

《牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术》

送审稿编制说明

一、工作简况

(一) 任务来源

本任务由全国动物卫生标准化技术委员会于 2014 年下达计划，任务计划编号为 20140410-T-326。本标准系对 GB/T 18637-2002 《牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术》的修订，参照近年来发布的其它相关诊断技术国家标准和初审专家意见增加了“临床诊断”标准和“综合判定”的内容，并在诊断技术方法上增加了“实时荧光 RT-PCR 检测方法”和“BVDV 抗体间接 ELISA 试验”。

(二) 背景介绍

牛病毒性腹泻(Bovine viral diarrhea, BVD)是由牛病毒性腹泻病毒(BVDV)引起的，是世界各国奶牛和肉牛群的常发病。本病毒于 1946 年首次在美国纽约州发现，1959 年 Gillespie 和 Baker 对美国两株病毒(纽约株和印第安纳株)进行鉴定后认定为同一个型，1960 年 Gillespie 等又分离到 Oregon 株，1971 年美国兽医协会将其统一命名为牛病毒性腹泻-黏膜病病毒(简称 BVD-MDV)，后来又定名为牛病毒性腹泻病毒(BVDV)。该病主要发生于牛，犊牛更为易感。牛群中的抗体检出率极高，因此可能普遍存在隐性感染。牛病毒性腹泻病毒(BVDV)在分类学上属于黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)，与古典猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)在血清学上发生交叉反应，并能够突破宿主的特异性发生交叉感染，因此该病毒感染牛的同时还能够感染绵羊、山羊、猪、鹿及其他反刍动物。长期以来，该病一直严重影响畜牧业的发展。因此，建立一种准确、快速诊断该病的方法显得极为重要。目前用于诊断 BVDV 的方法很多，如病毒分离、荧光抗体试验、ELISA、RT-PCR 技术等，在控制和根除 BVDV 方面发挥着越来越重要的作用。

我国现行《牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术》(GB/T 18637-2002)系 2002 年 2 月 19 日由国家质量监督检验检疫总局批准，2002 年 5 月 1 日起实施。该标准中所涉及诊断技术方法均为 2002 年之前的 BVDV 病原和抗体的常规检测方法，已不

能适应当前及今后一段时期我国牛病毒性腹泻诊断的技术需求。其存在主要缺陷为：1) 随着细胞培养技术的发展，病毒分离培养所采用的玻璃培养瓶、细胞玻片、林氏管等已经被一次性的细胞培养瓶和不同规格和型号的细胞培养板所替代；2) 病毒分离培养所采用的细胞只规定采用原代牛睾丸细胞，增加了原代牛睾丸细胞本身外源病毒污染的可能，影响诊断的结果和诊断周期；3) 随着间接免疫荧光抗体试剂的商品化及细胞培养器皿的改进，荧光抗体诊断技术的操作方法也取得了较大的简化；4) 随着分子生物学的发展，牛病毒性腹泻的实时荧光 RT-PCR 技术已逐渐成为该病的病原学诊断的重要方法，并广泛应用；5) 在血清学诊断中，该标准只规定了一种微量血清中和试验方法，虽是经典的诊断方法之一，但不符合目前的诊断试剂快速、准确的技术理念，而有关牛病毒性腹泻病毒抗体的间接酶联免疫吸附试验方法已经十分成熟，为 OIE 推荐的抗体诊断方法之一，并且有商品化试剂盒供应。

2002 年至今已经十余年，牛病毒性腹泻诊断技术也发展迅速，相应的诊断方法也日趋科学、快速和准确，诊断技术标准也不断提升和完善。在此期间，我国也研制和改进了多种牛病毒性腹泻诊断检测技术，适用于不同目的和需求的诊断检测。本次对牛病毒性腹泻诊断技术的修订，基本原则有三点：一是与国际先进技术（尤其是 OIE 推荐的诊断方法）保持一致，与国际标准形成衔接，改变现有国家标准滞后于国际标准的状况；二是将在我国经过多年实践检验证明成熟可行的诊断方法和操作步骤纳入进来，提高实用性，改变原有标准不适合使用的状况；三是所包含方法全面系统，内容丰富，能够尽可能的满足今后我国对牛病毒性腹泻的诊断技术需要。

(三) 起草单位

略

(四) 主要工作过程

1. 预研阶段

标准立项前，在 2013 年农业标准化重要标准体系专项研究项目《牛病毒性腹泻/粘膜病病毒荧光 RT-PCR 检测方法研究》科研项目的资助下，研制出牛病毒性腹泻荧光 RT-PCR 检测方法和配套试剂。

2014 年 6 月—2014 年 12 月，接到此项预立项任务后，按照国标的要求，文

献检索和研讨，完成此标准具体修订工作方案的制定。

2015年1月—2015年12月，系统完成牛病毒性腹泻诊断技术国家标准中实验室研究工作，重点完成对原有标准中方法的验证，新增的荧光 RT-PCR 检测方法和抗体 ELISA 检测方法的研究和验证试验工作，初步完成相关试验实验数据的收集和整理。

2. 起草讨论阶段

2016年1月—2016年7月，在多次试验数据验证基础上，初步完成《牛病毒性腹泻诊断技术》征求意见讨论稿的编制，并经过多次讨论修订后形成《牛病毒性腹泻诊断技术》的征求意见稿。

3. 征求意见阶段

2016年8月—2016年9月，将征求意见稿寄送给全国的大学、兽医研究所、出入境检验检疫局等14家单位的共14位专家征求意见，共计收回14份“征求意见稿”的意见回执表。随后，项目组根据专家们的“意见回执表”中提出的99条意见进行汇总、归类，经项目组认真讨论、修改，共采纳意见43条，部分采纳意见20条(采纳意见共占63.6%)，未采纳意见36条(未采纳意见占36.4%)。在征集到的修改意见中未对本标准的原则性内容提出修改意见，均为文字性和表述性进行进一步规范和完善。对所有专家的意见项目组均经过多次沟通、充分讨论决定，必要时再次咨询相关专家决定是否采纳所提意见，对未采纳的部分专家意见均进行详细说明，在此基础上形成本标准的“送审稿”上报。

