

# 《牛羊副流感病毒 3 型诊断技术》

## 编制说明

注：提交时黑色和蓝色字均不可删减。没有的应写“无”。

### 一、工作简况

#### （一）任务来源

《牛羊副流感病毒 3 型诊断技术》于 2021 年由农业农村部提出，全国动物卫生标准化技术委员会归口，待批准的推荐型国家标准制（修）订项目。

#### （二）起草单位和主要起草人及其所做的工作

本标准由吉林农业科技学院负责起草，江苏省农业科学院兽医研究所、吉林省动物疫病预防控制中心、吉林大学动物科学学院、中国动物卫生与流行病学中心参与起草。吉林农业科技学院、吉林省动物疫病预防控制中心和吉林大学动物科学学院重点针对牛的副流感 3 型诊断技术中病毒分离鉴定、RT-PCR 方法、Realtime RT-PCR 方法和竞争酶联免疫吸附试验进行研究，江苏省农业科学院兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心重点针对牛羊的副流感 3 型诊断技术中羊副流感 3 型的临床诊断、RT-PCR 方法、Realtime RT-PCR 方法、病毒中和试验、竞争酶联免疫吸附试验进行研究。为确保科学、严谨，本标准在预研和起草过程中专门成立了起草小组，并进行分工。

#### （三）主要工作过程

要按标准各阶段为单位分别编写。列出各阶段的关键内容。征求意见、审查阶段的主要内容要详细给出。征求意见要对征求对象的代表性、回复情况、意见处理情况进行总结说明。

##### 1. 起草阶段

（1）预研阶段。2017年，吉林农业科技学院、吉林动物疫病预防控制中心和吉林大学动物科学学院具有丰富经验的高级专家组成技术专家小组，酝酿提出“牛副流感病毒3型诊断技术”相关内容，并依托吉林省产业技术创新战略联盟项目实施和吉林省动物疫病专项流行病学调查项目研究，对牛副流感流行情况开展流行病学调查，建立本标准检测方法，进行为期3年的预研究。

2019年，江苏省农业科学院兽医研究所在前期地标研究基础上，联合中国动物卫生与流行病学中心提出了“羊副流行性感冒诊断技术”行标相关内容，并开展进一步的技术研究。

(2) 正式起草阶段。2019年11月，牛副流感病毒3型诊断技术专家小组根据前期预研结果、实验验证情况，组织相关技术领域专家，成立标准起草工作组，制定了工作计划，拟定2019年12月至2021年1月为标准正式起草阶段。工作组人员由技术专家小组人员和实验验证有关人员组成，工作人员根据任务分工，启动编制工作，查阅了大量技术资料，包括：一是，世界动物卫生组织（OIE）《陆生动物卫生法典》《陆生动物诊断和疫苗手册》；二是，国内相关技术标准、规范、法律、法规等；三是，牛副流感病毒3型实时荧光定量反转录PCR检测技术研发资料，如论文、专利等；四是，标准撰写要求资料，如 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》等。工作人员针对上述资料进行了认真研究，完成了本标准工作组讨论稿，之后通过网络平台召开研讨会，由吉林农业科技学院、吉林省动物疫病预防控制中心、吉林大学动物科学学院3个单位共同研究和修改，形成征求意见稿。

2020年，江苏省农业科学院兽医研究所根据前期地标“山羊副流感病毒3型检测技术规程”实验结果等基础，由原地标起草组成员进一步修订完善形成本标准的讨论稿，并进一步评估检测方法的特异性、敏感性等指标。最终形成了行标“羊副流行性感冒诊断技术”征求意见稿。

## **2. 征求意见阶段**

### **(1) 立项前征求意见情况**

2021年2月，立项前“牛的副流感病毒3型诊断技术”标准起草工作组将征求意见稿、编制说明以网络函询的形式，征求10个单位意见建议。其中，从事牛副流感诊断技术研究的大学2个、研究所3个，包括吉林农业大学动物科技学院、吉林农业科技学院、军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所、吉林省农业科学院、吉林省畜牧兽医科学研究所；从事牛副流感诊断技术应用的事业单位和企业5个，包括：河北省动物疫病预防控制中心、延边州动物疫病预防控制中心、长春市动物疫病预防控制中心、致准（嘉兴）生物科技有限公司、长春西诺生物科技有限公司等10个单位均全部回复，并给予高度评价，认为该方法可行性高，

对研判牛副流感发生发展趋势和诊断具有重要的科学指导意义，10位专家一致认为可以申报农业行业标准。

2021年4月，立项前“羊副流行性感冒诊断技术”标准起草工作组向10家单位征求了意见，包括：河北农业大学、江苏省动物疫病预防控制中心、江苏沿海地区农业科学研究所、中国农业科学院上海兽医研究所、徐州苏羊羊业有限公司、中国农业科学院兰州兽医研究所、南京农业大学、南京农业大学、江苏农牧科技职业学院、中国动物卫生与流行病学中心，各单位一致认为可以申报农业行业标准。

