

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4742—2025

牛轮状病毒感染诊断技术

Diagnostic techniques for bovine rotavirus infection

2025-04-27 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



目 次

前言 II

引言 III

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 临床诊断 1

6 样品的采集、处理、运输和保存 2

7 病毒分离与鉴定 3

8 间接免疫荧光染色 4

9 RT-PCR 方法 5

10 实时荧光 RT-PCR 方法..... 6

11 病毒中和试验 7

12 间接 ELISA 抗体检测 8

13 综合判定 9

附录 A(规范性) 病毒分离鉴定及 RT-PCR 方法溶液配制 10

附录 B(资料性) 细胞病变及荧光染色示意图 11

附录 C(资料性) RT-PCR 方法引物序列及结果示意图..... 12

附录 D(资料性) 实时荧光 RT-PCR 方法相关资料..... 14

附录 E(资料性) 中和抗体效价测定结果计算方法 15

附录 F(资料性) 牛轮状病毒 VP6 蛋白的表达与纯化 16

附录 G(规范性) 酶联免疫吸附试验(ELISA)溶液配制 17

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：中国兽医药品监察所、中国动物卫生与流行病学中心、金宇保灵生物药品有限公司。

本文件主要起草人：吴华伟、陈晓春、樊晓旭、刘丹、赵丽霞、苏佳、薛青红、孙翔翔、秦义娴、孔冬妮、田莉莉、陈坚、高金源、孙森、刘蒙达、邓永、黄小洁、陈延飞、张皓博、王嘉、薛麒、赵炜、杨青春、陈建、侯力丹、焉鑫、李岭、王秉昆、高月异、翟天舒。



引 言

轮状病毒(rotavirus,RV)是一种双链 RNA 病毒,属于呼肠孤病毒科,是重要的人畜共患病原之一,可感染多种动物,常引起婴幼儿或幼龄动物的腹泻。牛轮状病毒(bovine rotavirus,BRV)于 1968 年被 Mebus 等首次发现并命名为新生牛犊腹泻病毒(neonatal calf diarrhea virus,NCDV),我国于 1980 年在福建首次发现。作为影响养牛业发展的最重要的腹泻类疾病之一,由 BRV 感染引起的犊牛腹泻已在全球养牛国家和地区广泛流行,且被证实主要由 A 群 RV 引起,其临床发病常以精神沉郁、厌食、水样腹泻、脱水和酸中毒为主要特征,并伴有细菌的继发感染,使临床症状进一步加重,病情恶化,死亡率显著上升,给养牛业造成了严重的经济损失。

目前,我国尚无牛轮状病毒感染诊断技术的相关标准和规范。本文件参考了有关文献,并结合国内外相关检测技术研究新成果,规定了间接免疫荧光染色、RT-PCR、实时荧光 RT-PCR 等病原学诊断方法及病毒中和试验、间接 ELISA 抗体检测等血清学诊断方法,适用于我国 A 群牛轮状病毒感染诊断的需求。

牛轮状病毒感染诊断技术

1 范围

本文件规定了牛轮状病毒感染的临床诊断、病原学诊断和血清学诊断方法的技术要求和操作规范。
本文件适用于牛轮状病毒感染的诊断、检测、监测以及流行病学调查。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

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。

BRI:牛轮状病毒感染(bovine rotavirus infection)

BRV:牛轮状病毒(bovine rotavirus)

CPE:致细胞病变效应(cytopathic effect)

DMEM:达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)培养基(Dulbecco's modified eagle medium)

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

FBS:胎牛血清(fetal bovine serum)

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

MA104:猴胚胎肾细胞(MA104 cells)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline)

PBST:吐温磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution with tween-20)

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

TCID₅₀:半数组织感染量(median tissue culture infective dose)

VNT:病毒中和试验(virus neutralization test)

5 临床诊断

5.1 流行病学

5.1.1 传染源

病牛和隐性带毒牛是最主要的传染源。病毒污染的饲料、土壤、垫草和饮水也可引起传播。

5.1.2 传播途径

主要通过粪-口途径传播。患牛排出的粪便中含有大量病毒,进入环境中可通过消化道和呼吸道感染健康牛群。

5.1.3 易感动物

所有品种、日龄和性别的牛均可感染,但多发生于1日龄~7日龄的犊牛,且感染后发病率较高,成年

牛多隐性耐过。

5.1.4 流行特点

一年四季均可发生,春季和秋季发病率更高,呈地方性流行。

5.2 临床症状

潜伏期 18 h~96 h。前期症状不明显,突然发病,精神沉郁,吃奶减少或废绝,体温正常或略偏高。典型症状是严重腹泻,粪便呈黄褐色或乳白色,黏稠或呈水样,有时粪便附有肠黏膜及血液,含有未消化凝乳块,肛门周围、后肢内侧及尾部常被粪便污染,排便次数不一,排便失禁,不断有稀粪从肛门流出。后期因严重腹泻导致机体严重脱水,眼睛凹陷,重症时皮肤干燥,被毛粗乱,四肢无力,卧地不起,心力衰竭和代谢性酸中毒而死亡。

5.3 病理变化

主要局限于消化道,特别是小肠的空肠和回肠部,肠壁变薄,呈半透明状。肠内容物稀薄,呈黄褐色、红色或灰褐色,一般无出血或充血,但有时小肠伴有广泛出血。小肠绒毛萎缩或脱落,肠系膜淋巴结显著肿大,胆囊呈现肿大增生现象。

