

NY

中华人民共和国农业行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

代替 XX/T

牛呼吸道合胞体病诊断技术

Diagnostic techniques for Bovine respiratory syncytial

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

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 临床诊断	1
5.1 流行病学	1
5.2 临床症状	1
5.3 剖检变化	2
5.4 结果判定	2
6 样品的采集、运输和保存	2
6.1 样品采集	2
6.2 样品的运输和保存	2
7 病毒分离和鉴定	2
7.1 主要仪器和器材	2
7.2 主要试剂	2
7.3 主要耗材	2
7.4 操作步骤	3
7.5 结果判定	3
8 RT-PCR 方法	3
8.1 仪器设备	3
8.2 主要耗材	3
8.3 试剂	3
8.4 引物	4
8.5 操作步骤	4
8.6 结果判定	5
9 荧光 RT-PCR 方法	5
9.1 仪器设备	5
9.2 主要耗材	5
9.3 试剂	5
9.4 引物与探针	5
9.5 操作步骤	5
9.6 结果判定	6
10 ELISA 方法	6
10.1 主要仪器和器材	6

10.2	主要试剂	6
10.3	操作方法	7
10.4	样品 S/P 值计算方法	7
10.5	试验成立条件	7
10.6	结果判定	7
11	综合判定	7
附录 A (资料性)	病毒分离相关溶液的配制	8
A.1	磷酸盐缓冲液 (PBS)	8
A.2	DMEM 完全营养液和维持液	8
附录 B (资料性)	正常的 MDBK 细胞和感染 BRSV 后的细胞 CPE 形态图	9
B.1	正常的 MDBK 细胞形态图	9
B.2	MDBK 细胞感染 BRSV 后的 CPE 形态图	9
附录 C (资料性)	RT-PCR 试剂配置	10
C.1	TAE 电泳缓冲液	10
C.2	1% 的琼脂糖凝胶	10
附录 D (资料性)	BRSV N 基因序列及 RT-PCR 产物电泳示意图	11
D.1	牛呼吸道合胞体 N 蛋白核苷酸序列 (1202bp)	11
D.2	RT-PCR 产物电泳示意图	11
附录 E (资料性)	荧光 RT-PCR 扩增序列及扩增曲线示意图	12
E.1	N 基因特异性扩增序列	12
E.2	荧光 RT-PCR 扩增曲线示意图	12
附录 F (资料性)	牛呼吸道合胞体 N 蛋白的表达与纯化	13
F.1	重组表达质粒的制备及鉴定	13
F.2	重组 N 蛋白转染 Sf9 细胞	13
附录 G (资料性)	酶联免疫吸附试验相关溶液的配制	14
G.1	抗原包被液—0.05mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液	14
G.2	洗涤缓冲液—pH 7.4 PBST (含 0.05% 吐温-20)	14
G.3	封闭液及抗体稀释液—含 3% BSA 的 pH 7.4 PBS	14
G.4	底物	14
G.5	终止液	15
附录 H (资料性)	BRSV 阳性血清及阴性血清的制备	16
H.1	BRSV 阳性血清制备	16
H.2	BRSV 阴性血清制备	16

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/TC181）归口。

本文件起草单位：吉林省农业科学院、吉林省畜牧兽医科学研究院、吉林省动物疫病预防控制中心、中国农业科学院特产研究所、吉林农业大学、河南省农畜水产品检验技术研究院、长春市畜牧总站、长春科技学院。

本文件主要起草人：肖丹、王楠、王思月、魏天、杨艳玲、解殿玉、邵洪泽、曹利利、王开、于钦磊、郭衍冰、滕星、贾文博、王成宇、孙兴忠、元雪滨、朱奕霏、杨金鑫、周笑世、黄海楠、鞠安琪、谭成成。

引 言

牛呼吸道合胞病是由牛呼吸道合胞病毒（Bovine respiratory syncytial virus, BRSV）感染所致的一种牛急性呼吸道传染病，以发热、流涎、流泪、咳嗽及呼吸困难为主要特征。BRSV为分节段单股负链RNA病毒，属肺病毒科、正肺病毒属，也称为牛正肺病毒。BRSV基因组由长度为15.1kb的ssRNA组成，编码包含2个重叠的开放阅读框架（ORF）的10个基因，产生11种蛋白质根据G蛋白抗原性不同可分不同亚群，但仅有1个血清型。病毒颗粒被包裹在约7~15 nm厚的脂质膜中，直径约80~300 nm，呈多形性，有囊膜和纤突，对酸碱、热极其敏感。

BRSV可通过直接接触和飞沫传播，除感染牛外，还可感染羊、猪和马等哺乳类动物，在全世界广泛分布。作为牛呼吸道疾病综合征（Bovine respiratory disease complex, BRDC）的主要病原之一，BRSV单独感染牛群时，潜伏期2~7 d，初时无症状或症状较轻，主要表现为流涎，鼻、眼分泌物增多；严重时，病牛表现为进食量减少或不食，体温升高，呼吸困难，咳嗽等症状，常伴有肺水肿、肺气肿。当BRSV与其他牛呼吸道病原混合感染时，临床症状加剧，病牛的死亡率随之增加。

