

ICS 11.220
CCS B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 565—2025

代替 NY/T 565—2002

梅迪-维斯纳病诊断技术

Diagnostic techniques for Maedi-Visna

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 临床症状	1
6 病理变化	2
7 病原学检测	2
8 血清学检测	5
9 综合判定	7
10 鉴别诊断	7
附录 A(规范性) 病毒分离所需溶液的配制	8
附录 B(资料性) 绵羊脉络丛成纤维细胞的制备	9
附录 C(规范性) PCR 检测相关溶液的配制	10
附录 D(资料性) PCR 和 qPCR 引物、扩增核酸序列和扩增曲线参考图	11
附录 E(规范性) 间接 ELISA 抗体检测相关溶液的配制	13

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。

本文件代替 NY/T 565—2002《梅迪-维斯纳病琼脂凝胶免疫扩散试验方法》，与 NY/T 565—2002 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了缩略语(见第 4 章)；
- b) 增加了临床症状(见第 5 章)；
- c) 增加了病理变化(见第 6 章)；
- d) 增加了病原学检测(见第 7 章)；
- e) 增加了间接 ELISA 抗体检测方法(见 8.2)；
- f) 增加了综合判定(见第 9 章)；
- g) 增加了鉴别诊断(见第 10 章)。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

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：中国农业科学院兰州兽医研究所、西南民族大学、中国动物疫病预防控制中心、陕西省动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：窦永喜、陈豪泰、刘振东、朱学亮、殷相平、孙跃峰、张志东、孙雨、杨文欢。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2002 年首次发布为 NY/T 565—2002；

——本次为第一次修订。



引 言

梅迪-维斯纳病(Maedi-Visna, MV)是由梅迪-维斯纳病毒(Maedi-Visna virus, MVV)引起绵羊间质性肺炎或脑膜炎为主要症状的一种慢性传染病。梅迪-维斯纳为冰岛语,梅迪的意思是“呼吸困难”,描述了一种增进行间质性肺炎;维斯纳的意思是“抽搐”或“消耗”,症状为麻痹性脑膜炎。世界动物卫生组织(WOAH)将该病列为法定报告动物疫病,我国将其列为三类动物疫病。我国在1966—1967年因引入种羊而传入该病,之后在部分省份有发病报道。

本文件的临床症状和病理变化部分主要参考《兽医微生物学》(陆承平主编,第五版)、《兽医传染病》(陈溥言主编,第六版)及世界动物卫生组织(WOAH)《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2022年版),琼脂凝胶免疫扩散试验方法在原《梅迪-维斯纳病琼脂凝胶免疫扩散试验方法》(NY/T 565—2002)的基础上进一步细化修订,病原学和其他血清学诊断方法主要参考世界动物卫生组织(WOAH)《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2022年版)并结合近年来该病研究新成果的基础上进行优化和验证后制定。

梅迪-维斯纳病与山羊关节炎脑炎病原均属于慢病毒,两种病毒基因组核酸序列具有较高的同源性,血清交叉反应性也很高,可通过感染物种、临床症状进行初步鉴别,再根据病毒核酸检测结果或病毒基因测序结果进行确诊。

梅迪-维斯纳病诊断技术

1 范围

本文件规定了梅迪-维斯纳病临床症状、病理变化及其病原学和血清学检测方法的技术要求。
本文件适用于梅迪-维斯纳病的诊断、检测、监测和流行病学调查。

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，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)适用本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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。

AGID:琼脂凝胶免疫扩散(agar gel immunodiffusion)

CPE:细胞病变效应(cytopathic effect)

Ct:循环阈值(cycle threshold)

DMEM:细胞基础培养液(dulbecco's modified eagle medium)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

ELISA:酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay)

MV:梅迪-维斯纳病(maedi-Visna)

MVV:梅迪-维斯纳病毒(maedi-Visna virus)

OD:光密度(optical density)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)

qPCR:实时定量 PCR(quantitative real-time PCR)

TAE:Tris-乙酸-EDTA 缓冲液(tris acetateEDTA buffered solution)

5 临床症状

5.1 梅迪病(呼吸型)

5.1.1 多发生于3岁以上的绵羊,病程长,通常为4个月~8个月,有的可达数年。

5.1.2 初期病羊行动迟缓,上坡时常落后于羊群,呼吸频率加快;后期严重时鼻孔扩张,伸颈仰头,呼吸急促,常持站立姿势,除辅助呼吸肌参与呼吸过程外,头部和肋部经常出现有节奏的跳动,偶发干咳;听诊可在肺的内侧听到啰音,叩诊肺腹侧呈现实音。

5.1.3 病羊体重逐渐下降,虚弱消瘦;体温正常,食欲减退;轻度贫血,持续性白细胞增多。最后因缺氧和继发细菌性肺炎死亡,病死率高达100%。

5.2 维斯纳病(脑炎型)

