

《牛呼吸道合胞体病诊断技术》编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

2024年5月，农业农村部农产品质量安全监管司下达了2024年农业行业标准制修订项目计划（农质标函〔2024〕71号），批准《牛呼吸道合胞体病诊断技术》为推荐性农业行业标准制定项目。

项目编号：NYB-24257

项目名称：《牛呼吸道合胞体病诊断技术》

标准技术归口单位：全国动物卫生标准化技术委员会

项目主持单位：吉林省农业科学院（中国农业东北创新中心）

项目参与单位：吉林省畜牧兽医科学研究所、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

本标准计划起始时间为2024年5月，完成时间为2025年6月。

（二）制定背景

牛呼吸道合胞体病是由牛呼吸道合胞体病毒（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。自1970年Paccaud在瑞士首次从牛体内分离出该病毒以来，BRSV已在全球广泛流行。目前欧洲、美洲、非洲及亚洲均有牛源BRSV分离株报道。瑞典研究显示，牛血清中BRSV抗体检出率达41%~89%。我国于2007年首次从黑龙江某牛场患牛鼻腔分泌物中分离到该病毒。2011年王伟等对国内14个主要养牛省区（内蒙古自治区、黑龙江、吉林、辽宁等）开展的血清学调查表明：BRSV抗体平均阳性率高达69.6%，其中内蒙古自治区的阳性率最高，为92.8%，其次是吉林省90.1%，最低是河北省为41.1%。本项目组2016年至2019年连续对吉林省11个县（市）BRSV进行流行病学调查，结果显示部分县（市）BRSV的抗体阳性率最高达51.7%，病原阳性率可达25%。同时，作为牛呼吸道疾病综合征（Bovine respiratory disease complex, BRDC）的主要病原之一，牛呼吸道合胞体病毒与支原体、曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、传染性鼻

气管炎病毒、牛副流感病毒等呼吸道病原混合感染，显著提高了致死率，给养牛业带来巨大损失。

本项目组自 2013 年以来一直开展牛呼吸道合胞体病的研究，除在吉林地区持续开展病原学和血清学流行性病学调查外，还先后建立了 RT-PCR、荧光 RT-PCR、间接 ELISA 等实验室诊断方法，并在实际应用中取得了良好的效果。针对我国养牛业中牛呼吸道合胞体病毒（BRSV）感染率高、流行范围广、经济损失严重的防控需求，根据全国动物卫生标准化技术委员会《关于征集 2023 年度动物卫生标准制修订项目建议的通知》，本项目组（吉林省农业科学院动物卫生创新团队）牵头吉林省畜牧兽医科学研究所、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等单位共同起草并申报了农业行业标准《牛呼吸道合胞体病诊断技术》，旨在填补我国没有该病相关诊断标准的空白，以期对该病的临床诊断和实验室诊断提供技术支撑，提高防控技术手段有效降低该病对养牛业造成的经济损失。

（三）起草单位和主要起草人及其所做的工作

本文件的主要起草单位为吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心)、吉林省畜牧兽医科学研究所、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等，起草过程中得到了吉林农业大学、河南省农畜水产品检验技术研究院、长春市畜牧总站、长春科技学院等科研和技术应用单位的支持。文件起草的主要成员及其完成工作如下：

表 1. 标准起草小组人员构成表

姓名	性别	职称	主要职责	工作单位
肖 丹	女	副研究员	主持人，负责全面工作	吉林省农业科学院
王 楠	男	副研究员	病原分离与鉴定	吉林省畜牧兽医科学研究所
魏 天	女	助理研究员	RT-PCR 引物设计及方法优化	吉林省农业科学院
王思月	女	助理研究员	间接ELISA检测方法建立与优化	吉林省农业科学院
杨艳玲	女	研究员	RT-PCR 方法验证	中国农业科学院特产研究所
解殿玉	男	研究员	临床样本采集	长春市畜牧总站
邵洪泽	男	研究员	荧光 RT-PCR 引物设计	吉林省畜牧兽医科学研究所
曹利利	女	研究员	荧光 RT-PCR 方法验证	吉林省畜牧兽医科学研究所
于钦磊	男	副研究员	临床样本采集	吉林省动物疫病预防控制中心

王成宇	男	助理研究员	RT-PCR 方法优化	吉林省农业科学院
郭衍冰	女	研究实习员	间接 ELISA 检测方法验证	吉林省畜牧兽医科学研究所
王 开	男	副教授	重组蛋白的表达与纯化	吉林农业大学
朱奕霏	女	研究实习员	临床样本采集	吉林省动物疫病预防控制中心
贾文博	女	研究实习员	重复性试验验证	吉林省动物疫病预防控制中心
孙兴忠	男	研究实习员	敏感性试验验证	吉林省畜牧兽医科学研究所
杨金鑫	男	研究实习员	特异性试验验证	吉林省动物疫病预防控制中心
元雪湲	女	副研究员	文本编辑	河南省农畜水产品检验技术研究院
周笑世	女	研究实习员	文本编辑	吉林省畜牧兽医科学研究所
黄海楠	女	副教授	文本编辑	长春科技学院
鞠安琪	女	助理研究员	验证样品及试剂制备	吉林省农业科学院
谭成成	女	研究实习员	反馈意见收集与整理	吉林省农业科学院