目前，牛呼吸道合胞体病还没有有效的治疗手段，接种疫苗可预防该病的发生。因BRSV感染后的临床症状与其他呼吸道传染病相似，需进行实验室鉴别诊断。本文件参考了有关文献，结合本单位和国内外相关检测技术，制定了RT-PCR、实时荧光RT-PCR等病原学诊断方法，及间接ELISA血清学诊断方法。其中，病原学诊断方法适用于BRSV感染的鉴别诊断，血清学诊断方法适用于流行病学调查。绵羊、山羊及其他动物感染BRSV可参考本文件进行诊断。

牛呼吸道合胞体病诊断技术

1 范围

本文件规定了牛呼吸道合胞体病的临床诊断、样品的采集、运输和保存、病毒分离和鉴定、RT-PCR、荧光RT-PCR、酶联免疫吸附试验（ELISA）等实验室诊断方法的技术要求。

本文件适用于牛呼吸道合胞体病的流行病学调查、诊断、监测和检疫等。

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。

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。

BRDC：牛呼吸道综合征（Bovine respiratory disease complex）

BRSV：牛呼吸道合胞体病毒（Bovine respiratory syncytial virus）

BSA：牛血清白蛋白（Bovine serum albumin）

CPE：致细胞病变效应（Cytopathic effect）

ELISA：酶联免疫吸附试验（Enzyme linked immunosorbent assay）

HRP：辣根过氧化物酶（Horseradish peroxidase）

MDBK：牛肾细胞（Bovine kidney cell）

OD：光密度（Optical density）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate buffer saline）

RT-PCR：反转录-聚合酶链式反应（Reverse transcription-polymerase chain reaction）

SDS：十二烷基硫酸钠（Sodium dodecyl sulfate）

5 临床诊断

5.1 流行病学

5.1.1 该病一年四季均可发生，以冬季节多发；气温骤然变化、长途运输或过早断奶等应激因素易导致该病发生。

5.1.2 牛最易感，多发于1月龄以上犊牛及青年牛；绵羊、山羊次之，猪、马也可感染。

5.1.3 病牛及隐性感染牛为主要传染源，其他家畜感染后也可成为传染源。

5.1.4 直接接触和飞沫传播为主要传播途径。

5.2 临床症状

5.2.1 青年牛和成年牛多呈隐性感染，无明显临床症状；6月龄内犊牛常表现为体温升高，呼吸困难或干咳，结膜炎，流涎，鼻、眼分泌物增多等。

5.2.2 当与其他呼吸道病原混合感染时可引起BRDC，表现为高热、精神沉郁、食欲下降、呼吸困难、咳嗽、流涎、乳房炎、流产、生长发育受阻等症状。

5.3 剖检变化

呈间质性肺水肿，气管和支气管炎，表现为黏膜充血，气管内充满粘液，气管淋巴结、支气管淋巴结、腔淋巴结肿大、水肿；严重病例出现肺气肿、胸膜肺炎和皮下积液。

5.4 结果判定

出现 5.2 临床症状和 5.3 剖检变化，并符合 5.1 流行病学特点，可判为疑似牛呼吸道合胞体病，确诊需结合实验室诊断。

6 样品的采集、运输和保存

6.1 样品采集

6.1.1 主要试剂及耗材

6.1.1.1 含青霉素和链霉素的磷酸盐缓冲液，配制方法见 A.1.2。

6.1.1.2 无菌棉拭子。

6.1.1.3 5 mL 注射器。

6.1.1.4 0.22 μm 微孔针头滤器。

6.1.1.5 无菌离心管。

6.1.1.6 研磨器。

6.1.2 棉拭子样品

取无菌棉拭子插入鼻腔 2 cm~3 cm，轻轻擦拭并慢慢旋转 2 圈~3 圈，蘸取牛鼻腔分泌物后，置于含青霉素和链霉素的磷酸盐缓冲液离心管中待检。

6.1.3 血液样品

颈静脉或尾静脉无菌采集血液不少于 5 mL，加入无菌离心管中，待自然凝固后，3 000 g/min 离心 10 min，吸出上层血清待检。

6.1.4 组织样品

采集病死牛肺组织不少于 5 g，加入 5 mL 含青霉素和链霉素的磷酸盐缓冲液，充分研磨，制成组织悬浮液，12 000 g/min 离心 10 min，取上清用 0.22 μm 微孔针头滤器过滤除菌后待检。

6.2 样品的运输和保存

按 NY/T 541 执行。

7 病毒分离和鉴定

7.1 主要仪器和器材

7.1.1 生物安全柜。

7.1.2 CO₂ 培养箱。

7.1.3 倒置显微镜。

7.1.4 高速冷冻离心机（最高离心力不低于 12 000 g/min）。

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

7.1.6 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

7.2 主要耗材

7.2.1 滤芯吸头（10 μL 、200 μL 、1 000 μL ）。

7.2.2 微量离心管（0.5 mL、0.2 mL、1.5 mL）。

7.2.3 25 cm² 细胞培养瓶。

7.3 主要试剂

- 7.3.1 0.1 mol/L PBS，配制方法见 A.1.1。
- 7.3.2 含有青霉素和链霉素的磷酸盐缓冲液，配置方法见 A.1.2。
- 7.3.3 DMEM 完全营养液，配置方法见 A.2.1 和 A.2.2。
- 7.3.4 DMEM 维持液，配置方法见 A.2.3。
- 7.3.5 0.25% 胰蛋白酶溶液。
- 7.3.6 MDBK 细胞。

