

# DB36

江西省地方标准

DB36/T 1747—2023

## 新型鹅星状病毒病诊断技术规程

Diagnostic technical regulations for novel goose astrovirus disease

地方标准信息服务平台

2023-02-10 发布

2023-08-01 实施

江西省市场监督管理局 发布



## 目 次

前 言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 临床诊断 .....	1
5 实验室诊断 .....	2
6 综合判定 .....	6
附录 A (资料性附录) 病毒分离所需仪器设备和试剂耗材 .....	7
附录 B (资料性附录) 样品的采集、处理、运输及保存 .....	8
附录 C (资料性附录) RT-PCR 所需仪器设备和试剂耗材 .....	9
附录 D (资料性附录) 荧光 RT-PCR 所需仪器设备和试剂耗材 .....	10
附录 E (资料性附录) RT-LAMP 方法所需仪器设备和试剂耗材 .....	11
附录 F (资料性附录) 新型鹅星状病毒 RT-PCR 引物、荧光 RT-PCR 的引物和探针、RT-LAMP 引物 .....	12
参 考 文 献 .....	14

地方标准信息服务平台

## 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》规定起草。

本文件由江西省农业农村厅提出并归口。

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。

本文件起草单位：江西省农业科学院畜牧兽医研究所。

本文件主要起草人：李海琴、张帆帆、康昭凤、谭美芳、杨群、曾艳兵、韦启鹏、黄江南、方绍培、谭佳、吴诚诚、季华员。

地方标准信息服务平台

# 新型鹅星状病毒病诊断技术规程

## 1 范围

本文件规定了新型鹅星状病毒病的术语定义、临床诊断、实验室诊断和综合判定技术要求。  
本文件适用于新型鹅星状病毒病的诊断和流行病学调查。

## 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，凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 19489 实验室生物安全通用要求

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

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**新型鹅星状病毒** novel goose astrovirus, NGoAstV

属于星状病毒科（Astroviridae）禽星状病毒属（Avastrovirus），星状病毒（Astroviruses, AstV）是一种呈球形的RNA病毒，直径为25nm~35 nm，病毒表面无囊膜，有5个~6个突起，用透射电子显微镜观察呈五角星状或六角星状。

### 3.2

**新型鹅星状病毒病** novel goose astrovirus disease, NGoAstVD

指由新型鹅星状病毒引起的以雏鹅尿酸盐沉积在关节和（或）内脏为主要病理特征的传染病。。

### 3.3

**鸡肝癌细胞系** chicken hepatoma cell line, LMH

LMH细胞系是利用患肝细胞癌的鸡肝细胞致突变培育而成，是一种可以持续传代的鸡肝癌细胞系。

## 4 临床诊断

### 4.1 流行病学

病鹅、隐性带毒鹅、带毒种蛋是主要传染源，自然感染的潜伏期是3 d，该病既可垂直传播、也可

水平传播。各品种鹅均易感，5日龄~20日龄雏鹅最易感，最早可在3日龄发病。死亡率30%~40%，最高可超过50%。

## 4.2 临床症状

患鹅精神沉郁，食欲减退，饮水量增加，消瘦，四肢瘫痪，排白色稀便，发病高峰期约在7日龄~14日龄。

## 4.3 病理变化

### 4.3.1 剖检病变

剖检病理变化主要表现为肾脏呈花斑肾，输尿管尿酸盐沉积，有的关节腔尿酸盐沉积严重，有的心脏、肝脏表面有白色尿酸盐沉积。

### 4.3.2 组织学病变

患鹅肾小管上皮细胞脱落坏死，管腔内充满粉红色的尿酸盐沉积，肾间质出血，肾小球肿胀；有的心脏组织中心肌纤维排列紊乱、肿胀，有的肝脏可见少量炎性细胞或肝细胞空泡变性。

