

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 542—2025
代替 NY/T 542—2002

牛茨城病诊断技术

Diagnostic techniques for cattle Ibaraki disease

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 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 生物安全措施	1
6 临床诊断	1
6.1 流行病学	1
6.2 临床症状	2
6.3 病理特征	2
6.4 结果判定	2
7 样品采集、运输、保存与处理	2
7.1 仪器设备	2
7.2 试剂材料	2
7.3 样品的采集、运输、保存与处理	2
8 病原学检测	3
8.1 病毒分离与鉴定	3
8.2 免疫荧光抗体试验（IFAT）	4
8.3 病毒中和试验	5
8.4 反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）	6
8.5 实时荧光反转录聚合酶链式反应（实时荧光 RT-PCR）	7
9 血清学试验	7
9.1 血清中和试验	8
9.2 阻断酶联免疫吸附试验（B-ELISA）	9
9.3 琼脂凝胶免疫扩散试验（AGID）	10
10 综合判定	12
10.1 疑似	12
10.2 确诊	12
附录 A（规范性） 病毒分离和鉴定试剂配制	13
附录 B（规范性） RT-PCR 试剂配制	14
附录 C（规范性） RT-PCR、实时荧光 RT-PCR 相关引物、探针序列	15
附录 D（规范性） 阻断 ELISA 试剂配制	16
附录 E（规范性） 1%琼脂糖凝胶平皿配制	17

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。

本文件代替NY/T 542-2002《茨城病和鹿流行性出血病琼脂凝胶免疫扩散试验方法》，与NY/T 542-2002相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了病毒分离与鉴定（见8.1）；
- 增加了免疫荧光抗体试验（见8.2）；
- 增加了病毒中和试验（见8.3）；
- 增加了RT-PCR（见8.4）；
- 增加了实时荧光RT-PCR（见8.5）；
- 增加了血清中和试验（见9.1）；
- 增加了阻断酶联免疫吸附试验（见9.2）；
- 增加了综合判定（见10）。

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

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：昆明海关技术中心，云南省畜牧兽医科学院，深圳海关动植物检验检疫技术中心，云南省动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区兽医研究所。

本文件主要起草人：艾军，朱建波，杨俊兴，韩佃刚，段博芳，杨振兴、叶玲玲，苗海生、范青、杨云庆，花群义。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2002年首次发布为NY/T 542-2002；
- 本次为第一次修订。

引 言

牛茨城病（Ibaraki disease, IBAD）是由茨城病病毒（Ibaraki virus, IBAV）引起的经库蠓传播的一种非接触性传染病。病毒可感染牛、羊、鹿等家养和野生偶蹄动物。牛感染IBAV后的临床特点为发热，厌食，时有流涎，呼吸急促困难，可视黏膜出血，眼结膜和口黏膜暗红或紫蓝，关节疼痛肿胀，脱水，消瘦等。本病主要发生在北美、澳大利亚、亚洲和非洲，对养牛业造成严重的经济损失。

IBAV为流行性出血病病毒（Epizootic hemorrhagic disease virus, EHDV）血清2型，呼肠孤病毒科，环状病毒属。病毒对乙醚和去氧胆酸盐有抵抗力，pH 6.8 ~ 9.5稳定存在，pH 4.0以下迅速灭活。56 °C 4 h ~ 5 h可灭活病毒；-70 °C、4 °C病毒稳定存在，可长期保存活力；-20 °C放置30 d，病毒效价明显下降。IBAV可在鹿胎肾细胞、BHK-21、Vero、Hela细胞内增殖。在补体结合试验和琼脂扩散试验中，IBAV与蓝舌病病毒有交叉反应。

本文件的实施将提高我国牛茨城病的诊断与监测水平，及时采取防控措施，更有效地做好牛茨城病的防控工作。

本文件的制定参考了《陆生动物诊断试验与疫苗手册》，并结合了国内外相关文献和我国相关技术有关研究新成果。

牛茨城病诊断技术

1 范围

本文件规定了牛茨城病的临床诊断，样品的采集、运输、保存与处理，病毒分离与鉴定，免疫荧光抗体，病毒中和，RT-PCR，实时荧光RT-PCR，血清中和，B-ELISA，AGID的技术要求和规范。