5.4 结果判定

出现 5.2 部分或全部临床症状,或出现 5.3 剖检病理变化的发病牛,可判为 BRI 疑似病例。疑似病例需进一步采样进行实验室诊断。

6 样品的采集、处理、运输和保存

6.1 仪器设备

6.1.1 高速台式冷冻离心机。

6.1.2 涡旋混合振荡器。

6.1.3 研钵/组织匀浆器。

6.1.4 II 级生物安全柜。

6.2 试剂材料

6.2.1 PBS,按照附录 A 中 A.1 的规定配制。

6.2.2 含 1 000 U/mL 青霉素和链霉素的 DMEM 营养液。

6.2.3 含 200 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 营养液。

6.2.4 灭菌离心管(1.5 mL、2 mL、15 mL)、灭菌注射器或一次性采血管。

6.2.5 单道微量移液器及配套吸头(10 μ L~100 μ L、100 μ L~1 000 μ L、0.5 mL~5 mL、1 mL~10 mL)。

6.2.6 样品保存管(袋)、采样专用灭菌棉拭子、灭菌剪刀、镊子(含弯头)、0.22 μ m 滤器。

6.3 样品采集和处理

6.3.1 血清

无菌采集血液,将样品管放于室温,静置 1 h,再于 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 冰箱放置 1 h 或过夜,3 000 r/min 离心 5 min~10 min,吸取上层血清。用于 ELISA 抗体检测时可直接使用;用于中和抗体效价测定时,使用前需 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min。

6.3.2 组织样品

采集病死牛小肠或肠内容物样品 10 g~20 g,分别置于样品保存管(袋)中。如果样品需长途运输,加入含 50%甘油的 PBS,液面没过样品,加盖封口,编号备用。使用时,用无菌的剪刀和镊子剪取小肠等组织样品 2.0 g 于研钵或组织匀浆器中充分研磨,再加 10.0 mL 含 1 000 U/mL 青霉素和链霉素的 DMEM 营养液,混匀,5 000 r/min 离心 5 min 后,取 1.0 mL 上清液转入 1.5 mL 灭菌离心管中。用于核酸检测时直接使用;用于病毒分离时需将上清液经 0.22 μ m 滤器过滤后备用,或将已用含双抗的 DMEM 营养液处理的组织研磨液 10 000 r/min 离心 15 min 后取上清液直接使用。

6.3.3 粪便或肛拭子样品

挑取 5 g~10 g 的粪便标本加入 5.0 mL~10.0 mL 含 200 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 DMEM 营养液或采集肛拭子样品置于 1.5 mL~2.0 mL 含 200 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素的 DMEM 营养液中, 2℃~8℃ 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液待检。用于核酸检测时直接使用; 用于病毒分离时需将上清液经 0.22 μm 滤器过滤后备用, 或将已用含庆大霉素的 DMEM 营养液处理的粪便或肛拭子样品 10 000 r/min 离心 15 min 后取上清液直接使用。

6.4 样品运输和保存

样品采集后置于保温箱中, 加入预冷的冰袋, 密封。样品的保存和运输按照 NY/T 541 的规定执行, 尽可能 24 h 内送达实验室进行检测。采集或处理好的样品在 2℃~8℃ 条件下保存应不超过 24 h; 若需长期保存, 应置于 -70℃ 以下保存, 冻融不超过 3 次。

7 病毒分离与鉴定

7.1 仪器设备

- 7.1.1 显微镜。
- 7.1.2 高速台式冷冻离心机。
- 7.1.3 细胞计数仪。
- 7.1.4 恒温培养箱[(37 ± 2)℃]。
- 7.1.5 II 级生物安全柜。

7.2 试剂材料

- 7.2.1 PBS, 按照 A.1 的规定配制。
- 7.2.2 商品化 0.25% EDTA-胰酶和 0.25% 胰蛋白酶溶液, 按照 A.2 的规定配制。
- 7.2.3 细胞培养液, 按照 A.3 的规定配制。
- 7.2.4 细胞维持液, 按照 A.4 的规定配制。
- 7.2.5 MA104。
- 7.2.6 灭菌离心管(1.5 mL、15 mL、50 mL)。
- 7.2.7 细胞培养瓶(T25、T75)。
- 7.2.8 单道(多道)微量移液器及配套吸头(10 μL ~100 μL 、20 μL ~200 μL 、30 μL ~300 μL 、100 μL ~1 000 μL)。

7.3 制备单层细胞

将 MA104 传代细胞用 0.25% EDTA-胰酶消化液消化分散后, 再用细胞培养液将其浓度稀释为 1×10^6 个/mL~ 2×10^6 个/mL, 并将其分装至 25 cm^2 细胞培养瓶, 37℃ 培养箱中静置培养 72 h~96 h, 形成单层备用。

7.4 样品前处理

将处理好的样品加入终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ ~50 $\mu\text{g/mL}$ 的胰酶, 置于 37℃ 孵育 1 h~2 h。

7.5 接种细胞

取已长成良好单层的 MA104, 弃去细胞培养瓶中的培养液, 并用 PBS 洗涤 2 次。按最终细胞培养液体积的 5%~10% 接种上述前处理的样品, 37℃ 吸附 1 h~2 h, 弃去接种样品, 补加 DMEM 细胞维持液, 同时设立加有等量相同细胞维持液的正常细胞对照, 置于 37℃ 培养 96 h~144 h, 每天观察并记录。

7.6 观察和记录

如对照细胞单层完好、细胞形态正常, 接种样品的细胞如出现 CPE(见附录 B 中的 B.1), 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 96 h~144 h 取出, 并置于 -70℃ 以下冻存备用。

7.7 盲传

将第一代无 CPE 的细胞培养物冻融 3 次后混合,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液按 7.5、7.6 接种细胞并进行观察、记录和收毒,盲传第二代。此过程中培养物仍无 CPE 则按同样的方法继续盲传第三代,培养结束后无论是否出现 CPE 均收毒,置-70℃以下冻存备用。

