

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4647—2025

边界病诊断技术

Diagnostic techniques for border disease

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部

发布



目 次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 生物安全措施 2

6 临床诊断 2

 6.1 流行病学 2

 6.2 临床症状 2

 6.3 临床判定 2

7 样品采集、运输与保存 2

 7.1 样品的采集 2

 7.2 样品的运输与保存 3

8 病毒分离与鉴定 3

 8.1 主要仪器与设备 3

 8.2 主要试剂与材料 3

 8.3 样品处理 3

 8.4 病毒分离 4

 8.5 病毒鉴定 4

 8.6 结果判定 5

9 RT-PCR 5

 9.1 主要仪器与设备 5

 9.2 主要试剂与材料 5

 9.3 操作方法 6

 9.4 试验成立条件 6

 9.5 结果判定 6

10 实时荧光 RT-PCR 6

 10.1 主要仪器与设备 6

 10.2 主要试剂与材料 7

 10.3 操作方法 7

 10.4 试验成立条件 7

 10.5 结果判定 7

11 病毒中和试验 7

 11.1 主要仪器与设备 7

 11.2 主要试剂与材料 8

 11.3 操作方法 8

 11.4 试验成立条件 8

 11.5 结果判定 8

12 综合判定 8

附录 A(规范性) 病毒分离鉴定溶液的配制 10

 A.1 0.01 mol/L PBS(pH7.4) 10

 A.2 50%甘油 - PBS 保存液(pH7.4)..... 10

 A.3 细胞培养液 10

 A.4 细胞维持液 10

 A.5 0.25%胰蛋白酶溶液 10

 A.6 绵羊(山羊)睾丸或肾原代细胞制备 10

附录 B(资料性)核酸检测用引物、探针序列信息 11

 B.1 RT-PCR 引物 11

 B.2 5'UTR 基因序列(1-372)..... 11

 B.3 RT-PCR 产物电泳图 11

 B.4 实时荧光 RT-PCR 引物和探针 11

 B.5 实时荧光 RT-PCR 扩增曲线示意图 12

附录 C(规范性)核酸检测相关溶液的配制 13

 C.1 50×TAE 储存液 13

 C.2 1×TAE 缓冲液 13

 C.3 1.5%琼脂糖凝胶 13

附录 D(规范性)病毒繁殖和毒价测定 14

 D.1 病毒繁殖..... 14

 D.2 毒价测定..... 14

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、中国兽医药品监察所、江苏省农业科学院。

本文件主要起草人：王淑娟、樊晓旭、徐天刚、王莹、左媛媛、吴华伟、刘茂军、刘丹、陈晓春、毛立、李文良、吕艳、王华、胡永新、常星、张锋、王清华、张永强、赵永刚、郑东霞、邹艳丽、徐蛟、刘春菊、任炜杰、孙翔翔、孙明军、田莉莉、董雅琴、王媛媛、苏红、李金明、包静月、王志亮。



引 言

边界病(border disease, BD)是由边界病病毒(border disease virus, BDV)引起的主要发生于绵羊和山羊等动物的病毒性疫病,以繁殖障碍和羔羊畸形为特征。该病主要通过垂直方式传播,也能通过消化道、呼吸道等方式水平传播。BDV 在分类学上属于黄病毒科瘟病毒属成员,与猪瘟病毒(CSFV)和牛病毒性腹泻病毒(BVDV)同属。BDV 可分为 2 种生物型:致细胞病变型(CP)和非致细胞病变型(NCP),其中 NCP 型更普遍。

该病 1959 年首次在英格兰和威尔士边界地区的羊群中出现,目前在世界范围内广泛流行。我国 2013 年首次分离到 BDV。近年来,流行病学调查表明我国绵羊和山羊等均不同程度地感染 BDV。BDV 有免疫抑制作用,胎儿感染可能导致羔羊的持续性感染(PI),PI 羊抗体阴性但持续排毒,是主要传染源,所以用病原学检测方法检出 PI 羊是防控该病的关键和前提。本文件中的病原学检测方法均具有 BDV 特异性,能够特异性区分 BDV、BVDV 和 CSFV。

本文件的实施将提高我国边界病的诊断和监测水平,为更有效地做好边界病的防控工作提供技术支撑。

本文件的制定参考了 WOAHP:Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals、《陆生动物诊断试验与疫苗手册》相关内容,在技术上与国际保持一致,并结合了国外相关文献和我国相关技术有关研究新成果。

边界病诊断技术

1 范围

本文件规定了边界病(border disease, BD)的临床诊断、样品采集、运输与保存及病毒分离与鉴定、RT-PCR、实时荧光 RT-PCR、病毒中和试验等诊断技术要求。

