



中华人民共和国农业行业标准

NY/T 576—2015
代替 NY/T 576—2002

绵羊痘和山羊痘诊断技术

Clinical diagnostic technology for sheep pox and goat pox

2015-05-21 发布

2015-08-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 NY/T 576—2002《绵羊痘和山羊痘诊断技术》。

本标准与 NY/T 576—2002 相比,病原检测部分增加了 PCR 检测方法。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:支海兵、薛青红、印春生、李宁、王乐元、江焕贤。

本标准的历次版本发布情况为:

——NY/T 576—2002。

绵羊痘和山羊痘诊断技术

1 范围

本标准规定了绵羊痘和山羊痘(以下简称羊痘)的诊断方法。

本标准所规定的临床检查和 PCR 试验适用于羊痘的诊断以及产地、市场、口岸的现场检疫;中和试验和 PCR 试验适用于羊痘的诊断、检疫和流行病学调查;电镜检查、包涵体检查适用于羊痘病原的检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE:cytopathic effect 致细胞病变作用。

H. E.:hematoxylin-eosinstaining 苏木精-伊红染色。

MEM:minimun essential medium 低限基础培养基。

PCR:polymerase chain reaction 聚合酶链反应。

Tris-EDTA:tris-ethylene diamine tetraacetic acid 三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸。

3 临床检查

3.1 临床症状

羊痘的潜伏期一般为 5 d~14 d,感染初期表现为发热,体温超过 40℃,精神、食欲渐差。经 2 d~5 d 后开始出现斑点,先在体表无毛或少毛皮肤、可视黏膜上出现明显的小充血斑,随后在全身或腹股沟、腋下、会阴部出现散在或密集的痘疹,进而形成痘肿,分典型痘肿和非典型痘肿。

a) 典型痘肿:初期时,痘肿呈圆形,皮肤隆起,微红色,边缘整齐;进而发展为皮下湿润、水肿、水泡、化脓、结痂等反应。同时,痘肿的质地由软变硬;皮肤颜色由微红逐渐变为深红、紫红,严重的可成为“血痘”。患羊一般为全身发痘,并伴有全身性反应。

b) 非典型痘肿:在痘肿的发生、发展和消退过程中,皮肤无明显红色,无严重水肿,未出现水泡、化脓、结痂等反应,痘肿较小,质地较硬,有的成为“石痘”。患羊无严重的全身性反应。

随着病程的发展,有的病羊尚可见鼻炎、结膜炎、失明、体表淋巴结特别是肩胛前淋巴结肿大。病羊喜卧不起、废食、呼吸困难,严重的体温急剧下降,随后死亡。

存活病羊,可在痘肿结痂后 1 个月~2 个月,痂皮自然脱落,在皮肤上留下痘痕(疤)。

3.2 病理变化

病羊痘肿皮肤的主要病理变化表现为一系列的炎性反应,包括呼吸器官和消化器官上有大小、数量不等的痘斑、结节或溃疡;在肝脏、肾脏表面偶可见白斑;全身淋巴结肿大;细胞浸润、水肿、坏死和形成毛细血管血栓。尸体剖检,通常可见不同程度的黏膜坏死。

4 实验室诊断技术

4.1 样品采集

取活体或剖检羊的皮肤丘疹、肺部病变组织、淋巴结用于病毒分离和抗原检测;病料采集时间为临床症状出现后 1 周之内。采集病毒血症期间的组织进行病理组织学检查,病料为病变及病变周围组织,采集后迅速置于 10 倍体积的 10%福尔马林溶液中。经颈静脉无菌采集血液,分离血清,置于-20℃保存,用于血清学检测。

4.2 样品运输

福尔马林浸润的组织在运输时无特殊要求,用于病毒分离和抗原检测的样品应置于 4℃ 或 -20℃ 保存。如果样品在无冷藏条件下需要运送到较远的地方,应将样品置于含 10% 甘油的 Hanks 液中。用于血清学检测的样品,应置于加冰的冷藏箱内运输。

4.3 病原鉴定

4.3.1 病毒分离

4.3.1.1 材料

MEM 培养液(配制方法见附录 A)、待检组织绵羊羔睾丸细胞(制备方法见附录 B)、胎牛血清细胞培养瓶(25 cm²)。

4.3.1.2 方法

4.3.1.2.1 样品制备

取待检组织,无菌剪碎,用组织匀浆器研磨;按 1:10 的比例加入 MEM 培养液制备组织悬液,4℃ 过夜;1 500 r/min 离心 10 min,取上清备用。

