

ICS 11.220
CCS B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4042—2021

水貂病毒性肠炎诊断技术

Diagnostic techniques for mink viral enteritis

2021-12-15 发布

2022-06-01 实施

中华人民共和国农业农村部 发布



目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 临床诊断	1
5.1 流行特点	1
5.2 临床症状	1
5.3 病理变化	2
6 样品采集及处理	2
6.1 仪器	2
6.2 耗材	2
6.3 试剂	2
6.4 样品处理	2
7 病原分离鉴定	2
7.1 仪器	2
7.2 耗材	3
7.3 试剂	3
7.4 样品处理	3
7.5 病毒分离鉴定	3
8 血凝和血凝抑制实验(HA-HI)	3
8.1 仪器	3
8.2 耗材	3
8.3 试剂	3
8.4 HA 实验操作方法	4
8.5 HI 实验操作方法	4
8.6 质控标准	5
8.7 结果判定	5
9 PCR 检测	5
9.1 仪器	5
9.2 耗材	5
9.3 试剂	5
9.4 DNA 提取	6
9.5 PCR 检测	6
9.6 质控标准	6
9.7 结果判定	6
10 荧光 PCR 检测	7
10.1 仪器	7
10.2 耗材	7

10.3	试剂	7
10.4	DNA 提取	7
10.5	荧光 PCR 反应体系	7
10.6	荧光 PCR 反应参数	7
10.7	质控标准	7
10.8	结果判定	7
11	综合判定	7
附录 A(资料性)	水貂病毒性肠炎病例腹泻物特征图	8
附录 B(资料性)	磷酸盐缓冲液配制	9
附录 C(资料性)	水貂肠炎病毒分离鉴定相关溶液配制	10
附录 D(资料性)	HA-HI 实验相关溶液配制及判定结果示意图	12
附录 E(资料性)	PCR 检测引物及溶液配制	13
附录 F(资料性)	实时荧光 PCR 扩增引物、探针、扩增序列	15

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院特产研究所、吉林大学、佛山科学技术学院、中国兽医药品监察所、中国动物卫生与流行病学中心、长春海关。

本文件主要起草人：张海玲、闫喜军、胡博、刘昊、白雪、卢士英、王洋、张蕾、赵传芳、程悦宁、章沙沙、朱言柱、张东亮、印春生、王君玮、廉士珍、王伟利、赵建军、鲁荣光、徐磊。

引 言

水貂病毒性肠炎 (Mink viral enteritis)是由水貂肠炎病毒(Mink enteritis virus,MEV,也称为水貂细小病毒)引起水貂(*Neovison vison*)的一种急性、高度接触性传染病,以剧烈腹泻为主要临床特征。自20世纪40年代末开始,水貂病毒性肠炎呈世界性暴发,我国首发于1980年。在自然条件下,不同品种和不同年龄的水貂均易感,幼貂易感性极强,发病率50%~60%,病死率最高可达90%,给水貂养殖业造成巨大经济损失。

水貂病毒性肠炎诊断技术

1 范围

本文件规定了水貂病毒性肠炎临床诊断、病原分离鉴定、血凝-血凝抑制实验(HA-HI)、PCR 检测和实时荧光 PCR 检测操作方法的技术要求。

本文件适用于水貂病毒性肠炎的临床诊断、检疫、监测和流行病学调查。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

MEV:水貂肠炎病毒(Mink enteritis virus)

MEM:最低营养需求培养基(Minimum essential medium)

CRFK:猫肾细胞(Crandell rees feline kidney)

CPE:细胞病变效应(Cytopathic effect)

HA-HI:血凝-血凝抑制实验(Hemagglutination-hemagglutination inhibition)

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

Ct:循环阈值(Cycle threshold)

5 临床诊断

5.1 流行特点

5.1.1 各年龄段、各品系的水貂均易感,其中仔貂最易感。

5.1.2 发病和带毒水貂是本病主要传染源。

5.1.3 消化道是本病主要传播途径。既可通过交配、撕咬等直接传播;又可通过尿液、唾液等向体外排毒污染饲料、饮水及圈舍饲养环境间接传播;也可通过流动人员、运输设备、工具、鸟类、鼠类和昆虫媒介机械传播。