本文件适用于绵羊、山羊等动物边界病的诊断、检疫、监测和流行病学调查等。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范动物检疫

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BD:边界病(Border disease)

BDV:边界病病毒(Border disease virus)

BVDV:牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus)

CP:致细胞病变型(Cytopathic type)

CPE:细胞病变效应(Cytopathic effect)

CSFV:猪瘟病毒(Classical swine fever virus)

Ct:循环阈值(Cycle threshold)

DEPC:焦碳酸二乙酯(Diethyl pyrocarbonate)

DMEM: Dulbecco's 最低基本培养基(Dulbecco's minimal essential medium)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene diaminetetraacetic acid)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay)

FAM:6-羧基荧光素(6-Carboxy-fluorescein)

FITC:异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate)

NCP:非致细胞病变型(Non-cytopathic type)

OD:光密度(Optical density)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline)

PBST:吐温磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline with Tween-20)

PI:持续性感染(Persistent infection)

RNA:核糖核酸(Ribonucleic acid)

RT-PCR:反转录-聚合酶链反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

TAE:三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液(Tris-Acetic acid-EDTA buffer)

TAMRA:四甲基罗丹明(Tetramethylrhodamine)

TCID₅₀:组织半数感染量(Median tissue culture infective dose)

5 生物安全措施

进行 BD 的诊断、检测时,生物安全措施按照 GB 19489、GB/T 27401、NY/T 541、NY/T 1948 的规定执行。

6 临床诊断

6.1 流行病学

6.1.1 传染源

病羊、持续性感染(PI)羊及带毒动物是最主要的传染源。病毒主要存在于流产的胎儿、胎膜、羊水及持续感染动物的分泌物和排泄物中。

6.1.2 传播途径

垂直传播或通过消化道、呼吸道等水平传播,垂直传播是主要传播途径。

6.1.3 易感动物

绵羊最易感,山羊、牛、猪以及其他动物也能感染。

6.1.4 季节性

该病可常年发生,没有明显季节性。

6.1.5 流行特点

羊群感染后主要表现在繁殖季节不孕或流产增多,流产以怀孕 90 d 左右最多。典型特征是母羊生出弱小羔羊,羔羊发育不良、畸形,多在断奶前后死亡。羔羊常呈神经症状、体型异常、多毛,所以该病又称“多毛震颤病”或“茸毛症”。

6.2 临床症状

6.2.1 急性感染

病羊低热,出现短暂病毒血症,有的出现食欲不振、结膜炎、流鼻涕、呼吸困难和腹泻,羔羊死亡率可达 50%。

6.2.2 胚胎感染

6.2.2.1 妊娠早期感染,一般出现流产、死胎,死胎可被自动吸收,或产前可见较大胎儿流产、死胎,或早产弱小羔羊。在产羔羊季节,出现大量不孕母羊。

6.2.2.2 妊娠中期感染,胎儿出生后小而虚弱、站立困难,常出现明显神经症状、病羔震颤、运动紊乱和骨骼异常等。

6.2.2.3 妊娠晚期感染,出生后的羔羊多数正常且健康,出生后不带毒,但有 BDV 抗体,部分羔羊可因体弱而早亡。

6.2.3 持续性病毒血症

胎儿在产生免疫应答前(60 d~85 d)感染病毒并存活,出生后存活下来的大部分羔羊会始终保持病毒血症状态,成为持续性感染(PI)羊。PI 羊是 BDV 最主要的储存宿主和传染源,可终生带毒并通过粪、尿、分泌物、奶或精液大量排毒。

6.2.4 持续性病毒血症绵羊迟发病

持续性感染(PI)羊常出现腹泻、消瘦,眼鼻出现大量的分泌物,有时呼吸困难。

6.3 临床判定

当易感动物出现 6.2 部分或全部临床症状,并符合 6.1 流行病学特征,可判为 BD 疑似病例,确诊需进一步采样进行实验室诊断。

7 样品采集、运输与保存

7.1 样品的采集

7.1.1 每个疑似 BD 畜群选择至少 5 只(头)病畜采集样品,少于 5 只(头)的畜群则全部采集。

7.1.2 对有发热、腹泻、流产等临床症状的活畜,采集流产物、眼分泌物、鼻腔、口腔、尿道棉拭子,分别置于 600 μL ~1 000 μL 灭菌的 PBS 溶液中。无菌采集抗凝血以及全血各 1 管,每管应不少于 5 mL,无抗凝剂全血按照常规方法制备血清。采集公羊精液至少 5 mL,置于 50 mL 离心管中。

