

《牛茨城病诊断技术》编制说明

（一）工作简况

1、任务来源

农业农村部农产品质量安全监管司《关于下达 2024 年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函〔2024〕71 号），修订《牛茨城病诊断技术标准 NY/T542-2002》，项目编号 NYB-24307。

2、制定背景

牛茨城病是牛的一种急性、热性、病毒性传染病，其特征是突发高热、咽喉麻痹、关节疼痛性肿胀，主要通过蚊虫等吸血昆虫传播，对养牛业造成显著的经济损失，为此，规范牛茨城病的诊断方法对于防控牛茨城病的传播具有重要意义。现行的《茨城病和鹿流行性出血病琼脂凝胶免疫扩散试验方法》NY/T542-2002，仅规定了牛茨城病的琼扩试验，随着新技术发展，牛茨城病诊断中病原诊断的病毒分离鉴定、PCR 检测方法、荧光 PCR 检测方法，抗体检测的 ELISA 方法现已成熟，其 WOAHP 陆生动物诊断与疫苗手册中也对相应检测方法进行推荐。基于技术的发展，为了规范我国牛茨城病的诊断技术，我们提出了 NY/T542-2002 标准的修订。

3、起草单位和主要起草人及其所做的工作

牛茨城病病原为流行性出血病病毒血清2型。起草人常年开展牛茨城病等虫媒病毒分离、鉴定及检测研究，制订有行业标准SN/T 1161-2010《鹿流行性出血病检疫技术规范》。起草人及团队，所在单位（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）在承担本任务前后，建立了完善的牛茨城病诊断技术体系，分离到多株流行性出血病病毒，研制成功牛茨城病相关的ELISA抗体检测试剂盒，琼扩抗体检测试剂盒。在本项目开展中，我们总结团队前期在牛茨城病诊断技术开发中的研究成功，编制本标准，并在相应单位进行应用，完成标准征求意见的收集；根据征求意见修改标准，形成送审稿。起草单位和主要起草人在牛茨城病诊断技术方面研究，发表的相关文章及专利如下：

- [1]罗倩敏,韦丽,韩佃刚,等.流行性出血病的全球流行及分布[J].中国动物检疫,2022,39(11):96-104.
- [2]董仙兰,王琼,韩佃刚,等.流行性出血病病毒阻断 ELISA 抗体检测试剂盒的研制[J].中国动物检疫,2021,38(10):92-97.
- [3]董仙兰,韩佃刚,董俊,等.流行性出血病研究进展[J].上海畜牧兽医通讯,2021(04):37-41.DOI:10.14170/j.cnki.cn31-1278/s.2021.04.014.
- [4]发明专利:一种鹿流行性出血病病毒琼扩抗体检测试剂盒(ZL 2016 1 0421 335.X),专利权人,艾军等。
- [5]发明专利:EHDV-2 型单克隆抗体、制备源细胞株、产物应用及试剂盒(ZL 2021 1 0950351.9)专利权人,艾军等。

4、主要工作过程

1) 起草阶段

起草单位总结科研成果,完成牛茨城病诊断中病原检测的病毒分离鉴定、PCR、荧光 PCR 检测方法,抗体检测的琼扩和阻断 ELISA 方法、中和试验实操的总结,编写标准征求意见稿,标准中关键方法在海关科学技术研究中心(原北京海关技术中心)、石家庄海关技术中心、重庆海关技术中心完成了适用性验证;项目组结合日常开展的中和试验,分工合作,完成标准的起草。

2) 征求意见阶段

标准草案编制完成,先后在石家庄、拱北海关,中国农大等科研院校进行意见征求,征求范围既有从事国内动物疫病防控专家,也涵盖全国进境最大的种牛、种羊入境口岸海关,即牛茨城病检疫海关,上述单位对标准草案进行了增求意见反馈,收到回复意见177条,分析回复意见,最终采纳了157条,对于不采纳和部分采纳意见,在征求意见汇总表中逐一进行了说明。

3) 审查阶段

根据征求意见修订的标准,标准起草团队召开会议,完成了标准的内部审查。2025年6月28日,标准委组织,完成标准审查答辩,专家提出40条修改意见,涵盖全文排版,规范性书写,临床诊断,样品的采集、运输、保存与处理,病毒分离鉴定,免疫荧光抗体,病毒中和,RT-CPR,实时荧光RT-PCR, B-ELISA, AGID

等各个技术层面，标准编制团队利用标准编制软件，采取专人修改，集中研讨修改相结合方式，7月7日完成修改初稿。专家意见除以下2条为部份采纳外，其余均采纳。部份意见中未采纳意见及理由如下：（1）中和试验中增加牛茨城病毒株来源，未采纳，理由：考虑到毒株无法商品化购买，仅能从参考实验室引进，标准使用者如开展相关实验，基于其专业性，可自行从不同参考实验室引进；（2）标准中说明该病是否垂直传播，未采纳，理由：现资料无法表明此病是否为垂直传播，为此，在无详细科学研究结论之前，未写入标准。

4) 报批阶段

现未进入报批阶段。

（二）行业标准编制原则、主要内容及其确定依据，修订行业标准时，还包括修订前后技术内容的对比

1、标准编写原则

标准编写中采用标准编写软件完成编写。按照 GB/T1.1—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》的规定编写，编写覆盖牛茨城病临床诊断，样品的采集、运输、保存与处理，病毒分离鉴定，免疫荧光抗体，病毒中和，RT-CPR，实时荧光 RT-PCR，B-ELISA，AGID 等现稳定的诊断技术。

2、主要内容及其确定依据

标准修订中应用了起草团队在牛茨城病诊断研究中的相关成果，参照了 WOAHP 陆生动物诊断试验与疫苗手册中流行性出血病章节推荐的检测方法。

标准中主要内容，病毒分离鉴定为标准起草单位云南省畜牧兽医科学院常年开展的常规试验；RT-PCR 和 荧光 RT-PCR 为 WOAHP 推荐检测方法，在标准起草单位及应用单位进行了适用性验证；标准中琼扩抗体检测方法、阻断 ELISA 检测方法，标准起草单位均自研有相应检测试剂盒，已应用于天津等多个口岸入境动物牛茨城病的检疫工作。