7.4 操作步骤

7.4.1 单层细胞制备

将 MDBK 传代细胞用 0.25% 胰酶消化液消化分散后，用 DMEM 完全营养液分散为浓度为 1×10^6 个/mL，将其分装至 25 cm² 细胞培养瓶中，37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养 12 h~24 h，形成单层备用。

7.4.2 接种细胞

取制备好的MDBK单层细胞，弃去瓶内细胞培养液，无菌PBS冲洗3次，接种6.1.2或6.1.4处理好的样品 1 mL，37℃ 吸附 30 min~60 min，弃去样品液，无菌PBS冲洗3次，补足 DMEM 维持液至瓶体积的1/3。每个样品接种 2 瓶细胞，置 37℃、5%CO₂ 条件下培养。同时，设正常细胞对照 1 瓶，弃去细胞培养液后，以DMEM 维持液1 mL，37℃ 30 min~60 min吸附，补足 DMEM 维持液至瓶体积的1/3。

7.4.3 培养及观察

每日观察细胞培养物是否出现 CPE，持续培养 3 d~7 d。如细胞培养液出现混浊或有絮状物，弃去该瓶细胞。若培养至 7d 仍未观察到明显CPE，将细胞培养物反复冻融3次，取上清继续接种MDBK细胞，盲传 3 代以上，仍未出现CPE，可判为病毒分离阴性。

7.5 结果判定

当细胞出现空泡化、变圆、折光性增强等典型的致细胞病变效应（CPE）且病变范围达到约80%（参见附录B.2），同时对照细胞未出现CPE时，可初步判为病毒分离阳性。进一步鉴定需将出现CPE的细胞培养液经第 8 章或第 9 章方法进行核酸检测。

8 RT-PCR 方法

8.1 仪器设备

- 8.1.1 PCR 仪。
- 8.1.2 高速冷冻离心机（最高离心力不低于 12 000 g/min）。
- 8.1.3 生物安全柜。
- 8.1.4 -20℃ 冰箱。
- 8.1.5 电泳仪。
- 8.1.6 水平电泳槽。
- 8.1.7 凝胶成像仪。
- 8.1.8 微量移液器（0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、200 μL~1 000 μL）。

8.2 主要耗材

- 8.2.1 滤芯吸头（10 μL、200 μL、1 000 μL）。
- 8.2.2 微量离心管（1.5 mL、0.5 mL、0.2 mL）。
- 8.2.3 PCR 管（0.2 mL）。

8.3 试剂

- 8.3.1 核酸提取试剂宜选取商品化病毒 RNA 提取试剂盒或等效试剂。
- 8.3.2 商品化 2×一步法 RT-PCR 预混液。
- 8.3.3 商品化无毒核酸染料。
- 8.3.4 无核酸酶水。
- 8.3.5 10×上样缓冲液。
- 8.3.6 DNA Marker (2000 bp)。
- 8.3.7 TAE 电泳缓冲液 (配置方法见 C.1)。
- 8.3.8 1% 琼脂糖凝胶 (配置方法见 C.2)。
- 8.3.9 阳性对照, 灭活的 BRSV 细胞培养物。
- 8.3.10 阴性对照, MDBK 细胞培养液。

8.4 引物

引物名称、序列和产物长度见表 1。

表1 RT-PCR 检测用引物名称、序列和产物大小

引物名称	引物序列	产物长度 (bp)
上游引物 (F)	5'-TGCTATGTGTTGCTGCTTTGGTTA-3'	660
下游引物 (R)	5'-TCTTGATTGCCTCTAATTCCTCTGTAGT-3'	

8.5 操作步骤

8.5.1 病毒 RNA 提取

待检样品、阳性对照、阴性对照按所选取的病毒 RNA 提取试剂盒说明书提取病毒 RNA。提取的 RNA 应迅速进行 RT-PCR 扩增, 或置于 -20 °C 冰箱备用。

8.5.2 RT-PCR 反应体系配制

冰浴条件下按照表 2 分别将除模版 RNA 以外的各组分加入至 0.2 mL PCR 管, 配制反应体系; 依次将待检样品、BRSV 阳性对照和阴性对照模板 RNA 加入配置好的反应体系, 加完后盖紧盖子并做好标记。

表2 RT-PCR 反应体系

序 号	组 分	反应体系 (μL)
1	2×一步法 RT-PCR 预混液	25.0
2	上游引物 (10 μmol/L)	2.5
3	下游引物 (10 μmol/L)	2.5
4	模板 RNA	5.0
5	无核酸酶水	15.0
总体积		50.0

8.5.3 RT-PCR 扩增条件

将 PCR 管置 PCR 扩增仪上 50 °C 反转录 10 min; 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。采用不同生产商的一步法 RT-PCR 预混液, 可根据说明书设置扩增条件。

8.5.4 电泳

扩增完成后将 5 μL 的 6 $\times$ 上样缓冲液加入到 RT-PCR 产物中，混匀后取 8 μL 加入到使用 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液配制的 1% 琼脂糖凝胶中（含无毒核酸染料），加 DNA marker 作为电泳参照物。调节电压 5 V/ cm^2 ，电泳时间 20 min~25 min。电泳结束后，用凝胶成像仪观察结果并记录。

