

鹅星状病毒感染诊断技术规范

1 范围

本文件规定了鹅星状病毒感染的临床诊断和实验室诊断的技术规范。其中临床诊断包括流行病学、临床症状、病理变化；实验室诊断包括样品的采集与保存、病毒分离鉴定、反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）、实时荧光定量RT-PCR与间接酶联免疫吸附试验（ELISA）。

本文件适用于鹅星状病毒感染的诊断、检测、监测和流行病学调查。鹅星状病毒感染的流行病学、临床症状、病理变化适用于鹅星状病毒的初步诊断；病毒分离、RT-PCR和实时荧光定量RT-PCR检测方法适用于鹅组织、分泌物、排泄物和病毒培养物中鹅星状病毒分离鉴定及核酸检测；间接ELISA抗体检测方法适用于鹅星状病毒感染的抗体特异性血清学诊断。

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 19489—2008 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

NY/T 541—2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鹅星状病毒感染 *goose astrovirus infection*

由鹅星状病毒引起的5日龄~25日龄雏鹅内脏器官与关节发生严重尿酸盐沉积的疾病。

4 实验室要求

4.1 环境

4.1.1 实验室符合 GB 19489—2008 和 GB/T 27401 要求。

4.1.2 从事 RT-PCR 工作的实验室应进行分区，根据条件划分出前处理区、核酸提取区、核酸扩增区、电泳检测区，形成有效的物理隔离，且为单一流向，不得倒流。特别注意电泳后的琼脂凝胶要及时处理，避免对实验室造成污染。

4.1.3 生物样品应严格控制避免对环境造成污染，试验结束后应将相关样品（如血样）进行无害化处理。

4.2 人员

操作人员应接受实验室生物安全、实验室质量管理、血清学和分子生物学实验室检测技术培训。熟悉临床诊断、病理组织学诊断、生物样品处理、病毒分离，以及核酸提取、基因扩增等分子生物学技术，熟悉RT-PCR、qRT-PCR与间接ELISA检测结果的判断方法。

5 样品

5.1 仪器设备

- 5.1.1 生物安全柜。
- 5.1.2 解剖剪。
- 5.1.3 解剖盘。
- 5.1.4 镊子。
- 5.1.5 组织匀浆器。

5.2 试剂与材料

- 5.2.1 磷酸盐缓冲液（PBS），见 A.1。
- 5.2.2 青霉素（100 000 IU/mL）。
- 5.2.3 链霉素（100 mg/mL）。
- 5.2.4 离心管。
- 5.2.5 样品保存管。
- 5.2.6 滤器（孔径 0.22 μm ）。

5.3 样品采集与运送

- 5.3.1 总则：样品采集、保存、运输应按照 NY/T 541—2016 技术规范进行。采样和样品前处理过程中应戴一次性手套、口罩、帽子，采样过程中样品不得交叉污染。
- 5.3.2 组织样品：采集疑似鹅星状病毒感染死亡鹅的肝脏、脾脏和肾脏等组织样品。采集病料时，用无菌手术剪取组织样品，置于样品保存管中，密封、编号。
- 5.3.3 泄殖腔/喉拭子样品：活禽泄殖腔/喉拭子样品，置于样品保存管中。
- 5.3.4 血清样品：用无菌注射器采血 1 mL，将其注入 1.5 mL 无菌 eppendorf 管中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h。分离的血清转入新的无菌 eppendorf 管中，加盖，编号，待检。采集的血清样品应无溶血，置于离心管中。
- 5.3.5 鹅胚尿囊液：将鹅胚尿囊液加入无菌 eppendorf 离心管中，加盖，编号，待检。
- 5.3.6 所有样品应置于密闭容器中冷藏运输，保存温度在-15 $^{\circ}\text{C}$ 以下，时间不超过 24 h。

5.4 样品处理与保存

- 5.4.1 样品应在生物安全柜中进行处理，取 10 g~20 g 样品放入灭菌的研钵中磨碎。研磨充分的组织置于含青霉素（2 000 IU/mL）、链霉素（2 mg/mL）、庆大霉素（50 $\mu\text{g/mL}$ ）和制霉菌素（1 000 IU/mL）

