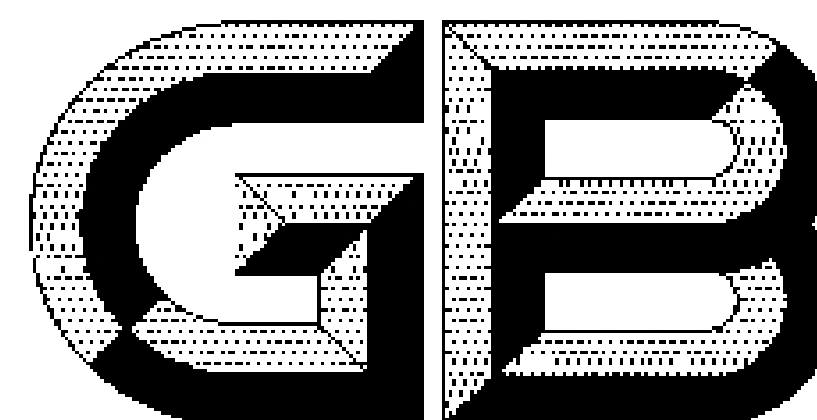




中华人民共和国国家标准

GB/T 42115—2022

牛恶性卡他热诊断技术

Diagnostic techniques for bovine malignant catarrhal fever

2022-12-30 发布

2023-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、青海省动物疫病预防控制中心、新疆维吾尔自治区动物疫病预防控制中心、江西省动物疫病预防控制中心、西藏自治区动物疫病预防控制中心、新疆生产建设兵团动物疫病预防控制中心、黑龙江省动物疫病预防与控制中心。

本文件主要起草人：孙雨、王瑞红、杨林、李晓霞、王睿男、蔡金山、赵晓春、王传彬、阚威、甘平、王文、央珍、张旭、马英、邵剑挺、马晓艳、肖开提·阿不都克力木、游潇倩、都占林、林元清、张晓英、蒋菲、魏巍、顾小雪、苏晓慧、美热木古丽·巴依待拉提、任娟、薛文、秦菊、努尔麦麦提·阿穆提、沙娜瓦尔·塔西、马伟、孙航、冯冰、陈玲。

引 言

牛恶性卡他热(Bovine Malignant Catarrhal Fever, BMCF)是由疱疹病毒科丙型疱疹病毒亚科的恶性卡他热病毒(Malignant Catarrhal Fever Virus, MCFV)引起,以高热、双侧角膜混浊、口鼻部坏死、口腔黏膜溃疡、高死亡率为特征的急性、高度致死性传染病。该病主要发生于非洲,也见于欧洲、亚洲以及其他地区,水牛、奶牛和黄牛等多种反刍动物易感,我国《一、二、三类动物疫病病种名录》将其列为二类动物疫病。在与反刍动物相关的至少 10 余种疱疹病毒中,能引发恶性卡他热且具有致病性的病原分别是绵羊疱疹病毒 2 型(Ovine Herpesvirus 2, OvHV-2)和狷羚疱疹病毒 1 型(Alcelaphine Herpesvirus 1, AlHV-1),事实上几乎所有的牛恶性卡他热临床病例,都是由绵羊和牛羚所携带的病毒感染造成的。在没有牛羚等野生动物的地区,家养的绵羊也能感染本病,且多为不表现临床症状的隐性感染,这成为牛的主要感染来源。患病牛的主要特征为短期高烧,口、鼻和眼睛的黏膜出现高度炎症,甚至有出血和溃疡,早期可见神经症状,急性致死率非常高。牛恶性卡他热的临床症状易与牛病毒性腹泻/黏膜病、口蹄疫、牛传染性鼻气管炎、牛瘟、蓝舌病和水泡性口炎混淆;当伴有严重的神经症状时,与狂犬病、蜱传播性脑炎临床症状较为相似,需要做实验室鉴别诊断。

本文件参考了《陆生动物诊断试剂和疫苗使用手册》(OIE)的有关内容,技术方法与 OIE 推荐的标准方法一致。其中病原分离方法适用于从活体动物肿胀的体表淋巴结、外周血液中以及从死亡动物的脾脏、肾脏或肝脏中分离 MCFV;聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)适用于检测 MCFV 核酸,可用于对前病毒 DNA 的检测;间接免疫荧光抗体试验、酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)适用于检测血清样品中的 MCFV 抗体,可用于实验室诊断、流行病学调查、检验检疫。