2.1 牛茨城病病毒分离、血清抗体中和试验确定依据

标准起草团队云南省畜牧兽医科学院，2012 年在云南省师宗县，利用牛羊哨兵动物，从采集的 1078 份血样中，通过流行性出血病群特异性引物，实时荧

光 RT-PCR 检测，阳性样品，接种 BHK21 细胞进行病毒分离，盲传 4 代，检测阳性，病毒纯化，电镜观察病毒粒子、PCR 扩增、序列比对，中和试验，确定分离到牛茨城病，本标准正是以相关实验操作程序为基础，编制而成（未发表），相关的流行性出血病血清 6 型病毒分离，已发表相关文章。

2.2 牛茨城病荧光抗体试验

荧光抗体试验为一种基础性试验，项目团队在研制出牛茨城病单克隆抗体后，利用商品化的荧光标记试剂盒，标记牛茨城病单克隆抗体，在实验室验证了此方法的可操作性，也比较了不同浓度丙酮，对实验的影响，最终确定 80%丙酮固定细胞不影响试验结果。标准中相关方法基于以上开展试验而编制。

2.3 牛茨城病阻断 ELISA 抗体试验

标准起草团队，利用灭活的牛茨城病病毒，免疫 BALB/c 小鼠，取其脾，与 SP20 细胞融合，通过灭活病毒作为抗原筛选，获得 1 株牛茨城病病毒单克隆抗体，抗体进行了细胞株保藏，保藏编号（CCTCC NO:C2021180），利用单抗与牛茨城病灭活病毒，优化反应条件，研制成功牛茨城病阻断 ELISA 抗体检测试剂，其检测方法优化条件、敏感性、特异性、方法重复性、符合性研究见下：

2.3.1 抗原最佳包被浓度及单克隆抗体和样品最佳稀释度的确定

用 0.05 mol/L PH 9.6 碳酸盐缓冲液将浓缩的 EHDV 抗原(2.73mg/ml)按 1:25、1:50、1:100、1:200、1:500、1:1000 稀释包被；单克隆抗体按 1：25、1：50、1：100、1：200 稀释，HRP 羊抗鼠二抗做 1：1000 倍稀释，进行方阵滴度试验，以确定抗原最佳包被浓度和检测单抗的最佳稀释度。在二抗浓度为 1:1000 稀释的条件下，进行抗原和单抗的矩阵筛选，发现抗原 1:100 稀释时，OD 值在 1.0 以上，考虑到检测结果 ELISA 仪读数的精确度（一般当 OD 值为 1.0 时，ELISA 仪读数更精准），考虑抗原制备经济成本，确定 1:100 稀释为试剂盒的抗原稀释倍数。试验结果表明抗原最佳包被浓度为 1:100(27.3μg/mL)，单抗 1:100 稀释为试剂盒的最佳稀释度。

表 1 方阵滴定抗原的结果

		抗原包被浓度					
		1:25	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000
抗 单	1:25	1.28	1.28	1.19	0.99	0.80	0.75

1:50	1.19	1.12	1.08	0.83	0.79	0.57
1:100	1.25	1.13	1.03	0.75	0.65	0.55
1:200	1.19	0.93	0.98	0.69	0.60	0.40

2.3.2 样品稀释液的确定

分别使用①磷酸盐缓冲液；②含 1%BSA 的磷酸盐缓冲液；③含 5%BSA 的磷酸盐缓冲液；④含 0.5% BSA、0.05%吐温-20 的磷酸盐缓冲液进行阻断 ELISA 检测 4 份阴性血清，确定最佳的样品稀释液。在二抗浓度为 1:1000 稀释的条件下，进行稀释液的选择，结果显示含 0.5 %BSA、0.05%吐温-20 的磷酸盐缓冲液稀释样品时，阴性血清 OD 至最接近 1.0（ELISA 仪读数的灵敏性在 OD 值为 1.0 附近），同时 PI 值越大。

表 2 最佳样品稀释液的选择

样品稀释液		OD _{450nm} /PI（%）值							
		磷酸盐缓冲液		含 1%BSA 磷酸盐缓		含 5%BSA 磷酸盐缓		含 0.5 %BSA、0.05%吐温	
				冲液		冲液		-20 的 PBS	
血清 编 号	1	0.537	71.27	0.664	84.26	0.711	87.67	0.759	97.56
	2	0.554	73.52	0.621	78.81	0.672	82.86	0.744	95.63
	3	0.562	74.59	0.687	87.18	0.737	90.88	0.767	98.59
	4	0.549	72.86	0.708	89.15	0.715	88.16	0.808	103.86
	平均值	0.5505	73.06	0.67	85.03	0.70875	87.39	0.7695	98.91

2.3.3 待检血清和 HRP 羊抗鼠二抗最佳稀释度的确定

参照 ID Screen® EHDV Competition 检测试剂盒，阳性血清分别 1:2、1:2.5、1:5、1:10 稀释，HRP 羊抗鼠二抗分别做 1:500、1:1000、1: 2000、1:2500 稀释，进行方阵滴度试验，在二抗浓度为 1:1000 稀释，抗原 1:100 稀释，单抗 1:100 的条件下，进行样品稀释度与单抗稀释度的矩阵筛选，试验结果显示样品 1:2.5 稀释，HRP 羊抗鼠二抗 1:1000 稀释时，阳性血清的 OD 值较低，PI 值最低。

表 3 待检血清和 HRP 羊抗鼠二抗最佳稀释度的选择

HRP 羊抗鼠二抗		OD _{450nm} /PI (%) 值							
		1:500		1:1000		1:2000		1:2500	
血清 稀 释 度	1:2	0.423	37.20	0.232	21.54	0.178	21.63	0.134	20.49
	1:2.5	0.277	22.93	0.296	19.69	0.164	21.66	0.161	23.47
	1:5	0.422	34.45	0.361	32.76	0.203	25.83	0.199	28.47
	1:10	0.607	49.03	0.438	39.78	0.297	36.31	0.212	29.90

