



中华人民共和国国家标准

GB/T 18637—2018
代替 GB/T 18637—2002

牛病毒性腹泻/粘膜病诊断技术规范

Technical specifications for diagnosis of bovine viral diarrhea / mucosal disease

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18637—2002《牛病毒性腹泻/粘膜病诊断技术》，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 增加了“临床诊断”方法(见第 4 章)；
- 增加了“实时荧光 RT-PCR 检测”(见 5.4)。



本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：中国兽医药品监察所、中华人民共和国北京出入境检验检疫局、扬州大学、中华人民共和国宁夏出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人：李俊平、刘环、印春生、陶洁、郝俊虎、蒲静、范学政、吴华伟、孙森、王建华、宋建德、朱国强。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18637—2002。

引 言

牛病毒性腹泻/粘膜病(Bovine Viral Diarrhea / Mucosal Disease,BVD/MD,简称 BVD),是由牛病毒性腹泻/粘膜病病毒(Bovine Viral Diarrhea / Mucosal Disease Virus,BVD/MDV,简称 BVDV)感染牛引起的以发热、粘膜糜烂溃疡、白细胞减少、腹泻、咳嗽及怀孕母牛流产或产出畸形胎儿为主要特征的一种传染病。BVDV 在分类学上属黄病毒科(*Flaviviridae*),瘟病毒属(*Pestivirus*),是瘟病毒属的代表种,目前国际病毒分类委员会确定的 BVDV 有二个基因型(或种),分别是 BVDV-1 和 BVDV-2。它们与同属的猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus,CSFV)及羊边界病病毒(Border DiseaseVirus, BDV)之间存在着结构与抗原相关性,在血清学上有部分交叉反应。BVDV-1 引起的疫病呈全球分布,较为常见,而 BVDV-2 引发的疫病不多见。二个基因型的病毒均可根据其在培养细胞上能否产生细胞病变而被分为二个生物型,即致细胞病变型(Cytopathic type,CP)和非致细胞病变型(Non-cytopathic type,NCP)。NCP 毒株是引起所有感染和发病类型的生物型,而 CP 毒株主要出现在粘膜病病例。

目前,该病在世界范围内广泛流行,我国于 1983 年首次分离到了 BVDV。近年来,病原学调查表明我国牛、羊、鹿、猪等均不同程度的感染 BVDV,该病已严重影响着我国畜牧业的健康发展。

本标准中所描述的方法均为近几年我国在 BVD 诊断过程中常用的方法,包括临床诊断、病原学诊断及血清学诊断技术。血清学诊断技术为病毒中和试验。病原学诊断技术包括病毒分离鉴定和实时荧光 RT-PCR(Real-time RT-PCR)检测方法,本标准中的 Real-time RT-PCR 检测方法具有 BVDV 特异性,能够同时检测 BVDV-1 和 BVDV-2,且能特异区分 BVDV 与 CSFV。

结合我国动物防疫相关法律、法规和政策,本标准能够有效地诊断和监测我国 BVD/MD 的发生和流行。



牛病毒性腹泻/粘膜病诊断技术规范

1 范围

本标准规定了牛病毒性腹泻/粘膜病的流行病学、临床症状、病理变化等临床诊断,及样品采集与处理、病毒分离与鉴定、Real-time RT-PCR 检测及病毒中和试验等实验室诊断的技术要求和操作规范。

本标准适用于检测不同样品中的 1 型和 2 型牛病毒性腹泻/粘膜病病毒、核酸及抗体水平。

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/T 19438.1—2004 禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法

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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BT:牛鼻甲骨细胞(Bovine Turbinate cell)

BVD/MD:牛病毒性腹泻/粘膜病(Bovine Viral Diarrhea / Mucosal Disease)

BVD/MDV:牛病毒性腹泻/粘膜病病毒(Bovine Viral Diarrhea / Mucosal Disease Virus)

CPE:致细胞病变效应(Cytopathic Effect)

CP:致细胞病变型(Cytopathic type)

cRNA:互补 RNA(Complement RNA)

Ct(C_p):每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数(Cycle Threshold, or Crossing Point)

DEPC:焦碳酸二乙酯(Diethyl Pyrocarbonate)

FAM:羧基荧光素(Carboxyfluorescein)

FBS:胎牛血清(Fetal Bovine Serum)

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

MDBK:牛肾继代细胞(Madin-Darby Bovine Kidney cell)

MEM:基础培养基(Minimum Essential Medium)

NCP:非致细胞病变型(Non-cytopathic type)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline)

PBST:吐温磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution with Tween20)

PI:持续性感染(Persistent Infection)

Real-time RT-PCR:实时荧光反转录聚合酶链反应(Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

TCID₅₀:组织半数感染量(Median Tissue Culture Infective Dose)

4 临床诊断

4.1 流行病学

BVDV 可感染各种年龄的牛,青年牛可发生急性感染,怀孕牛极易发生垂直传播。急性感染的牛病毒血症持续时间较短,表现为一过性排毒,而且排毒量低,在疫病的传播中不起主要作用。怀孕牛感染可引起流产、胚胎吸收、死胎、先天性缺陷或出生牛犊的持续性感染(PI)等。怀孕 120 天之前先天性感染的胎牛,出生后往往表现为 PI,它们可终身带毒及排毒,是 BVDV 的主要储存宿主和传播来源。

BVDV 的水平传播导致急性感染,主要发生在同牛群内或临近牛群间的相互感染,其中易感牛与 PI 牛直接接触是 BVDV 水平传播的主要途径。

4.2 临床症状

4.2.1 亚临床感染

在免疫机能健全、血清抗体阴性的牛发生 BVDV 感染时,70%~90%的牛不表现出明显的眼观临床症状,即处于亚临床感染状态。可导致温和型发热、白细胞减少症和血清中和抗体的产生,对泌乳期奶牛可导致产奶量降低。

