



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3972—2014

## 猪流感病毒病检疫技术规范

Quarantine protocol for swine influenza disease

2014-07-14 发布

2015-03-01 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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、广东省农业科学院动物卫生研究所。

本标准主要起草人：卢体康、孙洁、张彩虹、秦智锋、曾少灵、林庆燕、宋长绪、刘建利、陈茹、陈书琨、陶虹、唐金明、陈兵、胡运发。



# 猪流感病毒病检疫技术规范

## 1 范围

本标准规定了猪流感的临床诊断、病原学和血清学检疫技术要求。

本标准适用于对进出境猪流感的诊断、检疫和监测。

## 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

pH<sub>1</sub>N<sub>1</sub>(2009):甲型 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>(2009)流感病毒

SI:猪流感

SIV:猪流感病毒

## 4 概述

猪流感病毒一年四季均可在猪群中流行,不同品种、年龄的猪均可感染。病猪是重要传染源,康复猪可能成为长期的带毒和排毒者。本病的主要传播途径包括直接接触传播和空气传播。病猪突然发烧,体温在 40.5℃~41.5℃之间,有时达 42℃。病理变化主要发生在呼吸器官,鼻、喉、气管及大支气管黏膜充血、肿胀并覆有黏稠的液体,小支气管和细支气管充填渗出物,胸腔蓄积多量混有纤维素的浆液,纵膈淋巴结和支气管淋巴结肿大,肺脏的病变多发生在尖叫、心叶、中间叶及隔叶的背部和基底部,呈紫红色,坚实,塌陷,而周围的肺组织则呈苍白色气肿状态,界限分明,肺的间质增宽,并出现炎症变化,心包腔蓄积混有纤维素状的液体,胃肠黏膜呈现卡他性炎;脾脏微肿。

## 5 病原学检测

### 5.1 病毒分离与鉴定

#### 5.1.1 材料

##### 5.1.1.1 器材与设备

棉拭子、剪刀、镊子、注射器、离心管、高速台式冷冻离心机、漩涡振荡器、研钵、匀浆器、微量可调移液器、冰箱、生物安全柜、照蛋器、打孔器、酒精灯、1.0 mL 一次性灭菌注射器、孵蛋器、细胞培养瓶、吸管、洗耳球或电动助吸器、二氧化碳培养箱、倒置显微镜。



### 5.1.1.2 试剂

符合 GB/T 6682 所规定的一级水,胎牛血清,9~11 日龄 SPF 鸡胚,犬肾传代细胞,石蜡、5%碘酊、75%酒精,青霉素、链霉素、双抗贮存液、pH 7.2,0.01 mol/L PBS、细胞生长液、细胞维持液、细胞消化液等溶液(配制方法见 A.1)。

### 5.1.2 样品的采集与处理

#### 5.1.2.1 一般要求

样品的采集、保存及运输应符合 GB/T 18088 的相关要求。

#### 5.1.2.2 鼻腔拭子

将灭菌的棉拭子插入猪鼻腔,轻轻擦拭 3~5 次并慢慢旋转,然后取出拭子并放入盛有 2 mL 灭菌的 0.01 mol/L pH 7.2 PBS(含青霉素 10 000 IU/mL,链霉素 10 000  $\mu$ g/mL)管内,加盖、编号。

#### 5.1.2.3 肺脏组织

采集新鲜的可疑病变肺脏组织约 3.0 g~4.0 g,放置于无菌平皿中,编号。

#### 5.1.2.4 血清或血浆

用无菌注射器直接吸取至无菌 1.5 mL 离心管中,编号。

#### 5.1.2.5 样品的保存和运输

待检样品在 2℃~8℃ 保存不应超过 24 h; -20℃ 保存不超过 3 个月; -80℃ 以下可长期保存。样品应置于低温、密封的容器内运输。

#### 5.1.2.6 样品制备

鼻腔拭子样品于旋涡振荡器上振荡混匀约 5 s 后,于离心机中瞬时离心待用。血清或血浆样品于台式冷冻离心机上 3 000 r/min 冷冻离心 5 min 后取上清待用。组织样品,用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 2.0 g 于研钵中充分研磨,再加 10 mL PBS(含青霉素 10 000 IU/mL,链霉素 10 000  $\mu$ g/mL)混匀,或置于组织匀浆器中,加入 10 mL PBS(含青霉素 10 000 IU/mL,链霉素 10 000  $\mu$ g/mL)匀浆,然后将组织悬液转入无菌 1.5 mL 离心管中 3 000 r/min 4℃ 离心 15 min,取上清液转入另一无菌 1.5 mL 离心管中,编号备用。

### 5.1.3 病毒分离

#### 5.1.3.1 鸡胚分离病毒

5.1.3.1.1 将 9~11 日龄 SPF 鸡胚用照蛋器照视检查,在气室边缘上 2 mm~8 mm 处避开血管作一标记。

5.1.3.1.2 将鸡胚竖放在蛋座上,钝端向上。用 5%碘酊消毒蛋壳气室后,用 75%的酒精脱碘消毒,用无菌处理的打孔器在标记处钻一小孔(勿损伤壳膜)。

5.1.3.1.3 用 1.0 mL 注射器吸取 0.2 mL 处理好的样品,针头刺入孔内,经绒毛尿囊膜注入尿囊腔,如图 1 所示,每个样品接种 5 个鸡胚。

5.1.3.1.4 接种后,加热熔化石蜡封孔,于 35℃~37℃ 孵化箱内孵育 96 h,24 h 后开始观察鸡胚死亡情况,以后每间隔 8 h 观察一次,记录鸡胚死亡情况。