## 4.4 临床诊断结果判定

符合4.1流行病学特征、病鹅出现4.2临床症状和4.3病理变化，可判定为新型鹅星状病毒病疑似病例，应进行实验室确诊。

## 5 实验室诊断

实验室生物安全要求按照GB 19489执行。

### 5.1 病毒分离

试验设备和试剂耗材准备见附录A，样品准备见附录B。

#### 5.1.1 细胞分离

##### 5.1.1.1 细胞的准备

细胞的准备工作包括以下内容：

- a) 在37℃水浴中提前预热消化液（0.25%胰酶）和DMEM/F12细胞培养液，将生长良好的LMH细胞用无菌PBS洗涤2次，弃去PBS；
- b) 加入0.25%胰酶消化为单个细胞，加入细胞培养液，用吸管轻轻吹散细胞，再加入细胞培养液，用吸管轻轻吹打使细胞分散均匀后，按每孔1 mL加入到细胞培养瓶；
- c) 在37℃含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养24 h~36 h，密度达到80%时，用于细胞分离。

##### 5.1.1.2 病毒的分离培养

病毒的分离培养工作包括以下内容：

- a) 将上述细胞培养液弃掉，用无菌PBS洗涤3次后，将处理好的样品接种到单层细胞上，每孔0.2 mL~0.4 mL；

- b) 放入细胞培养箱 1 h~2 h, 每隔 15 min 轻轻摇动一次, 吸附后弃掉液体, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 加入细胞维持液, 每孔 1 mL;
- c) 于 37 °C 含 5 % CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中连续培养 5 d, 每天观察细胞状态;
- d) 待细胞液变黄, 将细胞培养瓶反复冻融 3 次, 细胞液经 5000 rpm 离心 10 min 后取上清用于检测或置于-80 °C 保存。

## 5.1.2 鹅胚分离

### 5.1.2.1 种蛋准备

将种鹅蛋（新型鹅星状病毒阴性）置于孵化器中 37 °C 下孵育 10 d~11 d, 用于病毒分离。

### 5.1.2.2 鹅胚接种

将待检样品以 0.2 mL/胚的剂量经绒毛尿囊膜途径接种 10 日龄~11 日龄鹅胚, 37 °C 恒温培养箱中培养, 每天照蛋 2 次, 连续观察 6 d, 并记录死胚情况。

### 5.1.2.3 尿囊液收集

弃掉接种后 24 h 内死亡的鹅胚, 若接种 2 d~6 d 内鹅胚出现死亡, 则收集死亡鹅胚的尿囊液; 若接种 6 d 内鹅胚不出现死亡, 则收集 6 d 活胚的尿囊液。

## 5.2 病毒的鉴定

### 5.2.1 RT-PCR 技术

试验设备和试剂耗材准备见附录 C。

#### 5.2.1.1 病毒 RNA 的提取

提取待检组织样品总 RNA, 提取的 RNA 立即用于反转录, 否则置于-80 °C 冰箱冻存。

#### 5.2.1.2 病毒 cDNA 的合成

采用 50 μL 体系, 于无菌无酶 EP 管中依次加入 RNA 模板 5 μL、Buffer 缓冲液 10 μL, 随机引物 2 μL、dNTPs (2.5 mM each) 4 μL、M-MLV 反转录酶 (200 U/μL) 1 μL, RNA 酶抑制剂 (40 U/μL) 2 μL, 补充无菌水至总体积共 50 μL, 置于 PCR 仪中进行 cDNA 合成, 以 25 °C 5 min、50 °C 45 min、85 °C 2 min、4 °C 5 min 的程序进行一个循环, cDNA 合成后进行 PCR 扩增或于-20 °C 保存备用。

#### 5.2.1.3 PCR 反应体系及反应条件

配置 PCR 反应液, 在样品制备区加样。采用 25 μL 反应体系, 见表 1 所示。

表 1 PCR 反应体系

试剂	体积 (μL)
2×PCR Mix	12.5
上游引物 (10 μmol/L)	1.0
下游引物 (10 μmol/L)	1.0
模板 cDNA	2.0
无 RNA 酶去离子水	8.5
总体积	25.0