5.2.1 多见于2岁以上的成年羊,偶见于1年以内的幼年羊。

5.2.2 早期病羊表现后肢步态不稳、共济失调,容易摔倒,之后发展为后肢轻度瘫痪;随着病程缓慢发展,

后肢由轻瘫逐渐发展为完全截瘫,嘴唇震颤,体况迅速恶化。发病后数周至数月内死亡。

6 病理变化

6.1 梅迪病(呼吸型)

6.1.1 剖检变化:肺膨大,大小和重量是正常肺的2倍~4倍,表面可见肋弓压痕,呈灰黄至灰蓝色,如海绵状,切面干燥;气管、支气管和纵隔淋巴结肿大,为正常的2倍~4倍。

6.1.2 组织学变化:显著特征是肺间质淋巴样增生,肺泡壁增厚。随着病程发展,还可出现平滑肌纤维、结缔组织和上皮细胞增生。镜检可见血管周围、细支气管周围及肺泡内有淋巴细胞、单核细胞及巨噬细胞的弥漫性浸润,甚至形成淋巴结,部分淋巴结中出现生发中心或淋巴滤泡。

6.2 维斯纳病(脑炎型)

6.2.1 剖检变化:无特异性病理变化,病期长的主要表现后肢肌肉萎缩。

6.2.2 组织学变化:局限于中枢神经系统,呈弥漫性脑脊髓炎,淋巴细胞浸润及小神经胶质细胞增生,血管周围可见“套袖现象”;脑脊液中淋巴细胞增多,单核细胞数可达40个/mm³~2000个/mm³;大脑、小脑、脑桥、延脑及脊髓出现脱髓鞘现象。

7 病原学检测

7.1 病毒分离

7.1.1 主要仪器和设备

7.1.1.1 二氧化碳培养箱。

7.1.1.2 倒置生物显微镜。

7.1.1.3 二级生物安全柜。

7.1.1.4 台式低温高速离心机。

7.1.1.5 微量可调移液器(2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL等不同规格)。

7.1.2 主要试剂和材料

7.1.2.1 淋巴细胞分离液。

7.1.2.2 细胞培养液(含10%胎牛血清),按照附录A中A.1的规定配制。

7.1.2.3 细胞维持液(含2%胎牛血清),按照A.2的规定配制。

7.1.2.4 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L pH7.4),按照A.3的规定配制。

7.1.2.5 青霉素和链霉素溶液,按照A.4的规定配制。

7.1.2.6 0.25%胰蛋白酶溶液,按照A.5的规定配制。

7.1.2.7 绵羊脉络丛成纤维细胞,见附录B。

7.1.3 试验程序

7.1.3.1 从活体中分离病毒

7.1.3.1.1 样品采集

无菌采集疑似感染绵羊或山羊的抗凝血或乳汁。

7.1.3.1.2 血液中提取白细胞

将抗凝血用PBS做1:1稀释后加入到淋巴细胞分离液中(不同商品化淋巴细胞分离液应按试剂说明进行操作),4℃5000 r/min离心5 min,用移液器将上清和下部的红细胞移出,避免碰到贴在管壁上的白细胞,用适量细胞培养液悬浮白细胞,制成约1×10⁷个细胞/mL的白细胞悬液。

7.1.3.1.3 乳汁中提取白细胞

按7.1.3.1.2所述的方法依次进行分离,最后制成约1×10⁷个细胞/mL的白细胞悬液。

7.1.3.1.4 白细胞培养

将白细胞悬液置于聚四氟乙烯袋中,于 37 ℃、5% 的 CO₂ 培养箱内培养 10 d~12 d。期间,根据细胞状态和培养液颜色变化更换细胞培养液 3 次~5 次。

7.1.3.1.5 与绵羊脉络丛成纤维细胞共培养

取 2 mL~5 mL 白细胞培养物转移到长到 60%~70% 满的绵羊脉络丛成纤维细胞培养瓶中,于 37 ℃、5% 的 CO₂ 培养箱内培养,期间每隔 2 d~3 d 更换细胞维持液 1 次。

7.1.3.1.6 结果观察

在白细胞与绵羊脉络丛成纤维细胞共培养后的 2 周~5 周内,如果存在活病毒,绵羊脉络丛成纤维细胞将出现细胞病变效应(CPE),具体表现为:细胞高度空泡化,或者出现多核巨细胞或巨大的合胞体,或者出现树枝状、能折光的星状细胞。

7.1.3.2 从剖检组织中分离病毒

7.1.3.2.1 样品采集

无菌采取新鲜的病变组织,如肺脏、脑、脊髓、乳房等组织。

7.1.3.2.2 样品处理

在生物安全柜内将组织放置于无菌细胞培养皿内,用 PBS 或 DMEM 冲洗 1 次~2 次,然后将组织剪碎,移至细胞培养瓶中,每瓶 20 个~30 个组织碎块,补充细胞培养液至完全没过组织碎块,37 ℃、5% 的 CO₂ 培养箱内培养。

