

团 体 标 准

T/SHZSAQS 00164—2022

牛病毒性腹泻、粘膜病诊断技术规程

2022-11-09 发布

2022-11-09 实施

石河子市质量标准化协会

发 布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
3.1 牛病毒性腹泻-黏膜病	1
3.2 牛病毒性腹泻-黏膜病临床症状	1
4 原理	1
4.1 竞争法荧光抗体检测	1
4.2 免疫过氧化物酶单层细胞试验 (IPMA)	2
4.3 微量血清中和试验	2
4.4 抗原捕获酶联免疫吸附试验 (ELISA)	2
4.5 反转录聚合酶链反应 (RT-PCR)	2
5 临床诊断	2
5.1 持续感染型 (PI)	2
5.2 急性型	2
5.3 黏膜病 (MD)	2
5.4 急性 BVDV 感染	3
6 临床诊断判定标准	3
7 实验室诊断	3
7.1 竞争法荧光抗体试验	3
7.2 免疫过氧化物酶单层细胞试验 (IPMA)	3
7.3 微量血清中和试验	3
7.4 抗原捕获酶联免疫吸附试验 (ELISA)	3
7.5 反转录聚合酶链反应 (RT-PCR)	3
8 实验室诊断判定标准	3
8.1 竞争法荧光抗体试验	3
8.2 免疫过氧化物酶单层细胞试验	3
8.3 微量血清中和试验	4
8.4 抗原捕获酶联免疫吸附试验 (ELISA)	4
8.5 反转录聚合酶链反应 (RT-PCR)	4

9 废弃物处理 4

10 人员防护..... 4

11 注意事项..... 4



前 言

本文件参照GB/T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则起草。

本文件起草单位：新疆生产建设兵团第八师畜牧兽医工作站。

本文件主要起草人：吴洁、王丹、林为民、周霞、毋婷、董峰、蔺文龙、张辉、刘良波、孙志华、窦立静、赵艳梅、叶翠芳、杨阳、万姣、张豫、王煜舒、马宏、王刚、刘鹏梁、张梦琦、陈杨。

牛病毒性腹泻、粘膜病诊断技术规程

1 范围

本文件规定了牛病毒性腹泻/粘膜病诊断的术语与定义及原理、临床诊断、临床诊断判定标准、实验室诊断、实验室诊断判定标准、废弃物处理、人员防护、注意事项等。适用于牛病毒性腹泻/粘膜病的诊断。

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。

GB19489	实验室 生物安全通用要求
GB/T5009	食品检验方法 理化检验
GB/T6682	分析实验室用水规格和试验方法
GB/T18637	牛病毒性腹泻/粘膜病诊断技术规范
GB/T27401	实验室质量控制规范 动物检疫
JIS K0461	竞争性免疫测定法导则
SN/T 1247.2	猪繁殖和呼吸综合征免疫过氧化物酶单层试验
NY/T 543	牛流行热微量中和试验方法

3 术语和定义

3.1 牛病毒性腹泻-黏膜病

牛病毒性腹泻-黏膜病（BVD-MD）发病率高，是由牛病毒性腹泻病毒（BVDV）引起的主要发生于牛的一种急性、热性传染病，具有一定的致死率，且存在持续感染、免疫抑制的情况，对养牛产业造成了较大的危害。

3.2 牛病毒性腹泻-黏膜病临床症状

BVD-MD的主要临床症状表现为腹泻、高热、黏膜溃疡，消化道呈线性病变，伴随精神不振、厌食、呼吸系统疾病、消化系统疾病，严重者出现血便等，潜伏期一般为5~7d。可分为3个类型，急性型、持续感染型（PI）和黏膜病（MD）。

4 原理

4.1 竞争法荧光抗体检测

利用荧光素标记抗体，使之在涂片上或组织切片上与标本中的待测抗原特异性地结合，采用高发光效率的点光源，透过滤色板发出一定波长的光，使结合在标本上的荧光素被激发而产生荧光，借助荧光显微镜观察底物片上荧光染色形态，可以判断有无待测抗原或抗体。

4.2 免疫过氧化物酶单层细胞试验（IPMA）

免疫过氧化物酶单层细胞试验，其主要原理是通过抗原抗体的相互作用，产生特异性显色反应，通过光学显微镜肉眼即可观察并判定结果。

4.3 微量血清中和试验

动物受到病毒感染后，体内产生特异性中和抗体，并与相应的病毒粒子呈现特异性结合，因而阻止病毒对敏感细胞的吸附，或抑制其侵入，使病毒失去感染能力。中和试验是以测定病毒的感染力为基础，以比较病毒受免疫血清中和后的残存感染力为依据，来判定免疫血清中和病毒的能力。