4.2.2 急性感染

急性 BVDV 感染通常发生在免疫机能健全的青年牛群,以 6 月龄~24 月龄的血清抗体阴性牛常见。临床症状包括不同程度的高热、厌食、精神沉郁、白细胞减少、眼和鼻腔分泌物增加、口腔溃疡、口腔脓包和出血、腹泻、呼吸困难以及泌乳期产奶量降低等,在乳房和皮肤交接处及乳头上常见皮肤溃烂。死亡率不高,个别病牛表现出临床症状后 3 天~10 天死亡。也有一些急性感染的牛不表现明显的临床症状。发病的严重程度与感染毒株的毒力以及是否继发感染密切相关。

4.2.3 严重急性感染

发生严重急性感染时显著特征为高发病率和高死亡率,各种年龄均有发生,表现为高热、肺炎和突然死亡,怀孕母牛发生流产。血小板减少症和出血性综合征是严重急性 BVDV 感染的表现形式,感染牛通常表现为血小板严重减少,粘膜表面淤血、鼻出血、血性腹泻、高热、白细胞减少和死亡等。近年来,报道的严重急性感染多由 NCP 的 BVDV 基因 2 型毒株所致。

4.2.4 持续性感染(PI)

妊娠母牛在怀孕早期(约 120 天前)感染 BVDV 后可导致病毒的垂直传播,从而感染胎牛,感染的胎牛出生后存活下来的大部分犊牛都会发展成为 PI 牛。PI 牛是 BVDV 最主要的储存宿主和传播来源,可终生带毒并通过尿、粪、分泌物、奶或精液大量排毒。该感染类型无特定的病变,临床差异较大。有的表现正常,有的衰弱无力,站立和哺乳都困难,也可表现为神经系统缺陷(如肌肉颤抖、共济失调及失明等),严重的常在出生数日内死亡。为确诊 PI 牛,对排毒牛需间隔 3 周后再次检测牛的排毒情况,如果仍排毒,可以判定为 PI 牛。

4.2.5 粘膜病(MD)

MD 是 BVDV 感染引起的一种最严重的临床类型,只发生于 PI 牛,一般呈散发性,比较少见。其致病机理是胎儿时期感染了 NCP 的 BVDV 毒株的牛,又感染了与此毒株抗原相近的 CP 株,引发了粘

膜病。粘膜病主要表现为发病突然、高热、食欲减退、呼吸急促、产奶量降低、大量水样腹泻。腹泻通常以出现粘膜排泄、纤维蛋白样物质、血便和恶臭为特征。死亡率非常高。出现 MD 病例预示着牛群存在 BVDV 感染,提示有必要开展流调普查与防控。

4.3 病理变化

急性 BVDV 感染往往导致胃肠道、消化道和呼吸系统的表皮损伤。严重急性感染病牛剖检时可见口腔腐烂或溃疡、胃肠表面淤血、溃疡或出血。

对粘膜病死亡牛进行剖检,可见大量坏死性溃疡和整个胃肠道的腐烂,鼻孔和上呼吸道粘膜可见溃疡症状,小肠派伊尔氏结常见坏死和出血症状。典型的肠内容物多呈水样,并有恶臭气味。

4.4 结果判定

出现 4.2.2 或 4.2.3 或 4.2.4 或 4.2.5 至少一项临床症状且同时出现 4.3 剖检病理变化的发病牛,可判为 BVD/MD 可疑。

5 实验室诊断

5.1 样品的采集与处理

5.1.1 基本原则

在进行病毒分离和 Real-time RT-PCR 检测时,优先采集病变组织和鼻拭子等样品;在进行抗体定性或定量检测时,优先采集血清和牛奶样品。采样及前处理样品时应戴一次性手套。采样中注意避免样本间交叉污染。

5.1.2 采样及处理工具

除采用一次性商品化无菌采样工具外,其他所有采样工具应经 $121\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,15 min 高压灭菌并烘干或经 $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干烤 2 h。

5.1.3 样品采集

5.1.3.1 血清

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,分离血清,编号备用。

5.1.3.2 组织样品

用无菌剪刀、镊子采集待检脏器或组织。可采集肠粘膜刮取物或肺、脾、淋巴结等作为待检组织样品;对流产胎牛、死胎,直接采集胎儿的组织;对怀疑死于粘膜病的牛,可采集血块或肺、脾、淋巴结等组织,尤其是肠道集合淋巴组织,如肠道样品已发生自溶,可采扁桃体和淋巴结。将采集的样品装入无菌采样袋或其他灭菌容器,编号备用。

5.1.3.3 鼻拭子

对疑似为急性感染期或持续感染的牛,采集鼻分泌物拭子。取鼻拭子时将拭子深入鼻腔来回擦拭 2 次~3 次并旋转,取分泌物;将采样后的拭子放入盛有 2.0 mL PBS(配方见附录 A 的 A.1.3)的采样管中,编号备用。

5.1.3.4 精液

采集新鲜精液直接装入 1.5 mL 灭菌离心管中,编号备用;对于冷冻精液,在室温解冻后,使用无菌剪刀剪断精液保存管,将精液收集在 1.5 mL 灭菌离心管中,编号备用。