本文件适用于牛茨城病的诊断、检疫、监测与流行病学调查。鹿、羊等野生和家养偶蹄动物茨城病诊断可参照本标准执行。

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）适用于本文件。

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列术语和缩略词适用于本文件。

IBAV（Ibaraki Virus）：茨城病病毒

BHK-21（Baby Hamster Kidney-21）：幼仓鼠肾细胞

Vero（Verda Reno）：非洲绿猴肾细胞

CPE（Cytopathic Effect）：细胞病变效应

TCID₅₀（50% Tissue Culture Infective Dose）：组织培养半数感染量

RT-PCR（Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction）：反转录聚合酶链式反应

Ct（Cycle Threshold）：循环阈值

HRP（Horseradish Peroxidase）：辣根过氧化物酶

BLP（Buffered Lactose Peptone）：乳糖蛋白胨缓冲肉汤

DEPC（Diethyl Pyrocarbonate）：焦碳酸二乙酯

5 生物安全措施

进行IBAD的诊断、检测时，如动物剖检、样品采集与处理、核酸提取等，按照GB 19489的规定执行。

6 临床诊断

6.1 流行病学

6.1.1 易感动物主要包括牛、羊、鹿等家养或野生偶蹄动物。

6.1.2 传染源主要为库蠓。该病暴发通常与病媒数量的高峰期吻合，大多数病例发生在夏末和秋季。

6.1.3 传播途径主要是通过吸血库蠓叮咬在反刍动物宿主间传播。

6.2 临床症状

6.2.1 发热、厌食、口部溃疡、流涎、关节疼痛肿胀。

6.2.2 可视黏膜出血，眼结膜和口黏膜暗红或紫蓝，脱水，消瘦。

6.2.3 有时可见流产和死胎，胎儿被消融或出现水脑畸形。

6.3 病理特征

6.3.1 剖检病变主要是黏膜、皮膜和内脏的广泛出血。

6.3.2 许多器官坏死，特别是舌、唾液腺、前胃、主动脉和左心室的乳头肌，胆囊黏膜表面有散布的灰色斑块。

6.3.3 横纹肌玻璃样变性、坏死和矿化，伴有中性粒细胞、淋巴细胞和组织细胞的浸润。

6.4 结果判定

易感动物出现临床症状且符合流行病学及病理特征的发病动物，可判为IBAD疑似感染。

7 样品采集、运输、保存与处理

7.1 仪器设备

7.1.1 台式低温高速离心机。

7.1.2 研钵或组织匀浆器。

7.1.3 振荡器。

7.1.4 手术刀。

7.1.5 剪刀。

7.1.6 镊子。

7.1.7 微量移液器。

7.2 试剂材料

7.2.1 PBS 缓冲液，按照 A.4 的规定配制。

7.2.2 BLP 缓冲液，按照 A.5 的规定配制。

7.2.3 青霉素（100 000 IU/L）。

7.2.4 链霉素（100 000 IU/L）。

7.2.5 采血管（5 mL、10 mL）。

7.2.6 离心管（1.5 mL、5 mL、50 mL）。

7.2.7 样品保存管（2 mL、5 mL、50 mL）。

7.3 样品的采集、运输、保存与处理

7.3.1 样品的采集

7.3.1.1 样品的采集应符合 GB/T 18088、NY/T 541 要求。

7.3.1.2 有临床症状活畜，采肝素抗凝血 1 管，非抗凝血 1 管，每管不少于 5 mL。

7.3.1.3 病死畜，采集病畜肝、脾、淋巴结、肾等组织各 5 g ~ 10 g，分别置于样品保存管（袋）。

7.3.1.4 在牧场、水池边等地区，采用诱蚊灯等方式采集库蠓样品，置于样品保存管，每管 10 ~ 50 只。

7.3.2 样品的运输与保存

7.3.2.1 样品采集后，应尽可能在 4 °C 容器内冷藏运输，24 h 送至实验室。样品运输应符合 NY/T 541 要求。

7.3.2.2 样品在 2 °C ~ 8 °C 保存应不超过 24 h；若需长期保存，应置于 -70 °C 以下冰箱，冻融不超过 3 次。

7.3.3 样品的处理

7.3.3.1 血液样品处理

取肝素抗凝血 5 mL，用 PBS 洗涤血样 3 ~ 4 次，每次 400 g 离心 10 min，弃上清液后加入等量 BLP，经处理的样品当天使用，使用前置 4 °C 保存，剩余样品置于 -70 °C 以下保存。

取非抗凝血 5 mL，800 g 离心 10 min，经处理的样品当天使用，使用前置 4 °C 保存，剩余样品置于 -20 °C 以下保存。

7.3.3.2 组织样品处理

取组织样品 5 g，剪碎后加入 BLP 10 mL（含青霉素 2000 IU/mL、链霉素 2000 IU/mL），置研钵中研磨，800 g 离心 10 min，取上清液 5 mL，冻融三次，800 g 离心 20 min，上清液经 0.45 μm 滤膜过滤。经处理的样品当天使用，使用前置 4 °C 保存，剩余样品置于 -70 °C 以下保存。

7.3.3.3 库蠓样品处理

取适量库蠓置于 1 个小管中，加入含青霉素 2000 IU/mL、链霉素 2000 IU/mL 的 BLP 1 ~ 3 mL，置冰浴中研磨虫体，800 g 离心 20 min，上清液经 0.45 μm 滤膜过滤。经处理的样品当天使用，使用前置 4 °C 保存，剩余样品置于 -70 °C 以下保存。

8 病原学检测

8.1 病毒分离与鉴定

8.1.1 仪器设备

8.1.1.1 倒置光学显微镜。

8.1.1.2 倒置荧光显微镜。

8.1.1.3 CO₂ 培养箱。

8.1.1.4 二级生物安全柜。

8.1.1.5 台式低温高速离心机。

8.1.1.6 微量移液器。

8.1.2 试剂材料

8.1.2.1 BHK-21 细胞或 Vero 细胞。

8.1.2.2 茨城病病毒阳性血清和阴性血清：试验前血清经 56 °C 灭活 30 min。

8.1.2.3 细胞培养液，按照附录 A.1 的规定配制。

8.1.2.4 细胞维持液，按照附录 A.2 的规定配制。

8.1.2.5 细胞分散液，按照附录 A.3 的规定配制。

8.1.2.6 PBS 缓冲液，按照附录 A.4 的规定配制。

8.1.2.7 BLP 缓冲液，按照附录 A.5 的规定配制。

8.1.3 病毒分离

8.1.3.1 样品接种

接种前一天用BHK-21或Vero细胞传代至12孔板，待第二天细胞长至80%，取处理好的样品按0.1 mL/孔接种，孔内培养基体积与接种上清液体积比为10:1，每份样品接种2孔细胞，另设对照细胞1孔。