7.1.3 无菌采集死亡时间不超过 24 h 的病死畜或流产胎畜的组织(肾、睾丸、肺、甲状腺、胸腺、脾脏、淋巴结、脑和肠道病变组织等)样品各 25 g~50 g,分别置于样品保存管(袋)中。如果样品需长途运输,加入 50%甘油-PBS 保存液,液面没过样品,加盖封口。

7.2 样品的运输与保存

7.2.1 样品采集后,应于 48 h 内低温送至实验室。样品的包装应防渗、防漏、防溢出,避免包装穿刺或损坏,样品运输应符合 NY/T 541 的要求。

7.2.2 样品在 4℃ 保存应不超过 24 h。若需长期保存,应置于-70℃ 以下保存。

8 病毒分离与鉴定

8.1 主要仪器与设备

8.1.1 生物安全柜。

8.1.2 CO₂ 培养箱。

8.1.3 倒置荧光显微镜。

8.1.4 台式低温高速离心机。

8.1.5 冰箱(2℃~8℃、-20℃、-70℃)。

8.1.6 研钵和研杵(或冷冻组织匀浆机)。

8.1.7 0.45 μm 滤器。

8.1.8 剪刀。

8.1.9 镊子(含弯头镊子)。

8.1.10 灭菌漏斗(含 4 层纱布)。

8.1.11 三角瓶。

8.1.12 细胞培养瓶。

8.1.13 移液器(10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

8.2 主要试剂与材料

8.2.1 0.01 mol/L PBS(pH7.4),按照附录 A 中的 A.1 的规定配制。

8.2.2 50%甘油-PBS 保存液,按照 A.2 的规定配制。

8.2.3 青霉素,浓度为 10 000 IU/mL。

8.2.4 链霉素,浓度为 10 000 $\mu\text{g/mL}$ 。

8.2.5 细胞培养液,按照 A.3 的规定配制。

8.2.6 细胞维持液,按照 A.4 的规定配制。

8.2.7 0.25%胰蛋白酶溶液,按照 A.5 的规定配制。

8.2.8 2 月龄~4 月龄的健康雄性绵羊通过无菌手术摘取的睾丸或肾脏,应无 BDV 污染。

8.2.9 胎牛血清,应无 BVDV 和 BDV 污染且相应抗体均应为阴性,-20℃ 保存。

8.2.10 阳性毒株,BDV 分离株。

8.2.11 BDV 单克隆抗体(商品化)以及 FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体(商品化)或 BDV 直接免疫荧光抗体(商品化),使用前稀释至推荐工作浓度。

8.3 样品处理

8.3.1 组织样品

在生物安全柜内研磨或匀浆处理受检样品。分别取肾、睾丸、肺、甲状腺、胸腺、脾脏、淋巴结、脑和肠道病变组织等样品 1 g,加灭菌生理盐水 5 mL~10 mL,研磨成 10%~20%匀浆,5 000 r/min 4℃离心 15 min,接种细胞的样品取上清液经 0.45 μm 滤器过滤,编号备用,经处理的样品当天使用,使用前置于 4℃保存,剩余样品置于-70℃以下保存。

8.3.2 血液样品

取抗凝血 500 μL,冻融 3 次,3 000 r/min 4℃离心 10 min,取上清。经处理的样品当天使用,使用前置于 4℃保存,剩余样品置于-70℃以下保存。

8.3.3 血清样品

用无菌注射器直接采集血液至灭菌离心管或采用一次性采血管采集血液,将样品管放于室温,静置于 1 h,再于 4℃冰箱放置于 1 h 或过夜,5000 r/min 离心 5 min~10 min,无菌吸取上层血清,编号备用。

8.3.4 精液样品

加入 10 倍体积含 1 00 U/mL 青霉素和 200 μg/mL 链霉素的 DMEM 细胞维持液匀浆,5 000 r/min 4℃离心 15 min,收集上清液作为接种材料。不能立即接种细胞者,应置-70℃以下保存。

8.3.5 棉拭子样品

将浸泡于灭菌 PBS 溶液中的棉拭子充分捻动、混匀,接种细胞的样品取上清用 0.45 μm 滤膜过滤备用,剩余样品置于-70℃以下保存。

8.4 病毒分离

8.4.1 制备单层细胞

将绵羊(山羊)睾丸或肾原代细胞(按照 A.6 的规定制备)用 0.25% EDTA-胰酶消化液消化分散后,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液稀释成浓度为 1×10^6 个/mL~ 2×10^6 个/mL,将其分装至细胞培养瓶,于 37℃含 5% CO₂ 培养箱中静置培养 24 h~48 h,形成细胞单层备用。

