



中华人民共和国国家标准

GB/T 39602—2020

牛结节性皮肤病诊断技术

Diagnostic techniques for Lumpy skin disease

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 缩略语 1

4 临床诊断 1

 4.1 易感动物 1

 4.2 临床症状 2

 4.3 病理变化 2

 4.4 结果判定 2

5 实验室诊断样品采集 2

 5.1 器材 2

 5.2 试剂 2

 5.3 样品采集 3

 5.4 样品的送检与保存 3

 5.5 样品处理 3

6 电镜观察 4

 6.1 器材 4

 6.2 试剂 4

 6.3 操作步骤 4

 6.4 结果判定 4

7 病毒分离与鉴定 4

 7.1 器材 4

 7.2 细胞与试剂 4

 7.3 病毒分离 5

 7.4 病毒鉴定 5

8 实时荧光聚合酶链式反应(实时荧光 PCR) 5

 8.1 器材 5

 8.2 试剂 5

 8.3 引物及探针 5

 8.4 标准毒株和细胞 6

 8.5 样品的处理 6

 8.6 病毒 DNA 的提取和纯化 6

 8.7 实时荧光 PCR 检测 6

 8.8 结果判定 7

9 聚合酶链式反应(普通 PCR 方法) 7

9.1 器材 7

9.2 试剂 7

9.3 引物 8

9.4 样本的制备 8

9.5 PCR 检测 8

9.6 结果判定 9

10 微量中和试验(VN) 9

10.1 器材 9

10.2 细胞株 9

10.3 标准毒株 9

10.4 操作步骤 9

10.5 阴阳性对照 10

10.6 结果判定 10

10.7 结果解释 10

11 综合判定 10

11.1 疑似 10

11.2 确诊 10

附录 A (规范性附录) 试剂的配制 11

附录 B (资料性附录) 引物扩增序列 14



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准对应于 OIE 最新公布的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2018 版)的 3.4.12 牛结节性皮肤病(LSD)有关内容,且与该条标准的一致性程度为非等效。

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:中华人民共和国重庆海关、中国动物卫生与流行病学中心、中华人民共和国上海海关、重庆澳龙生物制品有限公司。

本标准主要起草人:聂福平、李林、李应国、吴晓东、王昱、杨俊、樊晓旭、王国民、李贤良、南文龙、史梅梅、张雷、邹艳丽、王志亮、李键、冉智光。



引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及到 8.3 引物及探针中引物对 2 和探针 2 与《牛结节性皮肤病病毒野毒株 TaqMan-MGB 实时荧光定量 PCR 检测用引物、试剂盒及检测方法》相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人姓名:聂福平、王昱、杨俊、李贤良、王国民、李应国。

地址:重庆市江北区红黄路 8 号。

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。



牛结节性皮肤病诊断技术

1 范围

本标准规定了牛结节性皮肤病(LSD)的临床诊断、实验室诊断技术和程序。

本标准适用于牛结节性皮肤病的诊断。病毒分离与鉴定适用于个体动物移动前的无感染证明或临床病例确诊;电镜观察适用于临床病例确诊;实时荧光 PCR 与普通 PCR 适用于个体动物移动前的无感染证明、临床病例确诊和监测感染流行率;血清中和试验适用于个体动物移动前的无感染证明、确诊临床病例、监测感染流行率和免疫效果评估。

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 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE:细胞病变(Cytopathic effect)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

GMEM:生长营养需要培养基(Glasgow's Modified Eagle's Medium)

LSD:牛结节性皮肤病(Lumpy skin disease)

LSDV:牛结节性皮肤病病毒(Lumpy skin disease virus)

LTc:羔羊睾丸细胞(Lamb testis cell)

ORF:开放阅读框(Open reading frame)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

TCID₅₀:半数组织培养感染量(Median tissue culture infective dose)

Vero:非洲绿猴肾细胞(African green monkey kidney cell)

VN:病毒中和试验(Virus neutralisation test)

4 临床诊断

4.1 易感动物

各种品种的牛,包括黄牛、奶牛、亚洲水牛、瘤牛、牦牛均易感,绵羊、山羊及野生动物长颈鹿、黑斑羚、长角羚羊可人工感染。



4.2 临床症状

4.2.1 易感动物体温升高达 41 ℃,持续 1 周~2 周;鼻炎、结膜炎和唾液过度分泌;厌食,精神委顿,不愿行走,泌乳奶牛产奶量显著减少。

4.2.2 易感动物全身皮肤、黏膜出现结节,以头、颈、乳房、腿部、背部、胸部、阴囊、外阴、会阴、眼睑、耳梢、口鼻黏膜及尾部尤为突出,结节大小不等,可聚成不规则的肿块,可波及全身皮肤、皮下组织、肌肉组织。

