

DB22

吉 林 省 地 方 标 准

DB22/T 3473—2023

牛呼吸道合胞体病病原学诊断技术

Pathogenic diagnostic techniques of bovine respiratory syncytial disease

地方标准信息服务平台

2023 - 04 - 25 发布

2023 - 05 - 23 实施

吉林省市场监督管理厅

发布

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这些专利的责任。

本文件由吉林省畜牧业管理局提出并归口。

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。

本文件主要起草人：肖丹、邵洪泽、曲磊、王楠、任锐、马晓媛、胡泽宇、曹东阳。

地方标准信息服务平台

牛呼吸道合胞体病病原学诊断技术

1 范围

本文件规定了牛呼吸道合胞体病的临床诊断、实验室诊断和综合判定。
本文件适用于牛呼吸道合胞体病的病原学诊断。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 541-2016 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。

BRSV: 牛呼吸道合胞体病毒 (Bovine Respiratory Syncytial Virus)

DEPC: 焦碳酸二乙酯 (Diethyl Pyrocarbonate)

5 临床诊断

5.1 流行病学

一年四季均可发生，秋、冬季节多发，在恶劣养殖环境、长途运输或过早断奶等应激情况下，促进该病发生。牛、羊易感，犊牛最易感。主要传染源是病畜和带毒畜。直接接触和飞沫经呼吸道传播是主要感染途径。

5.2 临床症状

6 月龄内犊牛常表现急性呼吸道症状，体温升高，呼吸困难或干咳、结膜炎、眼鼻分泌物增多。青年牛和成年牛多呈隐性感染，无明显临床症状，部分病牛表现流泪、流涎，流少量浆液性鼻液，轻微咳嗽，偶有发热，产奶量下降等症状。

5.3 剖检变化

本病呈间质性肺水肿，气管和支气管炎，表现为粘膜充血，气管内充满粘稠的粘液，气管淋巴结、支气管淋巴结、腔淋巴结的肿大、水肿，病程严重时出现肺气肿、胸膜肺炎和皮下积液。

5.4 结果判定

牛出现上述临床症状和剖检变化，结合流行病学特点，可判定为疑似牛呼吸道合胞体病。

6 实验室诊断

6.1 仪器与设备

- 6.1.1 组织匀浆机或研磨皿。
- 6.1.2 低温冰箱， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.1.3 旋涡振荡器。
- 6.1.4 高速冷冻离心机。
- 6.1.5 电子天平。
- 6.1.6 II级生物安全柜。
- 6.1.7 PCR扩增仪。
- 6.1.8 水平电泳槽。
- 6.1.9 凝胶成像仪。
- 6.1.10 实时荧光PCR仪。
- 6.1.11 微量移液器， $0.5\ \mu\text{L}\sim 10\ \mu\text{L}$ ， $2\ \mu\text{L}\sim 20\ \mu\text{L}$ ， $20\ \mu\text{L}\sim 100\ \mu\text{L}$ ， $200\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$ 。

6.2 试剂与材料

除特别说明以外，试剂均为分析纯试剂或生化试剂。

- 6.2.1 水，GB/T 6682 一级。
- 6.2.2 滤芯吸头， $10\ \mu\text{L}$ ， $200\ \mu\text{L}$ ， $1\ 000\ \mu\text{L}$ 。
- 6.2.3 Eppendorf管， $0.5\ \text{mL}$ ， $1.5\ \text{mL}$ ， $2\ \text{mL}$ 。
- 6.2.4 棉拭子。
- 6.2.5 PCR管， $0.2\ \text{mL}$ 。
- 6.2.6 商品化病毒RNA提取试剂盒或等效试剂。
- 6.2.7 一步法RT-PCR反应预混液。
- 6.2.8 一步法real-time RT-PCR反应预混液。
- 6.2.9 含青、链霉素PBS溶液，配制方法见附录A.3。
- 6.2.10 1%溴化乙锭(EB)溶液或代替物。
- 6.2.11 琼脂糖。
- 6.2.12 DEPC水。
- 6.2.13 $6\times$ 上样缓冲液。
- 6.2.14 DL2 000 marker，分子量范围 $200\ \text{bp}\sim 2000\ \text{bp}$ 。
- 6.2.15 TAE电泳缓冲液，配置方法见附录A.4。
- 6.2.16 BRSV阳性对照，灭活的BRSV牛肾传代细胞培养的病毒培养物。
- 6.2.17 BRSV阴性对照，正常牛肾传代细胞。

6.3 样品采集

将灭菌的棉拭子蘸取牛鼻腔分泌物放入含青、链霉素PBS溶液 2 mL 的采样管中，加盖密封保存。肺部组织按照 NY/T 541-2016 中的 6.2.2 规定执行。