8.4.2 接种细胞

每份样品接种 2 瓶细胞,另设细胞对照 1 瓶。接种前先弃去细胞培养瓶中的培养液,按最终细胞维持液体积的 8%~10%比例接种已处理好的样品,37℃吸附 1 h~2 h,补加细胞维持液。细胞对照瓶不接种样品,弃去培养液后加入等量细胞维持液。均置于 37℃恒温培养箱或 5% CO₂ 培养箱中。

8.4.3 观察和记录

每天观察并记录。如对照细胞单层完好,细胞形态正常或稍有衰老,接种病料的细胞如出现 CPE,且 70%以上细胞出现 CPE 时取出并置于-70℃以下冻存备用。无 CPE 的细胞瓶于接种后 120 h~168 h 进行盲传。

8.4.4 盲传

将第 1 代无 CPE 的样品接种细胞瓶,弃去细胞培养液,重新补加与第 1 代相同体积的细胞维持液继续培养 120 h~168 h,按 8.4.3 进行观察和记录,盲传第 2 代。此过程中培养物仍无 CPE 则按相同的方法盲传第 3 代,培养结束后无论是否出现 CPE 均收毒,置于-70℃以下冻存备用。取盲传 3 代的培养物进行病毒鉴定。

8.5 病毒鉴定

8.5.1 免疫荧光染色

8.5.1.1 按 8.4.1 方法制备浓度为 1×10^6 个/mL~ 2×10^6 个/mL 的绵羊(山羊)睾丸或肾原代细胞,分装于 96 孔细胞板中,0.1 mL/孔,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中静置培养 24 h。

8.5.1.2 将 8.4.3 或 8.4.4 备用样品,冻融 3 次后,3 000 r/min 离心 10 min。取上清液接种于已长成 80%以上细胞单层的 96 孔细胞板中(接种前弃去培养板孔中的细胞营养液),0.1 mL/孔,每个样品接种 4 孔,同时设立阳性病毒对照 4 孔(100 TCID₅₀/孔~300 TCID₅₀/孔),设不接毒的正常细胞对照 4 孔。

8.5.1.3 接种后细胞板置于 37℃含 5% CO₂ 培养箱中吸附 1 h~2 h,每孔补加细胞维持液 0.1 mL,置于 37℃含 5% CO₂ 培养箱中继续培养 120 h~168 h。

8.5.1.4 培养结束后,弃去细胞板孔中液体,用 PBS 轻轻洗涤 1 次,吸干,加入 80% 的冷丙酮或其他固定液(如 4% 多聚甲醛),0.1 mL/孔,4 ℃ 固定 30 min~40 min。弃去孔中固定液,室温自然晾干,备用。

8.5.1.5 固定好的细胞板采用直接免疫荧光或间接免疫荧光方法进行染色。

8.5.1.5.1 直接免疫荧光染色:每孔加入 100 μ L BDV 直接免疫荧光抗体工作液,37 ℃ 孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次后,弃去孔中液体。

8.5.1.5.2 间接免疫荧光染色:每孔分别加入 BDV 单克隆抗体工作液 100 μ L,37 ℃ 孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,再每孔加入 FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体工作液 100 μ L,37 ℃ 孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次后,弃去孔中液体。

8.5.1.6 镜检

8.5.1.6.1 荧光染色特点:被 BDV 感染的细胞,在蓝紫光(波长 490 nm~495 nm)激发的荧光显微镜下,胞浆呈黄绿色的荧光,并常见有闪烁明亮黄绿色荧光的细小颗粒散布于胞浆内。未感染细胞无荧光。

8.5.1.6.2 荧光观察记录:荧光在激发光照射下,随时间延长而明显减弱,因此在染色后,应尽快镜检及时记录,记录可分为:

(-):无荧光;

(+):荧光微弱,细胞形态不清晰;

(++):荧光较亮,细胞形态清晰;

(+++~++++):荧光较强,明亮闪烁,细胞形态清晰。

8.5.1.7 试验成立条件

当正常细胞对照为(-)、4 个阳性对照均为(++)或以上,证明试验成立,可进行结果判定。

8.5.1.8 免疫荧光结果判定

根据荧光染色观察结果,被检样品孔任一孔结果为(++)或以上时判定被检样品 BDV 阳性;被检样品孔均低于(++)但任一孔结果为(+)时应重检,如重检结果有任一孔不低于(+)时,判定被检样品 BDV 阳性;被检样品孔结果均为(-)时,判定被检样品 BDV 阴性。

8.6 结果判定

经 8.4 病毒分离后的样品,经 8.5 病毒鉴定或第 9 章 RT-PCR 或第 10 章实时荧光 RT-PCR 进行检测判为阳性者,可判定为 BDV 分离阳性。