2016年8月—2016年12月，将需要技术复核的实时荧光 RT-PCR 检测方法所需的检测试剂，送有复查资质的河北、吉林省出入境检验检疫局检验检疫技术中心和新疆畜牧科学院兽医研究所等3家单位按本标准拟定的实时荧光 RT-PCR 检测方法、检验操作规程及判定标准进行了技术复核，根据各单位技术复核结果，项目组对标准起草内容及参数进行了进一步审核和明确。最终形成《牛病毒性腹泻诊断技术》(送审稿)，一并将技术复核表(复印件)上报全国动物卫生标准化技术委员会。

4. 审查阶段(暂缺)

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

本标准中涉及的内容已有标准的，起草时采纳原标准内容同时结合试验技术和原辅材料及耗材的发展，实验时，根据繁殖复壮的牛病毒性腹泻病毒（Oregon C24V 株）进行复核，并进一步验证该内容的确证性。本标准中涉及的内容暂无标准的，通过阅读文献和调查市场应用情况，汲取其有用信息，同时结合本实验室近几年的研究和相关诊断技术方法的比对试验，结果通过实验室系统试验进一步明确标准参数及判定标准。

（二）提出本标准的依据

本实验室长期从事牛病毒性腹泻的相关研究，包括病原学诊断、血清学诊断方法的研究；兽用生物制品外源病毒检验中牛 BVDV 的检测方法研究；牛 BVDV 的标准抗原、标准阳性血清的研究等。本标准是主要是在原有的《牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术》（GB/T 18637-2002）标准基础上进行修订。修订主要分为两部分，原有诊断技术方法的改进和新增诊断技术方法的研究和标准制定。

对于原有诊断技术方法修订部分，主要修订依据为 GB/T1.1-2009《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写》进行格式和文字等方面的修订，同时结合每一项诊断技术的发展和原辅材料及耗材的更新，对相关诊断技术的操作方法等进行了修订，并进行了一系列验证和完善。

对于新增的两项诊断技术方法，都是通过近几年项目组所在实验室的大量试验研究的数据分析制定标准操作方法和判定标准。其中新增的 BVDV 抗体间接 ELISA 诊断技术方法是采用在我国兽医临床诊断和出入境检验检疫局的相关检测机构中都广泛使用的美国 IDEXX 公司研制和销售的试剂盒。经过实验室进一步比对试验研究，结果表明该试剂盒具有良好的敏感性和特异性，和经典的中和试验相比具有较高的符合率，符合率达到 91.3%。

关于实时荧光 RT-PCR 的诊断技术方法，项目组按照分工由北京出入境检验检疫局根据多年来的试验研究和数据分析，并组织多家单位进行了比对试验，制定了诊断技术操作方法和判定标准。实时荧光 PCR 技术由于其快速、灵敏、特异和高通量、自动化的优势，已经成为病原初筛的首选方法。国内外已经建立起一些 BVDV 荧光检测方法，OIE 也发布了 BVDV 荧光 RT-PCR 检测方法的引物探针序列。然而，OIE 推荐的荧光方法是针对整个瘟病毒属的初筛方法，无法鉴

别诊断 BVDV 和 CSFV。根据实际生产和出入境检疫需求,本研究通过比对大量 BVDV 和 CSFV 的序列,设计出仅针对 BVDV 的引物探针序列,并建立起更为准确敏感、不会与猪瘟病毒检测混淆的 BVDV 荧光 RT-PCR 检测方法。

(三) 制定本标准的基础

本标准的制修订组织单位中国兽医药品监察所始建于 1952 年,承担兽药注册评审,兽药、兽医器械质量监督、检验和兽药残留监控,菌(毒、虫)种保藏,兽药 GMP、GCP、GLP 检查验收,省级兽药监察所业务指导以及兽药国家标准的制修订、标准品和对照品制备标定等工作,是国家级兽药评审检验监督机构,业务归口兽医局管理。建所以来,共获得省部级以上科技成果奖 98 项,在动物疾病预防控制等方面取得了令人瞩目的成果。同时,也培养出了一支经验丰富的高素质科研技术队伍,为我国兽药事业的奠基和发展做出了巨大的贡献。

本标准的制修订组织单位的项目组一直从事牛病毒性腹泻相关研究已有几十年的历史,积累了丰富的经验和资源。该标准制修订项目依托在中国兽医药品监察所病毒制品检测室,本实验室一直从事牛羊犬类生物制品检验及相关研究,近年来除完成日常的监督检验、复核检验、注册检验外,一直致力于病毒类疫苗和检测方法的研究,承担了多项部级和所级的研究项目。课题组拥有高级技术职称人员 6 人,课题主持人具有较强的组织管理和协调能力,主要技术人员均已参加工作多年,且一直在一线从事兽用生物制品的检验和研发工作,拥有丰富的实践经验,了解和掌握了兽用生物制品检验和研究的前沿动态和最新科技。

项目团队所在实验室是国内最早开展牛病毒性腹泻黏膜病研究的权威实验室之一,为农业部指定的牛病毒性腹泻相关诊断制品国家标准品和参照品的研发和标定实验室,项目组已成功研制了牛病毒性腹泻中和试验抗原、标准阳性血清和标准阴性血清等兽用国家标准品,并提供各相关单位进行生产和研究用。项目组主要骨干成员近几年来一直从事牛病毒性腹泻的病原学、血清学诊断及疫苗检验检测和研发等相关工作,具有良好的经验及工作基础。

