

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 575—2019

代替 NY/T 575—2002

---

## 牛传染性鼻气管炎诊断技术

**Diagnostic techniques for infectious bovine rhinotracheitis**

2019-08-01 发布

2019-11-01 实施

---



中华人民共和国农业农村部 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 NY/T 575—2002《牛传染性鼻气管炎诊断技术》。与 NY/T 575—2002 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

- 增加了引言(见引言);
- 修改了范围(见第 1 章);
- 增加了规范性引用文件(见第 2 章);
- 增加了缩略语(见第 3 章);
- 修改了病毒鉴定中和指数的判定标准(见 4.4);
- 增加了实时荧光 PCR 试验(见第 7 章);
- 增加了细胞培养液的配制和实时荧光 PCR 试验过程防止交叉污染的措施(见附录 A 和附录 C)。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

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:中国动物卫生与流行病学中心、华中农业大学。

本标准主要起草人:李晓成、郭爱珍、张志、李庆妮、吴发兴、张芳、胡长敏、刘爽、陈颖钰、董雅琴、陈曦、张慧、姜传文、侯桂先、刘瑞宁、陈焕春。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- NY/T 575—2002。

## 引 言

牛传染性鼻气管炎(Infectious bovine rhinotracheitis, IBR)是家养牛和野牛的一种病毒性传染病,病原是牛传染性鼻气管炎病毒(Infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV),学名为牛疱疹病毒 I 型(Bovine herpesvirus 1, BoHV-1)。该病广泛分布于世界各地。世界动物卫生组织(OIE)将其列为牛的法定报告疫病,我国将其列为二类动物疫病。该病死亡率较低,许多感染牛呈亚临床症状经过,往往由于细菌继发感染导致更为严重的呼吸道疾病。

本标准参考世界动物卫生组织(OIE)《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2017 年 OIE 官方网站在线版)中关于牛传染性鼻气管炎/牛传染性化脓性外阴阴道炎(Chapter 2.4.12)的内容,转化了实时荧光 PCR 诊断方法并引入到本标准中。



# 牛传染性鼻气管炎诊断技术

## 1 范围

本标准规定了牛传染性鼻气管炎的诊断技术要求。

本标准规定的病毒分离鉴定适用于牛疱疹病毒 I 型的分离鉴定;微量血清中和试验和酶联免疫吸附试验适用于牛群牛传染性鼻气管炎的流行病学调查、监测和诊断;实时荧光 PCR 试验适用于快速检测牛疱疹病毒 I 型感染。

## 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

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。

BoHV-1:牛疱疹病毒 I 型(bovine herpesvirus type 1)

CPE:细胞病变(cytopathic effect)

Ct 值:循环阈值(cycle threshold)

IBR:牛传染性鼻气管炎(infectious bovine rhinotracheitis)

MDBK:牛肾细胞系(madin-darby bovine kidney cell line)

TCID<sub>50</sub>:组织培养半数感染量(50% tissue culture infective doses)

## 4 病毒分离鉴定

### 4.1 材料

#### 4.1.1 试剂

4.1.1.1 青霉素-链霉素溶液(青霉素 10 000 U/mL,链霉素 10 000 μg/mL)。

4.1.1.2 无 BoHV-1 抗体新生牛血清。

4.1.1.3 DMEM 培养液、细胞生长液和细胞维持液(配制方法见附录 A)。

4.1.1.4 0.25% EDTA 胰酶。

4.1.1.5 BoHV-1 标准阳性血清和 BoHV-1 标准阴性血清。

4.1.1.6 MDBK 细胞或睾丸原代或睾丸次代细胞。

#### 4.1.2 器材

4.1.2.1 组织匀浆机。

4.1.2.2 离心机。

4.1.2.3 恒温二氧化碳培养箱。

4.1.2.4 倒置显微镜。

4.1.2.5 无菌棉拭子。

4.1.2.6 0.22 μm 孔径滤器。

4.1.2.7 微量可调移液器。

4.1.2.8 无菌移液器吸头。

4.1.2.9 细胞瓶(T25 cm<sup>2</sup>)。

4.1.2.10 无菌 96 孔细胞培养板。

## 4.2 样品

### 4.2.1 样品采集

#### 4.2.1.1 拭子样品

用无菌棉拭子反复刮擦,采取鼻道、生殖道和眼分泌物,立即将拭子浸入 1.0 mL DMEM 培养液(含青霉素 1 000 U/mL、链霉素 1 000 μg/mL、2%~5% 的无 BoHV-1 抗体新生牛血清、pH 7.2)中。