7.1.3.2.3 组织细胞培养

待培养瓶中的组织块贴壁后,小心更换细胞完全培养液,使组织块中的细胞增殖。当组织块周边增殖的细胞覆盖瓶壁达 95% 以上程度时,用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化。

7.1.3.2.4 与绵羊脉络丛成纤维细胞共培养

取 2 mL~5 mL 消化的细胞培养物转移到长到 60%~70% 满的绵羊脉络丛成纤维细胞培养瓶中,按 7.1.3.1.5 方法共培养。

7.1.3.2.5 结果观察

组织细胞与绵羊脉络丛成纤维细胞共培养后的 2 周~5 周,如果存在活病毒,绵羊脉络丛成纤维细胞将出现细胞病变效应(CPE),具体表现同 7.1.3.1.6。

7.1.4 结果判定

共培养后,绵羊脉络丛成纤维细胞出现特征性的细胞病变效应(CPE),则初步判定为梅迪-维斯纳病毒分离阳性。进一步鉴定需将出现 CPE 的细胞,采用 PCR 检测方法(见 7.2)或 qPCR 检测方法(见 7.3)进行核酸检测和分析。

共培养后,如果绵羊脉络丛成纤维细胞不出现任何细胞病变效应(CPE),形态与对照正常绵羊脉络丛成纤维细胞一致,则判定为梅迪-维斯纳病毒分离阴性。

7.2 PCR 检测方法

7.2.1 主要仪器和设备

7.2.1.1 凝胶成像仪。

7.2.1.2 PCR 扩增仪。

7.2.1.3 台式低温高速离心机。

7.2.1.4 电泳仪。

7.2.1.5 微量可调移液器(2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL 等不同规格)。

7.2.1.6 无 DNA 酶和 RNA 酶 PCR 管、离心管和移液器吸头。

7.2.2 主要试剂和材料

7.2.2.1 DNA 提取试剂盒。

7.2.2.2 阳性对照:含 MVV *gag* 基因片段的重组质粒。

7.2.2.3 阴性对照:正常绵羊脉络丛成纤维细胞提取的 DNA。

- 7.2.2.4 空白对照:灭菌超纯水。
- 7.2.2.5 DL 2 000 DNA 分子质量标准。
- 7.2.2.6 PCR 预混液(2×),按照附录 C 中 C.1 的规定配制。
- 7.2.2.7 1×TAE 电泳缓冲液,按照 C.2 的规定配制。
- 7.2.2.8 加样缓冲液(6×),按照 C.3 的规定配制。
- 7.2.2.9 核酸染色剂,按照 C.4 的规定配制。
- 7.2.2.10 1.5%琼脂糖凝胶,按照 C.5 的规定配制。
- 7.2.2.11 引物序列,见附录 D 中的 D.1。

7.2.3 前病毒 DNA 提取

用 DNA 提取试剂盒从血液或组织样品或病毒分离细胞培养物中提取前病毒 DNA,用分光光度法测定 DNA 浓度,−20 °C 冰箱保存备用。

7.2.4 PCR 反应体系

总反应体系为 50 μL,其中:PCR 预混液(2×)为 25 μL、上游引物(10 μmol/L)和下游引物(10 μmol/L)各 2 μL、模板 DNA 或对照样品(10 ng~500 ng)、灭菌超纯水补足体积至 50 μL。

7.2.5 PCR 反应程序

94 °C 预变性 2 min~3 min;98 °C 变性 15 s,58 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;循环结束后 72 °C 延伸 10 min。

7.2.6 PCR 产物电泳

取 PCR 扩增产物 5 μL~10 μL,经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中观察结果。

7.2.7 试验成立条件

阳性对照有大小约为 515 bp 的特异性扩增条带,阴性对照和空白对照无任何扩增条带,试验成立。

7.2.8 结果判定

在试验成立的前提下,样品有大小约为 515bp 的特异性扩增条带,判为 MVV 核酸阳性;阳性可进一步用测序法验证,PCR 产物核酸序列见 D.2。

7.3 qPCR 检测方法

7.3.1 主要仪器和设备

- 7.3.1.1 实时荧光定量 PCR 仪。
- 7.3.1.2 台式低温高速离心机。
- 7.3.1.3 微量可调移液器(2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL 等不同规格)。
- 7.3.1.4 无 DNA 酶和 RNA 酶 PCR 管、离心管和移液器吸头。

7.3.2 主要试剂和材料

- 7.3.2.1 商品化实时荧光定量 PCR 试剂盒(荧光染料法)。
- 7.3.2.2 上、下游引物序列,见 D.3。
- 7.3.2.3 阴、阳性对照,同 7.2.2 中的阴、阳性对照。

7.3.3 前病毒 DNA 提取

参照 7.2.3 进行。

7.3.4 反应体系配制

反应体系为 25 μL,其中:实时荧光定量 PCR 酶预混液(2×)12.5 μL、上游引物(10 μmol/L)和下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL、模板 DNA 或阴性对照样品或阳性对照样品 2.0 μL、灭菌超纯水补足体积至 25 μL。振荡混匀并瞬时离心,置于实时荧光定量 PCR 仪内进行扩增。