5.1.3.5 牛奶

采用手工挤奶取样,待检牛每次挤奶时弃去前三把乳后,采集新鲜牛奶直接装入 1.5 mL 灭菌离心管中,编号备用。同群不同个体牛采集的牛奶可以混合。

5.1.4 样品贮运

样品采集后置保温箱中,加入预冷的冰袋,密封。样品的运输按照相关的运输要求包装,并以最快的方式(尽可能 24 h 内送达)送实验室进行检测。

5.1.5 样品处理

5.1.5.1 血清

无菌采血后,将样品管放于室温,静置 1 h,再于 4 °C 冰箱放置 1 h 或过夜,2 000 r/min 离心 5 min~10 min,无菌吸取上层血清,编号备用;如果样品形成为凝血块,将样品冻融 3 次后,2 000 r/min 离心 5 min~10 min,无菌吸取上清液(如怀疑可能污染时按总体积的 10%加入含 10 000 U/mL 青霉素和链霉素的 PBS),编号备用。

5.1.5.2 组织样品

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 2.0 g 于研钵或组织匀浆器中充分研磨,再加 10.0 mL PBS(含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素,配方见 A.1.5)混匀,2 000 r/min 离心 5 min 后,取 1.0 mL 上清液转入无菌 1.5 mL 灭菌离心管中,编号备用。

5.1.5.3 鼻拭子

用含 1 000 U/mL 青霉素和链霉素的细胞培养液 4 倍稀释后,2 000 r/min 离心 15 min 取上清液,编号备用。

5.1.5.4 精液

冻融 3 次(或超声波裂解处理,用于 Real-time RT-PCR 试验的样品也可取 100 μL 精液加入 500 μL Catrimox-14,振荡混匀),用含 1 000 U/mL 青霉素和链霉素的细胞培养液制备成 1:10 的乳剂,2 000 r/min 离心 15 min 取上清液,编号备用。

5.1.5.5 牛奶

全脂乳样品经 2 000 r/min 离心 15 min 后或置 2 °C~8 °C 过夜,取上清液,脱脂乳样品无需离心处理,直接取样编号备用。

5.1.6 样品存放

采集或处理好的样品在 2 °C~8 °C 条件下保存应不超过 24 h;若需长期保存,应放置 -70 °C 以下保存,冻融不超过 3 次。

5.2 病毒分离与鉴定

5.2.1 仪器

- 5.2.1.1 倒置荧光显微镜。
- 5.2.1.2 倒置显微镜。
- 5.2.1.3 台式离心机(最高离心速度不低于 5 000 r/min)。
- 5.2.1.4 超声波裂解仪。
- 5.2.1.5 细胞计数仪。
- 5.2.1.6 生物安全柜。
- 5.2.1.7 恒温培养箱(37℃±2℃)。
- 5.2.1.8 CO₂ 恒温培养箱(37℃±2℃)。
- 5.2.1.9 高速台式冷冻离心机(最高离心速度不低于 12 000 r/min)。
- 5.2.1.10 涡旋混合振荡器。
- 5.2.1.11 研钵。
- 5.2.1.12 组织匀浆器。
- 5.2.1.13 冰箱(2℃~8℃、-20℃、-70℃)。
- 5.2.1.14 单道(或多道)微量移液器(10 μL、100 μL、200 μL、300 μL、1 000 μL)。

5.2.2 耗材

- 5.2.2.1 离心管(1.5 mL、2 mL、15 mL、50 mL、100 mL)。
- 5.2.2.2 采样管(5 mL)。
- 5.2.2.3 细胞培养瓶(25 cm²、75 cm²、175 cm²)。
- 5.2.2.4 细胞培养板(96 孔、48 孔、24 孔、6 孔)。
- 5.2.2.5 移液器吸头(10 μL、200 μL、300 μL、1 000 μL)。
- 5.2.2.6 剪刀(含弯头剪刀)。
- 5.2.2.7 镊子(含弯头镊子)。
- 5.2.2.8 采样专用商品化棉拭子。
- 5.2.2.9 一次性采血管(含针头)。
- 5.2.2.10 注射器(5 mL、10 mL、20 mL)。
- 5.2.2.11 标签。

5.2.3 试剂

- 5.2.3.1 PBS:配方见 A.1.3。
- 5.2.3.2 PBST:配方见 A.1.4。
- 5.2.3.3 细胞培养液与细胞维持液:配方见 A.2。
- 5.2.3.4 BVDV 阳性参照毒株:BVDV-1(Oregon C24V 株)、BVDV-2(890 株)。
- 5.2.3.5 FBS(无 BVDV 及其抗体)或马血清,-20℃保存。
- 5.2.3.6 中和试验对照血清:BVDV-1 阳性血清、BVDV-2 阳性血清和阴性血清(已 56℃水浴灭活 30 min)。
- 5.2.3.7 病毒液:BVDV-1(Oregon C24V 株)和 BVDV-2(890 株)分别接种 MDBK 细胞收获的培养物,测定 TCID₅₀后,分装于小管,-70℃以下保存备用。
- 5.2.3.8 细胞:MDBK 传代细胞或 BT 传代细胞,细胞形态良好。

5.2.4 试验步骤

5.2.4.1 制备单层细胞

将 MDBK 传代细胞或 BT 传代细胞用 0.25% EDTA-胰酶消化液消化分散后,用细胞培养液分散为浓度为 1×10^6 个/mL~ 2×10^6 个/mL,分装细胞培养瓶,37 °C 恒温培养箱 5% CO₂ 培养箱中静置培养 24 h~48 h,形成单层备用。

5.2.4.2 接种细胞

每份样品接种 3 瓶细胞,另设细胞对照 2 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 10% 加入已经处理好的样品,37 °C 吸附 2 h~3 h,补加细胞维持液(配方见 A.2.2)。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 °C 恒温培养箱或 5% CO₂ 培养箱中培养。