2.3.4 封闭液的选择

以 1%的 BSA、5%的 BSA、10%的 BSA、1%的明胶、1%的马血清作为封闭液进行试验，确定最佳封闭液。在二抗浓度为 1:1000 稀释，抗原 1:100 稀释，单抗 1:100 的条件下，进行封闭液的选择，试验结果表明，考虑到试剂盒的稳定性，我们选择用 5%的 BSA 封闭时，阻断效果最佳。

表 4 封闭液的选择

		PI (%) 值					
		1%BSA	5%BSA	10%BSA	1%明胶	1%马血清	未加封闭液
血 清	阳性	27.47	16.33	9.80	27.50	30.68	32.50
	弱阳	50.53	55.74	47.02	52.65	59.70	61.81
	阴性	86.47	87.64	78.11	90.96	99.39	93.13
	M	99.33	100.00	100.00	100.00	99.47	100.35

2.3.5 包被时间、封闭时间、待检血清反应时间、单克隆抗体反应时间、HRP 羊抗鼠二抗反应时间、和底物作用时间的确定

在已确定的最优条件下，逐一确定最佳封闭时间（分别进行 4℃过夜、37℃1h、37℃2h 作用时间）；待检血清最佳反应时间（分别进行 30min、45min、60min 作用时间）；单克隆抗体最佳反应时间（分别进行 30min、45min、60min 作用时间）；HRP 羊抗鼠二抗反应时间（分别进行 30min、45min、60min 作用时间）；底物最佳作用时间（分别进行 5min、10min、15min、20min 作用时间），试验结果表明

最佳包被时间 4℃过夜（表 5 和图 1）最佳封闭时间为 37℃1h（表 6 和图 2）；待检血清最佳反应时间为 37℃反应 45min（表 7 和图 3）；单克隆抗体最佳反应时间为 37℃反应 45min（表 8 和图 4）；HRP 羊抗鼠二抗反应时间为 37℃反应 45min（表 9 和图 4）；底物最佳作用时间为 37℃静置 15min（表 10 和图 5）

表 5 最佳包被时间的确定

Table 3-10 Determination of optimum coating time

包被时间		OD450nm /PI（%）值					
		4℃过夜		37℃1h		37℃2h	
血清 编 号	1	0.653	75.32	0.597	70.24	0.549	65.47
	2	0.568	65.51	0.523	61.53	0.513	61.18
	3	0.674	77.74	0.608	71.53	0.587	70.01
	4	0.662	76.36	0.66	77.65	0.615	73.35
	平均值	0.63925	73.73	0.597	70.24	0.566	67.50

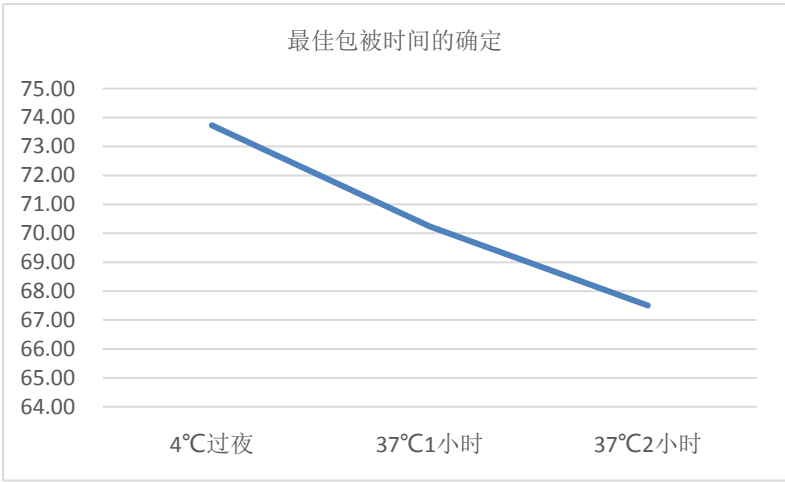


图 1 最佳包被时间的确定

表 6 最佳封闭时间的确定

封闭时间		OD450nm /PI（%）值					
		4℃过夜		37℃1h		37℃2h	
血清	1	0.597	76.74	0.647	87.31	0.494	77.61

2	0.608	78.15	0.586	79.08	0.523	82.17
3	0.594	76.35	0.674	90.96	0.513	80.60
4	0.588	75.58	0.647	87.31	0.53	83.27
平均值	0.59675	76.70	0.6385	86.17	0.515	80.91

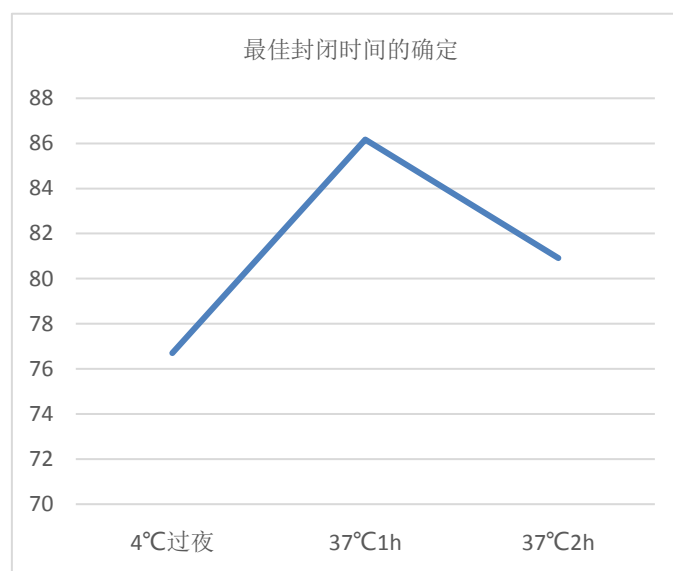


图 2 最佳封闭时间的确定

表 7 待检血清最佳反应时间

Table 3-12 Optimal reaction time of serum to be tested

反应时间 (37°C)		OD _{450nm} /PI (%) 值					
		30min	45min	60min			
血清 编 号	1	0.584	82.37	0.482	86.38	0.431	82.41
	2	0.59	83.22	0.491	87.99	0.454	86.81
	3	0.622	87.73	0.495	88.71	0.447	85.47
	4	0.567	79.97	0.458	82.08	0.446	85.28
	平均值	0.59075	83.32	0.4815	86.29	0.4445	84.99

