

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3465—2019

山羊关节炎脑炎诊断技术

Diagnostic techniques for caprine arthritis-encephalitis

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：中国动物疫病预防控制中心、中国农业科学院兰州兽医研究所、天津大学、重庆市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：宋晓晖、孙雨、张志东、黄金海、肖颖、窦永喜、曲萍、胡冬梅、王传彬、杨林。

引 言

山羊关节炎脑炎(Caprine arthritis-encephalitis, CAE)是由反转录病毒科慢病毒属山羊关节炎脑炎病毒(CAE virus, CAEV)引起的一种慢性进行性传染病。CAEV 感染引起肺脏、关节、乳房以及中枢神经系统的进行性单核细胞炎症损伤,临床上羔羊发生脑脊髓炎,成年山羊发生多发性关节炎、间质性肺炎和乳房炎。山羊关节炎脑炎常呈亚临床感染,但可通过初乳、乳汁或者呼吸道分泌物持续传播病毒。世界动物卫生组织(World Organisation for Animal Health, OIE)将山羊关节炎脑炎列为必须报告的动物疫病,我国《一、二、三类动物疫病病种名录》将其列为二类动物疫病。梅迪-维斯纳病和山羊关节炎脑炎都是小反刍兽慢病毒病,两种病原在系统发育上存在密切相关性,临床上山羊关节炎脑炎只感染山羊,以关节炎最常见,梅迪-维斯纳病感染绵羊,以慢性进行性肺炎最常见。

本标准参考了 OIE《陆生动物诊断试剂和疫苗使用手册》的有关内容,技术方法与 OIE 推荐的标准方法一致。其中,病毒分离适用于从活体动物的乳汁、关节囊液或外周血液中以及从死亡动物的肺、滑膜或乳腺组织中分离 CAEV,可用于临床诊断;聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)适用于检测病毒核酸,可用于对前病毒 DNA 的检测;酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)适用于检测血清样品中的 CAEV 抗体,可用于临床诊断、流行病学调查、检验检疫;琼脂免疫扩散试验(Agar Gel Immunodiffusion, AGID)适用于检测血清样品中的 CAEV 抗体,可用于临床诊断、流行病学调查、检验检疫。

山羊关节炎脑炎诊断技术

1 范围

本标准规定了山羊关节炎脑炎的临床诊断、病原分离与鉴定、病原核酸检测以及血清学检测的技术要求。

本标准适用于山羊关节炎脑炎的临床诊断、实验室检测以及检验检疫。

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 临床诊断

3.1 流行病学

3.1.1 易感动物

在自然条件下,山羊最易感,偶见绵羊发病。山羊易感性不受性别和年龄影响。

3.1.2 传染源

病羊和隐性感染羊是主要传染源。

3.1.3 传播途径

羔羊吮吮感染山羊的初乳或奶是主要的传播途径,也可通过被病羊分泌物与排泄物污染的饲草、饲料、饮水传播,还可通过免疫治疗、人工授精器械、挤奶器械等传播。

3.2 临床症状

3.2.1 脑脊髓炎

2月龄~6月龄羔羊常见脑脊髓炎,偶见于青年羊和成年羊。感染早期病羊表现虚弱、共济失调和后肢站立不稳,也可见反射亢进和肌张力亢进,继而发展为后肢轻瘫、四肢软弱和瘫痪,也可见沉郁、头部歪斜、转圈运动、角弓反张、斜颈和划水样等神经症状。