4.2.3 易感动物口腔和消化道黏膜表面形成丘疹;全身体表淋巴结肿大;眼、鼻、口、直肠、乳房和生殖器黏膜表面形成结节,并迅速溃烂。

4.2.4 母牛流产与暂时性不孕;公牛罹患睾丸炎和附睾炎,暂时性或终生不育。

4.3 病理变化

4.3.1 患病动物皮肤表面可见直径 0.5 cm~5 cm、深度 1 cm~2 cm 的皮肤结节,累及所有皮肤层、皮下组织以及相邻的肌肉,并伴有充血、出血、水肿、血管炎和坏死;口腔、气管、生殖道和消化道黏膜(特别是皱胃)可能存在结节。

4.3.2 皮肤、肌肉等结节附近发生炎症反应,结节下、黏膜下、结缔组织或周围组织有浆液性渗出,皮下组织水肿;咽、呼吸道、消化道、包皮、阴道、子宫壁的病变也有此特点。

4.3.3 咽、舌和会厌以及整个消化道黏膜出现痘样病变。鼻腔、气管和肺等黏膜出现痘样病变;睾丸和膀胱出现痘样病变。

4.3.4 结节切面为乳白色或白色,初期可渗出血清,2 周内结节内可能出现锥形中央核或坏死组织/坏死灶。

4.4 结果判定

4.4.1 易感动物出现上述临床症状和病理变化,可判为疑似牛结节性皮肤病。

4.4.2 确诊应采集有临床症状动物的结节、抗凝血进行实验室诊断,或采集未见明显临床症状易感动物的抗凝血、唾液、鼻眼分泌物进行实验室诊断。

5 实验室诊断样品采集

5.1 器材

5.1.1 手术剪刀和镊子。

5.1.2 灭菌样品保存管(15 mL 或 50 mL)。

5.1.3 离心管(2 mL,10 mL)。

5.1.4 10 mL~20 mL 灭菌注射器。

5.1.5 防水标签。

5.1.6 医用防护服。

5.1.7 组织匀浆器。

5.1.8 高速组织匀浆机。

5.2 试剂

5.2.1 0.1 mol/L PBS(pH7.4),按照附录 A 的 A.1 配制。

5.2.2 10%甘油-PBS 保存液,按照 A.2 配制。

5.2.3 青霉素,终浓度为 1 000 IU/mL。

- 5.2.4 硫酸链霉素,终浓度为 1 mg/mL。
- 5.2.5 制霉菌素,终浓度为 100 IU/mL。
- 5.2.6 两性霉素 B,终浓度为 2.5 μ g/mL。
- 5.2.7 新霉素,终浓度为 200 IU/mL。
- 5.2.8 GMEM 培养基。

5.3 样品采集

5.3.1 皮肤结节采集

用 0.1 mol/L PBS(pH7.4)清洗皮肤结节表面,然后用灭菌手术剪刀剪取结节,2 g~5 g 为宜。采集到的皮肤结节装入样品保存管,加 10%甘油-PBS 保存液,使保存液液面没过样品,加盖封口,冷冻保存。

5.3.2 组织样品采集

除皮肤结节外,在活体检查或死后剖检时,可采集淋巴结、病变肺部组织、脾、脏器上的病变结节及病灶周围组织 2 g~5 g,装入样品保存管,加 10%甘油-PBS 保存液,使保存液液面没过样品,加盖封口,冷冻保存。临床表现健康,但需要做牛结节性皮肤病病原学监测的动物,可在屠宰时采集 EDTA 抗凝全血、淋巴结。对肉品进行牛结节性皮肤病病原检测时,可采集肌肉组织样品不少于 2 g,装入样品保存管中,密封、冷冻保存。

5.3.3 其他类型样品采集

活体检查,可采集病牛的皮肤结节或结痂周围组织病料,唾液、口腔/鼻腔拭子、牛奶、精液、抗凝血(含 EDTA 或肝素钠)等。采集动物血液,每头应不少于 2 mL。用于血清分离的血液样品,每头应不少于 5 mL。采集的唾液、口腔/鼻腔拭子应立即装入样品保存管,加入 0.5 mL 的 10%甘油-PBS 保存液,加盖封口,冷冻保存。

5.4 样品的送检与保存

样品的运送与保存应满足 NY/T 541 的相关要求。从抗凝血中分离血浆(即棕黄层)样品需立即置于冰上,尽快处理。样品可在 4 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存 2 d。用于病毒分离和抗原检测的组织样品需置于 4 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C、冰封或-20 $^{\circ}$ C 保存。长距离运输样品(无冷链)样品保存液中需含 10%甘油,且样品体积需足够大(按每克样品添加 10 mL 10%甘油-PBS 保存液),避免运输介质渗透到组织样品中。