5.2.4.3 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 -70 °C 以下冻存备用。无 CPE 的细胞瓶,于接种后 96 h~144 h,取出并置 -70 °C 以下冻存备用。

5.2.4.4 盲传

将第 1 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 5.2.4.2 接种细胞,按 5.2.4.3 进行观察、记录、收毒,盲传第 2 代。此过程中培养物仍无 CPE 则按同样的方法继续盲传第 3 代,培养结束后无论是否出现 CPE 均收毒,置 -70 °C 以下冻存备用。取盲传 3 代的培养物进行 5.2.4.5 或/和 5.4 的检测。

5.2.4.5 荧光染色鉴定

5.2.4.5.1 按 5.2.4.1 方法制备浓度为 1×10^6 个/mL~ 2×10^6 个/mL 的 MDBK 传代细胞或 BT 传代细胞,分装于 96 孔细胞板中,0.1 mL/孔,将细胞板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

5.2.4.5.2 将 5.2.4.3 和 5.2.4.4 备用样品,冻融 3 次后混合,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液接种于长成 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,同时阳性对照 BVDV-1 毒株(Oregon C24V 株)和 BVDV-2 毒株(890 株)各接种 4 孔(100 TCID₅₀/孔~300 TCID₅₀/孔)。设不接毒的正常细胞对照 4 孔。

5.2.4.5.3 接种后细胞板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中吸附 2 h~3 h,每孔补加维持液 0.1 mL,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 72 h~120 h,期间显微镜下观察每一个孔是否出现 CPE。

5.2.4.5.4 培养结束后,弃去细胞板孔中液体,用 PBS 轻轻洗涤一次,吸干,加入 80% 的冷丙酮,0.1 mL/孔,4 °C 固定 10 min~15 min。

5.2.4.5.5 固定好的样品进行免疫荧光染色,在倒置荧光显微镜下观察各细胞孔中的荧光情况并记录观察结果,具体操作如下:

- a) 弃去孔中丙酮,室温自然晾干。每孔分别加入 FITC 标记的抗 BVDV 荧光抗体(同时抗 BVDV-1 和抗 BVDV-2)工作液 50 μL,37 °C 孵育 1 h;或每孔先加入牛抗 BVDV-1 和牛抗 BVDV-2 特异性阳性血清混合工作液或 BVDV-1 和 BVDV-2 单克隆抗体混合工作液 50 μL,37 °C 孵育 1 h 后,PBS 洗涤 3 次,再每孔加入 FITC 标记的抗牛 IgG 荧光抗体或 FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体工作液 50 μL,37 °C 孵育 1 h。

- b) PBS 洗涤 3 次后,弃去孔中液体。
- c) 在倒置荧光显微镜下观察各细胞孔中的荧光情况并及时记录,记录可分为:
 - 1) (—)无荧光;
 - 2) (+)荧光微弱,细胞形态不清晰;
 - 3) (++)荧光较亮,细胞形态清晰;
 - 4) (+++~++++)荧光较强,明亮闪烁,细胞形态清晰。

5.2.4.5.6 根据荧光染色观察结果,按照以下条件及标准进行试验结果判定:

- a) 试验成立的条件如下:5.2.4.5.5c)项正常细胞对照应为 1),2 个阳性对照均应为 3)或 4),否则判为结果无效,应重检。
- b) 在试验成立的前提下,样品检测结果判定为:
 - 1) 当 5.2.4.5.5c)项被检样品孔结果为 3)或 4)时判定被检样品为 BVDV 阳性。当 5.2.4.5.5c)项被检样品孔结果为 2)时应重检,重检结果与首次结果一样时,判定被检样品为 BVDV 阳性。
 - 2) 其他情况判定被检样品 BVDV 阴性。

5.2.4.6 Real-time RT-PCR 检测法鉴定

5.2.4.6.1 样品核酸提取

将 5.2.4.3 和 5.2.4.4 备用样品,冻融 3 次后混合,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按 5.4.4.2 提取核酸。

5.2.4.6.2 扩增试剂的准备与配制

按 5.4.4.3 准备与配制扩增试剂。

5.2.4.6.3 加样

按 5.4.4.4 加样。

5.2.4.6.4 Real-time RT-PCR

按 5.4.4.5 进行 Real-time RT-PCR 检测。

5.2.4.6.5 结果判定

按 5.4.4.6 进行结果判定。

5.2.4.7 综合结果判定

5.2.4.5 和 5.2.4.6 可以单独使用或联合使用进行 BVDV 鉴定。当单独使用时,按照相应鉴定方法的结果判定进行检测结果判定。当联合使用时,按 5.2.4.5.6 或(和)5.2.4.6.5 结果判定被检样品为 BVDV 阳性的,判定被检样品为 BVDV 阳性;按 5.2.4.5.6 和 5.2.4.6.5 结果判定被检样品均为 BVDV 阴性的,判定被检样品为 BVDV 阴性。

5.3 病毒中和试验

5.3.1 仪器

同 5.2.1。

5.3.2 耗材

同 5.2.2。

5.3.3 试剂

同 5.2.3。

5.3.4 试验步骤

5.3.4.1 定量测定

5.3.4.1.1 用多道移液器于 96 孔细胞培养板中加入稀释液(无血清的 MEM), 50 μL /孔。

5.3.4.1.2 用单道移液器取 50 μL 经 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 灭活后的被检血清于 2 块细胞板的第一排孔中, 每份样品每块板加 4 孔。

5.3.4.1.3 用多道移液器(调至 50 μL)从第一排孔开始连续作倍比稀释, 直至最后一个孔, 并从最后一排的孔中弃去 50 μL 稀释液。

5.3.4.1.4 用稀释液将 BVDV-1(Oregon C24V 株)和 BVDV-2(890 株)病毒液分别稀释成 100 TCID₅₀/50 μL 的工作液。

