



中华人民共和国国家标准

GB/T 27982—2011

小反刍兽疫诊断技术

Diagnostic techniques for peste des petits ruminants

2011-12-30 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:农业部热带亚热带动物病毒学重点实验室、中国动物卫生与流行病学中心、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:包静月、吴晓东、王志亮、李林、刘春菊、王清华、赵文姬、邹艳丽、郑东霞、徐天刚、李金明、姚李四、张乐、林祥梅、吴绍强、韩雪清。



小反刍兽疫诊断技术

1 范围

本标准规定了小反刍兽疫的临床诊断和实验室诊断的技术要求。
本标准适用于小反刍兽疫的诊断。

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 19489—2008 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

荧光定量反转录-聚合酶链式反应 **real time quantitative reverse transcription polimerase chain reaction**

荧光定量 RT-PCR 反应

在 RT-PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 RT-PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

3.2

荧光域值 **threshold**

荧光定量 RT-PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,荧光域值的缺省设置是 3 个~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。

3.3

Ct 值 **Ct value**

每个反应管内的荧光信号到达设定的荧光域值时所经历的循环数。

4 生物安全措施

进行小反刍兽疫实验室检测时,如病毒分离、血清处理等,按照 GB 19489—2008。

5 临床诊断

5.1 临床症状

5.1.1 突然发热,第 2 天~第 3 天体温达 40℃~42℃ 高峰。发热持续 3 d 左右,病羊死亡多集中在发热后期。

5.1.2 眼、鼻大量排出分泌物,最初水样的眼、鼻分泌物日益增多,变成脓性然后结干,动物发出恶臭。由于鼻孔被凸起的结干的鳞屑覆盖,动物打喷嚏和咳嗽。呼吸急促,呼吸困难,排痰性咳嗽和眼睛的卡他性分泌物。

5.1.3 口腔粘膜充血,口腔上皮和鼻腔粘膜出现大量部分粘连的极微小的略灰色坏死点,坏死组织脱落后形成界线分明的浅糜烂斑。上皮破损偏好部位为嘴唇、齿龈、牙板、舌头以及母羊阴户的阴唇表面。口腔破损可能伴有大量流涎。

5.1.4 发热 2 d~3 d 后病畜开始腹泻,伴随严重脱水、消瘦、虚脱。怀孕母羊可发生流产。

5.1.5 特急性病例在发热开始的 4 d~6 d 内死亡。亚临床型病例症状较轻,病畜在生病 10 d~14 d 以后康复。

5.2 病理变化

5.2.1 嘴唇充血,口腔破损程度不等,较轻的只有一处溃疡,严重的出现广泛的溃疡性及坏死性口腔炎,涉及牙板、硬腭、颊粘膜和乳突和舌头喙部背面。粘膜病变可延伸至咽部,偶尔在网胃和瘤胃交界处。

5.2.2 上呼吸道粘膜可能严重充血,伴有鼻孔和气管的溃疡。支气管肺炎,肺尖肺炎。

5.2.3 皱胃粘膜出现严重的充血和溃烂。偶尔,整个肠道出现弥散性的充血,但是,多数情况仅局限于十二指肠、回肠、盲肠和结肠上部分。常见回盲肠瓣膜出血。大肠纵向折叠顶部偶尔出现严重的出血形成斑马样条纹。

5.2.4 肠淋巴组织坏死、萎缩。肠系膜淋巴组织轻微肿大、水肿,脾可能肿胀。上呼吸道粘膜可能严重充血,伴有鼻孔和气管的溃疡。支气管肺炎,肺尖肺炎。肺部淋巴结肿胀并水肿。

