

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 906—2004

牛瘟诊断技术

Diagnosis techniques for rinderpest

2005-01-04 发布

2005-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人：张仲秋、支海兵、陈先国、吴华伟。

牛瘟诊断技术

1 范围

本标准规定了牛类家畜的牛瘟诊断技术。

本标准适用于牛瘟的临床诊断、诊断样品的采集和运输、病原学诊断、血清学诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注明日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准。然而鼓励本标准达到协议的各方研究是否使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

OIE 2000 诊断试验和疫苗标准手册 2.1.4 章《牛瘟》。

FAO 牛瘟诊断手册第二版。

3 牛瘟的临床诊断

3.1 牛瘟的临床症状

3.1.1 牛瘟的潜伏期约为1周~2周,第一个临床特征是急性发热,高热维持在40℃~41.5℃之间。此时,可出现明显的前驱症状,表现为精神沉郁及鼻镜干燥,并伴有食欲减退、便秘、可视黏膜充血,口、鼻大量流涎。

3.1.2 高热期间,在下唇和齿龈出现隆起的、苍白的、针尖大小的上皮坏死斑点,随后很快出现在下齿龈和牙床的边缘,舌下、颊部及颊部的乳突和硬腭部位,通过病灶的扩大,形成新的病灶,2 d~3 d后,出现大片口腔坏死,大量的坏死物质脱落形成浅表的、不出血的黏膜糜烂。

3.1.3 牛瘟的第二个特征是发生剧烈喷射状腹泻。在口腔病变发作后1 d~2 d,起初腹泻量大而稀,呈喷射状;稍后便含有黏液、血液和上皮碎屑,并伴有里急后重。

3.1.4 在糜烂期里,可在鼻孔、阴门和阴道以及阴茎的包皮鞘看到坏死。以后,食欲废绝,鼻镜完全干裂,动物极度沉郁,眼和鼻有黏液脓性分泌物。

3.1.5 在疾病末期,呼吸出恶臭气味,动物可能24 h~28 h躺倒不动。此时,呼吸急促并经常可见到呼气伴有低沉的呼噜声。

3.1.6 当出现严重坏死、高热、腹泻或类似症状时,一旦体温下降,并降到正常体温之下,动物就可能死亡。有的糜烂期的非典型病例也可能高热减退。2 d~3 d后口腔损伤迅速消失,腹泻停止,很快转入正常并康复。

3.1.7 当在畜群中出现以上症状的病畜及急性死亡病畜时,即可怀疑为牛瘟并对症状典型的病畜进行病理解剖。

3.2 牛瘟的病理变化

3.2.1 典型病例,尸体外观呈脱水、消瘦、污秽。鼻和嘴角可能有黏液性分泌物,眼凹陷、结膜充血。

3.2.2 口腔常有大面积坏死的上皮皮屑,坏死区轮廓鲜明,与毗邻的健康黏膜区分清楚。病变常可延伸到软腭,也可能蔓延到喉头和食道上部。

3.2.3 瘤胃、网胃和瓣胃常不受影响,但偶尔可在瘤胃上见到坏死斑。真胃,特别是幽门区受到严重侵害,表现为充血、淤斑和黏膜下水肿,上皮坏死使黏膜呈石板样颜色。

3.2.4 小肠除在集合淋巴结处有淋巴样坏死和腐肉脱落,形成充血的黑色的结缔组织等变化外,其他

不受影响。

3.2.5 大肠病变包括:回盲瓣、盲肠扁桃体和盲肠皱褶出现高度充血。病期较长的颜色变色,形成斑马状条纹。

4 牛瘟诊断样品的采集和运输

按照一类传染病的采样防护要求采集以下样品。

4.1 活畜组织样品的采集

4.1.1 淋巴结的采集

用手在皮肤外将选用的外周淋巴结固定后,用套管针穿刺到淋巴结实质部,采集淋巴结组织块。将采集的组织块放入适当的容器中,加入 0.5 mL~1 mL 运输保存液,低温保存并运往实验室。

4.1.2 齿龈组织碎片的采集

将齿龈上的坏死组织膜碎片用刮勺或戴有橡胶手套的手指采集到适当的容器中。用于分子学诊断的样品应保存在 0.5 mL~1 mL PBSA 中。

4.1.3 泪液的采集

用棉签或棉拭子在眼睑内的结膜囊内吸取泪液后,将棉签或棉拭子折断放入 2 mL 灭菌注射器的针筒中,加入 150 μ L PBSA,再将泪液压挤到适当的容器中。

用于分子学诊断的泪液样品,将吸有泪液的棉签或棉拭子头剪下浸入 0.5 mL~1 mL PBSA 中。

4.1.4 抗凝血的采集

通过颈静脉将病畜血液采集到含有适当抗凝剂,如 EDTA 或肝素的容器中,轻摇均匀,低温保存,但不能结冻。

4.1.5 血清的采集

通过颈静脉将病牛血液采集到采血管中或适当的灭菌容器中,血液凝固至少 24 h 后,分离血清。

4.1.6 从活畜采集的所有样品均应低温保存,组织样品应放入 PBSA 运输保存液中(附录 A.1、运输液中不得含有甘油)。

用于分离病毒的样品应尽快地运送到实验室。在运输途中应低温保存,但不要冻结如果样品需要长期保存,则应 -70 $^{\circ}$ C 保存。

4.2 死亡动物样品的采集

4.2.1 对于怀疑牛瘟尚未死亡的患畜,至少应屠宰两头病畜,解剖后仔细检查病理变化并采集样品。

4.2.2 屠宰病畜时应选择清洁的屠宰地点,防止对尸体、器官和组织造成污染。

4.2.3 解剖后,无菌采集脾脏、淋巴结,特别是应采集肠系膜淋巴结,食道、呼吸道、尿道黏膜,扁桃体组织。将采集的样品放入适当的容器中,容器周围应加入冰块,低温运往实验室。

4.2.4 对于已经死亡的动物,应尽快在尸体新鲜时进行解剖并采集脾脏、肠系膜淋巴结、扁桃体、食道,呼吸道、尿道黏膜组织,并如前保存和运输。

4.3 牛瘟的样品采集和运输程序

对于牛瘟流行进行诊断的基本步骤如下:

4.3.1 对全群动物进行检查并至少选择 6 头早期急性期病畜。

4.3.2 选出的 6 头动物,每头均应采集适当的组织样品,而且至少应屠宰 2 头病畜,采集脏器标本。

4.3.3 对死亡病畜逐头进行解剖并采集适当的样本。

4.3.4 对于采集的样本,可采用免疫捕获 ELISA、免疫荧光、病毒分离及病毒中和试验进行病原学诊断。

4.3.5 病毒分离和实验室诊断应在国家牛瘟参考实验室进行。

4.3.6 必要时,可将样本送往 FAO 或 OIE 牛瘟参考实验室进行 PCR 和分子学诊断,以确定病原。

5 牛瘟的病原学诊断

5.1 琼脂扩散试验

5.1.1 器材:平皿或载玻片,直径 5 mm 打孔器,湿盒,50 mL~100 mL 试剂瓶

5.1.2 试剂

5.1.2.1 琼脂或琼脂糖

5.1.2.2 防腐剂:硫柳汞或叠氮钠

5.1.2.3 抗牛瘟高免血清

5.1.2.4 参考牛瘟抗原

参考牛瘟抗原是将牛瘟弱毒株病毒接种牛肾细胞或 VERO 细胞经培养和纯化后制备的灭活抗原。

5.1.3 待检样品的制备

将由怀疑牛瘟感染后 12 d 内的动物采集的样品做如下处理:

5.1.3.1 淋巴结和脾脏组织放入组织研磨器中制成组织匀浆,500 g 离心 10 min~20 min,取上清液作为待检样品。

5.1.3.2 齿龈坏死组织碎片

将齿龈组织碎片加入少量 PBSA 在组织研磨器中制成组织匀浆,作为待检样品。

5.1.4 琼脂板的制备

称取 1 g 琼脂或琼脂糖放入 100 mL 玻璃瓶中,加入 100 mL 蒸馏水,沸水中煮沸 30 min。将熔化的 1% 琼脂液按需要量倒入水平放置的平皿中。一般直径为 5 cm 平皿加入 1% 琼脂 8 mL、10 cm 平皿加 25 mL、载玻片加 3 mL~5 mL。加完琼脂后,室温静置 30 min,使琼脂凝固,待琼脂凝固后,移入 4℃~8℃ 冰箱中过夜。

加样前按照孔径 5 mm、孔距 5 mm 打梅花样孔,中央孔周围打 6 个孔。

5.1.5 加样

中间孔加牛瘟参考抗原,1、3、5 孔加牛瘟阳性血清,2、4、6 孔加待检样品。加样时,吸取样品加满琼脂孔。加样后,将琼脂板放湿盒中,37℃ 温箱放置 36 h,分别在加样后 12 h、24 h、36 h 检查琼脂板。

5.1.6 结果判定

首先观察阳性血清和标准抗原之间的沉淀线。应看到清晰可见的白色沉淀线。

随后观察待检样品与阳性血清之间的沉淀线。待检样品与阳性血清孔之间出现沉淀线且与参考抗原和阳性血清孔之间的沉淀线融合,弯曲成弧线状判为牛瘟阳性反应。

待检样品和阳性血清孔之间无沉淀线或虽有沉淀线但与标准抗原和阳性血清孔之间的沉淀线不融合呈交叉状,判为牛瘟阴性反应。

5.2 捕获 ELISA (Immunocapture ELISA)

5.2.1 仪器

5.2.1.1 酶标读数仪

5.2.1.2 96 孔酶标板

5.2.1.3 微量振荡器

5.2.1.4 50 μ L~200 μ L 单通道加样器,50 μ L~200 μ L 八通道加样器

5.2.2 试剂

捕获 ELISA 试剂盒由 OIE 牛瘟参考实验室提供,其中含有以下试剂。

5.2.2.1 捕获抗体

抗牛瘟病毒 N 蛋白单克隆抗体,为纯化制剂,冻干产品。

5.2.2.2 指示抗体

生物素化抗牛瘟病毒 N 蛋白单克隆抗体。

生物素化抗小反刍兽疫病毒 N 蛋白单克隆抗体。

均加入甘油作为保护剂, -20℃ 保存。

5.2.2.3 牛瘟和小反刍兽疫参考抗原

牛瘟和小反刍兽疫病毒参考株感染细胞培养上清。

5.2.2.4 阴性血清

冻干的牛瘟和小反刍兽疫阴性羔羊血清,4℃ 保存。

5.2.2.5 包被缓冲液

0.01 mol/L pH7.4 PBS。(附录 B.1)

5.2.2.6 封闭缓冲液

0.05% Tween-20、0.5% 阴性羔羊血清的 0.01 mol/L pH7.4 PBS。(附录 B1)

5.2.2.7 洗涤缓冲液

0.05% Tween-20、0.002 mol/L pH7.4 PBS 溶液(附录 B.1)。

5.2.2.8 结合物

链霉亲和素辣根过氧化物酶, -20℃ 保存。

5.2.2.9 底物溶液

邻苯二胺(OPD)过氧化脲溶液(附录 B.1)。

5.2.2.10 终止液

1 mol/L 硫酸(附录 B.1)

5.2.3 试剂配制

所有冻干试剂均用 1 mL 双蒸水或无离子水溶解后, -20℃ 冻结保存。

5.2.4 待检样品的制备

按照 5.1.3 项制备待检样品。

5.2.5 试验操作

5.2.5.1 包被 ELISA 板

	PPR 空白	被 检 样 品 区								RP 空白		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1	1	8	8	1	1	8	8			
B		2	2	9	9	2	2	9	9			
C		3	3	10	10	3	3	10	10			
D		4	4	11	11	4	4	11	11			
E		5	5	12	12	5	5	12	12			
F		6	6	13	13	6	6	13	13			
G		7	7	14	14	7	7	14	14			
H		PPR 参考抗原		RP 参考抗原		PPR 参考抗原		RP 参考抗原				
	← PPR 单抗 →					← RP 单抗 →						
	← 结合物 →											