瞬时离心，置PCR扩增仪内进行扩增，反应程序为95℃预变性3 min；然后进入扩增循环：95℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 45 s，35个循环；最后72℃延伸8 min，4℃结束反应。

#### 5.2.1.4 PCR产物检测

将制备好的1.0%琼脂糖凝胶放入电泳槽（带加样孔的一端在阴极），倒入电泳液（1×TAE）浸过胶面。DNA Marker、阴性对照产物、PCR产物和阳性对照产物各取7 μL加入胶孔内，在110 V电压下电泳20 min~40 min；在凝胶成像分析系统下观察、拍照，并记录结果。

#### 5.2.1.5 RT-PCR结果判定

##### 5.2.1.5.1 试验成立的条件

阴性对照样品无条带，阳性对照样品出现489 bp大小的条带，试验条件成立。必要时，对扩增片段进行序列测定。

##### 5.2.1.5.2 试验结果的判定

在试验成立的前提下，待检样品出现489 bp大小的条带，判定待检样品为新型鹅星状病毒PCR阳性。否则为阴性，必要时，对扩增片段进行序列测定。

#### 5.2.2 荧光RT-PCR技术

试验设备和试剂耗材准备见附录D。

##### 5.2.2.1 病毒RNA的提取

同5.2.1.1。

##### 5.2.2.2 病毒cDNA的合成

同5.2.1.2。

##### 5.2.2.3 荧光定量PCR反应体系和反应条件

将试剂盒中预混液、引物和探针取出，置于冰上直至融化，将下列试剂依次加入到无RNA酶的荧光定量PCR管中。采用20 μL反应体系，见表2所示。

表2 荧光定量PCR反应体系

试剂	体积 (μL)
2 × 荧光定量PCR预混液	10.0
上游引物(10 μmol/L)	0.4
下游引物(10 μmol/L)	0.4
探针(10 μmol/L)	0.4
cDNA	1.0
无RNA酶去离子水	7.8
总体积	20.0

将上述成分分别加入荧光定量PCR管中，轻轻混合均匀，瞬时离心，打开荧光定量PCR仪和联机计算机，将上述荧光定量PCR管置于荧光定量PCR仪内，设置反应程序为94℃ 30 s，94℃ 5 s，60℃ 30 s，45个循环；4℃终止反应。



#### 5.2.2.4 荧光定量 PCR 结果判定

##### 5.2.2.5.1 试验成立的条件

阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增的最高点为准。阴性对照的检测结果应无特异性扩增，阳性对照Ct值应 $<28$ ，则试验结果成立。

##### 5.2.2.5.2 试验结果的判定

判定结果按照以下要求：

- a) Ct 值 $<30$ ，而且出现明显的扩增线，表明样品中存在新型鹅星状病毒，判为阳性；
- b) 无 Ct 值，并且无扩增曲线，或者 Ct 值 $>35$ ，表明样品中无新型鹅星状病毒，判为阴性；
- c)  $30 \leq \text{Ct 值} \leq 35$  的样品，判为可疑，必须重做，重做结果 Ct 值 $<30$  者判为阳性，否则判为阴性。

#### 5.2.3 RT-LAMP 方法

试验设备和试剂耗材准备见附录E。

##### 5.2.3.1 病毒 RNA 的提取

同5.2.1.1。

##### 5.2.3.2 病毒 cDNA 的合成

同5.2.1.2。

##### 5.2.3.3 LAMP 反应体系和反应条件

配置LAMP反应液，在样品制备区加样。采用25  $\mu\text{L}$ 反应体系，见表3所示。

表 3 LAMP 反应体系

试剂	体积 ( $\mu\text{L}$ )
2 $\times$ buffer	12.5
酶混合物(EM)	1.0
内引物-NGoAstV-FIP	1.0
内引物-NGoAstV-BIP	1.0
外引物-NGoAstV-F3	0.5
外引物-NGoAstV-B3	0.5
环引物-NGoAstV-LB	1.0
环引物-NGoAstV-LF	1.0
cDNA	2.0
无RNA酶去离子水	4.5
总体积	25.0