4.3.1.2.2 接种

取 25 cm² 细胞培养瓶,待绵羊羔睾丸细胞形成 90% 单层后,接种 1 mL 病料上清液,置 37℃ 吸附 1 h。弃去瓶内液体,补足细胞维持液,置 37℃、5% CO₂ 条件下培养。同时,设立正常细胞对照 1 瓶。

4.3.1.2.3 培养及观察

每日观察细胞培养物是否出现 CPE,持续培养 14 d,在培养期间可适时更换 MEM 培养液。如果 14 d 仍未见 CPE,将细胞培养物反复冻融 3 次,取上清液继续接种绵羊羔睾丸细胞,一旦出现 CPE,可进行包涵体染色检查。

4.3.1.3 判定

羊痘病毒感染绵羊羔睾丸细胞的特征性 CPE 为细胞收缩变圆,界限明显,间隙变宽,形成拉网状,细胞脱落,并形成嗜酸性包涵体。包涵体大小不等,最大的约为细胞核的一半。

4.3.2 电镜负染检查法

4.3.2.1 材料

待检组织载玻片、400 目电镜甲碳网膜 Tris-EDTA(pH 7.8)缓冲液、1.0% 磷钨酸(pH 7.2)。

4.3.2.2 方法

4.3.2.2.1 样品制备

取待检组织,无菌剪碎,用组织匀浆器研磨,按 1:5 的比例加入 MEM 培养液制备组织悬液。

4.3.2.2.2 制片

取一滴组织悬液置于载玻片上,将碳网膜漂浮于液滴上 1 min;将 Tris-EDTA(pH 7.8)缓冲液滴加到碳网膜上浸泡 20 s;用滤纸吸干膜上液体,滴加 1.0% 磷钨酸(pH 7.2)染色 10 s,用滤纸吸干膜上液体,待其自然干燥后用透射电镜观察。

4.3.2.3 病毒形态判定

在电镜下观察,病毒粒子呈卵圆形,大小为 150 nm~180 nm。

4.3.3 包涵体检查

4.3.3.1 材料

组织病料(置于福尔马林溶液中或 4℃ 保存备用)、载玻片、苏木精—伊红(H. E)染色液。

4.3.3.2 方法

取组织病料,用切片机切成薄片置于载玻片上,或直接将病料在载玻片上制成压片(触片)。经 H·E 染色,置于光学显微镜下观察。

4.3.3.3 判定

羊痘病毒感染细胞的细胞质内应有不定形的嗜酸性包涵体,细胞核内应有空泡。

4.3.4 中和试验

4.3.4.1 材料

MEM 培养液(配制方法见附录 A)、绵羊羔睾丸细胞(制备方法见附录 B)、羊痘抗原及阳性血清、待检羊组织。

4.3.4.2 方法

4.3.4.2.1 样品制备

按 4.3.1 的方法将待检样品接种细胞,并培养至出现 CPE 时收获冻融后的细胞悬液,备用。

4.3.4.2.2 抗原及阳性血清

阳性血清,恢复至室温备用。标定羊痘抗原滴度,并将抗原液用 Hanks 液进行系列稀释至 100 TCID₅₀/0.1 mL。

4.3.4.2.3 加样

取 96 孔细胞培养板,待检样品的细胞悬液、羊痘抗原(100 TCID₅₀/0.1 mL)各加 2 孔,每孔 0.1 mL,向其中一孔加入等量阳性血清,向另一孔内加入等量 Hanks 液;阳性血清加 1 孔,每孔 0.1 mL,再向孔内加入等量 Hanks 液,作为阳性血清对照;Hanks 液加 1 孔,每孔 0.2 mL,作为空白对照。

4.3.4.2.4 感作

将 96 孔细胞培养板摇匀后置于 37℃ 水浴中 1 h,期间每 15 min 振摇 1 次。

4.3.4.2.5 培养

取生长良好的绵羊羔睾丸细胞单层 1 瓶,按常规方法消化,调整细胞浓度至 10⁵ 个/mL,每孔接种细胞悬液 0.1 mL。接种后,置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

4.3.4.2.6 观察

培养 4 d~7 d,每日观察 CPE 情况。

4.3.4.3 结果判定

当正常细胞对照孔、羊痘抗原中和对照孔、阳性血清对照孔的细胞均无 CPE,而羊痘抗原对照孔细胞有特征性 CPE,试验成立。待检样品中和试验孔细胞无 CPE,而待检样品未中和试验孔的细胞有特征性 CPE,判定该待检抗原为羊痘抗原。