8.1.3.2 接种细胞后，37 °C 5% CO₂培养箱培养，培养 3 d ~ 5 d，每隔 24 h 观察细胞形态。当出现细胞圆缩，脱落等细胞病变效应（CPE）时，及时收获细胞，进入 8.1.4 病毒鉴定程序。如果没有出现 CPE，应继续盲传 2 代，进入 8.1.4 病毒鉴定程序。

8.1.4 病毒鉴定

将出现CPE或盲传2代的细胞培养物反复冻融3次，取200 μL按第8.3、第8.4或第8.5的规定做进一步鉴定和分析，其余细胞培养物至-70 °C 以下保存。

8.1.5 结果判定

细胞培养物经所述8.3、8.4、8.5方法检测为阳性者，判定为IBAV分离阳性；经所述8.3、8.4、8.5方法检测为阴性者，判定为IBAV分离阴性。

8.2 免疫荧光抗体试验（IFAT）

8.2.1 仪器设备

8.2.1.1 荧光显微镜。

8.2.1.2 CO₂培养箱。

8.2.2 试剂材料

8.2.2.1 荧光标记抗 IBAV 单克隆抗体。

8.2.2.2 细胞维持液，按照附录 A.2 的规定配制。

8.2.2.3 PBS，按照附录 A.4 的规定配制。

8.2.2.4 丙酮。

8.2.2.5 碳酸缓冲甘油，按照附录 A.6 的规定配制。

8.2.3 试验程序

8.2.3.1 取细胞培养物，200 g 离心 10 min，取上清液接种于 6 孔板中带有玻片的细胞单层。每份样品接种两孔，同时设参考病毒阳性、阴性对照，37 °C 吸附 1 h，加入维持液，置 37 °C CO₂培养箱中培养 72 h。

8.2.3.2 取出培养玻片，0.01 mol/L 的 PBS 漂洗一次，80%预冷丙酮固定 15 min。

8.2.3.3 每片滴加荧光标记的 IBAV 单克隆抗体，覆盖玻片，置暗湿盒中于 37 °C 作用 30 min。

8.2.3.4 用 0.01 mol/L 的 PBS 洗片三次，再用蒸馏水洗片一次。

8.2.3.5 风干，荧光显微镜检查，或用碳酸缓冲甘油封片保存。

8.2.4 结果判定

阳性对照细胞浆内呈现颗粒状的黄绿色荧光，阴性对照无荧光或无颗粒状的黄绿色荧光时，若试验组细胞浆内发现颗粒状的黄绿色荧光者，判为IBAV疑似阳性。

样品经病毒中和试验（8.3）、RT-PCR（8.4）或实时荧光RT-PCR（8.5）试验进一步鉴定为阳性，则该样品为牛茨城病病毒阳性。

8.3 病毒中和试验

8.3.1 仪器设备

8.3.1.1 CO₂培养箱。

8.3.1.2 高速冷冻离心机。

8.3.2 试剂材料

8.3.2.1 BHK-21 细胞或 Vero 细胞。

8.3.2.2 细胞维持液，按照附录 A.2 的规定配制。

8.3.3 病毒繁殖

将疑似病毒分离物接种于25T细胞瓶中BHK-21细胞或Vero细胞单层，37℃吸附1 h后加入维持液，置37℃ 5% CO₂培养箱培养，接种后间隔24 h，逐日观察。待CPE达75%以上，收获病毒培养物，冻融1次，400 g离心20 min，分装，每管2 mL，置-70℃以下保存备用。

8.3.4 毒价测定

将疑似病毒在96孔板上作10倍倍比稀释至10⁻¹⁰，每个稀释度作8孔，每孔病毒悬液为50 μL，加入细胞悬液100 μL（3 × 10⁵个/mL），加入细胞维持液50 μL，每块板设8孔细胞对照。置5% CO₂培养箱37℃培养，每隔24 h观察CPE，直至第6天。按Karber方法计算出疑似病毒的组织半数感染量（TCID₅₀/50 μL）。

8.3.5 中和测定

8.3.5.1 细胞对照

设4孔正常细胞对照，每孔加细胞悬液100 μL（3 × 10⁵个细胞/mL）、细胞维持液100 μL。

8.3.5.2 阴性对照

设4孔阴性对照，每孔加阴性血清和100 TCID₅₀/50 μL病毒悬液各50 μL，再加入细胞悬液100 μL（3 × 10⁵个细胞/mL）。

8.3.5.3 病毒回归对照

将被鉴定病毒稀释成1000、100、10、1、0.1 TCID₅₀/50 μL，每个稀释度作4孔，每孔加入病毒悬液50 μL，再加入细胞悬液100 μL（3 × 10⁵个细胞/mL），补充细胞维持液50 μL。

8.3.5.4 病毒中和

用100 TCID₅₀/50 μL疑似茨城病病毒分离毒株分别与茨城病标准阳性血清（效价不低于1:32）、流行性出血病其他血清型作微量中和试验。试验在96孔细胞培养板上进行。阳性血清作1:10稀释，重复4孔，每孔加1:10稀释的阳性血清和100 TCID₅₀/50 μL病毒各50 μL、振荡3 min ~ 5 min，置37℃中和1 h，加入细胞悬液100 μL（3 × 10⁵个细胞/mL），置37℃ 5% CO₂培养箱培养。

8.3.6 结果判定

当100 TCID₅₀/50 μL出现75% ~ 100% CPE，同时阴性、正常细胞对照成立，进行判定。经1:10稀释的茨城病标准阳性血清与病毒细胞孔中和，50%以上的细胞不出现CPE，且流行性出血病其他血清型不能中和，判为IBAV阳性。

8.4 反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)