5.2.5 结膜出现脓性结膜炎。肾和膀胱可见充血。母羊可见阴户和阴道糜烂。

5.2.6 组织学上可见肺部组织出现多核巨细胞以及细胞内嗜酸性包含体。

5.3 结果判定

山羊或绵羊出现上述临床症状和病理变化,羊群发病率、病死率较高,传播迅速,可判定为疑似小反刍兽疫。

6 实验室诊断

6.1 样品采集与运输

6.1.1 样品的采集



6.1.1.1 每个发病羊群最少选择 5 只病畜采集样品。

6.1.1.2 选择处于发热期(体温 40℃~41℃)、排出水样眼分泌物、出现口腔溃疡、无腹泻症状的活畜采集样品。采集结膜棉拭子 2 个、鼻粘膜棉拭子 2 个、颊部粘膜棉拭子 1 个,分别放在 300 μL 灭菌的 0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)中。无菌采集血液 10 mL,用常规方法分离血清。

6.1.1.3 选择刚被扑杀或者死亡时间不超过 24 h 的病畜采集组织样品。无菌采集肠系膜和支气管淋巴结各 3 个~4 个,脾、胸腺、肠粘膜和肺等组织各约 25 g~50 g,分别置于 50 mL 离心管中。

6.1.1.4 肉制品取 25 g~50 g,置于 50 mL 离心管中。

6.1.2 样品的运输与储存

6.1.2.1 样品采集后,置冰上冷藏送至实验室检测。

6.1.2.2 血清储存应置于-20℃冰箱。

6.1.2.3 棉拭子、病料组织和肉制品储存应置于一70℃冰箱。

6.2 器械与设备

5%二氧化碳培养箱,DNA热循环仪,低温高速离心机,电泳仪和电泳槽,凝胶成像系统或者紫外检测仪,实时荧光定量PCR仪,96孔高吸附性酶标板,洗瓶或者洗板机,恒温箱,酶标仪。

6.3 病毒分离与鉴定

6.3.1 试验材料

非洲绿猴肾(Vero)细胞,pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)(见A.1),细胞培养液(见A.3),细胞培养瓶。

6.3.2 样品处理

棉拭子充分捻动、挤干后弃去拭子,加入青霉素至终浓度200 IU/mL,加入链霉素至终浓度200 μg/mL。37℃作用1 h。3 000 g离心10 min,取上清液300 μL作为接种材料。

用灭菌的剪刀、镊子取大约0.5 g组织样品或肉制品,置于研钵中,剪碎,充分研磨,加入5 mL灭菌的0.01 mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液(含青霉素200 IU/mL,链霉素200 μg/mL),制成1:10悬液。37℃作用1 h。3 000 g离心10 min,取上清液5 mL作为接种材料。

不能立即接种者,应将上清放-70℃保存。

6.3.3 样品接种

取样品上清液接种已长成单层的Vero细胞,37℃恒温箱中吸附2 h,加入细胞培养液,置5%二氧化碳培养箱37℃培养。

6.3.4 观察结果

接种后5 d内,细胞应出现细胞病变效应,表现为细胞融合,形成多核体。如接种5 d~6 d后不出现细胞病变,应将细胞培养物盲传三代。

6.3.5 病毒的鉴定

将出现细胞病变的细胞培养物,按“6.4 RT-PCR方法”和“6.5 荧光定量RT-PCR反应”做进一步鉴定。

6.3.6 结果判定

样品出现细胞病变,而且RT-PCR方法或实时荧光RT-PCR方法鉴定结果阳性,则判为小反刍兽疫病毒分离阳性,表述为检出小反刍兽疫病毒。

否则,表述为未检出小反刍兽疫病毒。

6.4 RT-PCR方法

6.4.1 试剂与材料

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂。实验用水符合GB/T 6682的要求。

TRIzol试剂,三氯甲烷,异丙醇,无水乙醇,DEPC处理过的水(见附录B),反转录酶/Taq DNA聚合酶混合液,2×一步法RT-PCR反应缓冲液,1.5%的琼脂糖凝胶(见附录B),0.5×TBE缓冲液(见附录B),溴化乙锭。

可以采用引物 NP3/NP4 用于小反刍兽疫病毒核酸的检测,引物的靶基因、位置、序列和扩增产物的大小见表 1。

表 1 用于小反刍兽疫病毒 RT-PCR 检测的引物

引物	目的	靶基因	序列(5' - 3')	产物
NP3	正向引物	N 基因	TCTCGGAAATCGCCTCACAGACTG	351 bp
NP4	反向引物	N 基因	CCTCCTCCTGGTCCTCCAGAATCT	