北京出入境检验检疫局,一直致力于动物病毒实时荧光 PCR 技术的研究,作为首家在全国推广应用该检测技术的单位,已经搭建了成熟的荧光 PCR 技术平台,建立了近二十种动物疫病实时荧光 PCR 检测方法,并逐步转化为标准应用在实际检测中,均获得较为理想的应用结果。本标准起草组成员长期从事进境

动物及动物产品中 BVDV 的检测，为该标准的制定奠定了良好的基础。此外，北京出入境检验检疫局具有较先进的仪器设备，并且具备生物安全 2 级实验室，为标准制订工作提供所需的设备、设施和试验场地。

宁夏出入境检验检疫局综合技术中心隶属于宁夏出入境检验检疫局，并经批准成立的具有独立公正地位的第三方检测机构。目前，中心包括 3 个国家级重点实验室(枸杞检测重点实验室、羊绒及其制品检测重点实验室、煤化工检测重点实验室)、1 个研究中心（宁夏清真产品检验检疫技术研究中心）、3 个区域性中心实验室(宁夏铁合金检测中心实验室、动物检疫中心实验室和宁夏植物检疫中心实验室)，1 个检测工作站（银川市食品检验检测工作站），3 个综合性实验室：化矿与金属材料分析实验室、动植物检疫实验室、食品实验室。目前，中心现有工作人员 45 人，其中高级工程师 6 人、工程师 10 人、实验室技术人员 25 人。其中博士 3 人，硕士 15 人。

天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心反刍动物疫病检测实验室为质检总局系统反刍动物检疫国家重点实验室,拥有能够满足细胞培养、病原检测和血清学检测等检疫业务和科研工作需要的，如细胞培养箱、荧光显微镜、酶联免疫吸附试验工作站、荧光 PCR 仪、高速等温冷冻离心机、超声波破碎仪和蛋白分离纯化系统等完备的实验设施条件和仪器设备。近十年来，天津港一直是我国进境奶牛的主要输入口岸，天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心反刍动物疫病检测实验室每年承担的进境奶牛的数量约占全国进口奶牛总数的三分之一，平均达 5 万头以上。牛病毒性腹泻粘膜病是我国规定的对澳大利亚和新西兰进口奶牛必须检疫的疫病之一。本实验室除完成对进境奶牛的牛病毒性腹泻等疫病的日常检测之外，近年来围绕牛病毒性腹泻的病源检测，本实验室开展了相关研究工作，取得了一些进展，目前已研究建立了牛病毒性腹泻病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法、牛病毒性腹泻病毒分型荧光 RT-PCR 检测方法以及猪源牛病毒性腹泻病毒和猪瘟病毒二重荧光 RT-PCR 检测方法，同时也正在进行牛病毒性腹泻病毒胶体金试纸条的研制工作。

（四）实验内容

- 1、BVDV 实时荧光 RT-PCR 检测方法研究；
- 2、间接 ELISA 试剂盒检测的敏感性、特异性和符合率及批间差异的验证试

验研究。

(五) 实际应用效果

本标准的研制和修订实现了牛病毒性腹泻的准确、快速的诊断：a) 修订的《牛病毒性腹泻诊断技术》为我国牛病毒性腹泻诊断提供了更为完善的诊断技术标准；b) 标准研制过程中会对各种检测方法进行比较，有利于全面了解牛病毒性腹泻的各种诊断方法的特点；c) 本标准的研制，为全面掌握我国牛病毒性腹泻流行情况创造了条件，社会效益显著。

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

牛病毒性腹泻病毒是痘病毒的代表种，是引起牛病毒性腹泻的病原体，分为牛病毒性腹泻 1 型和 2 型，可通过基因水平和抗原水平(主要使用单克隆抗体)，区分 2 种不同型的牛病毒性腹泻病毒。为了建立 BVDV 实时荧光 RT-PCR 病原学检测方法和验证广泛使用的商品化 BVDV 抗体检测试剂盒，项目组主要进行了以下试验研究。

(一) 实时荧光 RT-PCR 检测方法研究

1 BVDV 实时荧光 RT-PCR 引物探针的设计

下载 GenBank 中公布的牛病毒性腹泻病毒基因组序列，应用 DNAMAN 软件进行序列多重比对，然后选取 BVDV 基因组最保守的 5' UTR 区域，使用 oligo6.0 软件设计引物及探针，探针的 5' 和 3' 分别标记 FAM 荧光染料和无荧光淬灭基团 BHQ1，引物和探针由上海基康生物技术有限公司合成及标记。BVDV 实时荧光 RT-PCR 引物探针的序列、基因组位置等信息见表 1。

表 1 BVDV 实时荧光 RT-PCR 检测方法的引物探针序列

引物或探针名称	序列 (5'-3')	基因组位置 (nt)	检测靶基因
BVDV 上游引物	CAG CGA MGG CCG AAA AGA	3~17	
BVDV 下游引物	TGA CGA CTN CCC TGT ACTCAG	178~198	
BVDV 探针	[FAM] CCA TGC CCT TAG TAG GAC TAG CA [BHQ1]	107~128	5'UTR

注1：上游、下游引物及探针均为简并引物

注2：引物和探针可由生物公司合成，纯度为HPLC级，用DEPC水溶解并稀释至终浓度10 μmol/L，-20℃保

存备用。

注3: 引物探针是根据已发布的毒株序列进行设计, 基因组位置参考毒株Bovine viral diarrhea virus strain Oregon C24V (GenBank登录号: AF091605.1)。