8.4.1 仪器设备

8.4.1.1 PCR 仪。

8.4.1.2 凝胶成像仪。

8.4.1.3 冷冻离心机。

8.4.2 试剂材料

8.4.2.1 One Step RT-PCR Kit。

8.4.2.2 电泳缓冲液, 配制见附录 B. 1。

8.4.2.3 10 mg/mL 溴化乙锭溶液配制见附录 B. 2, 可采用等同的商品化试剂。

8.4.2.4 RNase-free 水。

8.4.2.5 1.5% 琼脂糖凝胶, 按照附录 B. 3 的规定配制。

8.4.2.6 DNA 分子量标准。

8.4.2.7 RT-PCR 引物, 见附录 C. 1。

8.4.2.8 样品对照

阳性对照: 接种茨城病病毒的阳性培养物、质控品或含病毒核酸的其他感染物。

阴性对照: 正常BHK-21细胞或未感染牛茨城病病毒的动物红细胞。

8.4.3 病毒 RNA 提取

取 100 μ L ~ 300 μ L 经处理的样品提取RNA。核酸提取可选常用柱式法或磁珠法商品化RNA 提取试剂盒, 按说明书进行。

8.4.4 一步法 RT-PCR 扩增

8.4.4.1 在 RNase-free 离心管中配制如下混合液: 2 $\times$ One Step Mix 25 μ L, One Step Enzyme Mix 2.5 μ L, 10 μ M 的上、下游引物各 1 μ L, 提取 RNA 5 μ L, 等体积的 RNase-free ddH₂O 代替提取 RNA 作为空白对照, 加 RNase-free ddH₂O 至最终体积 50 μ L。

8.4.4.2 离心管瞬时离心, 置 PCR 仪内运行下列程序: 50 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 运行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min; 4 $^{\circ}$ C 保持。

8.4.5 PCR 产物的检测

取扩增产物5 μ L与上样缓冲液混合, 加入1.5% 琼脂糖凝胶孔中。恒压5 V/cm ~ 8 V/cm, 电泳30 min ~ 60 min; 凝胶成像系统下观察结果、照像。

8.4.6 结果判定

8.4.6.1 成立条件

PCR扩增后, 阳性对照应在388 bp左右出现特异核酸条带, 阴性对照和空白对照应无核酸条带。

在阳性样品、阴性对照和空白对照均成立的情况下, 进行检测样品的结果判定。

8.4.6.2 结果判定

待检样品RT-PCR扩增物, 经电泳出现预期大小约388 bp的DNA条带, 可判为IBAV核酸可疑阳性, 需进一步测序比对确定。

待检样品在预期大小约388 bp未出现DNA条带, 判为IBAV核酸阴性。

出现的条带不是388 bp左右，为非特异性反应，需重复试验，两次试验均为非特异性反应时，判为IBAV核酸阴性。

8.5 实时荧光反转录聚合酶链式反应（实时荧光 RT-PCR）

8.5.1 仪器设备

8.5.1.1 荧光 PCR 仪。

8.5.1.2 高速冷冻离心机。

8.5.1.3 微量移液器。

8.5.2 试剂材料

8.5.2.1 One Step qRT-PCR Probe Kit。

8.5.2.2 引物与探针见附录 C.2。

8.5.2.3 样品对照，同 8.4.2.8。

8.5.3 RNA 提取

RNA提取同8.4.3。

8.5.4 Real-time RT-PCR 扩增

8.5.4.1 在 RNase-free 离心管中配制如下混合液：2 × One Step U+ Mix 10 μL, One Step U+ Enzyme Mix 1 μL, 50× ROX Reference Dye 0.4 μL, 10 μM IBAV 上、下游引物各 1 μL, 10 μM IBAV 探针 0.3 μL, 10 μM β-actin 上、下游引物各 1 μL, 10 μM β-actin 探针 0.3 μL, 提取 RNA 5 μL, 等体积的 RNase-free ddH₂O 代替模板 RNA 作为空白对照，加 RNase-free ddH₂O 至最终体积 20 μL。

8.5.4.2 实时实时荧光 RT-PCR 反应条件随不同仪器略有改变，一般反应程序如下：

第一阶段：55 °C 15 min；第二阶段：95 °C 10 min；第三阶段：95 °C 15 s和60 °C 1 min，40个循环。在每个循环60 °C退火延伸时收集荧光；试验结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

8.5.5 结果判定

8.5.5.1 阈值设定

实时荧光RT-PCR反应结束后，设置荧光信号阈值，阈值设定原则根据仪器噪音情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为准。

8.5.5.2 成立条件

空白对照和阴性对照，无Ct值且无特异性扩增曲线；阳性对照，Ct值小于或等于30，并出现典型的特异性扩增曲线；β-actin扩增，Ct值小于或等于30，并出现特异性扩增曲线。否则，此次实验视为无效，需分析原因重新检测。

8.5.5.3 结果判定

符合8.5.5.2的条件，被检样品Ct值 ≤ 38且出现特异性扩增曲线，则判为IBAV核酸阳性；无Ct值，未出现特异性扩增曲线则判为IBAV核酸阴性；当38 < Ct值 < 40且出现特异性扩增曲线，则判为疑似。对疑似样品，模板量加倍进行1次复检，做3个重复；有2个及以上重复Ct值 < 38且出现特异性扩增曲线即判为IBAV核酸阳性，否则判为IBAV核酸阴性。