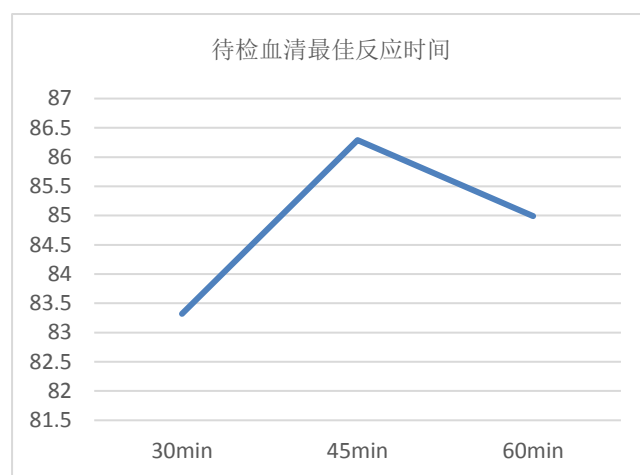


图 3 待检血清最佳反应时间

表 8 单克隆抗体反应时间的确定

Table 3-13 Determination of reaction time of monoclonal antibody

反应时间 (37℃)		OD _{450nm} /PI (%) 值					
		30min		45min		60min	
血清 编 号	1	0.461	82.17	0.508	90.55	0.472	84.14
	2	0.447	79.68	0.469	83.60	0.504	89.84
	3	0.471	83.96	0.481	85.74	0.478	85.20
	4	0.445	79.32	0.455	81.11	0.454	80.93
	平均值	0.456	81.28	0.4785	85.25	0.477	85.03

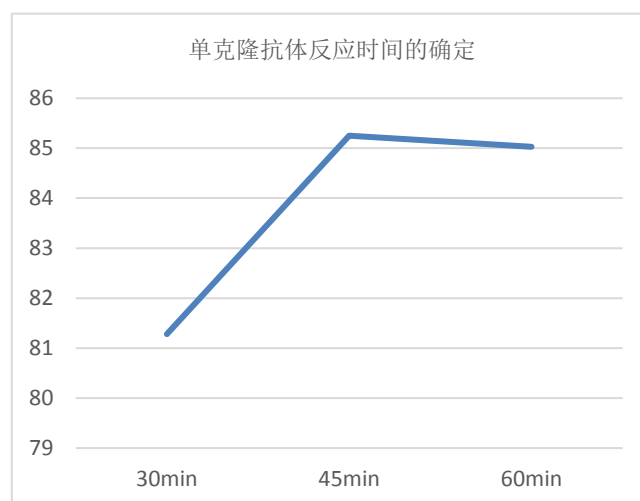


图 4 单克隆抗体反应时间的确定

表 9 HRP 羊抗鼠二抗反应时间

Table 3-14 Reaction time of HRP Sheep anti mouse second antibody

反应时间 (37℃)		OD _{450nm} /PI (%) 值					
		30min		45min		60min	
血清 编 号	1	0.558	88.57	0.615	97.62	0.589	93.49
	2	0.522	82.86	0.61	96.83	0.577	91.59
	3	0.534	84.76	0.6	95.24	0.605	96.03
	4	0.484	76.83	0.551	87.46	0.555	88.10
	平均值	0.5245	83.25	0.594	94.29	0.5815	92.30

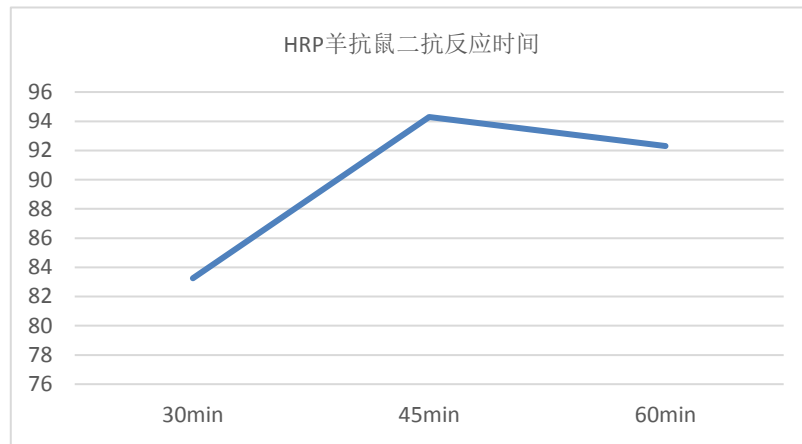


图 5 HRP 羊抗鼠二抗反应时间

表 10 底物最佳作用时间

Table 3-15 Optimal reaction time of substrate

反应时间 (37℃)		OD _{450nm} /PI (%) 值							
		5min		10min		15min		20min	
血清 编 号	1	0.268	39.94	0.439	88.60	0.58	86.44	0.575	86.23
	2	0.239	35.62	0.407	82.14	0.595	88.67	0.59	88.60
	3	0.246	36.66	0.408	82.34	0.589	87.78	0.58	87.67
	4	0.229	34.13	0.435	87.79	0.599	89.27	0.59	88.96

平均值	02455	36.59	0.42225	85.22	0.59075	88.04	0.58375	87.86
-----	-------	-------	---------	-------	---------	-------	---------	-------