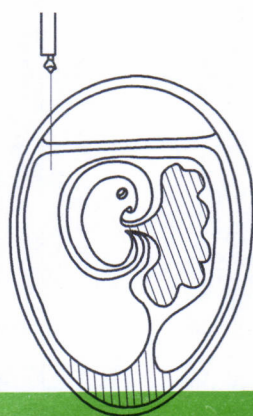


图 1 鸡胚接种示意图

5.1.3.1.5 对于 24 h 以后的死胚以及 96 h 仍存活的鸡胚,于 4 ℃ 冷却 4 h~12 h 后,无菌收取尿囊液。将尿囊液于 4 ℃ 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液转入另一无菌 1.5 mL 离心管中,编号备用。

#### 5.1.3.2 细胞分离病毒

在生物安全柜中操作,按常规方法培养细胞单层,待长至 60%~80% 左右,吸取培养液,用细胞培养液(不含胎牛血清,含有 TPCK 处理的 0.025% 的胰酶的 DMEM 培养基)洗三次,加入适量的处理样品,置于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1 h~2 h,期间每隔 30 min 轻轻摇动一次。感作完毕,弃去感作物,用含有胰酶的培养液洗三次,加入适量的细胞维持液,37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养 5 d~7 d,期间观察细胞病变(CPE)的形成情况。如出现 CPE(特征病变为:细胞肿胀圆化,细胞间隙增大,细胞核固缩或破裂,严重时细胞部分或全部脱落),收集细胞培养上清液。

#### 5.1.3.3 结果判定

收获鸡胚液或细胞培养上清液,测定其血凝活性(具体操作见 5.2)。若 HA 反应阳性说明可能有正黏病毒科的病毒,应采用 HA-HI 试验进行血凝素亚型的鉴定;若无血凝活性或血凝效价很低,应盲传 3~5 代,若仍阴性,则认为病毒分离阴性。

### 5.2 HA 试验

#### 5.2.1 材料

##### 5.2.1.1 试剂与溶液

pH 7.2, 0.01 mol/L PBS(配制方法见 A.1),阿氏(Alsevers)液、鸡红细胞悬液(配制方法见 A.2),标准猪流感病毒血凝素分型抗原,分型标准阳性血清和标准阴性血清。

##### 5.2.1.2 器材

96 孔 V 型微量反应板、振荡器、25 μL 微量加样器。

#### 5.2.2 操作方法

5.2.2.1 在微量反应板的 1~12 孔每孔均加入 25 μL PBS。

5.2.2.2 吸取 25 μL 待检液体样品加入第 1 孔,混匀。

5.2.2.3 每个微量反应板的最后一排设置为空白对照,最后一排第 1 孔加入 25 μL PBS 作为空白对照。

5.2.2.4 从第 1 孔吸取 25 μL 液体加入第 2 孔,混匀后吸取 25 μL 液体加入第 3 孔,如此对倍稀释至第 11 孔,吸弃 25 μL。



## SN/T 3972—2014

5.2.2.5 每孔再加入 25  $\mu\text{L}$  PBS。

5.2.2.6 每孔加入 25  $\mu\text{L}$  1% 鸡红细胞悬液(加之前,红细胞悬液要充分摇匀)。

5.2.2.7 轻轻振荡混匀,在 20  $^{\circ}\text{C}$  ~ 25  $^{\circ}\text{C}$  静置 40 min 后于 45 $^{\circ}$  倾斜板上观察结果(也可于 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 60 min 后观察结果)。

### 5.2.3 结果判定

将板放置于 45 $^{\circ}$  斜板上,于 1 min 内观察板内所有孔底低红细胞有无呈泪珠状流淌。当最后一排空白对照孔的红细胞全部应呈现明显的纽扣状沉淀于孔底时,表明试验结果成立。完全血凝(不出现任何流淌)的最高稀释倍数代表 1 个血凝单位(HAU)。若待检液体样品具有血凝性,说明待检液体样品中可能含有 SIV。

## 5.3 HI 试验

5.3.1 按照 5.2 所述的操作方法对具有血凝性的病毒进行 HA 检测。

5.3.2 根据 HA 试验结果配制 4HAU 的病毒抗原,以完全血凝的病毒最高稀释倍数作为终点,终点稀释倍数除以 4 即为 4HAU 抗原的稀释倍数。为了更精确确定所配制的抗原是否为 4HAU,可采用回测的方法确定。

5.3.3 在微量反应板的 1~11 孔加入 25  $\mu\text{L}$  PBS,第 12 孔加入 50  $\mu\text{L}$  PBS。

5.3.4 在每一批检测中,在一个微量反应板中设置阴性对照和空白对照。阴性对照即在第 1 孔中加入 25  $\mu\text{L}$  标准阴性血清,空白对照即在第 1 孔中加入 25  $\mu\text{L}$  PBS。

5.3.5 吸取 25  $\mu\text{L}$  各个亚型的标准阳性血清依次加入第 1 列的第 1 孔内,充分混匀后吸取 25  $\mu\text{L}$  于第 2 孔内,如此对倍稀释至第 10 孔,吸弃 25  $\mu\text{L}$ 。