牛恶性卡他热诊断技术

1 范围

本文件规定了牛恶性卡他热的临床诊断、病理诊断和综合判定的技术要求,描述了病原学和血清学检测方法。

本文件适用于牛恶性卡他热的临床诊断、实验室检测、流行病学调查以及检验检疫。

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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 临床诊断

4.1 流行病学

4.1.1 牛恶性卡他热常发生于水牛、奶牛、黄牛等牛属反刍动物。在所有易感动物中黄牛和水牛易感性强,尤以1岁~4岁的青壮年牛易发病,老年牛发病较少。少数牛发病后呈温和型或隐性感染的情况,并持续带毒。

4.1.2 牛羚、角马、羚羊等野生动物以及吸血昆虫是本病的主要传染源;在没有牛羚等野生动物的地区,隐性感染的绵羊是本病的主要感染来源,发病牛常有与绵羊接触的历史,如同群放牧或者同栏饲养等。

4.1.3 牛恶性卡他热病毒主要存在于病牛的血液、脑、脾、淋巴结等组织中,可通过吸血昆虫机械性传播;病毒也可以通过胎盘感染。潜伏期一般为10 d~34 d。

4.2 临床症状

4.2.1 头眼型

头眼型为最常见的病型,死亡率较高。病初体温升高至40℃以上,食欲和反刍减少,头部皮肤发热。常在发病的第2天出现眼、口、鼻黏膜症状,双眼结膜剧烈发炎,流出黄褐色脓性及纤维素性分泌物;眼睑肿胀,角膜混浊,严重的表面形成溃疡,甚至引起角膜穿孔。病程多为1周~2周,随着病程发展,病牛严重虚弱,衰竭而死。

4.2.2 最急性型

牛突然发病,体温升高到 41℃~42℃,精神沉郁,食欲和反刍减少或者停止,喜饮水,鼻镜干热,呼吸和心跳加快,明显衰竭,1 d~2 d 内死亡。

4.2.3 肠型

该型较少见,除体温升高等一般临床症状外,消化道症状较为明显。初便秘,后腹泻,粪便中混有血液和脱落的坏死组织,腥臭。排尿次数增多,尿呈酸性,混浊,有时混有血液。眼有轻度的结膜炎。

4.2.4 皮肤型

除了具有 4.2.1 的症状外,颊部、背部、乳房等部位的皮肤出现丘疹、水疱和龟裂坏死,形成痂皮等变化,并有斑状脱毛区,角基部、会阴部、蹄冠周围和趾间也会出现类似症状。

5 病理诊断

5.1 头眼型

有类似于白喉的病理变化,表现为咽部黏膜上皮细胞坏死,并逐渐扩大融合,同时可见局部黏膜血管扩张充血,大量纤维蛋白渗出与坏死细胞、白细胞和细菌凝结在一起,覆盖在破坏的黏膜表面出现灰白色假膜,假膜形成处及周围组织呈轻度充血肿胀。鼻骨、筛骨有坏死性变化。上皮下淋巴浸润,全身性淋巴增殖和坏死,出现广泛性血管炎。肾脏和肝脏等部位的血管出现淋巴细胞或者单核细胞浸润。