5.1.4 具有季节性,常在8月~9月发生,此时正是仔貂分窝及其母源抗体处于较低水平时期,容易引起大规模暴发流行,冬季散发。

5.2 临床症状

5.2.1 本病潜伏期4 d~8 d,病程1 d~14 d不等。

5.2.2 精神沉郁,食欲减退或废绝,部分水貂出现呕吐等症状。

5.2.3 大部分水貂体温升高达40℃以上(包括40℃),有的体温升高持续2 d以上。

5.2.4 出现腹泻,排出混有血液、黏液的水样便或混有肠黏膜的稀便,呈黄色、绿色或灰白色,有的出现灰白色或粉红色管型便(见附录A),伴有刺鼻腥臭气味。

5.3 病理变化

5.3.1 肝、脾、肾和肠系膜淋巴结肿大；胃、肠道及肠系膜淋巴结出血，肠黏膜脱落；肠胀气，肠壁变薄，内容物呈黑绿色或红色，部分发生脑出血。

5.3.2 部分淋巴小结变性和坏死，淋巴细胞显著减少，脾脏小动脉周围淋巴细胞减少。肝脏小叶周边肝细胞变性，变性肝细胞的胞浆内含有空泡。

5.3.3 十二指肠、空肠和回肠绒毛萎缩、钝化，绒毛和隐窝上皮细胞脱落，隐窝扩张。

6 样品采集及处理

6.1 仪器

6.1.1 微量移液器(200 μL ~1 000 μL)。

6.1.2 天平。

6.1.3 高压蒸汽灭菌锅。

6.1.4 组织匀浆机或研磨皿。

6.1.5 高速冷冻离心机(转速 \geq 12 000 r/min)。

6.1.6 生物安全柜。

6.1.7 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

6.1.8 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

6.2 耗材

6.2.1 吸头(200 μL ~1 000 μL)。

6.2.2 5 mL 离心管。

6.2.3 剪刀。

6.2.4 镊子。

6.2.5 棉拭子。

6.3 试剂

6.3.1 除特别说明以外，本文件所用试剂均为分析纯，实验用水符合 GB/T 6682 分析实验室用水规格。

6.3.2 磷酸盐缓冲液(0.015 mol/L, pH 6.4)(见附录 B)。

6.3.3 三氯甲烷(氯仿)。

6.4 样品处理

6.4.1 除特别说明以外，本文件样品采集应符合 NY/T 541 的规定。

6.4.2 采集样品包括发病和病死水貂的肠道组织、肠内容物、肠系膜淋巴结、粪便或直肠拭子。

6.4.3 用无菌镊子和剪刀取发病和病死水貂肠内容物、肠道组织、肠黏膜、肠系膜淋巴结或粪便样品 1 g，加 5 倍体积的磷酸盐缓冲液，用组织匀浆机或研磨皿研磨乳化制成乳剂， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱反复冻融 3 次，振荡混匀后 3 000 r/min 离心 10 min，取上清液 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

6.4.4 用无菌棉拭子轻轻旋转插入发病水貂直肠 2 cm~4 cm 刮取内容物，直肠拭子放入离心管，用 2 mL 磷酸盐缓冲液浸润后，3 000 r/min 离心 10 min，取上清液 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

6.4.5 用微量移液器吸取 6.4.3、6.4.4 处理溶液，加等体积氯仿充分振荡混匀，12 000 r/min 离心 15 min，吸取上层液相冻存 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

注：以上操作均在生物安全柜中进行。

7 病原分离鉴定

7.1 仪器

7.1.1 微量移液器(200 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL)。

7.1.2 5% CO₂培养箱。

7.1.3 生物安全柜。

7.1.4 -20℃冰箱。

7.2 耗材

7.2.1 吸头(200 μL~1 000 μL, 20 μL~200 μL)。

7.2.2 细胞培养瓶。

7.2.3 10 mL 吸管。

7.3 试剂

7.3.1 除特别说明以外,本文件所用试剂均为分析纯,实验用水符合 GB/T 6682 的规定。

7.3.2 胎牛血清。

7.3.3 CRFK 传代细胞。

7.3.4 MEM 细胞培养液(见附录 C 中的 C.1)。

7.3.5 MEM 细胞维持液(见 C.2)。

7.3.6 0.25%胰蛋白酶溶液(见 C.3)。

7.3.7 青、链霉素双抗溶液(含青霉素 10 000 IU/mL,链霉素 10 mg/mL)。

7.4 样品处理

吸取 6.4.5 样品处理液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌备用。

注:以上操作在生物安全柜中进行。

7.5 病毒分离鉴定

7.5.1 将 CRFK 细胞用 MEM 细胞培养液培养长满单层(见 C.4),经 0.25%胰蛋白酶消化传代。

7.5.2 将 7.4 中制备的滤液首次接毒按照 5%~10%,之后按 2%~3%细胞悬液体积比例同步接种于含青链霉素双抗(青霉素 100 IU/mL,链霉素 100 μg/mL)的 CRFK 传代细胞悬液中(3×10^6 个/mL~ 4×10^6 个/mL),置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

7.5.3 接毒培养后 24 h,更换成 MEM 维持液,于 37℃ 继续培养,并逐日观察细胞病变(CPE)。

7.5.4 如无 CPE,细胞培养 3 d~5 d 后用胰酶消化并连续传代培养,至第 4 代仍无 CPE 判定为阴性。

7.5.5 若细胞聚集、萎缩、变窄,呈网状(见 C.5),待病变达到 80% 左右收获病毒液,冻融 3 次后,置于 -20℃ 冰箱冷冻保存。出现以上特异性 CPE 可初步判定为病毒分离阳性,但需要进一步鉴定是否为 MEV。