## （2）立项后征求意见情况

2021年7月，立项后“牛的副流感3型诊断技术”标准起草工作组将征求意见稿、编制说明以网络函询的形式，征求20个单位意见建议。包括：吉林省畜牧兽医研究院、吉林省农业科学院、长春市农业科学院、扬州大学疾病诊断技术中心、延边州动物疫病预防控制中心、天津市动物疫病预防控制中心、河南省动物疫病预防控制中心、吉林农业大学、长春海关技术中心、吉林省卫精源牧业有限公司、青岛农业大学、吉林大学动物医学学院、军事兽医研究所、内蒙古农业大学、哈尔滨兽医研究所、兰州兽医研究所、山东师范大学、西南民族大学、吉林科技学院、长春市动物疫病预防控制中心。

~~3. 审查阶段（此次不写本部分）~~

~~4. 报批阶段（此次不写本部分）~~

## 二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

### （一）标准的编写原则

主要阐述标准制定或修订过程遵循的基本原则。

标准编制遵循“科学性、先进性、适用性、一致性、规范性”的原则，注重标准的通用性、实用性、可操作性，符合我国国情和诊断技术需求。本标准内容经过大量试验验证，易懂、易掌握、易操作。

### （二）提出本标准主要内容的依据

主要内容包括技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等。依据包括试验和统计数据。尤其注意本条不要写成任务来源。

#### 1. 技术指标依据

牛副流感又称“运输热”，是由牛副流感病毒3型引起牛的一种急性呼吸道

传染病。牛副流感病毒 3 型（BPIV3）属副黏病毒科副黏病毒亚科呼吸道病毒属成员，主要侵害牛呼吸器官引起牛高热，呼吸困难和咳嗽，是牛呼吸道疾病的启动器。该病给我国养牛业特别是长途运输牛造成严重经济损失，影响养牛业的发展。我国是重要的养牛大国，尤其是肉牛养殖跃居世界第三，近年来流行病学调查显示我国牛场牛副流感血清抗体阳性率 71%以上，最高达 100%，死亡率 20%以上，长途运输牛发病率远高于牛场固定饲养牛的发病率。

目前，该病国内尚无有效疫苗，快速诊断是控制 BPIV3 流行的有效方法。本标准的制定对诊断牛副流感具有重要指导意义。当前，我国在牛副流感诊断和出入境检验检疫过程中未建立相关标准。本病诊断方法血凝抑制试验虽然操作简单、成本低，但特异性低和，同时受临床毒株变异等因素影响不建议使用，而中和试验因阳性对照物和阴性对照物制备难度大，同样不建议应用。本病确诊可采用病毒分离和免疫荧光试验，快速诊断可采用反转录 PCR、实时荧光定量反转录 PCR 方法，血清学诊断可采取竞争 ELISA 方法。这些方法当前还没有标准化，所以现阶段急需将其列入行业标准，进行标准化。

江苏省农业科学院兽医研究所于 2013 年起开展羊副流感诊断防控技术研究，先后完成不同流行毒株的分离鉴定、全基因组测序、病毒分离培养技术、核酸检测技术、血清抗体检测技术等。在临床诊断方面，主要依据本课题组流行病学数据以及实验室试验数据总结，包括：流行病学特点、临床症状指标。在病原学诊断方面，通过比对山羊副流感病毒 3 型与牛副流感病毒 3 型基因序列差异，设计特异性引物及探针，建立了特异的核酸检测方法，与牛副流感病毒 3 型无交叉反应，具有良好的临床应用效果。血清学检测技术中的中和试验主要参考牛副流感病毒 3 型等相关病毒的检测技术并结合课题组具体试验数据制定。同时利用制备的单克隆抗体建立竞争 ELISA 抗体检测方法，并组装形成试剂盒，确定对牛羊样品检测的判定标准。

## **2. 结构和规则依据**

本标准严格按照 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》要求起草制定。

### **（三）新旧标准对比（适用于修订标准的情况）**

无。

### 三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

#### (一) 主要试验或验证的分析

##### 1. 病毒分离鉴定试验

(1) 病料处理。将临床采集的鼻拭子或组织研磨液放入装有适量处理液(含 1000 U/ml 青霉素、1000  $\mu$ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液)的灭菌冻存管中，充分混匀，冻融 3 次后，4 $^{\circ}$ C，2000 r/min 离心 10 min，取上清经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后，分装，置-80 $^{\circ}$ C 保存作接种材料。

(2) MDBK 细胞培养。将上述处理后材料接种于长成单层 MDBK 细胞的 6 孔培养板，每孔接种 0.2 ml，设立正常细胞对照孔，37 $^{\circ}$ C 培养箱吸附 1 小时后，弃去孔内液体，用 PBS 清洗后加入 2% 马血清的维持液 1 ml，置 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内，每日观察 CPE，培养 60-72 h，反复冻融收获病毒液，并继续盲传 2-4 代，标记分装后置于-80 $^{\circ}$ C 保存。肉眼可见细胞变圆，逐渐脱落，最后变细变长，拉网状。CPE 结果如图 1 所示。