图 1 捕获 ELISA 加样排列顺序

按照 ELISA 试剂盒说明书将抗牛瘟 N 蛋白单克隆抗体用 PBS 稀释成工作浓度,加入 96 孔 ELISA 板,每孔加 100 μL ,将板置微量振荡器上,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 2 h。

5.2.5.2 吸出抗体液,用洗涤缓冲液将板洗 3 次,甩干残留液体,按照图 1 所示的加样排列顺序加入 50 μL ,用封闭液稀释的待检样品、参考抗原。

5.2.5.2.1 将 RPV 参考抗原加到 H4、H5、H8、H9 孔;将 PPR 参考抗原加到 H2、H3、H6、H7 孔,每孔 50 μL 。

5.2.5.2.2 将待检样品按样品号加入待检样品区对应孔中,每份样品加 4 孔,每孔 50 μL 。

5.2.5.2.3 在 A1~H1、A10~H10,每孔加入 50 μL 封闭缓冲液作为空白对照。加样后,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡作用 1 h,洗板 3 次。

5.2.5.3 将 RPV 生物素化单抗按照试剂盒的使用说明用封闭缓冲液稀释到工作浓度,加入 6、7、8、9 列各孔,每孔 50 μL 。

5.2.5.4 将 PPR 生物素化单抗按试剂盒使用说明用封闭缓冲液稀释成工作浓度,加入 2、3、4、5 列各孔,每孔 50 μL 。

5.2.5.5 加样后,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡作用 1 h,洗板 3 次。

5.2.5.6 将亲和素化过氧化物酶结合物按照试剂盒使用说明书用封闭缓冲液稀释成工作浓度,加入所有试验孔,每孔 50 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡作用 60 min,洗板 3 次。

5.2.5.7 加入 50 μL 底物溶液到所有孔中,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光作用 10 min。

5.2.5.8 加入 50 μL 1 mol/L 硫酸溶液终止反应。

5.2.6 在酶标读数仪上以 492 nm 测定所有试验孔的 OD 值。

5.2.7 判定标准

样品孔 OD 值/空白对照孔平均 OD 值 ≥ 2 ,判为 RPV 或 PPV 阳性。

5.3 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

5.3.1 仪器设备

5.3.1.1 RNA 提取设备

高速离心机、低速离心机、微量离心机、紫外分光光度计、组织研磨器、离心管。

5.3.1.2 RT-PCR 用仪器

PCR 仪、0.75 mL 薄壁离心管、琼脂糖凝胶电泳仪、紫外检测仪、照相机。

5.3.2 试剂

5.3.2.1 RNA 提取试剂

异硫氰酸胍、肌氨酸、柠檬酸钠、醋酸钠、B-2-巯基乙醇、水饱和酚、缓冲液饱和酚-氯仿、氯仿、异戊醇、无水乙醇、HANK'S 缓冲盐水(HBSS)、Ficoll、无菌纯水、DEPC 处理水、Tris 缓冲液、EDTA。

5.3.2.2 RT-PCR 用试剂

Superscript II 反转录酶、Taq 聚合酶、琼脂糖、随机引物、病毒特异性寡核糖酸引物、Tris-HCl 缓冲液、MgCl₂、硼酸、EDTA、BSA、KCl、dATP、dGTP、dCTP、dTTP。

5.3.2.3 反转录缓冲工作液

由试剂供应商提供的各成分按附录 B.2.11 配制。

5.3.2.4 PCR 缓冲工作液

由试剂供应商提供的各成分按附录 B.2.12 配制。

5.3.2.5 琼脂糖凝胶

称取 0.75 g 电泳级琼脂糖加入 50 mL 1X TBE,微波炉中熔化,冷却到 50 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 时加入 10 μL 1.0 mg/mL 的溴化乙锭溶液,混匀后倾倒琼脂糖凝胶板。

5.3.2.6 DNA 分子量 Markers

采用 100~600 碱基对的 DNA Markers, 吸取 0.5 μL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Markers, 加入 7 μL ~10 μL 琼脂糖凝胶指示缓冲液中。

5.3.3 操作

5.3.3.1 提取样品 RNA

5.3.3.1.1 固体组织

将 0.5 g~1 g 组织放在平皿中, 用无菌剪刀剪碎后, 加入 4 mL 溶液 D(附录 B.2.2), 放玻璃研磨器中磨成组织匀浆, 放入 12 mL 聚苯乙烯离心管中, 加入 1/10 体积(0.4 mL) 2 mol/L pH4.2 醋酸钠缓冲液混匀后再加入等体积水饱和酚混匀。

5.3.3.1.2 再加入 1/5 体积(0.8 mL) 氯仿-异戊醇溶液(49:1), 混匀 10 min, 在冰浴中放置约 20 min, 将上层水层吸入另一个清洁离心管中, 加入 2.5 体积的无水乙醇, 在 -20°C 至少沉淀 2 h(或在 -70°C 沉淀 1 h), 以 10 000 g 离心 10 min 沉淀 RNA。

5.3.3.1.3 吸弃上清液后, 将沉淀用 70% 乙醇洗涤几次以除去残余的酚。将盛有 RNA 的离心管倒置于真空罐中抽气 5 min~10 min, 使 RNA 干燥。

5.3.3.1.4 将干燥的 RNA 用 2 mL 灭菌双蒸水溶解, 并用 260 nm、280 nm 测定 RNA 浓度和纯度。如果 260/280 比值大于 1.7, RNA 浓度在 0.5 mg~1 mg 之间, 可用于下一步 RT/PCR。如比值小于 1.7 或 RNA 浓度过低, 可如前再沉淀, 直到达到要求。