5.5 样品处理

5.5.1 生物安全措施

样品制备的生物安全措施应满足 GB 19489 的规定。

5.5.2 组织病料的处理

用于病毒分离和抗原检测的病灶样品,无菌剪碎后,加入等体积的无菌 PBS 或含抗生素(含 1 000 IU/mL 的青霉素、1 mg/mL 的硫酸链霉素和 100 IU/mL 的制霉菌素或 2.5 μ g/mL 的两性霉素 B 和 200 IU/mL 的新霉素)的无血清 GMEM 培养基,无菌研磨,制成 10%的组织悬液,制成的悬液反复冻融 3 次后,以 800 g 离心 10 min。上清液用 0.22 μ m 的滤器过滤,可用于病毒培养等。

5.5.3 血液样品的处理

采集的抗凝血,800 g 离心 15 min,小心吸取上清液中含病毒的棕黄层血浆,将其转移至 5 mL 预

冷去离子水中,30 s 后,加入 5 mL 预冷的双倍浓度的 GMEM 培养基,混匀。混合液以 800 *g* 离心 15 min,弃去上清,用 5 mL GMEM 培养基悬浮细胞沉淀,再以 800 *g* 离心 15 min,最后用 5 mL 新鲜的 GMEM 培养基悬浮沉淀,用于病毒分离培养。

6 电镜观察

6.1 器材

- 6.1.1 透射电子显微镜。
- 6.1.2 台式冷冻离心机。
- 6.1.3 微型振荡器。
- 6.1.4 石蜡膜或蜡板。
- 6.1.5 微量移液器。

6.2 试剂

- 6.2.1 Tris-EDTA 缓冲液(pH7.8),按照 A.3 配制。
- 6.2.2 2% 磷钨酸溶液(pH7.2),按照 A.4 配制。

6.3 操作步骤

取患病动物新鲜的皮肤结节或其他活体组织,制备组织悬液,采用透射电子显微镜观察。取一滴制备的悬液于石蜡膜或蜡板或载玻片上,将约 38 μm (即 400 目)碳网膜漂覆于悬滴液上 1 min,再将碳网膜转移到一滴 Tris-EDTA 缓冲液(pH7.8)中 20 s,接着转到一滴 2% 的磷钨酸溶液(pH 7.2)中染色 10 s。取出碳网膜,用滤纸吸去膜上液体,自然干燥后,置于电子显微镜下观察。

6.4 结果判定



牛结节性皮肤病病毒粒子如砖状,周围覆盖有短管状结构,大小约为 290 nm $\times$ 270 nm,部分病毒粒子周围有宿主细胞膜包围。

7 病毒分离与鉴定

7.1 器材

- 7.1.1 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。
- 7.1.2 超低温冰箱。
- 7.1.3 台式冷冻离心机。
- 7.1.4 生物 II 型安全柜。
- 7.1.5 二氧化碳培养箱。
- 7.1.6 倒置显微镜。
- 7.1.7 微量移液器(5 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL 等不同规格)。
- 7.1.8 细胞培养板,或 25 cm^2 细胞培养瓶。

7.2 细胞与试剂

- 7.2.1 山羊或绵羊原代(或次代)LTc。
- 7.2.2 GMEM 培养液。

7.2.3 胎牛血清。

7.2.4 苏木精-伊红染色液,按照 A.5 配制。

7.3 病毒分离

取 5.5.2 或 5.5.3 中处理后的病料上清液或棕黄层液体 1 mL,接种 25 cm² 培养瓶中的单层 LTc, 37 °C 吸附 1 h,补加 10 mL 含有 2 % 胎牛血清的 GMEM 培养液,或用含有 LT 细胞和爬片的组织培养液。逐日观察 CPE 情况,持续观察 7 d~14 d。出现细胞膜皱缩至细胞圆缩、核染色体边缘化等 CPE,感染初期可见小面积的 CPE,4 d~6 d 后波及整个细胞层,14 d 后如未发现 CPE,应将培养物反复冻融 3 次,取上清液再接种单层 LT 细胞,进行二次培养。细胞出现 CPE 或感染爬片出现 CPE,则进行病毒特异性鉴定。

7.4 病毒鉴定

7.4.1 典型细胞病变如 7.3 所述。若培养液中含有特异性牛结节性皮肤病抗体,CPE 可能被阻止或推迟。

7.4.2 取 7.3 中细胞培养物,用丙酮固定,进行苏木精-伊红染色(即 H&E 染色)观察。当观察到直径相当于细胞核一半、大小不一,且周边有清晰的亮红色嗜酸性细胞浆内包涵体,即可诊断为痘病毒感染。