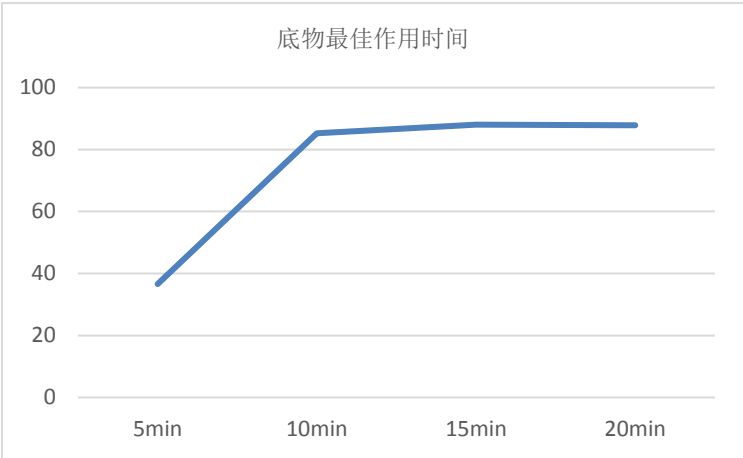


图 6 底物最佳作用时间

2.3.6 临界值的确定

运用本方法检测 90 份阴性参考血清，来自澳大利亚进境牛血清，并经 ID Screen® EHDV Competition 试剂盒证明为阴性的牛血清。通过流行性出血病病毒阻断 ELISA 抗体检测试剂盒进行检测，结果呈正态分布，详细结果见下表 11 和图 7。

表 11 90 份阴性参考血清的 ELISA 抗体检测结果

编号	PI (%) 值	编号	PI (%) 值	编号	PI (%) 值	编号	PI (%) 值	编号	PI (%) 值
1	83.39	20	75.32	39	78.71	58	80.41	77	68.47
2	83.52	21	76.41	40	80.90	59	81.14	78	71.19
3	80.53	22	80.29	41	84.66	60	85.02	79	74.69
4	77.99	23	69.01	42	84.66	61	84.29	80	74.35
5	67.43	24	76.41	43	77.14	62	82.23	81	63.05
6	74.71	25	77.50	44	84.90	63	82.96	82	64.29
7	78.71	26	79.68	45	84.41	64	81.87	83	77.18
8	77.38	27	88.05	46	81.38	65	83.69	84	66.33
9	77.38	28	83.44	47	82.23	66	86.36	85	68.36
10	82.47	29	78.35	48	75.08	67	85.08	86	68.14

11	82.96	30	79.44	49	81.26	68	78.64	87	73.56
12	75.92	31	76.29	50	82.72	69	71.19	88	81.81
13	81.38	32	80.17	51	88.66	70	60.08	89	68.70
14	76.90	33	85.63	52	82.84	71	66.33	90	79.66
15	81.87	34	83.08	53	83.20	72	66.10		
16	82.96	35	87.33	54	77.99	73	75.37		
17	81.02	36	86.72	55	83.57	74	70.73		
18	87.69	37	82.60	56	77.50	75	73.56		
19	76.29	38	81.02	57	85.51	76	67.91		
P		WP		N		M			
对照	22.38	对照	41.93	对照	79.66	对照	100.00		
平均		平均		平均		平均			
值		值		值		值			

注：P 代表强阳性对照；WP 代表弱阳性对照；N 代表阴性对照；M 代表单克隆抗体对照孔。

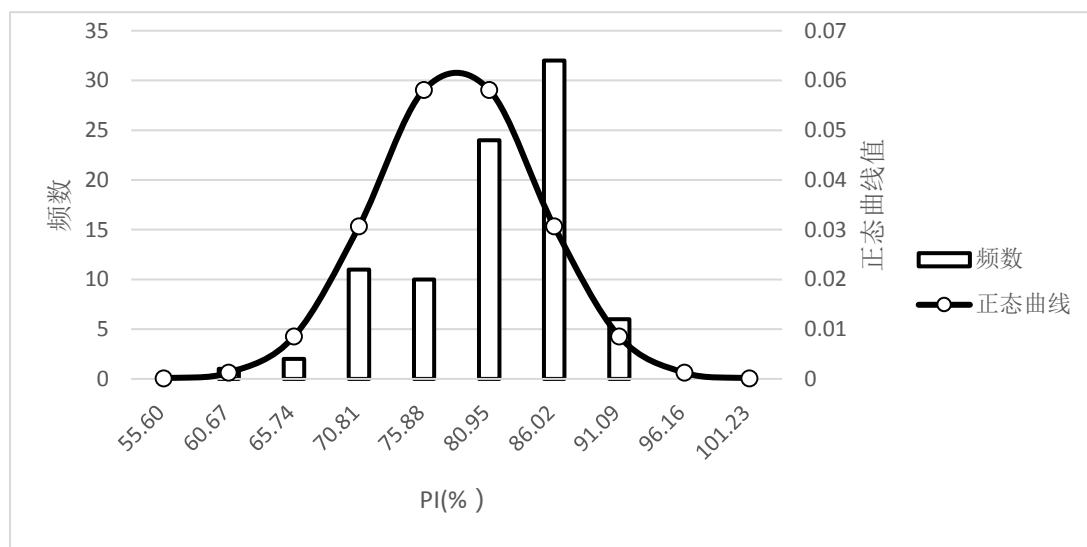


图 7 90 份阴性参考血清的 ELISA 抗体检测结果分布图

Fig. 3-10 Distribution of ELISA antibody test results of 90 negative reference sera

运用本试验建立的 EHDV 阻断 ELISA 抗体检测方法检测 90 份阴性参考血清求得 90 份阴性参考血清的平均值 ($\bar{X}$) = 78.41；标准偏差 (SD) = 6.34；根据阴阳性临界值的计算公式确定阴阳性临界值为 59.40，即待检血清的检测结果

PI (%) 值<60 判为阳性，待检血清 PI (%) 值≥60 时判为阴性。

本标准正是依据以上实验结果编制而成。

2.4 牛茨城病琼扩抗体试验

标准起草团队，利用保存的牛茨城病病毒，通过扩大繁殖、调节病毒培养液 pH 值，灭活病毒（pH 值改变，病毒灭活后，感染 BHK21 细胞，盲传 2 代，未出现细胞病变），透析袋浓缩（10:1），制备牛茨城病琼扩抗原；利用灭活浓缩病毒，与佐剂混合，免疫山羊，每周免疫 1 次，免疫 5ml，免疫 3 周，测定抗体效价，与琼扩抗原出现细致紧密线条；麻醉，取血液，分离血清，作为琼扩阳性血清。