5.3.6 于 1~11 孔加入 25  $\mu\text{L}$  含 4 HAU 的待检抗原,在 20  $^{\circ}\text{C}$  ~ 25  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min(也可于 4 $^{\circ}\text{C}$  静置 60 min)。

5.3.7 每孔加入 25  $\mu\text{L}$  1% 鸡红细胞悬液(加之前,红细胞悬液要充分摇匀)。轻轻振荡混匀,在 20  $^{\circ}\text{C}$  ~ 25  $^{\circ}\text{C}$  静置 40 min 后于 45 $^{\circ}$  倾斜板上观察结果(也可于 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 60 min 后观察结果)。

5.3.8 结果判定:以完全抑制(出现完整的倒“ $\perp$ ”形)4 个 HAU 抗原的血清最高稀释倍数作为 HI 滴度。只有空白对照出现凝集、阴性对照孔血清滴度不大于 1/4(或表示为  $2^2$ ),阳性对照孔血清误差不超过 1 个滴度,试验结果才有效。HI 价小于或等于 1/8(或表示为  $2^3$ ),判定 HI 试验阴性,说明分离的病毒与抗血清的亚型不一致;HI 价等于 1/16(或表示为  $2^4$ )为可疑,需重复试验;HI 价大于或等于 1/32(或表示为  $2^5$ )为阳性,说明分离的病毒与抗血清的亚型一致。

## 5.4 NI 试验(全量法以 N1 和 N2 分型血清为例)

5.4.1 将 N1、N2 标准阳性血清和阴性血清分别按原液、10 倍、100 倍稀释,并分别加入标记好的相应试管中。

5.4.2 将已经确定 HA 亚型的待检测样本稀释至 HA 价位 16 HAU,每管均加入 0.05 mL,混匀,拧上盖后 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h。

5.4.3 每管加入胎球蛋白溶液(50 mg/mL)0.1 mL 混匀,拧上盖后 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 16 h~18 h。

5.4.4 室温冷却后,每管加入 0.1 mL 过碘酸盐混匀,室温静置 20 min。

5.4.5 每管加入 1 mL 砷制剂,振荡至棕色消失,乳白色出现。

5.4.6 每管加入 2.5 mL 硫代巴比妥酸试剂,将试管置煮沸的水浴中 15 min,不出现粉红色的为神经氨酸酶抑制阳性,即待检病毒的神经氨酸酶亚型与加入管中的标准神经氨酸酶分型血清亚型一致。



## 5.5 猪流感病毒 AGID 试验

### 5.5.1 器材

研磨器、台式离心机、打孔器、6~9 号针头、平皿、微量加样器、酒精灯等。

### 5.5.2 试剂

琼脂板(制备方法见 A.2)。标准抗原,标准阳性血清和标准阴性血清。

### 5.5.3 操作方法

#### 5.5.3.1 抗原制备

从具有血凝性的鸡胚中取出绒毛尿囊膜,用 pH 7.2, 0.01 mol/L PBS 冲洗后,用研磨器磨碎后连续冻融 3~4 次,1 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,按终浓度 0.1% 的量加入甲醛溶液。置 37 °C 灭活 36 h 后,用禽流感标准阳性血清进行型特异性鉴定。

#### 5.5.3.2 打孔

在制备的琼脂板上,按图 2、图 3 打孔,孔径约 5 mm,孔距 2 mm~5 mm。将孔中的琼脂用针头轻轻挑出或吸出,勿伤边缘,以免渗漏。

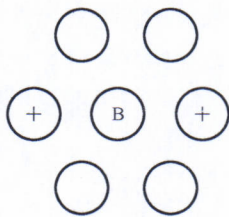


图 2 样品少时使用

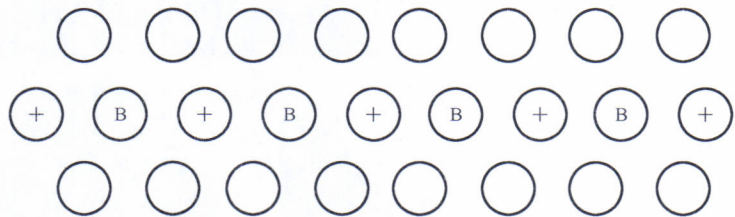


图 3 样品多时使用

#### 5.5.3.3 封底

用酒精灯轻烤平皿或玻璃板底部,封闭孔的底部,以防侧漏。

#### 5.5.3.4 加样

用微量移液器吸取标准阳性血清加到中间 B 孔,标准抗原滴入⊕孔中,按照 5.5.3.1 制备好的抗原悬液加入其他外周孔,每孔均以加满不溢为度。每加一个样品换一个吸头。

#### 5.5.3.5 作用

加样完毕后,静置 5 min~10 min,然后将平皿水平倒置或玻璃板水平正置放入湿盒内,于 37 °C 温箱中作用,分别于作用 24 h、48 h 及 72 h 后观察并记录结果。

#### 5.5.3.6 结果判定

5.5.3.6.1 在暗背景下,将琼脂板置日光灯或侧强光下观察,若标准抗原悬液孔与中心标准阳性血清孔之间出现一条清晰致密的白色沉淀线,则试验成立,否则视为无效,需重做。