(四) 主要工作过程

要按标准各阶段为单位分别编写。列出各阶段的关键内容。征求意见、审查阶段的主要内容要详细给出。征求意见要对征求对象的代表性、回复情况、意见处理情况进行总结说明。

1. 起草阶段

2023 年初，根据标准申报通知要求，项目组基于前期对牛呼吸道合胞体病的研究基础，对国内外文献和专利材料进行梳理，在 2022 年吉林省地方标准《牛呼吸道合胞体病病原学诊断技术》的基础上，优化和完善间接 ELISA 检测方法，并持续开展了 BRSV 的血清流行病学调查工作。经对各类诊断方法的综合比较，确定了标准的编制工作方案。其中，涉及的检测技术包括针对病原的病毒分离方法、RT-PCR 和荧光 PCR 核酸检测方法，针对抗体的间接 ELISA 检测方法。上述工作完成后，标准起草工作组开始本文件的起草工作，于 2024 年 3 月完成《牛呼吸道合胞体病诊断技术》行业标准讨论稿。之后，项目组组织成员对《牛呼吸道合胞体病诊断技术》标准草案进行了修改，形成了《牛呼吸道合胞体病诊断技术》行业标准征求意见稿。

2. 征求意见阶段

2024 年 4 月，起草组将《牛呼吸道合胞体病诊断技术》行业标准征求意见稿发送至中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、兰州兽医研究所、上海兽医研究所

等国内权威的兽医科研机构，以及吉林大学、吉林农业大学、延边大学等省内具有兽医专业的院校，上海市动物疫病预防控制中心、吉林省动物疫病预防控制中心、长春海关、延边州动物疫病预防控制中心等检验检测机构，吉林省畜牧总站、长春市畜牧总站、吉林市农业科学院、吉林省标准研究院等技术推广机构，以及吉林省易安生物技术有限公司、吉林省睿德司诺生物科技有限公司等相关企业征求意见。共发出征求意见 20 份，共收回征求意见 20 份，总计 83 条，对本标准的内容无重大异议和分歧。标准起草小组对收回的征求意见进行认真梳理，完全采纳 67 条，未采纳 5 条，部分采纳 11 条。未采纳的主要原因：一是采纳了其他专家建议；二是提出的建议不符标准编制要求；三是意见内容没有依据。在征求意见过程中，针对一些不同意见，标准起草工作组专门进行了实地调研，并组织省内大专院校、科研院所及检测机构领域专家召开预审会，对标准内容进行了认真修改，最终形成《牛呼吸道合胞体病诊断技术》行业标准送审稿。

这里是否写上召开省内专家的预审情况

3. 审查阶段

2025年6月26日，全国动物卫生标准化技术委员会以飞书视频会议形式组织召开预审查会议，共5位专家参会对行业标准《牛呼吸道合胞体病诊断技术》送审稿的标准文本和编制说明进行了审查，会上专家提出了27条修改意见，项目组对意见进行了汇总处理详见《技术审查意见汇总处理表》。依照专家的意见，对标准文本和编制说明进行了认真的修改，并最终形成了送审稿。

~~4. 报批阶段（此次不写本部分）~~

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

（一）标准的编写原则

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》、编写征求意见稿。文件编制过程中遵循的基本原则为：保证标准的适用性；保持标准的先进性；注意标准的统一性和规范性；注意标准的经济效益和社会效益。

在标准的适用性方面，本文件针对牛呼吸道合胞体病毒这一引起牛呼吸道疾病综合征重要病原之一，通过病原学方法和血清学方法等两类主流检测技术用于

该病的诊断，为动物疫病预防控制机构、海关、第三方检测机构，开展流行病学调查、监测、检疫等工作提供技术支撑。在标准的先进性方面，本文件综合参考了国内外牛呼吸道合胞体检测技术的发展，及我国实验室检测技术的现状，所列出的病毒分离、RT-PCR、荧光 RT-PCR、间接 ELISA 等方法均为目前实验室诊断的主流技术，技术成熟且广泛，易被各类实验室掌握，能够快速有效的诊断牛呼吸道合胞体病，对控制该病的传播和流行，降低其对养牛业的经济影响具有重要意义。在标准的统一性和规范性方面，本文件技术部分按照临床诊断、样品采集、运输和保存、病毒分离、RT-PCR、荧光 RT-PCR、间接 ELISA 顺序进行排列，与其他动物疫病诊断类标准的格式相统一，文本结构、文体、术语、形式严格按照标准 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》规定，操作步骤详细，可在各类实验室完成。

（二）提出本标准主要内容的依据

本文件在前期工作积累的基础上，结合国内外最新的科研成果和不同机构的诊断和检测能力，最终确定了病毒分离、RT-PCR、荧光 RT-PCR、间接 ELISA 等主流方法作为本标准的技术内容，并参考了《WOAH Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals》2023 年版 2.2 中的诊断试验验证方法，对相关方法进行了验证。结果显示，本文件所涉及的相关方法能够满足不同级别和不同层次的实验室开展各种诊断和检测等目的的要求，具有广泛的适用性、实用性和可操作性。

1、标准总体内容概述

本制定标准由标准正文与附录组成。标准正文共 11 个部分，分别为范围、规范性引用文件、术语与定义、缩略语、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、间接酶联免疫吸附试验、综合判定。

（1）适应范围：疾病诊断方法适用于牛呼吸道合胞体病的诊断、流行病学调查、监测以及检疫等。

（2）临床诊断：简单描述了发病牛的流行病学、临床症状及剖检器官组织的病理变化。

(3) 样品的采集、运输和保存：规定了棉拭子、血液等不同类型样品采集、样品的运输与保存。

(4) 病毒分离培养：规定了单层细胞制备、样品处理、细胞处理及接毒、样品接种数量及对照设置的操作步骤，给出了结果判定。

(5) RT-PCR：规定了核酸提取、反应体系配制、扩增程序、电泳等操作步骤，给出了结果判定的方法。

(6) 荧光 RT-PCR：规定了核酸提取、反应体系配制、扩增程序等操作步骤，给出了结果判定的方法。

(7) 间接酶联免疫吸附试验：规定了酶标板的包被、样品孵育与洗涤、二抗孵育与洗涤、显色、终止、读数与计算的操作步骤，给出了结果判定的方法。

(8) 综合判定：给出了符合临床症状和不符合临床症状的待检动物以及待检样品确诊判定的综合判定方法。

2、临床症状的主要内容及依据

牛呼吸道合胞体病毒是引起牛呼吸道疾病综合征主要病原之一，其临床症状无明显特征，且常与其他呼吸道病原混合感染，通过临床诊断进行确诊较为困难。因此，本标准规定在临床诊断中只能确认患畜可疑，需要通过进一步的实验室诊断才能进行确诊。本标准还描述了该病的易感动物、传染源、传播途径等流行特点，供检测人员参考。