5.2 最急性型

心肌、肝、肾及淋巴结肿大,心肌变性、心包充血,消化道黏膜尤其是真胃黏膜明显发炎,并伴有高度充血、出血现象。

5.3 肠型

胃肠道有出血点及溃疡点,肝脏和肾脏有不同程度的肿大和出血。口腔、皱胃和小肠的黏膜呈弥漫性出血,有的可见散在的点状出血、溃疡和糜烂,肠内容物呈水样,常混有血液。

5.4 皮肤型

颊部、背部、乳房、角基部、会阴部、蹄冠周围和趾间等区域皮下组织有弥漫性出血点、溃疡点、水肿及相应炎症病理变化。

注:皮肤型牛恶性卡他热病理变化较轻。

6 病原学方法

6.1 基本要求

除特殊说明外,本文件所有操作程序均应符合 GB 19489 的规定。

6.2 病原分离与鉴定

6.2.1 试剂耗材

除特殊说明外,本文件使用的化学试剂均为分析纯,水均为符合 GB/T 6682 标准的二级水。

- 6.2.1.1 商品化的白细胞提取试剂盒。
- 6.2.1.2 细胞生长液:按附录 A 中的 A.1 描述的方法配制。
- 6.2.1.3 细胞维持液:按 A.2 描述的方法配制。
- 6.2.1.4 Hank's 平衡盐溶液。
- 6.2.1.5 细胞消化液:按 A.3 描述的方法配制。
- 6.2.1.6 青霉素、链霉素(双抗)液:按 A.4 描述的方法配制。
- 6.2.1.7 pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS):按 A.5 描述的方法配制。
- 6.2.1.8 牛甲状腺细胞:按照附录 B 给出的方法制备。
- 6.2.1.9 细胞培养瓶:25 cm²。
- 6.2.1.10 灭菌吸管:5 mL、10 mL。
- 6.2.1.11 无菌滤芯吸咀。
- 6.2.1.12 抗凝真空采血管。
- 6.2.1.13 聚四氟乙烯袋。

6.2.2 仪器设备

- 6.2.2.1 二氧化碳培养箱。
- 6.2.2.2 普通冰箱(2 ℃ ~8 ℃)。
- 6.2.2.3 低温冰箱(-20 ℃)。
- 6.2.2.4 倒置生物显微镜。
- 6.2.2.5 二级生物安全柜。
- 6.2.2.6 超净工作台。
- 6.2.2.7 通用离心机。
- 6.2.2.8 微量可调移液器(10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)及相应吸头。

6.2.3 样品采集

无菌采集表现出 4.2 描述的临床症状,剖检出现第 5 章描述的病理变化的病牛的抗凝外周血或新鲜脾脏、淋巴结。

6.2.4 试验步骤

6.2.4.1 血液样品

6.2.4.1.1 样品处理

外周血液样品按照商品化的白细胞提取试剂盒说明书提取白细胞,用细胞生长液制成白细胞悬液。将白细胞悬液加入聚四氟乙烯袋中,37 ℃、5%二氧化碳条件下培养 10 d~12 d。

6.2.4.1.2 白细胞培养

牛甲状腺单层细胞用细胞维持液洗 2 次,加入 2 mL~5 mL 6.2.4.1.1 中制备的白细胞悬液,再加入细胞培养液,37 ℃、5% 二氧化碳条件下培养。

6.2.4.1.3 结果观察

在加入新维持液前先以 pH 7.2 磷酸盐缓冲液洗一次,除去红细胞及没有贴壁的细胞,每 3 d 换液一次,连续培养约 7 d~21 d 并观察细胞病变。初代培养以形成多核巨细胞为主(多在接种后 3 d~14 d 内出现)。组织学检查,可见到嗜酸性核内包涵体。随传代次数的增加,细胞病变的出现速度及程度逐

渐加快加剧,游离病毒量也逐渐增多。观察期间应根据细胞生长状况换液和传代。

6.2.4.2 剖检样品

6.2.4.2.1 样品处理

将淋巴结或脾脏剪成 1 mm~2 mm 的碎块,充分磨碎后以维持液制成药 10% 的组织悬液,再经维持液 10 倍稀释后,自然静置使组织块下沉,取上清液置换长成单层的牛甲状腺细胞培养液。

6.2.4.2.2 细胞培养

37℃、5% 二氧化碳条件下培养,每 3 d 换液一次,直至细胞铺满细胞培养瓶底,用胰酶消化后分瓶培养并形成单层细胞后,记录细胞病变情况。

6.2.4.2.3 结果观察

连续培养约 7 d~21 d 并观察细胞病变。初代培养可以形成多核巨细胞为主(多在接种后 3 d~14 d 内出现)。组织学检查,可见到嗜酸性核内包涵体。随传代次数的增加,细胞病变的出现速度及程度逐渐加快加剧,游离病毒量也逐渐增多。观察期间应根据细胞生长状况换液和传代。

6.2.4.3 病毒的鉴定

恶性卡他热病毒感染细胞典型细胞病变为细胞融合形成合胞体,即多数细胞发生相互融合而成巨细胞。一般在接种后 3 d~14 d 内,初代培养的细胞即可形成多核巨细胞。每个合胞体细胞中含有 2 个~20 个细胞核,并且可见到嗜酸性核内包涵体。随传代次数的增加,细胞病变的出现速度及程度逐渐加快加剧。6.2.4.1、6.2.4.2 中培养的细胞如出现细胞病变,应按照附录 C 描述的方法将其制备成细胞培养飞片,并采用间接免疫荧光抗体技术(按照附录 D 给出的方法进行操作)。

6.2.4.4 结果判定

血液样品或剖检组织样品接种后,出现 6.2.4.3 中描述的细胞病变,并且经间接免疫荧光抗体染色,细胞培养飞片同阳性血清有荧光反应,则判定为牛恶性卡他热病毒分离阳性。