7.8 病毒鉴定

7.6 或 7.7 分离培养物按第 8 章进行间接免疫荧光染色,结果为阳性者判定为病毒分离阳性。

8 间接免疫荧光染色

8.1 仪器设备

8.1.1 倒置荧光显微镜。

8.1.2 CO₂恒温培养箱[(37±2)℃]。

8.1.3 II 级生物安全柜。

8.1.4 其他仪器设备同 7.1。

8.2 试验材料

8.2.1 80%冷丙酮或其他固定液(如甲醇、4%多聚甲醛)。

8.2.2 病毒对照(BRV 参考毒株 CVCC AV51、CVCC AV52 或其他分离毒株)。

8.2.3 商品化 BRV 单克隆抗体(或单克隆抗体 BRV-3 株或 BRV-10 株)以及 FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体,使用前稀释至推荐工作浓度。

8.2.4 其他试验材料同 7.2。

8.3 试验步骤

8.3.1 按 7.3 方法制备浓度为 1×10^6 个/mL~ 2×10^6 个/mL 的 MA104 悬液,分装于 96 孔细胞板中,0.1 mL/孔,将细胞板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h~96 h。

8.3.2 将 7.6 或 7.7 的样品冻融 3 次后混合,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液按照 7.4 进行前处理后接种于长成良好 MA104 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,并用 PBS 洗涤 2 次),0.1 mL/孔,每个样品接种 4 孔,同时设立病毒对照 4 孔(20 TCID₅₀/孔~200 TCID₅₀/孔)及正常细胞对照 4 孔。

8.3.3 接种后细胞板置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中吸附 1 h~2 h,弃去接种样品,每孔补加 0.1 mL 细胞维持液,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 96 h~144 h,其间显微镜下观察每一个孔是否出现 CPE。

8.3.4 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%冷丙酮或其他固定液(如甲醇、4%多聚甲醛),0.1 mL/孔,2℃~8℃固定 30 min~60 min。

8.3.5 弃去孔中固定液,室温自然晾干。每孔分别加入 BRV 单克隆抗体工作液 50 μL,37℃孵育 45 min~60 min;PBS 洗涤 3 次,再每孔加入 FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体工作液 50 μL,37℃孵育 45 min~60 min。

8.3.6 PBS 洗涤 3 次后,弃去孔中液体,在倒置荧光显微镜下观察各细胞孔中的荧光情况。

8.4 结果观察与记录

被 BRV 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(见 B.2),未感染细胞无荧光。染色后,应立即在蓝色激发光下观察并及时记录,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 试验成立条件

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

8.6 结果判定

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

9 RT-PCR 方法

9.1 仪器设备

9.1.1 高速台式冷冻离心机。

9.1.2 PCR 仪。

9.1.3 电泳仪。

9.1.4 凝胶成像仪。

9.1.5 涡旋混合振荡器。

9.1.6 II 级生物安全柜。

9.2 试剂材料

9.2.1 Trizol 裂解法抽提试剂或具有同等效力的 RNA 抽提试剂盒。

9.2.2 商品化一步法 RT-PCR 试剂盒或具有同等效力的试剂盒。

9.2.3 DEPC 水,按照 A.5 的规定配制。

9.2.4 电泳缓冲液,按照 A.6 的规定配制。

9.2.5 1.0%的琼脂糖凝胶,按照 A.7 的规定配制。

9.2.6 上游引物和下游引物,见附录 C 中的 C.1。

9.2.7 阳性对照:将 BRV 的细胞培养物置于 56 °C 水浴灭活 60 min,−20 °C 保存备用。

9.2.8 阴性对照:MA104 培养液上清或已知 BRV 阴性的动物组织悬液,−20 °C 保存备用。

9.2.9 无核酸酶离心管(1.5 mL)和 PCR 反应管(0.2 mL)。

9.2.10 单道微量移液器及配套无核酸酶带滤芯吸头(1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)。

9.3 操作程序

9.3.1 病毒核酸提取

可使用商品化病毒 RNA 提取试剂盒,或使用 Trizol 法按如下操作:

- 取 200 μL 待检样品、阴性对照和阳性对照,分别加入 1 mL Trizol 试剂,涡旋振荡 30 s,室温(15 °C~25 °C,下同)放置 5 min;
- 加入 200 μL 三氯甲烷,涡旋振荡 30 s,室温放置 15 min;12 000 r/min 离心 15 min;
- 取上层水相至一新的离心管中,加等体积异丙醇,上下颠倒数次混匀,−20 °C 放置 20 min;
- 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 1 mL 75%乙醇清洗沉淀;10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀室温干燥 5 min;
- 加 50 μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀,RNA 溶液应立即使用或−20 °C 冰箱保存备用,避免反复冻融。

9.3.2 反应体系配制

采用商品化一步法 RT-PCR 试剂盒配制 25 μL 反应体系:

- 12.5 μL 的 2×一步法 RT-PCR 反应缓冲液;
- 1.0 μL 的上游引物(10 μmol/L);
- 1.0 μL 的下游引物(10 μmol/L);
- 0.5 μL 的酶混合物;

- e) 3.0 μL 模板;
- f) 7.0 μL 的 DEPC 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

45 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

9.3.4 电泳

用 1.0% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳。将 8 μL PCR 产物和 2 μL 电泳加样缓冲液混匀后加入凝胶孔中进行电泳,并设立 DNA 标准分子量 100 bp~2 000 bp Marker 作对照。5 V/cm~8 V/cm 电泳 30 min 左右,以溴酚蓝接近凝胶块底部为准,停止电泳。电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪中观察结果。