5.3.4.1.5 第一块板用多道移液器从第二排孔开始每孔加 BVDV-1(Oregon C24V 株)病毒工作液 50 μL , 第一排孔加 50 μL 稀释液作为被检血清毒性对照, 同时设 1:10 稀释的 BVDV-1 阳性血清对照、1:5 稀释的阴性血清对照和正常细胞对照各 4 孔及 BVDV-1(Oregon C24V 株)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。第二块板用多道移液器从第二排孔开始每孔加 BVDV-2(890 株)病毒工作液 50 μL , 第一排孔加 50 μL 稀释液作为被检血清毒性对照, 同时设 1:10 稀释的 BVDV-2 阳性血清对照、1:5 稀释的阴性血清对照和正常细胞对照各 4 孔及 BVDV-2(890 株)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。

5.3.4.1.6 将细胞板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h~3 h。

5.3.4.1.7 将 5.2.3.8 选用的细胞单层用 PBS 液轻轻洗涤 1 次, 加入 0.25% EDTA-胰酶消化液, 消化分散后, 用细胞培养液制备成细胞悬液(约含 2×10^5 个细胞/mL~ 5×10^5 个细胞/mL)加入到上述各试验孔中, 100 μL /孔。

5.3.4.1.8 将细胞板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 6 d, 第一块板从第 4 天开始观察, 于第 6 天判定各孔细胞病变情况。第二块板于第 6 天按 5.2.4.5 进行荧光染色判定各孔细胞感染情况。

5.3.4.2 定性测定

5.3.4.2.1 用多道移液器于 96 孔细胞培养板中加入稀释液(无血清的 MEM), 40 μL /孔。

5.3.4.2.2 用单道移液器取 10 μL 灭活后的被检血清于 2 块细胞板与被检血清样品编号相应的孔中, 每份样品加 4 孔。

5.3.4.2.3 病毒工作液配制见 5.3.4.1.4。

5.3.4.2.4 第一块板用多道移液器将 BVDV-1(Oregon C24V 株)病毒工作液加入到上述试验孔中, 50 μL /孔, 同时设 1:10 稀释的 BVDV-1 阳性血清对照、1:5 稀释的阴性血清对照和正常细胞对照各 4 孔及 BVDV-1(Oregon C24V 株)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。第二块板用多道移液器将 BVDV-2(890 株)病毒工作液加入到上述试验孔中, 50 μL /孔, 同时设 1:10 稀释的 BVDV-2 阳性血清对照、1:5 稀释的阴性血清对照和正常细胞对照各 4 孔及 BVDV-2(890 株)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。

5.3.4.2.5 重复 5.3.4.1.6~5.3.4.1.8 步骤。

5.3.4.3 双份血清测定

5.3.4.3.1 双份被检血清取自同一动物,间隔 21 天,血清样品按 5.1.3.1 采集和 5.1.5.1 处理。

5.3.4.3.2 试验操作方法同 5.3.4.1。

5.3.4.4 结果判定

5.3.4.4.1 培养至第 6 天时进行判定。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 $30 \text{ TCID}_{50}/50 \mu\text{L} \sim 300 \text{ TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ 范围之内,阳性血清对照孔不出现 CPE 或荧光染色为阴性,阴性血清对照孔出现 CPE 或荧光染色为阳性,证明试验成立,可进行结果判定,否则试验不成立,应重检。

5.3.4.4.2 定量测定时,记录每份血清各稀释度的 4 个孔中出现 CPE 或荧光染色为阳性的孔数,按照 Reed-Muench 法(见附录 B)分别计算各血清针对 BVDV-1 和 BVDV-2 的中和抗体效价,针对任一种病毒的抗体效价大于 $1:5$ 时,该血清即为阳性。

5.3.4.4.4 定性测定时,被检血清在 $1:5$ 稀释时有 2 个或 2 个以上孔的细胞未出现 CPE 或荧光染色为阴性,该血清即为阳性。

5.3.4.4.4 双份血清测定时,当相隔 21 天的第 2 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。

5.4 实时荧光 RT-PCR 检测

5.4.1 仪器

5.4.1.1 台式离心机(最高离心速度不低于 $5\,000 \text{ r/min}$)。

5.4.1.2 高速台式冷冻离心机(最高离心速度不低于 $12\,000 \text{ r/min}$)。

5.4.1.3 荧光 PCR 检测仪及配套反应管(板)。

5.4.1.4 涡旋混合振荡器。

5.4.1.5 冰箱($2 \text{ }^\circ\text{C} \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$)。

5.4.1.6 单道微量移液器($5 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{L}$ 、 $100 \mu\text{L}$ 、 $200 \mu\text{L}$ 、 $300 \mu\text{L}$ 、 $1\,000 \mu\text{L}$)。

5.4.2 耗材

5.4.2.1 无核酸酶离心管(1.5 mL)。

5.4.2.2 采样管(5 mL 、 10 mL)。

5.4.2.3 剪刀(含弯头剪刀)。

5.4.2.4 镊子(含弯头镊子)。

5.4.2.5 采样专用商品化棉拭子。

5.4.2.6 标签。

5.4.2.7 PCR 反应管。

5.4.2.8 无核酸酶移液器吸头($10 \mu\text{L}$ 、 $200 \mu\text{L}$ 、 $300 \mu\text{L}$ 、 $1\,000 \mu\text{L}$)。