剖检组织样品接种后,未出现 6.2.4.3 中描述的细胞病变,并且经间接免疫荧光抗体染色,细胞培养飞片同阳性血清没有荧光反应,则判定为牛恶性卡他热病毒分离阴性。

6.3 聚合酶链式反应(半巢式)

6.3.1 试剂耗材

6.3.1.1 DNA 提取试剂盒。

6.3.1.2 商品化单核细胞分离试剂。

6.3.1.3 2×*Taq* 缓冲液。

6.3.1.4 10×PCR 反应液。

6.3.1.5 无核酸酶水。

6.3.1.6 DL-2000 DNA Marker。

6.3.1.7 1%琼脂糖凝胶(按附录 E 给出的方法进行配制)。

6.3.1.8 5×TBE 电泳缓冲液(按附录 E 给出的方法进行配制)。

6.3.1.9 无菌滤芯吸咀。

6.3.1.10 0.2 mL PCR 管。

6.3.2 仪器设备

- 6.3.2.1 PCR 扩增仪。
- 6.3.2.2 台式离心机。
- 6.3.2.3 凝胶成像仪。
- 6.3.2.4 普通冰箱(2℃~8℃)。
- 6.3.2.5 普通冰箱(-20℃)。
- 6.3.2.6 分光光度计。
- 6.3.2.7 微量可调移液器(10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)。

6.3.3 引物

引物及序列参见附录 F,引物用商品化的 DEPC 水配成 100 μmol/L 的储存液和 10 μmol/L 的工作液。

6.3.4 对照样品

- 阳性对照:含有目的基因片段的质粒或者病毒分离培养物。
- 阴性对照:空载体质粒或者正常组织细胞。

6.3.5 样品预处理

使用商品化单核细胞分离液提取试剂,提取抗凝血中的外周血单核细胞。若为组织样品,用无菌剪刀和镊子剪取典型病变组织 0.5 g~1.0 g,加入 0.5 mL~1 mL 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液,于组织匀浆器或研钵中充分匀浆或研磨,将组织悬液转入无菌离心管中备用。

6.3.6 试验步骤

6.3.6.1 DNA 提取

按商品化 DNA 提取试剂盒的操作说明书,提取模板 DNA,提取的 DNA 应迅速进行 PCR 扩增,或置于 -20℃ 冰箱备用。

6.3.6.2 半巢式 PCR 反应

6.3.6.2.1 第一轮 PCR 扩增

- 25 μL 反应体系配制如下:
 - 12.5 μL 的 2×Taq 缓冲液;
 - 1 μL 的上游引物 POL1(10 μmol/L);
 - 1 μL 的下游引物 POL2(10 μmol/L);
 - 5 μL 的模板 DNA;
 - 5.5 μL 的无核酸酶水。

取 0.2 mL PCR 反应管配制 25 μL 反应体系后,盖紧盖子并做好标记,将其置于 PCR 扩增仪上,按如下程序扩增:95℃预变性 15 min,94℃变性 60 s,60℃退火 60 s,72℃延伸 60 s,25 个循环,72℃终延伸 10 min。

6.3.6.2.2 第二轮 PCR 扩增(检测 OvHV-2 型恶性卡他热病毒核酸序列)

- 25 μL 反应体系配制如下:

- 12.5 μL 的 $2\times\text{Taq}$ 缓冲液；
- 1 μL 的上游引物 OMVPol2(10 $\mu\text{mol/L}$)；
- 1 μL 的下游引物 POL2(10 $\mu\text{mol/L}$)；
- 2 μL 的模板 DNA(第一轮 PCR 扩增产物)；
- 8.5 μL 的无核酸酶水。

取 0.2 mL PCR 反应管配制 25 μL 反应体系后,盖紧盖子并做好标记,将其置于 PCR 扩增仪上,按如下程序扩增:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。

6.3.6.2.3 第三轮 PCR 扩增(检测 AIHV-1 型恶性卡他热病毒核酸序列)

25 μL 反应体系配制如下:

- 12.5 μL 的 $2\times\text{Taq}$ 缓冲液；
- 1 μL 的上游引物 AlHVPol2(10 $\mu\text{mol/L}$)；
- 1 μL 的下游引物 POL2(10 $\mu\text{mol/L}$)；
- 2 μL 的模板 DNA(第一轮 PCR 扩增产物)；
- 8.5 μL 的灭菌双蒸水。