3.2.2 关节炎

成年羊多见,病羊关节囊肿胀,跗关节最常见,伴有不同程度的跛行。

3.2.3 肺炎

病羊可见呼吸困难,偶见干咳;也可见食欲下降,精神不振,体重减轻。

3.2.4 乳房炎

病羊分娩后乳腺肿胀、坚硬,无乳,产奶量低下。

3.3 结果判定

山羊出现上述临床症状之一,可判定为山羊关节炎脑炎疑似病例。

4 病理诊断

4.1 脑脊髓炎

剖检可见脑脊髓出现不对称分布、颜色呈淡褐色的肿胀;病理组织学可见脑和脊髓出现多处单核细胞浸润的炎性病灶,伴有不同程度的脱髓鞘。

4.2 关节炎

剖检可见关节囊增厚和滑膜绒毛膜明显增生,也可见关节囊、腱鞘和黏液囊软组织钙化,严重病例可见软骨损伤、韧带和肌腱断裂、关节周围形成骨刺。病理组织学可见滑膜细胞增生,滑膜下单核细胞浸润,绒毛过度增生、滑膜水肿和滑膜坏死。

4.3 肺炎

剖检可见肺脏坚实、呈暗红色,有白色病灶。支气管淋巴结可见肿胀。病理组织学可见肺泡隔膜、支气管及周围组织的淋巴细胞浸润。

4.4 乳房炎

病理组织学可见乳导管基质周围单核细胞浸润,正常结构不清晰,并出现坏死灶。

4.5 结果判定

表现 3.2 临床症状的病羊,剖检出现上述病理变化之一,可判定为山羊关节炎脑炎疑似病例。

5 病原学方法

5.1 病原分离与鉴定

5.1.1 试剂耗材

除特殊说明外,本标准使用的化学试剂均为分析纯,水均为符合 GB/T 6682 的二级水。

5.1.1.1 细胞生长液(配制方法见附录 A 中的 A.1)。

5.1.1.2 细胞维持液(配制方法见 A.2)。

5.1.1.3 Hank's 平衡盐溶液。

5.1.1.4 细胞消化液(配制方法见 A.3)。

5.1.1.5 青霉素、链霉素(双抗)液(配制方法见 A.4)。

5.1.1.6 山羊滑膜(goat synovial membrane, GSM)细胞(制备方法见附录 B)。

5.1.1.7 肺泡巨噬细胞(制备方法见附录 C)。

5.1.1.8 细胞培养瓶(25 cm²)。

5.1.1.9 灭菌吸管(5 mL、10 mL)。

5.1.1.10 微量可调移液器(10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 100 μL~1 000 μL)以及相应吸头。

5.1.1.11 抗凝真空采血管。

5.1.1.12 聚四氟乙烯袋。

5.1.2 仪器设备

5.1.2.1 二氧化碳培养箱。

5.1.2.2 普通冰箱(2℃~8℃)、低温冰箱(-20℃)。

5.1.2.3 倒置生物显微镜。

5.1.2.4 二级生物安全柜。

5.1.2.5 超净工作台。

5.1.2.6 通用离心机。

5.1.3 样品

无菌采集疑似感染羊的乳汁、外周血或者关节囊液样品,或剖检无菌采集病羊新鲜肺脏、关节滑膜、乳房等组织样品。样品采集、保存、运输按照 NY/T 541 的规定进行。

5.1.4 试验步骤

5.1.4.1 样品处理

5.1.4.1.1 提取白细胞

乳汁、外周血或者关节囊液样品用商品化提取液提取白细胞,用细胞生长液将白细胞制成约 6×10^8

个细胞/mL的悬液。将细胞悬液加入到聚四氟乙烯袋中,37℃、5% CO₂条件下,培养 10 d~12 d。

5.1.4.1.2 培养组织细胞

组织样品置于含适量细胞生长液的培养皿中,用手术剪充分剪碎,用巴氏管吸取转移单个组织碎片至 25 cm² 细胞培养瓶中,每瓶放置 20 个~30 个组织碎片。在每个碎片上滴加一滴细胞生长液后,37℃、5% CO₂条件下,静置培养 3 d~4 d,使组织碎片增殖贴壁。待培养瓶中的组织片贴壁后,补加培养液,使细胞增殖,用胰酶消化后分瓶培养并形成单层细胞。