5.4.3 试剂

5.4.3.1 总则:除另有说明,所用试剂均为分析纯,所用液体试剂均需使用无 RNA 酶的容器进行分装。

5.4.3.2 TRIzol($2 \text{ }^\circ\text{C} \sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$)、氯仿($2 \text{ }^\circ\text{C} \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$)、异丙醇($-20 \text{ }^\circ\text{C}$)、Catrimox-14,均为商品化试剂。

5.4.3.3 DEPC 水:见 A.3。

5.4.3.4 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷。

5.4.3.5 PBS(含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素):配方见 A.1.3。

5.4.3.6 BVDV Real-time RT-PCR 检测引物、探针序列,反应液配方及使用注意事项:见附录 C。

5.4.3.7 Real-time RT-PCR 试验阳性、阴性对照应满足以下要求:

- a) 阳性对照为灭活 BVDV 的细胞培养物(制备方法见 D.1)或 BVDV 5'-UTR 基因体外转录 cRNA 溶液(制备方法见 D.2);
- b) 阴性对照为正常 MDBK 传代细胞培养液或已知 BVDV 阴性的动物组织悬液。

5.4.4 试验步骤

5.4.4.1 实验室的标准化设置与生物安全管理

本方法的实验室设置与管理见 GB/T 19438.1—2004;实验室生物安全管理见 GB 19489。

5.4.4.2 样品核酸提取

5.4.4.2.1 在样本制备区进行。采取 TRIzol 裂解法提取,也可采用其他等效的 RNA 提取方法,如柱式提取法。

5.4.4.2.2 待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用 n 表示,取 n 个灭菌 1.5 mL 离心管,逐管编号。

5.4.4.2.3 每管加入 600 μ L TRIzol。

5.4.4.2.4 每管分别加入已处理的待检样品、阳性对照、阴性对照各 200 μ L,充分混匀。

5.4.4.2.5 每管加入 200 μ L 氯仿,充分颠倒混匀。于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min。

5.4.4.2.6 新取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管,逐管编号,每管加入 500 μ L 异丙醇(−20 $^{\circ}$ C 预冷)。

5.4.4.2.7 吸取 5.4.4.2.5 各管中的上清液 500 μ L,转移至 5.4.4.2.6 相应的管中,避免吸出中间层,颠倒混匀。

5.4.4.2.8 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,沥干液体,不同样品应在吸水纸不同位置沥干。

5.4.4.2.9 逐管加入 600 μ L 75%乙醇(−20 $^{\circ}$ C 预冷),颠倒洗涤。

5.4.4.2.10 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,沥干液体,不同样品应在吸水纸不同位置沥干。

5.4.4.2.11 4 000 r/min 离心 10 s,将管壁上的残余液体甩到管底部,用微量移液器尽量将其吸干。注意一份样本换一个吸头,吸头不要碰到有沉淀一面。

5.4.4.2.12 室温干燥 3 min(不宜过于干燥,以免 RNA 不溶)。

5.4.4.2.13 每管加入 25 μ L DEPC 水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,2 000 r/min 离心 5 s,获得 RNA 溶液,冰浴保存备用(4 $^{\circ}$ C 保存不超过 8 h,若长期保存应放置 −70 $^{\circ}$ C 冰箱)。

5.4.4.3 扩增试剂的准备与配制

5.4.4.3.1 在反应混合物配制区进行。

5.4.4.3.2 每个检测反应体系需使用 15 μ L Real-time RT-PCR 反应液。根据 5.4.4.2.2 中设定的 n 值,按表 C.2 配制反应液,充分混匀后分装,每管 15 μ L。转移反应管至样本制备区。

5.4.4.4 加样

5.4.4.4.1 在样本制备区进行。

5.4.4.4.2 在上述 5.4.4.3.2 的反应管中分别加入 5.4.4.2.13 中制备的 RNA 溶液 10 μ L,使每管总体积达到 25 μ L,记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后,瞬时离心。

5.4.4.5 Real-time RT-PCR

5.4.4.5.1 在检测区进行。

5.4.4.5.2 将 5.4.4.4.2 加样后的反应管放入荧光 PCR 检测仪内,记录反应管摆放顺序。选定 FAM 作为报告基团,BHQ1 无荧光淬灭基团。反应参数设置如下:

- a) 第一阶段,反转录 42 °C/30 min(或按反转录酶说明书进行设定);
- b) 第二阶段,预变性 94 °C/3 min;
- c) 第三阶段,92 °C/15 s,45 °C/30 s,72 °C/60 s,5 个循环;
- d) 第四阶段,92 °C/10 s,56 °C/60 s,40 个循环,在 c) 第三阶段每个循环的退火延伸时收集荧光。试验结束后,根据收集的荧光曲线和 Ct(或 Cp)值判定结果。

5.4.4.6 结果判定

5.4.4.6.1 结果分析条件设定:根据仪器噪声情况对阈值设定进行调整,以阈值线刚好超过阴性对照品扩增线的最高点为准。

5.4.4.6.2 质控标准同时满足以下两个条件,试验有效。否则,此次实验视为无效:

- a) 阴性对照应无 Ct(或 Cp)值并且无扩增曲线(参见附录 E);
- b) 阳性对照的 Ct(或 Cp)值应 ≤ 28 ,并出现典型的扩增曲线(参见附录 E)。

5.4.4.6.3 根据 Ct(或 Cp)值对试验结果进行描述及判定,描述和判定分为:

- a) 无 Ct(或 Cp)值,且无扩增曲线,表示样品中无 BVDV 核酸,判为阴性;
- b) Ct(或 Cp)值 ≤ 35 ,且出现典型的扩增曲线,表示样品中存在 BVDV 核酸,判为阳性;
- c) Ct(或 Cp)值 > 35 ,且出现典型的扩增曲线的样品需复检。复检仍出现上述结果的,判为阳性,否则判为阴性。