7.4.3 或取 7.3 所述细胞培养物提取 DNA,采用聚合酶链式反应,扩增、测序分析,可鉴别诊断牛结节性皮肤病病毒;或采用实时荧光聚合酶链式反应进行牛结节性皮肤病病毒核酸检测。

8 实时荧光聚合酶链式反应(实时荧光 PCR)

8.1 器材

8.1.1 微量高速离心机。

8.1.2 生物 II 型安全柜。

8.1.3 微型震荡器。

8.1.4 恒温水浴锅。

8.1.5 高压灭菌锅。

8.1.6 低温冰箱。

8.1.7 实时荧光 PCR 仪。

8.1.8 微量可调移液器(0.5 μL~10 μL、5 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)及配套吸头。

8.2 试剂

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂,水应符合 GB/T 6682 中规定的三级水的规格。

8.2.1 Premix Ex Taq(Probe qPCR)荧光 PCR 缓冲液。

8.2.2 营养液,按照 A.7 配制。

8.2.3 维持液,按照 A.8 配制。

8.2.4 细胞分散液,按照 A.9 配制。

8.2.5 商品化微量病毒核酸提取试剂盒或其他商品化试剂盒。

8.3 引物及探针

根据牛结节性皮肤病病毒的标准株 Neethling 株基因序列(ORF101 和 ORF126 基因,Genbank 登录号:AF 409137.1),在其保守区域分别设计引物和探针,引物及探针序列见 B.1。引物对 1(F1 和 R1)

与探针 1 用于通用型 LSDV 核酸检测,引物对 2(F2 和 R2)和探针 2 用于野生型和疫苗型 LSDV 核酸的鉴别。具体扩增基因信息见附录 B 中 B.1。引物与探针均用无菌去离子水配制成 10 $\mu\text{mol/L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

8.4 标准毒株和细胞

8.4.1 标准毒株:以 LSDV 国际标准毒株 Neethling 株为试验参照毒株。

8.4.2 细胞:无菌取健康羔羊睾丸,制备原代睾丸细胞。

8.4.3 阳性对照样品:由指定单位提供或按照下列方法制备,将牛结节性皮肤病病毒国际标准毒株按 10%(体积分数)接种原代睾丸细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h 后补加入细胞维持液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养,待 CPE 达到 70%以上,收获病毒悬液;反复冻融 3 次~4 次,12 000 g 离心 10 min,取上清液备用。

8.4.4 阴性对照样品:由指定单位提供或按照下列方法制备:将正常的原代睾丸细胞,反复冻融 3 次~4 次,12 000 g 离心 10 min,取上清液备用。

8.5 样品的处理

取 5.3 采集的临床样品,包括皮肤、肺、脾脏、淋巴结、肌肉等,取 2 g~5 g 组织样品切成小块,加入 5 mL~10 mL 预冷的 PBS 缓冲液匀浆 2 min,制成悬液,反复冻融 3 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 10 min,取 200 μL 上清液进行核酸提取。

液体样品(包括抗凝血、精液、细胞培养液等):直接取 200 μL 进行核酸提取。

8.6 病毒 DNA 的提取和纯化

核酸提取应在生物安全柜中进行,取阴性、阳性对照和 8.5 中前处理的样品各 200 μL ,按照传统酚/三氯甲烷(氯仿)抽提法提取核酸,或采用等效的 DNA 提取试剂盒及其方法进行病毒核酸提取。

8.7 实时荧光 PCR 检测

8.7.1 实时荧光 PCR 反应体系

检测牛结节性皮肤病病毒实时荧光 PCR 体系见表 1。以牛结节性皮肤病病毒 DNA 作为阳性对照,以不含 LSDV 的牛肉组织、原代睾丸细胞 DNA 作为阴性对照,以灭菌去离子水作为空白对照。

表 1 实时荧光 PCR 反应体系^a

名称	贮备液浓度	体系工作液浓度	加样体积/ μL
Premix Ex Taq 缓冲液	2×	1.2×	15
正向引物	10 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1
反向引物	10 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1
MGB 探针	10 $\mu\text{mol/L}$	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.5
模板 DNA	—	—	5
灭菌去离子水	—	—	2.5
反应体系总体积	—	—	25
^a 实时荧光 PCR 反应体系可根据实际情况进行相应比例的调整。			

8.7.2 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,共 45 个循环,58 $^{\circ}\text{C}$ 34 s 收集