8 血凝和血凝抑制实验(HA-HI)

8.1 仪器

8.1.1 8 通道或 12 通道微量移液器(20 μL~200 μL)。

8.1.2 冷冻离心机。

8.1.3 4℃ 冰箱。

8.2 耗材

8.2.1 与多通道移液器配套的取样量程范围 20 μL~200 μL 吸头。

8.2.2 底部角度为 90° 的 V 型 96 孔血凝板。

8.2.3 1.5 mL 离心管。

8.2.4 一次性液体加样槽。

8.2.5 恒温水浴锅。

8.3 试剂

8.3.1 除特别说明以外,本文件所用试剂均为分析纯,实验用水符合 GB/T 6682 的规定。

8.3.2 病毒待检样品:6.4.5 中样品收集上清或 7.5.5 中病毒分离细胞培养液。

8.3.3 阳性对照:HA 效价 $\geq 1:32$ 的病毒液。

8.3.4 阴性对照:HA 效价 $< 1:8$ 的正常水貂样品处理上清。

8.3.5 MEV 阳性血清:血凝抑制抗体效价 $\geq 1:256$ 。

8.3.6 胎牛血清。

8.3.7 1%猪红细胞液(见附录 D 中的 D.1)。

8.4 HA 实验操作方法

8.4.1 取 6.3.2 中磷酸盐缓冲液(0.015 mol/L, pH 6.4)1 L,使用前加入 0.3% (V/V) 的经 56 °C、30 min 灭活的胎牛血清,即为 HA-HI 实验缓冲液,现用现配。

8.4.2 在 96 孔 V 型血凝板上,从第 1 孔至第 11 孔,用移液器每孔加入处理的磷酸盐缓冲液 25 μ L。

8.4.3 用移液器吸取待检样品 25 μ L,从第 1 排孔(纵列)起,依次做倍比稀释,至第 11 个倍数孔,弃去移液器内 25 μ L 液体(稀释倍数依次为 2、4、8、16、32……2 048)。

8.4.4 每孔加入 25 μ L 磷酸盐缓冲液,12 孔为红细胞对照,加入磷酸盐缓冲液 50 μ L。

8.4.5 每孔加入 1%猪红细胞悬液 50 μ L,立即在微量板振荡器上轻微振荡摇匀 1 min,2 °C~8 °C 放置 1 h 后判定结果。

8.4.6 每次测定应设红细胞对照,对照及待检样品每个样品应做 2 个重复孔后读取最终结果。

8.4.7 血凝实验(HA)示例见表 1。

表 1 血凝实验(HA)示例(以 96 孔 V 型血凝板为例)

单位为微升

项目	V 型血凝板各孔									红细胞对照
	1	2	3	...	8	9	10	11		
磷酸盐缓冲液	25	25	25	...	25	25	25	25	25	—
待检样品	1:2 }↘	1:4 }↘	1:8 }↘	...	1:256 }↘	1:512 }↘	1:1 024 }↘	1:2 048 }↘	—	—
磷酸盐缓冲液	25	25	25	...	25	25	25	25	25	50
1%猪红细胞悬液	50	50	50	...	50	50	50	50	50	50

8.4.8 结果判定

8.4.8.1 阴性对照无凝集,实验方可成立。

8.4.8.2 将反应板倾斜 60°,观察红细胞有无呈泪珠样流淌。完全无泪珠样流淌或者血细胞呈颗粒性伞状凝集沉于孔底(100%凝集)的最高稀释倍数为血凝效价,即为 1 个血凝单位;再根据开始的稀释倍数精确计算血凝效价(见 D.2)。

8.4.8.3 若待检样品血凝价 $< 1:8$ 判定为血凝阴性。

若待检样品血凝价 $\leq 1:16$ 且 $\geq 1:8$,判定为疑似,重复实验结果相同,判定为血凝阴性。

8.4.8.4 若待检样品血凝价 $> 1:16$ 判定为血凝阳性,是否为 MEV 血凝阳性,需要进一步 HI 实验确定。

8.5 HI 实验操作方法

8.5.1 4 个血凝单位病毒液配制

以样品 HA 效价为 1:256 为例,4 个血凝单位=256/4=64(即 1:64)。取磷酸盐缓冲液 9 mL,加病毒液 1 mL,即成 1:10 稀释度。将 1:10 稀释液混匀后吸取 1 mL 加入磷酸盐缓冲液 5.4 mL 中,即为 4 个血凝单位病毒液。