3、样品的采集、保存和运输的主要内容及依据

根据本病的临床症状，感染的牛主要是呼吸道病变为主，呼吸道病变主要表现为气管黏膜充血、局限性肺炎等。此外，因该病导致患畜死亡的病例极少，因此，通常情况下主要针对活动物进行采样。根据其症状确定采样的部位主要分为三类：一类是以鼻拭子为代表的呼吸道样品，可用于分子生物学方法检测；第二类是以肺脏为代表的组织样品，其含毒量较高，可用于病毒分离和分子生物学方法检测；第三类为血清样品，主要用于抗体检测。在样品运输和保存方面，引用了 NY/T 541《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》，对不同样品的采集

与处理以及运输和保存方式进行了详细的规范。

4、病毒分离的主要内容及依据

病毒分离鉴定是病毒检测和疾病诊断的“金标准”，但是很多呼吸道病原体很难从肺脏分离出来。BRSV特殊的病毒粒子结构和寄生部位以及复杂的培养环境使其分离培养比较困难。病毒粒子能否在样本中存活，对于病毒分离至关重要，因此本标准建议采集新鲜样本进行病毒分离。大量文献表明，使用MDBK细胞可以分离到BRSV。本项目组近年来也通过MDBK成功分离到BRSV，其操作步骤与经典的细胞培养方法无明显差异。

5、RT-PCR 检测方法的主要内容及依据

RT-PCR 是一种成熟简便、灵敏、快速的分子生物学技术，本标准 RT-PCR 用于鉴定临床待检样品（鼻拭子、气管或肺组织）或细胞培养上清中的 BRSV 核酸来达到快速诊断的目的。所选用的引物位于 N 蛋白核苷酸序列，是 BRSV 中最为保守的序列。经 BLAST 比对 NCBI 数据库中所有登录的 BRSV 的核苷酸序列证实，上下游引物序列均处于保守区。

6、荧光 RT-PCR 检测方法的主要内容及依据

荧光RT-PCR作为一种简便、灵敏、快速的分子生物学技术广泛应用于疫病病原体的检测中，本标准中的荧光RT-PCR用于鉴定临床待检样品（鼻拭子、气管或肺组织）或细胞培养上清中的BRSV核酸来达到快速诊断的目的。本标准编制过程中，首先参考文献报道的引物，并结合分析比对了NCBI数据库中所有登录的BRSV核苷酸序列。研究发现BRSV基因序列中的N基因保守性较高，可以用做病毒核酸检测的目标基因，因此本标准选择N基因作为检测靶标基因。根据比对分析结果，基于N基因的保守区域设计了一套引物探针，经BLAST比对NCBI数据库中所有登录的BRSV的核苷酸序列证实，上下游引物及探针序列均处于保守区。

7、间接酶联免疫吸附试验的主要内容及依据

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。N 蛋白相对保守，是常用诊断靶标之一。此外，多篇文献证明了 N 蛋白作为间接 ELISA 方法特异性强，敏感性高，重复性好，可用于 BRSV 感染的血清学调查和诊断，并可以替代中和试验检测 BRSV 免疫后抗体水平。

8、综合判定的确定依据

BRSV 感染引起的临床症状并不明显，单凭临床症状难以确诊。病毒分离培养出现 CPE 时，由于其他病毒及细菌病的混合感染，且 MDBK 细胞也并非仅对 BRSV 敏感，无法判定 CPE 现象就是由 BRSV 引起的。当出现 CPE 时也只能判定为可疑。因此，临床症状和病毒分离均不能对该病做出最终的判定，只有 RT-PCR、荧光 RT-PCR 方法、间接酶联免疫吸附试验能够对待检样品进行判定，同时考虑到待检样品可能会来源于活动物、动物或死亡动物，所以，本标准在最后的综合判定中做出了如下规定：

（1）经临床诊断判定为疑似 BRSV 感染病例，再经 RT-PCR 或荧光 RT-PCR 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。

（2）无明显临床症状，但经 RT-PCR 或荧光 RT-PCR 方法检测判定为阳性的，可判为 BRSV 感染病例。

（3）无明显临床症状，但经 RT-PCR 或荧光 RT-PCR 方法检测判定为阴性的，且经间接 ELISA 方法检测判定为阳性的，可判为 BRSV 感染康复病例。

（三）新旧标准对比（适用于修订标准的情况）

无。

三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

（一）主要试验或验证的分析

1.RT-PCR

(1) 引物设计

使用 Geneious prime 2.2 软件针对牛呼吸道合胞体全基因序列 (NC_001989) 的 N 基因为目的片段, 设计扩增全长为 660 bp 的特异性上下游引物。

上游引物 (F) 5'-TGCTATGTGTTGCTGCTTTGGTTA-3'

下游引物 (R) 5'-TCTTGATTGCCTCTAATTCCTCTGTAGT-3'

(2) RNA 提取

在样品制备区将待检样品、阳性对照、阴性对照按所选取的病毒 RNA 提取试剂盒说明书进行提取。提取的 RNA 应迅速进行 RT-PCR 扩增, 或置于 -20℃ 冰箱备用。

(3) RT-PCR 扩增

在试剂准备区打开和配制试剂, 配制完毕后应及时将剩余试剂放回贮存区域。取 0.2 mL PCR 反应管, 在冰浴条件下配制 50 μ L 反应体系, 按照表 1 依次加入以下成分, 加完后盖紧盖子并做好标记。