5.5.3.6.2 若被检抗原悬液与中心标准阳性血清孔之间出现沉淀线,并与标准抗原悬液的沉淀线末端相吻合,即可判定被检抗原悬液为阳性。



SN/T 3972—2014

5.5.3.6.3 若被检抗原悬液与中心标准阳性血清孔之间不出现沉淀线,但标准抗原悬液的沉淀线一端弯向抗原悬液孔,则被检抗原悬液判为弱阳性(凡弱阳性者应重复试验,仍为弱阳性者,判为阳性)。

5.5.3.6.4 若被检抗原悬液与中心标准阳性血清孔之间不出现沉淀线且标准抗原悬液沉淀线直向被检抗原悬液孔或向其外侧偏弯者,则被检抗原悬液判为阴性。

5.5.3.6.5 若被检抗原悬液与中心标准阳性血清之间的沉淀线与标准抗原悬液和中心标准阳性血清孔之间的沉淀线交叉直伸,则判为非特异性反应,应重复该试验。若仍出现非特异性反应则判为阴性。

## 5.6 荧光抗体检测

### 5.6.1 材料

#### 5.6.1.1 设备

二氧化碳培养箱、恒温恒湿培养箱、荧光显微镜、冰箱。

#### 5.6.1.2 试剂与溶液

SIV 标准检测抗原,异硫氰酸荧光素标记的猪流感抗体,蒸馏水;用 HCl 或 NaOH 调蒸馏水的 pH 值至 7.4。pH 7.2, 0.01 mol/L PBS(配制方法见 A.1),丙酮(使用前置-20℃冰箱预冷)。

### 5.6.2 操作方法

#### 5.6.2.1 组织标本制作

取新鲜的可疑病变肺脏组织,剪开后用滤纸将切面液体吸干,用镊子取洁净盖玻片通过酒精灯火焰后,轻压组织切面,使玻片附着上 1~2 层组织细胞,室温晾干或吹干。同时设感染猪样品的阳性对照和健康猪样品的阴性对照。

#### 5.6.2.2 细胞标本制作

取无菌 96 孔平底细胞培养板,每孔加 100  $\mu$ L MDC K 细胞悬液,置 37℃、5% 的二氧化碳培养箱中培养 24 h~48 h,于倒置显微镜下观察,形成单层细胞后,移弃细胞培养液。取待检样品上清液接种单层细胞,50  $\mu$ L/孔,每个样品接种 2 孔,置 37℃、5% 的二氧化碳培养箱中孵育 30 min,移弃组织上清液,按每孔 200  $\mu$ L 加新鲜细胞维持液,置 37℃、5% 的二氧化碳培养箱中培养 24 h~48 h。当 10%~25% 的细胞出现感染后,弃去培养板中的细胞维持液,每孔加入 0.1 mL 的 PBS 洗一次。同时设接种病毒孔阳性对照和正常细胞阴性对照。

#### 5.6.2.3 固定

待上述标本在室温下自然风干后,用 0.1 mL 预冷丙酮固定 10 min,置超净工作台中风干。

#### 5.6.2.4 荧光抗体染色

于已固定的标本上加入 0.1 mL 异硫氰酸荧光素标记的抗 SIV 的抗体结合物,置湿盒内,于 37℃ 恒温恒湿培养箱内感作 30 min。

#### 5.6.2.5 漂洗

用 pH 7.2 的 PBS 洗涤 3 次,每次浸泡 5 min~10 min,然后风干。

#### 5.6.2.6 荧光显微镜检查

在标本上滴加一滴缓冲甘油,在暗室内用紫外荧光显微镜观察结果。



### 5.6.2.7 结果判定

病毒对照孔的单个或成团细胞的胞浆内出现黄绿色荧光信号,不接毒细胞对照无绿色荧光信号,或病毒感染猪的肺泡组织内出现黄绿色荧光信号,健康猪的肺泡组织内无黄绿色荧光信号,则试验成立,可进行结果判定。

待检样品的单个或成团细胞的胞浆内或者肺泡组织内出现黄绿色荧光信号的,判为阳性。

待检样品的单个或成团细胞的胞浆内或者肺泡组织内无黄绿色荧光信号的,判为阴性。

## 5.7 免疫组化检测

### 5.7.1 材料

#### 5.7.1.1 设备

烘箱、荧光显微镜、恒温恒湿培养箱、冰箱。

#### 5.7.1.2 试剂与溶液

福尔马林、多聚左旋赖氨酸、二甲苯、无水乙醇、95%的乙醇和 75%的乙醇。蒸馏水:用 HCl 或 NaOH 调整蒸馏水的 pH 值至 7.4。0.05%的蛋白酶消化液、pH 7.2, 0.1 mol/L PBS、DAB 溶液(配制方法见 A.3)。抗 SIVN 蛋白的鼠源单克隆抗体,生物素标记的羊抗鼠 IgG,链霉菌抗生物素-过氧化物酶三抗。

### 5.7.2 操作方法

#### 5.7.2.1 标本制作

将福尔马林固定、石蜡包埋的肺脏组织切成 4  $\mu\text{m}$  厚的薄片,置于多聚左旋赖氨酸处理的载玻片上,同时设病毒感染猪样品的阳性对照和健康猪样品的阴性对照。