FAM 荧光信号。

8.8 结果判定

8.8.1 结果分析

读取检测结果,阈值设定原则以阈值线超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为准。不同仪器可根据仪器噪声进行调整。

8.8.2 质控标准

阴性对照的检测结果显示无特异性扩增,阳性对照的 Ct 值应 <28.0 。

8.8.3 结果描述及判定



8.8.3.1 阳性

Ct 值 <40 ,且出现明显的 S 扩增曲线,表明样品中存在牛结节性皮肤病病毒核酸。

8.8.3.2 阴性

无特异性扩增曲线或 Ct 值 >45 ,表明样品中无牛结节性皮肤病病毒核酸。

8.8.3.3 有效原则

$40.0 \leq \text{Ct 值} \leq 45.0$ 的样本应重做,重做结果无特异性扩增或 Ct 值 >45 则为阴性;反之,有 Ct 值且有明显扩增曲线则为阳性。

9 聚合酶链式反应(普通 PCR 方法)

9.1 器材

9.1.1 PCR 仪。

9.1.2 台式低温高速离心机。

9.1.3 生物 II 型安全柜。

9.1.4 低温冰箱。

9.1.5 微型震荡器。

9.1.6 恒温水浴锅。

9.1.7 高压灭菌锅。

9.1.8 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

9.1.9 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。

9.1.10 微量可调移液器($0.5 \mu\text{L} \sim 10 \mu\text{L}$ 、 $5 \mu\text{L} \sim 20 \mu\text{L}$ 、 $20 \mu\text{L} \sim 200 \mu\text{L}$ 、 $100 \mu\text{L} \sim 1\,000 \mu\text{L}$)及配套吸头。

9.1.11 1.5 mL 离心管。

9.1.12 PCR 扩增管。

9.2 试剂

以下所用的试剂,除特别注明者外均为分析纯试剂,水应符合 GB/T 6682 中规定的三级水的规格。

9.2.1 Premix Ex Taq PCR 缓冲液。

9.2.2 商品化微量病毒核酸提取试剂盒或其他商品化试剂盒。

9.2.3 1×TAE 电泳缓冲液。

9.2.4 琼脂糖。

9.2.5 电泳加样缓冲液。

9.2.6 DNA 2000 Marker(标准分子量)。

9.3 引物

上游引物 F:5'-CCTCCTTTTAAGCTACTTTTCTTA -3'；

下游引物 R:5'- GATACATGTAGGAACATTGTTACCTA-3'。

具体扩增基因信息参见 B.2。用灭菌去离子水配制成 10 μmol/L 使用工作液，-20 ℃ 保存。

9.4 样本的制备

阴性对照、阳性对照、样本的处理、核酸提取均同 8.4~8.6。

9.5 PCR 检测

9.5.1 PCR 反应体系

检测牛结节性皮肤病病毒普通 PCR 反应体系见表 2。以牛结节性皮肤病病毒 DNA 作为阳性对照，以不含 LSDV 的牛肉组织、原代睾丸细胞 DNA 作为阴性对照，以灭菌去离子水作为空白对照。

表 2 普通 PCR 反应体系^a

名称	贮备液浓度	体系工作液浓度	加样体积/μL
2×Premix Ex Taq 缓冲液	2×	1×	12.5
正向引物	10 μmol/L	0.04 μmol/L	1
反向引物	10 μmol/L	0.04 μmol/L	1
模板 DNA	—	—	2
灭菌去离子水	—	—	8.5
反应体系总体积	—	—	25
^a PCR 反应体系可根据实际情况进行相应比例的调整。			

9.5.2 PCR 反应条件

PCR 检测的循环参数:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环,72 ℃ 延伸 5 min。

9.5.3 扩增产物电泳检测

9.5.3.1 1.5%琼脂糖凝胶的制备:称取 1.5 g 琼脂糖,加入 100 mL 1×TAE 缓冲液中。加热融化后加 5 μL(10 mg/mL)GoodView™,混匀后倒入凝胶盘中,胶厚 5 mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子,待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔),放入电泳槽中,加 1×TAE 缓冲液淹没胶面。

9.5.3.2 加样:取 5 μL PCR 扩增产物与 1 μL 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳时加标准 DNA Marker、阴性对照、阳性对照。