取 0.2 mL PCR 反应管配制 25 μL 反应体系后,盖紧盖子并做好标记,将其置于 PCR 扩增仪上,按如下程序扩增:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。

6.3.7 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

6.3.7.1 试验步骤

将 PCR 扩增产物和 DNA 分子量标准于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳,100 V~120 V 恒压电泳 20 min~40 min,在凝胶成像系统上观察结果,并做好记录。

6.3.7.2 试验成立条件

阳性对照的第一轮 PCR 产物电泳后在约 388 bp 的位置上出现一条特异性条带,第二轮 PCR 产物电泳后在约 173 bp 的位置上出现特异性条带,阴性对照 PCR 产物电泳后没有条带,试验结果成立;否则,结果不成立。

6.3.7.3 结果判定

6.3.7.3.1 琼脂糖凝胶电泳

在试验结果成立的前提下,如果使用 OvHV-2 引物,第二轮 PCR 产物经电泳后在约 173 bp 的位置出现特异性条带,则判该样品中含有绵羊疱疹病毒 2 型(OvHV-2 型)恶性卡他热病毒核酸;如果使用 AIHV-1 引物,第二轮 PCR 产物经电泳后在约 173 bp 的位置出现特异性条带,则判该样品中含有狨羚疱疹病毒 1 型(AIHV-1 型)恶性卡他热病毒核酸。

6.3.7.3.2 测序验证

为了进一步验证检测结果,可将 PCR 产物回收纯化后进行测序。如果测序结果与附录 F 中或与 GenBank 中绵羊疱疹病毒 2 型(OvHV-2 型)恶性卡他热病毒基因序列一致,则判该样品中含有 OvHV-2 型恶性卡他热病毒;如果测序结果与附录 F 中或与 GenBank 中狨羚疱疹病毒 1 型(AIHV-1 型)恶性卡他热病毒基因序列一致,则判该样品中含有 AIHV-1 型恶性卡他热病毒。

7 血清学诊断

7.1 双抗原夹心 ELISA 试验(S-ELISA)

采用夹心 ELISA 方法检测血清或血浆样品中 MCFV 抗体:预包被高纯度重组 MCFV 的 POL 抗原,待检血清中的抗 MCFV 抗体与包被抗原反应,再与酶标 MCFV 的 POL 抗原结合,形成抗原-抗体-酶标抗原复合物,加底物(TMB)显色,在酶标仪上测定光密度(OD)值,根据 OD 值判定有无 MCFV 抗体的存在。

7.2 试剂耗材

- 7.2.1 包被抗原:MCFV 的 POL 基因重组蛋白。
- 7.2.2 对照血清:牛恶性卡他热阴性血清、牛恶性卡他热阳性血清。
- 7.2.3 酶标抗原:HRP 酶标记的 MCFV 基因重组抗原。
- 7.2.4 PBST 稀释液:按附录 G 中 G.1 描述的方法进行配制。
- 7.2.5 底物溶液:按 G.2 描述的方法进行配制。
- 7.2.6 终止液:按 G.3 描述的方法进行配制。
- 7.2.7 微量可调移液器($10\ \mu\text{L}\sim 100\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$)及相应吸头。
- 7.2.8 八通道移液器($50\ \mu\text{L}\sim 300\ \mu\text{L}$)及相应吸头。
- 7.2.9 96 孔酶标板。

7.3 仪器设备

- 7.3.1 酶标仪。
- 7.3.2 恒温培养箱。
- 7.3.3 洗板机。
- 7.3.4 台式离心机。

7.4 试验操作

7.4.1 加样

在包被 MCFV 重组抗原的酶标板中分别加入阴性对照血清、阳性对照血清,每孔各 $50\ \mu\text{L}$ 。在每个待测样品孔中加入稀释后的样品 $50\ \mu\text{L}$ 。

7.4.2 孵育

用封口膜封住酶标板, $37\ ^\circ\text{C}$ 温育 45 min。

7.4.3 第 1 次洗板

弃去酶标板中液体,用工作浓度洗液洗板 5 次。

7.4.4 加入酶标抗原

每孔加入 $50\ \mu\text{L}$ 酶标抗原, $37\ ^\circ\text{C}$ 温育 30 min。

7.4.5 第 2 次洗板

按 7.4.3 方法洗板。

7.4.6 加底物

每孔中依次加入 50 μ L 底物溶液 A 液与 50 μ L 底物溶液 B 液,37 $^{\circ}$ C 下避光温育 15 min。

7.4.7 反应终止

每一孔中加入 50 μ L 终止液。

7.4.8 读取吸光度

在酶标仪上读取每孔的 450 nm 的吸光度,并读取 OD 值。

7.5 试验结果判定

7.5.1 试验成立条件

阳性对照 OD 值大于或等于 1.0,并且阴性对照 OD 值小于 0.2。

7.5.2 结果判定

临界值:临界值=阴性对照孔平均 OD 值+0.15;