8.5.2 血清处理

取 MEV 阳性血清 100 μ L,56 °C 水浴灭活 30 min。加入 1%猪红细胞液 10 μ L,混匀后 2 °C~8 °C 作用 2 h,4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。

8.5.3 加样步骤

8.5.3.1 在96孔V型微量血凝板上,用固定病毒稀释血清法,自第1孔至第11孔,用移液器每孔加入磷酸盐缓冲液 25 μL ,12孔加入磷酸盐缓冲液 50 μL ,第11和第12孔分别为4单位待检样品对照和红细胞对照。

8.5.3.2 第1排孔(纵列)加入 25 μL 8.5.2中处理的MEV阳性血清,混合均匀,并依次进行倍比稀释,至第10排孔,最后第10排孔弃去 25 μL 液体。

8.5.3.3 在第1孔至第11孔中,每孔加入 25 μL ,4个血凝单位的待检病毒液,12孔加入1%猪红细胞悬液 50 μL ,将反应板在微量板振荡器上振荡混匀,封板以防止液体蒸发,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h。

8.5.3.4 每孔加入1%猪红细胞悬液 50 μL ,将反应板在微量板振荡器上振荡混匀,置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h,待MEV细胞病毒培养液对照出现红细胞凝集时观察结果。

8.5.3.5 每次测定应设已知效价的MEV阳性血清对照和病毒对照,方法同8.5.1~8.5.6,对照及待检样品每个样品应做2个重复孔后读取最终结果。

8.5.3.6 血凝抑制实验(HI)示例见表2。

表2 血凝抑制实验(HI)示例(以96孔V型血凝板为例)

单位为微升

项目	V型血凝板各孔							病毒对照	红细胞对照
	1	2	3	...	8	9	10		
磷酸盐缓冲液	25	25	25	...	25	25	25	25	50
MEV阳性血清 稀释倍数	1:2 }\	1:4 }\	1:8 }\	...	1:256 }\	1:512 }\	1:1024 }\	—	—
4单位待检样品	25	25	25	...	25	25	25	25	—
1%猪红细胞悬液	50	50	50	...	50	50	50	50	50

8.6 质控标准

MEV阳性血清血凝抑制效价与已知效价相差小于1个滴度,MEV阳性对照凝集,阴性对照不凝集,实验方可成立。

8.7 结果判定

能够被MEV阳性血清抑制血凝的待检样品,判定为MEV阳性。

9 PCR检测

9.1 仪器

9.1.1 微量移液器(200 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、2 μL ~20 μL 、0.5 μL ~10 μL)。

9.1.2 高速冷冻离心机(转速 \geq 12 000 r/min)。

9.1.3 恒温水浴锅。

9.1.4 生物安全柜。

9.1.5 PCR仪。

9.1.6 电泳仪。

9.1.7 电泳槽。

9.1.8 紫外线凝胶成像仪。

9.2 耗材

9.2.1 0.2 mL PCR管。

9.2.2 吸头(1 000 μL 、200 μL 、20 μL 、10 μL)。

9.3 试剂

9.3.1 除特别说明以外,本文件所用试剂均为分析纯,实验用水符合GB/T 6682的规定。

- 9.3.2 dNTP(含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L)。
- 9.3.3 10×Taq DNA 聚合酶缓冲液。
- 9.3.4 -20℃保存的 5 U/μL Taq 酶。
- 9.3.5 结构蛋白 VP2 基因保守区引物(浓度为 10 μmol/L,见附录 E 中的 E.1)。
- 9.3.6 1×TAE 电泳缓冲液(见 E.2)。
- 9.3.7 1%的琼脂糖凝胶(见 E.3)。
- 9.3.8 商品化无毒核酸染料。
- 9.3.9 6×核酸电泳加样缓冲液(见 E.4)。
- 9.3.10 商品化 DL2000 DNA Marker 分子量标准。

9.4 DNA 提取

取 6.4.5 处理上清和 7.5.5 的病毒分离细胞培养液,应用市售的商品化病毒 DNA 提取试剂盒提取病毒 DNA,作为 PCR 或荧光 PCR 模板。

9.5 PCR 检测

9.5.1 PCR 反应体系

在超净工作台中按剂量要求在 0.2 mL PCR 管中依次加入 PCR 反应试剂。同时设不加模板空白对照,已知阳性对照及正常水貂组织或者 CRFK 正常细胞处理上清作为模板的阴性对照,PCR 采用 25 μL 反应体系:

灭菌水	16 μL
dNTPs(2.5 mmol/L)	2 μL
10×Taq DNA 聚合酶缓冲液	2.5 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.5 μL
正向引物(10 μmol/L)	1 μL
反向引物(10 μmol/L)	1 μL
模板 DNA(10 ng/μL~20 ng/μL)	2 μL
总量	25 μL