9.5.3.3 电泳:电压 80 V~100 V,或电流 40 mA~50 mA。电泳 30 min~40 min。

9.6 结果判定

9.6.1 试验成立条件

电泳结束,取其凝胶置凝胶成像仪的紫外灯下观察。阳性样品电泳结果应有一条大小为 376 bp 的条带。阴性对照无扩增条带;反之,此次实验视为无效。

9.6.2 阴阳性结果判定

符合 9.6.1 的条件,被检测样品若出现 376 bp 大小条带则为牛结节性皮肤病病毒核酸阳性;被检测样品无特异性扩增条带,判为牛结节性皮肤病病毒核酸阴性。检测为核酸阳性的样品,其 PCR 产物应送测序公司进行测序分析,将测序结果与 NCBI 登录序列信息进行比较,序列一致性达 97% 以上,则判定为牛结节性皮肤病病毒核酸阳性。

10 微量中和试验(VN)

10.1 器材

10.1.1 二氧化碳培养箱。

10.1.2 倒置显微镜。

10.1.3 96 孔细胞培养板。

10.1.4 微量可调移液器及配套吸头。

10.2 细胞株

Vero 细胞或 LT 细胞。

10.3 标准毒株

山羊痘病毒标准株:0240 KSGP 疫苗株,滴度大于 $6 \lg \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

10.4 操作步骤

10.4.1 待测血清(包括阳性、阴性对照)按 1 : 5 的比例用 Eagle's/HEPES 营养液稀释, 56°C 灭活 30 min。

10.4.2 $50 \mu\text{L}$ 已灭活的血清按照如下顺序加样:第 1 份灭活待测血清加入到 96 孔细胞培养板 A 行~H 行的纵向 1 列和 2 列中,第 2 份灭活待测血清加入到 A 行~H 行的 3 列、4 列;第 3 份灭活待测血清加入到 A 行~H 行的 5 列和 6 列;阳性血清加入到 A 行~H 行的 7 列和 8 列,阴性血清加入 A 行~H 行的 9 列和 10 列, $50 \mu\text{L}$ 无血清的 Eagle's/HEPES 营养液加入到 A 行~H 行的 11 列、12 列。

10.4.3 取山羊痘病毒标准参考毒株(滴度大于 $6 \lg \text{TCID}_{50}/\text{mL}$),用 Eagle's/HEPES 营养液稀释,梯度依次为 $5.0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $4.0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $3.5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $3.0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $2.5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $2.0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $1.5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ (相当于每 $50 \mu\text{L}$ 的病毒含量为 $3.7 \lg \text{TCID}_{50}$ 、 $2.7 \lg \text{TCID}_{50}$ 、 $2.2 \lg \text{TCID}_{50}$ 、 $1.7 \lg \text{TCID}_{50}$ 、 $1.2 \lg \text{TCID}_{50}$ 、 $0.7 \lg \text{TCID}_{50}$ 、 $0.2 \lg \text{TCID}_{50}$)。

10.4.4 从稀释度最高的 G 行开始,每孔加入不同稀释度的 $50 \mu\text{L}$ 病毒液。每个稀释度病毒均重复操作直至病毒浓度最高的 A 行。

10.4.5 将 96 孔细胞培养板置 5% 的二氧化碳培养箱 37°C 孵育 1 h。

10.4.6 将预先培养好的 LT 单层细胞用 Eagle's 培养液(含有抗生素和 2% 胎牛血清)制备成细胞数为 10^5 个/mL 的细胞悬液。除 H 行的 11 孔和 12 孔作为培养液对照外,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液。

H 行剩余其他各孔(即 H 行的 1 孔~10 孔)作为细胞和血清对照孔。

10.4.7 将制备好的 96 孔细胞培养板放置于 5% 的二氧化碳培养箱 37 °C 培养 9 d,从第 4 天起,逐日观察 CPE 情况。H 行的细胞孔应不出现 CPE。第 9 天进行结果判读,按照 Spearman-Kärber 方法计算每个重复滴度的病毒滴度。

10.4.8 同时做山羊痘病毒回归试验以测定病毒实际 TCID₅₀。

10.5 阴阳性对照

10.5.1 阳性血清和阴性血清均按被检测血清进行测定。

10.5.2 病毒回归试验,即重新测定病毒的 TCID₅₀,将病毒培养液做 10 倍系列稀释至 10⁻⁸,每个稀释度加 4 孔,每孔加 50 μL,补加 50 μL 培养液,再加入细胞悬液 100 μL,计算试验所用 50 μL 病毒液含有实际的 TCID₅₀。

10.6 结果判定



10.6.1 用倒置显微镜从第 4 天起每天观察 CPE 变化,当病毒培养物对照、阴性血清对照均出现 CPE,阳性血清对照无 CPE,待检血清对细胞无毒性,对照细胞生长正常,病毒实际用量在 50 TCID₅₀/50 μL~150 TCID₅₀/50 μL 范围内方能判定结果,第 9 天终判,抗体效价滴定判读标准是以待检血清最高稀释度 50% 保护为该待检血清的中和效价,以能保护细胞免于破坏的血清最高稀释度为该血清滴度。