表 1. RT-PCR 反应体系组成

次序	组分	反应体系
1	1-Step RT-PCR Master Mix	25.0 μ L
2	上游引物 (10 μ mol/L)	2.5 μ L
3	下游引物 (10 μ mol/L)	2.5 μ L
4	模板 RNA	5.0 μ L
6	无核酸酶水	15.0 μ L

(4) RT-PCR 反应条件优化

在核酸扩增区将 PCR 管置 PCR 仪上, 通过对两对引物在反应体系中的使用浓度及反应条件的摸索, 确定了 PCR 反应体系为 50 μ L, 引物的浓度均为 10 μ mol/L。扩增反应条件为: 50℃ 反转录 10 min; 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。在此条件下对包括上海生工、诺维赞、凯杰、赛默飞世尔等多个市售商品化一步法 RT-PCR 预混液进行了试验室验证, 结果表明在 60℃ 退火温度下, 按照各市售试剂盒操作说明, 虽然反转录、预变性等时间和温度条件有所变化, 但均能得到有效结果。

(5) 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

在产物分析区将适量 50×TAE 稀释成 1×TAE 溶液。用 1×TAE 溶液配制 1% 琼脂糖凝胶溶液 100 mL，加热使琼脂糖溶解，冷却至 50-60 °C 左右，加入无毒核酸染料溶液 10 μL，充分混匀后倒凝胶平板。将冷却的凝胶平板放入水平电泳槽，加入 1×TAE 电泳缓冲液刚好没过胶面。取 10 μL RT-PCR 产物，加 1 μL 10×上样缓冲液混匀后点样，同时设 DNA Marker 分子量标准做对照。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，用凝胶成像分析系统观察和记录检测结果。

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 660 bp 目的条带（如图 1 所示），满足以上两个条件，实验结果成立。

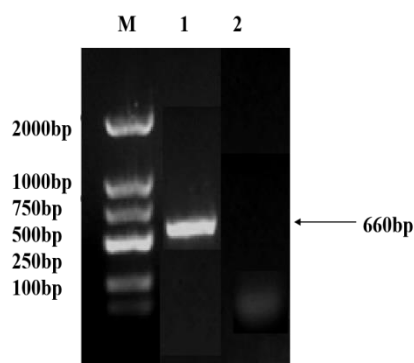


图 1 牛呼吸道合胞体病毒 RT-PCR 检测结果

M: DNA 分子量标准 (DL2000 Marker)；1: 阳性对照；2: 阴性对照

(6) 特异性试验

采用本方法对牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)、牛副流感病毒 3 型 (BPIV3)、牛支原体、溶血曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌核酸进行检测，结果显示均无交叉反应，表明所建立方法具有良好的特异性，可用于牛呼吸道合胞病毒 (BRSV) 的特异性检测。

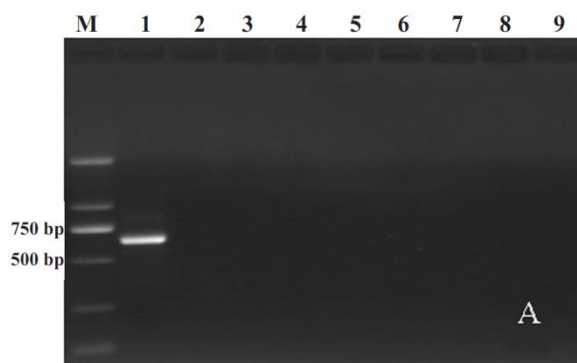


图2 牛呼吸道合胞体病毒 PCR 特异性研究

M: DL 2000; 1: BRSV; 2: BVDV; 3: IBPV; 4: BPIV3; 5: 牛支原体;
6:溶血曼杆菌;7:多杀巴氏杆菌; 8: 阴性对照

(7) 敏感性试验

采用 25 μ L 的 PCR 反应体系和反应程序，样品分别为 3.9×10^6 、 3.9×10^5 、 3.9×10^4 、 3.9×10^3 、 3.9×10^2 copies/ μ L 的 pFastBac-HTB 阳性质粒。结果见图 3，最小检出量为 3.9×10^3 copies/ μ L。

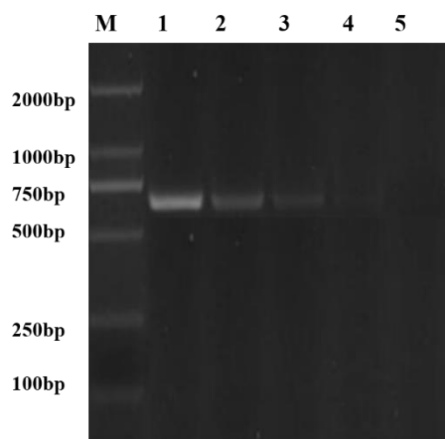


图3 牛呼吸道合胞体病毒 PCR 敏感性研究

M: DL 2000; 1-5: $10^{-2} \sim 10^{-6}$ 稀释的模板

2. 牛呼吸道合胞体病毒荧光 RT-PCR 检测方法的建立和应用

(1) 引物和探针

使用 Geneious prime 2.2 软件针对牛呼吸道合胞体全基因序列(NC_001989)的 N 基因设计引物和探针。荧光定量 RT-PCR 检测引物和探针序列见表 3。

表3 荧光定量 RT-PCR 检测用引物、探针名称和序列

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

(2) 荧光 RT-PCR

在试剂准备区打开和配制试剂，配制完毕后应及时将剩余试剂放回贮存区域。取 0.2 mL 实时荧光 PCR 反应管，在冰浴条件下配制 25 μ L 反应体系，按照表 4 依次加入以下成分，加完后盖紧盖子。