将上述成分分别加入无菌的 PCR 管中，轻轻混合均匀、离心后置于 PCR 扩增仪内进行扩增，反应程序 64  $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min，然后 85  $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 min 进行酶灭活处理。

##### 5.2.3.4 LAMP 结果判定

##### 5.2.3.5.1 试验成立条件

反应结束后，取TE染料加入产物中，混匀后在紫外线下观察。在阳性对照出现黄绿色荧光，同时阴性对照不出现黄绿色荧光的情况下，试验成立。

#### 5.2.3.5.2 结果判定

在紫外线下被检样品出现黄绿色荧光，判为阳性；在紫外线下被检样品未出现黄绿色荧光，判为阴性。

### 6 综合判定

符合临床诊断规定的疑似病例经5.2.1、5.2.2、5.2.3中的任一方法检测，结果为阳性者，可判定为新型鹅星状病毒病。

地方标准信息服务平台

附 录 A  
(资料性附录)  
病毒分离所需仪器设备和试剂耗材

## A.1 细胞分离

### A.1.1 仪器和设备

生物安全柜、可调微量移液器（2  $\mu\text{L}$ -20  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ -200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ -1000  $\mu\text{L}$ ）、高压蒸汽灭菌锅、无菌离心管（1.5 mL、15 mL、50 mL）、冰箱（4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-80 $^{\circ}\text{C}$ ）、漩涡振荡器、细胞培养箱、细胞培养瓶（25 $\text{cm}^2$ 、75 $\text{cm}^2$ 、175 $\text{cm}^2$ ）。

### A.1.2 试剂

磷酸盐缓冲液（PBS）、DMEM/F12细胞培养液、胎牛血清（FBS）、胰酶、青霉素-链霉素溶液。

### A.1.3 分离病毒用细胞

鸡肝癌细胞系（LMH），LMH培养特性见参考文献<sup>[1]</sup>。

### A.1.4 培养液配制

#### A.1.4.1 细胞培养液

在DMEM/F12培养液中加入10%FBS、1%青霉素-链霉素溶液（1万 U/mL），用于LMH细胞培养。

#### A.1.4.2 细胞维持液

在DMEM/F12培养液中加入2%FBS、1%青霉素-链霉素溶液（1万 U/mL），用于病毒感染后的LMH细胞维持。

## A.2 鹅胚分离

### A.2.1 仪器设备与试剂耗材

可调微量移液器（2  $\mu\text{L}$ -20  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ -200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ -1000  $\mu\text{L}$ ）、高压蒸汽灭菌锅、无菌注射器（1 mL、5 mL）、无菌剪刀、无菌镊子、无菌离心管（1.5 mL、15 mL、50 mL）、无RNA酶的带滤芯枪头、75%酒精、碘伏、冰箱（4  $^{\circ}\text{C}$ 、-20  $^{\circ}\text{C}$ 、-80  $^{\circ}\text{C}$ ）、孵化箱。

**附 录 B**  
(资料性附录)  
样品的采集、处理、运输及保存

### B.1 仪器设备与耗材

台式高速冷冻离心机、高压蒸汽灭菌锅、高压灭菌的剪刀、高压灭菌的镊子、旋涡振荡器、可调微量移液器（2  $\mu\text{L}$ -20  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ -200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ -1000  $\mu\text{L}$ ）、无菌注射器（1 mL、5 mL）、无RNA酶的1.5 mL离心管、无RNA酶的带滤芯枪头、0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤器、冰箱（4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-80 $^{\circ}\text{C}$ ）、一次性口罩、一次性手套和一次性帽子。