10.6.2 中和指数以阴性对照血清与试验血清的病毒滴度的对数差(log)来表示,中和指数大于或等于 1:5 为阳性,小于 1:5 为阴性。

10.6.3 每次试验,阳性对照血清滴度不应比其已知效价差 1 个滴度以上,回归滴度变化应在 50 TCID₅₀~150 TCID₅₀ 之间。

10.7 结果解释

10.7.1 血清中和试验是羊痘病毒属病毒最特异的血清学试验方法,但 LSD 感染后主要是细胞免疫,动物感染 LSD 病毒后仅产生低水平的中和抗体,因此在采用中和试验结果的同时,需结合临床症状等指标做最终判定。

10.7.2 但若是检查同一动物感染前和感染后的血清,则以微量血清中和试验更敏感。临床症状出现后第 2 天则可检测到羊痘病毒抗体,持续约 7 个月,均可检出抗体,但在第 21 天~第 42 天抗体滴度明显升高。

11 综合判定

11.1 疑似

凡符合 LSD 流行病学特点,具有第 4 章临床诊断特点的病例,可判为牛结节性皮肤病疑似病例。

11.2 确诊

11.2.1 临床判定为疑似的易感动物,经电镜观察(见第 6 章)发现牛结节性皮肤病病毒,或经病毒分离(见第 7 章)分离出牛结节性皮肤病病毒,或经实时荧光 PCR(见第 8 章)、普通 PCR(见第 9 章)任一项检测出牛结节性皮肤病病毒核酸的,可判为牛结节性皮肤病发病。

11.2.2 临床无明显特异症状的非免疫动物经病毒中和试验(见第 10 章)检测出抗体阳性,可判为该动物曾经疑似感染过牛结节性皮肤病病毒,需结合其他方法进行综合确诊。

11.2.3 临床无明显特异症状的易感动物,经第 6 章、第 7 章、第 8 章、第 9 章中任一项检测出阳性的,可判为牛结节性皮肤病带毒(潜伏感染或持续感染)。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 pH 7.0 PBS

A 液：氯化钠(NaCl)	8.0 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
氯化钙(CaCl ₂ · 2H ₂ O)	0.132 g
氯化镁(MgCl ₂ · 2H ₂ O)	0.1 g
去离子水	100 mL
B 液：磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	1.15 g
磷酸二氢钾(KH ₂ · PO ₄)	0.2 g
去离子水	200 mL

依次称取各试剂并依次溶解在去离子水中。以 0.104 MPa~0.112 MPa 15 min 高压灭菌 A 液和 B 液。冷却后,将 B 液缓慢倒入 A 液中搅拌均匀。分装于 500 mL~1 000 mL 灭菌瓶中。取 1 mL~5 mL 接于营养肉汤(NB)中进行无菌检验。贮存于 4 ℃或室温。

A.2 10%甘油运输液

Hank's 平衡盐 10 倍浓缩液：	
氯化钠(NaCl)	80 g
氯化钾(KCl)	4.0 g
硫酸镁(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	1.0 g
氯化镁(MgCl ₂ · 6H ₂ O)	1.0 g
氯化钙(CaCl ₂)	1.4 g
葡萄糖	10 g
去离子水	800 mL

配制方法:依照以上顺序称取各试剂,并依次溶解于去离子水中,定容至 1 000 mL,分装,高压灭菌。贮存于室温或 4 ℃。

复合抗生素:青霉素钠盐 1 000 IU/mL,硫酸链霉素 1 mg/mL,制霉菌素 100 IU/mL,或两性霉素 2.5 μg/mL 和新霉素 200 IU/mL。

使用前,取 Hank's 平衡盐 10 倍浓缩液,用灭菌双蒸水稀释至 1 倍工作液,并含复合抗生素及 10% 甘油,即为 10%甘油运输液。

A.3 Tris-EDTA 缓冲液(pH 7.8)

A.3.1 0.05 mol/L Tris 缓冲液(pH7.8)的配制

将 50 mL 0.1 mol/L Tris 碱溶液与 34.5 mL 0.1 mol/L 盐酸混合,加去离子水定容至 100 mL。

A.3.2 Tris-EDTA 缓冲液(pH 7.8)的配制

0.01 mol/L Tris 缓冲液(pH 7.8)与 0.001 mol/L EDTA(pH8.0)等体积混合。

A.4 2%磷钨酸溶液(pH7.2)

