

山羊副流感病毒 3 型检测技术规程

Technical regulations for detection of Caprine parainfluenza virus 3

2019 -12-04 发布

2019-12-25 实施

江苏省市场监督管理局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由江苏省农业科学院提出并归口。

本标准起草单位：江苏省农业科学院。

本标准主要起草人：李文良、毛立、李基棕、郝飞、刘茂军、杨蕾蕾、孙敏。

山羊副流感病毒 3 型检测技术规程

1 范围

本标准规定了山羊副流感病毒3型（*Caprine parainfluenza virus 3*, CPIV3）的病原学检测（病毒核酸的RT-PCR和荧光定量RT-PCR检测）、血清学检测（血凝抑制（HI）试验）的技术要求。

本标准适用于山羊副流感病毒3型及其感染情况的实验室检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅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（包括所有的修订单）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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 病原学检测

3.1 材料

微量移液器及吸头、DEPC水处理的离心管、吸头、PCR扩增管、TRIzol试剂、三氯甲烷、异丙醇、DEPC处理水（用水符合GB/T 6682规定）、反转录酶/Taq DNA聚合酶混合液、2×一步法RT-PCR反应缓冲液、一步法荧光定量RT-PCR试剂盒、TAE缓冲液、琼脂糖、核酸染料、引物MF/MR、引物qMF/qMR与探针（附录A）。

3.2 仪器设备

PCR仪、荧光定量PCR仪、台式冷冻离心机、电泳仪和水平电泳槽、凝胶成像仪（或紫外透射仪）。

3.3 反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）

3.3.1 样品处理与RNA的提取

采集羊的鼻拭子、气管拭子或肺脏（样品的采集、保存和运输应符合NY/T 541相关规定）。取200 μL待检样品液至无菌无RNA酶的EP管中，使用TRIzol试剂、RNA提取试剂盒或自动化核酸提取仪等方法提取RNA。

3.3.2 RT-PCR 反应

RT-PCR反应使用20 μL体系：10 μL 2×一步法RT-PCR反应缓冲液、引物MF/MR各0.5 μL（10 μmol/L）、0.4 μL反转录酶/Taq DNA聚合酶混合液、4 μL RNA模板，4.6 μL DEPC处理水。反应条件为：45 °C 反转录30 min；94 °C 预变性2 min；94 °C 30 s，54 °C 30 s，72 °C 30 s，进行35个循环；72 °C 延伸10 min。

3.3.3 结果判定

取PCR产物10 μL，在1.2%琼脂糖凝胶中进行电泳，在凝胶成像系统中观察结果。样品PCR检测产物电泳后有大小为346 bp的片段判断为山羊副流感病毒3型核酸阳性，无条带判断为阴性。每次试验应设置阴阳性对照，阴阳性对照应不出现或出现相应大小的条带。

3.4 荧光定量反转录-聚合酶链式反应（荧光定量 RT-PCR）

3.4.1 核酸提取与荧光定量RT-PCR反应

核酸提取同3.3.1。荧光定量RT-PCR反应使用20 μL体系：10 μL 2×一步法反应缓冲液，0.4 μL反转录酶，0.4 μL DNA聚合酶，引物qMF/qMR各0.4 μL（10 μmol/L），0.8 μL探针，0.4 μL染料，2 μL RNA模板，5.2 μL DEPC处理水。将PCR管置于荧光定量PCR仪器上进行RT-PCR扩增，程序如下：42 ℃ 5 min；95 ℃ 10 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 34 s，共进行40个循环。

3.4.2 荧光定量RT-PCR结果判定

阳性对照扩增曲线呈标准的S曲线，且Ct值<30。阴性对照扩增曲线应为基线下的水平线。若样本曲线呈S形曲线，且Ct值<38为阳性；未出现扩增曲线为阴性。

4 血清学检测——血凝抑制（HI）试验

4.1 材料

微量移液器及配套吸头、96孔V型微量反应板、生理盐水、1%豚鼠红细胞悬液（配制方法见附录B）、病毒液（相关试验操作应符合GB 19489的要求）、标准阳性血清、标准阴性血清。

4.2 仪器设备

离心机、恒温培养箱。

4.3 病毒血凝效价测定

每次HI试验前应对病毒血凝效价进行测定，检测与判定方法如下：

- 在反应板一排各孔中加25 μL 生理盐水；
- 第一孔中加25 μL病毒分离液，按照1:2倍比稀释，最后一孔不加抗原作阴性对照。每孔中再加25 μL PBS；
- 每孔加25 μL 1%豚鼠红细胞液，37 ℃孵育40 min；
- 当红细胞被凝集时，红细胞均匀分布在反应板底部，反应板倾斜片刻，红细胞不下滑；红细胞未被凝集时，反应板倾斜片刻，可见沉淀的红细胞向下滑动，形成流线。HA效价为全部红细胞出现凝集时的最高稀释倍数。

4.4 HI 试验

按如下方法进行 HI 试验：

- 在 96 孔 V 型微量反应板各孔中加 25 μL 生理盐水；
- 加 25 μL 经处理的血清于第一孔中，混匀后取 25 μL 加到第 2 孔中，依次倍比稀释，从第 2 孔加至第 11 孔，第 11 孔混匀后吸取 25 μL 弃去，最后 1 孔不加血清作为对照；
- 每孔中加 25 μL 4 个 HA 单位的病毒抗原，37 ℃孵育 40 min；
- 每孔加 25 μL 1%豚鼠红细胞液，37 ℃孵育 40 min。

4.5 结果判定

将反应板倾斜70度左右，若无凝集反应，则沉淀的红细胞向下滑动，呈流线状，记录为抗体阳性。完全抑制凝集的抗体最高稀释倍数为血清的HI抗体滴度。

抗体滴度大于等于16为阳性，小于等于8为阴性。若检测发病后双份血清（第一份血清应在临床症状出现后立即采集，第二份血清在两周后采集），抗体滴度上升4倍或4倍以上时，表明羊只近期被感染。

附录 A
(资料性附录)
引物

A.1 引物序列

表A.1 用于RT-PCR和荧光定量RT-PCR检测的引物、探针

引物	靶基因	序列 (5'-3')	产物
MF	M 基因	AGTGATCTAGATGATGATCCA	346bp
MR	M 基因	GTTATTGATCCAATTGCTGT	
qMF	M 基因	GCTTGGCTTCTTTGAAATGG	150bp
qMR	M 基因	GCCTGCAGAAGTTCCTTGTC	
CPIV3 Probe	M 基因	FAM-CAATCGGACTAGCCAAGTATGGTGG GA-TAMRA	

A.2 引物的溶解

引物MF、MR、qMF、qMR用灭菌的DEPC处理水溶解到浓度为10 μmol/L；CPIV3 Probe用灭菌的DEPC处理水溶解到浓度为10 μmol/L。

附录 B
(资料性附录)
1%豚鼠红细胞的配制

B.1 生理盐水配制方法

氯化钠 (NaCl) 0.9 g

去离子水加至100 mL, 121 °C 高压灭菌15 min, 冷却后保存于2°C~8 °C冰箱中备用。

B.2 1%豚鼠细胞悬液制备

无菌采集豚鼠血液, 置于EDTA抗凝管中混匀, 2°C~8 °C保存。使用前吸取红细胞悬液置离心管中, 加入生理盐水洗涤3次, 每次以2000 r/min离心5 min, 将血浆、白细胞等充分洗去, 沉积的红细胞用生理盐水稀释成1%的悬液, 保存于2 °C~8 °C冰箱中备用。