如果提取的 RNA 样品中蛋白质含量过高, 即 260/280 比值小于 1.7, 则应将 RNA 样品用蛋白酶进行消化。

5.3.3.1.5 吸取 2 mL 2 mg/mL 的蛋白酶溶液, 加入 2 mL RNA 中, 37°C 消化 1 h~2 h, 加入等体积缓冲液饱和酚-氯仿混合液, 充分混匀后, 作用 1 h~2 h, 以 880 g~900 g 离心 10 min, 将上层水层吸入另一离心管中, 加入 2.5 体积的无水乙醇, -20°C 如前沉淀。以上方法也可用于从泪液和口腔棉拭子样品中提取 RNA。

5.3.3.2 提取外周血单核细胞(PBMCS)RNA。

5.3.3.2.1 对于 10 mL 以上 EDTA 或肝素抗凝的外周血样品, 以 1 300 g 室温(18°C ~ 20°C)离心 10 min, 吸取上层的淡黄色 PBMCS 层, 重新悬浮于终体积为 20 mL 的 HBSS 中。

5.3.3.2.2 对于少于 10 mL 的样品

取 5 mL~10 mL 全血, 加入 HBSS 使终体积为 20 mL, 混匀后, 在血液底层加入 10 mL Ficoll 溶液以 800 g~900 g 室温离心 30 min, 沉淀红细胞后吸取 Ficoll 层顶部的清亮白细胞层, 转移到另一个 50 mL 离心管中, 加入 8 mL HBSS(附录 B.2), 重新悬浮细胞, 再加 HBSS 使体积达到 40 mL~45 mL, 混匀后, 以 500 g 离心 10 min, 如此离心洗涤 2~3 次。

最后一次离心后将 PBMCS 用 HBSS 配成 8 mL~10 mL 细胞悬液。取样 10 μL , 用 1:10 苔酚蓝溶液染色后进行活细胞计数。其余细胞悬液分装后 -70°C 或液氮保存。该样品也可用于进行病毒分离培养。

5.3.3.2.3 PBMCS RNA 提取

取相当于至少 5 mL 全血的洗涤 PBMCS 用 1 mL HBSS 悬浮后, 加入无菌的 1.5 mL 离心管中离心 20 min~30 min, 弃上清, 加入 0.4 mL 溶液 D, 按 5.3.4.1. 项提取 RNA。

5.3.3.3 RT-PCR 操作程序

5.3.3.3.1 PCR 引物

第一对引物为 PRV 融合蛋白(F)基因特异性引物, 序列如下:

RPVF3 5' AAGAGGCTGTTGGGGAC

RPVF4 5' GCTGGGTCCAAATAATGA 或

RPVF3 5' GGGACAGTGCTTCAGCCTATTAAGG

RPVF4 5' CAGCCCTAGCTTCTGACCCACGATA

第二对引物为 PPRF 基因特异性引物,序列如下:

PPRF1 5' ATCACAGTGTTAAAGCCTGTAGAGG

PPRF2 5' GAGACTGAGTTTGTGACCTACAAGC

另外还有两对套式引物,分别为:

RPVF_{3a} 5' GCTCTGAACGCTATTACTAAG

RPVF_{4A} 5' CTGCTTGTCGTATTTCTCAA

用于扩增 235 个碱基对片段

PPRV 套式引物:

PPRV_{1a} 5' ATGCTCTGTCAGTGATAACC

PPRV_{2a} 5' TTATGGACAGAAGGGACAAG

用于扩增 309 个碱基对片段。

5.3.3.3.2 RNA 反转录

在 0.5 mL 微量离心管中加入 5 μ L 1 mg/mL 的 RNA 样品溶液,加入 2 μ L 50 ng/ μ L 随机引物,12 μ L 5XRT 缓冲液(附录 B.2.11),使总体积为 19 μ L,65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,迅速冷却到 0 $^{\circ}$ C,静置 10 min,加入 1 μ L 200 U/ μ L Superscript II 反转录酶,42 $^{\circ}$ C 作用 60 min,70 $^{\circ}$ C 作用 15 min,4 $^{\circ}$ C 作用 30 min,-20 $^{\circ}$ C 冻结保存或直接进行 PCR。

5.3.3.3.3 PCR 程序

取 5 μ L RT 产物,加入 45 μ L PCR 缓冲工作液(附录 B.2.12)混匀后,离心 10 s~20 s,将离心管加到 PCR 仪中。

5.3.3.3.4 PCR 仪程序设定

每次试验均应包括一个阴性对照和一个阳性对照。PCR 程序如表 1:

表 1

	温 度	时 间
步骤 1	95 $^{\circ}$ C	5 min
步骤 2	94 $^{\circ}$ C	1 min
步骤 3	51 $^{\circ}$ C	1 min
步骤 4	72 $^{\circ}$ C	2 min
步骤 5	重复步骤 2~4	30 次
步骤 6	72 $^{\circ}$ C	10 min

5.3.3.3.5 PCR 产物电泳鉴定

按照 6.3.2.5 制备琼脂糖凝胶板,将凝胶板置电泳槽中,取出加样孔梳子,加入 1 \times TBE 电泳缓冲液,将 PCR 产物取 8 μ L 加入 2 μ L 5 \times 琼脂糖凝胶电泳指示缓冲液(附录 B.2.8),混匀后逐一加样并接通电泳仪电源,以 50V~100V 电泳到溴酚蓝带出现在距加样孔约 2/3 凝胶板处停止电泳,将电泳板置紫外监测仪下观察出现的荧光染色带,并与分子量 Markers 和阳性对照孔进行比较,当 DNA 扩增带位置在 400 bp~450 bp(436 bp)之间并与阳性样品位置相同时,判为阳性反应。

5.3.3.3.6 PCR 产物的套式扩增和鉴定

当第一次的扩增产物电泳后无扩增带或扩增带不清晰时,可将扩增产物取 1 μ L 加入 45 μ L 含有

RPV 套式引物的 PCR 缓冲工作液,混匀后置 PCR 仪中按 5.3.4.3.4 项进行扩增,并如前电泳,当 DNA 扩增带位置在 200 bp~300 bp(235 bp)之间并与阳性样品位置相同时,判为阳性反应。