7.3.5 反应程序设置

95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,共 40 个循环;每个循环在 60 °C 时收集荧光信号。

7.3.6 溶解曲线分析

上述循环反应结束后,再按 95 °C 5 s,60 °C 60 s,50 °C 30 s 进行一个循环并收集荧光信号,进行溶解曲线分析。

7.3.7 试验成立条件

阳性对照扩增曲线有明显对数增长,且 C_t 值 ≤ 30 ,溶解曲线为单一波峰,阴性对照无扩增曲线,试验成立。合格的 qPCR 扩增曲线和溶解曲线见图 D.4 和图 D.5。

7.3.8 结果判定

在试验成立的前提下,被检样品 C_t 值 ≤ 35 且有特异性扩增曲线,判为 MVV 核酸阳性。无 C_t 值或 C_t 值 > 38 ,判为 MVV 核酸阴性。若 $35 < C_t$ 值 ≤ 38 且出现特异性扩增曲线,则判为可疑。可疑样品应重新检测,若重新检测 C_t 值 ≤ 38 且有明显扩增曲线则判为 MVV 核酸阳性,若无 C_t 值或 C_t 值 > 38 则判为 MVV 核酸阴性。阳性样品可进一步通过测序法验证,qPCR 产物核酸序列见 D.2 下划线部分。

8 血清学检测

8.1 琼脂凝胶免疫扩散试验

8.1.1 主要仪器和设备

8.1.1.1 恒温培养箱。

8.1.1.2 六边形打孔器。

8.1.1.3 微量可调移液器(2.5 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L 等不同规格)。

8.1.1.4 培养皿(9 cm)。

8.1.2 主要试剂和材料

8.1.2.1 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L pH 7.4),按照 A.3 的规定配制。

8.1.2.2 MVV 标准抗原。

8.1.2.3 对照: MV 标准阳性对照血清和阴性对照血清。

8.1.3 试验程序

8.1.3.1 琼脂糖凝胶平板的制备

称取琼脂糖 0.8 g~1 g,加入至 100 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲液中,加热融化后,冷却至 55 °C 左右时,向直径 9 cm 的平皿倒入约 15 mL,冷却凝固后,4 °C 保存备用。

8.1.3.2 打孔

用六边形打孔器或者其他孔型的打孔器垂直在琼脂糖凝胶平板打孔,孔径 3 mm~5 mm,孔间距 2 mm~3 mm,挑出孔内琼脂糖凝胶块,平皿底部在酒精灯火焰上方快速来回加热 5 次~6 次以封底。之后,将所打的孔按图 1 所示进行编号和定位。

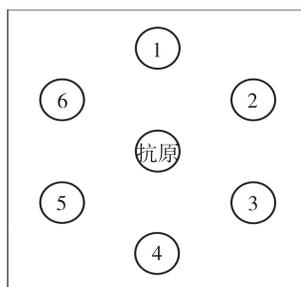


图 1 琼脂凝胶平板打孔编号示意图

8.1.3.3 加样

中央孔中加入梅迪-维斯纳病毒标准抗原,1、3、5 孔分别加入待检血清样品,2、4、6 孔加入标准阳性血

清。每孔的加样量为加满但不溢出。

8.1.3.4 孵育

静置待孔中液体完全吸附后,将平皿反转倒置放入湿盒中,在 20 °C~25 °C 培养箱中孵育过夜。

8.1.3.5 结果观察

孵育 24 h 后,观察标准阳性血清和抗原孔之间的沉淀线。若沉淀线不清晰,可在 2 °C~8 °C 冰箱中静置继续孵育 24 h 后再观察。

8.1.4 结果判定

在标准阳性血清和抗原孔之间出现沉淀线的条件下,样品孔与抗原孔之间形成的沉淀线与阳性对照血清形成的沉淀线弯曲环联,判为 MVV 抗体阳性;无沉淀线,或沉淀线与阳性对照沉淀线交叉或者不环联时,判为 MVV 抗体阴性。

8.2 间接 ELISA 抗体检测方法

8.2.1 主要仪器和设备

8.2.1.1 酶标仪。

8.2.1.2 恒温培养箱。

8.2.1.3 单道微量可调移液器(2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL 等不同规格)和八道微量可调移液器(300 μL)。

8.2.1.4 酶标板和移液器吸头等。

8.2.2 主要试剂和材料

8.2.2.1 包被抗原:纯化的 MVV_{p25}(又称 CA 蛋白)重组蛋白。

8.2.2.2 对照:MV 标准阳性血清、标准阴性血清。

8.2.2.3 酶标抗体:HRP 标记兔抗羊 IgG。

8.2.2.4 包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液,pH 9.6),按照附录 E 中的规定 E.1 配制。

8.2.2.5 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L,pH 7.4),按照 A.3 的规定配制。