9 血清学试验

9.1 血清中和试验

9.1.1 仪器设备

9.1.1.1 倒置显微镜。

9.1.1.2 CO₂培养箱。

9.1.1.3 冰箱（-20℃，-70℃以下）。

9.1.1.4 微量移液器。

9.1.2 试剂材料

9.1.2.1 病毒：牛茨城病标准毒株、流行性出血病其他血清型标准毒株。

9.1.2.2 对照血清：牛茨城病标准阳性血清、阴性血清。

9.1.2.3 被检血清：采集牛血液所分离的血清。

9.1.2.4 细胞：BHK-21 或 Vero 细胞。

9.1.2.5 培养液，按照附录 A.1 的规定配制。

9.1.2.6 维持液，按照附录 A.2 的规定配制。

9.1.2.7 细胞分散液，按照附录 A.3 的规定配制。。

9.1.3 试验程序

9.1.3.1 病毒繁殖

将茨城病病毒接种于BHK-21或Vero细胞单层，37℃吸附1h后加入维持液，置5% CO₂的37℃温箱培养，逐日观察。待CPE达75%以上，收获病毒悬液，冻融1次，2 000 r/min离心20 min，分装成1 mL/瓶，置-70℃保存备用。

9.1.3.2 毒价测定

将病毒在96孔板上作10倍倍比稀释，每个稀释度作8孔，每孔病毒悬液为50 μL，加入细胞悬液150 μL（3 × 10⁵个细胞/mL），每块板设8孔细胞对照。置5% CO₂培养箱37℃培养，逐日观察并记录CPE。按Karber方法计算出病毒的TCID₅₀/50 μL。

9.1.3.3 样品处理

茨城病标准阳性血清、阴性血清、被检血清经56℃ 30 min灭活。

9.1.3.4 对照设置

细胞对照：设4孔正常细胞对照，每孔加细胞悬液100 μL（3 × 10⁵个细胞/mL）、稀释液100 μL。

阴性血清对照：设4孔阴性对照，每孔加阴性血清和100 TCID₅₀ / 50 μL病毒悬液各50 μL，再加入细胞悬液100 μL（3 × 10⁵个细胞/mL）。

病毒回归对照：将牛茨城病、流行性出血病其他血清型病毒稀释成1 000、100、10、1 TCID₅₀ / 50 μL，每个稀释度作4孔，每孔加入50 μL病毒悬液，再加入细胞悬液100 μL（3 × 10⁵个细胞/mL）、每孔补充稀释液50 μL。

阳性血清对照：将阳性血清分别作1:4、1:8、1:16稀释，每个稀释度作4孔，每孔加各稀释度阳性血清和100 TCID₅₀/50 μL病毒悬液各50 μL，再加入细胞悬液100 μL（3 × 10⁵个细胞/mL）。

血清毒性对照：每份被检血清须按稀释度各设1孔毒性对照、每孔各加稀释度血清50 μL，稀释液50 μL和100 μL细胞悬液。

9.1.3.5 中和试验

将每份被检血清作1:4、1:8、1:16稀释，每个稀释度作5个孔，每孔加各稀释度血清50 μL。

第1孔作为血清毒性对照，加入稀释液50 μL和细胞悬液100 μL (3×10^5 个细胞/mL)。

第2 ~ 5孔为正式试验孔，每孔加入病毒悬液50 μL (100 TCID₅₀/50 μL)，振荡3 min ~ 5 min，置37 °C中和1 h；加细胞悬液100 μL (3×10^5 个细胞/mL)。

置37 °C、5% CO₂培养箱培养，24 h后逐日观察CPE并进行记录，培养6 d。

9.1.4 结果判定

9.1.4.1 成立条件

当病毒回归1 000、100、10 TCID₅₀/50 μL全部出现CPE、1 TCID₅₀/50 μL出现50% CPE，阳性、阴性、正常细胞、血清毒性对照全部成立时，试验有效。

9.1.4.2 结果判定

血清不与流行性出血病其他血清型病毒反应，被检血清孔与牛茨城病病毒感染孔，细胞50%出现保护，判为阳性，如低于50%判为阴性。当某份血清的某一稀释度出现50%保护时，该血清稀释度即为该份血清的中和抗体滴度。

9.2 阻断酶联免疫吸附试验 (B-ELISA)

9.2.1 仪器设备

9.2.1.1 酶标仪 (配备 450 nm 滤光片)。

9.2.1.2 恒温水浴箱 (37 °C ± 0.2 °C)。

9.2.1.3 洗板机。

9.2.1.4 微量移液器。

9.2.2 试剂材料

9.2.2.1 IBV 抗原包被板，按照附录 D.7 的规定制备。

9.2.2.2 鼠源性抗 IBV 单抗，按照附录 D.8 的规定制备。

9.2.2.3 IgG-HRP 羊抗鼠二抗。

9.2.2.4 阳性对照血清。

9.2.2.5 阴性对照血清。

9.2.2.6 包被液，按照附录 D.1 的规定配制。

9.2.2.7 20× 浓缩洗涤液按照附录 D.3 的规定配制。

9.2.2.8 底物液终止液按照附录 D.4 的规定配制。。

9.2.2.9 封闭液按照附录 D.2 的规定配制。

9.2.3 试验程序

9.2.3.1 加样

取抗原包被板，每孔分别加入50 μL不进行稀释的阴性、阳性对照血清和1:2.5稀释液稀释的待检血清，阴性、阳性对照各加2孔，37 °C作用45 min，不洗板，加入抗IBV单克隆抗体，50 μL/孔，37 °C反应45 min。