注:如果羊痘抗原中和对照细胞出现 CPE,表明阳性血清不能完全中和 100 TCID₅₀/0.1 mL 的羊痘抗原,可对待检样品和羊痘抗原进行适当稀释或更换更高效价的阳性血清再进行中和试验。

4.3.5 PCR 试验

4.3.5.1 材料

待检样品、羊痘病毒对照、DNA 提取试剂盒、2×Taq Master Mix(商品化试剂)、1.5% 琼脂糖凝胶(见附录 A)、1×TAE 缓冲液(商品化试剂)、DNA Marker I(商品化试剂)、上样缓冲液(商品化试剂)、高压灭菌的去离子水、PCR 仪、台式高速冷冻离心机、电泳仪、电泳槽、冰箱、凝胶成像系统、微量移液器、水浴锅、涡旋仪等。

4.3.5.2 方法

4.3.5.2.1 样品处理

取待检组织(皮肤或其他组织),无菌剪碎,用组织匀浆器研磨;按 1:10 的比例加入 MEM 培养液制备组织悬液,4℃ 过夜;1 500 r/min 离心 10 min,取上清备用;冻融的抗凝血、精液或培养上清液等液体样品取 0.2 mL 备用。

4.3.5.2.2 DNA 提取

在 0.2 mL 血液样品中加入 2 μL 蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL)或 0.8 mL 组织样品中加入 10 μL 蛋

白酶 K 溶液。按 DNA 提取试剂盒说明书或以下方法提取 DNA。将上述样品 56℃ 孵育 2 h 或过夜,再 100℃ 加热 10 h。按样品体积 1:1 的比例加入等体积的苯酚、氯仿和异戊醇溶液(体积比为 25:24:1)。振荡均匀,室温孵育 10 min。将样品 4℃, 16 000 g 离心 15 min。小心收集上层水相(约 200 μ L),并转移到 2.0 mL 小管中,并加入等体积的冷乙醇和 1/10 体积的醋酸钠(3 mol/L, pH 5.3)。将样品置于 -20℃ 静置 1 h。将样品 4℃, 16 000 g 离心 15 min, 去掉上清液。用 70% 冷乙醇(100 μ L)洗涤沉淀,并 4℃, 16 000 g 离心 1 min。弃去上清液,并彻底干燥。用 30 μ L 无 RNA 酶水悬浮溶解沉淀,置于 -20℃ 保存,备用。

4.3.5.2.3 引物合成

按下列引物序列合成引物:

正向引物 5'-TCC-GAG-CTC-TTT-CCT-GAT-TTT-TCT-TAC-TAT-3';

反向引物 5'-TAT-GGT-ACC-TAA-ATT-ATA-TAC-GTA-AAT-AAC-3'。

4.3.5.2.4 PCR 扩增体系

按下列方法配制 50 μ L PCR 扩增反应体系:

10 $\times$ PCR 缓冲液	5 μ L
50mmol/L MgCl ₂	1.5 μ L
10mmol/L dNTP	1 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
DNA 模板(约 10ng)	1 μ L
Tag 酶	0.5 μ L
无核酸酶水	39 μ L

4.3.5.2.5 PCR 扩增条件

按下列程序进行 PCR 扩增:先 95℃ 变性 2 min,然后按 95℃ 变性 45 s、50℃ 退火 50 s、72℃ 延伸 60 s 的顺序循环,共循环 34 次,最后在 72℃ 温度下延伸 2 min,于 4℃ 保存,备用。

4.3.5.2.6 PCR 产物电泳

每个样品取 10 μ L 与上样缓冲液充分混匀,再每管取 5 μ L 加入琼脂糖凝胶板的加样孔中,在位于凝胶中央的孔加入 DNA 分子量标准。加样后,按照 8V/cm~10V/cm 电压,电泳 40 min~60 min(每次电泳时,每隔 10 min 观察 1 次。当加样缓冲液中溴酚蓝电泳过半至凝胶下 2/5 处时,可停止电泳)。电泳后,置于紫外凝胶成像仪下观察,用分子量标准判断 PCR 扩增产物大小。

4.3.5.2.7 结果判定

羊痘病毒阳性对照出现 192 bp 的扩增条带,且阴性对照无此扩增带时,判定检测有效;否则判定检测结果无效,不能进行判断。被检样品出现 192 bp 扩增带为羊痘病毒阳性,否则为阴性。