表 4 反应体系

体系成分	用量(μ L)
1-StepRT-qPCR Master Mix	12.5
上游引物 F (10 μ mol/L)	1
下游引物 R (10 μ mol/L)	1
探针 P (10 μ mol/L)	0.5
无核酸酶水	5
模板 RNA	5
总量	25

在核酸扩增区将 PCR 实时荧光 PCR 管置荧光 PCR 仪上按如下程序扩增：50℃反转录 10 min；95℃预变性 10 min；95℃变性 15 s，60℃退火 30 s，共 40 个循环，荧光收集设置在 60℃ 进行。在此条件下对包括上海生工、诺维赞、凯杰、赛默飞世尔等多个市售商品化一步法 qRT-PCR 预混液进行了试验室验证，结果表明在 60℃退火温度下，按照各市售试剂盒操作说明，虽然反转录、预变性等时间和温度条件有所变化，但均能得到有效结果。

试验检测结束后，根据生成的荧光曲线和 Ct 值直接读取检测结果。Ct 值为每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。阴性对照和空白对照无 Ct 值并且无典型扩增曲线。阳性对照的 Ct 值应 $\leq$ 25.0，并出现特定的扩增曲线。如阴性对照和阳性条件不满足以上所有条件，则实验视为无效。

(3) 特异性试验

采用本方法对牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)、牛副流感病毒 3 型 (BPIV3)、牛支原体、溶血曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌核酸进行检测，结果显示均无交叉反应，表明所建立方法具有良好的特异性，可用于牛呼吸道合胞病毒 (BRSV) 的特异性检测。

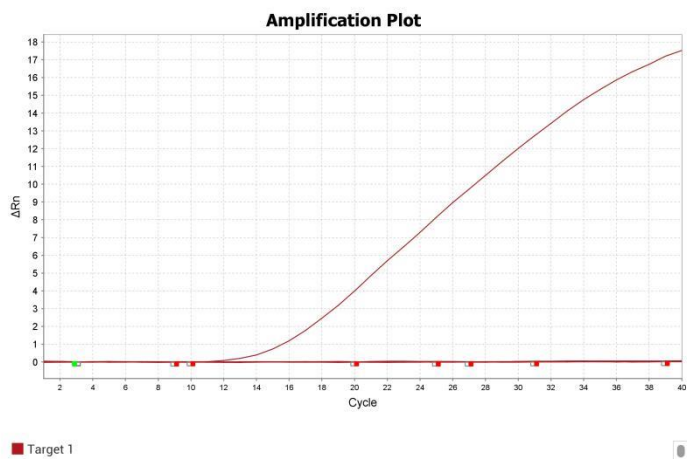


图 4 与牛常见病原特异性鉴定

(4) 敏感性试验

采用 25 μL 的 PCR 反应体系和反应程序，样品分别为 3.9×10^6 、 3.9×10^5 、 3.9×10^4 、 3.9×10^3 、 3.9×10^2 、 3.9×10^1 copies/μL 的 pFastBac-HTB 阳性质粒。结果见图 3，最小检出量为 3.9×10^1 copies/μL。

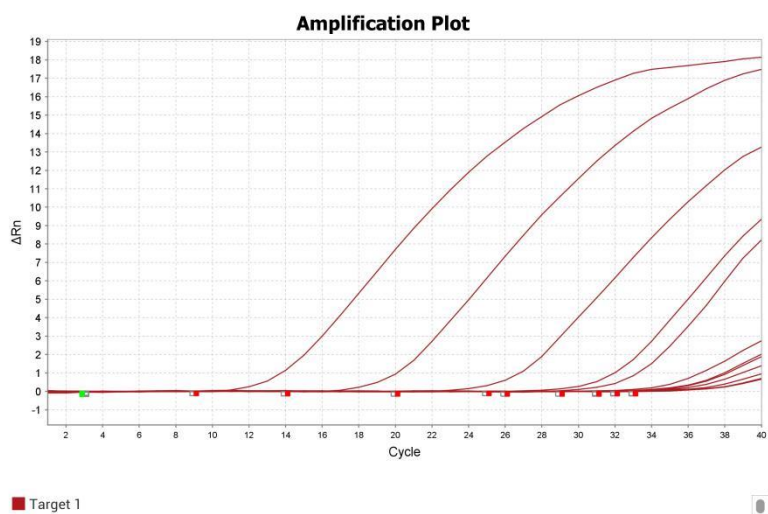


图 5 牛呼吸道合胞体病毒荧光定量 PCR 方法敏感性研究

(5) 应用试验

本研究采用本标准小组保存的 2022 年至 2024 年全省送检的 265 份疑似牛呼吸道合胞病毒（BRSV）鼻拭子样本，进行核酸检测。结果显示：RT-PCR 检测阳性样本 86 份，荧光 RT-PCR 检测阳性样本 89 份。同时应用上海生工、诺维赞、凯杰、赛默飞世尔等生产厂家的一步法 RT-PCR 和 qRT-PCR 预混液进行验证，结果一致。

3. 间接 ELISA 抗体检测

(1) 包被抗原制备

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后转化至大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞中, 涂布于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素、7 $\mu\text{g/mL}$ 庆大霉素、10 $\mu\text{g/mL}$ 四环素、100 $\mu\text{g/mL}$ X-gal 和 40 $\mu\text{g/mL}$ IPTG 的 LB 培养基上, 倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中过夜培养。采用蓝白斑方法进行三次重复筛选, 得到的阳性菌株进行 PCR 及序列分析鉴定为阳性重组载体。