#### 4.2.1.2 组织样品

剖检时,无菌采集牛呼吸道黏膜、扁桃体、肺、脑中三叉神经节。对刚死亡的胎儿,无菌采集肺、肾、脾等各种组织样品。

#### 4.2.1.3 精液

采集 0.5 mL 新鲜精液或冷冻精液。

### 4.2.2 样品运送

采集的样品立即 4℃ 储存,24 h 内送达实验室,并按 NY/T 541 的规定执行。

### 4.2.3 样品处理

#### 4.2.3.1 拭子样品

将拭子样品冻融 2 次,振荡 2 min。拧干拭子,样品液经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 孔径滤器过滤,滤液作为接种分离材料。

#### 4.2.3.2 组织样品

用无菌剪镊取适量组织,先用 DMEM 培养液制成 20% 的匀浆液,再经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 孔径滤器过滤,滤液作为接种分离材料。

#### 4.2.3.3 精液

将精液样品冻融 2 次或超声波裂解,经 10 000 r/min 离心 10 min。新鲜精液通常对细胞有毒性,可抑制病毒增殖,接种前应预先用 DMEM 培养液作 1:15 稀释。

## 4.3 操作方法

### 4.3.1 接种培养

4.3.1.1 取经过处理的样品 0.2 mL,接种到已形成良好单层的 MDBK 细胞或睾丸原代或次代细胞培养瓶(T25 cm<sup>2</sup>)中。

4.3.1.2 每个样品接种 4 瓶,置 37℃ 吸附 1 h 后,倾去接种液,用 DMEM 培养液洗 3 次,最后加入细胞维持液 5 mL。

4.3.1.3 置 37℃ 培养,逐日观察 CPE;若 7 d 仍不出现 CPE,则收获培养物继代于新制备的细胞单层上,盲传三代后,观察 CPE,出现 CPE 者收获培养物,保存于-70℃ 待鉴定。

4.3.1.4 BoHV-1 在 MDBK 细胞和睾丸原代或次代细胞上形成 CPE 的特征:细胞变圆,聚合,呈葡萄串状或拉网状,最后脱落。

### 4.3.2 测定中和指数

4.3.2.1 取出现 CPE 的细胞培养物,经冻融 2 次后,以 10 000 r/min 离心 10 min。

4.3.2.2 取上清液,用 DMEM 培养液作 10 倍递增稀释至 10<sup>-7</sup>。

4.3.2.3 分别将 BoHV-1 标准阳性血清(中和效价 1:32 或以上)和 BoHV-1 标准阴性血清与每个稀释度病毒液等量混合,置 37℃ 中和 1 h。

4.3.2.4 将病毒血清混合物接种 96 孔细胞培养板,每个样品接种 4 孔,每孔 100 μL。

4.3.2.5 每孔加入 MDBK 细胞悬液(每毫升含 30 万~40 万细胞)100 μL。置 37℃ 培养,观察 72 h~120 h,

每天记录 CPE 和无 CPE 的孔数。

4.3.2.6 按 Reed-Muench 方法计算  $TCID_{50}$ 。计算公式见式(1)、式(2)。

$$TCID_{50} = \lg D + L \times \lg d \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$D$  ——高于 50%百分数的病毒稀释度;

$L$  ——距离比值;

$d$  ——稀释系数。

$$L = (P_1 - 50) / (P_1 - P_2) \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$P_1$  ——高于 50%的百分数;