的 pH 值 7.0~7.4 的等渗磷酸盐缓冲液 (PBS, A.1) 中, 配制成 10%~20% (g/mL) 的悬液。样品经 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清液经 0.22 μm 滤器过滤除菌后, 作为接种和检测材料。

5.4.2 泄殖腔/咽喉拭子置于含青霉素 (2 000 IU/mL)、链霉素 (2 mg/mL)、庆大霉素 (50 $\mu\text{g/mL}$) 和制霉菌素 (1 000 IU/mL) 的 pH 值 7.0~7.4 的 PBS 中。样品剧烈震荡后, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清作为检测材料。

5.4.3 鹅胚尿囊液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下经 10 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转入无菌 eppendorf 管中, 加盖, 编号, 待检。

5.4.4 所有样品保存温度在-15℃以下，不超过2 wk；-70℃贮存不超过30 d。

5.5 检测要求

在每次检测过程中，需要设置相应的阳性对照和阴性对照。

6 临床诊断

6.1 流行病学

鹅群发病日龄集中于5日龄~20日龄，5日龄左右开始发病，死亡率逐渐升高，10日龄~15日龄为死亡高峰，鹅群的死亡率为20%~30%，最高可达50%。

6.2 临床症状

患病雏鹅表现为精神沉郁、卧地倦动、采食减少、排白色稀便。

6.3 剖检变化与组织学变化

死亡雏鹅剖检变化主要表现为内脏器官和关节腔有大量尿酸盐沉积，包括心脏、肝脏、肾脏及输尿管等，有的病例表现为肾脏出血肿大。患鹅组织学变化主要表现为肾小管上皮细胞坏死、间质出血，肾小球肿胀，脾脏有大量红细胞浸润，肝细胞空泡变性、尿酸盐沉积。

6.4 临床诊断结果判定

同时符合6.1、6.2、6.3，则判断为疑似鹅星状病毒感染。

7 病毒分离鉴定

7.1 病毒分离

7.1.1 仪器设备与材料

7.1.1.1 不同温度的冰箱（2℃~8℃、-20℃、-70℃）。

7.1.1.2 37℃恒温孵化箱。

7.1.1.3 4℃离心机。

7.1.1.4 打孔器。

7.1.1.5 1 mL注射器。

7.1.1.6 石蜡。

7.1.1.7 照蛋器。

7.1.1.8 13 日龄鹅星状病毒血清抗体阴性鹅胚。

7.1.2 样品接种和培养

7.1.2.1 将处理后的样品上清，经绒毛尿囊腔途径无菌接种 13 日龄鹅胚，0.2 毫升/枚，37℃ 孵育，连续观察 6 d。

7.1.2.2 弃去 24 h 内死亡鹅胚，24 h~144 h 内死亡和存活鹅胚置于 4℃ 冰箱过夜或 -20℃ 冷冻 1 h，分别无菌收集尿囊液并进行无菌检查，无菌尿囊液盲传三代。

7.1.3 病毒分离结果判定

组织样品处理液接种鹅胚后，当胚体3 d~5 d内出现死亡，且胚体尿囊膜增厚，死亡鹅胚全身皮肤及胚体腹膜有点状出血斑，肝脏、肾脏、肺脏均呈现点状出血等变化，可判断为鹅疑似星状病毒感染。

7.2 病原检测

7.2.1 RT-PCR 反应

7.2.1.1 仪器设备

- 7.2.1.1.1 生物安全柜。
- 7.2.1.1.2 PCR 基因扩增仪。
- 7.2.1.1.3 台式低温高速离心机（最大转速为 15000r/min）。
- 7.2.1.1.4 无 RNA 酶离心管（1.5mL）。
- 7.2.1.1.5 PCR 反应管（0.2mL）。
- 7.2.1.1.6 微量移液器（最大量程分别为 10 μL、20 μL、100 μL、1000 μL）。
- 7.2.1.1.7 无 RNA 酶带滤芯枪头。
- 7.2.1.1.8 核酸电泳仪。
- 7.2.1.1.9 核酸电泳槽。
- 7.2.1.1.10 紫外凝胶成像仪。
- 7.2.1.1.11 电子天平：精度为 0.01g。
- 7.2.1.1.12 电磁炉或微波炉。