6.4.2 样品处理

将棉拭子充分捻动、挤干后弃去拭子,取 100 μ L 样品液至一新的离心管中,加入 1 mL TRIzol 试剂,振荡混匀,进行 RNA 提取。

取大约 100 mg 组织样品,剪碎后,加入 1 mL TRIzol 试剂充分匀浆后转移至 1.5 mL 离心管中,进行 RNA 提取。

6.4.3 RNA 提取

经 TRIzol 处理的样品液 12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清,静置 5 min。加 200 μ L 三氯甲烷,振荡混匀,15 s,静置 2 min~3 min。12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取 400 μ L 上层水相到新的离心管中,加 400 μ L 的异丙醇,混匀,静置 10 min。12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,去上清。加入 75%乙醇 1 mL,混匀,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,去上清。再加入 75%乙醇 1 mL,混匀,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,去上清。干燥 RNA 沉淀后加入 100 μ L DEPC 处理过的水溶解。立即进行 RT-PCR 反应或-70 $^{\circ}$ C 保存。

6.4.4 RT-PCR 反应

反应体系为 25 μ L,依次加入以下成分:12.5 μ L 2 $\times$ 一步法 RT-PCR 反应缓冲液,1 μ L 正向引物 NP3 (10 μ mol/L),1 μ L 反向引物 NP4 (10 μ mol/L),1 μ L 反转录酶/Taq DNA 聚合酶混合液,4.5 μ L DEPC 处理过的水,5 μ L RNA 模板。

每次进行 RT-PCR 反应时均设标准阳性、阴性及空白对照。标准阳性用阳性对照 RNA 作为模板,标准阴性用 Vero 细胞 RNA 作为模板,空白对照用 DEPC 处理过的水作为模板。

RT-PCR 反应条件为:50 $^{\circ}$ C 反转录 30 min;94 $^{\circ}$ C, 2 min 进行 Taq 酶的激活;94 $^{\circ}$ C, 30 s,55 $^{\circ}$ C, 30 s,72 $^{\circ}$ C, 30 s,共 35 次循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

6.4.5 PCR 产物的电泳

取 PCR 产物 5 μ L 在 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像系统中观察结果。

6.4.6 质控标准

小反刍兽疫病毒 RT-PCR 标准阳性对照有大小为 351 bp 的特异性阳性扩增条带,标准阴性对照和空白对照无任何扩增条带,说明质控合格。

6.4.7 结果判定

样品有大小为 351 bp 的特异性阳性扩增条带判为 RT-PCR 结果阳性,表述为检出小反刍兽疫病毒核酸。

样品无特异性的阳性扩增条带判为 RT-PCR 结果阴性,表述为未检出小反刍兽疫病毒。

6.5 荧光定量 RT-PCR 反应

6.5.1 试验材料

TRIzol 试剂,三氯甲烷,异丙醇,无水乙醇,DEPC 处理过的水(见附录 B)、 $2\times$ 一步法荧光 RT-PCR 反应缓冲液,Taq DNA 聚合酶,反转录酶,参比荧光 ROX II。

引物和探针:引物和探针针对小反刍兽疫病毒 N 基因保守序列区段设计,引物和探针的位置和序列见表 2。

表 2 用于小反刍兽疫病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测的引物和探针

引物	目的	位置	序列(5' - 3')
PPRN8a	正向引物	1213-1233	CACAGCAGAGGAAGCCAAACT
PPRN9b	反向引物	1327-1307	TGTTTTGTGCTGGAGGAAGGA
PPRN10P	探针	1237-1258	FAM-5'-CTCGGAAATCGCCTCGCAGGCT-3'-TAMRA