#### 5.7.2.2 脱蜡和水化

将组织切片在 60  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘烤 15 min 进行脱蜡,分别在二甲苯、无水乙醇、95%的乙醇、75%的乙醇和蒸馏水中浸泡 5 min。

#### 5.7.2.3 消化

用 0.05%的蛋白酶消化 2 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。

#### 5.7.2.4 加单抗

每张切片加 1 滴或 0.05 mL 鼠源抗 SIVN 蛋白的单克隆抗体,室温孵育 1 h 或 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, PBS 洗 3 次,每次 2 min。

#### 5.7.2.5 加二抗

每张切片加 1 滴或 0.05 mL 生物素标记的羊抗鼠二抗,室温孵育 10 min, PBS 洗 3 次,每次 2 min。

#### 5.7.2.6 加酶标三抗

每张切片加 1 滴或 0.05 mL 链霉菌抗生物素至过氧化物酶标记三抗,室温孵育 10 min, PBS 洗 3 次,每次 2 min。



#### 5.7.2.7 加底物

每张切片加 2 滴或 0.1 mL 新鲜配制的 DAB 溶液,室温孵育 5 min,蒸馏水洗 2 次。

#### 5.7.2.8 复染、脱水、透明、封片

苏木精复染 2 min,盐酸酒精分化,蒸馏水洗 3 次,每次 2 min,脱水、透明、封片后进行镜检。

#### 5.7.2.9 镜检

#### 5.7.2.10 结果判定

病毒感染猪的支气管上皮细胞和肺泡组织内出现深褐色沉淀,健康猪的支气管上皮细胞和肺泡组织内无棕红色沉淀,则试验成立,可进行结果判定。

待检样品的支气管上皮细胞和肺泡组织内出现深褐色沉淀,判为阳性。

待检样品的支气管上皮细胞和肺泡组织内无深褐色沉淀,判为阴性。

### 5.8 SIV 核酸检测方法

#### 5.8.1 材料

##### 5.8.1.1 设备

高速台式冷冻离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)、台式离心机(离心速度 3 000 r/min)、混匀器、冰箱(2℃~8℃和-20℃两种)、PCR 仪、电泳仪系统、全自动凝胶成像分析系统、荧光 PCR 检测仪。

##### 5.8.1.2 试剂

无 DNA 酶和 RNA 酶的水、TRIZOL、分析纯三氯甲烷、分析纯异丙醇、75%乙醇。异丙醇和乙醇使用前预冷至-20℃。一步法 RT-PCR 试剂盒、一步法实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒。50×TAE 缓冲液、1%琼脂糖凝胶板、10×电泳上样缓冲液(配制方法见 A.4)、Mark DNA。

#### 5.8.2 采样和样品前处理

参见 5.1.2。

#### 5.8.3 常规 RT-PCR 检测与分型

具体方法见 GB/T 27521。

#### 5.8.4 荧光 RT-PCR 检测与分型

##### 5.8.4.1 引物和探针序列

采用以下引物和探针或其他等效引物和探针来进行 SIV、H<sub>1</sub> 亚型、H<sub>3</sub> 亚型和新型甲型 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 流感的检测和分型:

A 型流感:

InfA Forward:5'-GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C-3'

InfA Reverse:5'-AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA-3'

InfA Probe:5'-FAM-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG-BHQ-3'

H<sub>1</sub> 亚型猪流感:

SW H<sub>1</sub> Forward:5'-GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA-3'



SW H<sub>1</sub> Reverse:5'-CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC-3'

SW H<sub>1</sub> Probe:5'-FAM-CA GAA TAT ACA" T(-BHQ)"CC RRT CAC AAT TGG ARA A-3'

H<sub>3</sub> 亚型猪流感:

SW H<sub>3</sub> Forward:5'-AAA TTG AAG TGA CTA ATG CTA C-3'

SW H<sub>3</sub> Reverse:5'-TGA GGC AAC TAG TGA CCT AAG-3'

SW H<sub>3</sub> Probe:5'-FAM-CAA CAG GTA GAA TAT GCG ACA GTC C-BHQ-3'

甲型 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> (2009):

pH<sub>1</sub>N<sub>1</sub>—2009 Forward:5'-CAA CAC CAA CTT TGC TGC-3'

pH<sub>1</sub>N<sub>1</sub>—2009 Reverse:5'-GGA ACC GAT TCT TA(C/T)ACT GTT GTC-3'

pH<sub>1</sub>N<sub>1</sub>—2009 Probe:5'-FAM-CAG TCA GTG GTT TCC GTG AAA TTA GC-BHQ-3'

以上引物浓度均为 10 pmol/μL, 探针浓度为 5 pmol/μL。

#### 5.8.4.2 操作方法

##### 5.8.4.2.1 病毒 RNA 提取

见 GB/T 27521。

##### 5.8.4.2.2 实时荧光 RT-PCR 检测

###### 5.8.4.2.2.1 反应体系配制

在 PCR 溶液配制区, 每份检测样品的实时荧光 RT-PCR 体系(25 μL)见表 1。

表 1 实时荧光 RT-PCR 反应体系配制表

组 分	体积/μL
2X RT-PCR Buffer	12.5
Enzyme Mix	1.0
上游引物(10 μmol/mL)	1.0
下游引物(10 μmol/mL)	1.0
TaqMan 探针(5 μmol/mL)	1.0
无核酸降解酶的水	3.5
总体积	20