5.1.4.1.3 制备肺泡巨噬细胞

肺脏可按附录 C 的方法制备肺泡巨噬细胞。

5.1.4.2 与指示细胞 GSM 共培养

GSM 单层细胞用细胞维持液洗 2 次,加入 2 mL~5 mL 按照 5.1.4.1.1、5.1.4.1.2、5.1.4.1.3 方法制备的细胞,补齐细胞培养液至 5 mL,37℃、5% CO₂的条件下培养。

5.1.4.3 结果观察

连续培养观察 5 周,CAEV 感染细胞典型细胞病变为形成合胞体细胞,每个合胞体细胞中含有 2 个~20 个细胞核,以合胞体细胞为中心,周围是遮光性强的梭形细胞。观察期间应根据细胞生长状况换液和传代。

5.1.4.4 病毒的鉴定

出现 5.1.4.3 典型细胞病变后,应制备细胞培养飞片(操作方法见附录 D),并采用间接免疫荧光抗体技术(操作方法见附录 E)或电镜技术鉴定并确认。

5.1.4.5 结果判定

阳性:活体组织、剖检组织或肺泡巨噬细胞同指示细胞 GSM 共培养后,细胞出现 CAEV 典型病变,并且经间接免疫荧光抗体染色,细胞培养飞片同阳性血清有荧光反应,或者电镜观察到直径为 80 nm~120 nm、表面有长的纤突、核心致密位于粒子的中央、呈棒状或钝圆锥状的典型的慢病毒粒子,则判定为山羊关节炎脑炎病毒分离阳性,表述为检出山羊关节炎脑炎病毒。

阴性:活体组织、剖检组织或肺泡巨噬细胞与指示细胞 GSM 共培养后,细胞没有 CAEV 典型病变,并且经间接免疫荧光抗体染色,细胞培养飞片与阳性血清没有荧光反应,或者电镜没有观察到典型的慢病毒粒子,则判定为山羊关节炎脑炎病毒分离阴性,表述为未检出山羊关节炎脑炎病毒。

5.2 PCR 方法

5.2.1 试剂耗材

5.2.1.1 DNA 提取试剂盒。

5.2.1.2 Ficoll Pague PLUS。

5.2.1.3 2×Taq buffer 反应液。

5.2.1.4 10×PCR 反应液。

5.2.1.5 DL 2 000 plus DNA Marker。

5.2.1.6 1%琼脂糖(配制方法见附录 F)。

5.2.1.7 5×TBE 缓冲液(配制方法见附录 F)。

5.2.1.8 引物

检测引物及序列参见附录 G,引物用 DEPC 水配成 100 μmol/L 的储存液和 10 μmol/L 的工作液。

5.2.1.9 对照样品

阳性对照:含有目的基因片段的质粒或者病毒分离培养物。

阴性对照:空载体质粒或者正常组织细胞。

5.2.1.10 微量可调移液器(10 μL~100 μL,20 μL~200 μL,100 μL~1 000 μL)以及相应吸头。

5.2.1.11 0.2 mL PCR 管。

5.2.2 仪器设备

5.2.2.1 PCR 扩增仪。

- 5.2.2.2 台式离心机。
- 5.2.2.3 凝胶成像仪。
- 5.2.2.4 普通冰箱(2℃~8℃)。
- 5.2.2.5 普通冰箱(-20℃)。
- 5.2.2.6 分光光度计。

5.2.3 样品

按照 NY/T 541 的方法,采集羊静脉抗凝血 5 mL,来回颠倒几次,使抗凝剂与血液充分混合。

5.2.4 试验步骤

5.2.4.1 样品处理

使用商品化 Ficoll Pague PLUS 提取试剂,提取抗凝血中的外周血单核细胞。

5.2.4.2 DNA 提取

按 DNA 提取试剂盒的操作说明书,提取模板 DNA,用分光光度法测定模板浓度,-20℃冰箱中备用。

5.2.4.3 PCR 反应体系

建立 25 μ L 反应体系,包括:

2×Taq buffer	12.5 μ L
上游引物(10 μ mol/L)	0.5 μ L
下游引物(10 μ mol/L)	0.5 μ L
模板 DNA	1 μ L
灭菌双蒸水	10.5 μ L