利用制备的牛茨城病琼扩抗原与琼扩阳性血清，优化反应条件，试制试剂盒。用研制试剂开展特异性、敏感性、重复性、重现性、符合性比较，研究结果见下：

2.4.1 研制试剂对口蹄疫、赤羽病、牛白血病、小反刍兽疫抗体阳性血清进行检测，结果均为阴性，无交叉反应。对蓝舌病强阳性血清检测，结果存在交叉反应。检测结果如表 1。

表 1 特异性试验

检测结果	阳性血清（样品数）				
	FMD（10）	AK（10）	BLD（10）	PPR（10）	BT（10）
阳性数	0	0	0	0	2
阴性数	10	10	10	10	8

2.4.2 敏感性试验

应用研制琼扩试剂对牛茨城病阳性血清的 10 个稀释度进行检测，结果显示当阳性血清稀释到 1: 128 时，试剂检测结果为阳性，当阳性血清稀释到 1: 256 时，试剂的检测结果为阴性。检测结果如表 2。

表 2 敏感性试验

试剂盒	阳性血清稀释倍数									
	2 ⁰	2 ⁻¹	2 ⁻²	2 ⁻³	2 ⁻⁴	2 ⁻⁵	2 ⁻⁶	2 ⁻⁷	2 ⁻⁸	2 ⁻⁹
A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

2.4.3 重复性试验

通过随机抽取同批次和不同批次间的试剂盒进行检测发现，研制试剂的检测结果一致，批内和批间重复性好。检测结果如表 3。

表 3 重复性试验

试剂盒 A		血清	
		牛茨城病阳性（25）	牛茨城病阴性性（15）
批内重复	A1-1	25	15
	A1-2	25	15
	A1-3	25	15
批间重复	A1	25	15
	A2	25	15
	A3	25	15

注：A1-1、A1-2 和 A1-3 为同一批次的三个试剂盒，A1、A2 和 A3 分别为三个批次的试剂盒。

2.4.5 重现性试验

表 4 重现性试验

研制试剂		血清	
		牛茨城病阳性（25）	牛茨城病阴性（15）
本实验室	A1-1	25	15
	A1-2	25	15
	A1-3	25	15
云南省动物疫病 预防控制中心	A1	25	15
	A2	25	15
	A3	25	15

2.4.6 符合率试验

用研制试剂（A）、商品化试剂（B）两种试剂盒同时对 550 份血清进行检测，两种试剂盒的检测结果完全一致，两者的 Kappa 值为 1。

表 5 符合率试验

A 试剂盒	B 试剂盒	总数
-------	-------	----

	阳性	阴性	
阳性	66	0	66
阴性	0	484	484
总数	66	484	550
符合率		100%	
相对敏感度		100%	
相对特异性		100%	

A、B 试剂盒的符合率为： $(66+484) / 550 \times 100\% = 100\%$ ；相对敏感性为： $66/66 \times 100\% = 100\%$ ；
 相对特异性为： $484/484 \times 100\% = 100\%$ ； $Kappa = 2(66 \times 484 - 0 \times 0) / (66 \times 484 + 66 \times 484) = 1$
 本标准正是依据以上实验结果编制而成。

3、新旧标准对比（适用于修订标准的情况）

新标准《牛茨城病诊断技术》规定了牛茨城病病原检测的病毒分离、荧光抗体试验、病毒中和试验、RT-PCR 试验、实时荧光 RT-PCR 试验；抗体检测的中和试验、B-ELISA 试验、琼脂凝胶免疫扩散试验等检测方法；与修订的标准《茨城病和鹿流行性出血病琼脂凝胶免疫扩散试验方法》NY/T542-2002 相比，增加了牛茨城病临床诊断，样品的采集、运输、保存与处理，病毒分离鉴定，免疫荧光抗体，病毒中和，RT-CPR，实时荧光 RT-PCR，B-ELISA 等多种诊断方法。

（三）试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

1、试验验证的分析

本标准建立的牛茨城病病毒分离鉴定试验，病毒中和和血清中和试验，涉及活病毒使用，运输、生物安全问题，仅在标准起草单位昆明海关技术中心、云南省畜牧兽医科学院进行验证。试验操作程序，已发表相关病毒分离鉴定文章，具有可重复性和操作性。

标准中核酸检测方法，我们采用提取核酸，转录为 cDNA 方式进行运输，在不同单位进行验证，主要考虑到：RNA 运输易于降解，本标准引物采用 WOAHH 推荐引物，我们仅是验证引物的适用性，不验证提取 RNA 方式。RNA 提取各个

单位在标准实际使用中，可采用验证的商品化提取试剂开展工作。经验证标准中引物均可有效鉴别出牛茨城病与其他临床易感染病毒。

本标准建立的阻断 ELISA 抗体检测方法，琼扩抗体检测方法，试制的相应试剂盒参加了 2019 年海关总署委托原北京海关技术中心组织的全国试剂比对，其中阻断 ELISA 抗体检测试剂盒在三家单位试剂盒测试中，敏感性为 93.57%，96.43%，97.14%，特异性均为 100%，kappa 值为 0.93。琼扩抗体检测试剂盒在三家单位试剂盒测试中，敏感性为 95.00%，95.00%，99.00%，特异性为 86.67%，86.21%，86.21%，kappa 值为 0.92。相关技术水平已达到国外同类检测试剂盒性能指标，解决了国际贸易不稳定情况下，我国进境反刍动物茨城病检疫无试剂可用局面。（数据来源，海关总署 2019 年组织的流行性出血病试剂盒性能比对）