9.2.3.2 洗板

每孔加300 μL 1× 洗涤液，洗板3次，拍干。

9.2.3.3 加 IgG-HRP 山羊抗鼠二抗

加入1 µg/mL的IgG-HRP标记的羊抗鼠二抗，100 µL/孔，37 °C反应45 min。

9.2.3.4 洗板

每孔加300 µL 1× 洗涤液，洗板3次，拍干。

9.2.3.5 加底物溶液

加入底物液，100 µL/孔，37 °C避光静置显色15 min。

9.2.3.6 终止反应

加终止液，100 µL/孔终止反应，酶标仪测定OD_{450 nm}值，根据公计算P/N值。

9.2.4 结果计算

$P/N = \text{血清样本平均OD值} / \text{阴性孔平均OD值} \times 100$ 。

9.2.5 结果判定

9.2.5.1 成立条件

IBAV 阳性对照的P/N值小于30。

IBAV 阴性对照的P/N值大于80。

9.2.5.2 结果判定

待检血清的检测结果P/N值<60判为阳性，待检血清P/N值≥60时判为阴性。

9.3 琼脂凝胶免疫扩散试验（AGID）

9.3.1 仪器设备

9.3.1.1 打孔器。

9.3.1.2 微量移液器。

9.3.2 试剂材料

9.3.2.1 1%琼脂糖凝胶平皿，配置见附录 E. 3。

9.3.2.2 IBAV 琼扩抗原。

9.3.2.3 IBAV 阳性血清。

9.3.2.4 IBAV 弱阳性血清。

9.3.2.5 IBAV 阴性血清。

9.3.3 试验程序

9.3.3.1 打孔

采用7孔制。用打孔器（孔外径4 ~ 4.5 mm，孔间距2 mm）垂直在1%琼脂糖凝胶平皿上打孔，打孔后用针头挑出孔中间的琼脂。最终形成中间1孔，周围6孔为一组的梅花图形。

9.3.3.2 加样

每孔加25 µL血清。按照图1所示，1、3、5孔加待检血清（Y）；2、4、6孔加IBAV阳性血清（PS）；中心孔加IBAV琼扩抗原（Ag）。

9.3.3.3 对照

阳性对照：周边6孔加IBAV阳性血清，中间孔加抗原。如图2所示。

弱阳性对照：1、3、5孔加IBAV弱阳性血清（WPS）；2、4、6孔加IBAV阳性血清，中间孔加抗原。如图3所示。

阴性对照：1、3、5孔加IBAV阴性血清（NS）；2、4、6孔加IBAV阳性血清，中间孔加抗原。如图4所示。

9.3.3.4 感作

加样后，封底（或预试验证明无需封底），静置5 min，移入湿盒内。湿盒放置于室温（23 ℃ ~ 25 ℃），或放置于23 ℃ ~ 25 ℃的反应箱中感作。感作时间为48 h。