注: 不同公司生产的实时荧光 one step RT-PCR 试剂盒反应成分不同, 体系不同, 可根据相应的说明书进行修改。

将配制的每个 PCR 反应试剂充分混匀, 瞬时离心后转移至样本处理区。

###### 5.8.4.2.2.2 加样

在已分装有 PCR 反应混合液的 PCR 管中分别加入已提取好的核酸 5 μL, 盖上管盖, 将 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内, 记录样本放置顺序。

###### 5.8.4.2.2.3 PCR 扩增检测

第一步: 反转录 45 °C 30 min;

第二步: 热启动 95 °C 10 min(不同的生产厂家推荐的时间不同, 应根据说明书进行);

第三步: 95 °C 15 s, 60 °C 45 s, 40 个循环, 60 °C 时设置采集荧光。



荧光素设定:Reporter Dye 设定为 FAM,Quencher Dye 都设定为 BHQ(或 None),应根据母液中是否含有校准荧光染料确定是否选择 Reference Dye。

#### 5.8.4.2.3 结果判定

综合分析仪器给出的各项结果,基线以仪器给出的默认值作为参考,阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点为准,具体根据仪器噪音情况进行调整,选择 FAM 通道进行分析。

阳性对照样品有对数扩增曲线,而且 Ct 值 $\leq 30$ ;阴性对照和空白对照无扩增曲线,而且 Ct 值 $> 40$ 或未检出,二者均成立才可判定试验成立;

Ct 值 $\leq 35$ ,判为阳性,表明猪病毒活相应亚型病毒核酸阳性;

Ct 值 $> 40$ 或无扩增曲线,判为阴性样本,表明猪流感病毒病毒核酸阴性;

$35 < \text{Ct 值} \leq 40$ ,判为可疑样品。对于可疑样品,先看扩增曲线。如果扩增曲线为对数扩增曲线,则为可疑阳性,否则判为阴性。

对于可疑阳性样品,重新抽提核酸,再次进行实时荧光 RT-PCR 检测。如果重复扩增曲线为对数扩增曲线,判为阳性。

## 6 血清学检测

### 6.1 血凝抑制试验

#### 6.1.1 检测抗原 HA

滴度测定参见 5.2。

#### 6.1.2 HI 操作方法

6.1.2.1 根据 6.1.1 试验结果配制 4HAU 的 SIV 标准检测抗原,以完全血凝的病毒最高稀释倍数作为终点,终点稀释倍数除以 4 即为 4HAU 抗原的稀释倍数。为了更精确确定所配制的抗原是否为 4HAU,可采用回测的方法确定。

6.1.2.2 在微量反应板的 1~11 孔加入 25  $\mu\text{L}$  PBS,第 12 孔加入 0.05 mL PBS。

6.1.2.3 在每一批检测中,在一个微量反应板中设置阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照即在第 1 孔中加入 25  $\mu\text{L}$  标准阳性血清,阴性对照即在第 1 孔中加入 25  $\mu\text{L}$  标准阴性血清,空白对照即在第 1 孔中加入 25  $\mu\text{L}$  PBS。

6.1.2.4 吸取 25  $\mu\text{L}$  待检血清加入第 1 孔内,充分混匀后吸取 25  $\mu\text{L}$  于第 2 孔内,如此对倍稀释至第 10 孔,吸弃 25  $\mu\text{L}$ 。

6.1.2.5 于 1~11 孔加入含 4HAU 混匀的病毒悬液 0.025 mL,在 20  $^{\circ}\text{C}$ ~25  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min(也可于 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 60 min)。

6.1.2.6 每孔加入 25  $\mu\text{L}$  1% 鸡红细胞悬液(加之前,红细胞悬液要充分摇匀)。轻轻振荡混匀,在 20  $^{\circ}\text{C}$ ~25  $^{\circ}\text{C}$  静置 40 min 后于 45 $^{\circ}$  倾斜板上观察结果(也可于 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 60 min 后观察结果)。

#### 6.1.3 结果判定

以完全抑制(出现完整的倒“ $\perp$ ”形)4 个 HAU 抗原的血清最高稀释倍数作为 HI 滴度。只有空白对照出现凝集、阴性对照孔血清滴度不大于 1/4(或表示为  $2^2$ ),阳性对照孔血清误差不超过 1 个滴度,试验结果才有效。HI 价小于或等于 1/8(或表示为  $2^3$ ),判定 HI 试验阴性;HI 价等于 1/16(或表示为  $2^4$ )为可疑,需重复试验;HI 价大于或等于 1/32(或表示为  $2^5$ )为阳性。



## 6.2 ELISA 试验

### 6.2.1 材料

#### 6.2.1.1 设备与器材

96 孔酶标板、振荡器、恒温培养箱、酶标仪、洗板机、8 道或 12 道移液器(50  $\mu\text{L}$ ~300  $\mu\text{L}$ )。

#### 6.2.1.2 试剂

SIV 抗原、SIV 阳性血清和阴性血清。ELISA 所用溶液:包被液、洗涤液、封闭液、稀释液、底物液及终止液(配制方法详见 A.5)。

#### 6.2.1.3 待检血清

在无菌条件下采取血样,分离血清。

### 6.2.2 操作方法

#### 6.2.2.1 包被

用抗原包被液将抗原稀释至工作浓度后,加入酶标孔内,每孔 100  $\mu\text{L}$ 。将酶标板置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱中孵育 1 h,然后转移到 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中过夜。