5.4 直接法荧光抗体试验

5.4.1 仪器

5.4.1.1 冷冻切片机

5.4.1.2 荧光显微镜

5.4.1.3 染色架

5.4.1.4 恒温培养箱

5.4.1.5 湿盒

5.4.1.6 载玻片

5.4.2 试剂

5.4.2.1 荧光抗体

牛抗牛瘟荧光抗体用牛瘟兔化弱毒反复免疫健康黄牛制备牛抗牛瘟高免血清,并由其提取抗牛瘟 IgG,用荧光素标记而成。

5.4.2.2 组织固定剂:分析纯丙酮

5.4.2.3 灭菌 0.01 mol/L pH7.4 PBS

5.4.2.4 Tris 缓冲甘油

5.4.3 试验操作

5.4.3.1 由淋巴结、肝脏或肾脏组织样品制备涂片或冰冻切片,用冷丙酮固定 2 次,每次 5 min。

5.4.3.2 对于待检样品接种细胞培养中的盖玻片培养飞片,从培养管中取出培养飞片,用 PBS 洗涤 2 次,用无离子水洗涤 1 次。在未干燥之前,用预冷到 -20℃ 的丙酮固定 2 次,每次 5 min。

5.4.3.3 每次染色试验均应设立阳性和阴性对照样品。

5.4.3.4 染色

将载玻片或细胞培养飞片水平放置在湿盒中,滴加用 PBS 稀释到工作浓度的荧光抗体溶液,密闭湿盒,37℃ 作用 30 min~60 min。

5.4.3.5 移出载玻片或细胞培养飞片,吸弃未结合的荧光抗体溶液,用 PBS 洗涤 3 次,每次 30 s,室温干燥。

5.4.3.6 将干燥的荧光染色载玻片或细胞培养飞片滴加 Tris 缓冲甘油,置荧光显微镜下观察。

5.4.4 结果判定

首先观察阴性和阳性对照玻片,阳性对照应在细胞胞质看到黄绿色荧光,阴性对照不出现荧光。待检样品玻片在细胞质出现与阳性对照相同的黄绿色荧光时,判为牛瘟病毒阳性。

5.5 病毒分离鉴定

用分子生物学技术可以对牛瘟作出初步诊断,而要确诊必须进行病毒分离鉴定。另外,如需要对流行的牛瘟病毒的致病性、毒力及抗原性进行分析时,则病毒分离鉴定是最可靠的诊断方法。病毒分离鉴定必须在生物安全 3 级实验室进行。

5.5.1 仪器设备

5.5.1.1 CO₂ 培养箱

5.5.1.2 离心机

5.5.1.3 高压锅

5.5.1.4 低温冰箱

5.5.1.5 除菌过滤设备

5.5.1.6 显微镜

5.5.1.7 转瓶机

5.5.1.8 细胞培养瓶、细胞培养管、48孔细胞培养板

5.5.2 试剂

5.5.2.1 Hank's 液

5.5.2.2 0.25%胰酶消化液

5.5.2.3 199 营养液或 MEM 营养液

5.5.2.4 新生犊牛血清

5.5.3 细胞培养

5.5.3.1 原代犊牛肾细胞的培养

5.5.3.1.1 无菌采取 2 周龄以下犊牛肾脏,置无菌烧杯中迅速运往实验室。

5.5.3.1.2 在生物安全柜中将肾脏置无菌平皿中,用灭菌剪刀剪去肾脏周围的脂肪组织和被膜,将肾脏移往另一个无菌平皿中,剪开肾脏,剪除肾盂等肾髓质,将肾皮质移到一烧杯中,用无菌剪刀剪成 2~3 mm 大小的组织块。用 Hank's 液洗涤 3 次以上直至上清液无色清亮为止。

5.5.3.1.3 倾倒入上清后,加 400 mL 0.25% 胰酶溶液,密封瓶口后,置 37℃ 水浴中消化 40 min~60 min,期间轻摇 3 次~4 次,当组织呈绒状时,移出水浴,室温静置 5 min~10 min。吸净上清液。

5.5.3.1.4 将消化后的组织用 Hank's 液洗涤 3 次,再吸净上清液,振摇消化瓶,使消化组织呈泥状,加入 10% 牛血清 MEM 或 199 营养液 500 mL,继续振摇 3 min~5 min 使成细胞悬液,静置 3 min~5 min 后倾出上层细胞悬液,向沉淀的组织泥中再加入 500 mL 10% 牛血清 MEM 或 199 营养液,如前振摇,如此操作 3 次。

5.5.3.1.5 将 3 次细胞悬液混合后,以 8 层~10 层纱布过滤除去细胞团块。将滤过的细胞悬液,经细胞计数,用 10% 牛血清营养液将细胞浓度调整到 2×10^5 个/mL 细胞左右分装细胞瓶,每个 30 mL 细胞瓶分装 5 mL 细胞悬液或分装不同规格的转瓶及细胞板。将细胞瓶或细胞板置 3% CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 3 d~4 d,等长成细胞单层后换 5% 血清 MEM 或 199 营养液维持培养。

5.5.3.2 继代犊牛肾细胞培养

将原代肾细胞弃去维持液,每个 30 mL 细胞瓶加入 0.3 mL~0.5 mL 0.05% 胰酶分散液洗涤一次,再加入 0.3 mL~0.5 mL 0.05% 胰酶,水平放置,室温消化至细胞脱落后,以大口径吸管吹打分散细胞,将细胞液移至离心管中。500 g~1 000 g 离心 5 min,弃上清液。将沉淀细胞按每瓶加入 15 mL 营养液的比例,加入 10% 牛血清 MEM 或 199 培养液,大口径吸管吹打分散细胞后分装细胞培养瓶,37℃ CO₂ 培养箱继续培养即为二代犊牛肾细胞,必要时可继续传代。一般传代不超过 9 代。

5.5.4 待检样品的制备

5.5.4.1 血液样品的制备

由于牛瘟病毒与血液中的白细胞结合在一起,因此在采集用于分离病毒的血液样本时应采用肝素抗凝血。将抗凝血取 10 mL 移入圆底离心管中,以 2 000 g 4℃ 离心 15 min,弃去血浆成分,将沉淀细胞用 0.85% 生理盐水离心洗涤 3 次。第 3 次离心时以 500 g~1 000 g 离心 5 min~10 min,使红细胞下沉后,吸取上清的淡黄色细胞层到另一瓶中,加入 10 mL 细胞维持液,混匀后接种犊牛肾细胞单层。