$P_2$  ——低于 50%的百分数。

4.3.2.7 计算中和指数

中和指数是标准阴性血清处理后的病毒毒价( $\lg 10$ )和标准阳性血清处理后的病毒毒价( $\lg 10$ )之差。

4.4 结果判定

分离物引起典型 BoHV-1 细胞病变且中和指数  $> 1.5$  时,即可确定分离物为 BoHV-1。

## 5 微量血清中和试验

### 5.1 材料

#### 5.1.1 试剂

5.1.1.1 BoHV-1 标准毒株(IBR Baitha-Nu/67 弱毒株)冻干毒。

5.1.1.2 BoHV-1 标准阳性血清和 BoHV-1 标准阴性血清。

5.1.1.3 无 BoHV-1 抗体新生牛血清。

5.1.1.4 DMEM 培养液、细胞生长液和细胞维持液(配制方法见附录 A)。

5.1.1.5 MDBK 细胞

5.1.1.6 0.25% EDTA 胰酶。

#### 5.1.2 器材

5.1.2.1 水浴锅。

5.1.2.2 恒温箱。

5.1.2.3 微量可调移液器。

5.1.2.4 无菌移液器吸头。

5.1.2.5 无菌 96 孔细胞培养板。

5.1.2.6 恒温二氧化碳培养箱。

5.1.2.7 倒置显微镜。

#### 5.1.3 病毒抗原制备

5.1.3.1 用细胞生长液培养 MDBK 细胞,待细胞长成良好单层后,用 DMEM 培养液洗 2 次。

5.1.3.2 将 IBR Baitha-Nu/67 弱毒株冻干毒用 DMEM 培养液作 10 倍递增稀释。

5.1.3.3 按原培养液 1/10 量接毒,置 37°C 吸附 1 h,然后加入细胞维持液至原培养液量,置 37°C 培养。

5.1.3.4 待 80%~90% 细胞出现 BoHV-1 感染典型 CPE 时收获培养物,冻融 2 次后,以 10 000 r/min 离心 10 min,其上清液即为病毒抗原。

5.1.3.5 测定病毒毒价( $TCID_{50}$ ),分装小瓶,每瓶 1 mL,做好标记和收毒日期,储存于 -70°C 备用。半年内病毒毒价保持不变。

#### 5.1.4 病毒毒价( $TCID_{50}$ )测定

5.1.4.1 将制备的病毒抗原,用 DMEM 培养液作 10 倍递增稀释至  $10^{-7}$ 。

5.1.4.2 每一个稀释度接种 96 孔细胞培养板的 4 个孔,每孔 50  $\mu\text{L}$ 。

5.1.4.3 每孔加入细胞悬液(每毫升含 30 万~40 万细胞)100  $\mu\text{L}$  和细胞维持液 50  $\mu\text{L}$ 。同时,设 4 孔细胞为正常对照。置 37 $^{\circ}\text{C}$  培养,观察 72 h~120 h,每天记录 CPE 和无 CPE 的孔数。

5.1.4.4 按 Reed-Muench 方法计算  $\text{TCID}_{50}$ 。必要时,可多次测定病毒的  $\text{TCID}_{50}$ ,求其平均值作为中和抗原的毒价。

### 5.1.5 被检血清

无菌采集血液,并分离血清,不加任何防腐剂。

## 5.2 操作方法

5.2.1 血清均于水浴中 56 $^{\circ}\text{C}$  灭活 30 min。

5.2.2 将一瓶已知毒价的 BoHV-1 病毒抗原,用 DMEM 培养液稀释成每 50  $\mu\text{L}$  含 100  $\text{TCID}_{50}$ 。

5.2.3 取 0.3 mL 病毒悬液与等量的被检血清于离心管(或小试管中)中混合,置 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱中和 1 h。

5.2.4 将已中和的被检血清-病毒混合物加入 96 孔培养板孔内,每个样品接种 4 孔,每孔 100  $\mu\text{L}$ 。

5.2.5 于每一样品孔内加入 100  $\mu\text{L}$  MDBK 细胞悬液,细胞密度为每毫升含 30 万~40 万细胞,置 37 $^{\circ}\text{C}$  培养。

### 5.2.6 对照设置

5.2.6.1 标准阳性血清加抗原和标准阴性血清加抗原对照,其操作程序同 5.2.3、5.2.4、5.2.5。

5.2.6.2 被检血清毒性对照:每份被检血清样品接种 2 孔,每孔 50  $\mu\text{L}$ ,再加细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ 。

5.2.6.3 细胞对照:每孔加 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液,再加细胞生长液 100  $\mu\text{L}$ 。

5.2.6.4 病毒回归试验:

a) 将病毒抗原工作液(100  $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ )作 10 倍递增稀释至  $10^{-3}$ 。

b) 取抗原工作液及每个稀释度接种 4 孔,每孔 50  $\mu\text{L}$ ,加细胞生长液 50  $\mu\text{L}$ ,再加细胞悬液 100  $\mu\text{L}$ 。

c) 按 Reed-Muench 方法,计算本次试验  $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$  的实际含量。

## 5.3 结果判定

### 5.3.1 试验成立的条件

接种后 72 h~120 h,判定结果。当病毒抗原工作液对照、标准阴性血清对照均出现典型细胞病变,标准阳性血清对照无细胞病变,细胞对照正常,病毒抗原实际含量在 30  $\text{TCID}_{50}$ ~300  $\text{TCID}_{50}$  时,方能判定结果;否则,被认为此次试验无效。

