的 RNA 溶液 10  $\mu$ L,使总体积达 25  $\mu$ L。

盖紧管盖后,500 r/min 离心 30 s。

## 7.3.8 荧光 RT-PCR 反应

在检测区进行。将 7.3.7 中加样后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内,记录样品摆放顺序,选定 FAM 检测通道读取检测结果,选择 TAMRA 作为淬灭基团。设置如下反应参数:

- 第一阶段,反转录 42℃/30 min;
- 第二阶段,预变性 92℃/3 min;
- 第三阶段,92℃/10 s,45℃/30 s,72℃/1 min,5 个循环;
- 第四阶段,92℃/10 s,60℃/30 s,40 个循环,荧光收集设置在第四阶段每次循环的退火延伸

时进行。

### 7.3.9 结果判定

#### 7.3.9.1 结果分析条件设定

阈值设定原则:根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点,且相交于阳性对照扩增曲线的指数增长期为准。

#### 7.3.9.2 质控标准

阴性对照无 Ct 值并且无特定扩增曲线。阳性对照的 Ct 值应 $\leq 30$ ,并出现特定的扩增曲线。如阴性对照和阳性对照不满足以上条件,此次实验视为无效。

#### 7.3.9.3 结果描述及判定

结果描述及判定如下:

- a) 阴性:无 Ct 值并且无扩增曲线,表明样品中无戊型肝炎病毒。
- b) 阳性:Ct 值 $\leq 30$ ,且出现特定的扩增曲线,表示样品中存在戊型肝炎病毒。

### 7.4 综合判定

依据 7.1 或者 7.2 方法检测获得阳性结果的即可判定为猪戊型肝炎血清抗体阳性;依据 7.3 方法检测获得阳性结果的可判定为猪戊型肝炎抗原阳性。



附 录 A  
(规范性附录)  
ELISA 试验试剂的配制

A.1 抗原稀释液(0.05 mol/L PBS,pH 9.6)

碳酸氢钠 2.93 g,碳酸钠 1.59 g,双蒸水加至 1 000 mL,2℃~8℃保存备用,1周内用完。

A.2 洗涤液(0.01 mol/L PBS-0.05%吐温-20,pH 7.4)

磷酸二氢钾 0.20 g,磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )2.90 g,氯化钠 8.00 g,氯化钾 0.20 g,吐温-20 0.50 mL,双蒸水加至 1 000 mL,现用现配。

A.3 封闭液

A.3.1 磷酸盐缓冲液(PBS 0.01 mol/L,pH 7.2)

磷酸二氢钾 0.20 g,碳酸氢钠 1.15 g,氯化钠 8.00 g,氯化钾 0.20 g,双蒸水加至 1 000 mL,121℃±2℃,15 min 高压灭菌冷却后,无菌条件下加入青霉素、链霉素各 10 000 IU/mL,2℃~8℃保存。

A.3.2 封闭液工作液

向 PBS(0.01 mol/L,pH 7.2)溶液中加入 1%牛血清白蛋白,混匀。

A.4 显色剂

显色剂 A:0.4 g/L 的四甲基联苯胺。显色剂 B:3%过氧化氢,在使用前将显色剂 A 和显色剂 B 进行等体积混合,现配现用。

A.5 终止液

12.5 mL 98%浓硫酸缓慢加入 87.5 mL 双蒸水中。

## 附录 B

### (资料性附录)

### 临床诊断

#### B.1 流行病学

猪戊型肝炎(Hepatitis E, HE)是由戊型肝炎病毒(Hepatitis E Virus, HEV)引起的一种人和多种动物的人兽共患病,戊型肝炎的流行病学特点与甲肝相似,但其传染性较甲肝低。主要为粪-口途径传播。分流行性与散发性两种,但以流行性为主,流行性多由水源被污染所致,散发病例多由不洁食物或饮品所引起。潜伏期末期和急性期粪便排出的病毒量最高,传染性最强。猪戊肝病毒主要感染 2~6 月龄猪。戊肝流行有明显的季节性,多发生在秋冬季节、雨季或洪水之后,但是散发性病例没有明显季节性,流行持续时间长短不一。

猪戊型肝炎病毒可以在动物宿主中广泛分布和流行,目前已从猪、牛以及狗等动物体内检测到了抗体,在有些地区动物中抗体阳性率非常高,猪是戊肝病毒的主要传染源。到目前为止,HEV 只有一个血清型。

#### B.2 病理变化及临床诊断

戊型肝炎病理变化似甲型肝炎,有肝细胞气球样变,点状或灶性坏死及汇管区炎性细胞浸润,主要为淋巴细胞和单核巨噬细胞,有明显胆汁淤积。通过电镜观察,表明本病肝细胞损害可能与细胞介导的免疫反应有关。猪自身感染 HEV 临床症状并不明显,要判断猪是否感染 HEV 主要通过实验手段来检验。

**附 录 C**  
(规范性附录)  
**荧光 RT-PCR 试验**

C.1 引物、探针的名称、序列及基因组位置见表 C.1。

**表 C.1 引物、探针名称、序列及位置**

引物、探针名称	序列	位置
上游引物	acHctRttta aYcttgetga Yac	Nt.6260-6279
下游引物	ccttRtcctgetgagcRttctc	Nt.6444-6463
探针	5'(FAM)-ccgacagaattgatttcgtcggc-(TAMRA)3'	Nt.6296-6316

H: A or C or T, Y: C or T, R: A or G.

C.2 0.1% DEPC 水

去离子水中加入终浓度为 0.1 % 的 DEPC, 37 °C 搅拌处理 12 h, 121 °C 高压蒸汽灭菌 30 min, 冷却后密闭冷藏备用。

C.3 戊型肝炎病毒荧光 RT-PCR 反应液配方见表 C.2。

**表 C.2 配方**

荧光 RT-PCR 反应液组分	体积(μL)/反应
5×RT-PCR 缓冲液(Mg <sup>2+</sup> 浓度 15 mmol/L)	5
dNTP(2.5 mmol/L)	2
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	0.5
上游引物(10 μmol/L)	0.5
下游引物(10 μmol/L)	0.5
探针(10 μmol/L)	0.25
M-MLV 反转录酶(200 U/μL)	0.5
RNA 酶抑制剂(40 U/μL)	0.25
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.25
DEPC 水	5.25
总体积	15