5.5.4.2 固体组织样品的制备

对于脾、淋巴结等固体组织样品,在生物安全柜中无菌剪取除去被膜的 1 g~2 g 组织,放入研磨器中剪成 2 mm~3 mm 组织块,再加入少量灭菌玻璃砂,研磨成组织匀浆,加入 10 mL 细胞维持液继续研磨成组织悬液,移至灭菌试管中 4℃ 浸泡过夜,第二天以 1 000 g 4℃ 离心 5 min~10 min,吸取上清液直

接种单层犊牛肾细胞。

5.5.5 病毒接种细胞

5.5.5.1 将制备好的被检白细胞样品,接种3个~4个30 mL细胞瓶犊牛肾细胞,接种时弃去细胞维持液,每瓶接种0.2 mL~0.5 mL样品,加入5 mL细胞维持液,37℃培养。

5.5.5.2 固体组织上清样品

对于由淋巴结、脾等固体样品制备的上清可直接进行病毒培养和鉴定。

接种时,每一样品吸取2 mL分置两支试管中,每管1 mL。第一管加入5%牛瘟阳性血清维持液,第二管加入5%犊牛血清维持液,两种样品分别接种犊牛肾细胞,接种时,弃去细胞瓶的原维持液,每瓶接种0.2 mL~0.5 mL样品,37℃吸附1 h,再加5 mL维持液,37℃ 3% CO₂培养箱培养。培养期间,每2 d~3 d交替用5%犊牛血清的维持液和无血清维持液换液一次,直至培养到14 d。每次接种均应设立不接种样品细胞对照。

5.5.6 病毒分离培养结果判定

被检样品接种细胞后,从第二天开始,每日用显微镜观察接种细胞1次~2次,观察时注意观察细胞病变(CPE),并与不接毒细胞对照进行比较。

当无阳性血清中和组出现CPE,牛瘟阳性血清中和组无CPE时,即可判为牛瘟感染。对于均无CPE出现的培养物应盲传2代~3代,均无CPE出现时,判为牛瘟阴性。

5.5.7 病毒鉴定

5.5.7.1 捕获ELISA和RT-PCR鉴定

为了对培养的病毒液进行进一步鉴定,可将未加牛瘟阳性血清的培养瓶-20℃冻结后,冻融2次~3次,采用免疫捕获ELISA或PCR技术进行病毒鉴定,如出现阳性反应,即可确诊。必要时可进行F基因的序列测定。

5.5.7.2 中和试验鉴定

将分离的病毒液用TPB(附录B.4)溶液做 10^{-1} ~ 10^{-5} 10倍系列稀释,每一样品稀释后,将每个稀释度样品分为两份,分置两支试管中,每管1 mL,向第一支试管中加入1 mL牛瘟阴性血清,第二支试管中加入1 mL牛瘟阳性血清,混匀后,37℃作用过夜。然后,每一稀释度均各接种3个~5个30 mL细胞瓶犊牛肾细胞,每瓶接种0.2 mL,37℃吸附1 h,再加5 mL无血清维持液,37℃ 3% CO₂培养箱培养11 d。从接种后第二天开始,每天显微镜观察1次~2次,如果阴性血清组TCID₅₀达到 10^3 ~ 10^5 ,牛瘟阳性血清中和组病毒被完全中和不出现细胞病变,则可确诊为牛瘟。

6 血清学诊断

6.1 血清中和试验

6.1.1 仪器设备

同5.5.1项。

6.1.2 试剂

6.1.2.1 细胞培养试剂同5.5.2项

6.1.2.2 中和试验用病毒

采用冻干的适应细胞培养的牛瘟鸡胚化弱毒株或牛瘟Kabete“0”疫苗株。病毒的毒价为 10^3 TCID₅₀/mL。

6.1.2.3 参考血清

6.1.2.3.1 参考阳性血清

牛瘟弱毒疫苗株病毒免疫牛阳性血清。

6.1.2.3.2 参考阴性血清

牛瘟抗体阴性牛血清。

6.1.2.4 试验细胞

继代犊牛肾细胞或 Vero 细胞,对于牛瘟鸡胚化弱毒株也可采用继代鸡胚成纤维细胞。

6.1.3 试验操作

6.1.3.1 继代犊牛肾细胞或 Vero 细胞的培养同 6.5.3.2 项

6.1.3.2 血清稀释

将待检血清由原液开始用 pH7.3 PBS 对倍稀释到 1:32。每一稀释度取 1 mL 置 8 mL 试管中。

6.1.3.3 病毒稀释

将牛瘟弱毒病毒用 pH 7.3 PBS 稀释成 10^3 TCID₅₀/mL。

6.1.3.4 中和

向每一血清稀释管中加入 1 mL 稀释好的病毒液,混匀后 4℃ 过夜。

6.1.3.5 接种细胞

将病毒血清混合液分别接种 48 孔细胞培养板,每一稀释度接种 5 孔,每孔接种 0.2 mL,接种后每孔加入 $0.5 \text{ mL } 2 \times 10^5$ /mL 继代犊牛肾细胞或 Vero 细胞。37℃ 3% CO₂ 培养箱培养 12 d~14 d,期间每隔 3 d 用无血清 MEM 维持液换液一次。每次试验均应设立病毒、阳性血清、阴性血清、待检血清和正常细胞对照。

6.1.4 结果判定

从接种后第三天开始,每天在显微镜下观察细胞病变(CPE),被检血清 1:2 以上稀释。

接种细胞孔培养 12 d~14 d,无 CPE 出现,判为血清中和抗体阳性。

6.2 竞争法酶联免疫吸附试验(Competitive ELISA C-ELISA)