6 结果诊断判定

6.1 病原学判定

出现 4.2.2 或 4.2.3 或 4.2.4 或 4.2.5 的四项临床症状的任意一项,并同时符合 4.3 病理剖检变化的发病牛可判为 BVD/MD 可疑;凡符合 5.2.4.5.6b)1)者判为样品中 BVDV 病原阳性;凡符合 5.4.4.6.3b)者或符合 5.4.4.6.3c)阳性判定指标的均判为样品中 BVDV 病毒核酸阳性。

6.2 血清学判定

凡具有 5.3.4.4 为阳性者判为样品中 BVDV 抗体阳性。

附 录 A
(规范性附录)
溶液配制

以下所用试剂均为分析纯。

A.1 PBS 配方

A.1.1 A 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液： $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g，溶于去离子水中，最后定容至 1 000 mL，备用。

A.1.2 B 液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g)，加去离子水溶解，最后定容至 1 000 mL，备用。

A.1.3 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 的配制

取 A 液 14 mL、B 液 36 mL，加 NaCl 8.5 g，用去离子水定容至 1 000 mL。经过滤除菌后，备用。

A.1.4 PBST 的配制

取 A 液 14 mL、B 液 36 mL，加 NaCl 8.5 g，加 0.5 mL 吐温-20，用去离子水定容至 1 000 mL。经过滤除菌后，备用。

A.1.5 0.01 mol/L、pH 7.2 PBS(含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素)的配制

取 A 液 14 mL、B 液 36 mL，加 NaCl 8.5 g，牛血清白蛋白 5 g，用去离子水定容至 1 000 mL。经过滤除菌后，无菌条件下分别按 10 000 U/mL 加入青霉素和链霉素，备用。

A.2 细胞培养液与细胞维持液

A.2.1 细胞培养液

Eagle's -MEM 培养液	87.5 mL
FBS	10 mL
7.5% 碳酸氢钠	1.5 mL
调节 pH 至 7.2~7.4，充分混匀，现配现用。	

A.2.2 细胞维持液

Eagle's -MEM 培养液	95.5 mL
FBS	2 mL
7.5% 碳酸氢钠	1.5 mL
调节 pH 至 7.2~7.4，充分混匀，现配现用。	

A.3 DEPC 水

将 DEPC 加入去离子水(符合 GB/T 6682 要求)中至终浓度为 0.1%(体积分数),充分混合均匀后作用 12 h,分装,121℃±2℃高压灭菌 30 min,冷却后冷藏备用。

附 录 B
(规范性附录)

Reed-Muench 法计算中和抗体效价的方法

B.1 按照 Reed-Muench 法计算中和抗体效价

中和抗体效价以半数保护数(PD₅₀)的反对数表示,PD₅₀计算方法如下:

PD₅₀等于或低于50% CPE百分数的血清稀释度的对数加上距离比例与稀释系数的对数的乘积。其中,距离比例按 Reed-Muench 法计算,以50%减去低于50%的 CPE百分数的差作为分子,高于50%的 CPE百分数减去低于50%的 CPE百分数作为分母,求分子与分母的比值即为距离比例。

求 PD₅₀的反对数,结果以 1 : x 的格式表示,即为相应样品的中和抗体效价。

B.2 中和抗体效价计算方法示例

B.2.1 某血清中和抗体效价测定结果见表 B.1。

表 B.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 (CPE)孔 比例	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 : 1024(10 ^{-3.01})	4/4	4	0	11	0	100

B.2.2 按 B.1 中和抗体效价计算方法,将 B.2.1 中和抗体效价测定结果数据按 PD₅₀计算方法进行计算,计算过程如下:

从表 B.1 可见, PD₅₀介于 10^{-1.20}和 10^{-1.81}之间,按 Reed-Muench 法计算距离比例,即:

$$\text{距离比例} = \frac{50-17}{60-17} = 0.77$$

$$\text{PD}_{50} = -1.20 + 0.77 \times \lg 1/4 = -1.20 + 0.77 \times (-0.6) = -1.20 - 0.46 = -1.66$$

$$\text{PD}_{50} \text{的反对数} = 10^{-1.66} = 0.0218 = 1 : 45.9$$

该血清的中和抗体效价表示为 1 : 45.9。

附 录 C
(规范性附录)

引物探针序列及 Real-time RT-PCR 反应液配方

C.1 引物探针序列

BVD/MD 病毒核酸 Real-time RT-PCR 检测方法所用的引物探针序列见表 C.1。

表 C.1 引物探针序列

引物或探针名称	序列(5'—3')	基因组位置 (nt)	检测靶基因
上游引物	CCGCGAMGGCCGAAAAGA	83 ~ 100	5'-UTR
下游引物	TGACGACTNCCCTGTACTCAG	178 ~ 198	
探针	FAM-CCATGCCCTTAGTAGGACTAGCA-BHQ1	107 ~ 129	
<p>注 1: 上游、下游引物均为简并引物。</p> <p>注 2: 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 °C 保存备用。</p> <p>注 3: 引物探针是根据已发布的毒株序列进行设计,基因组位置参考毒株 Bovine viral diarrhea virus strain Oregon C24V(GenBank 登录号:AF091605.1)。</p>			