9 RT-PCR

9.1 主要仪器与设备

9.1.1 PCR 扩增仪。

9.1.2 台式低温高速离心机。

9.1.3 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

9.1.4 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。

9.1.5 研钵和研杵(或组织匀浆机)。

9.1.6 移液器(10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L 等不同规格)。

9.1.7 冰箱(2 ℃~8 ℃、-20 ℃、-70 ℃)。

9.1.8 核酸提取仪。

9.2 主要试剂与材料

9.2.1 引物,序列信息见附录 B 中的 B.1。

9.2.2 DEPC 处理水。

9.2.3 TAE 缓冲液,按照附录 C 中的 C.1 和 C.2 的规定配制。

9.2.4 1.5% 琼脂糖凝胶,按照 C.3 的规定配制。

9.2.5 一步法 RT-PCR 试剂盒(商品化)。

9.2.6 RNA 提取试剂盒(商品化)。

9.2.7 上样缓冲液。

9.2.8 提取阳性对照:灭活的 BDV 细胞培养物等。

9.2.9 反应阳性对照:人工合成的含有 BDV 目的基因(序列信息见 B.2)的质粒或体外转录法制备的 BDV RNA 片段或 BDV 细胞培养物提取的核酸等。

9.2.10 提取阴性对照:正常细胞对照或 BDV 阴性动物抗凝血。

9.2.11 反应阴性(空白)对照:DEPC 处理水等。

9.3 操作方法

9.3.1 病毒核酸提取

采用 RNA 提取试剂盒(商品化)提取各类样本中的病毒核酸,或用自动化核酸提取仪提取各类样本中的病毒核酸。每次提取核酸时,应设置核酸提取阳性对照和阴性对照。如在 2 h 内检测可将提取的核酸冷藏保存,超过 2 h 应置于 -70°C 以下冰箱中保存。

9.3.2 反应体系配制

用一步法 RT-PCR 试剂盒(商品化)配制 25 μL 反应体系(反应体系可依据所用试剂盒的不同而适当改变):

——12.5 μL 的 2 $\times$ 一步法 RT-PCR 反应缓冲液;

——1.0 μL 的正向引物 PBD136F(10 $\mu\text{mol/L}$);

——1.0 μL 的反向引物 PBD335R(10 $\mu\text{mol/L}$);

——1.0 μL 的酶混合物;

——3.0 μL 模板;

——6.5 μL 的 DEPC 处理水。

瞬时离心后,置于 PCR 扩增仪内进行扩增。每次检测应设置阳性对照和阴性对照。

9.3.3 RT-PCR 反应程序

50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

注:反应程序可依据所用试剂盒的不同而适当改变。

9.3.4 RT-PCR 扩增产物电泳

取 8 μL PCR 扩增产物,按上样缓冲液比例要求加入上样缓冲液混匀,用 1 $\times$ TAE 缓冲液配制的 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,Marker 用 DL 2 000 DNA Marker,100 V 电泳 30 min 左右。电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪中观察结果。

9.4 试验成立条件

提取阳性对照和反应阳性对照应出现 225 bp 的特异性扩增条带,且提取阴性对照和反应阴性对照应无任何扩增条带,试验成立。

9.5 结果判定

被检测样品出现 225 bp 大小的特异性的扩增条带,则判为 BDV 核酸阳性;被检样品无特异性的扩增条带,则判为 BDV 核酸阴性。RT-PCR 产物电泳图见 B.3。

10 实时荧光 RT-PCR

10.1 主要仪器与设备

10.1.1 荧光定量 PCR 扩增仪。

10.1.2 台式低温高速离心机。

10.1.3 研钵和研杵(或自动匀浆机)。

10.1.4 核酸提取仪。

10.1.5 冰箱(2℃~8℃、-20℃、-70℃)。

10.1.6 移液器(10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL 等不同规格)。

10.2 主要试剂与材料

10.2.1 引物和探针,序列信息见 B.4。

10.2.2 一步法实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒(商品化)。

10.2.3 RNA 提取试剂盒(商品化)。

10.2.4 DEPC 处理水。

10.2.5 提取阳性对照:灭活的 BDV 细胞培养物等。

10.2.6 反应阳性对照:人工合成的含有 BDV 目的基因(序列信息见 B.2)的质粒或体外转录法制备的 BDV RNA 片段或 BDV 细胞培养物提取的核酸等。

10.2.7 提取阴性对照:正常细胞对照或 BD 阴性动物抗凝血等。

10.2.8 反应阴性(空白)对照:DEPC 处理水等。

10.3 操作方法

10.3.1 病毒核酸提取

同 9.3.1。

10.3.2 反应体系配制

用一步法 RT-qPCR Mix 试剂盒(商品化)配制 20 μL 反应体系(反应体系可依据所用试剂盒的不同而适当改变):

——10.0 μL 的 2×一步法 Real-time RT-PCR 反应缓冲液;