9.5.2 扩增程序及反应条件

将混匀的 PCR 管置于 PCR 仪上,按如下程序扩增:95℃预变性 5 min;94℃变性 45 s,53℃退火 30 s,72℃延伸 50 s,40 个循环;最后 72℃延伸 10 min。

9.5.3 PCR 产物电泳检测

9.5.3.1 用 1×TAE 电泳缓冲液配制 1%的琼脂糖凝胶溶液 100 mL,加热使琼脂糖溶解,冷却至 50℃~60℃,加入无毒核酸染料溶液 20 μL,充分混匀后倒凝胶平板。

9.5.3.2 将冷却的凝胶平板放入水平电泳槽,加入 1×TAE 泳缓冲液刚好没过胶面。

9.5.3.3 每个 PCR 管吸取 5 μL PCR 产物和 1 μL 6×加样缓冲液混匀后分别加入样品孔。

9.5.3.4 同时设 DL2000 DNA Marker 分子质量标准作参照。

9.5.3.5 100 V 恒压电泳 30 min,当溴酚蓝达到琼脂糖凝胶底部时停止电泳,用凝胶成像系统观察结果。

9.6 质控标准

阴性对照和空白对照未出现目的条带,阳性对照出现特异性的 573 bp 目的条带,满足以上 2 个条件,实验结果成立。

9.7 结果判定

9.7.1 若被检样品扩增出大小为 573 bp 的 PCR 产物(见 E.5),测序结果与参考序列(见 E.6)的同源性大于 99%,则判定被检样品 MEV 核酸阳性。

9.7.2 若被检样品未扩增出 573 bp 特异性条带,判定为阴性。

9.7.3 若出现与扩增长度不同大小的条带为非特异性反应,需要重复实验,2 次实验均为非特异条带可

判定为阴性。

10 荧光 PCR 检测

10.1 仪器

10.1.1 微量移液器(200 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、2 μL ~20 μL 、0.5 μL ~10 μL)。

10.1.2 荧光定量 PCR 仪。

10.1.3 涡旋混匀器。

10.2 耗材

10.2.1 吸头(1 000 μL 、200 μL 、20 μL 、10 μL)。

10.2.2 荧光定量 PCR 管。

10.3 试剂

10.3.1 除特别说明以外,本文件所用试剂均为分析纯,实验用水符合 GB/T 6682 分析实验室用水规格。

10.3.2 2 \times Premix Ex TaqTM(Probe qPCR)反应预混液。

10.3.3 引物及 MGB-TaqMan 探针及参考序列(见附录 F 中的 F.1 和 F.2)。

10.3.4 MEV 阳性对照、阴性对照样品。

10.4 DNA 提取

按照 9.4 所述方法提取样品 DNA,同时设阳性对照和阴性对照。

10.5 荧光 PCR 反应体系

探针法荧光 PCR 检测待检样品,采用 20 μL 反应体系:

灭菌水	4.8 μL
2 \times Premix Ex Taq TM (Probe qPCR)	10 μL
正向引物(5 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
反向引物(5 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
MGB-Taqman 探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.2 μL
DNA 模板(10 ng/ μL ~20 ng/ μL)	3 μL
总量	20 μL

依次在荧光定量 PCR 管中加入以上试剂,总体积为 20 μL 体系,用涡旋混匀器进行混匀,瞬时离心,备用。

10.6 荧光 PCR 反应参数

10.6.1 将 10.5 中加样后的荧光定量 PCR 管放入荧光定量 PCR 检测仪内,记录样品摆放顺序。

10.6.2 反应参数设置:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 45 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 起始变性 6 s,一步法退火加延伸 60 $^{\circ}\text{C}$ 27 s,40 个循环,降温至 40 $^{\circ}\text{C}$ 冷却 30 s,反应结束后记录 C_t 值。