阳性判定:血清样品 OD 值 $\geq$ 临界值,判定为 S-ELISA 检测阳性,表述为检出牛恶性卡他热血清抗体;

阴性判定:血清样品抑制率 $<$ 临界值,判定为 S-ELISA 检测阴性,表述为未检出牛恶性卡他热血清抗体。

8 综合判定

8.1 表现出 4.2 描述的临床症状,剖检出现第 5 章描述的病理变化的病牛,可初步判为牛恶性卡他热可疑病例。

8.2 可疑病例并且 6.2.4.4、6.3.7、7.5 任何一项阳性者,可判为牛恶性卡他热阳性确证病例。

附 录 A
(规范性)
细胞培养液的制备

A.1 细胞生长液

900 mL 的 DMEM 营养液加 100 mL 的胎牛血清混合,配制成 1 000 mL 的溶液,加入青霉素至终浓度 100 IU/mL,链霉素至终质量浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,充分混匀,过滤除菌后 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

A.2 细胞维持液

980 mL 的 DMEM 营养液加 20 mL 的胎牛血清混合,配制成 1 000 mL 的溶液,加入青霉素至终浓度 100 IU/mL,链霉素至终质量浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,充分混匀,过滤除菌后 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

A.3 细胞消化液

A.3.1 0.25%胰蛋白酶溶液的配制

称取 250 mg 胰蛋白酶粉末,加入少许 D-Hank's,将胰蛋白酶粉末调成糊状,再补足 D-Hank's 至 100 mL,磁力搅拌混匀,使其完全溶解,放置室温 4 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存过夜。

A.3.2 0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)的配制

称取 200 mg 的 EDTA $\cdot$ 2Na,加 D-Hank's 至 1 L,加入酚红 15 mg,用碳酸氢钠或盐酸调 pH 至 7.2。高压消毒灭菌(6.9×10^3 Pa,121 $^{\circ}\text{C}$,15 min),分装小瓶,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

将 0.02%EDTA 和 0.25%胰蛋白酶 1 : 1 等量混合。

A.4 青霉素、链霉素(双抗)液

1 g 链霉素(硫酸盐)溶解在 10 mL Hank's 液,再用 8 mL 链霉素(硫酸盐)溶液溶解 800 KIU 的青霉素粉,即配成含为 100 mg/mL 链霉素和 100 KIU/mL 青霉素的双抗母液。使用时,在 100 mL 培养基内加 0.1 mL 母液,则培养基内链霉素质量浓度为 0.1 mg/mL,青霉素浓度为 100 IU/mL。

A.5 pH 7.2 磷酸盐缓冲液

配制 pH 7.2 磷酸盐缓冲液所需试剂如下:

- 8 g 的氯化钠(NaCl);
- 0.2 g 的氯化钾(KCl);
- 1.44 g 的磷酸氢二钠(Na_2HPO_4);
- 0.24 g 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

试剂加水溶解至 1 L,调整 pH 为 7.2,然后高压灭菌,室温保存。

附 录 B
(规范性)
牛甲状腺细胞制备及传代

B.1 牛甲状腺原代细胞的制备

B.1.1 样品处理

无菌采取胎牛甲状腺,用 D-Hank's 洗 3 次,剪成 $1\text{ mm}^3 \sim 2\text{ mm}^3$ 的小块,加入少量的细胞生长液,混匀后加入细胞瓶中,弃去多余液体。

B.1.2 消化

用 3 倍~5 倍体积含 $0.1\% \sim 0.3\% \mu\text{g/mL}$ 的胶原酶组 DMEM 消化, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h,期间可振荡数次。

B.1.3 过滤洗涤

消化后的细胞悬液经 100 目不锈钢网过滤后,收集消化液。消化液 $1\ 000\text{ r/min}$ 离心 10 min,弃上清液,收集细胞,用 D-Hank's 洗涤。