8.2.2.6 洗涤缓冲液/血清稀释液(PBST,pH 7.4),按照 E.2 的规定配制。

8.2.2.7 封闭缓冲液(含 3%BSA 的 pH 7.4 PBS),按照 E.3 的规定配制。

8.2.2.8 底物溶液,按照 E.4 的规定配制。

8.2.2.9 终止液(2 mol/L H₂SO₄),按照 E.5 的规定配制。

8.2.3 试验程序

8.2.3.1 抗原包被

用包被液将 MVV_{p25} 重组蛋白稀释至终浓度 1 μg/mL,每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板,4 °C 孵育过夜。

8.2.3.2 洗板

弃去孔内液体,用洗涤缓冲液洗板 3 次,将酶标板在吸水材料上拍干。

8.2.3.3 封闭

酶标板反应孔中每孔加入 200 μL 封闭液,于 37 °C 孵育 1 h。按 8.2.3.2 冲洗酶标板。

8.2.3.4 加血清

用血清稀释液分别将待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清作 1:4 稀释,然后向包被有 MVV 抗原的酶标板反应孔中,依次加入 100 μL 稀释好的待检血清、阳性对照血清和阴性对照血清,每份血清做 2 孔重复。

8.2.3.5 孵育

用膜封住酶标板,室温(22 °C~25 °C)或者 37 °C 孵育 1 h。

8.2.3.6 洗板

按 8.2.3.2 冲洗酶标板。

8.2.3.7 加酶标抗体

用稀释液将 HRP 标记兔抗羊 IgG 稀释至最佳工作浓度(1:20 000),每孔加入 100 μL,用膜封住酶标板,室温(22 ℃~25 ℃)或者 37 ℃孵育 1 h。

8.2.3.8 洗板

按 8.2.3.2 冲洗酶标板。

8.2.3.9 加底物溶液

每孔中加入 100 μL 底物溶液,室温下避光作用 15 min。

8.2.3.10 加终止液

每孔中加入 100 μL 终止液终止反应。

8.2.3.11 读取吸光值

在反应终止后的 10 min 内,在酶标仪 450 nm 波长处读取每孔的吸光值。

8.2.4 样品吸光值百分比计算

待检血清样品吸光值百分比(S)按公式(1)计算。

$$S = \frac{OD_{450-S} - OD_{450-NC}}{OD_{450-PC} - OD_{450-NC}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

S ——待检血清样品在 450 nm 处的吸光值百分比;

OD_{450-S} ——待检血清样品在 450 nm 处的平均吸光值;

OD_{450-NC} ——阴性对照血清在 450 nm 处的平均吸光值;

OD_{450-PC} ——阳性对照血清在 450 nm 处的平均吸光值。

注:应用商品化试剂盒检测,应根据试剂盒提供的说明及评价条件进行操作和判定。

8.2.5 结果判定

S>40%,判为 MVV 抗体阳性。

S<30%,判为 MVV 抗体阴性。

S 介于 30%~40%,判为可疑,应进行复检。复检如果 S>40%,判为 MVV 抗体阳性;S<30%,判为 MVV 抗体阴性;如 S 仍介于 30%~40%,则判为 MVV 抗体阳性。

9 综合判定

9.1 疑似

具有临床症状或病理变化的易感动物,或经 7.1 病毒分离阳性的易感动物,判定为梅迪-维斯纳病疑似病例。

9.2 确诊

易感动物经 7.2 或 7.3 任一项检测为 MVV 核酸阳性的,或经 8.1 或 8.2 任一项检测为 MVV 抗体阳性的,判定为梅迪-维斯纳病确诊病例。

10 鉴别诊断

与山羊关节性脑炎的鉴别诊断:

a) 梅迪-维斯纳病主要感染绵羊,临床上以进行性消瘦、间质性肺炎或脑膜炎为主要症状;

b) 山羊关节炎脑炎主要感染山羊,临床上羔羊呈脑脊髓炎,成年山羊则以多发性关节炎、间质性肺炎和乳房炎为主要症状。

两种疫病从易感动物、临床症状进行初步鉴别诊断,阳性病例可根据 PCR 和 qPCR 结果或病毒基因测序结果进行确诊。

附录 A

(规范性)

病毒分离所需溶液的配制

A.1 细胞培养液(含 10%胎牛血清)

A.1.1 DMEM 基础培养液的配制

量取去离子水 950 mL,置于容器中,称取 10 g DMEM 粉剂和 3.7 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)加入 30 °C 的去离子水中,边加边搅拌,充分溶解后加去离子水至 1 000 mL,用 1 mol/L 氢氧化钠或盐酸将 pH 调至 6.9~7.0,除菌过滤后 4 °C 保存备用。

A.1.2 加入 10%胎牛血清

取 DMEM 基础培养液 900 mL、胎牛血清 100 mL 混合,然后加入抗生素至青霉素终浓度 100 IU/mL、链霉素终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,4 °C 保存备用。

A.2 细胞维持液(含 2%胎牛血清)