10.7 质控标准

阴性对照无 C_t 值并且无扩增曲线。阳性对照的 C_t 值 \leq 30.0,并出现特定的扩增曲线。如阴性对照和阳性对照条件不满足以上条件,此检测视为无效。

10.8 结果判定

10.8.1 无 C_t 值并且无扩增曲线,判定 MEV 核酸阴性。 C_t 值 \leq 30.0,且出现特定的扩增曲线,判定 MEV 核酸阳性。

10.8.2 若 30.0 $<C_t$ 值 $<$ 40.0,从样品处理开始重复一次实验,若结果一致,判定 MEV 核酸阴性。

11 综合判定

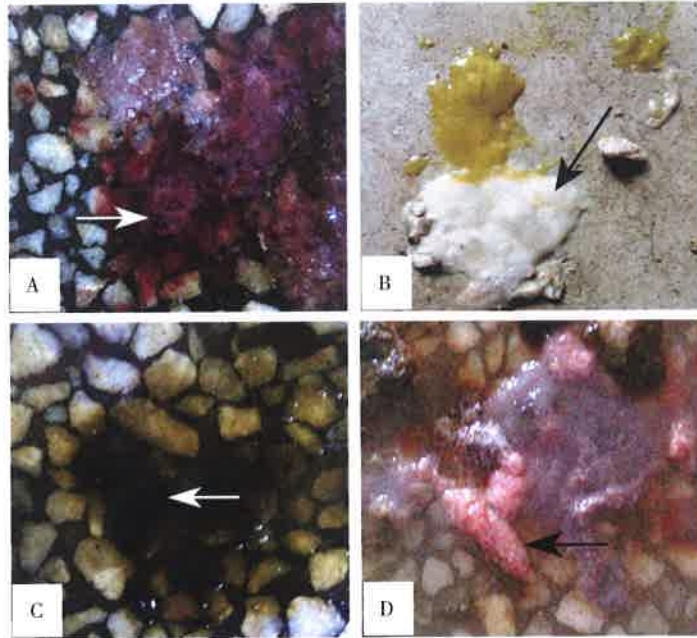
11.1 符合流行病学和临床症状、病理变化,PCR 检测或实时荧光 PCR 检测为阳性,可诊断为水貂病毒性肠炎。

11.2 符合流行病学和临床症状、病理变化,HA-HI 检测为阳性,可诊断为水貂病毒性肠炎。

附录 A
(资料性)

水貂病毒性肠炎病例腹泻物特征图

水貂病毒性肠炎病例腹泻物特征图见图 A.1。



标引序号说明：

A——血便(箭头所示)；

C——墨绿色水样便(箭头所示)；

B——灰白色肠黏膜(箭头所示)；

D——粉色肉样管型便(箭头所示)。

图 A.1 水貂病毒性肠炎病例腹泻物特征图

附录 B

(资料性)

磷酸盐缓冲液配制

B.1 甲液:0.15 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)溶液

B.1.1 配制一

无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	21.3 g
去离子水	800 mL

充分搅拌溶解,加去离子水定容至 1 L,121℃ 高压灭菌 30 min,4℃ 保存备用。

B.1.2 配制二

12 水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	53.7 g
去离子水	800 mL

充分搅拌溶解,加去离子水定容至 1 L,121℃ 高压灭菌 30 min,4℃ 保存备用。

B.2 乙液:0.15 mol/L 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)溶液

磷酸二氢钾(H_2PO_4)	20.42 g
去离子水	800 mL

充分搅拌溶解,加去离子水溶解后定容至 1 L,121℃ 高压灭菌 30 min,4℃ 保存备用。

B.3 磷酸盐缓冲液(0.015 mol/L, pH 6.4)

甲液	27 mL
乙液	73 mL
去离子水	700 mL

加入 9 g 氯化钠(NaCl),再用去离子水定容至 1 L,121℃ 高压灭菌 30 min,4℃ 保存备用。

附录 C

(资料性)

水貂肠炎病毒分离鉴定相关溶液配制

C.1 MEM 细胞培养液(含 10%胎牛血清)

MEM 培养基	450 mL
胎牛血清	50 mL

用 5.6%碳酸氢钠(NaHCO_3)调 pH 至 7.2。

C.2 MEM 细胞维持液(含 3%胎牛血清)

MEM 培养基	485 mL
胎牛血清	15 mL

用 5.6%碳酸氢钠(NaHCO_3)调 pH 至 7.2。

C.3 0.25%胰酶溶液(ATV)

氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.40 g
葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	1.00 g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	0.58 g
胰蛋白酶	2.50 g
乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.20 g
双蒸水或去离子水	1 000 mL

溶解后 0.22 μm 过滤除菌,定量分装。

C.4 正常猫肾细胞图(100 \times)

见图 C.1。

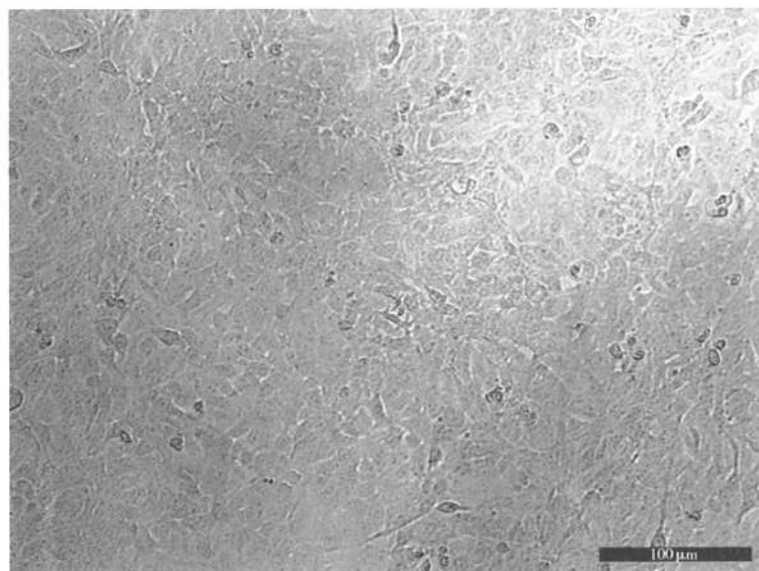


图 C.1 CRFK 正常细胞

C.5 病变猫肾细胞图(100×)