取 20 mL 磷钨酸加入 800 mL 去离子水中,调节 pH 值至 7.2 备用。

A.5 苏木精-伊红染色液

苏木精	1 g
氧化汞	0.5 g
乙醇	10 mL
硫酸铝钾(或硫酸铝铵)	20 g
去离子水	200 mL

配制:在乙醇内溶解苏木精,在水内溶解硫酸铝钾,加热助溶;混合苏木精和硫酸铝钾溶液,尽快煮沸;加入氧化汞,此时溶液变成深紫色;在自来水中迅速冷却;滤纸过滤,装入瓶中,盖紧,室温保存。

使用方法¹⁾:制备涂片在空气中干燥,用磷酸缓冲液洗 3 次,以去除蛋白;在 Zenker's 液(配方见 A.6)中固定 12 h~36 h;自来水中洗 30 min;80%乙醇中脱水;转到 0.5%碘液(95%乙醇配制)5 min;转到 0.5%硫代硫酸钠水溶液中 5 min;在自来水中洗 5 min,用苏木精染色 10 min,在稀释的氨水中分化,直到呈蓝色(约 10 min);用 0.5%伊红复染 2 s~5 s;在三缸 95%乙醇中脱水(即 3 次),然后快速转到两缸纯乙醇(即 2 次);在二甲苯中脱脂 2 次,每次 2 min~5 min;用中性香胶固封。

A.6 Zenker's 液

氯化汞	70 g
硫酸钠	10 g
次氯酸钾	25 g
去离子水	1 000 mL

配制方法:将上述盐类溶于水中(加温),室温保存。使用前加冰乙酸使其最终浓度为 5%。

使用方法²⁾:切组织块(厚 3 mm~4 mm),根据组织块大小固定 6 h~8 h,用自来水冲洗过夜或每 1 h~2 h 换水一次,共 2 次~3 次,组织保存于 70%乙醇中。

A.7 营养液

GMEM 培养基添加 10%无 LSDV 抗体的胎牛血清,内含青霉素 200 IU/mL,链霉素 200 IU/mL,过滤除菌。

A.8 维持液

GMEM 培养基添加 2%无 LSDV 抗体胎牛血清,内含青霉素 200 IU/mL,链霉素 200 IU/mL,过滤除菌。

-
- 1) 此法用于观察细胞在体外感染后的一般形态,显示细胞的变化,融合细胞形成及细胞内包涵体,嗜酸性包涵体染成亮红色。
 - 2) 此液固定的组织,细胞核与细胞质的染色较清晰,也较稳定。

A.9 细胞分散液

胰酶	2.50 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA)	0.20 g
无钙镁 PBS	1 000 mL
0.22 μm 滤膜过滤除菌, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。	



附 录 B
(资料性附录)
引物扩增序列

B.1 牛结节性皮肤病病毒特异性片段序列(实时荧光 PCR)

引物 F1:5'-TGAATTAGTGTGTTGTTTCTTC-3',引物 R1:5'-GGGAATCCTCAAGATAGTTTCG-3',探针 1:5'-FAM-TGCCGCAAAATGTCGA-MGB-3';引物 F2:5'-ATTTAATTTGGGACGATAA-CAACG-3',引物 R2:5'-GTTGTTACAACCTCAAATCGTTAGG-3',探针 2:5'-FAM-ACCACCTA-ATGATAG-MGB-3'。

引物对 1(F1 和 R1)扩增序列:

TGAATTAGTGTGTTGTTTCTTCAT**CGACATTTTGC****GGCAACGA**ACTATCTTGAGGATTCCC

引物对 2(F2 和 R2)扩增序列:

ATTTAATTTGGGACGATAACAACGTTTATGATTT**ACCACCTAATGATAGT**GTGTTTATGAT
TTACCACCTAACGATTGAGTTGTAACAAC

注:下划线为引物匹配位置,下划线黑体为探针匹配位置。

B.2 牛结节性皮肤病病毒特异性片段序列(普通 PCR)

CCTCCTTTTAAGCTACTTTTTCTTATTTTTGTACGGAAACGTGTTTGTCAAATCTGAC
TATAACTATTTAATGTATAAGATAAATGTTTTTAAAAACAATGAAAGTACTATCAAGTG
CTATCATAATAATGATATTATTTTTTTATCAGATGATTGCGTAAGCTTTAACTCTACATA
TAATACAACCTGTTTTAAACAATGATGATGTTAAACTGAACTTGTTACATTGTGTGATGT
ATCTAAAGAAGTACAAATATTCTCTCTCGACAATTCTTATACTGGTCTATTTTTAACTTT
TTTATGCAATAATAACGATAGTTATTGGTTTGTGATATTTTAGAAAATGGAATAGGTA
ACAATGTTCTACATGTATC