### 5.3.2 判定

#### 5.3.2.1 定量判定

5.3.2.1.1 被检血清的中和抗体效价为保护 50% 接毒细胞孔不出现 CPE 的血清稀释度的倒数。

5.3.2.1.2 如果未经稀释的被检血清(终稀释度为 1/2)能使 50% 细胞孔不出现 CPE,则中和抗体效价为 1。

5.3.2.1.3 如果所有未经稀释的被检血清完全保护和倍比稀释血清(终稀释度为 1/4)能使 50% 细胞孔不出现 CPE,则中和抗体效价为 2。

#### 5.3.2.2 定性判定

5.3.2.2.1 中和抗体效价  $\geq 1$  者判为阳性。

5.3.2.2.2 中和抗体效价  $< 1$  者判为阴性。

## 6 酶联免疫吸附试验

### 6.1 材料

#### 6.1.1 试剂

- 6.1.1.1 抗牛免疫球蛋白-辣根过氧化物酶标记抗体。
- 6.1.1.2 BoHV-1 抗原。
- 6.1.1.3 BoHV-1 标准阳性血清和 BoHV-1 标准阴性血清。
- 6.1.1.4 抗原包被缓冲液、封闭液、洗涤液、底物溶液和终止液(配制方法见附录 B)。
- 6.1.2 器材
- 6.1.2.1 酶标反应板。
- 6.1.2.2 微量可调移液器。
- 6.1.2.3 移液器吸头。
- 6.1.2.4 酶标仪。
- 6.1.2.5 恒温箱。
- 6.2 操作方法
- 6.2.1 抗原制备
- 6.2.1.1 将病毒接种细胞,待 80%~90% 细胞出现 BoHV-1 感染典型 CPE 时收获培养物, -20℃ 冻存。
- 6.2.1.2 冻融 3 次,细胞溶解物经 25 000 r/min 离心 4 h,将含有病毒的沉淀物用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)重悬,冰上冷却,超声破碎。
- 6.2.1.3 经 2 000 r/min 离心 10 min,上清液加入终浓度为 0.5% 的去污剂 Nonidet P40 灭活病毒即为包被抗原。
- 6.2.2 抗原包被  
用包被缓冲液将抗原稀释至工作浓度包被反应板,每孔 150 μL,4℃ 包被 12 h 后使用。
- 6.2.3 洗板  
甩掉孔内的包被液,注满洗涤液,再甩干。如此连续操作 5 遍。
- 6.2.4 封闭  
每孔注满封闭液,置 37℃ 封闭 90 min,然后按 6.2.3 洗涤。
- 6.2.5 加样
- 6.2.5.1 标准阴、阳性血清和被检血清均用封闭液作 100 倍稀释,每份被检血清加 2 孔,每孔 150 μL。
- 6.2.5.2 每块板均设标准阴、阳性血清及稀释液对照各 2 孔。
- 6.2.5.3 置 37℃ 孵育 1 h,再按 6.2.3 洗涤。
- 6.2.6 加酶标记抗体  
每孔加入用封闭液稀释至工作浓度的酶标记抗体 150 μL。置 37℃ 再孵育 1 h,按 6.2.3 洗涤。
- 6.2.7 加底物  
每孔加底物溶液 150 μL,置室温(20℃左右)避光反应 20 min。
- 6.2.8 终止反应  
每孔加终止液 25 μL。
- 6.2.9 读数  
加入终止液 10 min 内,使用酶标仪测定结果(OD<sub>450nm</sub>)。
- 6.3 结果判定
- 6.3.1 试验成立条件  
阳性对照血清平均 OD<sub>450nm</sub> ≥ 0.5,阴性对照血清平均 OD<sub>450nm</sub> ≤ 0.2,判定试验条件成立。
- 6.3.2 P/N 比法  
被检样品(P)的吸光度值和阴性标准样品(N)值之比。  
P/N < 1.50 判为阴性;  
2.0 > P/N > 1.50 判为可疑;



$P/N \geq 2.0$  判为阳性。

6.3.3 凡可疑被检血清均应重检,仍为可疑时,则判为阴性。

## 7 实时荧光 PCR 试验

### 7.1 材料

#### 7.1.1 试剂

除另有规定,本方法试验用水应按照 GB/T 6682 规定的二级水,所用化学试剂均为分析纯。

##### 7.1.1.1 引物与探针

###### 7.1.1.1.1 引物与探针配制:

采用无 DNA 酶和 RNA 酶的水,将每条引物与探针配制成  $100 \mu\text{mol/L}$  储存液,置  $-20^\circ\text{C}$  或更低温度冻存;使用时,取适量配制成  $10 \mu\text{mol/L}$  的工作液,避免多次冻融。