#### 6.2.2.2 洗涤

甩净包被原,吸水纸吸干,每孔加入 250  $\mu\text{L}$  洗涤液,静置 3 min,甩干,重复 2 次,吸水纸吸干;也可用洗板机进行洗涤。

#### 6.2.2.3 封闭

加入含 10% 胎牛血清的 PBST 进行封闭,每孔加入 300  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  湿盒封闭 2 h 或置 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜封闭。甩净封闭液,按 6.2.2.2 所述标准程序进行洗涤。

#### 6.2.2.4 加样及抗体吸附

用稀释液将待检血清以及阳性和阴性对照血清作 10 倍稀释,加入封闭好的酶标板中,每孔加入 100  $\mu\text{L}$ ,待检血清、阳性对照和阴性对照都要设置重复,如果样品比较多,要在酶标板的不同位置设置对照。将加好样的酶标板在振荡器上充分振荡混匀后,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。

#### 6.2.2.5 加酶标二抗

将上述反应板按 6.2.2.2 所述标准程序进行洗涤后,每孔加入用洗涤液稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体 100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。

#### 6.2.2.6 显色

将上述反应板按 6.2.2.2 所述标准程序进行洗涤后,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  新鲜配制的底物液,37  $^{\circ}\text{C}$  或室温避光反应 5 min~10 min。

#### 6.2.2.7 终止

每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液,振荡混匀,加终止液的顺序与加底物的顺序一致。



#### 6.2.2.8 OD 值测定

加入终止液后 15 min 内,使用酶标仪于 450 nm 波长,测定吸光值( $OD_{450}$ 值)。

#### 6.2.2.9 结果判定

阴性对照孔  $OD_{450}$  值记为  $N$ ,阳性对照孔  $OD_{450}$  值记为  $P$ ,待检样品孔  $OD_{450}$  值记为  $S$ ,若  $P/N \geq 2.1$ ,且  $P-N > 0.2$ ,则试验成立,可进行结果判定。若  $S/N \geq 2.1$ ,即判定结果为阳性,否则判定为阴性。



## 附录 A

### (规范性附录)

#### 试剂的配制

#### A.1 病毒分离用试剂的配制

##### A.1.1 0.01 mol/L pH 7.2 PBS(磷酸盐缓冲液)

氯化钠(NaCl)	8.50 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.89 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.20 g
加灭菌双蒸水至	1 000 mL
将上述成分依次溶解,分装,121 °C 高压灭菌 15 min,4 °C 保存。	

##### A.1.2 双抗贮存液(100×)

100 万单位青霉素 G 和 100 万微克( $\mu\text{g}$ )链霉素溶解于 100 mL 灭菌的三蒸水中,使每毫升(mL)含有 1 万单位的青霉素 G 和 1 万微克( $\mu\text{g}$ )的链霉素,−20 °C 保存,使用时每 100 mL 加入 1 mL 双抗液。

##### A.1.3 DMEM 培养液

1 袋 DMEM 干粉溶于 950 mL 三蒸水中,加入 3.7 g  $\text{NaHCO}_2$ ,用 1mol/L HCl 调 pH 值至 6.8~7.0,定容至 1 000 mL,0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,4 °C 保存备用。

##### A.1.4 细胞生长液

在 90 mL DMEM 培养液中加入 10 mL 的灭活胎牛血清和 1 mL 的双抗,4 °C 保存备用。

##### A.1.5 细胞维持液

在 DMEM 培养液中加入 1% 的灭活胎牛血清、1% 的双抗,4 °C 保存备用。

##### A.1.6 细胞消化液

胰酶	2.5 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA)	0.20 g
0.01 mol/L pH 7.2 PBS	1 000 mL
0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,分装。−20 °C 保存备用,有效期 6 个月。	

#### A.2 HA、HI 和 AGID 相关试剂配制

##### A.2.1 阿氏(Alsever's)液配制

葡萄糖( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	20.5 g
二水合柠檬酸钠( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	8.0 g
柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )	0.55 g



氯化钠(NaCl)	4.2 g
-----------	-------

溶于蒸馏水,并稀释至 1 000 mL,用 1 mol/L 的氢氧化钠或 1 mol/L 的盐酸调节 pH 至 6.1,用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜进行过滤除菌。

### A.2.2 1%鸡红细胞悬液制备

无菌采集至少 3 只 SPF 公鸡或无禽流感和新城疫血凝抑制抗体的公鸡血液与等体积阿氏液混合摇匀,用 pH 7.2, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次均以 1 000 r/min 离心 10 min,将血浆和白细胞充分洗去。洗涤后用 PBS 配成体积分数为 1%红细胞悬液,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用,有效期为 1 周。

### A.2.3 琼脂板制备方法

琼脂糖	0.9 g
氯化钠(NaCl)	8.0 g
叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )	0.1 g