9.3.5 试验成立条件

阳性对照出现大小约 1 014 bp 的条带,阴性对照不出现任何条带,试验成立。

9.4 结果判定

被检测样品出现 1 014 bp 大小的特异性的扩增条带,则判为 BRV 核酸阳性;被检样品无特异性的扩增条带,则判为 BRV 核酸阴性。必要时,可切胶回收测序或直接送 PCR 产物进行测序。RT-PCR 产物电泳示意图和参考序列见 C.2 和 C.3。

10 实时荧光 RT-PCR 方法

10.1 仪器设备

10.1.1 荧光定量 PCR 仪。

10.1.2 其他仪器设备同 9.1。

10.2 试验材料

10.2.1 BRV 实时荧光 RT-PCR 检测引物、探针序列,见附录 D 中的 D.1。

10.2.2 商品化一步法 RT-qPCR Mix 试剂盒或具有同等效力的试剂盒。

10.2.3 其他试验材料同 9.2。

10.3 操作程序

10.3.1 病毒核酸提取

同 9.3.1。

10.3.2 反应体系配制

用商品化一步法 RT-qPCR Mix 试剂盒配制 25 μL 反应体系:

- a) 12.5 μL 的 2 $\times$ 一步法 RT- qPCR 混合物(含酶混合物);
- b) 0.8 μL 的上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$);
- c) 0.8 μL 的下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$);
- d) 1.0 μL 的探针(10 $\mu\text{mol/L}$);
- e) 2.0 μL 的模板;
- f) 7.9 μL 的 DEPC 水。

盖紧反应管盖或反应板封膜,振荡混匀后瞬时离心。每次检测时应设置阴性对照和阳性对照。

注:反应体系可依据所用试剂盒的不同而适当改变。

10.3.3 反应程序

将 10.3.2 加样后的反应管/板放入荧光定量 PCR 仪内,记录样品摆放顺序。选定 FAM 作为报告基团,MGB 作为荧光淬灭基团。反应参数设置如下:52 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s,40 个循环,在每一个循环的 60 $^{\circ}\text{C}$ 时收集 FAM 荧光信号。试验结束后,根据收集的

荧光曲线和 C_t 值判定结果。

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

阳性对照的 C_t 值应 ≤ 30.0 且出现特异性扩增曲线,阴性对照无 C_t 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 C_t 值或无特异性扩增曲线,判为 BRV 核酸阴性;被检样品 C_t 值 ≤ 36.0 且出现特异性扩增曲线,判定为 BRV 核酸阳性;被检样品 C_t 值 > 36.0 且出现特异性扩增曲线,需复检。复检 C_t 值若 > 36.0 且出现特异性扩增曲线,判定为 BRV 核酸阳性;若无特异性扩增曲线,则判为 BRV 核酸阴性。实时荧光 RT-PCR 扩增曲线示意图见 D.2。

11 病毒中和试验

11.1 仪器设备

同 7.1。

11.2 试验材料

11.2.1 中和试验牛轮状病毒阳性血清(中和抗体效价不低于 $1:1024$)、中和试验阴性血清(中和抗体效价低于 $1:8$),使用前均需要 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min 。

11.2.2 其他试验材料同 7.2。

11.3 操作程序

11.3.1 定量测定

11.3.1.1 按 7.3 制备病毒中和试验用细胞培养板。

11.3.1.2 将 BRV 参考毒株或其他毒株按照 7.4 进行预处理,然后用细胞维持液稀释成 $200\text{ TCID}_{50}/0.1\text{ mL}$,作为中和病毒工作液。

11.3.1.3 用多道移液器于 96 孔空白细胞板(样品稀释用)中加入细胞维持液, $60\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$,用单道移液器将待检血清加入第一列孔中,每份血清加 4 孔, $60\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$ 。用多道移液器(调至 $60\text{ }\mu\text{L}$)从第一列孔开始连续作倍比稀释,直至最后一个孔,并从最后一孔中弃去 $60\text{ }\mu\text{L}$ 稀释液。

11.3.1.4 用多道移液器从细胞板的第二列开始每孔加入 $60\text{ }\mu\text{L}$ BRV 中和病毒工作液,第一列加 $60\text{ }\mu\text{L}$ 细胞维持液作为被检血清毒性对照,同时设 $1:8$ 稀释的 BRV 阳性血清对照、 $1:4$ 稀释的 BRV 阴性血清对照和正常细胞对照各 4 孔及 BRV 中和病毒液回归对照 $10^0 \sim 10^{-3}$ 的 4 个稀释度,每个稀释度各 4 孔。然后,将样品稀释细胞板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中孵育 $1\text{ h} \sim 2\text{ h}$ 。

11.3.1.5 将 11.3.1.1 制备的已长成良好紧密细胞单层的细胞板弃去培养液,然后每孔加入 PBS $200\text{ }\mu\text{L}$,洗涤 2 遍后弃去 PBS,然后将 11.3.1.4 各样品转移到该细胞培养板相对应的孔中, $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 $96\text{ h} \sim 144\text{ h}$ 。通过 CPE 或间接免疫荧光染色(见第 8 章)判定各孔感染情况。采用 Reed-Muench 法计算血清中和抗体效价(见附录 E)。

11.3.2 定性测定

操作方法同 11.3.1,但被检血清稀释时只做 $1:8$ 稀释度($10\text{ }\mu\text{L}$ 被检血清样品 + $70\text{ }\mu\text{L}$ 细胞维持液)。

11.3.3 双份血清测定

11.3.3.1 双份被检血清取自同一动物,间隔 21 d 。

11.3.3.2 试验操作方法同 11.3.1。

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 $30\text{ TCID}_{50}/50\text{ }\mu\text{L} \sim 300\text{ TCID}_{50}/50\text{ }\mu\text{L}$ 范围之内,阳性血清对照孔不出现 CPE 或荧光染色阴性,阴性对照血清出现 CPE 或间接免疫荧光染色