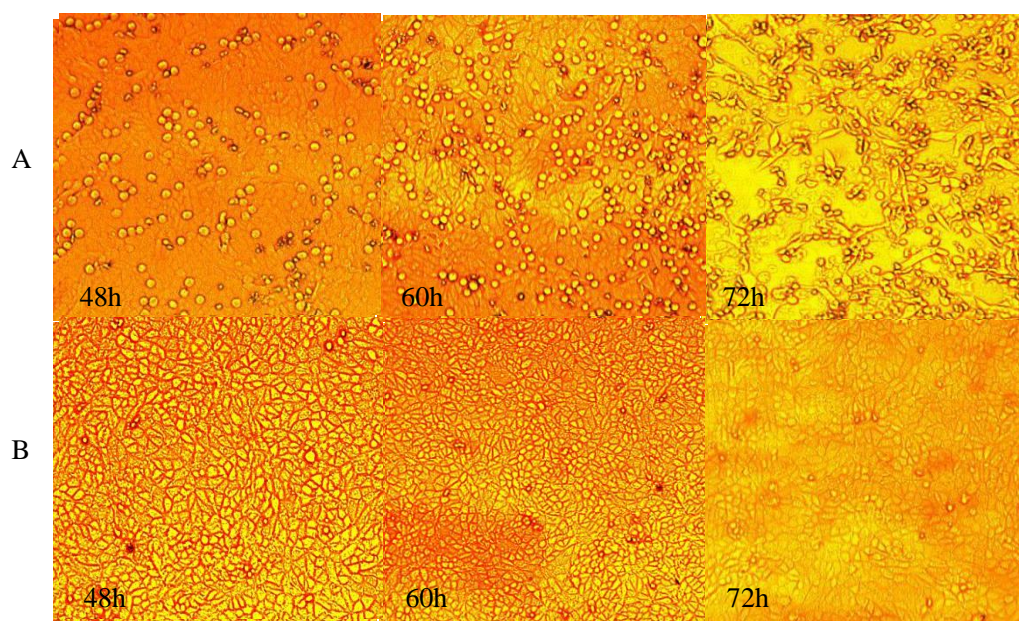


图 1. BPIV3 病毒接种 MDNK 细胞 48h、60h 和 72h CPE 结果

A: 48h、60h 和 72h CPE; B: 48h、60h 和 72h 细胞对照

(3) 分离病毒的 TCID<sub>50</sub> 测定。将培养至 F2-F4 代的病毒，10 倍系列稀释，单层接种于长满单层 MDBK 细胞的 96 孔细胞培养板，每个稀释度 8 个孔，每孔 50  $\mu$ L，设两个重复。37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 1 h 后，弃去孔内液体，用 PBS 清洗后加入 2% 血清的维持液 100  $\mu$ L，置 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内，培养 60-72 h，设



立不接种病毒液的细胞培养孔为阴性对照，接种标准毒株的为阳性对照，每日观察 CPE，接种 60-72h 后，按照 Reed-Muench 法计算病毒毒价。

## 2. 免疫荧光试验

(1) 病毒接种。将制备好的病毒液接种于长满单层 MDBK 细胞的 96 孔细胞培养板，设立不接种病毒液的细胞培养孔为阴性对照，同时接种标准毒株的为阳性对照。

(2) 细胞固定。接种后第 60 h 弃孔内液体，用 PBS (0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 洗 3 遍后用固定液固定 (丙酮:甲醇=1:1)，-20℃ 2 h，然后弃固定液。

(3) 免疫荧光。用 PBS 洗三次，加入荧光素异硫氰酸酯 (FITC) 标记的 BPIV3 单克隆抗体，37℃ 温箱孵育 30~40 min，弃去孔内液体，PBS 洗三遍，每孔再加 50 μL PBS，置荧光显微镜下观察并拍照，结果如图 2 所示。

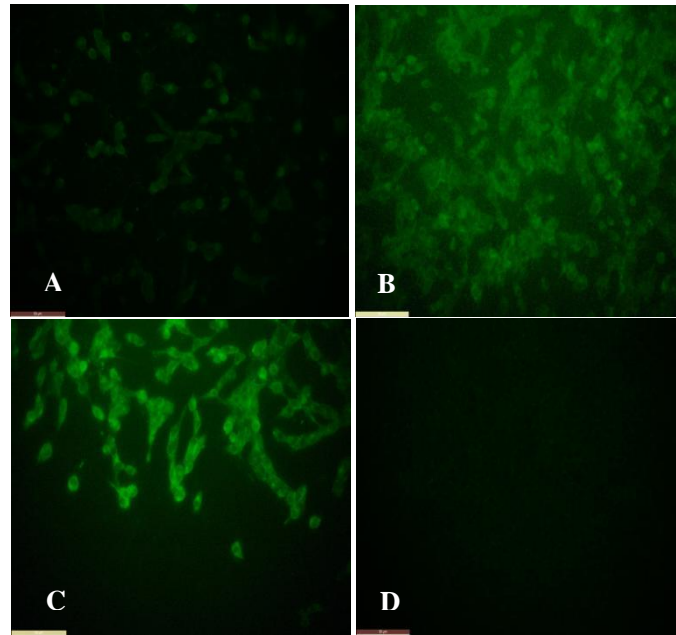


图 2: BPIV3 接种 MDBK 细胞直接荧光结果

A: 48h 可见少量特异荧光，随着培养时间的延长，未见荧光数量的增加；B: 60h 特异性荧光增多，且 CPE 明显；C: 72h 培养免疫荧光，细胞变细变长，脱落；D: 正常细胞对照，无特异荧光。