8.6 结果判定

- 8.6.1 成立条件：BRSV 阳性对照出现 660 bp 目的条带，且 BRSV 阴性对照无相应条带，见 B.1。
- 8.6.2 被检样品出现 660 bp 目的条带，判定为 BRSV 核酸阳性。被检样品无 660 bp 目的条带，判定为 BRSV 核酸阴性。
- 8.6.3 若出现于设计长度不同的条带，为非特异性反应，需重复实验，2 次实验均为非特异性条带时，可判定为阴性。

9 荧光 RT-PCR 方法

9.1 仪器设备

- 9.1.1 高速冷冻离心机（最高离心力不低于 12 000 g/min）。
- 9.1.2 生物安全柜。
- 9.1.3 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。
- 9.1.4 荧光 PCR 仪。
- 9.1.5 微量移液器（0.5 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、200 μL ~1 000 μL ）。

9.2 主要耗材

- 9.2.1 滤芯吸头（10 μL 、200 μL 、1 000 μL ）。
- 9.2.2 微量离心管（1.5 mL、0.5 mL、0.2 mL）。
- 9.2.3 荧光 PCR 管（0.2 mL）。

9.3 试剂

- 9.3.1 核酸提取试剂宜选取商品化病毒 RNA 提取试剂盒或等效试剂。
- 9.3.2 商品化 2 $\times$ 一步法 qRT-PCR 预混液。
- 9.3.3 无核酸酶水。
- 9.3.4 阳性对照，同 8.3.9。
- 9.3.5 阴性对照，同 8.3.10。

9.4 引物与探针

引物及探针名称和序列见表 3。

表3 实时荧光 RT-PCR 检测用引物和探针名称和序列

引物名称	序列
上游引物 F	5'- TGCTAAAAGAGATGGGAGAGGTAGC -3'
下游引物 R	5'-CCTGACCTATCACCTGCTGCTAA -3'
探针 P	5'-FAM- TGGTATGATAGTGCTATGTGTTGC-MGB-3'

9.5 操作步骤

9.5.1 病毒 RNA 提取

同 8.5.1。

9.5.2 反应体系配置

9.5.2.1 按照表 4 将除模版 RNA 以外的各组分加入至 0.2 mL 实时荧光 PCR 管, 配制 Real-time RT-PCR 反应体系。

9.5.2.2 将待检样品、BRSV 阳性对照和阴性对照模板 RNA 加入配置好的反应体系, 加完后盖紧盖子并做好标记。

表4 反应体系

序 号	组 分	用量 (μL)
1	2×一步法 qRT-PCR 预混液	12.5
2	上游引物 F (10 μmol/L)	1.0
3	下游引物 R (10 μmol/L)	1.0
4	探针 P (1 μmol/L)	0.5
5	无核酸酶水	5.0
6	模板 RNA	5.0
总体积		25.0

9.5.3 扩增程序

将荧光PCR 管置于荧光定量 PCR 仪上, 50 °C 反转录 10 min; 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环, 在每一个循环的 60 °C 时收集荧光信号。采用不同生产商的一步法qRT-PCR预混液, 可根据说明书设置扩增程序。

9.6 结果判定

9.6.1 成立条件: BRSV 阳性对照 Ct 值≤25, 且出现特征性“S”形曲线, 见附录 E.2; BRSV 阴性对照无 Ct 值, 且无特征性“S”形曲线。

9.6.2 被检样品 Ct 值≤35, 且出现特征性“S”形扩增曲线, 判定为 BRSV 核酸阳性; 被检样品无 Ct 值或 Ct 值>40, 且无特征性“S”形曲线, 判定为 BRSV 核酸阴性; 被检样品 35<Ct 值≤40 且出现特征性“S”形曲线, 样品检测结果判为疑似, 应重新提取病毒 RNA 进行检测, 仍为疑似, 判定为 BRSV 核酸阳性。

10 间接 ELISA 方法

10.1 主要仪器和器材

- 10.1.1 酶标仪。
- 10.1.2 37°C 恒温培养箱。
- 10.1.3 洗板机。
- 10.1.4 微量移液器 (0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、200 μL~1 000 μL)。
- 10.1.5 酶标板。
- 10.1.6 吸头 (10 μL、200 μL、1 000 μL)。
- 10.1.7 吸水滤纸。

10.2 主要试剂

- 10.2.1 包被抗原: 重组 BRSV N 蛋白 (N 蛋白基因序列参见 D.1, 制备方法见 F)。
- 10.2.2 HRP 标记的其他动物的抗牛 IgG 二抗, 商品化试剂。
- 10.2.3 包被液: 0.05 mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液 (配置方法见 E.1)。
- 10.2.4 洗涤液: 含 0.05% 吐温-20 的 pH 7.4 的 PBS (配置方法见 E.2)。
- 10.2.5 封闭液及抗体稀释液: 含 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 pH 7.4 的 PBS (配置方法见 E.3)。

10.2.6 底物：MBTH/DMAB 溶液（配置方法见 E.4.1）。

10.2.7 终止液：3 mol/L H₂SO₄（配置方法见 E.5.1）。

10.2.8 BRSV 阳性对照血清，制备方法见 H.1。

10.2.9 BRSV 阴性对照血清，制备方法见 H.2。

10.3 操作方法

10.3.1 包被抗原：用包被液将重组 BRSV N 蛋白稀释至终浓度 8 μg/mL，每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板，4 ℃ 孵育过夜。