### B.2 样品采集

可采标NY/T 541。采集和样品前处理过程中应戴一次性手套、口罩、帽子，采集过程中样品不得交叉污染。样品采集过程包括以下要求：

- 1) 组织样品：采集死亡鹅或发病鹅的心、肝、肺、肾、脾等组织，采集病料时，用无菌的剪刀剪取组织样品，将样品装入一次性无菌 50 mL 离心管或一次性洁净塑料自封袋，密封、编号，待检；
- 2) 细胞培养上清液：直接将细胞培养上清液加入到灭菌的 1.5 mL 离心管中，加盖、编号，待检。
- 3) 鹅胚尿囊液：直接将鹅胚尿囊液加入到灭菌的 1.5 mL 离心管中，加盖、编号，待检；
- 4) 肛拭子样品：取泄殖腔棉拭子时，将棉拭子深入泄殖腔转 3 圈并沾取少量粪便，将棉拭子头一并放入盛有 1 mL PBS 的无菌离心管中，盖上管盖并编号，10000 rpm 离心 5 min 后取上清备用。

### B.3 样品处理

#### B.3.1 组织样品

在生物安全柜内用灭菌剪刀剪碎后按照1:5加入无菌PBS（pH 7.4、0.01 mol·L<sup>-1</sup>）进行研磨，反复冻融3次后，在4 $^{\circ}\text{C}$ 下10000 rpm 离心15 min，上清液经0.22  $\mu\text{m}$ 滤器过滤后-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

#### B.3.2 细胞上清液和鹅胚尿囊液

将细胞培养液和鹅胚尿囊液在4 $^{\circ}\text{C}$ 下10000 rpm 离心15 min，将上清液转入灭菌的1.5 mL离心管中，依据原样品地编号。

## 附 录 C

### (资料性附录)

#### RT-PCR 所需仪器设备和试剂耗材

##### C.1 仪器设备与耗材

PCR基因扩增仪、核酸电泳仪、核酸电泳槽、凝胶成像分析系统、台式高速冷冻离心机、可调微量移液器（0.1  $\mu\text{L}$ -2.5  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ -20  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ -200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ -1000  $\mu\text{L}$ ）、无RNA酶的1.5 mL离心管、无RNA酶的PCR管、无RNA酶的带滤芯枪头。

##### C.2 试剂

商品化RNA提取试剂盒、无RNA酶去离子水、反转录试剂盒（包括Buffer缓冲液、M-MLV反转录酶、RNA酶抑制剂）、2 $\times$ PCR Mix、dNTPs(2.5 nmol/L each)、DNA Marker、电泳级琼脂糖、Tis-乙酸电泳缓冲液TAE(50 $\times$ TAE, 1 $\times$ TAE)、1%琼脂糖、阳性对照（新型鹅星状病毒）、阴性对照（阴性尿囊液或正常细胞）。

##### C.3 引物

###### C.3.1 随机反转录引物

Random 9 反转录引物。

###### C.3.2 RT-PCR引物

针对鹅星状病毒的RT-PCR检测引物，参照附录F。

地方标准信息服务平台

## 附录 D

(资料性附录)

### 荧光 RT-PCR 所需仪器设备和试剂耗材

#### D.1 仪器设备与耗材

台式高速冷冻离心机、实时荧光定量PCR仪、涡旋振荡器、可调微量移液器(0.1  $\mu\text{L}$ -2.5  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ -20  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ -200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ -1000  $\mu\text{L}$ )、无RNA酶的1.5 mL离心管、无RNA酶的荧光定量PCR管、无RNA酶的带滤芯枪头。

#### D.2 试剂

商品化RNA提取试剂盒、无RNA酶去离子水、反转录试剂盒(包括Buffer缓冲液、M-MLV反转录酶、RNA酶抑制剂)、实时荧光定量PCR试剂盒、dNTPs(2.5 nmol/L each)、阳性对照(新型鹅星状病毒)、阴性对照(阴性尿囊液或正常细胞)。