4.4 血清学试验—中和试验法

4.4.1 材料

MEM 培养液(配制方法见附录 A)、绵羊睾丸细胞(制备方法见附录 B)、羊痘抗原及阳性血清、待检羊血清。

4.4.2 方法

4.4.2.1 样品处理

经颈静脉无菌采集待检羊血,按常规方法分离血清,56℃ 灭能 30 min 后备用。

4.4.2.2 抗原及阳性血清

阳性血清,恢复至室温备用。标定羊痘抗原滴度,并将抗原液用 Hanks 液进行系列稀释至 100 TCID₅₀/0.1 mL。

4.4.2.3 加样

取 96 孔细胞培养板,待检血清、阳性血清各加 2 孔,每孔 0.1 mL,向其中一孔加入等量羊痘抗原(100 TCID₅₀/0.1 mL),向另一孔内加入等量 Hanks 液;羊痘抗原(100 TCID₅₀/0.1 mL)加 1 孔,每孔 0.1 mL,再向孔内加入等量 Hanks 液,作为抗原对照;Hanks 液加 1 孔,每孔 0.2 mL,作为空白对照。

4.4.2.4 感作

将 96 孔细胞培养板摇匀后置于 37℃ 中和 1 h,期间每 15 min 振摇 1 次。

4.4.2.5 培养

取生长良好的绵羊羔睾丸细胞单层 1 瓶,按常规方法消化,调整细胞浓度至 10⁵ 个/mL,每孔接种细胞悬液 0.1 mL。接种后,置于 37℃、5%CO₂ 条件下培养。

4.4.2.6 观察

培养 4 d~7 d,每天观察 CPE 情况。

4.4.3 结果判定

当正常细胞和血清毒性对照孔细胞无 CPE,而接种抗原对照孔细胞有明显 CPE 时,试验成立。

待检血清中和后,试验孔细胞出现特征性 CPE,判定该血清为羊痘病毒抗体阴性;待检血清中和后,试验孔细胞未出现 CPE,判定该血清为羊痘病毒抗体阳性。

注:如果羊痘阳性血清中和细胞出现 CPE,表明阳性血清不能完全中和 100TCID₅₀/0.1 mL 的羊痘抗原,可对羊痘抗原浓度进行适当调整再进行中和试验。

附 录 A
(规范性附录)
营养液及溶液的配制

A.1 Hanks 液(10×浓缩液)

A.1.1 成分

A.1.1.1 成分甲

氯化钠	80.0 g
氯化钾	4.0 g
氯化钙	1.4 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g

A.1.1.2 成分乙

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1.52 g
磷酸二氢钾	0.6 g
葡萄糖	10.0 g
1.0%酚红	16.0 mL

A.1.2 配制方法

按顺序将上述成分分别溶于450 mL注射用水中,即配成甲液和乙液;然后,将乙液缓缓加入甲液,边加边搅拌。补足注射用水至1 000 mL,用滤纸过滤后,加入三氯甲烷2 mL,置于2℃~8℃保存。

A.1.3 使用

使用时,用注射用水稀释10倍,107.6 kPa灭菌15 min,置2℃~8℃保存备用。使用前,用7.5%碳酸氢钠溶液调pH至7.2~7.4。

A.2 7.5%碳酸氢钠溶液

A.2.1 成分

碳酸氢钠	7.5 g
注射用水	100.0 mL

A.2.2 配制方法

将上述成分溶解,0.2 μm滤器滤过除菌,分装于小瓶中,置-20℃保存。

A.3 1.0%酚红溶液

A.3.1 成分

酚红	10.0 g
1 mol/L 氢氧化钠溶液不超过	60 mL
注射用水补足至	1 000 mL

A.3.2 配制方法

1 mol/L 氢氧化钠溶液的制备:取澄清的氢氧化钠饱和液56.0 mL,加注射用水至1 000 mL即可。

称酚红10.0 g,加1 mol/L 氢氧化钠溶液20 mL,搅拌溶解。静置后,将已溶解的酚红溶液倒入

1 000 mL容器内。未溶解的酚红继续加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 20 mL,搅拌使其溶解。如仍未完全溶解,可继续加少量 1 mol/L 氢氧化钠溶液搅拌。如此反复,直至酚红完全溶解,但所加 1 mol/L 氢氧化钠溶液总量不得超过 60 mL。补足注射用水至 1 000 mL,分装小瓶,107.6 kPa 灭菌 15 min 后,置 2℃~8℃保存。

A.4 0.25%胰蛋白酶溶液

A.4.1 成分

氧化钠	8.0 g
氯化钾	0.2 g
柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	1.12 g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.056 g
碳酸氢钠	1.0 g
葡萄糖	1.0 g
胰蛋白酶(1:250)	2.5 g
注射用水加至	1 000 mL