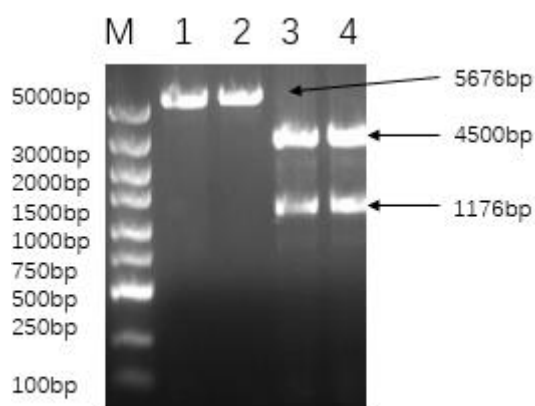


图 4 载体 pFastBac-HTB-BRSV-N 的单双酶切鉴定

Fig. 1-5 Single and double enzyme digestion of vector pFastBac-HTB-BRSV-N

M:DNA marker 5000bp; 1、2: Bamh I 单酶切载体 pFastBac-HTB-BRSV-N;

3、4: BamH I 和 Xho I 双酶切载体 pFastBac-HTB-BRSV-N

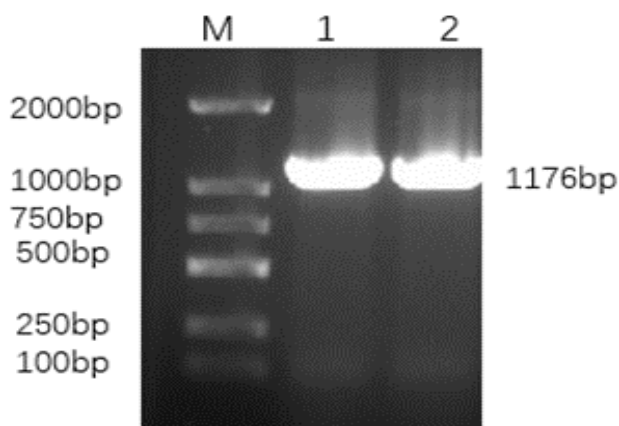


图 5 载体 pFastBac-HTB-BRSV-N 的 PCR 鉴定

M:DNA marker 2000bp; 1、2: 质粒 PCR 产物

②重组 N 蛋白转染 Sf9 细胞

将阳性重组载体转染到细胞培养瓶中进行扩大培养，于转染后 48-72 h 收获细胞，以 BRSV 阳性血清为一抗，采用 Western blotting 进行重组 N 蛋白表达验证。进一步采用 Ni 柱法进行纯化并测定洗脱液中蛋白浓度，分装后 -80℃ 保存，作为间接 ELISA 检测抗原。

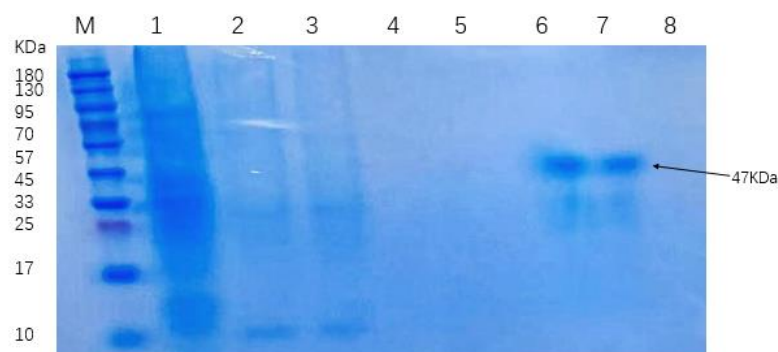


图 6 重组蛋白的纯化鉴定

M: Protein Marker; 1: 上清; 2: 穿透液

3-7: 依次为 100、200、300、400、500mM 咪唑浓度洗脱液; 8: 洗涤液

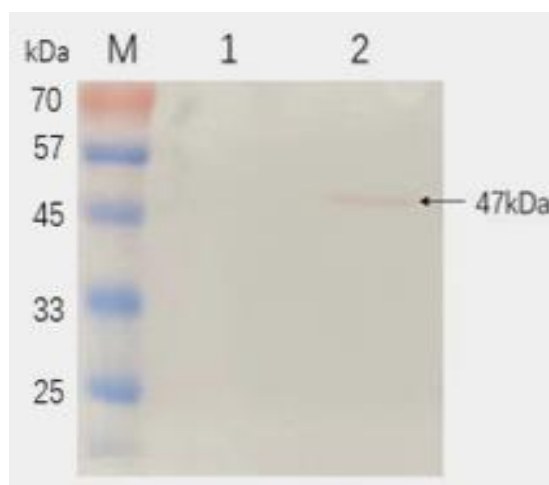


图 7 纯化蛋白与 BRSV 阳/阴性血清 Western-blot 鉴定

M: Protein Marker; 1: BRSV 阴性血清; 2: BRSV 阳性血清

(2) 方法建立与优化

利用纯化的重组 BRSV N 蛋白作为包被抗原，BRSV 阳性血清作为一抗，建立间接 ELISA 诊断方法。经棋盘法优化，以 P/N 值最大的条件确定间接 ELISA

的最佳反应条件：抗原包被浓度为 8 µg/mL、4 °C 过夜包被、3% BSA 封闭 1 h，加入待检血清（1: 50 稀释）、反应 2 h、HRP 标记二抗稀释 2500 倍、反应 1h、TMB 显色 10 min，加入终止液。

（2）临界值确定

基于绝大多数健康个体/阴性样本的 OD 值服从正态分布（或近似）的假设。选择 80 份经过 BIO-X 公司牛呼吸道合胞体病毒 ELISA 检测试剂盒鉴定为抗体阴性的牛血清样品，以本研究建立的 N 蛋白间接 ELISA 方法进行检测。读出每份阴性血清的 OD₄₅₀ 值，并计算出它们的平均值（ $\bar{x}$ ）和标准差（SD）。按如下公式计算临界值：

$$\text{设定临界值 (Cut-off)} = \text{MeanNC} + K \times \text{SDNC}$$

式中：

Cut-off——临界值，判定结果的阈值

MeanNC——阴性对照组的均值

SDNC——阴性对照组的标准差

K——倍数系数，根据置信度需求设定的常数。

通过已知样本（阳性和阴性）进行验证来确定 K 值的最优值为 3。

根据统计学原则，当被检样品的 OD₄₅₀ 值大于 80 份阴性血清 OD₄₅₀ 值的平均值（ $\bar{x}$ ）+3 倍标准差，（SD）则判定被检样品为阳性；当被检样品的 OD₄₅₀ 值小于 80 份阴性血清 OD₄₅₀ 值的平均值（ $\bar{x}$ ）+2 倍标准差（SD）时则判定为阴性，当被检样品的 OD₄₅₀ 值介于二者之间时判为可疑。