取 DMEM 基础培养液 980 mL、胎牛血清 20 mL 混合,然后加入抗生素至青霉素终浓度 100 IU/mL、链霉素终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,4 °C 保存备用。

A.3 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L pH 7.4)

称取氯化钠(NaCl)8 g、氯化钾(KCl)0.2 g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.24 g、十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)3.58 g,充分溶解后,加去离子水定容至 1 000 mL,调节 pH 至 7.4,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min,常温保存。

A.4 青霉素和链霉素溶液

取青霉素和链霉素溶解于去离子水中,使每毫升含青霉素 1 万 U、链霉素 10 000 μg ,用 0.22 μm 滤膜除菌过滤后,-20 °C 冻存备用。

A.5 0.25%胰蛋白酶溶液

称取胰蛋白酶 0.25 g,溶解于 100 mL PBS 中,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,2 °C~8 °C 低温保存。

附录 B

(资料性)

绵羊脉络丛成纤维细胞的制备

B.1 取材与漂洗

选取约 1/3 妊娠期的健康绵羊剖腹取出胚胎,开颅无菌取脑室中脉络丛放入无菌平皿中。用灭菌 PBS 漂洗表面血污 3 次,取适量组织放入青霉素瓶内。

B.2 剪切与消化

将组织小块置于青霉素瓶一角,用眼科剪反复剪切组织块成 1 mm^3 大小,然后再用 PBS 液清洗 3 次,静置 1 min。用吸管吸去上层洗液。最后一遍尽量吸去 PBS 液。

先加入 5 mL 0.25% 胰蛋白酶,静置 1 min。然后加入 10 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶,37 °C 水浴消化 30 min,小心吸去消化液,用 PBS 液漂洗 3 次,吸去 PBS 液。

B.3 吹打过滤

将消化好的组织移入细胞培养瓶中,加 20 mL DMEM 基础培养液,用破口吸管充分吹打,吹打动作要轻柔,以免影响细胞成活率。将细胞悬液用 4 层无菌纱布过滤,除去未消化好的组织块。

B.4 细胞传代

根据细胞密度向细胞悬液中加入适量 DMEM 基础培养液,加 15% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺、1% 双抗,调 pH 至 7.0。混匀后用吸管均匀分装至细胞培养瓶中,于 37 °C 培养箱中培养 24 h 后,可置于倒置显微镜下观察细胞生长状况。

待细胞长成单层,弃去培养液,然后加 1 mL~2 mL 胰蛋白酶/EDTA 消化 30 s~60 s,加少量细胞培养液充分吹打,使细胞分散,留适量细胞继续培养。一般传 2 代~3 代后可用于接种病毒。

B.5 细胞冻存

挑选已长成单层的细胞培养物进行消化,加上适量的细胞培养液,3 000 r/min 离心 20 min。弃去上清液,加少量细胞培养液,摇匀,使细胞分散,按 10% 体积比加入二甲基亚砜(DMSO),分瓶封口。然后,梯度降温至 -70 °C,迅速投入液氮中保存。

B.6 细胞复苏和培养

从液氮中取出细胞瓶立即放入 38 °C~40 °C 水浴中,使其在 1 min 内完全融化。无菌操作将细胞悬液移入细胞培养瓶中,补加足量细胞培养液,置于 37 °C 培养箱中培养,48 h 后换液,继续培养长至单层细胞,复苏的细胞在传代 10 代~15 代之前均可用于 MVV 的分离和培养。

附 录 C

(规范性)

PCR 检测相关溶液的配制

C.1 PCR 预混液(2×)

取 *Taq* DNA 聚合酶(0.5 U/ μ L) 4 μ L、dNTPs(2.5 mmol/L) 4 μ L、10×反应缓冲液(含 Mg^{2+}) 5 μ L,用灭菌超纯水调体积至 25 μ L。

注:商品化 PCR 预混液(2×)可按照说明直接进行 PCR 反应体系的配制。

C.2 1×TAE 电泳缓冲液

取三羟甲基氨基甲烷(Tris) 242 g、乙二胺四乙酸二钠二水合物($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$)37.2 g、冰乙酸 57.1 mL,加入至 800 mL 去离子水中,充分搅拌溶解后,加去离子水定容至 1 000 mL,调 pH 至 8.0,制成 50×TAE 电泳储存液,常温保存备用。

取 50×TAE 电泳储存液 20 mL,加入至 980 mL 去离子水中混合均匀,临用现配。

C.3 加样缓冲液(6×)

称取溴酚蓝 0.25 g 和蔗糖 40 g,加入至 100 mL 灭菌超纯水中充分溶解,4℃保存备用。

C.4 核酸染色剂

在 10 mL 灭菌超纯水中加入 100 mg 溴化乙锭(EB)配制成 10 mg/mL 的浓缩液。使用时按 10%体积加入。

注:商品化核酸染料可替代 EB 染色剂使用。

C.5 1.5%琼脂糖凝胶

称取琼脂糖(电泳级)1.5 g,加入至 100 mL 1×TAE 电泳缓冲液中,加热至琼脂糖固体完全融化,冷却至 50℃~60℃时加核酸染色剂 10 μ L(商品化核酸染料按照说明书加入),混匀后倒入胶槽后自然凝固后使用。