9.3.4 结果判定

48 h进行结果判定。

9.3.4.1 成立条件

在阳性对照、弱阳性对照、阴性对照试验成立的条件下，进行待检样品的判定。

9.3.4.2 结果判定

阳性：被检血清孔与抗原孔之间出现明显清晰致密的沉淀线，并与IBAV阳性血清孔的沉淀线末端互相融合，记作“+++”或“++”（如图5所示）。

弱阳性：IBAV阳性血清孔和抗原孔之间的沉淀线向被检血清孔内侧弯曲，而被检血清孔与抗原孔之间不形成完整的沉淀线，记作“+”（如图3所示）。

阴性：被检血清孔与抗原孔之间无沉淀线，IBAV阳性血清孔与抗原孔间沉淀线直延伸到被检血清孔边缘，无弯曲，记作“-”（如图4所示）。

非特异性反应：抗原孔与被检血清孔与IBAV阳性血清的沉淀线交叉，为非特异性反应（如图6所示，第1孔样品）。

第一次检测为弱阳性、非特异性样品须重复试验。重复试验仍为弱阳性者判为阳性，重复试验仍为非特异性反应者判为阴性。

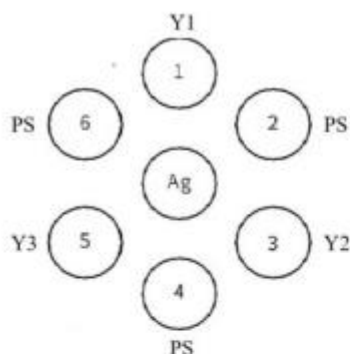


图1. 琼扩试验加样示意图

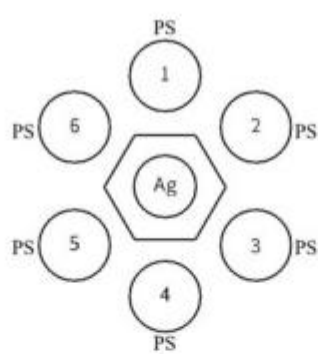


图2. 阳性血清形成六边形沉淀线

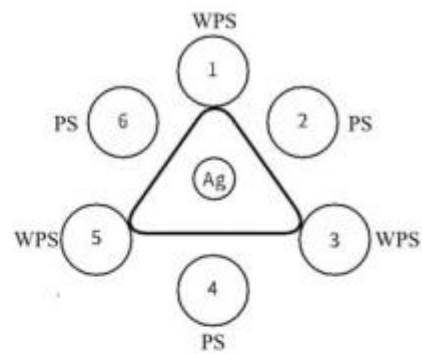


图3. 弱阳性血清形成沉淀线

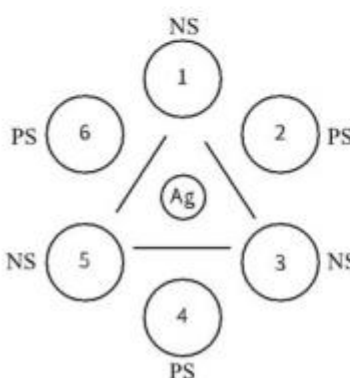


图4. 阴性血清形成沉淀线

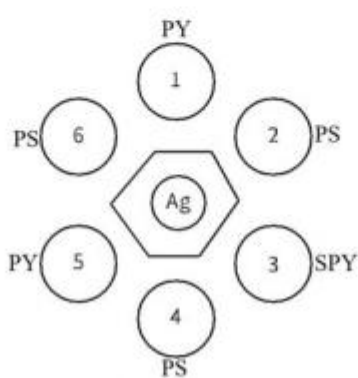


图5. 强阳性、阳性样品形成沉淀线

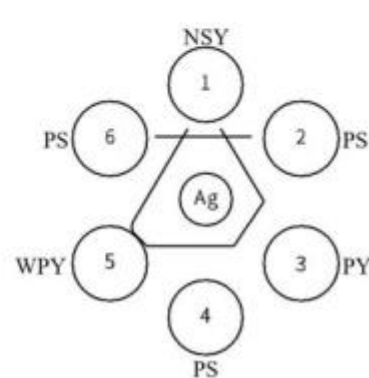


图6. 弱阳性、非特异性样品形成沉淀线

注：图1-6中：Y代表样品，PY代表阳性样品，SPY代表强阳性样品，WPY代表弱阳性样品，NSY代表非特异性样品，PS代表阳性血清，WPS代表弱阳性血清，NS代表阴性血清，Ag代表IBAV琼扩抗原

10 综合判定

10.1 疑似

易感动物出现临床症状且符合流行特点及病理特征，判定为IBAD疑似病例。

病毒分离、免疫荧光抗体试验、B-ELISA、AGID任何一项结果为阳性，诊断为疑似IBAV感染。

10.2 确诊

病毒中和试验、RT-PCR、实时RT-PCR、血清中和试验任一项检测结果为阳性，可诊断为IBAV感染。

附 录 A (规范性) 病毒分离和鉴定试剂配制

A.1 细胞培养液

199培养基，加入含10% 无IBAD病毒抗体胎牛血清（56 ℃，30 min灭活），含青霉素200 IU/mL，链霉素200 IU/mL，抽滤除菌，置4 ℃保存备用。

A.2 细胞维持液

199培养基，加入含2% 无IBAD病毒抗体胎牛血清（56 ℃，30 min灭活），含青霉素200 IU/mL，链霉素200 IU/mL，抽滤除菌，置4 ℃保存备用。

A.3 细胞分散液

胰酶	2.5 g
乙二胺四乙酸二钠	0.2 g
无钙镁PBS (pH7.4)	1000 mL

混匀抽滤除菌，置4 ℃保存备用。

A.4 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L、pH7.4)

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
十二水磷酸氢二钠	2.9 g
磷酸二氢钾	0.2 g
去离子水	1000 mL

将上述成分依次溶解、混匀、分装、调节pH值，高压灭菌（ 1.01×10^5 Pa，15 min）。

A.5 乳糖蛋白胨缓冲肉汤 (BLP)

a液

磷酸二氢钠（无水）	4.6 g
去离子水	500 mL

b液

磷酸氢二钠（无水）	9.4 g
去离子水	1000 mL

a液 220 mL

b液 780 mL

蛋白胨 2 g

乳糖 100 g

将上述成分依次溶解、混匀、分装，高压灭菌（ 1.01×10^5 Pa，15 min）。

A.6 碳酸缓冲甘油

a) 0.5 mol/L, pH9.5碳酸缓冲液

碳酸氢钠	3.7 g
碳酸钠（无水）	0.6 g
去离子水	100 mL

b) 甘油

1份碳酸缓冲液加9份甘油混合即成。

附录 B (规范性) RT-PCR 试剂配制

B.1 5× Tris-硼酸 (TBE) 电泳缓冲液

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
乙二醇四乙酸二钠 (0.5 mol/L, pH8.0)	20 mL

去离子水定容至1000 mL, 充分溶解, 4 °C 保存。

B.2 10 mg/mL 溴化乙锭溶液

溴化乙锭	1 g
去离子水	100 mL

置棕色瓶中, 磁力搅拌数小时以确保其完全溶解, 然后用铝箔包裹容器, 保存于室温。

B.3 1.5% 琼脂糖凝胶的制备

在200 mL三角烧瓶中加入琼脂糖1.5 g, 0.5× TBE缓冲液100 mL。微波炉中使之完全溶解, 加入10 mg/mL溴化乙锭溶液5 μL 充分摇匀, 备用; 待琼脂糖冷却至60 °C左右, 倒入制胶板并防止气泡产生, 使琼脂糖厚度达3 mm ~ 5 mm; 待凝胶完全凝固后去掉梳子, 将凝胶托盘放入电泳槽, 加入0.5× TBE电泳缓冲液使之高出凝胶2 mm ~ 3 mm。

B.4 RT-PCR 扩增序列

Tcgaag aggtgatgaa tcgcataact gaaaggaatg atgcacatgc ggcatataga ttggctgaaa tggctcaaaa caccatgtta
gatcgtgaaa aggtgtgggt acagtgttat aaaagttttt ctgagccata tgacgaaaat attgctgaaa agattcagat atgtggtagg gagctattgg
ataaatataa aaatagtgat atggtaacca aaattgataa catgataaaa ttgatccaa cacgcatcgt gctagatgac aacttttctg
ctttccata cttatacata ccagtaaact atggccagat ggtgcaacca atcaggataa tgagatacag acaaattgga tactgttttt acagccaga
tgtagtagat ga

附 录 C

(规范性)