——0.8 μL 的上游引物 BDV87F(10 μmol/L);

——0.8 μL 的下游引物 BDV237R(10 μmol/L);

——0.4 μL 的探针 BDV136TF(10 μmol/L);

——0.4 μL 的 ROX Reference Dye II;

——3.0 μL 的模板;

——4.6 μL 的 DEPC 处理水。

盖紧 PCR 管盖或封膜,瞬时离心后,置于荧光 PCR 扩增仪内进行扩增。每次检测时,应设置反应阳性对照、提取阳性对照和阴性对照。

10.3.3 反应程序

50℃反转录 10 min;95℃预变性 5 min;95℃变性 15 s,60℃退火延伸 30 s,45 个循环,在每一个循环的 60℃时收集 FAM 荧光信号。

注:反应时间和温度可依据所用试剂盒及荧光定量 PCR 仪的不同而适当改变。

10.4 试验成立条件

提取阳性对照和反应阳性对照的 Ct 值应≤30 且出现特异性扩增曲线,提取阴性对照和反应阴性对照无 Ct 值且无特异性扩增曲线,试验结果有效。

10.5 结果判定

被检样品无 Ct 值或无特异性扩增曲线,判为 BDV 核酸阴性;被检样品 Ct 值≤36 且出现特异性扩增曲线,判定为 BDV 核酸阳性;被检样品 Ct 值>36,且出现特异性扩增曲线,需复检,复检 Ct 值若>36 且出现特异性扩增曲线,判定为 BDV 核酸阳性,若无特异性扩增曲线则判为 BDV 核酸阴性。扩增曲线示意图见 B.5。

11 病毒中和试验

11.1 主要仪器与设备

11.1.1 生物安全柜。

11.1.2 5% CO₂ 培养箱。

11.1.3 倒置荧光显微镜。

11.1.4 台式低温高速离心机。

11.1.5 冰箱(2℃~8℃、-20℃、-70℃)。

11.1.6 移液器(10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL 等不同规格)。

11.1.7 0.45 μm 滤器。

11.1.8 96 孔细胞培养板。

11.2 主要试剂与材料

11.2.1 绵羊(山羊)睾丸或肾原代细胞,分离培养方法按照 A.6 的规定进行。

11.2.2 NCP 型 BDV 毒株,按照附录 D 准备病毒和测定毒价。

11.2.3 BDV 阳性血清。

11.2.4 BDV 阴性血清。

11.2.5 BDV 单克隆抗体(商品化)以及 FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体(商品化)或 BDV 直接免疫荧光抗体(商品化),使用前稀释至推荐工作浓度。

11.3 操作方法

11.3.1 按 8.4.1 方法制备细胞单层。

11.3.2 用移液器吸取 100 μL 待检血清、BDV 阳性和阴性对照血清,分装于无菌离心管中,一份血清换一个移液器吸头。将分装后的待检血清和对照血清置于 56℃ 水浴锅中灭活 30 min。

11.3.3 在血清灭活期间,将已知毒价的 BDV 用无血清 DMEM 培养液将病毒稀释至 200 TCID₅₀/0.1 mL。

11.3.4 取 1 块 96 孔细胞培养板(记为板 I)每孔加入细胞维持液 60 μL。将 11.3.2 灭活后的待检血清和对照血清按顺序加入上述培养液中,每孔 20 μL,每份血清做 2 个重复。此时,待检/对照血清均被稀释 4 倍。血清稀释后,向板 I 中各孔加入 11.3.3 中的稀释好的病毒液 80 μL。同时设 1:4 稀释的 BDV 阳性血清对照、1:4 稀释的阴性血清对照和正常细胞对照各 2 孔及 BDV 病毒液回归对照 10⁰~10⁻³ 的 4 个稀释度,每个稀释度各 2 孔。将板 I 置于 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h。

11.3.5 孵育结束后,将 11.3.1 中制备的细胞板(记为板 II),用多道移液器吸净上清,然后迅速加入板 I 对应孔中的血清-病毒混合液,每孔 100 μL。

注:进行此步骤操作时,以两列为单位进行操作。例如,先用多道移液器吸净板 II 中 1 列、2 列细胞培养液,然后迅速从板 I 中吸取 1 列、2 列孔中液体加入板 II 的对应孔中。

11.3.6 将板 II 置于 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h。

11.3.7 取出板 II,每孔加入维持液 100 μL,置于 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中培养 120 h~168 h。

11.3.8 按 8.5.1.4~8.5.1.6 进行免疫荧光染色。

11.4 试验成立条件

当正常细胞对照孔内细胞单层生长良好,病毒回归对照结果在 30TCID₅₀/50 μL~300TCID₅₀/50 μL 范围之内,BDV 阳性对照血清均为染色阴性,阴性对照血清均为染色阳性,试验成立。