附录 D

(资料性)

PCR 和 qPCR 引物、扩增核酸序列和扩增曲线参考图

D.1 PCR 引物序列

MVV 的 *gag* 基因保守性高,因此常被用作检测和诊断的靶基因,其他基因也可作为靶基因。PCR 引物序列信息见表 D.1。

表 D.1 梅迪-维斯纳病毒 PCR 引物序列

引物	目的	靶基因	序列(5'-3')	大小
Gag-F	正向引物	<i>gag</i>	5'-GAGAAAAAGGGATACCCCGAGC-3'	515 bp
Gag-R	反向引物		5'-TCAAAATCCTCGGACACAAG-3'	

D.2 PCR 和 qPCR 扩增核酸序列

PCR 扩增的 MVV *gag* 基因序列,其中下划线部分为 qPCR 扩增序列:

GAGAAAAAGGGATACCCCGAGCTCAAGGAAGTAATTAAAGCAACATGTAAAATAAAGG
TAGGGGCCGGGAAGGAGACCTTGACAGAAGGGAAGTGTGTTATGGGCACTAAAACTGTAGA
CTTTATATTTGAAGATATAAAGACAGAACCGTGGACTCTTACAAAGATGTATACTGTATGG
GACAGATTAAGACAGTTGACTCCAGAAGAGACAAGTAAAAGAGAGTTTGCCTCCTTGCAAG
CTACATTGGCTTGCCTAATGTGTAGTCAAATGGGCATGAAGCCTGAGACAGTGCAGGCAGCA
CGGGGAATAATAAGTATGAAGGAAGGACTACAAGAGAATAAGGAGGAAAAAAGGTAGAA
CAACTCTACCCAAATCTAGAGAAGCACAAGGAAGTATACCCCATTTGTGAATTTGCAAGCGGG
GGGAAGGAGTTGGAAGGCAGTAGACTCCGTAGTCTTCCAACAGCTGCAAAATGTAGCAATGC
AGCATGGACTTGTGTCCGAGGATTTTGA(GenBank:KR011757.1)

D.3 qPCR 引物序列

qPCR 引物序列信息见表 D.2。

表 D.2 梅迪-维斯纳病毒 qPCR 引物序列

引物	目的	靶基因	序列(5'-3')	大小
Gag-qF	正向引物	<i>gag</i>	5'-AAGGTAGARCAACTCTACCC-3'	148 bp
Gag-qR	反向引物		5'-ACACAAGTCCATGCTGCAT-3'	