6.5.2 RNA 提取

同 6.4.3。

6.5.3 荧光定量 RT-PCR 反应

反应体系为 25 μ L,依次加入以下成分:12.5 μ L $2\times$ 1 step buffer,1 μ L 正向引物 PPRN8a (10 μ mol/L),1 μ L 反向引物 PPRN9b (10 μ mol/L),0.5 μ L 探针 PPRN10p (10 μ mol/L),0.5 μ L Taq DNA 聚合酶,0.5 μ L 反转录酶,0.5 μ L 参比荧光 ROX II, 3.5 μ L DEPC 处理过的水,5 μ L RNA 模板。每次进行荧光定量 RT-PCR 时均设标准阳性、阴性及空白对照。标准阳性用阳性对照 RNA 作为模板,标准阴性用 Vero 细胞 RNA 作为模板,空白对照用 DEPC 处理过的水作为模板。

荧光定量 RT-PCR 反应条件为:42 $^{\circ}$ C 反转录 30 min;95 $^{\circ}$ C, 10 min 进行 Taq 酶的激活;95 $^{\circ}$ C, 15 s,60 $^{\circ}$ C, 1 min,共 50 次循环;每个循环在 60 $^{\circ}$ C, 1 min 时收集荧光信号。

6.5.4 质控标准

读取每个样品的 Ct 值。

标准阳性对照样品有特异性扩增曲线而且 Ct 值 ≤ 30 ,标准阴性对照和空白对照无特异性扩增曲线,说明质控合格。

6.5.5 结果判定

样品有特异性扩增曲线而且 Ct 值 ≤ 40 判为实时荧光 RT-PCR 扩增阳性,表述为检出小反刍兽疫病毒核酸。

样品 Ct 值 >40 或者无特异性扩增曲线判为实时荧光 RT-PCR 扩增阴性,表述为未检出小反刍兽疫病毒核酸。

6.6 竞争 ELISA 方法

6.6.1 试验材料

包被用抗原:PPRV 疫苗株重组 N 蛋白。对照血清:强阳性血清、弱阳性血清、阴性血清。单克隆

抗体:小反刍兽疫病毒 N 蛋白的单克隆抗体。酶结合物:辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠血清。封闭缓冲液、洗涤缓冲液、底物溶液及终止液,配制方法见附录 C。

6.6.2 抗原包被

PPRV 重组 N 蛋白用包被缓冲液 1 : 3 500 倍稀释后,每孔 50 μL 包被 96 孔酶标板,37 ℃置湿盒吸附 1 h,用洗涤缓冲液洗板 4 次。

6.6.3 血清加样步骤

每孔加入 45 μL 封闭缓冲液。每份待检血清做 2 孔,每孔加入 5 μL 待检血清。设强阳性血清对照孔(C++)4 个,每孔加入 5 μL 强阳性血清,设弱阳性血清对照孔(C+)4 个,每孔加入 5 μL 弱阳性血清,设阴性血清对照孔(C-)2 个,每孔加入 5 μL 阴性血清,设单抗对照孔(Cm)4 个,每孔加入 5 μL 封闭缓冲液,设酶结合物对照孔(Cc)2 个,每孔加入 55 μL 封闭缓冲液。

6.6.4 单克隆抗体的加入

除酶结合物对照孔外,每孔加入 50 μL 工作浓度的单抗,37 ℃置湿盒作用 1 h,用洗涤缓冲液洗板 4 次。

6.6.5 酶结合物的加入

每孔加入 50 μL 工作浓度的酶结合物,37 ℃置湿盒作用 1 h,洗涤缓冲液洗板 4 次。

6.6.6 显色与终止

每孔加入 50 μL 底物溶液,37 ℃避光反应 10 min,每孔加入 50 μL 终止液。

6.6.7 读值

酶标仪预热 15 min,读取每孔 492 nm 波长的吸光度值(OD 值)。

6.6.8 计算抑制率

按照式(1)计算每孔(包括对照孔)的抑制率,并计算每份样品的平均抑制率。

$$PI = 100 - (OD_T \div OD_C) \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- PI ——抑制率;
- OD_T ——试验孔或对照孔 OD 值;
- OD_C ——单抗对照孔 OD 平均值。

6.6.9 质控标准

结果在质控标准(见表 3)范围内,则试验成立。

表 3 小反刍兽疫竞争 ELISA 检测方法质控标准

项 目	最大值	最小值
Cm 孔的 OD 值	1.500	0.500
Cc 孔抑制率	+105	+95
Cm 孔抑制率	+20	-19

表 3 (续)