B.1.4 培养

细胞沉淀用细胞生长液悬浮,调整细胞浓度至 0.5×10^7 个细胞/mL, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%二氧化碳条件下培养 24 h,弃去未贴壁细胞,换细胞生长液。此时已贴壁细胞为原代牛甲状腺细胞,继续培养,直至细胞长成连续单层细胞。

B.2 牛甲状腺细胞的传代

将已长成连续单层的原代细胞用无血清 DMEM 洗 2 次,用细胞消化液消化后加入细胞生长液重悬细胞。细胞悬液 $1\ 000\text{ r/min}$ 离心 10 min,用细胞生长液重浮细胞,调整细胞浓度至 0.5×10^7 个/mL,分瓶培养。

附 录 C
(规范性)
细胞培养飞片的制备

病毒接种细胞出现病变或确知细胞内含有丰富的病毒抗原后,用胰酶消化细胞,用 PBS 洗涤 3 次,用适量 PBS 悬浮细胞,将细胞悬液滴于玻片孔中。同时消化未感染病毒的同批细胞,滴加同一玻片另一孔内,作为正常细胞对照。孔内滴加的细胞以细胞铺开、不重叠为宜。室温干燥后,冷丙酮(4℃)固定 10 min 后,用 PBS 漂洗后,充分干燥,−20℃备用。

附 录 D
(规范性)
间接免疫荧光操作步骤

D.1 试剂耗材

- D.1.1 固定液:**称取 6.5 g 的磷酸氢二钠及 4.0 g 的磷酸二氢钠,加水溶解,加入 100 mL 甲醛(40%),加水定容至 1 L,调整 pH 值为 7.4。
- D.1.2 PBST 稀释液:**量取 50 mL 0.1 mol/L 的 PBS 和 0.25 mL 的吐温-20,加水混合,定容至 500 mL。
- D.1.3 封闭液:**牛血清白蛋白(BSA)粉末 1 g,加入 PBST 溶液定容至 100 mL。
- D.1.4 荧光抗体:**商品化的标记有荧光素或者罗丹明的抗牛免疫球蛋白。
- D.1.5 牛恶性卡他热阳性血清。**
- D.1.6 牛恶性卡他热阴性血清。**
- D.1.7 50%甘油:**丙三醇 50 mL,加入水定容至 100 mL。
- D.1.8 盖玻片。**

D.2 仪器设备

荧光显微镜。

D.3 操作步骤

- D.3.1** 取出细胞培养飞片,室温干燥后,1% BSA 封闭,37 °C 孵育 1 h。
- D.3.2** 用 PBST 稀释液洗 3 次,每次 5 min,室温干燥。
- D.3.3** 将适当稀释的牛恶性卡他热阳性血清、阴性血清分别滴于细胞培养飞片上,置湿盒内,37 °C 孵育 30 min~45 min。
- D.3.4** 用 PBST 稀释液洗 3 次,每次 5 min,室温干燥。
- D.3.5** 取适当稀释的荧光抗体,滴加于细胞培养飞片上,37 °C 孵育 30 min~45 min。
- D.3.6** 用 PBST 稀释液洗 3 次,每次 5 min,室温干燥。
- D.3.7** 50%甘油封片,荧光显微镜下观察。

D.4 结果判定

D.4.1 试验成立条件

阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均无荧光,阳性血清与正常细胞反应无荧光。

D.4.2 结果判定

细胞培养飞片与阳性血清荧光反应,同阴性血清无荧光反应,判为细胞培养飞片为阳性。

附 录 E
(规范性)
PCR 试验用溶液的配制

E.1 5×TBE 电泳缓冲液

称取 54 g 的三羟甲基氨基甲烷(Tris)、2.9 mg 的 EDTA 及 27.5 g 的硼酸,加入灭菌双蒸水溶解,定容至 1 L,用 5 mol/L 的盐酸调 pH 至 8.0。

E.2 1×TBE 电泳缓冲液

100 mL 电泳缓冲液(5×)和 400 mL 灭菌双蒸水混合。

E.3 1%琼脂糖凝胶

称取 2 g 的琼脂糖(电泳级),量取 40 mL 的 TBE 电泳缓冲液(5×),加灭菌双蒸水至 200 mL,微波炉中完全融化。

附 录 F

(资料性)