D.4 qPCR 扩增曲线参考图

图 D.1 为 qPCR 扩增曲线参考图。

D.5 qPCR 熔解曲线参考图

图 D.2 为 qPCR 熔解曲线参考图。

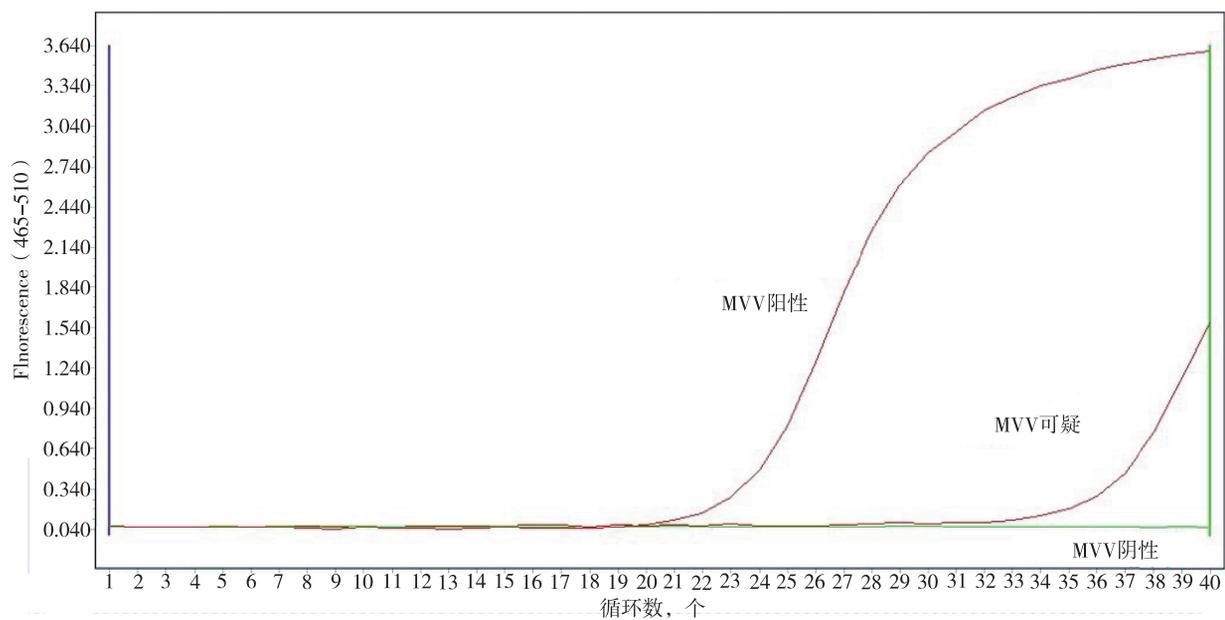


图 D.1 qPCR 阳性、阴性和可疑扩增曲线

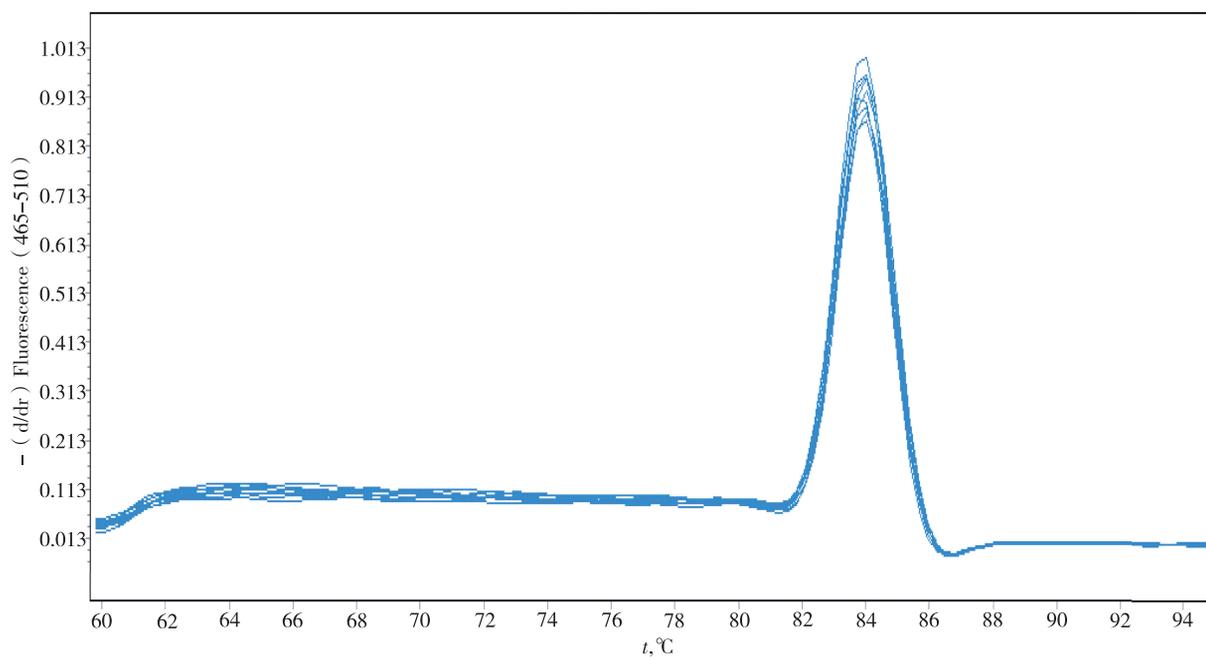


图 D.2 qPCR 扩增阳性溶解曲线

附 录 E

(规范性)

间接 ELISA 抗体检测相关溶液的配制

E.1 包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)

A 液:称取碳酸钠(Na_2CO_3) 1.68 g,溶解于 400 mL 去离子水中。

B 液:称取碳酸氢钠(NaHCO_3) 2.86 g,溶解于 200 mL 去离子水中。

将 400 mL A 液与 150 mL B 液混合,调节 pH 至 9.6,4℃ 保存备用,1 个月有效。

E.2 洗涤缓冲液/血清稀释液(PBST, pH 7.4)

向 1 000 mL 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.4)中加入吐温-20 0.5 mL,充分混匀后使用。

E.3 封闭缓冲液(含 3% BSA 的 pH 7.4 PBS)

称取 3 g 牛血清白蛋白(BSA),加入至 100 mL 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中,充分混匀,现配现用。

E.4 底物溶液

E.4.1 A 液

称取 20 g 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),溶于 10 mL 的无水乙醇中,加去离子水至 100 mL,用 0.45 μm 滤膜过滤,避光 2℃~8℃ 棕色瓶保存。

E.4.2 B 液

称取十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)7.17 g、柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)0.93 g,量取 0.75% 过氧化氢尿素 0.64 mL,加去离子水至 100 mL,调节 pH 至 5.0~5.4,避光 2℃~8℃ 保存。

E.4.3 用法

使用时,将 A 液、B 液按 1:1 的比例混合,现配现用。

E.5 终止液(2 mol/L H_2SO_4)

取 22.2 mL 浓硫酸(浓度 98%),缓慢加入到 177.8 mL 去离子水中,不断搅拌混匀,冷却至室温后分装保存。