(见第 8 章)阳性,试验成立。

11.5 结果判定

11.5.1 定量测定时,被检血清中和抗体效价不低于 1:8 时,判该血清为 BRV 抗体阳性。

11.5.2 定性测定时,被检血清在 1:8 稀释时有 2 个或 2 个以上孔未出现 CPE 或荧光染色为阴性,判该血清为 BRV 抗体阳性。

11.5.3 双份血清测定时,当间隔 21 d 的第二份血清的抗体效价高于第一份血清 4 倍或 4 倍以上,则证明该动物正在发病过程中。

12 间接 ELISA 抗体检测

12.1 仪器设备

12.1.1 酶标仪。

12.1.2 恒温培养箱[(37 ± 2)℃]。

12.1.3 单道(或多道)微量移液器及配套吸头(10 μL、100 μL、200 μL、300 μL、1 000 μL、10 mL)。

12.2 试验材料

12.2.1 包被抗原(表达纯化的 BRV VP6 蛋白),见附录 F。

12.2.2 包被液,按照附录 G 中 G.1 的规定配制。

12.2.3 洗涤液/样品稀释液/酶标抗体稀释液,按照 G.2 的规定配制。

12.2.4 封闭液,按照 G.3 的规定配制。

12.2.5 底物显色液,按照 G.4 的规定配制。

12.2.6 终止液,按照 G.5 的规定配制。

12.2.7 酶标抗体:商品化抗牛 IgG HRP 酶标抗体,使用前用样品稀释液稀释至工作浓度。

12.2.8 酶标板和血清稀释板(96 孔)。

12.3 操作程序

12.3.1 包被抗原:将包被抗原用包被液稀释至 1 μg/mL,每孔 50 μL,包被酶标板,封口后,37 °C 孵育 2 h 或 2 °C ~ 8 °C 孵育 12 h。

12.3.2 洗涤:弃去孔内液体,每个反应孔加入约 250 μL 的洗涤液进行洗涤,洗涤 5 次,最后一次在洁净的吸水纸上将酶标板拍干。

12.3.3 封闭:每孔加入封闭液 250 μL,置于 37 °C 培养箱中封闭 1 h。重复步骤 12.3.2。拍干后可密封置于 -20 °C 保存。

12.3.4 加样品:将待检血清用样品稀释液先做 25 倍稀释(4 μL 待检血清 + 96 μL 样品稀释液),然后再连续作 2 倍系列稀释至 1:200,每份样品加 2 孔,每孔 50 μL。同时加入阴性对照血清和阳性对照血清(已稀释至工作浓度,直接使用)各 2 孔,每孔 50 μL。置于 37 °C 培养箱中反应 1 h。重复步骤 12.3.2。

12.3.5 加酶标抗体:加入工作浓度的抗牛 IgG HRP 酶标抗体,每孔加入 50 μL,置于 37 °C 恒温培养箱中反应 1 h。重复步骤 12.3.2。

12.3.6 加底物:每孔加入 100 μL 底物显色液,轻柔摇匀,37 °C 避光显色 10 min ~ 15 min。

12.3.7 加终止液:每孔加入 50 μL 终止液终止反应。

12.3.8 读数:加终止液后 15 min 内在酶标仪上读取 450 nm 吸光值($OD_{450\text{ nm}}$)。

12.3.9 计算阳性对照平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值($\bar{P}$)、阴性对照平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值($\bar{N}$)和各待检血清平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值($\bar{S}$)。

12.4 试验成立条件

阳性对照平均 OD_{450} 值($\bar{P}$)应不低于 0.6 且不高于 2.0($0.6 \leq \bar{P} \leq 2.0$),阴性对照平均 OD_{450} 值($\bar{N}$)应不高于 0.28($\bar{N} \leq 0.28$),试验成立。

12.5 结果判定

当被检样品孔平均 OD₄₅₀ 值($\bar{S}$)和阴性对照孔平均 OD₄₅₀ 值($\bar{N}$)之比大于或等于 2.1(即 $\bar{S}/\bar{N} \geq 2.1$)时,判为 BRV 抗体阳性;当被检样品孔平均 OD₄₅₀ 值($\bar{S}$)和阴性对照孔平均 OD₄₅₀ 值($\bar{N}$)之比小于 2.1(即 $\bar{S}/\bar{N} < 2.1$)时,判为 BRV 抗体阴性。

13 综合判定

13.1 根据 5.4 临床诊断判定为 BRI 疑似病例,同时经第 8 章、第 9 章、第 10 章任一方法检测为 BRV 阳性者,判为 BRI 确诊病例。

13.2 无明显临床症状的动物,经第 8 章、第 9 章、第 10 章任一方法检测为 BRV 阳性者,判为 BRV 隐性感染。

13.3 经第 11 章、第 12 章任一方法检测为 BRV 抗体阳性,若第 8 章、第 9 章、第 10 章任一方法检测判定为阳性者,判为 BRI 确诊病例;若第 8 章、第 9 章、第 10 章任一方法检测为阴性,则判为曾经感染过 BRV。

13.4 经第 8 章、第 9 章、第 10 章任一方法检测为 BRV 阴性,且经第 11 章、第 12 章任一方法检测抗体也为阴性,则判为 BRI 阴性。

附录 A

(规范性)

病毒分离鉴定及 RT-PCR 方法溶液配制

A.1 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2)

首先配制 A 液(0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液),即取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g,加纯化水溶解,最后定容至 1 000 mL;再配制 B 液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液),即取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g,加纯化水溶解,最后定容至 1 000 mL;最后取 A 液 14 mL 和 B 液 36 mL,加 NaCl 8.5 g,用纯化水定容至 1 000 mL。经过滤除菌后,备用。