2 BVDV 实时荧光 RT-PCR 的建立

2.1 BVDV 阳性对照的制备

本研究所用的阳性对照为灭活 BVDV 的细胞培养物或 BVDV 5' -UTR 基因体外转录 cRNA 溶液。灭活 BVDV 的细胞培养物, 是直接提取毒价达 5.6×10^5 TCID₅₀BVDV Oregon C24V 毒株灭活的细胞培养物总 RNA 作为阳性对照。BVDV 5' -UTR 基因体外转录 cRNA 溶液, 是通过回收 BVDV Oregon C24V 毒株 5' UTR 基因的 RT-PCR 扩增产物, 长度为 386bp, 与 pMD-T20 载体进行连接, 转化 TOP10 感受态细胞, 碱裂解法提取质粒 DNA, 经 PCR 和酶切鉴定后获得阳性重组质粒 (命名为 pMD20-BVDV-5U), 再以纯化的质粒为模板, 将质粒线性化之后, 用试剂盒进行体外转录; 将体外转录产物用 DNase 除去其中的 DNA 模板再经 TRIzol 提取 RNA 进行浓度测定后, 即得到制备 BVDV 阳性对照所需的 RNA 阳性对照品母液。将母液 10 倍系列稀释之后, 可作为 BVDV 荧光 RT-PCR 方法的阳性对照使用。

2.2 BVDV 荧光 RT-PCR 的建立

首先, 以 BVDV 细胞培养物提取的 RNA 或者以制备的 BVDV-5' UTR 体外转录的非感染性 RNA 为阳性对照用扩增模板, 通过对上、下游引物和探针的浓度、Mg²⁺浓度、反应体积、扩增时反应参数和循环次数的条件摸索和优化, 建立 BVDV 荧光 PCR 检测方法。确定的 BVDV 荧光 RT-PCR 反应体系见表 2。

结果表明, BVDV 荧光 PCR 得到典型的阳性扩增曲线, 研究设计的 BVDV 检测引物探针和反应体系成立, 扩增曲线见图 1。

表 2 BVDV 荧光 RT-PCR 反应体系

荧光RT-PCR反应液组分	1个检测体系的加入量
5×RT 缓冲液 ^a (Mg ²⁺ 浓度15 mmol/L)	5.0μL
dNTP (2.5 mmol/L)	1.0μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2.0 μL
上游引物 (10 μmol/L)	1.0 μL
下游引物 (10 μmol/L)	1.0 μL
探针 (10 μmol/L)	0.5 μL

M-MLV 反转录酶 (200 U/ μ L)	0.5 μ L
RNA酶抑制剂 (40 U/ μ L)	0.25 μ L
Taq酶 ^b (5 U/ μ L)	0.25 μ L
DEPC水	3.5 μ L
a 5 \times RT 缓冲液的组成为: 375 mmol/L KCl、15 mmol/L MgCl ₂ 、50 mmol/L DTT、250 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3, 25 $^{\circ}$ C)。	
b Taq 酶: 具有 5' \rightarrow 3'外切活性。	

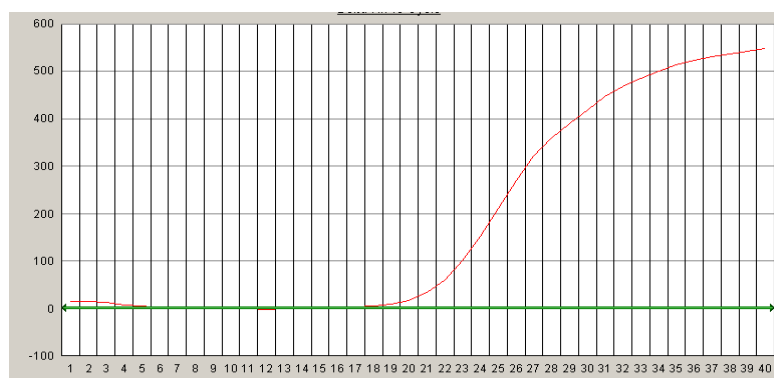


图 1 BVDV 荧光 RT-PCR 扩增曲线

BVDV 荧光 RT-PCR 的最佳反应条件和循环参数为: 第一阶段, 反转录 42 $^{\circ}$ C/30 min; 第二阶段, 预变性 94 $^{\circ}$ C/3 min; 第三阶段, 92 $^{\circ}$ C/15 s, 45 $^{\circ}$ C/30s, 72 $^{\circ}$ C/60 s, 5 个循环; 第四阶段, 92 $^{\circ}$ C/10 s, 56 $^{\circ}$ C/60 s, 40 个循环; 在第四阶段每次循环的退火延伸时收集荧光。试验结束后, 根据收集的荧光曲线和 C_t (或 C_p) 值判定结果。

经过对多种样品的重复性试验, 确定判定标准如下:

阴性: 无 C_t (或 C_p) 值并且无扩增曲线, 表示样品中无牛病毒性腹泻病毒。

阳性: C_t (或 C_p) 值 ≤ 30 , 且出现典型的扩增曲线, 表示样品中存在牛病毒性腹泻病毒核酸。

有效原则: C_t (或 C_p) 值 > 30 , 且出现典型的扩增曲线的样品建议复检。复检仍出现上述结果的, 判为阳性, 否则判为阴性。

3 BVDV 实时荧光 RT-PCR 的标准曲线及最低检出限 (灵敏度)

使用 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝/ μ L 浓度范围的 BVDV 体外转录 RNA 进行一步法荧光 RT-PCR 扩增, 选取其中 5 个连续点建立以拷贝浓度为单位的定量标准曲线, 扩增曲线和标准曲线见图 2 和图 3, 标准曲线显示出良好的回归相关系数, $R^2=0.99$ 。此外, 对于 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝/ μ L 浓度范围内的 RNA 模板, BVDV 荧光 RT-PCR 的最