6.2.1 仪器设备

6.2.1.1 平底 96 孔酶标板

6.2.1.2 -80℃ 低温冰箱

6.2.1.3 5 μL~200 μL 单通道和 8 通道加液器

6.2.1.4 -20℃ 低温冰箱

6.2.1.5 微量振荡器

6.2.1.6 ELISA 酶标仪

6.2.1.7 洗板机

6.2.2 试剂

6.2.2.1 0.01 mol/L pH 7.4 PBS(附录 B.1)

6.2.2.2 牛瘟 C-ELISA 诊断试剂盒由 OIE 牛瘟参考实验室提供。

6.2.3 试剂配制

6.2.3.1 牛瘟 C-ELISA 试剂盒各试验成分的配制

将试剂盒提供的冻干抗原、单抗和牛瘟参考血清、兔抗鼠结合物均每瓶加入 1 mL 试剂盒配备的灭菌无离子水充分溶解后,-20℃ 冻结保存。

6.2.3.2 封闭缓冲液

0.1% Tween-20、0.3% 阴性牛血清的 0.01 mol/L pH 7.4 PBS(附录 B.1)。该封闭液应当天配制。

6.2.3.3 洗涤缓冲液

0.1% Tween-20、0.002 mol/L pH7.4 PBS(附录 B.1)。

6.2.3.4 底物溶液

邻苯二胺(OPD)过氧化脲溶液(附录 B.1)。

6.2.3.5 终止液

1 mol/L 硫酸(附录 B.1)。

6.2.4 试验操作

6.2.4.1 试验加样排列

按图 2 排列顺序加样：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cc	Cc	1	1	9	9						
B	C++	C++	2	2	10	10						
C	C++	C++	3	3								
D	C+	C+	4	4								
E	C+	C+	5	5								
F	Cm	Cm	6	6								
G	Cm	Cm	7	7							39	39
H	C-	C-	8	8							40	40

注：Cc:结合物对照(不加血清和单抗) C++:强阳性对照 C+:弱阳性对照 C-:阴性血清对照 Cm:单抗对照

图 2 C-ELISA 加样排列顺序

6.2.4.2 结合物对照

A1、A2 两孔为结合物对照,除加兔抗小鼠酶结合物外,其余试剂成分均以封闭液代替。

6.2.4.3 强阳性对照

B1、B2、C1、C2 四孔为 RPV 强阳性血清对照孔,除以阳性血清代替被检血清外,与试验孔其他成分相同。

6.2.4.4 弱阳性对照

D1、D2、E1、E2 为 RPV 弱阳性血清对照孔,除以弱阳性血清代替被检血清外,与试验孔其他成分相同。

6.2.4.5 单抗对照孔

F1、F2、G1、G2 为 RPV 单抗对照孔,除加单抗外,其他成分以封闭液代替。

6.2.4.6 阴性对照孔

H1、H2 为 RPV 阴性对照孔,除以阴性血清代替被检血清外,与试验孔其他成分相同。

6.2.4.7 试验孔

除以上对照孔外,剩余各孔加被检血清,每份血清依照图 2 示排列顺序加两孔,每板可检测 40 份血清样品。

6.2.5 试验程序

6.2.5.1 包被抗原

用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 缓冲液将牛瘟 ELISA 抗原按照试剂盒说明书稀释成工作浓度,每孔加 50 μ L,然后置于轨道振荡器上,37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h。用洗涤缓冲液洗板 3 次,拍干。

6.2.5.2 加样顺序

6.2.5.2.1 加样

向 ELISA 板的每一孔加 40 μ L 封闭液。

A1、A2 孔再加入 60 μL 封闭缓冲液；
 F1、F2、G1、G2 孔再加入 10 μL 封闭液；
 B1、B2、C1、C2 孔加入 10 μL 强阳性血清；
 D1、D2、E1、E2 孔加入 10 μL 弱阳性血清；
 H1、H2 孔加入 10 μL 阴性血清。

将被检血清按血清号排列顺序加入到各自的试验孔中，每孔加入 10 μL 。

6.2.5.2.2 加单抗

加 50 μL 用封闭缓冲液稀释成工作浓度的单抗到除 A1、A2 外的每个试验孔中，然后置轨道振荡器上，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 1 h。如前洗板。

6.2.5.3 加结合物

加 50 μL 用封闭液稀释到工作浓度的兔抗小鼠免疫球蛋白辣根过氧化物酶结合物到每一试验孔中，然后置轨道振荡器上，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。如前洗板。

6.2.5.4 加底物

加 50 μL 底物/显色液到每一试验孔中，在室温下不振荡孵育 10 min。加 50 μL 1 mol/L 硫酸终止反应。

6.2.5.5 测定 OD 值

在酶标读数仪上以 492 nm 波长测定光吸收值(OD 值)，以单抗孔平均 OD 值为对照计算 PI 值。

6.2.6 结果判定

6.2.6.1 抑制率(PI)计算公式

PI 值按以下公式计算：

$$PI = 1 - OD_s / OD_m$$

OD_s 为被检样品两孔平均光吸收值；

OD_m 为 F1、F2、G1、G2 四孔单抗对照孔平均光吸收值。

6.2.6.2 结果判定前提

阴性血清对照 PI 值应 < 0.5；阳性血清对照 PI 值应 \geq 0.5。单抗对照孔 OD 值应介于 0.3~1.0 之间，试验方可成立。

6.2.6.3 判定标准

样品 PI 值 \geq 0.5 判为牛瘟抗体阳性；PI 值 < 0.5 判为牛瘟抗体阴性。

附 录 A
(规范性附录)
牛瘟诊断样本的采集和运输

PBSA

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
双蒸水	加至 1 000 mL

附 录 B
(规范性附录)
牛瘟诊断试验

B.1 琼脂扩散试验、免疫捕获 ELISA、C-ELISA**B.1.1 PBS(0.01 mol/L pH 7.4)**

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	2.83 g
双蒸水	加至 1 000mL

B.1.2 封闭缓冲液

Tween-20	1 mL
阴性牛血清	3 mL
0.01 mol/L pH 7.4 PBS	加至 1 000mL

B.1.3 洗涤缓冲液

Tween-20	1 mL
0.01 mol/L pH 7.4 PBS	200 mL
双蒸水	800 mL

B.1.4 底物溶液

30 mg OPD 片	1 片
双蒸水	75 mL
溶解后分装成 6 ml/瓶, -20℃ 冻结保存	
过氧化脲片	1 片
双蒸水	10 mL

溶解后避光保存。

使用前每 6 mL OPD 溶液加入 24 μL 过氧化脲溶液。

B.1.5 终止液

浓硫酸	55 mL
双蒸水	945 mL

将浓硫酸缓慢滴加入水中摇匀即可。

B.2 RT-PCR**B.2.1 Hank's 缓冲盐水(HBSS)**

10×浓缩液	
NaCl	80 g
KCl	4 g
CaCl	1.4 g
MgCl ₂ (7个结晶水)	2 g

Na ₂ HPO ₃ ·12 H ₂ O	1.52 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
双蒸水	加至 1 000 mL, 除菌过滤。

