

前 言

非洲猪瘟(African swine fever,简称 ASF)是由非洲猪瘟病毒(ASFV)引起的猪的一种急性、热性、高度接触传染性疾病。其特征为病程短,病死率高,临床症状和病理变化均类似于急性猪瘟,表现高热、皮肤充血、流产、水肿及脏器出血。为世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizootic(法),OIE]和我国规定的动物一类疾病。病毒在鲜肉和腌肉中能存活数月。

ASF 的实验室诊断分为两类:第一类包括病毒分离、病毒抗原和基因组 DNA 的检测;第二类包括抗体的检测。试验方法的选择主要依据本国或本地区的疾病情况而定。在没有 ASF 但又怀疑该病存在的国家,实验室诊断必须应用无感染性的诊断方法,即应用聚合酶链反应(PCR)检测病毒基因组 DNA 和应用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清抗体。

我国是无 ASF 国家,目前尚无 ASF 的检疫方法。农业部动物检疫所于 1997 年与美国梅岛动物病研究中心进行了 ASF 的无感染性快速检测方法的合作研究,建立了适合于我国使用的由可疑感染动物血液和内脏器官中直接检测 ASFV DNA 的 PCR 技术,以及检测血清中 ASFV 抗体的 ELISA 方法。本标准对这两种方法技术要求作了规定。

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 都是标准的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:农业部动物检疫所。

本标准主要起草人:蒋正军、王树双、尹燕博、蔡丽娟、郭福生、陆明哲、孙淑芳、龚振华。

非洲猪瘟诊断技术

Diagnostic techniques for African swine fever

1 范围

本标准规定了非洲猪瘟(ASF)聚合酶链反应(PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)的技术要求。
本标准适用于生猪和野猪等易感动物及其产品 ASF 的诊断和检疫。

2 PCR 试验

2.1 材料准备

2.1.1 样品 DNA 制备方法见附录 A(标准的附录)。

2.1.2 电泳液缓冲液的配制方法见附录 B(标准的附录)。

2.1.3 标准 ASFV-BA₇₁ 株 DNA、引物 1、引物 2、1.25 mmol/L dNTP 和载样缓冲液。

2.1.4 台克(Taq)DNA 聚合酶、分子量为 100 碱基对(bp)Ladder(标准 DNA Marker)0 和 10 倍浓度的聚合酶链反应(PCR)扩增缓冲液。

2.1.5 自动 DNA 热循环仪。

2.2 操作方法

2.2.1 将下列试剂按需求量加入到 0.75 mL 的离心管中:灭菌蒸馏水(24.5 μL);10 倍浓度的 PCR 扩增缓冲液(5 μL);1.25 mmol/L dNTP 贮存液(8 μL);引物 1(1 μL);引物 2(1 μL);样品 DNA 溶液(10 μL)(见附录 A);Taq DNA 聚合酶(0.5 μL)。

2.2.2 设定两个对照,阳性对照为标准的 ASFV-BA₇₁ 株的 10 μL DNA 含量为 10 fg;阴性对照为不含 DNA 的灭菌蒸馏水 10 μL。

2.2.3 取 50 μL 矿物油覆盖在混合液上。

2.2.4 将加有样品或对照混合物的 Eppendorf 管放入自动 DNA 热循环仪中,按下述程序和条件进行 DNA 扩增:94℃ 5 min,50℃ 2 min,72℃ 3 min 循环一次;94℃ 1 min,50℃ 2 min,72℃ 3 min 循环 30 次;94℃ 1 min,50℃ 2 min,72℃ 10 min 循环一次,最后置于 4℃ 保存。

2.2.5 上述步骤完成后,从矿物油下小心取出每种反应混合物 20 μL,放入另一支干净的 Eppendorf 管中并加 2 μL 载样缓冲液。

2.2.6 将所有样品按编号加入到对应 2%琼脂凝胶(见附录 B1)板的各孔中,其中一孔加标准阳性 DNA 样品,在凝胶的边孔中加入标准分子量 DNA Marker。

2.2.7 将凝胶在 150 V 恒定电压下电泳 2 h。

2.2.8 结果判定:用紫外光源检查凝胶。如为阳性样品,则出现一条孤立的、与阳性对照 PCR 产物的同步迁移的带,分子量为 265 bp。阴性对照和非 ASF 感染猪无 265 bp 带。

3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

3.1 试剂:标准抗原。

3.2 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(制备方法见附录 C1),底物溶液(见附录 C2)。