RT-PCR、实时荧光 RT-PCR 相关引物、探针序列

C.1 RT-PCR 引物序列

采用普通 RT-PCR 方法开展 IBAD 检测，根据 NS1 蛋白编码基因 S5 保守序列设计，其引物序列如下：

上游引物：5' -TCG-AAG-AGG-TGA-TGA-ATC-GC-3'

下游引物：5' -TCA-TCT-ACT-GCA-TCT-GGC-TG-3'

扩增产物为 388 bp。

C.2 实时荧光 RT-PCR 引物、探针序列

采用实时荧光 RT-PCR 方法开展 IBAD 检测，可根据下表提供的序列合成引物和探针。

靶标名称	引物/探针	序列(5'-3')
IBAD	IBAD_Seg2_F_1642-1665 (W)	CCT-TTA-AGA-TAA-GAC-GGG-TCG-AGA
	IBAD_Seg2_F_1640-1666 (E)	GTC-CTT-TAA-GGT-AAG-ACG-GGT-AGA-GAT
	IBAD_Seg2_R_1798-1770	CTC-AAG-ATA-TTA-CCG-GTT-AAG-CAT-AGA-GT
	IBAD_Seg2_R_1788-1770	TGC-CGG-TCA-TAC-AGA-ACG-C
	IBAD_Seg2_P_1728-1743	FAM-AAC-GAG-ATG-TGG-CTT-C-MGB
β-actin	ACT_F_1005-1029	CAG-CAC-AAT-GAA-GAT-CAA-GAT-CAT-C
	ACT_R_1135-1114	CGG-ACT-CAT-CGT-ACT-CCT-GCT-T
	ACT_P_1081-1105	VIC-TCG-CTG-TCC-ACC-TTC-CAG-CAG-ATG-T-TAMRA

附 录 D (规范性) 阻断 ELISA 试剂配制

D.1 包被液

pH=9.6 的碳酸盐缓冲液 (Na_2CO_3 1.58 g, NaHCO_3 2.92 g, 纯水定容至1000 mL, 调节pH值为9.6, 加入10%的硫柳汞, 硫柳汞终浓度为0.01%,) ;

D.2 封闭液

2.5%的BSA封闭液: 称取2.50克牛血清白蛋白(BSA), 用PBS溶液溶解后定容到100 mL。

D.3 20× 浓缩洗涤液

NaCl 32.0 g, KH_2PO_4 0.96 g, Na_2HPO_4 5.8 g, KCl 0.8 g, Tween-20 10 mL, 蒸馏水1000 mL, 充分溶解后, 调节pH值为7.2 后加入10%的硫柳汞, 硫柳汞终浓度为0.01%。

D.4 终止液

将10.87 mL 浓硫酸缓慢加入去离子水中混合均匀, 冷却后用去离子水滴定到100 mL, 即为终止液, 注意在加硫酸的过程中将容器置于冰水中降温。

D.5 稀释液

NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.24 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KCl 0.2 g, BSA 5.0 g, Tween-20 0.5 mL, 蒸馏水1000 mL, 充分溶解, 调节pH 值为7.4, 加入10%的硫柳汞1 mL, 用0.45 μm 滤膜过滤除菌。

D.6 PBS (磷酸盐缓冲液)

NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.24 g, Na_2HPO_4 1.45 g, KCl 0.2 g, 蒸馏水 1000 mL, 充分溶解, 调节pH值为7.2, 加入10%的硫柳汞, 硫柳汞终浓度为0.01%。

D.7 包被抗原

收集的IBAV经灭活, 超声破碎, 用1/10的Tris-HCL (pH=8)调节pH值至7.0, 加入溶液总体积量等等的饱和硫酸铵溶液, 在磁力搅拌器上搅拌1小时, 静置半小时后2300 g离心20 min, 弃上清, 沉淀用1/10总体积的PBS进行充分溶解, -20 °C 保存备用。制备抗原包被ELISA板时, 按50-200ug/孔, 包被。

D.8 抗IBAV单克隆抗体

IBAV免疫BALB/c小鼠, 三次免疫后, 加强免疫一次, 取脾细胞与SP20细胞融合, 利用IBAV作为包被抗原, 间接ELISA筛选, 克隆纯化制备分泌单克隆抗体细胞系。细胞注射降殖烷等预先处理的BALB/c母鼠, 制备腹水, 纯化获得牛茨城病单克隆抗体。

附 录 E
(规范性)
1%琼脂糖凝胶平皿配制

E.1 0.85%生理盐水

称取NaCl 8.5 g，加入去离子水或灭菌蒸馏水至1000 mL。

E.2 1%琼脂糖凝胶

称取琼脂糖1 g，加入到100 mL 0.85%生理盐水中。加热煮沸溶解，自然冷却至55 ℃，加入0.01%柳硫汞。（注意：1%琼脂糖凝胶加热溶解时，推荐用电炉加热，及时观察，以免琼脂糖溢出容器口，致使琼脂糖浓度增高，高于1%浓度的琼脂糖将影响实验结果准确性。）

E.3 1%琼脂糖凝胶平皿

取55 ℃左右1%琼脂糖凝胶12 mL加入到直径85 mm平皿（或琼脂糖凝胶48 mL加入到直径150 mm圆形平皿），琼脂板厚度约2.8 mm ~ 3 mm，待自然凝固后置4 ℃冰箱30 min，即可进行试验。琼脂糖凝胶平皿在2 ~ 8℃可倒置保存24 h。（注意：1%琼脂糖凝胶制备中，所制备平皿如在无菌条件下制备或制备平皿短期使用，可不加0.01%柳硫汞，制备的平皿最好现配现用）