C.2 Real-time RT-PCR 反应液配方

BVD/MD 病毒核酸 Real-time RT-PCR 反应液配方见表 C.2。

表 C.2 Real-time RT-PCR 反应液配方

Real-time RT-PCR 反应液组分	1 个检测体系的加入量
5×RT 缓冲液 ^a (Mg ²⁺ 浓度 15 mmol/L)	5.0 μL
dNTP(2.5 mmol/L)	1.0 μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.0 μL
上游引物(10 μmol/L)	1.0 μL
下游引物(10 μmol/L)	1.0 μL
探针(10 μmol/L)	0.5 μL
M-MLV 反转录酶(200 U/μL)	0.5 μL
RNA 酶抑制剂(40 U/μL)	0.25 μL
Taq 酶 ^b (5 U/μL)	0.25 μL
DEPC 水	3.5 μL
<p>^a 5×RT 缓冲液的组成为:375 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl₂,50 mmol/L DTT,250 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3,25 °C)。</p> <p>^b Taq 酶:具有 5'→3'外切活性。</p>	

C.3 注意事项

在检测过程中,应严防不同样品间的交叉污染。

反应液分装时应避免产生气泡,上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。



附 录 D
(规范性附录)

Real-time RT-PCR 试验阳性对照制备方法

D.1 灭活 BVDV 的细胞培养物制备方法

取毒价达 5.6×10^5 TCID₅₀/0.1mL 的 BVDV Oregon C24V 毒株的细胞培养物,根据稀释后的体积添加 0.5% 甲醛溶液灭活,37℃ 过夜。

D.2 BVDV 5'-UTR 基因体外转录 cRNA 溶液制备方法

BVDV 5'-UTR 基因体外转录 cRNA 溶液,是通过回收 BVDV Oregon C24V 毒株 5'UTR 基因的 RT-PCR 扩增产物(引物序列见表 D.1,反应液配方及反应条件见表 D.2),长度为 386bp,与 pMD-T20 载体进行连接,转化 TOP10 感受态细胞,碱裂解法提取质粒 DNA,经 PCR 和酶切鉴定后获得阳性重组质粒(命名为 pMD20-BVDV-5U),再以纯化的质粒为模板,将质粒线性化之后,用试剂盒进行体外转录;将体外转录产物用 DNase 除去其中的 DNA 模板再经 TRIzol 提取 RNA 进行浓度测定后,即得到制备 BVDV 阳性对照所需的 RNA 阳性对照品母液。将母液 10 倍系列稀释之后,可作为 BVDV Real-time RT-PCR 方法的阳性对照使用。

表 D.1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	基因组位置 (nt)	检测靶基因
上游引物	GTATACGAGAGTTAGATA	1~18	5'-UTR
下游引物	GTGCCATGTACAGCAGAGA	367~385	
<p>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℃ 保存备用。</p> <p>注 2: 引物探针是根据已发布的毒株序列进行设计,基因组位置参考毒株 Bovine viral diarrhea virus strain Oregon C24V(GenBank 登录号:AF091605.1)。</p>			

表 D.2 RT-PCR 反应液配方及反应条件

RT-PCR 反应液组分	1 个检测体系的加入量
5×RT 缓冲液 ^a (Mg ²⁺ 浓度 15 mmol/L)	5.0 μL
dNTP(2.5 mmol/L)	1.0 μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.0 μL
上游引物(10 μmol/L)	1.0 μL
下游引物(10 μmol/L)	1.0 μL
M-MLV 反转录酶(200 U/μL)	0.5 μL
RNA 酶抑制剂(40 U/μL)	0.25 μL

表 D.2 (续)

RT-PCR 反应液组分	1 个检测体系的加入量
<i>Taq</i> 酶 ^b (5 U/ μ L)	0.25 μ L
DEPC 水	4.0 μ L
<p>注：反应条件为：</p> <p>a) 反转录 42 $^{\circ}$C/30 min；</p> <p>b) 预变性 94 $^{\circ}$C/3 min；</p> <p>c) 94 $^{\circ}$C/30 s, 55 $^{\circ}$C/30 s, 72 $^{\circ}$C/30 s, 35 个循环；</p> <p>d) 72 $^{\circ}$C/10 min。</p>	
<p>^a 5 \times RT 缓冲液的组成为：375 mmol/L KCl、15 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L DTT、250 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3, 25 $^{\circ}$C)。</p> <p>^b <i>Taq</i> 酶：具有 5' \rightarrow 3' 外切活性。</p>	

附录 E
(资料性附录)

BVD/MDV 核酸阴性及阳性典型扩增曲线示意图

BVD/MDV 核酸 Real-time RT-PCR 检测, 质控阴性对照及阳性对照典型扩增曲线示意图见图 E.1。

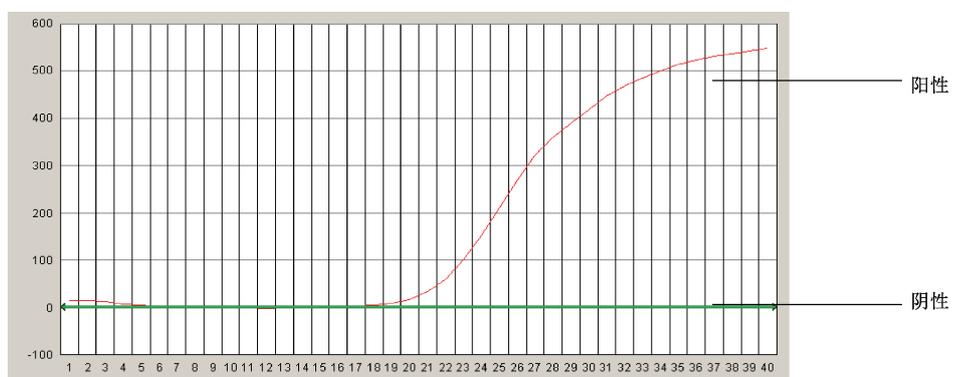


图 E.1 BVD/MDV 核酸 Real-time RT-PCR 典型扩增曲线示意图