见图 C.2。

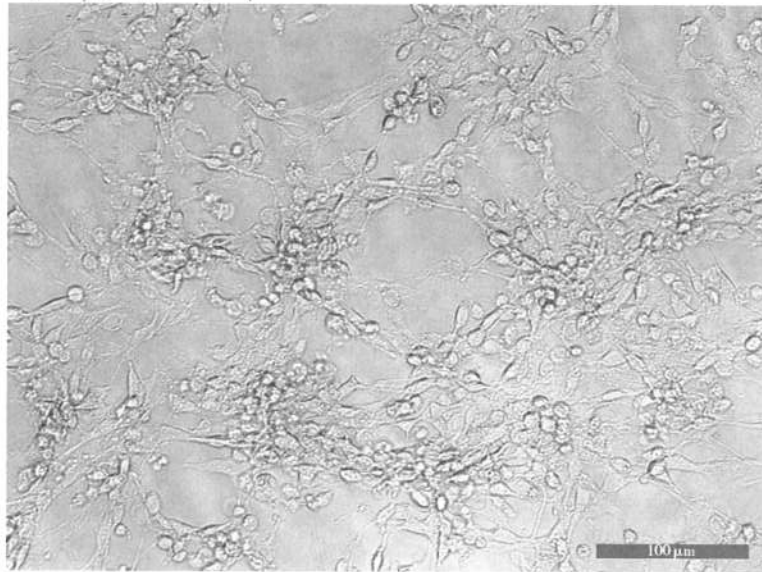


图 C.2 MEV 感染 CRFK 细胞产生的细胞病变

附录 D
(资料性)

HA-HI 实验相关溶液配制及判定结果示意图

D.1 1%猪红细胞液配制

D.1.1 阿氏液

柠檬酸钠	8.0 g
柠檬酸	0.55 g
葡萄糖	20.5 g
氯化钠(NaCl)	4.2 g
去离子水	800 mL

充分混匀后加去离子水定容至 1 L,并经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌或高压 116 °C 30 min,置于 4 °C 保存。

D.1.2 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液(0.015 mol/L,pH 7.2)pH 6.4

甲液(见 B.1)	72 mL
乙液(见 B.2)	28 mL
去离子水	700 mL

加入 9 g 氯化钠(NaCl),再用去离子水定容至 1 L。并经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,置于 4 °C 保存。

D.1.3 1%猪红细胞悬液

2 月龄~3 月龄的健康猪前腔静脉采血,将采集猪红细胞置于 10 倍体积的阿氏液(D.1.1)中,1 000 r/min离心 10 min,弃上清液。加入 5 倍体积的 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液(D.1.2)洗涤,充分混匀后 1 000 r/min离心 10 min,弃上清液。如此反复洗涤 3 遍~5 遍。用 pH 6.4 磷酸盐缓冲液配制成 1%的红细胞悬液,再加入 3%(V/V)经 56 °C 灭活 30 min 胎牛血清,即为 1%猪红细胞悬液。4 °C 保存备用。

D.2 血凝(HA)实验判定结果示意图

见图 D.1。

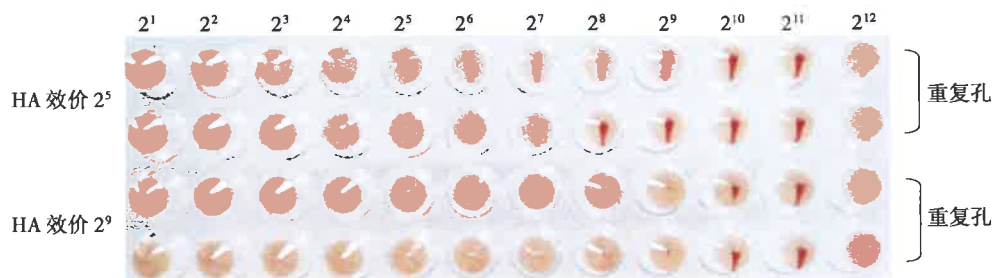


图 D.1 水貂细小病毒血凝试验结果判定示意图

附录 E

(资料性)

PCR 检测引物及溶液配制

E.1 PCR 扩增引物序列

正向引物 MEV573F(VP2 基因 114 位~135 位):5'-GGGGATTCTACGGGTACTTTC-3';
 反向引物 MEV573R(VP2 基因 665 位~686 位):5'-GGTGTGCCACTAGTTCAGTATG-3';
 扩增基因片段长度 573 bp。