3.3 操作方法

3.3.1 取 ELISA 微量滴定板,每孔加入用 0.1 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液稀释至工作滴度的抗原溶液 50 μ L,封板后于 4 C 作用 16 h(过夜)。

3.3.2 用 pH7.2 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗板 3 次,每次 2 min。

3.3.3 用含 0.05%吐温-20 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液溶液,将待检血清以及阳性和阴性对照血清作 30 倍稀释,将稀释的血清加入用抗原包被的孔中,每孔中加 50 μ L。

3.3.4 将滴定板放在微量振荡器上,37 C 作用 30 min,然后用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗 3 次。

3.3.5 每孔加入 50 μ L 用含 0.05%吐温-20 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液配制的免疫球蛋白 G(IgG)-抗猪过氧化物酶结合物溶液。

3.3.6 将滴定板放入振荡器,37 C 作用于 1 h,然后用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液洗 3 次。

3.3.7 每孔加 50 μ L 底物溶液。

3.3.8 室温下显色 15 min。

3.3.9 每孔加 50 μ L,1 mol/L 的硫酸终止反应。

3.3.10 判定结果:阳性血清可以用肉眼辨认,为清亮的黄色,用 ELISA 检测仪检测每一孔的光吸收值,检测波长为 492 nm。任何一种血清,只要它的吸收值超过同一块板中阴性对照血清平均吸收值的两倍,就可判为是阳性。

附录 A

(标准的附录)

样品 DNA 的制备

- A1 将组织放入有灭菌沙子的研钵中研磨成糊状,加 5 mL~10 mL 含 1%牛血清 0.1 mol/L pH7.2 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液,对研碎的组织作 10 倍稀释,制成组织悬液。
- A2 全血样品可用含 1%牛血清的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液作 1:1 000 倍稀释,制成悬液。
- A3 如为污染物的样品,如粪便等用以上 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液作 10 倍稀释,制成悬液。
- A4 500 r/min 离心 5 min。
- A5 取 500 μ L 加入有螺旋帽的离心管中,煮沸 10 min。
- A6 用小型高速离心机以 13 000 r/min 离心 5 min。
- A7 取 10 μ L 上清液用作 PCR 试验的样品 DNA。

附录 B

(标准的附录)

电泳缓冲液的配制

B1 琼脂糖凝胶的 TAE 缓冲液(50 倍)

三羟甲基氨基甲烷碱(Tris base)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L(pH8.0)乙二胺四乙酸(EDTA)	100 mL
蒸馏水	700 mL

待上述混合物完全溶解后,加蒸馏水至 1 000 mL,置 4℃冰箱中备用,如配制 2%的琼脂糖凝胶和用作电泳缓冲液,则用蒸馏水稀释 50 倍成 TAE 缓冲液。

B2 2%琼脂糖凝胶板制备

取 1 g 琼脂糖(电泳纯)加入至 50 mL TAE 缓冲液中,在微波炉中充分溶解后,加入最终浓度为 0.5 μ g/mL 的溴化乙锭,用 TAE 定容至 50 mL,冷却至 60℃后,倒入凝胶板中,在距离底板 0.5 mm 的位置上放置梳子,以便加入琼脂糖后可以形成完好的加样孔子,凝胶的厚度为 4 mm,待凝胶完全凝固后,小心移去梳子,将凝胶板放入电泳槽中,加入恰好没过胶面约 1 mm 深的足量电泳缓冲液。

附录 C

(标准的附录)

酶联免疫吸附试验溶液配制

C1 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液的配制

将下列试剂按次序加入 2 000 mL 体积的容器中。

氯化钠	80.06 g
氯化钾	20.02 g
磷酸氢二钠	11.50 g

磷酸二氢钾 2.01 g

双蒸馏水 800 mL

混匀,用 pH 试纸调 pH 至 7.2,用双蒸馏水定容至 1 000 mL。

C2 底物溶液[邻苯二胺-过氧化氢(OPD-H₂O₂)]

C2.1 0.1 mol/L pH5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液

将下列试剂按次序加入 1 000 mL 体积的容器中,充分溶解即成。

磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ · 12H₂O) 71.6 g

柠檬酸 19.2 g

蒸馏水 1 000 mL

C2.2 底物溶液

0.1 mol/L pH5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液 100 mL

邻苯二胺(OPD) 40 mg

30%(过氧化氢)(H₂O₂) 0.15 mL

此液对光敏感,应避免强光直射。现配现用。