2、综述报告

牛茨城病诊断技术标准草案中包括病原检测的病原分离、荧光抗体试验、病毒中和试验、RT-PCR 试验、实时荧光 RT-PCR 试验，抗体检测的中和试验、B-ELISA 抗体检测试验、琼脂凝胶免疫扩散试验检测方法。上述方法在 WOA 推荐的流行性出血病检测方法中均有涉及，其中茨城病 RT-PCR 和荧光 RT-PCR 已在全球进行应用和验证。标准起草单位也研制出茨城病琼扩和 ELISA 抗体检测方法，并试制出试剂盒，性能指标达到国际同类产品水平，已发表相关论文。

2.1 牛茨城病病毒分离鉴定试验

标准起草团队，云南省畜牧兽医科学院长期开展流行性出血病的监测、病毒分离鉴定工作，先后通过 BHK₂₁ 细胞接种分离、病毒中和试验、PCR\荧光 PCR 鉴定等试验，从牛血液中分离到 EHDV-1、EHDV-6 等病毒，本标准在总结前期研究结果基础上，参考 WOA EHDV 检测章节，编制完成牛茨城病病毒分离鉴定试验部分。

参考文献：

（1）杨振兴，寇美玲，李占鸿，等.血清 6 型流行性出血病病毒在我国云南的首次分离与鉴定[J].中国预防兽医学报.2019.41(11).1113-1119

（2）吕敏娜，朱建波，李娟，等. 广东一株牛源流行性出血病病毒的分离鉴定[J].中国预防兽医学报.2017.39(1).67-70

2.2 牛茨城病荧光抗体试验

标准起草团队，昆明海关技术中心，云南省畜牧兽医科学院，长期利用荧光抗体试验鉴定牛茨城病等相关病毒，标准起草团队已研制成功牛茨城病毒单克隆抗体，利用商业化试剂盒，可完成病毒荧光标记，开展病毒的荧光抗体检测。在本标准制定中，我们以本标准编制的检测流程为基础，开展了牛茨城病病毒感染玻片上的 BHD₂₁ 细胞，80%丙酮与 100%丙酮分别固定，与牛阳性血清反应，荧光标记山羊抗牛抗体反应试验，80%丙酮固定细胞玻片，出现绿色荧光。为此，标准编制中，我们将传统的 80%丙酮固定病毒感染细胞的荧光抗体试验，写入标准。

2.3 牛茨城病病毒中和试验和抗体中和试验

标准起草团队，昆明海关技术中心，云南省畜牧兽医科学院分别保存有牛茨城病及流行性出血病的多个血清型病毒，在流行性出血病及同属的蓝舌病病毒分离中，长期开展病毒中和试验和抗体中和试验鉴定病毒及感染动物的病毒血清型，研究成果见以上病毒分离鉴定文章，本标准中两种方法是总结前期研究结果，凝练而成。

2.4 牛茨城病 RT-PCR 试验

牛茨城病 NS1 蛋白为其保守蛋白，编码基因 S5 为流行性出血病中保守基因，标准采用 WOA 中保守基因，进行牛茨城病病毒检测。检测结果阳性，基因测序，序列比对，可确定是否为牛茨城病毒。

2.5 牛茨城病荧光 RT-PCR 试验

牛茨城病毒为分节段 RNA 病毒，共 10 节段，Seg- 2 节段编码的 VP2 蛋白是构成病毒外层衣壳的主要蛋白之一，可诱导被感染动物产生病毒的血清型特异性中和抗体，决定着 EHDV 的血清型。Seg- 2 是 EHDV 基因组中变异最大的基因节段，不同血清型 EHDV 毒株之间的核酸序列差异可达 56.2%；同一种血清型不同地域分离毒株的 Seg- 2 核酸序列差异也可达 29.4%，据此将同一种血清型的 EHDV 毒株进一步划分为 Eastern 型（东方型）与 Western 型（西方型）。标准起草团队，保存有 EHDV 八种血清型病毒，是国内保存此病毒最齐全的单位，团队利用 WOA 中牛茨城病和自研的引物开展相关验证工作，试验结果表明，相关引物均能有效扩增牛茨城病，且不与其他血清型病毒进行非特异性扩增。本研究中荧光 PCR 方法采信 WOA 中引物和检测方法。

参考文献：杨振兴，李占鸿，宋子昂，等。流行性出血病病毒（EHDV）血清型特异性荧光定量 RT-PCR 方法的建立及初步应用[J].病毒学报，36（5）：897-906

2.6 牛蒺城病 B-ELISA 抗体检测试验

研究用饱和硫酸铵浓缩 EHDV 灭活病毒作为包被抗原；在前期研制出牛蒺城病单克隆抗体的基础上，经筛选与克隆、纯化 BLAB/C 腹水制备的鼠源性单抗，商品化的 HRP-IgG 羊抗鼠二抗作为检测抗体，建立了 EHDV 阻断 ELISA 抗体检测方法。优化检测方法中各组分含量和反应程序，并最终确定：抗原包被浓度为 27.3ug/ml，每孔 100μL，pH9.6 碳酸盐 4℃包被过夜；洗板；5%BSA 37℃封闭 1h；样品用稀释液 1:2.5 稀释 50μL，37℃作用 45min；加入 1:100 稀释的单抗 50μL，37℃下作用 45min；洗板；加入 1:1000（1μg/孔）商品化的 HRP-羊抗鼠二抗 100μL，37℃作用 45min；洗板，加底物，显色；判定条件为 $PI(\%) = \frac{\text{样品 } OD_{450nm}}{\text{空白对照 } OD_{450nm}} \times 100 = S/M \times 100 < 60$ ，阳性，反之则为阴性。

研究的特异性试验表明：建立的 EHDV ELISA 抗体检测方法能有效区分蓝舌病、小反刍兽疫、口蹄疫、赤羽病等阳性血清；方法敏感性与国际通用试剂盒在检测相同倍比稀释的阳性血清时，敏感性相同。通过建立检测方法并试制的试剂盒，在与国际同类 ID Screen® EHDV Competition 检测试剂盒，一一对应检测，140 份阴性血清，60 份阳性血清，两者检测结果符合率达 97%。对实验室储备的 828 份血清进行临床样品检测，检出的阳性血清，用国际同类试剂盒检测，结果均为阳性。实验结果表明，研制的 EHDV B-ELISA 抗体检测试剂盒可用于 EHDV 临床样品的检测。