6.4 样品处理

6.4.1 鼻腔分泌物

将样品置于旋涡振荡器上振荡混匀，5 000 r/min、4 ℃ 离心 15 min，取上清液待检。

6.4.2 组织样品

取组织样品约 2 g，加入 4 mL含青、链霉素 PBS 溶液，在组织匀浆机或研磨皿中充分研磨，混匀，3 000 r/min、4 ℃ 离心 15 min，取上清液待检。

6.5 RT-PCR 方法

6.5.1 引物

RT-PCR引物序列见表 1。

表1 RT-PCR 检测用引物

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

6.5.2 病毒 RNA 提取

在样品制备区将经 6.4.1 或 6.4.2 处理过的待检样品、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。

6.5.3 RT-PCR 反应体系配制

在试剂准备区，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。在样品制备区，依次将待检样品的模板 RNA、BRSV 阳性对照和阴性对照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 反应体系组成

序号	组分	反应体系/μL
1	一步法 RT-PCR 反应预混液	12.5
2	上游引物 (10 μmol/L)	1.0
3	下游引物 (10 μmol/L)	1.0
4	模板 RNA	2.5
5	DEPC 水	8
6	总体积	25

6.5.4 RT-PCR 扩增条件

在核酸扩增区将 PCR 管置 PCR 扩增仪上按如下条件扩增：

- a) 45 °C 反转录 10 min；
- b) 98 °C 预变性 2 min；
- c) 98 °C 变性 30 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共 35 个循环，最后 72 °C 延伸 10 min。

6.5.5 电泳

在产物分析区将 5 μL 的 6×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×TAE 电泳缓冲液配制的 1% 琼脂糖凝胶中（含 1% 溴化乙锭溶液 1 μL 或无毒核酸染料溶液），加 DL 2 000 marker 作为电泳参照物。调节电压 5 V/cm，电泳时间约 25 min。电泳结束后，用凝胶成像仪观察结果并记录。

6.5.6 结果判定

6.5.6.1 实验成立条件：BRSV 阳性对照出现 660 bp 目的条带，且 BRSV 阴性对照无相应条带，实验成立参见图 B.1。

6.5.6.2 被检样品出现 660 bp 目的条带，判定为 BRSV 核酸阳性。

6.5.6.3 被检样品无 660 bp 目的条带，判定为 BRSV 核酸阴性。

6.6 Real-time RT-PCR 方法

6.6.1 引物与探针

实时荧光 RT-PCR 引物序列见表 3。

表3 实时荧光 RT-PCR 检测用引物

引物名称	引物序列
上游引物F	5' -ATTAGCAGCAGGTGATAGATC-3'
下游引物R	5' -CCTACTACCTCTCTAGTTGA-3'
探针P	5' -FAM-GCCTCACTGCAGTCATTAGGAGAGCCA-BHQ1-3'

6.6.2 病毒 RNA 提取

同 6.5.2。

6.6.3 Real-time RT-PCR 反应体系配置

在试剂准备区，冰浴条件下按照表 4 将除模版RNA以外的各组分加入至 0.2 mL PCR管，配制 Real-time RT-PCR 反应体系。在样品制备区，依次将待检样品的模版RNA、BRSV 阳性对照和阴性对照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	一步法real-time RT-PCR反应预混液	12.5
2	上游引物 F (10 μmol/L)	1
3	下游引物 R (10 μmol/L)	1

表 4 (续)

序号	组分	用量(μL)
4	探针 P (1 μmol/L)	0.5
5	DEPC 水	5
6	模板 RNA	5
7	总体积	25

6.6.4 Real-time RT-PCR 扩增程序

在核酸扩增时将 PCR 管置于荧光定量 PCR 仪上进行 RT-PCR 扩增，扩增程序为：

- a) 50 °C 反转录 10 min;
- b) 95 °C 预变性 10 min;
- c) 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 40 s, 共 40 个循环。在每一个循环的 60 °C 时收集荧光信号。

6.6.5 结果判定

6.6.5.1 实验成立条件：BRSV 阳性对照 Ct 值 ≤ 30 ，且出现特征性扩增曲线，参见图 B.2，BRSV 阴性对照无 Ct 值，且无特征性扩增曲线。

6.6.5.2 被检样品 Ct 值 ≤ 35 ，且出现特征性扩增曲线，判定为 BRSV 核酸阳性。

6.6.5.3 被检样品无 Ct 值或 Ct 值 >40 ，且无特征性扩增曲线，判定为 BRSV 核酸阴性。

6.6.5.4 被检样品 $35 < \text{Ct 值} \leq 40$ 且出现特征性扩增曲线，样品检测结果判为疑似。应重新采样检测，仍为疑似，判定为 BRSV 核酸阳性。