11.5 结果判定

待检血清的 2 个重复孔免疫荧光染色均为阴性时,判为 BDV 抗体阳性;若 2 个重复孔免疫荧光染色均为阳性时,判为 BDV 抗体阴性。若 2 个重复孔中 1 孔免疫荧光染色阳性、1 孔免疫荧光染色阴性,则该血清判为可疑,应重复检测;若仍为可疑结果,则判为 BDV 抗体阴性。

12 综合判定

12.1 根据第 6 章临床诊断判定为 BD 疑似病例,经第 8 章、第 9 章、第 10 章任意方法检测为 BDV 阳性

者,判为 BD 确诊病例。

12.2 无明显临床症状的动物,经第 8 章、第 9 章、第 10 章任意方法检测为 BDV 阳性者,判为 BD 隐性感染。

12.3 按第 11 章判定为 BDV 抗体阳性,若同时第 8 章、第 9 章、第 10 章任意方法检测判定为阳性者,判为 BD 确诊病例;若同时第 8 章、第 9 章、第 10 章所有方法检测均为阴性,判为曾经感染过 BDV。

附录 A

(规范性)

病毒分离鉴定溶液的配制

A.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)

称取 8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.20 g 氯化钾(KCl)、1.42 g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.27 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),加去离子水溶解至 1 000 mL,调整 pH 至 7.4,103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min,室温保存。PBS 一经使用,于 4 °C 保存不超过 3 周。

A.2 50%甘油-PBS 保存液(pH 7.4)

将 0.01 mol/L PBS 与纯甘油(分析纯)等量混合,调整 pH 至 7.4,分装为小瓶,103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。室温或 4 °C 保存。

A.3 细胞培养液

900 mL 高糖型 DMEM 培养液,加入 100 mL 胎牛血清,加入青霉素至终浓度 200 IU/mL,链霉素至终浓度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,两性霉素 B 至终浓度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 充分混匀。4 °C 保存。

A.4 细胞维持液

100 mL DMEM 培养液加入胎牛血清 2 mL~4 mL,现配现用。

A.5 0.25%胰蛋白酶溶液

取胰酶(胰蛋白酶,Trypsin)0.25 g 加入无菌 PBS 缓冲液 100 mL 中,4 °C 低温、低速过夜搅拌溶解,用 0.22 μm 一次性滤器过滤分装,-20 °C 保存。也可采用等效的商品化试剂。

A.6 绵羊(山羊)睾丸或肾原代细胞制备

A.6.1 选择 2 月龄~4 月龄健康雄性绵羊(山羊),放血致死,无菌取睾丸或肾脏。

A.6.2 剥弃睾丸的被膜、内膜及附睾(剥弃肾脏的被膜及髓质部)后,将组织用剪刀剪成 1 mm²~2 mm² 小方块,用 DMEM 培养液漂洗 3 次,倒去液体。

A.6.3 按组织重量的 5 倍,加入 0.25%胰蛋白酶溶液,置于 37 °C 恒温水浴锅中消化 30 min~40 min,沉淀 1 min~2 min,弃去胰蛋白酶溶液,

A.6.4 用细胞维持液洗 2 次~3 次后,加入细胞培养液,振摇分散细胞,反复数次至达到所需细胞液体积,经 4 层纱布过滤后制成 1.0×10^6 个/mL~ 2.0×10^6 个/mL 的细胞悬液,备用。

附 录 B
(资料性)
核酸检测用引物、探针序列信息

B.1 RT-PCR 引物

表 B.1 列出了 RT-PCR 引物信息。

表 B.1 RT-PCR 引物信息表

引物名称	序列(5' - 3')	位置	产物大小	基因
PBD136F	TCGTGGTGAGATCCCTGAG	136-154	225 bp	5'UTR
PBD335R	GCAGAGATTTTATACTAGCCTATTC	335-360		

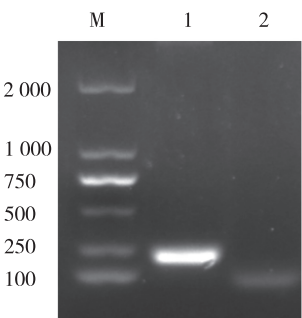
B.2 5'UTR 基因序列(1-372)