S/P 的计算公式如下：

$$S/P = (\text{OD}_{450-S} - \text{OD}_{450-NC}) / (\text{OD}_{450-PC} - \text{OD}_{450-NC})$$

公式中：

OD_{450-S}——待检血清样品在450 nm波长处的OD值；

OD_{450-PC}——阳性对照血清在450 nm波长处的平均OD值；

OD_{450-NC}——阴性对照血清在450 nm波长处的平均OD值。

经过对 80 份阴性血清进行 2 次重复检测，计算 2 次重复检测的平均 OD 值后，测得阳性对照平均 OD 值=1.8775，阴性对照平均 OD 值=0.26。根据 S/P 的计算公式计算每个样品的 S/P 值，计算得到阴性血清样品的平均 S/P=0.1603，标

准差 $SD=0.1102$ 。阳性临界值 $=S/P+3SD=0.50$ ，阴性临界值 $=S/P+2SD=0.38$ 。从而得到判定标准为：待检血清 $S/P \geq 0.50$ ，判定为 BRSV 抗体阳性； $S/P \leq 0.38$ ，判定为 BRSV 抗体阴性； $0.38 < S/P < 0.50$ ，判定为可疑。可疑样品应重新检测，重新检测结果 $S/P < 0.50$ ，判定为 BRSV 抗体阴性。

(3) 特异性

根据上述优化的间接 ELISA 反应条件，按照最佳的反应条件进行实验，对 BRSV 阳性血清、BPIV-3（牛副流感病毒 3 型）阳性血清、IBR（牛传染性鼻气管炎病毒）阳性血清、BVDV（牛病毒性腹泻病毒）阳性血清、BRV（牛轮状病毒）阳性血清、BCV（牛冠状病毒）阳性血清和 BRSV 阴性血清进行检测，每个血清设置 3 个复孔，检测器其平均 OD_{450} ，检测结果如表 5 所示。除 BRSV 阳性血清的 OD_{450} 大于临界值 0.3，其余的血清都小于 0.3，认为其为阴性。这表明建立的间接 ELISA 的方法具有良好的特异性。

表 5 特异性检测结果

血清	BRSV(+)	BPIV-3(+)	IBR(+)	BVDV(+)	BRV(+)	BCV(+)	BRSV(-)
OD_{450}	2.257	0.112	0.059	0.076	0.162	0.094	0.098
检测结果	阳	阴	阴	阴	阴	阴	阴

(4) 敏感性

根据上述优化的间接 ELISA 反应条件，按照最佳的反应条件进行实验，将 BRSV 阳性血清进行倍数稀释，稀释倍数分别为 10、20、40、80、160、320、640、1280、2560、5120、10240 倍。用优化好的间接 ELISA 方法进行检测，根据检测结果确定阳性血清的最高稀释倍数，检测结果如下表 6 所示，该间接 ELISA 方法最低可以检测到的稀释倍数为 1280，表明该方法具有良好的敏感性。

表 6 敏感性检测结果

阳性血清稀释倍数											
	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
OD_{450}	2.548	2.326	2.281	2.239	1.867	1.285	0.696	0.392	0.307	0.154	0.118
检测结果	阳	阳	阳	阳	阳	阳	阳	阳	可疑	阴	阴

(5) 重复性

根据上述优化的间接 ELISA 反应条件，按照最佳的反应条件进行批间和批

内重复性检测。批内重复性检测实验操作步骤：针对多次验证为阳性和阴性血清以同一批包被的 ELISA 板，间隔一周后进行检测；批间重复性检测实验操作步骤：取不同批次制备的 3 块已完成包被的酶标板，分别在 3 块酶标板内检测 BRSV 阳性血清和 BRSV 阴性血清，每份血清样品重复 3 孔。检测结果如表 7 和表 8 所示，通过其平均值和标准差，计算得到其变异系数小于 10%。

表 7 批内重复性测试结果

血清	复孔编号			平均值	标准差	变异系数
	1	2	3			
阳 1	2.314	2.178	2.027	2.173	0.117	5.394%
阳 2	1.804	1.967	1.622	1.798	0.141	7.839%
阳 3	1.536	1.492	1.663	1.564	0.072	4.637%
阴 1	0.117	0.148	0.133	0.133	0.013	9.541%
阴 2	0.123	0.119	0.103	0.115	0.009	7.514%
阴 3	0.092	0.116	0.102	0.103	0.010	9.526%

表 8 批间重复性测试结果

血清	复孔编号			平均值	标准差	变异系数
	1	2	3			
阳 1	1.896	1.651	1.923	1.823	0.122	6.711%
阳 2	2.125	2.317	1.921	2.121	0.162	7.623%
阳 3	1.746	1.822	1.457	1.675	0.157	9.388%
阴 1	0.142	0.134	0.165	0.147	0.013	8.939%
阴 2	0.123	0.139	0.133	0.132	0.007	5.012%
阴 3	0.169	0.141	0.159	0.156	0.012	7.411%