低检出限为 100 个拷贝，阴阳性临界 C_t 值为 30。

然后，对毒价为 5.6×10^5 TCID₅₀ 的 BVDV Oregon C24V 毒株细胞培养物进行 10 倍系列稀释后提取 RNA，进行荧光 RT-PCR 扩增，确定该方法检测病毒培养物的最低检出浓度为 5.6 TCID₅₀，结果见图 4。

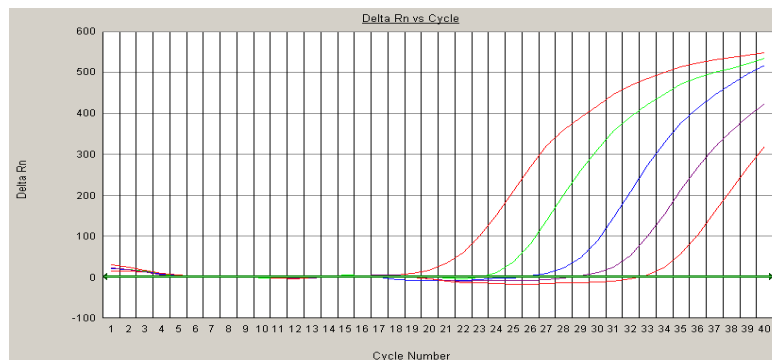


图 2 $10^7 \sim 10^3$ 拷贝/ μ L 的 BVDV RNA 进行荧光 RT-PCR 检测结果

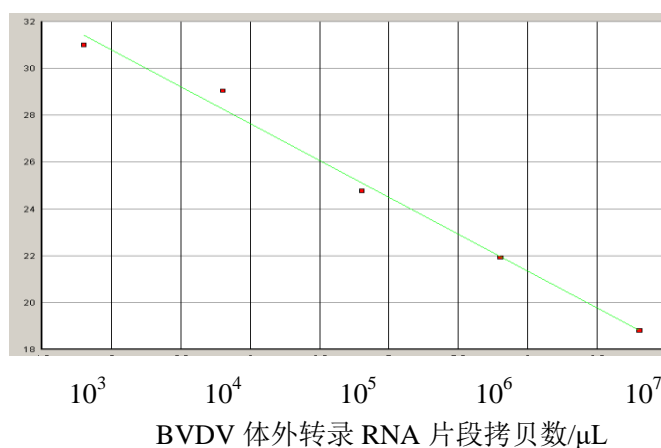


图 3 BVDV 荧光 RT-PCR 标准定量曲线

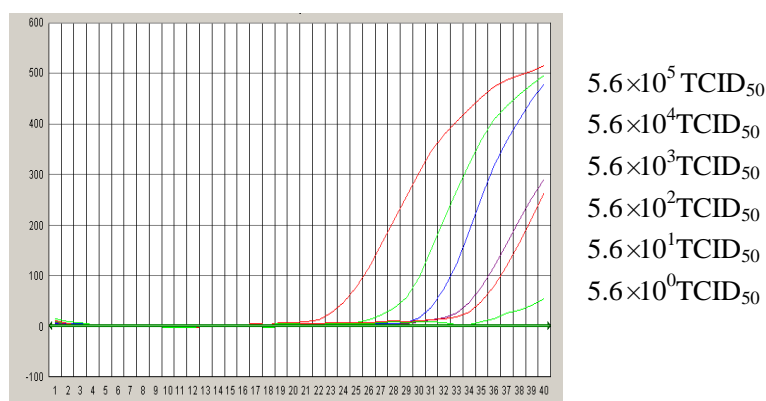


图 4 BVDV 荧光 RT-PCR 检测 BVDV 细胞毒的扩增曲线

4 BVDV 荧光 RT-PCR 的特异性试验

4.1 特异性试验

应用本试验建立的荧光 RT-PCR 方法检测牛病毒性腹泻病毒生物 1 型和生物 2 型核酸 (BVDV-1 和 BVDV-2)、猪瘟疫病毒核酸 (CSFV)、牛白血病病毒核酸 (BLV)、牛传染性鼻气管炎病毒核酸 (BoHV-1) 和赤羽病病毒核酸 (AKAV), 结果显示仅 BVDV-1 和 BVDV-2 核酸呈现典型的扩增曲线, 而其他病毒核酸则无扩增曲线出现, 结果见图 5, 表明本研究建立的 BVDV 荧光 RT-PCR 方法特异性良好。



图 5 BVDV 荧光 RT-PCR 特异性试验结果

A: BVDV-1 核酸; B: BVDV-2 核酸; C: 其他病毒核酸

4.2 方法比较

以上述 BVDV/Oregon C24V 细胞毒 10 倍系列稀释 ($5.6 \times 10^5 \sim 5.6 \times 10^0 \text{TCID}_{50}$) 提取的 RNA 为模板, 采用行业标准中的引物和两步法 RT-PCR 扩增细胞毒中的 BVDV 特异性核酸序列, 结果见图 6。现行行业标准普通 RT-PCR 对 BVDV/Oregon C24V 细胞毒的检测下限为 $5.6 \times 10^1 \text{TCID}_{50}$ 。

通过两种方法比较可知, BVDV 荧光 RT-PCR 对牛病毒性腹泻细胞毒的检测下限为 5.6 个 TCID_{50} , 灵敏度比普通 RT-PCR 检测方法提高了 10 倍。

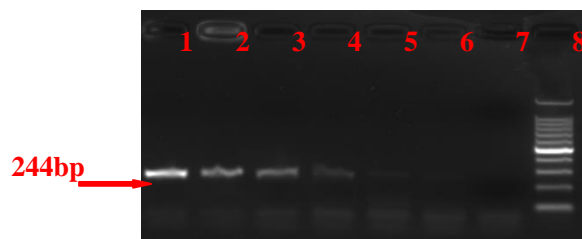


图 6 普通 RT-PCR 检测 BVDV/Oregon C24V 细胞毒结果

1~6: $5.6 \times 10^5 \sim 5.6 \times 10^0$ 细胞毒 RNA 的 RT-PCR 结果; 7: 水对照; 8: 100bp DNA MARKER