1 gtatacgggagtagctcatgcccgtatacaaaattggatattccaaaactcgattgggtt
61 agggagccctcctagcgacggccgaaccgtgttaaccatacacgtagtaggactagcaga
121 cgggaggactagccatcg**tggtgagatccctgag**cagtctaaatcctgagtacaggatag
181 tcgtcagtagttcaacgcaggcacggttctgccttgagatgctacgtggacgagggcatg
241 cccaagacttgctttaatctcggcgggggtcgccgaggtgaaaacacctaacggtgttgg
301 ggttacagcctgatagggtgctgcagaggcccac**gaataggctagtataaaaaatctctgc**
361 tgtacatggc ac

注:黑色加粗的为 RT-PCR 引物,标下划线的为实时荧光 RT-PCR 引物及探针。其中,136~154 位置既是 RT-PCR 上游引物的位置,也是实时荧光 RT-PCR 探针引物的位置。

B.3 RT-PCR 产物电泳图

RT-PCR 产物电泳图见图 B.1。



标引序号说明:
M——DL 2000 DNA Marker; 2——阴性。
1——阳性;

图 B.1 RT-PCR 产物电泳图

B.4 实时荧光 RT-PCR 引物和探针

表 B.4 列出了实时荧光 RT-PCR 引物和探针信息。

表 B.4 实时荧光 RT-PCR 引物和探针信息表

引物名称	序列 (5'-3')	位置	基因
BDV87F	CCGTGTTAACCATACACGTAGTAGGA	87-112	5'UTR
BDV237R	GCCCTCGTCCACGTAGCA	220-237	
BDV136TF	FAM-TCGTGGTGAGATCCCTGAG-TAMRA	136-154	

B.5 实时荧光 RT-PCR 扩增曲线示意图

实时荧光 RT-PCR 扩增曲线见图 B.2。

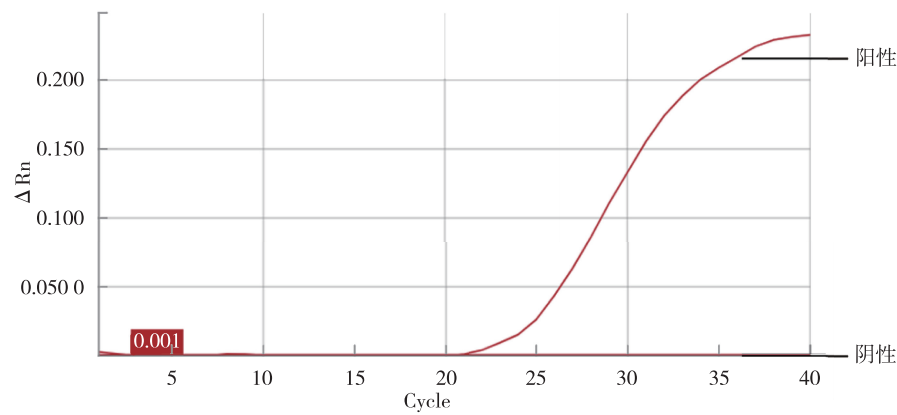


图 B.2 BDV 核酸实时荧光 RT-PCR 典型扩增曲线

附 录 C

(规范性)

核酸检测相关溶液的配制

C.1 50×TAE 储存液

取 242 g 的 Tris 碱、37.2 g 的 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、57.1 mL 的冰醋酸,加 800 mL 去离子水充分溶解,混匀后加去离子水定容至 1 000 mL。室温保存。

C.2 1×TAE 缓冲液

使用前将 50×TAE 做 50 倍稀释即可。

C.3 1.5%琼脂糖凝胶

称取 1.5 g 琼脂糖放入 100 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液中,加热融化,待温度降至 50 ℃~60 ℃时,加入 2.5 μL 溴化乙锭溶液或其他核酸染料,混匀后制备凝胶块。

附 录 D
(规范性)
病毒繁殖和毒价测定

D.1 病毒繁殖

按 8.4.1 方法制备绵羊(山羊)睾丸或肾原代细胞单层。将 BDV 接种绵羊(山羊)睾丸或肾原代细胞, 37℃ 吸附 1 h~2 h 后加入细胞培养液, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 120 h~168 h, 收获病毒培养物, 冻融 3 次后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取病毒上清液分装小瓶, 每瓶 1 mL, 置于 -70℃ 保存备用。

D.2 毒价测定

用 96 孔细胞培养板每孔加入细胞悬液 100 μ L, 将病毒上清液作 10¹~10⁶ 倍系列稀释, 每个稀释度作 6 孔, 每孔加入病毒悬液 100 μ L。同时, 每块板设 6 孔细胞对照, 每孔加入细胞悬液和细胞培养液各 100 μ L。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 从第 72 h 开始逐日观察记录 CPE, 无 CPE 的细胞在 120 h~168 h, 按 8.5.1 方法进行免疫荧光染色。根据 CPE 和免疫荧光染色结果, 按 Reed-Muench 方法计算出病毒液的 TCID₅₀。