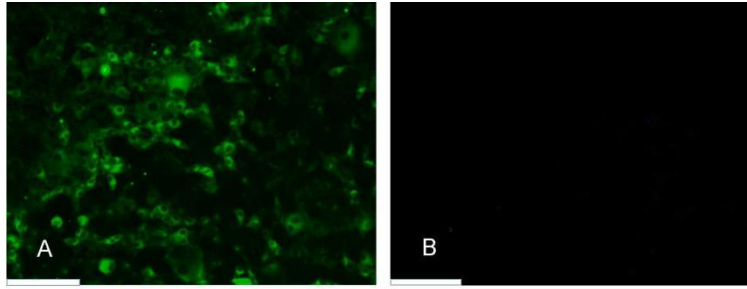


图 3: CPlV3 接种 MDBK 细胞直接荧光结果

A: 典型荧光图; B: 无特异荧光图

### 3. 反转录 PCR (RT-PCR) 方法

(1) BPlV3 RT-PCR 方法建立。采用设计好的引物建立 RT-PCR 法, 其反应体系总体系 25  $\mu\text{L}$ , 上游和下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , 补充灭菌双蒸水至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  2min, 94 $^{\circ}\text{C}$  30s, 57 $^{\circ}\text{C}$  30s, 72 $^{\circ}\text{C}$  1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  总延伸 10min。扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统检测可见 425bp 大小片段, 结果如图 4 所示。

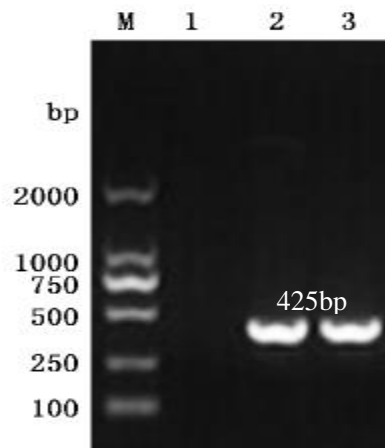


图 4: BPlV3 RT-PCR 方法扩增凝胶电泳图

(2) BPlV3 RT-PCR 方法敏感性测定。最低可检测 10pg/ $\mu\text{L}$  的病毒。以 BPlV3 阳性质粒为模板, 进行 10 倍稀释梯度稀释至  $10^{-7}$  稀释度, 反应体系中 BPlV3 阳性质粒为模板含量 10ng/ $\mu\text{L}$ ~10pg/ $\mu\text{L}$ 。反应混合物总体积 25  $\mu\text{L}$ , 进行 RT-PCR 敏感性检测反应体系及反应条件见同上, 结果如图 5 所示, 最低可检测 10pg/ $\mu\text{L}$  的病毒。

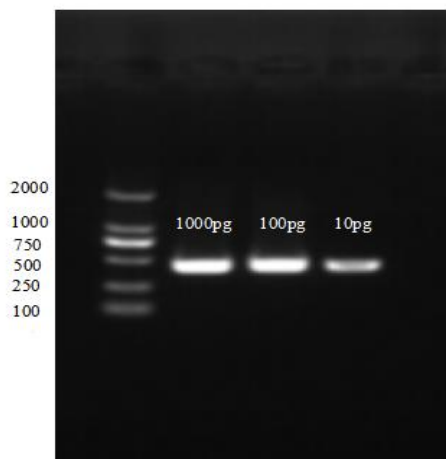


图 5: BPIV3 RT-PCR 方法敏感性测定结果

(3) BPIV3 RT-PCR 方法特异性测定。分别以 BPIV3、IBRV、BRSV 和 BVDV 阳性对照重组质粒的混合物加入鉴定牛副流感病毒 3 型病毒 (BPIV3) 的引物 P1 和 P2, 对其混合模板进行方法的特异性实验; 同时分别以 IBRV、BPIV3、BVDV 和 BRSV 阳性质粒为对照, 水为阴性对照。实验结果: 如图 6 所示, 分别以 IBRV、BPIV3、BRSV 和 BVDV 阳性对照重组质粒为模板出现其对应的阴性、425bp 条带, 阴性对照均未扩增出任何条带。

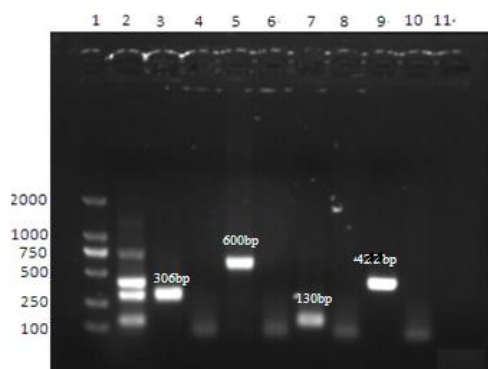


图 6: BPIV3 RT-PCR 方法特异性测定结果

注: 1. DNA MARKer 2 000; 2. IBRV、BRSV、BVDV 和 BPIV3 混合模板及对应引物多重 PCR 检测结果; 3. IBRV 阳性对照; 4. IBRV 引物及 BRSV、BVDV 和 BPIV3 混合模板 PCR 检测结果; 5. BRSV 阳性对照; 6. BRSV 引物及 IBRV、BVDV 和 BPIV3 混合模板 PCR 检测结果; 7. BVDV 阳性对照; 8. BVDV 引物及 IBRV、BRSV 和 BPIV3 混合模板 PCR 检测结果; 9. BPIV3 阳性对照; 10. BPIV3 引物及 IBRV、BVDV 和 BRSV 混合模板 PCR 检测结果; 11. 蒸馏水对照