10.3.2 洗板：酶标板用洗涤液洗涤 3 次，弃去洗涤液，将酶标板在吸水滤纸上拍干。

10.3.3 封闭：酶标板每孔加入 200 μL 封闭液，于 37 ℃ 孵育 1 h。弃去封闭液，将酶标板在吸水滤纸上拍干。

10.3.4 加样：将待检血清用抗体稀释液做 1:50 稀释后每孔加入 100 μL。同时加入稀释道工作浓度的阳性对照血清和阴性对照血清各 2 孔，每孔加入 100 μL。置于 37 ℃ 恒温培养箱中孵育 2 h。

10.3.5 按步骤 10.3.2 冲洗酶标板。

10.3.6 加酶标二抗：用抗体稀释液将 HRP 标记的二抗稀释至工作浓度，每孔加入 100 μL，37 ℃ 孵育 1 h。

10.3.7 按步骤 10.3.2 冲洗酶标板。

10.3.8 加底物溶液：每孔加 100 μL 底物溶液，室温避光孵育 10 min。

10.3.9 加终止液：每孔加 50 μL 终止液，终止显色反应。

10.3.10 读值：加终止液后室温 15 min 以内，在酶标仪 450 nm 波长下测定 OD 值。

10.3.11 计算阳性对照平均 OD_{450nm} 值、阴性对照平均 OD_{450nm} 值和各待检血清 OD_{450nm}。

10.4 样品 S/P 值计算方法

样品 S/P 值按公式（1）计算：

$$S/P = \frac{OD_S - OD_{NC}}{OD_{PC} - OD_{NC}} \quad (1)$$

式中：

S/P ——样品数值；

OD_S ——样品 OD 值；

OD_{PC} ——阳性对照平均 OD 值；

OD_{NC} ——阴性对照平均 OD 值。

10.5 试验成立条件

阳性对照血清两孔平均 OD_{450nm} 值大于 1.0，阴性对照血清两孔平均 OD_{450nm} 小于 0.3 时，试验成立。

10.6 结果判定

被检血清样品 S/P 值 ≥ 0.3，判定为 BRSV 抗体阳性。被检血清样品 S/P 值 < 0.3，判定为 BRSV 抗体阴性。

11 综合判定

11.1 经 5.4 判定为疑似 BRSV 感染病例，再经第 8 章或第 9 章方法检测判定为阳性的可判为牛呼吸道合胞体病确诊病例。

11.2 不符合第 5 章描述，但经第 8 章或第 9 章方法检测判定为阳性的，可判为 BRSV 感染病例。

11.3 不符合第 5 章描述，经第 8 章或第 9 章方法检测判定为阴性，且经第 10 章方法检测判定为阳性的，可判为 BRSV 感染康复病例。

附 录 A (资料性) 病毒分离相关溶液的配制

A.1 磷酸盐缓冲液 (PBS)

A.1.1 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4)

氯化钠 (NaCl) 80.0 g

氯化钾 (KCl) 2.0 g

加双蒸水 900 mL, 用盐酸调 pH 至 7.4, 定容至 1 000 mL, 103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。室温或 4 °C 冰箱保存。

A.1.2 含青霉素链霉素的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2~7.4)

加入终浓度为 100 IU/mL 的青霉素和 100 µg/mL 链霉素的 0.04 mol/L PBS (pH 7.2~7.4)。

A.2 DMEM 完全营养液和维持液

A.2.1 DMEM基础营养液

DMEM 干粉 9.5 g

碳酸氢钠 2.2 g

双重蒸馏水 1L

溶解后过滤除菌, 4 °C 保存。

A.2.2 DMEM 完全营养液 (pH 7.2)

DMEM基础营养液中加入下列成分使达到最终浓度

10% 灭活犊牛血清

100 IU/mL 的青霉素和 100 µg/mL 链霉素

2 mol/L 谷氨酰胺。

A.2.3 DMEM维持营养液 (pH 7.2)

MEM 基础营养液中加入下列成分使达到最终浓度:

2% 灭活犊牛血清

100 IU/mL 的青霉素和 100 µg/mL 链霉素

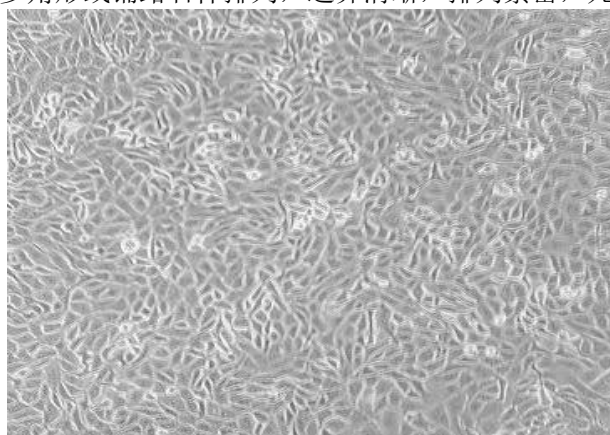
2 mmol/L 谷氨酰胺。

附 录 B
(资料性)