A.2 0.25%胰蛋白酶溶液

取胰蛋白酶(1:250)0.25 g 加入 100 mL PBS(A.1)中,充分溶解后,0.22 μm 过滤器过滤除菌,分装成 1.0 mL/管,−20 °C 保存备用。也可采用商品化 0.25%胰蛋白酶溶液(不含 EDTA)。

A.3 细胞培养液

取商品化 DMEM 培养液 450 mL,加入胎牛血清(无 BVDV、BRV 及其抗体,或马血清)50 mL,现用现配。

A.4 细胞维持液(含终浓度 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ~2.5 $\mu\text{g/mL}$ 胰蛋白酶)

取商品化 DMEM 培养液 500 mL,加入 0.25%胰蛋白酶溶液 0.1 mL~0.5 mL,现用现配。

A.5 DEPC 水

将 DEPC 加入纯化水中至终浓度为 0.1%(V/V),充分混合均匀后作用 12 h,分装,(121±2)°C 高压灭菌 30 min,冷却后冷藏备用。

A.6 电泳缓冲液

配制 50×TAE 电泳缓冲液所需试剂如下:

- a) 242 g 三羟甲基氨基甲烷;
- b) 57.1 mL 冰乙酸;
- c) 100 mL 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(pH 8.0)。

将上述试剂在 800 mL 纯化水中搅拌溶解,再用纯化水定容至 1 000 mL,室温保存。

取 20 mL 上述 50×TAE 加入 980 mL 纯化水中,配制成 1×TAE 电泳缓冲液,室温保存。

A.7 1.0%的琼脂糖凝胶

取 1×TAE 电泳缓冲液 100 mL 加入锥形瓶中,再加入琼脂糖 1.0 g,封上保鲜膜,在微波炉中加热至琼脂糖完全熔化。冷却至 60 °C 左右,加入溴化乙锭(终浓度 0.5 $\mu\text{g/mL}$)或其他商品化溴化乙锭替代物,混合均匀后将琼脂糖溶液倒入制胶模中,待凝固后备用。

附 录 B
(资料性)
细胞病变及荧光染色示意图

B.1 牛轮状病毒感染 MA104 CPE 示意图

BRV 感染 MA104 72h CPE 如图 B.1 所示。

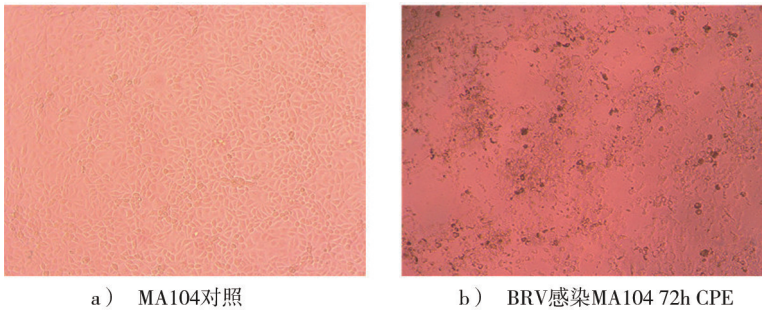


图 B.1 BRV 感染 MA104 CPE(72 h)示意图

B.2 间接免疫荧光染色示意图

间接免疫荧光染色示意图如 B.2 所示。

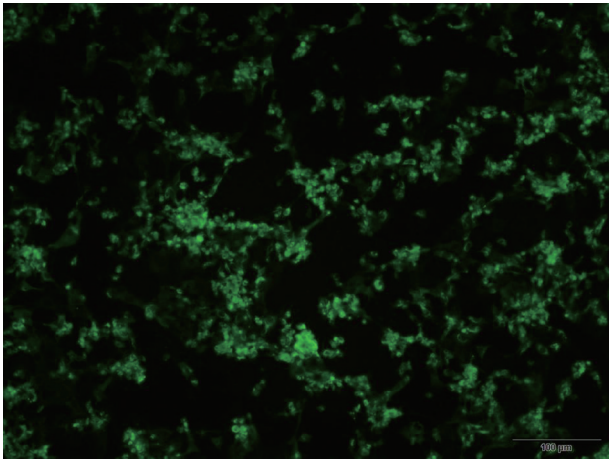


图 B.2 间接免疫荧光染色示意图

附 录 C
(资料性)

RT-PCR 方法引物序列及结果示意图

C.1 RT-PCR 扩增引物

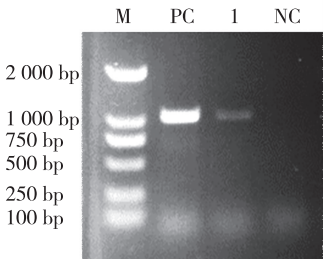
RT-PCR 方法所用的引物序列见表 C.1。

表 C.1 RT-PCR 扩增引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段大小	靶基因
上游引物	ATGTATGGTATTGAATATACCACA	1 014 bp	VP7
下游引物	GGTCACATCATACAATTCTAATCTA		
注 1:引物可由生物公司合成,纯度为 HPLC 级,用 DEPC 水溶解并稀释至终浓度 10 μmol/L, -20 ℃ 保存备用。			
注 2:引物是根据 GenBank 公布的牛轮状病毒(NCBI 登陆号:MN928494.1)VP7 基因全长序列设计。			