(4) CPIV3 RT-PCR 方法建立。提取山羊副流感病毒 3 型分离株 RNA, 利用引物对 MF/MR 进行目的基因 RT-PCR 扩增, 将纯化的目的片段克隆入 pMD18T 载体, 提取阳性质粒, 测定浓度, 作为标准品储存于 -20℃ 备用。

采用 20 μL 的 RT-PCR 反应体系, 使用 Transgen 公司 EasyScript™ One Step RT-PCR Kit 配制反应体系, 2×R-Mix 10 μl, 引物各 0.5 μl, E-Mix 0.4 μl, 提取的核酸 4 μl, RNase Free dH2O 4.6 μl。反应程序: 45℃ 反转录 30min;



94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 分别设定 48℃、51℃、54℃、57℃、60℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min。最终确定最佳退火温度为 54℃。实验结果如图 7 所示。

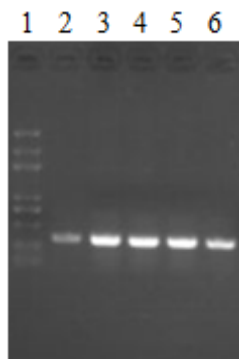


图7: RT-PCR退火温度优化

1: DL2000 plus Marker; 2: 48℃; 3: 51℃; 4: 54℃; 5: 57℃; 6: 60℃

(5) CPIV3 RT-PCR 方法敏感性测定。以浓度为  $10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ – $10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的阳性质粒为模板进行荧光定量 RT-PCR 扩增, 最低可检测到  $10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ , 说明建立的方法灵敏度较高, 如图 8。

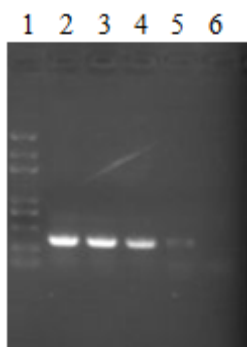


图8: RT-PCR敏感性检测

1: DL2000 plus Marker; 2:  $10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 3:  $10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 4:  $10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ;  
5:  $10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 6:  $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$

(6) CPIV3 RT-PCR 方法特异性测定。用建立的方法分别检测 BPIV3、小反刍兽疫病毒 (PPRV)、蓝舌病病毒 (BTV)、牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)、边界病病毒 (BDV) 的核酸样品, 均无特异性条带, 说明该方法具有良好的特异性, 如图 9。

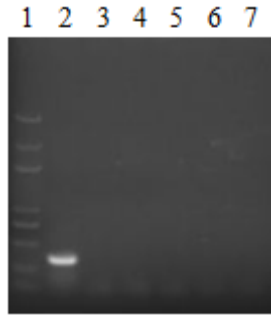


图9: RT-PCR特异性检测

1: DL2000 plus Marker; 2: BPIV3; 3: PPRV; 4: BTV; 5: BVDV; 6: BDV

#### 4.实时荧光定量反转录 PCR 方法

##### (1) BPIV3 实时荧光定量反转录 PCR 方法的建立

采用设计好的引物和探针建立实时荧光定量反转录 PCR 法,其反应体系总体系 20  $\mu\text{L}$ , 分别为 GoTaq<sup>®</sup> Probe qPCR Master Mix(2 $\times$ ) 10 $\mu\text{L}$ , 上游引物 (P1) 1.0  $\mu\text{L}$ , 下游引物 (P2) 1.0  $\mu\text{L}$ , 探针水解 (10  $\mu\text{M}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , Nuclease-Free Water 6.0  $\mu\text{L}$ , 模板 1 $\mu\text{L}$ 。扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40 个循环。扩增曲线如图 10 所示。