正常的 MDBK 细胞和感染 BRSV 后的细胞 CPE 形态图

B.1 正常的 MDBK 细胞形态图

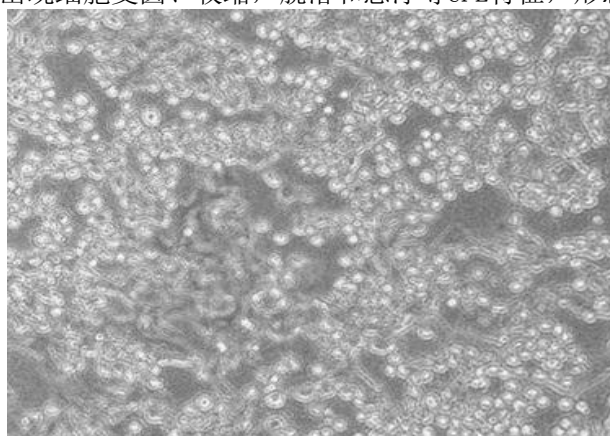
正常的MDBK细胞呈多角形或铺路石样排列，边界清晰，排列紧密，死亡细胞少，形态如图 B.1。



图B.1 正常的 MDBK 细胞形态图

B.2 MDBK 细胞感染 BRSV 后的 CPE 形态图

感染BRSV的MDBK细胞出现细胞变圆、收缩，脱落和悬浮等CPE特征，形态如图 B.2。



图B.2 感染 BRSV 后的 MDBK 细胞形态图

附 录 C

(资料性)

RT-PCR 试剂配置

C.1 TAE 电泳缓冲液

C.1.1 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na) 溶液 (pH 8.0)

乙二胺四乙酸二钠	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	定容至 100 mL

C.1.2 50×TAE电泳缓冲液

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	242.0 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (pH 8.0)	100 mL
灭菌双蒸水	定容至 1 000 mL

C.1.3 1×TAE 电泳缓冲液

使用前将 50×TAE 电泳缓冲液做 50 倍稀释。

C.2 1% 的琼脂糖凝胶

琼脂糖	0.5 g
1×TAE 缓冲液	50 mL

称取 0.5 g 琼脂糖,置于 200 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 1×TAE 缓冲液,加热溶解,冷却至50 ℃~60 ℃ 时,加入商品化无毒核酸染料至其说明书浓度,倒入胶槽内自然凝固。

附 录 D

(资料性)

BRSV N 基因序列及 RT-PCR 产物电泳示意图

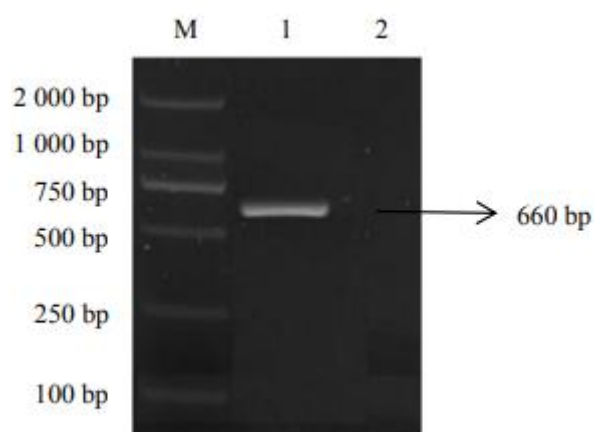
D.1 牛呼吸道合胞体 N 蛋白核苷酸序列 (1 202bp)

GGGGCAAATACAAAAATGGCTCTTAGCAAGGTCAAACATAAATGACACTTTCACAAGGATCAACTGTTGTCAACCAGCAA
 ATATACTATTCAACGTAGTACAGGTGACAACATTGATATACCAATTACGATGTGCAAAAACATCTCAATAAGTTGTGTG
 GTATGCTATTAATAACAGAAGATGCCAATCATAAATTTACAGGACTGATAGGTATGTTATATGCTATGTCCCGATTGGGG
 AGAGAAGATACCCCTAAAAATACTCAAAGATGCAGGCTACCAAGTGAGGGCCAATGGGGTTGATGTGATAACACATCGACA
 GGATGTGAATGGAAGAAATGAAATTTGAAGTGCTAACATTAGTCAGCTTAACATCAGAAGTTCAAGGTAATATAGAAA
 TAGAGTCAAGGAAGTCTTACAAAAAGATGCTAAAAGAGATGGGAGAGGTAGCTCCAGAATACAGACATGACTCTCCTGAT
 TGTGGTATGATAGTGCTATGTGTTGCTGCTTTGGTTATACAACAAATTAGCAGCAGGTGATAGGTCAGGCCTCACTGCAGT
 CATTAGGAGAGCCAACAATGTACTAAGGAATGAAATGAAACGATACAAAGGACTCATCCGAAAGATATAGCCAACAGCT
 TCTATGAAGTATTTGAAAAGTACCCTCATTACATAGATGTATTCGTACATTTTGGCATTGCTCAATCCTCAACTAGAGGA
 GGTAGTAGGGTAGAAGGAATCTTTCAGGGTTATTCATGAATGCATATGGAGCAGGTCAAGTGATGTTAAGATGGGGTGT
 ACTAGCCAAATCAGTCAAGAATATTATGCTTGGTCATGCCAGCGTACAAGCAGAAATGGAACAGGTTGTAGAAGTCTATG
 AATATGCACAAAAGTTAGGTGGAGAAGCTGGTTTTATCACATACTGAACAACCCTAAAGCATCATTGTTATCCTTAACA
 CAATTCCTCAATTTCTCTAGTGTAGTCTTAGGCAATGCTGCAGGACTAGGTATAATGGGTGAGTATAGAGGTACACCAAG
 AAACCAAGACTTGTATGATGCTGCCAAAGCATATGCAGAACAACTAAAAGAGAATGGGGTCATCAATTACAGTGTATTGG
 ATCTGACTACAGAGGAATTAGAGGCAATCAAGAACCAATTGAATCCCAAGATAATGATGTGGAATTGTGAGTTAATAAA
 AA