###### 7.1.1.1.2 引物与探针序列:

*gB* 基因上游引物 *gB-F*:  $5'$ -TGTGGACCTAAACCTCACGGT- $3'$ ;

*gB* 基因下游引物 *gB-R*:  $5'$ -GTAGTCGAGCAGACCCGTGTC- $3'$ ;

*gB* 基因探针:  $5'$ -FAM-AGGACCGCGAGTTCTTGCCGC-TAMRA- $3'$ 。

7.1.1.1.3 探针  $5'$ 端标记的报告荧光基团及  $3'$ 端标记的淬灭基团,可根据荧光 PCR 仪设备等具体情况另行选定。

##### 7.1.1.2 病毒核酸提取试剂盒。

7.1.1.3  $2\times$ PCR 预混液、 $50\times$ ROX、无 DNA 酶和 RNA 酶水(此 3 种试剂可采用经验证等效的商品化实时荧光 PCR 试剂盒替代)。

### 7.1.2 器材

7.1.2.1 荧光 PCR 仪。

7.1.2.2 离心机。

7.1.2.3 涡旋混合器。

7.1.2.4 可调微量移液器。

7.1.2.5 无 DNA 酶和 RNA 酶的移液器吸头。

7.1.2.6 无 DNA 酶和 RNA 酶的离心管。

7.1.2.7 荧光 PCR 反应管。

### 7.1.3 DNA 模板制备

将 4.2.3 中处理得到的拭子样品、组织样品和精液用病毒核酸提取试剂盒进行病毒 DNA 的提取,提取 DNA 产物用作实时荧光 PCR 的 DNA 模板。DNA 模板直接用于检测,或储存  $-20^\circ\text{C}$  备用。长期储存,应置  $-80^\circ\text{C}$  条件下。

## 7.2 操作方法

### 7.2.1 对照设置

7.2.1.1 每次实时荧光 PCR 试验,都应设置阳性对照、阴性对照和试剂对照。从样品处理开始,应设置阳性对照和阴性对照;配制实时荧光 PCR 体系时,应设置试剂对照。

7.2.1.2 阳性对照:取已知阳性的同类样品作为阳性对照。也可将适量的 BoHV-1 病毒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

7.2.1.3 阴性对照:取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

7.2.1.4 试剂对照:以无 DNA 酶和 RNA 酶水作为 DNA 模板为试剂对照。

### 7.2.2 实时荧光 PCR 体系

7.2.2.1  $2\times$ PCR 反应缓冲液  $12.5 \mu\text{L}$ 。

- 7.2.2.2 上游引物(10 nmol/L)0.75  $\mu$ L。
- 7.2.2.3 下游引物(10 nmol/L)0.75  $\mu$ L。
- 7.2.2.4 探针(10  $\mu$ mol/L)0.5  $\mu$ L。
- 7.2.2.5 50 $\times$ ROX 0.5  $\mu$ L。
- 7.2.2.6 DNA 模板 1.5  $\mu$ L。
- 7.2.2.7 无 DNA 酶和 RNA 酶水 8.5  $\mu$ L。
- 7.2.2.8 加完样后,盖紧管盖,混匀,低速瞬时离心,使反应液集中管底。

### 7.2.3 实时荧光 PCR 反应程序

- 7.2.3.1 第一阶段:50 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 10 min,1 个循环。
- 7.2.3.2 第二阶段:95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,45 个循环,荧光收集设置在 60 $^{\circ}$ C 退火延伸时进行。
- 7.2.3.3 荧光素或检测通道设置:采用 FAM 通道,将报告荧光(report dye)设定为 FAM,采用其他报告荧光应按仪器说明对应设定通道;淬灭荧光(quencher dye)设定为 TAMRA,校准荧光(reference dye)设定为 None。可根据不同品牌仪器说明设置等效参数。

## 7.3 结果判定

### 7.3.1 试验成立条件

阳性对照的  $C_t$  值应 $\leq 30$ 且曲线有明显的对数增长期,阴性对照和试剂对照应无  $C_t$  值。对照满足以上条件,此次试验才成立。

### 7.3.2 结果判定

- 7.3.2.1 当待检样品无  $C_t$  值时,判定样品 BoHV-1 核酸阴性。
- 7.3.2.2 当待检样品  $C_t$  值 $\leq 38$ 且曲线有明显的对数增长期,判定样品 BoHV-1 核酸阳性。
- 7.3.2.3 当待检样品  $38 < C_t$  值 $\leq 45$ 时,应进行重复试验。若重复试验  $C_t$  值 $\leq 45$ ,且曲线有明显的对数增长期,判定样品 BoHV-1 核酸阳性;否则,判定样品 BoHV-1 核酸阴性。