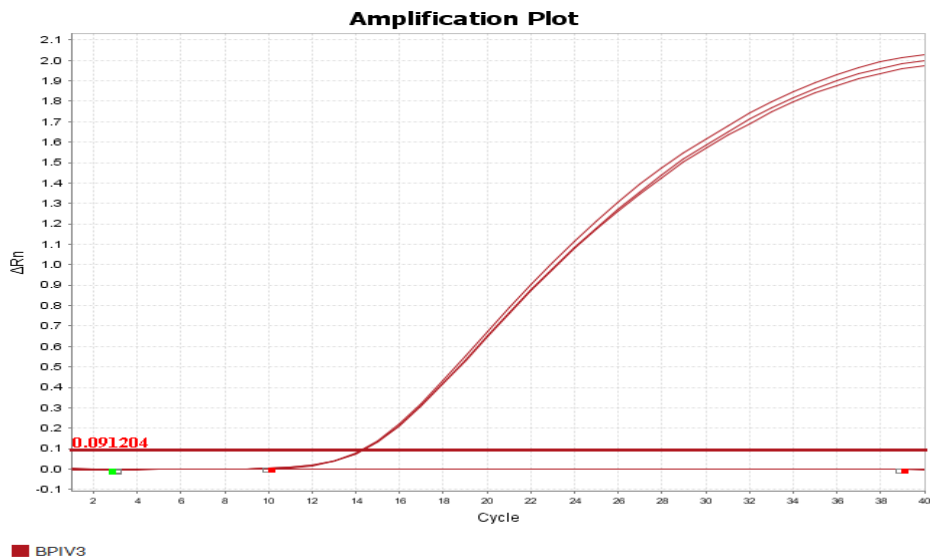


图 10: BPIV3 实时荧光定量反转录 PCR 方法扩增曲线图

##### (2) BPIV3 实时荧光定量反转录 PCR 方法敏感性测定

最低可检测  $10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的病毒。以 BPIV3 标准毒为模板,提取种 RNA 后,反转录产物进行 10 倍稀释梯度稀释至  $10^{-7}$  稀释度,反应体系中模板含量为  $5.60 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L} \sim 5.60 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 。反应混合物总体积 20  $\mu\text{L}$ ,进行荧光定量 PCR 敏感性检测反应体系及反应条件见同上,结果如图 11 所示,最低可检测  $10^1$

拷贝/ $\mu\text{L}$  的病毒。

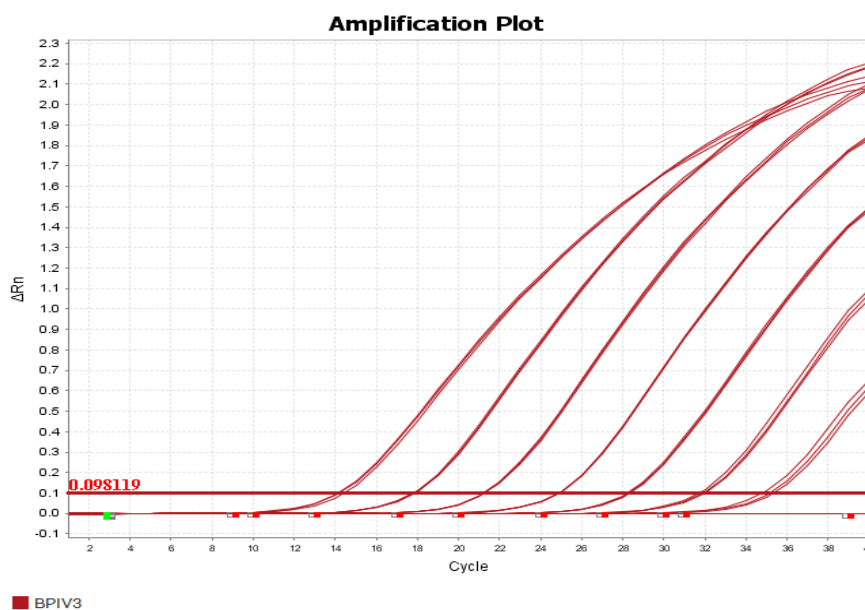


图 11: BPIV3 实时荧光定量反转录 PCR 方法敏感性测定结果

### (3) BPIV3 实时荧光定量反转录 PCR 方法特异性测定

以牛呼吸道相关病毒 BRSV、BPIV3、BoHV-1 和 BVDV 标准阳性质粒为模板，测定实时荧光定量反转录 PCR 方法特异性。反应体系总体系及反应条件同上，结果如图:12 所示。