用 pH 7.2, 0.01 mol/L PBS 定容至 100 mL,100  $^{\circ}\text{C}$  沸水浴中至充分融化,冷却至 45  $^{\circ}\text{C}$ ~55  $^{\circ}\text{C}$  时,将洁净干热灭菌的直径为 90 mm 的平皿置于平台上,每个平皿加入约 15 mL,使得平皿厚度为 2.0 mm~3.0 mm,加盖自然冷却凝固后,将平皿倒置置于湿盒中,放 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

## A.3 免疫组化用试剂的配制

### A.3.1 0.05%胰蛋白酶消化液

胰蛋白酶(trypsin)	0.05 g
0.05%无水氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )(pH 7.8)	100 mL

充分振荡溶解。

### A.3.2 pH 7.2, 0.1 mol/L PBS

氯化钠(NaCl)	80.06 g
氯化钾(KCl)	20.02 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	11.50 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2.01 g
加双蒸馏水	800 mL

将上述成分依次溶解,混匀,用 pH 试纸调 pH 至 7.2,用双蒸馏水定容至 1.0 L。

### A.3.3 DAB 溶液

#### A.3.3.1 底物缓冲液(0.05 mol/L pH 7.6 Tris-HCl)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	6.05 g
浓盐酸(HCl)	2.7 mL
加双蒸馏水	至 1 000 mL

#### A.3.3.2 底物液

临用前配制	
二氨基联苯胺(DAB)	30 mg
底物缓冲液	100 mL



1%双氧水( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 1 mL

在底物缓冲液中依次加入上述成分,混匀,如有沉淀,过滤后使用。

#### A.4 RT-PCR 用试剂的配制

##### A.4.1 DEPC 处理的灭菌双蒸水配制

灭菌双蒸水 100 mL,加入 DEPC 50  $\mu\text{L}$ ,室温过夜,121  $^{\circ}\text{C}$  高压 15 min,分装到 1.5 mL 的无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中。

##### A.4.2 50 $\times$ TAE 配方

###### A.4.2.1 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液(pH 8.0)配制

二水乙二铵四乙酸二钠(EDTA) 18.61 g

灭菌双蒸水 80 mL

用固体氢氧化钠调 pH 至 8.0,灭菌双蒸水定容至 100 mL。

###### A.4.2.2 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液配制

三羟甲基氨基甲烷(Tris) 24.2 g

冰乙酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 10 mL

0.5M 二水乙二铵四乙酸二钠(EDTA)(pH 8.0) 10 mL

加双蒸水至 100 mL,室温保存备用。使用时用双蒸水稀释为 1 $\times$ TAE。

##### A.4.3 1%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖凝胶:称取 0.8 g~1 g 琼脂糖于 100 mL 1 $\times$ TAE 缓冲液中,加热融化后充分摇匀,待冷至 50  $^{\circ}\text{C}$ ~60  $^{\circ}\text{C}$  时,加入 5  $\mu\text{L}$  10 mg/mL 的溴化乙锭(EB)贮存液或其他商品化可用于琼脂糖凝胶电泳的 DNA 染料。摇匀,倒入插好梳子的电泳板上,凝固后取下梳子,备用。

##### A.4.4 10 $\times$ 电泳上样缓冲液配方

聚蔗糖( $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ ) 25 g

灭菌双蒸水 100 mL

溴酚蓝( $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ ) 0.1 g

二甲苯青( $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$ ) 0.1 g

充分溶解后,分装到 1.5 mL 离心管中,−20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### A.5 ELISA 用试剂的配制

##### A.5.1 包被液(0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液)

碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ ) 2.93 g

碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1.59 g

双蒸水 1 000 mL

将上述成分依次溶解,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱,1 周内使用。



**A.5.2 洗涤液(0.01 mol/L pH 7.2 PBST)**

氯化钠(NaCl)	8.50 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.89 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.20 g
吐温-20(Tween-20)	0.5 mL
加双蒸水至	1 000 mL

将上述成分依次溶解,置于 4 °C 冰箱,1 周内使用。

**A.5.3 稀释液(含 0.1%BSA 的 PBST)**

洗涤液	100 mL
牛血清白蛋白(BSA)	0.1 g

充分溶解后,分装,置于-20 °C 冰箱内保存。

**A.5.4 封闭液(含 10%胎牛血清的 PBST)**

胎牛血清	10 mL
洗涤液	100 mL

充分混匀后,置于 4 °C 冰箱内避光保存。

**A.5.5 底物显色液****A.5.5.1 乙酸-柠檬酸缓冲液(pH 6.0)**

乙酸钠溶液(A 液)	
乙酸钠( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )	1.64 g
双蒸水	200 mL

充分溶解后置于 4 °C 冰箱,1 周内使用。

柠檬酸溶液(B 液)

柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )	2.1 g
双蒸水	100 mL

充分溶解后置于 4 °C 冰箱,1 周内使用。

配制时,取 B 液(约 2 mL)调 A 液 pH 值至 6.0,置于 4 °C 冰箱备用。

**A.5.5.2 TMB 溶液**

四甲基联苯胺(TMB)	350 mg
甲醇( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	100 mL

加温溶解后于暗盒中存放于室温。

**A.5.5.3 底物液**

临用前配制	
pH 6.0 乙酸-柠檬酸缓冲液	9.7 mL
TMB 溶液	300 $\mu\text{L}$
30% 双氧水( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	7 $\mu\text{L}$



## A.5.6 终止液(2 mol/L 硫酸)

浓硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	22.2 mL
双蒸水	177.8 mL

---