5 BVDV 荧光 RT-PCR 的稳定性和重复性试验

在实际检测工作中, 为达到降低检测成本, 提高检测试剂的稳定性和加强检测试剂的应用性, 我们将 BVDV 荧光 RT-PCR 检测方法研制成检测试剂盒, 并进行了初步组装, 试剂盒组份及规格见表 3。

表 3 BVDV 实时荧光 RT-PCR 试剂盒组份规格

试剂盒组份名称	成分	规格 (50tests/盒)
RNA 裂解液	TRIzol	15mL/瓶×2
BVDV RT-PCR 反应液	5×RT 缓冲液、2.5mM MgCl ₂ 、2.5mM dNTP、10μM 上游引物、10μM 下游引物、10μM 探针	750μL×1 管
酶混合物	M-MLV RT、RNase Inhibitor 和热启动 Taq 酶	200μL×1 管
阳性对照	体外转录的 BVDV 非感染性 RNA	1mL×1 管
阴性对照	阴性 MDBK 细胞培养液	1mL×1 管
水	无 RNA 酶的灭菌水	1mL×1 管

然后使用 BVDV 荧光 RT-PCR 试剂盒分别对 $10^5 \sim 10^7$ 拷贝数的 RNA 模板进行连续 3 次检测, 进行重复性试验, 统计各组 Ct 值的变异系数 (CV%), 以验证试剂盒的可重复性和稳定性。结果显示各组的变异系数均小于 5% (见表 4), 说明 BVDV 荧光 RT-PCR 试剂盒具有良好的重复性和稳定性。

表 4 BVDV 实时荧光 RT-PCR 试剂盒重复性实验结果

拷贝数 (cRNA)	Ct 值	平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$)	变异系数 (CV%)
10^5	23.47	24.14±0.79	3.26
	23.95		
	25.01		
	20.84		
10^6	20.57	21.01±0.55	2.62
	21.63		
	18.05		
10^7	17.21	17.61±0.42	2.40

6 临床样本检测

分别提取 180 份牛血清（采集自 2010 年—2013 年期间的北京和天津口岸隔离场牛血清样本，其中有 12 份血清样本经抗原捕获 ELISA 检测为 BVDV 阳性）、10 份牛精液、2 份胎牛血清和 2 份猪瘟疫苗样本的 RNA，使用本研究建立的荧光 RT-PCR 方法和行标 RT-PCR 方法进行检测，见图 7 和图 8，并将检测结果汇总于表 5。

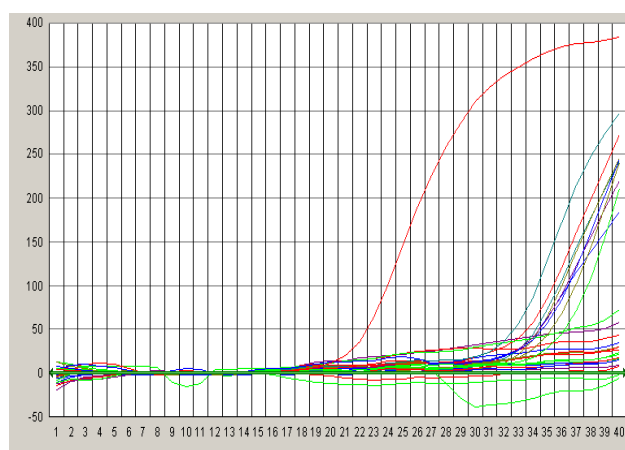


图 7 部分样本 BVDV 荧光 RT-PCR 扩增结果

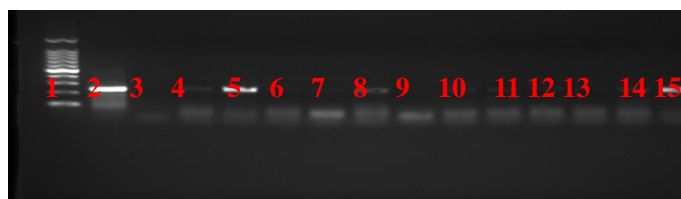


图 8 部分样本 BVDV 普通 RT-PCR 扩增结果

1: 100bp DNA Marker; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4~15: 为部分 BVDV 牛血清阳性样本

表 5 使用三种方法检测不同种类临床样本中 BVDV 的结果

临床样本种类	牛血清	牛精液	胎牛血清	猪瘟疫苗
份数	180	10	2	2
普通 RT-PCR 检测结果	12/180	0/10	0/2	0/2
实时荧光 RT-PCR 检测结果	12/180	0/10	0/2	0/2
抗原捕获 ELISA 检测结果	12/180	—	0/2	—
不同检测方法的符合率	100%	100%	100%	100%

由表 5 可知，在 180 份牛血清临床样本中，12 份抗原捕获 ELISA 检测为阳性的样本用 BVDV 荧光 RT-PCR 方法和现行行标普通 RT-PCR 方法检测 BVDV 核酸，结果全部为阳性；其余 168 份样本用这两种方法检测 BVDV 核酸的结果均为阴性，血清抗原 ELISA 检测结果也为阴性。使用两种 PCR 方法，检测 10 份牛精液、2 份胎牛血清和 2 份猪瘟疫苗均为 BVDV 阴性。应用上述试验结果表明，应用本研究建立的 BVDV 荧光 RT-PCR 方法可快速、敏感地检测出持续感染牛血清中的 BVDV 核酸，并在 4 个小时内报告检测结果，本研究建立的荧光 PCR 方法与常规 PCR 方法和血清抗原 ELISA 检测结果的符合率为 100%。由于样本获取途径所限，并未在牛精液、胎牛血清和猪瘟疫苗中检测出 BVDV 阳性的样本，需要进一步增加临床样本数量，扩大临床应用范围。