7.2.1.2 试剂与材料

- 7.2.1.2.1 DEPC 水。
- 7.2.1.2.2 商品化 RNA 提取试剂盒。
- 7.2.1.2.3 RT 反应试剂盒。
- 7.2.1.2.4 PCR 反应试剂。
- 7.2.1.2.5 1.0%琼脂糖凝胶，见 A.2。
- 7.2.1.2.6 1×TAE 缓冲液，见 A.3。
- 7.2.1.2.7 核酸染料。
- 7.2.1.2.8 核酸电泳加样缓冲液，见 A.4。
- 7.2.1.2.9 DNA 分子量标准，要求在 100bp~2000bp 之间，有 5 条以上的指示条带。
- 7.2.1.2.10 阳性对照标准品，使用鹅星状病毒 SDPY 株（CCTCC NO: V201808，见附录 C），或其他背景清楚的鹅星状病毒。
- 7.2.1.2.11 阴性对照标准品，为健康鹅正常组织或未感染鹅星状病毒鹅胚尿囊液。
- 7.2.1.2.12 RT-PCR 检测所需引物：

——上游引物 F：5' - TGGTGGTGYTTYCTCAARA -3' ；

——下游引物 R: 5' -GYCKGTCATCMCCRTARCA-3' , 扩增片段长度为 601 bp, 引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

7.2.1.3 试验程序

7.2.1.3.1 RNA 提取

按RNA提取试剂盒说明书提取样品和对照组的RNA。提取的RNA应立即检测, 否则应置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

7.2.1.3.2 RT-PCR 反应

7.2.1.3.2.1 反转录体系及程序

RNase Inhibitor 0.5 μL , M-MLV buffer 2 μL , Random Primers 1.0 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL , RNase M-MLV 0.5 μL , RNA模板5 μL , 共计10 μL 。反转录反应程序为30 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止。

7.2.1.3.2.2 PCR 反应体系及程序

在试剂准备区配制PCR反应液, 在样品制备区进行加样, 反应体系如下: 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , 引物F (10 $\mu\text{mol/L}$)和R (10 $\mu\text{mol/L}$)各0.5 μL , 模板cDNA 3 μL , rTaq DNA聚合酶0.25 μL , 加DEPC水至25 μL 。

瞬时离心, 置于PCR基因扩增仪内进行扩增, 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

7.2.1.3.2.3 琼脂糖凝胶电泳

1.0%琼脂糖凝胶板的制备: 称取1 g琼脂糖, 加入100 mL 1 \times TAE缓冲液中。加热融化后加5 μL 核酸染料溶液, 混匀后倒入放置在水平台面上的凝胶盘中, 胶板厚5 mm左右。依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔), 放入电泳槽中, 加1 \times TAE缓冲液淹没胶面。

加样: 取6 μL ~8 μL PCR扩增产物和2 μL 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳同时设标准DNA Marker、阴性对照、阳性对照。

电泳: 电压80 V~100 V或电流40 mA~50 mA, 电泳30 min~40 min。最后, 由凝胶成像系统观察并拍照记录。

7.2.1.4 结果判定

7.2.1.4.1 试验成立的条件

阳性对照出现601 bp的扩增条带, 且阴性对照无扩增条带时, 判定试验结果成立。

7.2.1.4.2 试验结果的判定

7.2.1.4.2.1 在试验成立的前提下, 待检样品出现 601 bp 的条带, 判定待检样品为鹅星状病毒 PCR 阳性, 必要时, 对扩增片段进行序列测定。

7.2.1.4.2.2 在试验成立的前提下, 待检样品无条带, 则为鹅星状病毒 PCR 阴性(见 B.1)。

7.2.2 实时荧光定量 RT-PCR

7.2.2.1 仪器设备

7.2.2.1.1 生物安全柜。

7.2.2.1.2 台式低温高速离心机(最大转速为 15000r/min)。

7.2.2.1.3 无 RNA 酶的离心管(1.5mL)。

7.2.2.1.4 无 RNA 酶的荧光定量 PCR 管。

7.2.2.1.5 微量移液器(最大量程分别为 10 μL 、20 μL 、100 μL 、1000 μL)。

7.2.2.1.6 无 RNA 酶带滤芯的枪头。

7.2.2.1.7 荧光定量 PCR 仪。

7.2.2.2 试剂与材料

7.2.2.2.1 DEPC 水。

7.2.2.2.2 商品化 RNA 提取试剂盒。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/425043204220012010>