研制检测方法、制备试剂与国外同类试剂的比较结果。

比对试剂盒	ID Screen® EHDV Competition		总数 Total
	阳性	阴性	
阳性 Position	60	6	66
阴性 Negative	0	134	134
总数 Total	60	140	200
符合率 Coincidence rate	97.00%		

$$\text{kappa}_{12} = 2(134 \times 60 - 6 \times 0) / (66 \times 140 + 60 \times 134) = 0.93$$

EBD 病毒 EIA 抗体检测试剂说明书

流行性出血热 (EBD) 是一种严重危害健康、生命及社会经济的疫病。血清学试验主要有中和试验、间接免疫扩散试验 (竞争/阻断) 酶联免疫吸附试验。

本试剂盒采用间接酶联免疫吸附试验 (EIA-EIHA)。相关试剂的酶活性由酶原和相应的单克隆抗体经酶活化、活化后应用于酶。半微量酶活性物质经 EIA 后血清抗体的检测和相应的流行病学调查。

1 试剂包组成:

名称	规格	备注
20x 样品孔液	20mL x 2	蓝色液体
缓冲液	40mL	黄色液体
洗涤液	25mL	棕色液体
终止液	25mL	红色液体
EIEIV 单克隆抗体	25mL	绿色液体
EIEIV 阳性对照	800uL	红色管帽
EIEIV 阴性对照	800uL	蓝色管帽

The bottom part of the image shows the kit components: a white bag labeled "EIEIV 酶包板板" (Enzyme-coated plate) and a multi-well plate with colored wells (blue, yellow, red, green).

3、技术经济论证

《牛炭城病诊断技术》草案中的技术方案均是结合工作实际，经过验证的方法，标准中既包括复杂的血清抗体中和试验，也包括大规模样品检测使用的 AGID 和 ELISA 抗体检测试验；既包括病原分离、也包括病原快速鉴定的荧光 RT-PCR 检测方法，标准草案的制订已充分考虑技术应用的不同场景和检疫的经济效能。标准使用者可根据实际场景，选择性使用标准中的技术开展牛炭城病检测。标准中检测方法已成熟，可广泛应用在我国入境种牛、国内种牛疫病诊断、监测中，对于保障我国种牛的健康养殖具有重要的经济意义。

4、预期的经济效益、社会效益和生态效益

国内牛炭城病为散发性感染，危害程度相对较低，但由于本身为 RNA 病毒，与流行性出血病其他血清型病毒基因间易产生重配，产生新的毒株，加强其国内牛炭城病的监测是保障我国反刍动物健康养殖的有效手段。且我国每年进境种用牛约 15 余万头，其中澳大利亚等国家输入我国牛均检疫牛炭城病病毒，本标准中牛炭城病荧光 RT-PCR、阻断 ELISA 抗体检测方法等技术将应用在大规模的疫病诊断、检疫中，产生经济效益显著。

（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本标准中牛炭城病抗体检测琼扩方法和阻断 ELISA 方法与国际同类试剂盒研发原理相同。其根据标准试制的琼扩抗体检测试剂，与国外 VM 琼扩试剂相比，VM 试剂盒无法检测出稀释后的强阳性及弱阳性血清，一一对应，本标准试制备试剂盒可检测出稀释至 1:8 的强阳性血清；两种试剂盒在 500 份临床血清样本检测中，检测结果相同（史云鹏等，2021）；阻断 ELISA 试制试剂盒与国外 ID Screen 参考试剂盒分别检测实验室保存的 200 份临床血清样本，结果显示研制阻断 ELISA 方法特异性、敏感性与 ID Screen 参考试剂盒一致，二者符合率为 97.00%，Kappa 值为 0.93（董仙兰等，2021）

参考文献：

1. 董仙兰,王琼,韩佃刚,等.流行性出血病病毒阻断 ELISA 抗体检测试剂盒的研制[J].中国动物检疫,2021,38(10):92-97.

2. 史云鹏¹ 林萍萍¹ 安鹏天,等.鹿流行性出血病 ELISA 和 AGID 试剂盒的比较研究[J]中国口岸科学技术.2021,11(3):18-22

（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

《牛茨城病诊断技术》以 WOA 陆生动物诊断与疫苗手册中流行性出血病诊断的推荐方法为基础，结合标准起草团队开展的病毒分离鉴定经验（包括病毒和血清中和试验），自主研发的牛茨城病琼扩抗体、阻断 ELIA 抗体检测试剂盒为基础编制。在标准编制中，我们采用 WOA 流行性出血病推荐方法中，牛茨城病与流行性出血病其他血清型病毒鉴别的荧光 PCR 引物，写入本标准，WOA 相关疫病的检测方法是国际推荐性检测方法，为此本标准采用其推荐引物为合规引用。

（六）与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准修订行标，不存在与茨城病防控中现行的法律、法规和强制性国家标准冲突的关系。

（七）重大分歧意见的处理经过和依据

无。

（七）涉及专利的有关说明

本标准与两项专利存在一定相关性，但专利权人均为本标准起草负责人，不涉及专利侵权问题。相关专利见下：

发明专利：一种鹿流行性出血病病毒琼扩抗体检测试剂盒（ZL 2016 1 042 1335.X），专利权人，艾军等。

发明专利：EHDV-2 型单克隆抗体、制备源细胞株、产物应用及试剂盒（ZL 2021 1 0950351.9）专利权人，艾军等。

在标准的前言中，进行了“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”申明。

（九）实施标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

标准完成修订后，我们也将结合前期制作的 AGID 操作视频，完善 ELISA 方

法视频制作，通过网络等形式，对标准中的技术方法进行详细讲解和宣贯。

建议 2026 年 06 月实施，过渡期 3 个月。

（十）其他应予说明的事项。

无。

标准起草组
2025 年 7 月