5.2.4.4 PCR 反应条件

95℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,54℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,重复循环 35 次,72℃延伸 10 min。

5.2.4.5 PCR 产物电泳

取 PCR 扩增产物 5 μ L 与 0.5 μ L 的 10×电泳上样缓冲液混合,经 1%琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中观察结果。

5.2.5 结果判定

5.2.5.1 试验成立的条件

阳性对照成立条件:有大小为 591 bp 的特异性扩增条带。

阴性对照成立条件:无任何扩增条带。

空白对照成立条件:无任何扩增条带。

5.2.5.2 结果判定

阳性:样品有大小为 591 bp 的特异性扩增条带,判定为 PCR 结果阳性,表述为检出山羊关节炎脑炎病毒核酸。

阴性:样品没有 591 bp 的特异性扩增条带,判定为 PCR 结果阴性,表述为未检出山羊关节炎脑炎核酸。

6 血清学诊断

6.1 琼脂凝胶免疫扩散试验

6.1.1 试剂耗材

6.1.1.1 琼脂糖。

6.1.1.2 磷酸盐缓冲液(配制方法见附录 H)。

6.1.1.3 山羊关节炎脑炎抗原。

6.1.1.4 山羊关节炎脑炎阳性血清。

6.1.1.5 培养皿(9 cm)。

6.1.1.6 六边形打孔器。

6.1.1.7 微量可调移液器(10 μL ~100 μL , 20 μL ~200 μL , 100 μL ~1 000 μL)及相应吸头。

6.1.2 仪器设备

6.1.2.1 恒温培养箱。

6.1.2.2 普通冰箱(2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$)。

6.1.2.3 电子天平(0.001 g)。

6.1.2.4 高压灭菌器。

6.1.3 试验操作

6.1.3.1 琼脂糖凝胶平板的制备

1 g 琼脂糖,加入 100 mL 磷酸盐缓冲液中,水浴煮沸融化后,冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$,将琼脂糖溶液倒入培养皿中,每个培养皿倒入约 18 mL,厚度 2.5 mm,半盖上皿盖。待琼脂糖冷却凝固后,盖好培养皿盖,并用封口膜封住平皿盖边缘,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下倒置保存备用。

6.1.3.2 样品处理

待检血清样品经 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min。

6.1.3.3 平板打孔

用六边形打孔器或者其他孔型的打孔器垂直在琼脂糖凝胶平板打孔,孔间距以 3 mm~5 mm 为宜,挑出每一孔内的琼脂糖凝胶块,勿破坏孔洞。酒精灯火焰封底,将所打的孔按图 1 所示进行编号和定位。

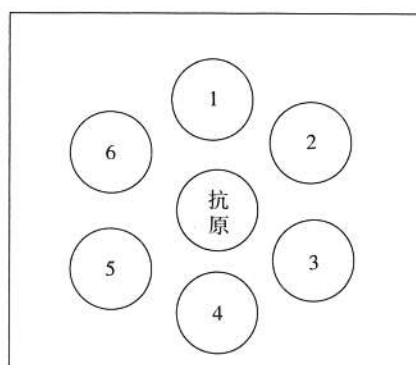


图 1 琼脂凝胶平板打孔编号图示

6.1.3.4 加样

中央孔加入山羊关节炎脑炎抗原,1、3、5 孔分别加入待检血清样品,2、4、6 孔分别加入标准阳性血清。加至孔满为止,平皿加盖。

6.1.3.5 温育

待孔中液体吸干后,将平皿倒置,防止水分蒸发。琼脂板则放入湿盒中,于 20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育过夜。

6.1.3.6 观察结果

孵育 24 h 后,观察标准阳性血清的沉淀线。如不清晰,继续在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置孵育 24 h。