7 综合判定

符合 5.4 且符合 6.5 或 6.6 判为牛呼吸道合胞体病；未出现 5.4 结果，但符合 6.5 或 6.6 结果判定为牛呼吸道合胞体病毒感染。

附 录 A
(规范性)
常用试剂的配制

A.1 pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS)

氯化钠 (NaCl)	8.00 g
氯化钾 (KCl)	0.20 g
磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄)	1.44 g
磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	0.24 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

将上述成分依次溶解, 用 HCl 调 pH 至 7.4, 分装, 121 °C、15 min 高压灭菌。室温或 4 °C 冰箱保存。

A.2 青、链霉素贮存溶液

取青霉素 1 000 000IU、链霉素 1 000 000 μg, 用灭菌去离子水配成 10 mL 的上述两种抗生素的贮存液 (浓度分别为: 青霉素 100 000IU/ mL、链霉素 100 000μg/ mL)。分装小瓶, -20 °C 保存。

A.3 含青、链霉素 PBS 溶液

取 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 98 mL, 加入 2 mL 青、链霉素贮存溶液, 调溶液 pH 值至 7.0~7.4。

A.4 TAE电泳缓冲液

A.4.1 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	加至 100 mL

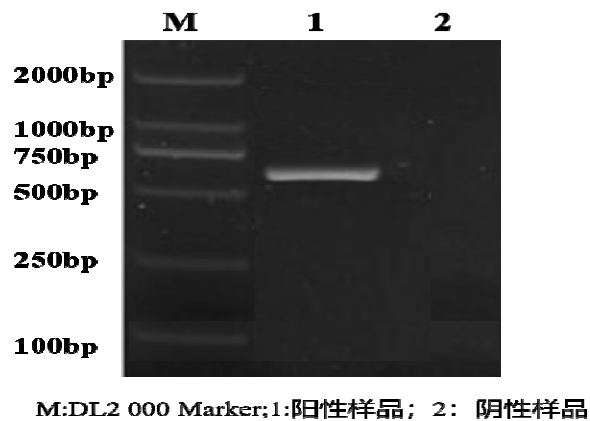
A.4.2 50×TAE电泳缓冲液。

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	242 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	加至 1000 mL

A.4.3 1×TAE 电泳缓冲液。使用前将 50×TAE 电泳缓冲液做 50 倍稀释即可。

附录 B
(资料性)
试验成立条件图

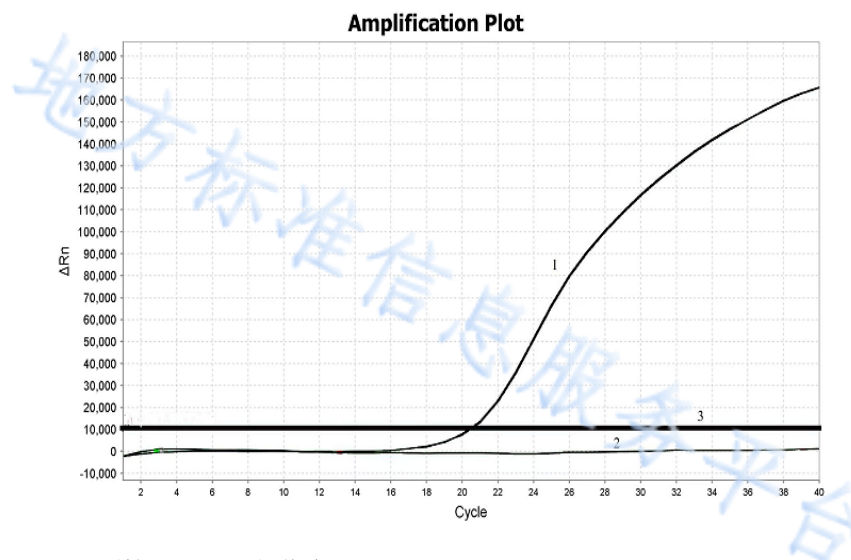
牛呼吸道合胞体病毒 RT-PCR 检测阳性参见图 B.1。



说明：M—DNA 分子量标准（DL2000 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。

图B.1 牛呼吸道合胞体病毒 RT-PCR 检测结果参照图

牛呼吸道合胞体病毒实时荧光 RT-PCR 检测结果参见图 B.2。



图B.2 牛呼吸道合胞体病毒实时荧光 RT-PCR 检测结果参照图