（二）牛病毒性腹泻病毒抗体检测试剂盒验证性试验研究

本研究目的是为进一步验证现已在国内外市场上广泛使用的美国 IDEXX 公司生产的牛 BVDV 抗体检测间接 ELISA 试剂盒的敏感性和特异性，并与经典的细胞中和试验检测抗体的方法比较二者之间的符合率，以制定我国牛病毒性腹泻病毒血清学诊断技术的国家标准，并使之能够在我国推广应用。

1 牛病毒性腹泻病毒中和抗原的制备与病毒含量测定

将长成单层的 MDBK 细胞弃去原有培养液，用适量的 PBS 缓冲液冲洗，分别接种标准株的种毒吸附 2h，弃掉瓶内液体，加入适量维持液置 CO₂ 培养箱（37℃、5% CO₂）中培养，间隔 12 h 观察一次。待约有 75% 以上的细胞发生病变或培养的细胞开始脱落时将其进行收毒，注明收获日期、毒种代次等。另设不接病毒的细胞作为对照。以含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基调整 MDBK 细胞浓度，铺 96

孔板， $1 \times 10^4/0.1$ mL/孔。24h 后，用无血清 MEM 培养基 10 倍梯度稀释待测病毒液，分别加于 96 孔板中，0.1 mL/孔，10 复孔/稀释度，另外 2 复孔/稀释度做为不加病毒液的阴性对照，37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。5d 后显微镜下观察各孔，计数每个稀释度出现的细胞病变孔数，计算细胞病变阳性孔百分率。以半数组织培养感染剂量（TCID₅₀）法确定牛病毒性腹泻病毒滴度，采用 Karber 法计算病毒滴度。研究结果表明，本次采用 BVDV 标准中和试验抗原毒液在 MDBK 细胞上扩增后，测定病毒含量结果 $10^{6.3}$ TCID₅₀/0.1mL。

2 BVDV 抗体间接 ELISA 试剂盒的验证试验研究

首先，按常规方法对待检血清进行定量测定中和抗体效价或定性测定抗体阴阳性。采用美国 IDEXX 公司生产销售的 BVDV 抗体间接 ELISA 试剂盒，对待检血清进行定量测定中和抗体效价或定性测定抗体阴阳性。同时验证试剂盒与经典的中和试验方法相比，比较试剂盒的灵敏度、特异性和符合率。将已知中和抗体效价的 BVDV 标准阳性血清先进行 50 倍稀释后再作 2 倍系列稀释，其他条件不变，按照试剂盒操作说明书进行检测，测定抗体效价来评价试剂盒灵敏度。再分别将牛传染性鼻气管炎（IBR）阳性血清、牛副流感病毒（PI3 型）阳性血清、牛腺病毒阳性血清、牛瘟病毒（RPV）阳性血清、牛布鲁氏菌病阳性血清作适当稀释度稀释，其他条件不变，按照试剂盒操作说明书进行检测，评价试剂盒的特异性。另外，取不同批次间接 ELISA 试剂盒，检测实验室保存的标准阳性血清、已知为牛病毒性腹泻阳性的牛血清，每份同样设置 6 个复孔，按照试剂盒操作说明书进行检测，计算变异系数，求得组间检测样品的重复性。最后按照试剂盒操作说明书和细胞中和试验方法对 300 份临床血清样本进行检测，并按照各自的方法进行阴阳性判定，比较间接 ELISA 试剂盒与细胞中和试验方法的符合率。

2.1 试剂盒的灵敏度

将标准阳性血清稀释作 2 倍系列稀释后，用 IDEXX 间接 ELISA 方法试剂盒检测。检测结果见表 6，按照试剂盒判定标准，将细胞中和抗体效价为 1:1024 的阳性血清稀释至 1:1600 后用间接 ELISA 试剂盒检测仍为阳性，试验结果表明该试剂盒具有较高的灵敏度。

表 6 试剂盒灵敏度检测结果

标准阳性 血清	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	阳性对照		阴性对照	
									1	2	1	2
OD _{450nm}	1.752	1.628	1.341	1.152	0.749	0.524	0.417	0.207	1.322	1.295	0.122	0.130

2.2 试剂盒的特异性

将牛传染性鼻气管炎阳性血清、牛副流感病毒阳性血清、牛腺病毒阳性血清、牛瘟病毒阳性血清、牛布鲁氏菌病阳性血清按照试剂盒操作说明书进行检测。特异性试验结果表 7，试验结果表明，该试剂盒只对 BVDV 阳性对照检测为阳性，对其他血清均为阴性。表明试剂盒不与其他病的阳性血清发生交叉反应，具有较好的特异性。

表 7 试剂盒特异性检测结果

标准阳性血清	BVDV 阳性血清	IBRV 阳性血清	PIV3 阳性血清	RPV 阳性血清	BadV 阳性血清	布氏菌病阳性血清	阳性对照		阴性对照	
							1	2	1	2
OD _{450nm}	0.185	0.128	0.167	0.155	0.214	0.208	1.322	1.295	0.122	0.130

2.3 试剂盒的批间重复性试验

用 3 个不同批次间接 ELISA 试剂盒，检测标准阳性血清、牛病毒性腹泻阳性的牛血清，每份同样设置 6 个复孔，按照试剂盒操作说明书进行检测，并计算批间和批内变异系数，结果见表 8，结果表明，变异系数(CV)均小于 10%，说明此试剂盒的重复性较好。

表 8 试剂盒重复性试验结果

血清	批内变异系数		批间变异系数	
	平均数	变异系数	平均数	变异系数
	X±SD	CV (%)	X±SD	CV (%)
第一次	1.127±0.055	4.88	1.220±0.043	3.50
第二次	1.145±0.027	3.22	0.996±0.056	5.62
第三次	0.927±0.068	7.26	1.245±0.067	5.29