注：（1）下划线为引物匹配位置。

（2）该序列为GenBank公布的牛呼吸道合胞体病毒N基因序列（NCBI登陆号：NC_038272.1），不同分离毒株的N基因序列可能存在差异。

D.2 RT-PCR 产物电泳示意图



图D.1 BRSV N 基因 RT-PCR 产物电泳示意图

说明：

M——DNA 分子量标准（DL 2000 Marker）；

1——牛呼吸道合胞体病毒阳性对照；

2——牛呼吸道合胞体病毒阴性对照。

附录 E
(资料性)

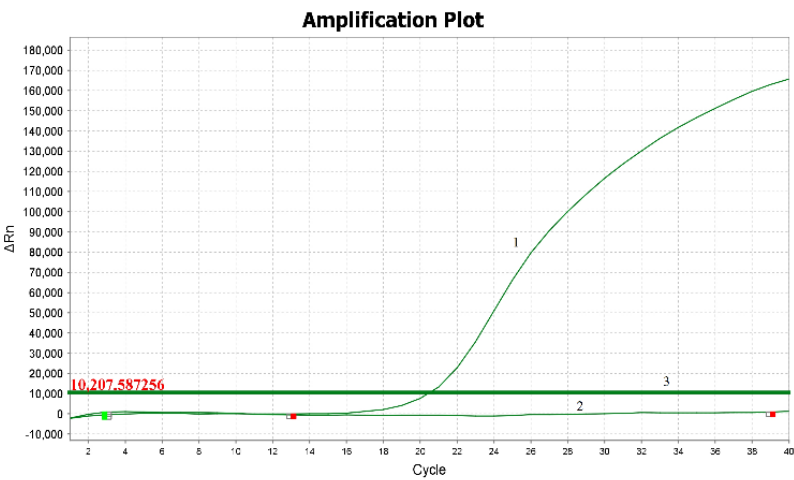
荧光 RT-PCR 扩增序列及扩增曲线示意图

E.1 N 基因特异性扩增序列

TGCTAAAAGAGATGGGAGAGGTAGCTCCAGAATACAGACATGACTCTCCTGATTGTGGTATGATAGTGCTATGTGTTGCTGCTT
TGGTTATAACAAAATTAGCAGCAGGTGATAGGTCAGG

注：下划线为引物匹配位置，下划线黑体为探针匹配位置。

E.2 荧光 RT-PCR 扩增曲线示意图



图E.1 牛呼吸道合胞体病毒荧光 RT-PCR 检测结果参照图

说明：
1 ——阳性对照；
2 ——阴性对照；
3 ——阈值线；
ΔRn ——相对荧光强度；
Cycle——循环数。

附录 F

(资料性)

牛呼吸道合胞体 N 蛋白的表达与纯化

F.1 重组表达质粒的制备及鉴定

F.1.1 将 BRSV N 蛋白的核苷酸序列人工合成至 pFastBac-HTB 转座载体上, 构建成重组表达质粒; 将重组表达质粒转化大肠杆菌 DH₁₀Bac 感受态细胞, 涂布于含有三抗 (50 μg/mL 卡那霉素、7 μg/mL 庆大霉素、10 μg/mL 四环素)、100 μg/mL X-gal 和40 μg/mL IPTG 的 LB 培养基上, 倒置于 37 °C 恒温培养箱中过夜培养。

F.1.2 用灭菌接种环在三抗 LB 培养基琼脂平板上挑取白色菌落, 在新的三抗 LB 培养基琼脂平板上重新划线接种, 如此重复进行三次复筛, 直到三抗 LB 培养基平板中菌落全部为白色。

F.1.3 用灭菌接种环挑取菌落, 接种于三抗 LB 液体培养基中。置于 37 °C 恒温摇床, 200 g/min 振荡, 过夜培养。

F.1.4 以菌液为模板, 以重组病毒杆粒通用引物 pUC M13+/M13- 进行 PCR 扩增, PCR产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

F.1.5 取 PCR 产物条带位置正确的阳性重组杆状病毒送去生物公司测序, 测序正确的菌液鉴定为阳性菌液。

F.2 重组 N 蛋白转染 Sf9 细胞

F.2.1 将 Sf9 昆虫细胞接种到六孔板中。每孔接种 1×10^6 个细胞, 用 Sf-900 II SFM 培养基补至 3 mL, 放置在培养箱中, 27 °C 过夜培养。

