

# DB32

## 江 苏 省 地 方 标 准

DB32/T 3685—2019

---

### 猪萨佩罗病毒检测技术规程

Detection technical regulation for Porcine Sapelovirus



2019 – 12 – 04 发布

2019 – 12 – 25 实施

江苏省市场监督管理局

发 布

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由江苏省农业科学院提出并归口。

本标准起草单位：江苏省农业科学院。

本标准主要起草人：李彬、范宝超、孙杰、何孔旺、郭容利、周金柱、俞正玉。

# 猪萨佩罗病毒检测技术

## 1 范围

本标准规定了猪萨佩罗病毒的核酸检测（RT-PCR法）、血清学检测（间接ELISA方法）等要求。本标准规定的RT-PCR法适用于本病毒的抗原确诊，间接ELISA试验适用于血清学的普查。

## 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（包括所有的修订单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**猪萨佩罗病毒** Porcine Sapelovirus (PSV)

单股正链RNA病毒，属于小RNA病毒科萨佩罗病毒属。该病毒能引起中度或严重的神经系统紊乱、腹泻、繁殖障碍和肺炎，感染猪康复后仍然会继续排毒，成为重要的病毒传播源，因此该病毒在猪群中感染率很高，严重威胁着养猪业的健康发展。

## 4 核酸检测（RT-PCR 法）

### 4.1 材料准备

PCR 引物 P1 5'- GAGAAGGTAAAGATGGGCAAAAC - 3' 和 P2 5'- AATACAGGATGACACAGGAAGGG- 3'（见附录B）。PCR相关试剂。猪萨佩罗病毒阳性病料RNA提取物反转录为cDNA作为阳性对照，水作为阴性对照。高速离心机（10000 r/min）、PCR仪、电泳仪、水平电泳槽凝胶成像系统（或紫外投射仪）、移液器等仪器。

### 4.2 操作步骤

#### 4.2.1 DNA模板制备

按NY/T 541规定的方法，采集待检猪的病料置于-20℃以下冰箱保存。临床组织病料样品加入1×PBS缓冲液进行充分研磨后冻融3次，高速10000 r/min离心5 min，取上清提取病毒总RNA（参照RNA提取试剂盒说明书），并反转录成cDNA（利用反转录试剂盒），保存备用。

#### 4.2.2 PCR

PCR反应体系：2xTaq Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ ，P1（20 pmol/ $\mu\text{L}$ ）1.0  $\mu\text{L}$ ，P2（20 pmol/ $\mu\text{L}$ ）1.0  $\mu\text{L}$ ，模板2  $\mu\text{L}$ ~5  $\mu\text{L}$ ，加ddH<sub>2</sub>O至总体积 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件：预变性94℃ 5min，94℃ 30s，扩增的退火温度分别采用55℃进行扩增30 s，72℃ 30 s，35个循环72℃延伸10 min。

#### 4.2.3 电泳

制备1 %琼脂糖凝胶，内加适量溴化乙锭或其替代物，取PCR产物10  $\mu\text{L}$  ~ 20  $\mu\text{L}$ 分别与适量加样缓冲液混合后，加样到电泳孔中，9 V/cm恒压下电泳15 min~30 min。将电泳好的凝胶放到紫外投射仪或凝胶成像系统上观察结果。

### 4.3 结果判定

阳性对照扩增到689 bp条带，同时阴性对照无条带时，试验成立。

在试验结果成立的前提下，如果样品扩增到689 bp条带，可确认为样品为猪萨佩罗病毒PCR阳性。

### 4.4 废弃物处理和防止污染的措施

检测过程中的废弃物，应做好无害化处理，检测过程中防止交叉污染的措施见附录A。

## 5 血清学检测（间接 ELISA 方法）

### 5.1 材料准备

猪萨佩罗病毒重组3C表达抗原，酶标抗体，标准阴性血清、标准阳性血清，酶标板及其他必要的试验溶液和酶标仪、移液器等仪器。待检血清样品采集于疑似患病猪场。

### 5.2 操作步骤

5.2.1 包被：用包被液将猪萨佩罗3C蛋白抗原稀释到工作浓度加入酶标板孔内，每孔100  $\mu\text{L}$ ，4℃冰箱过夜。

5.2.2 洗涤：甩掉酶标板孔内的液体，加入洗涤液200  $\mu\text{L}$ /孔，室温下浸泡5 min，甩去洗涤液，再重新加入洗涤液，连续洗3次，最后一次甩掉洗涤液后，拍干酶标板。

5.2.3 封闭：各孔加入5%的脱脂乳封闭液200  $\mu\text{L}$ ，37℃作用2 h。按5.2.2步骤洗涤四次。

5.2.4 加入待检血清和阴、阳性血清对照：待检血清用稀释液1:320稀释，每孔加100  $\mu\text{L}$ 。同时将阴、阳性血清作对照。37℃作用45 min，重复5.2.2步骤，洗涤4次。

5.2.5 加入酶标抗体：用稀释液将酶标抗体按1:10000稀释，每孔加入100  $\mu\text{L}$ ，37℃作用30 min，重复5.2.2步骤，洗涤4次。

5.2.6 加入底物，每孔加100  $\mu\text{L}$ ，室温避光显色8 min。

5.2.7 终止反应，每孔加入50  $\mu\text{L}$ 终止液终止反应。

5.2.8 测定光吸收值(OD)，在酶联免疫检测仪上于450 nm波长处测定光吸收值(OD)。

### 5.3 结果判定

用酶标仪检测OD值，计算S/P值， $S/P\text{值} = (\text{样品血清OD}_{450\text{nm}} - \text{阴性血清OD}_{450\text{nm}}) / (\text{阳性血清OD}_{450\text{nm}} - \text{阴性血清OD}_{450\text{nm}})$ 。当样品S/P值<0.150时，判为阴性；样品S/P值>0.212时判为阳性；0.150≤样品S/P值≤0.212时，判为疑似。