PCR 方法引物序列和特异性片段

F.1 引物序列

PCR 方法引物序列见表 F.1。

表 F.1 PCR 方法引物序列

引物	引物长度	序列(5'-3')	扩增产物大小
POL1	24 bp	5'-GGC(CT)CA(CT)AA(CT)CTATGCTACTCCAC-3'	388 bp
POL2	21 bp	5'-ATT(AG)TCCACAACTGTTTTGT-3'	
OvHVPol2	20 bp	5'-AAAAACTCAGGGCCATTCTG-3'	173 bp
AlHVPol2	20 bp	5'-CCAAAATGAAGACCATCTTA-3'	173 bp
注：括号中为插入的简并碱基，这些位置的核苷酸包含括号中两个注释碱基中的任何一个。			

F.2 扩增的片段序列

F.2.1 绵羊疱疹病毒 2 型(OvHV-2 型)恶性卡他热病毒第一轮扩增片段序列

GGCCCACAACCTATGCTACTCCACCAATTATACCCCACGAAAACCTGTCCAACCTTCCCTGACC
TGACCCCGAATGACTACGAGACCTTTTTTCATCAGCAGCGGGCCCGTGCACTTTGTGAAAAAGCAC
AAGTCCGAGTCCCTGTTGGCCAGCCTGCTGAAAACCTGGCTGGCCAAGAGGAAGGCCATCAGGA
AGGAGCTGGAGCAGTGTCAGGATGAAAAACTCAGGGCCATTCTGGACAAGCAGCAGCTGGCTAT
CAAGGTCACGTGCAACTCGGTGTATGGGTTTACTGGAGTAGCCTCCGGCATGCTGCCCTGCCTCA
TGATAGCCGAGACCGTGACTCTCCAGGGCCGAACCATGTTGGAGAAGACAAAACAGTTTGTGGA
AAAT

F.2.2 狨羚疱疹病毒 1 型(AIHV-1 型)恶性卡他热病毒第一轮扩增片段序列

GGCTCATAATCTATGCTACTCCACTCTGATCAAGCAGCAAGACCTTCCTAAATTTACCAACCTC
ACAGCAAATGACTATGAGACTTTTATGATAAGCGGTGGGCCTGTGCACTTTGTAAAGAAGCACAAG
ACTGAATCTCTGCTGGCCAGCCTGCTGAAAACCTGGTTGGCCAAGAGAAAGTCTATAAAAAAGGA
GCTGGAGCAGTGCCAGGATGCCAAAATGAAGACCATCTTAGATAAGCAGCAGCTGGCCATCAAAG
TCACGTGCAATTCAGTTTATGGATTTACTGGAGTGGCCTCTGGCATGCTCCCCTGCCTAATGATTGC
TGAGACCGTAACCCTGCAAGGCAGAACCATGCTAGAGAAAACAAAACAGTTTGTGGAGAAT

F.2.3 绵羊疱疹病毒 2 型(OvHV-2 型)恶性卡他热病毒第二轮扩增片段序列

AAAAACTCAGGGCCATTCTGGACAAGCAGCAGCTGGCTATCAAGGTCACGTGCAACTCGGT
GTATGGGTTTACTGGAGTAGCCTCCGGCATGCTGCCCTGCCTCATGATAGCCGAGACCGTGACTC
TCCAGGGCCGAACCATGTTGGAGAAGACAAAACAGTTTGTGGAAAAT

F.2.4 狨羚疱疹病毒 1 型(AIHV-1 型)恶性卡他热病毒第二轮扩增片段序列

CCAAAATGAAGACCATCTTAGATAAGCAGCAGCTGGCCATCAAAGTCACGTGCAATTCAGTT
TATGGATTTACTGGAGTGGCCTCTGGCATGCTCCCCTGCCTAATGATTGCTGAGACCGTAACCCT
GCAAGGCAGAACCAATGCTAGAGAAAACAAAACAGTTTGTGGAGAAT

附 录 G
(规范性)
S-ELISA 溶液的配制

G.1 PBST 稀释液

量取 50 mL 的 0.1 mol/L PBS、0.25 mL 的吐温-20,灭菌双蒸水加至 500 mL。

G.2 底物溶液

A 液:称取 20 mg 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺,量取 10 mL 无水乙醇,加灭菌双蒸水定容至 100 mL。

B 液:称取 2.1 g 柠檬酸、2.82 g 磷酸氢二钠,量取 0.64 mL 的 0.75%过氧化氢,加灭菌双蒸水定容至 100 mL。

使用时 A 液、B 液等体积混匀即可。

G.3 终止液[1%十二烷基硫酸钠(SDS)]

60 mL 蒸馏水中加入 1 g SDS,边加边搅拌,溶解后定容至 100 mL。