F.2.2 取 250 μL 的 Opti-MEM 减血清培养液, 加入无菌无酶 1.5 mL EP 管中, 再向其中加入 10 μL Expi Fectamine Sf Transfection Reagent 转染试剂, 不断轻柔地颠倒 5~10 次, 放置室温孵育 5 min。

F.2.3 取 1 μg 未稀释的 Bacmid DNA, 不断轻柔地颠倒 5~10 次, 在室温下孵育 5 min。

F.2.4 将 DNA-脂质混合物慢慢滴加至细胞上, 轻轻摇晃 6 孔板, 充分混匀。

F.2.5 将细胞放置在 27 °C 的湿润恒温培养箱中, 孵育 72 h~96 h, 倒置显微镜每12 h观察细胞状态, 直到出现细胞病变。

F.2.6 收集细胞转移至 EP 管中, 500 g/min 离心 5 min, 弃去沉淀, 上清即为所需病毒液 P0。放置-80°C 避光保存。

F.2.7 重组BRSV N蛋白的纯化

F.2.8 将 1 mL 的 Ni-NTA 混合物装填到纯化柱, 加入 10 倍体积的平衡缓冲液平衡纯化柱。

F.2.9 将离心后的病毒液上清过 0.22 μm 滤膜后, 再加入纯化柱中, 在 4°C 下结合 6 h。

F.2.10 用洗涤液洗涤纯化柱 3~5次, 并收集弃去洗涤液。再使用500 mmol/L浓度的咪唑洗脱液洗涤纯化柱3~5次, 合并收集每次的洗脱液。使用 Bradford 法检测洗脱液蛋白浓度, 真空冷冻离心浓缩至 0.5mg/mL, 分装后 -80 °C 保存备用。

附录 G

(资料性)

间接酶联免疫吸附试验相关溶液的配制

G.1 抗原包被液—0.05mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液

碳酸钠 (Na_2CO_3)	0.318 g
碳酸氢钠 (NaHCO_3)	0.588 g
去离子水	定容至200 mL

用 0.22 μm 膜过滤除菌，室温保存备用。

G.2 洗涤缓冲液—pH 7.4 PBST

吐温-20 (Tween-20)	0.5 mL
pH 7.4 PBS	定容至1 000 mL

现配现用。

G.3 封闭液及抗体稀释液

牛血清白蛋白(BSA)	3 g
pH 7.4 PBS	定容至1 000 mL

现配现用。

G.4 底物

G.4.1 DMAB/MBTH底物溶液

G.4.1.1 80.6 mmol/L DMAB

3-二甲基氨基苯甲酸 (DMAB)	1.33 g
去离子水	定容至100 mL

G.4.1.2 1.56 mmol/L MBTH

3-甲基-2-苯并噻唑酮腈 (MBTH)	27.96 g
去离子水	定容至100 mL

G.4.1.3 用法

取分别配制好的 80.6 mol/L DMAB 溶液和 1.56 mol/L MBTH 溶液各 10 mL，加入 5 μL H_2O_2 ，混匀。

G.4.2 ABTS底物溶液

G.4.2.1 A 液 (pH 4.0 1 mol/L 柠檬酸/磷酸盐缓冲溶液)

G.4.2.1.1 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠溶液

Na_2HPO_4	28.4 g
蒸馏水	至 1 000 mL

G.4.2.1.2 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液

柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$)	21.01 g
蒸馏水	至 1 000 mL

G.4.2.1.3 取 7.71 mL 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠溶液与 12.29 mL 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液混合。

G.4.2.2 B 液 (5 mg/mL ABTS 溶液)

2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 50 mg
加去离子水至 10 mL。

G. 4. 2. 2. 1 用法

使用时, 将 A 液、B 液按 9:1 的体积进行混合, 并加入 H_2O_2 至终浓度为 0.03%。

G. 5 终止液

G. 5. 1 3 mol/L H_2SO_4

浓硫酸 (H_2SO_4) 16.5 mL

去离子水 83.5 mL

将浓硫酸缓缓加到去离子水中, 混匀。

G. 5. 2 2% (W/V) SDS

称取 2 g SDS 置于 200 mL 烧杯中, 加入约 80 mL 去离子水, 68 °C 加热溶解。将溶液定容至100 mL 后室温保存。

附 录 H

(资料性)

BRSV 阳性血清及阴性血清的制备

H.1 BRSV 阳性血清制备

筛选牛呼吸道合胞体病原和抗体均为阴性的6月龄健康犊牛，用于制备阳性血清。用 1×10^7 TCID₅₀/mL BRSV接种犊牛，耳根后颈部肌肉注射 1 mL/头，48 h~72 h 后采集鼻拭子BRSV核酸检测为阳性。无菌分离感染康复 28 d 的牛血清，置于 56 °C 水浴灭活30 min~40 min 后，用 0.22 μm滤器过滤除菌，-80 °C以下保存备用。

抗体滴度合格标准：对采集的血清样品用中和实验检测，血清中和滴度应不低于 1:128。

H.2 BRSV 阴性血清制备

筛选牛呼吸道合胞体病原和抗体均为阴性的6至12个月健康犊牛，无菌分离血清，置于56 °C水浴灭活 30 min~40 min 后，用 0.22 μm 滤器过滤除菌，-80°C以下保存备用。

抗体滴度合格标准：对采集的血清样品用中和实验检测，血清中和滴度应不高于 1:2。