E.2 1×TAE 电泳缓冲液

E.2.1 50×TAE 储存液

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	242 g
乙二胺四乙酸二钠 (Na ₂ EDTA·H ₂ O)	37.2 g
冰乙酸	57.1 mL
去离子水	800 mL

充分搅拌溶解,加去离子水定容至 1 L,室温保存。

E.2.2 1×TAE 使用液

50×TAE 储存液	10 mL
去离子水	490 mL

充分混匀即为琼脂糖凝胶电泳缓冲液。

E.3 1%的琼脂糖凝胶

琼脂糖	1.0 g
1×TAE 溶液	100 mL

充分混匀后置于微波炉中温加热至凝胶完全溶化成液体。

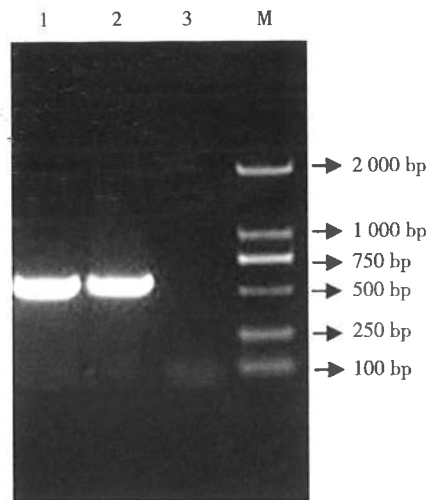
E.4 6×加样缓冲液

乙二胺四乙酸二钠 (Na ₂ EDTA·H ₂ O)	0.88 g
溴酚蓝	50 mg
二甲苯腈蓝 FF	50 mg
去离子水	40 mL
甘油(丙三醇)	36 mL

充分搅拌均匀,用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0,用去离子水定容至 100 mL,室温保存。

E.5 聚合酶链式反应(PCR)产物电泳检测

见图 E.1。



标引序号说明：
1——阳性样品； 3——阴性样品；
2——阳性对照； M——DL2000 bp DNA Marker。

图 E. 1 水貂细小病毒 DNA 的 PCR 扩增结果

E. 6 扩增 573 bp 基因序列(MEV SMPV-11 参考株, GenBank 登录号 KP008112. 1)

5'-GGGGATTTCTACGGGTACTTTCAATAATCAGACAGAATTTAAATTTTTGGAAAACGGAT
GGGTGGAAATCACAGCAAACCTCAAGCAGACTTGTACATTTAAATATGCCAGAAAGTGAAAA
TTATAAAAGAGTAGTTGTAAATAATATGGATAAAACTGCAGTTAAAGGAAACATGGCCTT
AGATGATACTCATGTACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGGTTGATGCAAATGCTTGGGGAG
TTTGGTTTAATCCAGGAGATTGGCAACTAATTGTTAATACTATGAGTGAGTTGCATTTAGT
TAGTTTTGAACAAGAAATTTTTAATGTTGTTTTAAAGACTGTTTCAGAATCTGCTACTCAG
CCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGTTGCATTAGATAGTA
ATAATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGG
AAACCAACCATAACCAACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGGGATAGAACATTAATACCAT
CTCATACTGGAAGTAGTGGCACACC-3'

附录 F

(资料性)

实时荧光 PCR 扩增引物、探针、扩增序列

F.1 引物及探针序列

正向引物 MEV92F(VP2 基因 275 位~298 位):5'-TTAAAGGAAACATGGCTTTAGATG-3';
 反向引物 MEV92R(VP2 基因 344 位~366 位):5'-ATTAAACCAAACCTCCCAAGCAT-3';
 MGB-TaqMan 探针(VP2 基因 314 位~332 位):5'-TTGTAACACCTTGGTCATT-3';
 扩增基因片段长度 92 bp。

F.2 荧光 PCR 扩增序列(MEV SMPV-11 参考株,GenBank 登录号 KP008112.1)

5'-TTAAAGGAAACATGGCTTTAGATGATATTCATGTACAAATTGTAACACCTTGGTCATTGG
 TTGATGCAAATGCTTGGGGAGTTTGGTTTAAT-3'



中华人民共和国
农业行业标准
水貂病毒性肠炎诊断技术
NY/T 4042—2021

* * *

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)
北京科印技术咨询服务有限公司印刷
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 1.5 字数 30千字

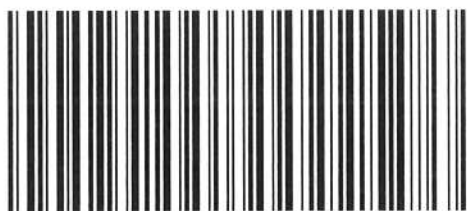
2022年4月第1版 2022年4月北京第1次印刷

书号: 16109·8940

定价: 52.00元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 4042—2021