6.1.3.7 实验结果判定

6.1.3.7.1 实验成立条件

标准阳性血清孔与抗原孔之间形成一条清晰、致密的白色沉淀线。

6.1.3.7.2 结果判定

阳性:当标准阳性血清与抗原孔间有明显的沉淀线,而被检血清与抗原孔间也有明显沉淀线,或标准阳性血清与抗原孔间的沉淀线末端向毗邻的被检血清孔内侧偏弯时,判定为琼脂凝胶免疫扩散阳性,表述为检出山羊关节炎脑炎血清抗体。

阴性：当标准阳性血清与抗原孔间有明显的沉淀线，而被检血清与抗原孔间无沉淀线，或标准阳性血清与抗原孔间的沉淀线末端向毗邻的被检血清孔直伸或向外方偏弯时，判为琼脂凝胶免疫扩散阴性，表述为未检出山羊关节炎脑炎血清抗体。

疑似：标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线末端似乎向毗邻受检血清孔内侧偏弯，但又不易判定，应重新进行检测，重检后仍为可疑，判为阳性，表述为检出山羊关节炎脑炎血清抗体。

6.2 竞争 ELISA 试验(c-ELISA)

6.2.1 试剂耗材

6.2.1.1 包被抗原：CAEV 的 SU 重组蛋白。

6.2.1.2 对照血清：山羊关节炎脑炎阴性血清、山羊关节炎脑炎阳性血清。

6.2.1.3 酶标竞争单抗：HRP 酶标记的抗 CAEV-SU 的单克隆抗体。

6.2.1.4 10×稀释液（配制方法见附录 I 中的 I.1）。

6.2.1.5 底物溶液（配制方法见附录 1.2）。

6.2.1.6 终止液（配制方法见附录 1.3）。

6.2.1.7 微量可调移液器（10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 100 μL~1 000 μL）及相应吸头。

6.2.1.8 八通道移液器（50 μL~300 μL）及相应吸头。

6.2.1.9 96 孔酶标板。

6.2.2 仪器设备

6.2.2.1 酶标仪。

6.2.2.2 恒温培养箱。

6.2.2.3 洗板机。

6.2.2.4 台式离心机。

6.2.3 试验操作

6.2.3.1 加样

在包被山羊关节炎脑炎重组抗原的酶标板中加入阴性对照血清、阳性对照血清以及待检样品，每孔 50 μL。

6.2.3.2 孵育

用封口膜封住酶标板，室温或者 37℃ 温育 1 h。

6.2.3.3 洗板

弃去酶标板中液体，用工作浓度洗液洗板 3 次。

6.2.3.4 加入酶标竞争单抗

除对照孔外，其余每孔加入 50 μL 酶标竞争单抗，室温或 37℃ 温育 30 min。

6.2.3.5 洗板

弃去酶标板中液体，用工作浓度洗液洗板 3 次。

6.2.3.6 加底物

每孔中加入 100 μL 底物溶液，室温下避光温育 20 min。

6.2.3.7 反应终止

每一孔中加入 50 μL 终止液。

6.2.3.8 读取吸光度

在酶标仪上读取每孔的 650 nm 的吸光度，并根据 OD 值按式(1)计算抑制率。

$$I = 100 - 100 \times \frac{a}{b} \dots\dots\dots (1)$$

式中：
I ——抑制率，单位为百分率(%)；

a ——样品 OD 值;

b ——阴性对照 OD 值。

6.2.4 实验结果判定

6.2.4.1 实验成立条件

阴性对照 OD 值 >0.3 , 且阳性对照抑制率 $\geq 35\%$ 。

6.2.4.2 结果判定

阳性: 血清样品抑制率 $\geq 35\%$, 判定为 C-ELISA 检测阳性, 表述为检出山羊关节炎脑炎血清抗体。

阴性: 血清样品抑制率 $< 35\%$, 判定为 C-ELISA 检测阴性, 表述为未检出山羊关节炎脑炎血清抗体。

7 综合判定

临床疑似病例并且 5.1、5.2、6.1、6.2 任何一项阳性者, 判为山羊关节炎脑炎阳性。

临床疑似病例并且 5.1、5.2、6.1、6.2 检测均为阴性, 判为山羊关节炎脑炎阴性。