项 目	最大值	最小值
C++ 孔抑制率	90	81
C+ 孔抑制率	80	51
C- 孔抑制率	30	5

6.6.10 结果判定

平均抑制率(PI) >80 ,判为强阳性, $50<$ 平均抑制率(PI) ≤ 80 ,判为弱阳性,表述为小反刍兽疫血清学阳性。平均抑制率(PI) ≤ 50 ,判为阴性,表述为小反刍兽疫抗体血清学阴性。

7 综合判定



凡具有 6.3.6、6.4.7、6.5.5、6.6.10 中任何一项阳性者,均判为小反刍兽疫阳性。

附 录 A
(规范性附录)
病毒分离鉴定溶液的配制

A.1 pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4,加去离子水至 1 000 mL,在 1.034×10^5 Pa 高压下蒸汽灭菌 20 min。保存于室温。PBS 一经使用,于 4 ℃ 保存不超过 3 周。

A.2 高糖型 DMEM 培养液

高糖型 DMEM	13.37 g
碳酸氢钠(NaHCO ₃)	3.7 g
超纯水	1 000 mL

充分溶解后,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。4 ℃ 保存。



A.3 细胞培养液

高糖型 DMEM 培养液	950 mL
胎牛血清	50 mL

加入青霉素至终浓度 200 IU/mL,链霉素至终浓度 200 μg/mL,两性霉素 B 至终浓度 2.5 μg/mL 充分混匀。4 ℃ 保存。

附 录 B

(规范性附录)

反转录-聚合酶链反应溶液的配制

B.1 DEPC 处理过的水

DEPC	1 mL
去离子水	1 000 mL

充分混匀,将瓶盖拧松后置于 37 ℃ 放置过夜,高压灭菌。

B.2 5×TBE 缓冲液

Tris 碱	54 g
硼酸	27.5 g
0.5 mol/L EDTA	20 mL

加去离子水调整体积至 1 000 mL。

B.3 0.5×TBE 缓冲液

取 100 mL 5×TBE 缓冲液,加去离子水调整体积至 1 000 mL。

B.4 1.5%的琼脂糖凝胶

琼脂糖	0.75 g
0.5×TBE 缓冲液	50 mL
溴化乙锭溶液(10 mg/mL)	2.5 μ L

称取 0.75 g 琼脂糖,置于 200 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 0.5×TBE 缓冲液,加热溶解,冷却至 50 ℃~60 ℃时加入 2.5 μ L 溴化乙锭溶液,倒入胶槽内自然凝固。



附 录 C
(规范性附录)

竞争酶联免疫吸附试验溶液的配制

C.1 包被缓冲液——0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐/重碳酸盐缓冲液

Na ₂ CO ₃	0.318 g
NaHCO ₃	0.588 g
去离子水	200 mL

用 0.22 μm 膜过滤除菌,室温保存备用。

C.2 洗涤缓冲液——pH7.4 PBST (0.05%吐温-20)

吐温-20	0.5 mL
pH7.4 PBS	1 000 mL

C.3 封闭缓冲液(含 3%BSA 的 pH7.4 PBS)

BSA	30 g
pH7.4 PBS	1 000 mL

封闭液要临用前配制。

C.4 底物溶液

C.4.1 A 液

Na ₂ HPO ₄	3.682 g
柠檬酸	1.021 g
过氧化氢尿素	0.06 g
去离子水	100 mL

临用前配制,避光 4℃~8℃保存。

C.4.2 B 液

柠檬酸	1.05 g
EDTA	14.6 mg
TMB (3,3'-二氨基联苯胺)	25.0 mg
去离子水	100 mL

用 0.45 μm 滤膜过滤,临用前配制,避光 4℃保存。

C.4.3 用法

使用时,将 A 液、B 液按 1:1 的比例混合。

C.5 终止液——3 mol/L H₂SO₄

浓硫酸	16.5 mL
-----	---------

去离子水	87.5 mL
------	---------

将浓硫酸缓缓加到蒸馏水中,混匀。