2.4 与中和试验抗体检测方法的符合率试验

按照试剂盒操作说明书和细胞中和试验方法对 300 份临床血清样本进行检测，比较两种诊断方法的符合率。试验结果见表 9，结果表明间接 ELISA 试剂盒的相对敏感性为 91.6% (217/237)，相对特异性为 90.5% (57/63)，该 ELISA 检测方法的符合率为 91.3% (274/300)。

表 9 试剂盒符合率试验结果

	细胞中和试验法	
	阳性 (237 份)	阴性 (63 份)
ELISA 试剂盒阳性	217 份	6 份
ELISA 试剂盒阴性	20 份	57 份

3 讨论与小结

牛感染牛病毒性腹泻将给我国养牛产业造成巨大的经济损失，该病已成为牛病中重要的防控疾病之一。目前牛病毒性腹泻疫苗只能提供有限的保护，无法彻底防止其爆发。因此，建立一种早期、快速、准确的诊断方法对于该病的防控具有重要的意义。酶免疫试验作为临床免疫检验中的主导技术，操作方便、交叉反应小和灵敏性高且对环境影响小。

间接 ELISA 的基本原理是将抗原吸附于某种固相载体表面，利用酶标记的抗抗体来检测已与固相抗原结合的待测抗体。在 ELISA 过程中，由于实验材料类型的不同、试剂类型与浓度的不同、实验过程中参数不同等原因，都会致使在实验结果上存在一定差异。本实验将 IDEXX 公司生产的牛 BVDV 抗体间接 ELISA 抗体检测试剂盒的敏感性、特异性和经典方法的符合率进行了验证，结果表明该试剂盒间接具有较好的特异性和敏感性，具有较好的重复性。

(三) 验证和技术复核

为验证及推广应用《牛病毒性腹泻病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法》标准，我们与北京森康生物科技有限公司合作，研制出配套的检测试剂盒，试剂盒组分包括一步法荧光 RT-PCR 反应液、酶混合物 (Taq 酶、M-MLV 反转录酶和 RNA 酶抑制剂)、阴性对照、阳性对照。

本标准在吉林、河北出入境检验检疫局 2 家质检系统实验室，新疆畜牧科学

院兽医研究所对检测方法的特异性、敏感性和临床样品检测适用性进行了验证和技术复核。检测各类样品共计 111 份，包括 BVDV 阳性牛血清 8 份，BVDV 阴性牛血清 90 份，BVDV 病毒核酸 5 份，猪瘟野毒核酸 2 份，猪瘟兔化弱毒核酸 3 份，传染性牛鼻气管炎病毒核酸 3 份。验证结果表明，该标准草案及配套的 BVDV 荧光 RT-PCR 检测试剂该方法可特异性检出所有 BVDV 阳性样品的核酸，与传染性牛鼻气管炎病毒无交叉反应，且与同属的猪瘟病毒无交叉反应，适应于临床样品中 BVDV 的检测。

（四）预期的经济效果

本标准修订后，将为牛病毒性腹泻的诊断提供重要的参考资料和科学的指导性建议。标准研制过程中开发的相关诊断试剂，如实时荧光 RT-PCR 诊断试剂盒等产品应用前景广阔，预计会产生良好的经济价值、社会价值和生态价值，采用 ELISA 试剂盒进行牛 BVDV 抗体监测和流行病学调查相比传统的病毒中和试验能够节约大量的人力、物力和财力，具有重要的经济意义。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度

本标准研制的实时荧光 RT-PCR 检测方法对我单位保存的牛病毒性腹泻病毒及临床分离样本的检出率达 100%，经 3 家单位验证和复核，其复核率均达 100%，并与同属的猪瘟病毒无交叉反应，具有良好的特异性。结果证明，本标准中首次建立的实时荧光 RT-PCR 方法标准可达到快速诊断的目标。

本标准中首次应用了在国内广泛使用的美国 IDEXX 研制生产的 BVDV 抗体间接 ELISA 检测试剂盒的方法进行 BVDV 抗体检测，该方法具有良好的特异性和敏感性，与经典的中和试验抗体检测方法具有较高的符合率，能够作为 BVDV 抗体检测的重要方法之一。

五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

目前，与牛病毒性腹泻诊断技术的标准有《牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术》(GB/T 18637-2002)、《中华人民共和国兽用生物制品规程（2000 版）》、《中华人民共和国兽药典三部（2010 版）》，《牛病毒性腹泻黏膜病检疫规范（SN/T 1129-2007）》，但缺少系统完整的牛病毒性腹泻诊断技术单行本内容。另外，英文版 OIE《陆生动物卫生法典》已将 RT-PCR 技术作为牛病毒性腹泻临床样本确

诊方法之一，但未对其方法进行细节性介绍，不具有可操作性，我国现有标准及规程对这一新方法均未提及。因而本标准增加了最新的实时荧光 RT-PCR 检测技术，与现有标准不存在矛盾，而是对相关标准做了有益补充，填补了该病诊断的空白。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

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

建议将《牛病毒性腹泻诊断技术》标准作为推荐性国家标准。

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）

本标准发布后，为了有效贯彻实施之，建议农业部和国家出入境检验检疫局等有关部门确定培训对象，拨专款，责成标准起草单位举办全国技术培训班，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，使受训人员返回单位后能独立进行工作。

九、废止现行有关标准的建议

自本标准公告之日起，建议废除中华人民共和国国家标准《牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术》（GB/T 18637—2002）。

十、其他应予说明的事项。

根据 OIE 对牛病毒性腹泻的命名规则和国际现行对牛病毒性腹泻的命名，建议将本标准名称修改为《牛病毒性腹泻诊断技术》。