A.4.2 配制方法

待胰酶充分溶解后,0.2 μm 滤器滤过除菌,分装于小瓶中,置于-20℃保存。使用时,用 7.5%碳酸氢钠溶液调 pH 至 7.4~7.6。

A.5 EDTA-胰蛋白酶分散液(10×浓缩液)

A.5.1 成分

氯化钠	80.0 g
氯化钾	4.0 g
葡萄糖	10.0 g
碳酸氢钠	5.8 g
胰蛋白酶(1:250)	5.0 g
乙二胺四乙酸二钠	2.0 g

按顺序溶于 900 mL 注射用水中,然后加入下列各液:

1.0%酚红溶液	2.0 mL
青霉素(10 万 IU/mL)	10.0 mL
链霉素(10 万 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	10.0 mL
补足注射用水至	1 000 mL

A.5.2 配制方法

将上述成分按顺序溶解,0.2 μm 滤器滤过除菌,分装小瓶,-20℃保存。临用前,用注射用水稀释 10 倍,作为分散工作液,适量分装,置于-20℃冻存备用。分散细胞时,将工作液取出,置于 37℃水浴融化,并用 7.5%碳酸氢钠溶液调 pH 至 7.6~8.0。

A.6 抗生素溶液(1 万 IU/mL)

A.6.1 10×浓缩液

青霉素	400 万 IU
链霉素	400 万 μg
注射用水	40 mL

充分溶解后,0.2 μm 滤器滤过除菌,分装小瓶,置于 -20°C 保存。

A.6.2 工作溶液

取上述 $10\times$ 浓缩液适量,用注射用水稀释10倍,分装后置于 -20°C 保存。

A.7 H-E 染色液

A.7.1 Harris 苏木精染液

苏木精	1.0 g
无水乙醇	10.0 mL
硫酸铝钾	20.0 g
蒸馏水	200.0 mL
氧化汞	0.5 g
冰醋酸	8.0 mL

先用无水乙醇溶解苏木精,用蒸馏水加热溶解硫酸铝钾,再将这两种液体混合后煮沸(约1 min)。离火后,向该混合液中迅速加入氧化汞,并用玻璃棒搅拌染液直至变为紫红色,用冷水冷却至室温。然后,加入冰醋酸并混合均匀,过滤后使用。

A.7.2 伊红染液

伊红染液有水溶性和醇溶性2种,常用0.5%水溶性伊红染液,配方如下:

伊红 Y	0.5 g
蒸馏水	100 mL
冰醋酸	1 滴

先用少许蒸馏水溶解伊红 Y,然后加入全部蒸馏水,用玻璃棒搅拌均匀。用冰醋酸将染液调至 pH4.5 左右,过滤后使用。

A.7.3 盐酸—乙醇分化液

浓盐酸	1.0 mL
75%乙醇	99.0 mL

A.8 MEM 培养液

A.8.1 成分

MEM 干粉培养基按说明书要求

注射用水	1 000 mL
------	----------

A.8.2 配制方法

称取适量干粉培养基,加入注射用水 500 mL,磁力搅拌使之完全溶解,根据说明书要求补加碳酸氢钠、谷氨酰胺和其他特殊物质,加水定容到终体积,调节 pH 7.4~7.6,0.22 μm 滤膜过滤除菌,无菌分装, $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

配制好的培养液用前加入胎牛血清,细胞培养液胎牛血清含量为 5%~10%,细胞维持液胎牛血清含量为 1%~2%。

A.9 10%福尔马林溶液

附 录 B
(规范性附录)
绵羊睾丸细胞的制备

B.1 原代细胞制备

选取4月龄以内健康雄性绵羊,以无菌手术摘取睾丸,剥弃鞘膜及白膜,剪成1 mm~2 mm小块,用Hanks液(见A.1)清洗3次~4次。按睾丸组织量的6倍~8倍加入0.25%胰酶溶液(见A.4),置于37℃水浴消化。待睾丸组织呈膨松状,弃去胰酶溶液,用玻璃珠振摇法分散细胞,并用MEM培养液稀释成每毫升含100万左右细胞数,分装细胞瓶,37℃静置培养,2 d~4 d即可长成单层。

B.2 次代细胞制备

取生长良好的原代细胞,弃去生长液,加入原培养液量1/10的EDTA胰酶分散液(见A.5),消化2 min~5 min。待细胞层呈雪花状时,弃去胰酶分散液。加少许MEM培养液吹散细胞,然后按1:2的分种率,补足MEM培养液。混匀、分装细胞瓶,置于37℃静置培养。细胞传代应不超过5代。