C.2 RT-PCR 产物电泳示意图

RT-PCR 产物电泳示意图见图 C.1。



标引序号说明:
M——DNA 分子量标准(2 000 bp DNA Ladder Marker);
PC——阳性对照;
NC——阴性对照;
1——粪便样品。

图 C.1 RT-PCR 产物电泳示意图

C.3 VP7 基因特异性扩增序列

ATGTATGGTATTGAATATACCACAATTCTAATCTTCTTGATATCGATTACATTGTTAAAT
TTACATATTGAAATCAATAACAAGAATAATGGACTACATAATCTACAGGTTTTTATTCATG
GTAGTGATACTGGCCGAGTAACAAATGCGCAGAACTATGGAGTTAATTTGCCAATAACTGG
GTCGATGGATACTACGTATGCAAACCTCTACACAAAATGAATCGTTTTTAACATCGACTTTGT
GTTTGTATTATCCAATTGAGGCATCAAATGAAATAGCTGATACCGAATGGAAAAATACACT
GTCGCAACTGTTTCTGACTAAAGGGTGGCCAACCTGGATCCGTATATTTTAAGGAGTACGCTG
ATATAGCGGCTTTTTTCAGTGGACCCTCAATTATATTGTGATTATAATTTGGTTTTTAATGAAA
TATGATTCAACATTAGAATTGGATATGTCTGAGTTAGCGGATCTTATATTGAATGAATGGC
TATGCAATCCAATGGATATAACGTTGTACTACTATCAGCAAACCTGATGAAGCAAACAAATG
GATATCAATGGGTTCGTCTTGACGGTAAAGTATGTCCATTAAACACACAGACACTTGGTA
TTGGATGCCTAACAACTGACCCAAATACGTTTGAGACGGTTGCGACAACTGAAAACTAGTA
ATTACTGACGTTGTAGATGGTGTTAATCACAAGTTAGATGTTACAACAACAACCTTGTA

TACGCAACTGTAAAAAATTAGGACCGAGAGAAAATGTAGCGGTTATACAGGTAGGTGGCGC
AAACATTTTAGACATTACTGCTGATCCGACAACCTCAAACAGAGAGAATGATGCGAG
TGAATTGGAAAAAATGGTGGCAGGTATTTTATACGGTTGTAGATTACGTTAACCAGATAATT
CAAGCAATGTCCAAGAGATCTAGGTCGTTAAATTCATCAGCGTTCTATTACAGAGTGTAGAT
ACATATTAGATTAGAATTGTATGATGTGACC(1 014 bp)

注：该序列为 GenBank 公布的牛轮状病毒(NCBI 登陆号：MN928494.1)VP7 基因序列，不同 G 血清型甚至同一 G 血清型不同分离毒株的 VP7 基因序列可能存在差异；下划线为引物匹配位置。

附 录 D
(资料性)

实时荧光 RT-PCR 方法相关资料

D.1 实时荧光 RT-PCR 引物和探针

实时荧光 RT-PCR 方法所用的引物和探针序列见表 D.1。

表 D.1 引物探针序列

引物/探针名称	引物序列(5'-3')	位置	靶基因
上游引物	ACCATCTACACATGACCCTC	963~982	NSP3
下游引物	GGTCACATAACGCCCC	1 034~1 049	
探针	FAM-ATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAA-MGB	984~1 016	
注 1:引物和探针可由生物公司合成,纯度为 HPLC 级,用 DEPC 水溶解并稀释至终浓度 10 μmol/L,—20 ℃ 保存。			
注 2:引物探针是根据已发布的牛轮状病毒株(NCBI 登陆号:KX655536.1)NSP3 序列进行设计。			

D.2 实时荧光 RT-PCR 扩增曲线

实时荧光 RT-PCR 扩增曲线示意图见图 D.1。

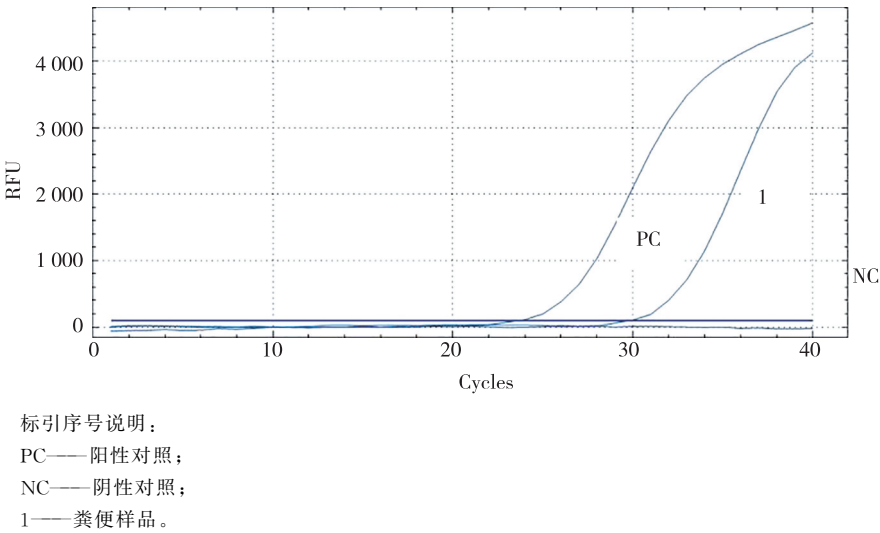


图 D.1 实时荧光 RT-PCR 扩增曲线示意图

D.3 NSP3 基因特异性扩增序列

ACCATCTACACATGACCCTCT**ATAAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAAAAACC**
TAAATGGCTATAGGGGCGTTATGTGACC(87 bp)