B.2.2 组织溶解液(溶液 D)

异硫氰酸胍	250 g
灭菌双蒸水	293 mL
0.75 mol/L 柠檬酸钠溶液	17.6 mL
10% 肌氨酸	26.4 mL 在 65℃ 水浴中加热溶解。

该贮存液可在室温避光保存于安全柜中,可保存几个月。使用前,取 50 mL 以上贮存液加入 0.36 mL B-2 巯基乙醇,该使用液在室温保存不应超过 1 个月。

B.2.3 10× Tris-硼酸缓冲液(TBE)

Tris	109 g
硼酸	55 g
EDTA	9.3 g
双蒸水	加到 1 000 mL

B.2.4 氯仿/异戊醇

氯仿	49 mL
异戊醇	1 mL
混合均匀即可。	

B.2.5 2 mol/L 醋酸钠缓冲液

醋酸钠	2 mol
双蒸水	500 mL~1 000 mL

溶解后用冰醋酸将 pH 调至 4.7,再加双蒸水至 2 000 mL。

B.2.6 蛋白酶

将蛋白酶用 0.01 mol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液,0.01 mol/L 氯化钠配成 20 mg/mL 的溶液,37℃ 作用 1 h,以除去 DNase 和 RNase 污染,分装成小体积 -20℃ 冻结保存,工作液浓度为 1 mg/mL。

B.2.7 10× 蛋白酶反应缓冲液母液

0.1 mol/L pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液
0.1 mol/L EDTA
5% SDS

B.2.8 5× 琼脂糖凝胶指示缓冲液

Ficol 1 400	1 g
0.5 mol/L EDTA	250 μL
0.5% 溴酚蓝	50 μL
3% 二甲苯蓝	50 μL

溶解成终体积为 5 mL 的混合液。

B.2.9 5× RT 缓冲液

Tris-HCl	250 mmol/L (pH 8.3)
MgCl ₂	15 mmol/L
BSA(acylated)	1 mg/mL

B.2.10 10× PCR 缓冲液

Tris-HCl	200 mmol/L (pH 8.3)
KCl	500 mmol/L

MgCl₂ 15 mmol/L

B.2.11 反转录缓冲工作液

5×RT 缓冲液 4 μL(50 mmol/L Tris-HCl、3 mmol/L MgCl₂、15 mmol/L KCl)
 二硫苏糖醇(DTT)(0.1 mol/L) 2 μL(10 mmol/L)
 BSA(acetylated) 2 μL(0.1 mg/mL)
 dNTPs 1 μL(0.5 mmol/L 每种)
 灭菌纯水 3 μL

B.2.12 PCR 缓冲工作液

10×PCR 缓冲液 5 μL
 Taq 聚合酶 0.5 μL
 dNTPs(10 mmol/L 每种) 1 μL
 引物 1 μL
 反转录引物 1 μL
 灭菌纯水 36.5 μL

B.3 荧光抗体

Tris-甘油缓冲液

Tris 1.21 g
 双蒸水 80 mL
 溶解后用浓盐酸调 pH 到 9.0 再加水至 100 mL
 加甘油 100 mL 混匀即可。

B.4 病毒分离鉴定、血清中和试验

B.4.1 Hank's 液

10×浓缩液
 NaCl 80 g
 KCl 4 g
 CaCl₂ 1.4 g
 MgCl₂(7 个结晶水) 2 g
 Na₂HPO₃·12H₂O 1.52 g
 KH₂PO₄ 0.6 g
 葡萄糖 10 g
 1% 酚红 16 mL
 双蒸水 加至 1 000 mL
 溶解后,除菌过滤,或经 0.1 MPa(115℃)
 灭菌 15 min。

B.4.2 7.5% 碳酸氢钠溶液

NaHCO₃ 7.5 g
 双蒸水 100 mL
 溶解后除菌过滤并分装于小瓶中冻结保存。

B.4.3 0.25% 胰蛋白酶溶液

NaCl 8 g

KCl	0.4 g
葡萄糖	1 g
NaHCO ₃	0.58 g
胰蛋白酶(1:250)	2.5 g
EDTA	0.2 g
双蒸水	1 000 mL

溶解后除菌过滤并分装于小瓶中冻结保存。

B.4.4 3%谷氨酰胺溶液

L-谷氨酰胺	3 g
双蒸水	100 mL

溶解后除菌过滤并分装于小瓶中冻结保存,使用时每 100 mL 细胞营养液加 1 mL。

B.4.5 3%丙酮酸钠溶液

丙酮酸钠	3 g
双蒸水	100 mL

溶解后除菌过滤并分装于小瓶中冻结保存,使用时每 100 mL 细胞营养液加 1 mL。

B.4.6 MEM 或 199 营养液

按包装说明用双蒸水溶解,经除菌过滤后分装于小瓶中冻结保存。

B.4.7 TPB 溶液

胰蛋白胨(bacto-tryptose)	20.2 g
葡萄糖	2.0 g
NaCl	5.0 g
Na ₂ HPO ₃	2.5 g
双蒸水	加至 1 000 mL

溶解后分装于 100 mL 小瓶中,0.15 MPa(121℃)高压 15 min,4℃ 保存。