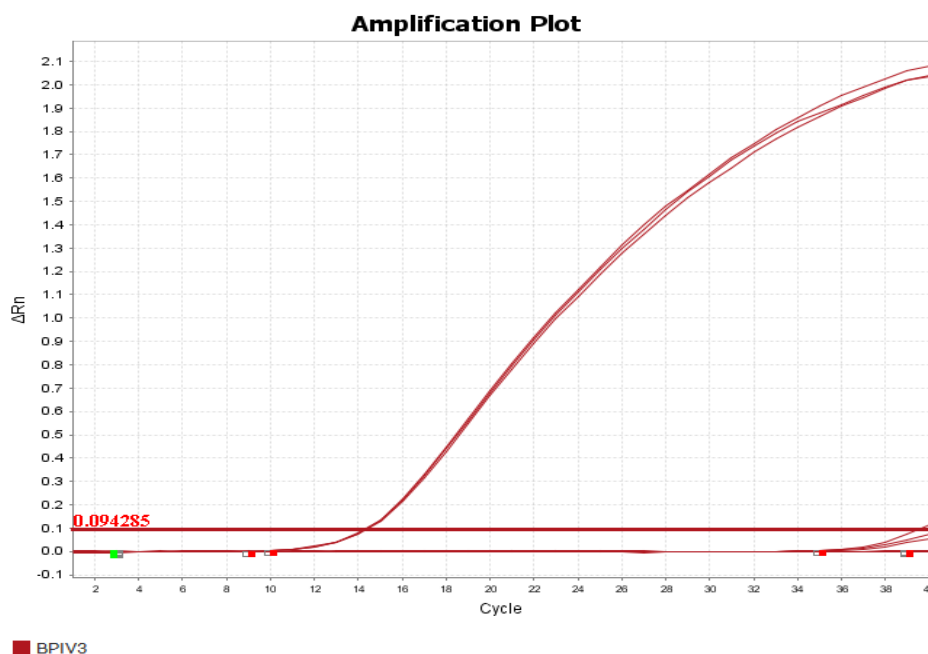


图 12: BPIV3 实时荧光定量反转录 PCR 方法特异性测定结果

### (4) CPIV3 实时荧光定量反转录 PCR 方法的建立。提取山羊副流感病毒 3

型分离株 RNA，利用引物对 qMF/qMR 进行目的基因 RT-PCR 扩增，将纯化的目的片段克隆入 pMD18T 载体，提取阳性质粒，测定浓度，作为标准品于-20℃备用。

在反应体系中其它条件相同的情况下，将引物浓度分别从 0.1 μmol/L 至 2.0 μmol/L 做连续倍比稀释，通过分析比较确定最佳引物终浓度为 0.2 μmol/L。进而将探针浓度分别从 0.1 μmol/l 至 0.5 μmol/l 作连续倍比稀释后进行检测，通过分析比较确定最佳探针终浓度为 0.4 μmol/l。

最终确定山羊副流感病毒 3 型实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL，使用 TaKaRa 公司 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 配制反应体系，所需各组分及相应浓度见表 1。反应条件选择如下：42℃，5 min，反转录；95℃，10 s，预变性；95℃，5 s，60℃，34 s，40 个循环。

表 1. 实时荧光定量 RT-PCR 反应体系各组分情况

组分	用量/终浓度
2×One Step RT-PCR Buffer III	10 μL/1×
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μL)	0.4 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.4 μL
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4 μL/0.2 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4 μL/0.2 μM
TaqMan Probe(10 μM)	0.8 μL/0.4 μM
ROX Reference Dye I (50×)	0.4 μL/1×
Total RNA	2 μL
RNase Free dH <sub>2</sub> O	5.2 μL

(5) CPIV3 实时荧光定量反转录 PCR 方法标准曲线的建立。取 10 倍梯度稀释得标准品为模板，用优化后的反应体系和程序进行荧光定量 PCR 扩增（如图 13）。以循环数阈值为纵轴，以质粒拷贝数的对数 (lgX) 为横轴，绘制标准曲线。相应的拷贝数与 Ct 值之间的线性关系较好 ( $Ct = -3.1911lgX + 39.811$ )，R<sup>2</sup> 值为 0.997。

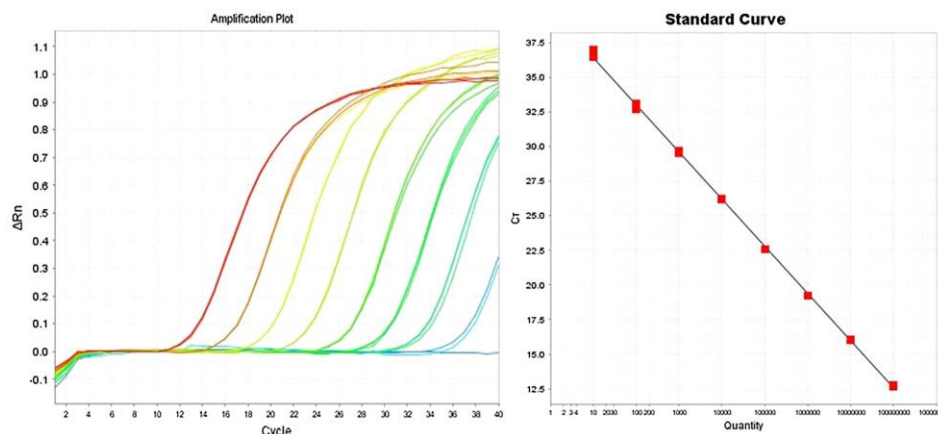


图 13: CPIV3 荧光定量 RT-PCR 扩增曲线与标准曲线图

(6) CPIV3 实时荧光定量反转录 PCR 方法特异性测定。分别以 BPIV3、PPRV、BVDV、BDV 的 RNA 为模板进行荧光定量 PCR 扩增，以  $10^{-3}$  倍稀释的标准品为阳性对照，检测该方法的特异性，仅标准质粒获得扩增曲线，其余样品无扩增信号，如图 14，证明该方法具有很高的特异性。

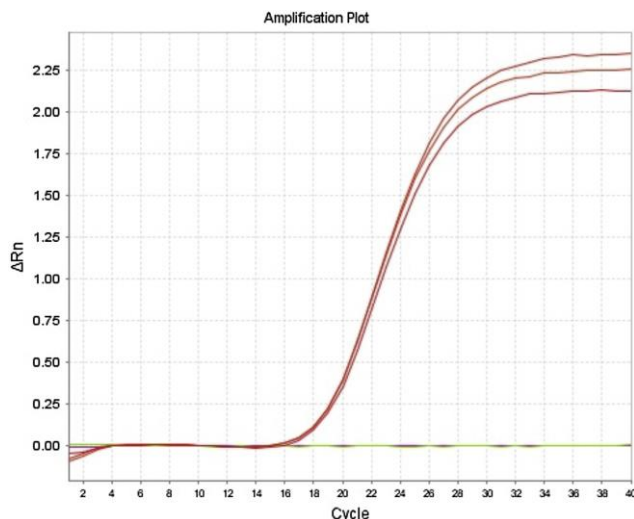


图 14: CPIV3 荧光定量 RT-PCR 特异性检测结果

(7) CPIV3 实时荧光定量反转录 PCR 方法敏感性测定。以浓度为 10 拷贝/ $\mu\text{l}$  和 1 拷贝/ $\mu\text{l}$  的阳性质粒为模板进行荧光定量 RT-PCR 扩增，10 拷贝/ $\mu\text{l}$  仍能出现扩增曲线，说明建立的方法灵敏度很高，如图 15。