注:下划线为引物匹配位置,黑体为探针匹配位置。

附 录 E
(资料性)
中和抗体效价测定结果计算方法

中和效价按照 Reed-Muench 法进行计算,示例见表 E. 1。

表 E. 1 中和抗体效价测定结果示例

血清稀释度 (病毒定量)	细胞病变孔比例 (CPE)	细胞病变孔数	无细胞病变孔数	累计结果		
				细胞 病变孔数	无细胞 病变孔数	细胞病变率 CPE, %
1 : 4($10^{-0.60}$)	0/4	0	4	0	9	0
1 : 16($10^{-1.20}$)	1/4	1	3	1	5	17
1 : 64($10^{-1.81}$)	2/4	2	2	3	2	60
1 : 256($10^{-2.41}$)	4/4	4	0	7	0	100
1 : 1 024($10^{-3.01}$)	4/4	4	0	11	0	100

从表 E. 1 可见,半数保护数(PD₅₀)在 $10^{-1.20} \sim 10^{-1.81}$,按 Reed-Muench 法计算距离比例,即:

$$\text{距离比例} = \frac{50\% - \text{低于 } 50\% \text{ 的 CPE 百分率}}{\text{高于 } 50\% \text{ 的 CPE 百分率} - \text{低于 } 50\% \text{ 的 CPE 百分率}} = \frac{50 - 17}{60 - 17} = 0.77$$

$$\begin{aligned} \text{PD}_{50} &= \text{低于 } 50\% \text{ 死亡(CPE)百分率的血清稀释度的对数} + \text{距离比例} \times \text{稀释系数的对数} \\ &= -1.20 + 0.77 \times \lg 1/4 = -1.20 + 0.77 \times (-0.6) = -1.20 - 0.46 = -1.66 \end{aligned}$$

查 -1.66 的反对数 = 0.0218(1 : 45.9)

附 录 F

(资料性)

牛轮状病毒 VP6 蛋白的表达与纯化

F.1 材料和试剂

牛轮状病毒;pTT5 哺乳动物表达载体;质粒提取试剂盒、限制性内切酶、镍离子亲和层析柱、Expi293 细胞、转染试剂均为商品化试剂,PBS 缓冲液。

F.2 牛轮状病毒 VP6 氨基酸参考序列

MDVLYSLSKTLKDARDKIVEGTLYSNVSDLIQQFNQMIITMNGNEFQTGGIGNLPIRNWNFD
FGLLGTTLLNLDANYVETARNTIDYFVDFVDNVCMDVMRESQRNGIAPQSDSLRKLSGIKFKRI
NFDNSSEYIENWNLQNRRTGTGTFHKNIPYASFTLNRSQPAHDNLMGTMWLNAGSEIQVA
GFDYSCAINAPANTQQFEHIVQLRRVLTATITLLPDAERFSFPRVIISADGATTWYFNPVILRPN
NVEVEFLLNGQIINTYQARFGTIVARNFDITRLSFQLMRPPNMTPAVAALFPNAQPFEHHATVG
LTLRIESAVCESVLADARETMLANVTSVRQEYAIIPVGPVFPFGMNWTDLITNYSRSDNLQRVF
TVASIRSMLVK

F.3 方法

F.3.1 VP6 蛋白哺乳动物表达载体的构建

根据 VP6 基因序列(Genbank 登录号 AFA41729.1),经密码子优化后进行基因合成(1 191 bp),在其两端分别引入 Xba I 和 Hind III 酶切位点。将载体 pTT5 用 Xba I 和 Hind III 双酶切,经 PCR 产物纯化后,将 VP6 基因片段连接至 pTT5 表达载体,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,筛选获得阳性重组载体命名为 pTT5-VP6。

F.3.2 VP6 蛋白的表达与纯化

复苏 Expi293 细胞,培养于 Free-Style 293 培养基中,将细胞转入 6 孔板中。当细胞整合度达 60% 时,取纯化的重组质粒 pTT5-VP6,按 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书转染至 Expi293 细胞。转染后 48 h 收集细胞,加入蛋白裂解液,经离心后取上清液,按照镍离子亲和层析柱的说明书纯化 VP6 蛋白,目的蛋白大小约为 47 ku。

F.3.3 重组蛋白纯度及浓度测定

分别取 5 μ L、2.5 μ L 和 1 μ L 纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,用凝胶成像仪成像并用薄层扫描法测定蛋白纯度,蛋白纯度应不少于 90%,同时利用 BCA 法测定蛋白浓度,纯化后蛋白浓度应不小于 1.0 mg/mL。

附 录 G

(规范性)

酶联免疫吸附试验(ELISA)溶液配制

G.1 包被液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)

取碳酸钠(Na_2CO_3 , 分析纯)1.59 g、碳酸氢钠(NaHCO_3 , 分析纯)2.93 g, 加纯化水至 1 000 mL, 充分溶解后, 调节 pH 至 9.6, 2℃~8℃ 保存备用。

G.2 洗涤液/血清稀释液/酶标抗体稀释液(PBST)

取吐温-20 0.5 mL 加入 1 000 mL PBS(A.1)中。用于酶标板洗涤或封闭液配制时直接使用; 用于 ELISA 血清样品稀释和酶标抗体稀释时需经过滤除菌, 现用现配。

G.3 封闭液(0.3%大豆蛋白)

取大豆蛋白 3.0 g 加入 100 mL PBST(G.2)中, 现用现配。

G.4 底物显色液(TMB-过氧化氢尿素溶液)

底物液 A: 取 TMB(分析纯)200 mg、无水乙醇或 DMSO 100 mL, 加纯化水至 1 000 mL, 充分溶解。

底物缓冲液 B: 取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 分析纯)71.7 g、柠檬酸(分析纯)9.33 g、0.75% 过氧化氢尿素 6.4 mL, 加纯化水至 1 000 mL, 充分溶解, pH 调至 5.0~8.0。

将底物 A 液和底物缓冲液按 1:1 混合, 即成底物显色液, 现用现配。

G.5 终止液(2 mol/L 硫酸溶液)

取硫酸(分析纯)58 mL、纯化水 442 mL, 混合后室温保存。