4.4 抗原捕获酶联免疫吸附试验（ELISA）

ELISA的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。

4.5 反转录聚合酶链反应（RT-PCR）

RT-PCR是将RNA的反转录（RT）和cDNA的聚合酶链式扩增（PCR）相结合的技术。首先经反转录酶的作用从RNA合成cDNA，再以cDNA为模板，扩增合成目的片段。

5 临床诊断

5.1 持续感染型（PI）

慢性病例临床症状不明显或逐渐发病，生长发育受阻，消瘦，体重逐渐下降，PI牛大多数表面健康，但其终生带毒排毒，且在其体内检测不到抗体，是牛场净化BVDV最大的阻碍。

5.2 急性型

急性感染牛一般为突然发病，体温升高、发热，血液中白细胞减少，精神沉郁，眼睛和鼻腔有液体分泌物流出，口腔和鼻镜黏膜溃烂，严重腹泻，便血，整个消化道出现糜烂性或溃疡性病灶，通常于发病后1~2周急性死亡，康复的病例较少。

5.3 黏膜病（MD）

黏膜病是牛感染BVDV最为严重的类型，死亡率极高，几乎达到100%，黏膜病（MD）类型初期不表现临床症状，在表现临床症状后1周左右死亡。

5.4 急性 BVDV 感染

导致消化道和呼吸道表皮损伤。严重急性感染病牛剖检可见动物胃肠道黏膜溃疡、糜烂。

6 临床诊断判定标准

出现5.2或5.3或5.4至少一项临床症状且同时出现5.3解剖病理变化可判定为BVD/MD可疑，需结合其他诊断方法进一步确诊。

7 实验室诊断

7.1 竞争法荧光抗体试验

所需器材、试剂、试验样品、操作方法应符合JIS K0461相关要求。

7.2 免疫过氧化物酶单层细胞试验（IPMA）

所需器材、试剂、试验样品、操作方法应符合SN/T1247.2相关要求。

7.3 微量血清中和试验

所需器材、试剂、试验样品、操作方法应符合NY/T543要求。

7.4 抗原捕获酶联免疫吸附试验（ELISA）

所需器材、试剂、试验样品、操作方法应符合GB/T5009相关要求。

7.5 反转录聚合酶链反应（RT-PCR）

所需器材、试剂、试验样品、操作方法应符合GB/T18637相关要求。

8 实验室诊断判定标准

8.1 竞争法荧光抗体试验

细胞在荧光显微镜下可视黄绿色荧光的细小颗粒散布于细胞浆内可判定为阳性，而阴性对照孔细胞无荧光；如果阳性对照、阴性对照不成立，则试验无效，重新检测。

8.2 免疫过氧化物酶单层细胞试验

细胞在显微镜下出现弥漫状或团块状棕红色可判定为阳性, 而阴性对照孔的细胞无棕红色; 如果阳性对照、阴性对照不成立, 则试验无效, 重新检测。

8.3 微量血清中和试验

在定性试验中, 被检血清在1: 5稀释度有2个或2个以上孔的细胞完全被保护, 该血清即为阳性; 在双份血清测定中, 当间隔21d的第二份来源于同一动物的血清中和效价高于第一份血清中和效价两个或两个以上滴度, 则证明该动物正在发病过程中。

8.4 抗原捕获酶联免疫吸附试验 (ELISA)

样品判为牛病毒性腹泻/黏膜病阴性的标准是S/P值 <0.20 ; 阳性标准是S/P值 ≥ 0.30 ; 当S/P值介于 0.20 和 0.30 之间, 样品判为牛病毒性腹泻/黏膜病可疑, 应重新检测。

8.5 反转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

如被检样品有条带, 大小与阳性样品相同为244 bp, 即可判定为阳性。

9 废弃物处理

检测过程中的废弃物, 应收集后高压灭菌处理。高压灭菌后送到指定的医疗垃圾处理站销毁。

10 人员防护

实验室工作人员在上班前应进行个人卫生处置, 对全身进行喷雾消毒; 进入实验室后必须穿工作衣、戴工作帽、手套、胶套、医用口罩; 实验室工作人员在每次接触标本后立即进行清洗和消毒, 手消毒可用75%乙醇或用0.3%—0.5%碘伏, 严格按照洗手法搓揉1—2分钟, 洗手应采用非接触式的洗手装置。

11 注意事项

规范中那个涉及的诊断方法必须设置阳性、阴性对照, 如果阳性对照、阴性对照不成立, 则试验无效, 重新检测。