#### D.3 引物

##### D.3.1 特异反转录引物

Random 9 反转录引物。

##### D.3.2 荧光定量RT-PCR引物和探针

针对鹅星状病毒的荧光PCR引物和探针, 参照附录F。

## 附 录 E

(资料性附录)

### RT-LAMP 方法所需仪器设备和试剂耗材

#### E.1 仪器设备与耗材

高速冷冻离心机、水浴锅、紫外分析仪、可调微量移液器(0.1  $\mu\text{L}$ -2.5  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ -20  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ -200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ -1000  $\mu\text{L}$ )、无RNA酶的1.5 mL离心管、无RNA酶的PCR管、无RNA酶的带滤芯枪头。

#### E.2 试剂

商品化RNA提取试剂盒、无RNA酶去离子水、反转录试剂盒(包括Buffer缓冲液、M-MLV反转录酶、RNA酶抑制剂)、商品化LAMP 扩增试剂盒、TE 可视染料、阳性对照(新型鹅星状病毒)、阴性对照(阴性尿囊液或正常细胞)。

#### E.3 引物

##### E.3.1 随机反转录引物

Random 9 反转录引物。

##### E.3.2 RT-PCR引物

针对鹅星状病毒的RT-LAMP检测引物, 参照附录F。

地方标准信息服务平台

附 录 F  
(资料性附录)

新型鹅星状病毒 RT-PCR 引物、荧光 RT-PCR 的引物和探针、RT-LAMP 引物

F.1 新型鹅星状病毒RT-PCR检测引物

见表F.1。

表 F.1 鹅星状病毒 RT-PCR 检测用引物和探针

引物名称	引物序列 (5'→3', 上下两行分别为上下游引物序列)	产物大小(bp)	基因	用途
NGoAstV-F	ATTCTTGGCTCGGTTGTC	489	ORF2	RT-PCR
NGoAstV-R	CCTGTGTTGCTCCTTCTC			

F.2 新型鹅星状病毒荧光RT-PCR检测用引物和探针

见表F.2。

表 F.2 荧光 RT-PCR 检测用引物和探针

引物名称	引物序列 (5'→3', 上下两行分别为上下游引物序列)	产物大小(bp)	基因	用途
NGoAstV-F	CAATCTTTCCTGTGCATG	107	ORF1a	荧光 RT-PCR
NGoAstV-R	CATTCTTGTTCCTCCAGGTGTGCTT			
探针引物	FAM-AGCCACTAATATAGATGTCAT-TAMRA			

F.3 RT-LAMP检测引物

见表F.3。

表 F.3 RT-LAMP 检测用引物和探针

引物名称	引物序列 (5'→3', 上下两行分别为上下游引物序列)	基因	用途
NGoAstV-F3	GTTGAAGCAACGGTCACTT	ORF1b	RT-LAMP
NGoAstV-B3	AGGTCTGCGCATTGAAAC		
NGoAstV-FIP	TGCCGTTTTCCCTGATGCTGAA-TCGAACTATGGTCCAAAGCC		
NGoAstV-BIP	ATACCCAGGATGGTGCACCTTGC-TGTGTTGCTCCTTCTCATCG		
NGoAstV-LF	TCACTGGTCATGAGTGAGA		
NGoAstV-LB	CGCATTGCAGAGATTCCT		

F.4 引物和探针的稀释



开盖前，将新合成的引物或探针进行短暂离心（12000 rpm，30 s）；用DEPC处理的灭菌去离子水溶解，加水量为10×总纳摩尔数（例如，合成引物或探针1 OD，5.5 nmol，则加水量为10×5.5=55 μL）。

地方标准信息服务平台

参 考 文 献

- [1] 赵蕾, 史爱华, 李林,等.鸡肝癌细胞系LMH培养特性的研究, 中国家禽, 2021,43(2):116-120.
- 

地方标准信息服务平台