附录 A  
(规范性附录)  
细胞培养液配制

A.1 细胞生长液

于 DMEM 基础细胞培养液中,加入终浓度为 5% 新生牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素。新生牛血清应无 BoHV-1 病毒污染,且 BoHV-1 血清学阴性。

A.2 细胞维持液

于 DMEM 基础细胞培养液中,加入终浓度为 1% 的新生牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素。新生牛血清应无 BoHV-1 病毒污染,且 BoHV-1 血清学阴性。

**附录 B**  
(规范性附录)  
**酶联免疫吸附试验溶液的配制**

**B.1 包被缓冲液(pH 9.6 碳酸盐缓冲液)**

碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	1.59 g
碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )	2.93 g
氯化钠( $\text{NaCl}$ )	7.30 g
加无离子水至 1 000 mL。	

**B.2 洗涤液(pH 7.4, 0.05% 吐温-磷酸盐缓冲液)**

磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.20 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2.90 g
氯化钾( $\text{KCl}$ )	0.20 g
氯化钠( $\text{NaCl}$ )	8.20 g
吐温-20(Tween-20)	0.5 mL
加无离子水至 1 000 mL。	

**B.3 封闭液的配制**

三羧甲基氨基甲烷(Tris)	6.06 g
氯化钠( $\text{NaCl}$ )	8.80 g
乙二胺四乙酸二钠( $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$ )	0.37 g
加无离子水至 1 000 mL。	

用 1 mol/L 盐酸调 pH 至 7.4, 临用前加入吐温-20(Tween-20)和健康马血清, 使终浓度分别达 0.1% 和 3%。

**B.4 底物溶液**

磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	7.30 g
柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	5.10 g
加无离子水至 1 000 mL。	

临用前, 称 40 mg 邻苯二胺溶解在 100 mL 上述溶液中。完全溶解后, 再加 0.15  $\mu\text{L}$  3% 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 混合后立即使用。

**B.5 终止液**

浓硫酸	22.2 mL
无离子水	177.8 mL

附录 C

(资料性附录)

实时荧光 PCR 试验过程中防止交叉污染的措施

- C.1 采样及样品处理过程,应防止不同样品之间通过器具、手套等的交叉污染。
  - C.2 在实验过程中,应穿工作服和戴一次性手套。勤换手套,工作服应经常清洗。
  - C.3 吸头、离心管、PCR 管等应经过高压灭菌处理,一次性使用,不得回收清洗后重复使用。
  - C.4 样品处理与 PCR 加样应在不同的区域进行,不同区域配备独立的加样工具和用具。该区域可以是独立的空间间隔、有紫外线消毒设施的独立的设备,如核酸提取工作站、PCR 加样工作站、可密闭进行紫外线消毒的超净工作台、生物安全柜等。若在敞开的空间进行核酸提取或 PCR 加样,该空间应安装紫外灯或配备具有等同降解核酸功能的设备,如移动紫外灯、带紫外线消毒功能的空气消毒净化器等。上述区域在每次使用后应及时清洁处理,并在使用前后照射紫外线 30 min 以上。每个区域应有专门的废弃物容器。每次实验结束,应在紫外线消毒前,及时清理废弃物及消毒容器,并将该废弃物容器放回工作区进行紫外线消毒。
  - C.5 PCR 反应液等试剂应按检测需求分装储存,避免同一管试剂多次开启使用。
  - C.6 装有 DNA 模板、样品或试剂的离心管在打开之前,应短暂离心,避免离心管崩开,所有操作尽量避免产生气溶胶。
  - C.7 上机运行前,应检查盖紧各 PCR 管,以防荧光物质或模板泄漏而污染机器。
  - C.8 遵循 SN/T 1193—2003《基因检验实验室技术要求》的其他技术要求。
-

中华人民共和国  
农业行业标准  
牛传染性鼻气管炎诊断技术

NY/T 575—2019

\* \* \*

中国农业出版社出版  
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

\* \* \*

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2019 年 10 月第 1 版 2019 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·4866

定价: 24.00 元



NY/T 575—2019

版权专有 侵权必究  
举报电话: (010) 59194261