(6) 与商品化试剂盒方法的比较

目前市售的牛呼吸道合胞体病抗体检测试剂盒主要 BIO-X 和 INGENASA 的 BRSV 抗体检测试剂盒。为了比较本标准所建立的 ELIS 方法与市售试剂盒的检测性能，课题组对吉林省畜牧兽医科学研究院保存的 200 份疑似牛呼吸道合胞体病临床血清样品进行检测，检测结果如表 9 所示。本研究建立的间接 ELISA 检测方法阳性样本检出 63 例，BIO-X 试剂盒的阳性样本检出 69 例，INGENASA 试剂盒的阳性样本检出 64 例，其中三者交叉共同阳性的为 62 例。本研究建立的间接 ELISA 检测方法和商品化试剂盒的检测阳性结果符合率为 89.86%-96.88%，

阴性符合率为 100%-96.32%。说明本方法与 INGENASA 试剂盒阴阳性符合率均较高（PPA=96.88%，NPA=96.32%），说明两者一致性较好，差异可能来自检测阈值或灰区样本处理方式，而与 BIO-X 试剂盒阴性判定完全一致（NPA=100%），但阳性检出较少（PPA=89.86%），可能表明 BIO-X 灵敏度更高（假阳性略多）或本研究方法特异性更强（假阳性略低）。因此，本研究建立的间接 ELISA 检测方法可以用于临床中 BRSV 抗体的初步筛查。

表 9 不同检测方法结果比较

建立的 ELISA 方法	BIO-X 试剂盒		INGENASA 试剂盒	
	阳性	阴性	阳性	阴性
	63	131	62	138
符合率	89.86%	100%	96.88%	96.32%

（二）技术经济论证

本标准中采用的牛呼吸道合胞体病（BRSV）临床诊断、RT-PCR 与荧光 RT-PCR 病原体核酸检测方法、抗体间接 ELISA 检测方法，具有特异性好、敏感性高、操作简单、结果准确的特点。其中，荧光 RT-PCR 检测限达 10^2 拷贝/ μ L，较常规 RT-PCR 灵敏度提升 10 倍；间接 ELISA 特异性 $\geq 98\%$ ，经 BVDV、IBRV 等 6 种病原验证无交叉。

本标准集成了临床诊断、病原核酸检测（RT-PCR、荧光 RT-PCR）及血清学检测（间接 ELISA）技术，为牛呼吸道合胞体病的诊断提供了技术标准。通过明确规范样本采集、核酸提取、引物/探针序列、反应体系及结果判读标准，可在县级兽医实验室基础设备条件下实施检测。配套的核心引物/探针及间接 ELISA 抗原可实现本土化生产，检测成本较国外进口试剂可降低 40%。该方法体系的建立实现了牛呼吸道合胞体病“早检早控”目标，可将疫病防控响应时间缩短至 48 小时内，显著提升早期感染、隐性携带及急性病例的快速诊断与抗体监测能力。本文件的使用推广，可为我国养牛业在防控牛呼吸道合胞体病方面提供有效的诊断方法，降低本病导致的经济损失，提高养牛业的经济效益。

（三）预期的经济效益

项目组采用分项量化法对《牛呼吸道合胞体病诊断技术》的预期经济效益进行了分析。案例分析表明：对于一个存栏量为 1000 头牛的养殖场，应用本标准

后，年均可直接节省养殖成本约 20.5 万元，约占养殖总成本的 4%-6%（详见表 10）。这一显著的效益数据，有力证明了该诊断技术标准的推广价值。通过规范、统一的诊断方法和判定标准，能显著提高牛群 BRSV 感染的早期检出率与准确性，避免因误诊、漏诊或诊断延迟导致的盲目用药、无效治疗及疫情扩散，从而大幅减少兽药开支、病死淘汰损失及生产效率下降等隐性成本。标准的推广将助力构建更加科学、高效的疫病防控体系，将成为推动畜牧业降本增效和高质量发展的重要技术抓手。

表 10 预期经济效果分析

项目	传统模式	本标准技术	单场年节约成本
诊断成本	进口试剂（150 元/样本）	自主检测（80 元/样本）	0.7 万元/100 样本
疫情处理	爆发后死亡+消毒（约 10 万元/次）	早期诊断/隔离（降温 80%）	10 万元/避免一次

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国内同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品有关数据对比情况

国内外尚无针对牛呼吸道合胞体病的分子诊断标准和抗体检测标准，本文件系首次制定 RT-PCR 与实时荧光 RT-PCR 分子方法检测牛呼吸道合胞体病原核酸的标准。同时，也是首次制定间接 ELISA 方法检测牛呼吸道合胞体抗体水平的标准。

五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

主要说明标准与相应法律法规和强制性标准之间的衔接、协调情况。列出与标准密切相关的法律法规、强制性标准的名称和编号。

《牛呼吸道合胞体病诊断技术》的制定遵循 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》、《中华人民共和国动物防疫法》、GB/T18088-2000《出入境动物检疫采样》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》、《动物检疫管理办法》、《农业部国家（行业）标准的计划编制、制定和审查管理办法》等相关法律、法规规定，是编写本文件的主要法律依据。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

说明各方面专家对标准主要内容（如参数、指标、试验方法）有哪些重大分歧，以及标准起草单位在修改完善标准过程中，对专家分歧意见的处理主要依据

和处理结果。对同一方法或问题有不同解决方案的应讨论出最佳方案。

无。

七、标准性质（强制性，推荐性）的建议，特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

严格按照立项下达的性质编写。无需增加解释文字。建议将本修订标准批准为推荐性标准。

本文件为推荐性标准。

八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）

本文件发布后，为有效贯彻实施，建议农业部相关部门确定培训对象，委托标准起草单位举办全国标准技术培训班，对有关技术人员进行相关技术强化操作培训，培训效果要达到：懂原理、操作熟练、判定准确，回单位能够独立工作。

九、废止现行有关标准的建议；

无。

十、其他应予说明的事项。

主要包括标准项目任务完成中有关标准名称变更、对有争议问题、遗留问题处理、尚需探讨的问题和制定或修订配套标准的说明等。

无。