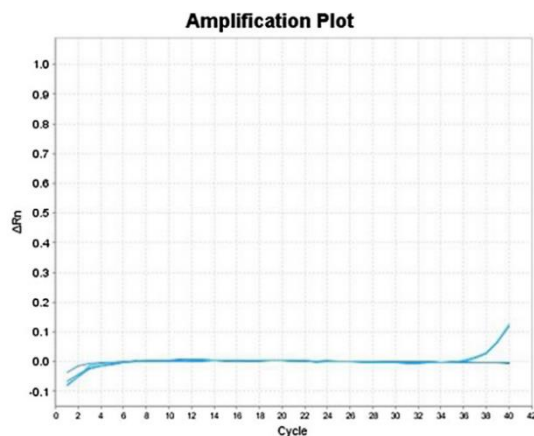


图 15: CPIV3 荧光定量 RT-PCR 敏感性检测

## 5. 竞争 ELISA 检测试剂盒的建立

(1) 酶标抗体制备：选取制备的 CPIV3 单克隆抗体杂交瘤细胞株 2E6，腹腔注射小鼠，制备腹水，3 000 rpm 离心 20 min，收集上清，分装，HRP 标记，测定效价，并分装保存至  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

(2) 抗原包被浓度和单克隆抗体 2E6 工作浓度的优化。按照矩阵法进行，以  $0.05\text{ mol/L}$  pH 9.6 碳酸盐缓冲液为包被液，分别以 300、400、500、600、

700、800 倍稀释的超离并灭活的 CPIV3 病毒（病毒 HA 效价  $2^{13}$ ）作为包被抗原，4 °C 过夜包被酶标板。PBST 洗涤 3 次后加入含 0.5%BSA 的 PBST，置 37 °C 培养箱封闭 2 h，PBST 洗涤 3 次，拍干，分别加入 CPIV3 阳性和阴性血清，50 uL/孔。37 °C 作用 1 h，取出酶标板，PBST 洗涤 3 次，拍干，依次加入 500、600、700、800、900、1000 倍稀释的 HRP 标记单克隆抗体（ELISA 效价 102400），每个稀释度重复一次，取其平均值，计算各条件下的 PI 值，选择阴性血清 OD450nm 值接近 1、PI 值最大的反应条件作为最佳反应条件。结果如表 2 所示：最佳抗原包被浓度为 1:400 稀释；酶标单克隆抗体的最佳工作浓度为 1:900 稀释。

（3）反应条件的优化。通过优化待检血清、酶标单克隆抗体和底物 TMB 的作用时间，最终完成竞争 ELISA 检测方法的建立和试剂盒的组装。经条件优化，其最佳反应条件为抗原包被浓度 1:400 稀释（含病毒 HA 效价 24），待检血清 1:5 稀释，血清作用时间为 60 min，HRP 标记单克隆抗体稀释度为 1:900（效价为）并反应 60 min，TMB 底物作用时间 10 min。

表 2 抗原包被浓度和酶标单克隆抗体工作浓度的选择

抗原包被浓度	酶标单克隆抗体工作浓度						
		1:500	1:600	1:700	1:800	1:900	1:1 000
1:300	P	0.431	0.344	0.389	0.31	0.23	0.257
	N	0.98	0.986	1.018	0.983	0.864	0.86
	PI%	56.02%	65.11%	61.79%	68.46%	73.38%	70.12%
1:400	P	0.354	0.324	0.334	0.291	0.193	0.264
	N	0.965	0.974	0.983	0.905	0.94	0.927
	PI%	63.32%	66.74%	66.02%	67.85%	79.47%	71.52%
1:500	P	0.33	0.295	0.291	0.264	0.232	0.253
	N	0.908	0.897	0.923	0.876	0.923	0.909
	PI%	63.66%	67.11%	68.47%	69.86%	74.86%	72.17%
1:600	P	0.336	0.255	0.246	0.21	0.217	0.192
	N	0.923	0.85	0.847	0.812	0.865	0.813
	PI%	63.60%	70.00%	70.96%	74.14%	74.91%	76.38%
1:700	P	0.29	0.238	0.281	0.224	0.22	0.241
	N	0.888	0.91	0.878	0.678	0.893	0.904
	PI%	67.34%	73.85%	68.00%	66.96%	75.36%	73.34%
1:800	P	0.249	0.239	0.242	0.214	0.195	0.207
	N	0.889	0.853	0.872	0.587	0.822	0.844
	PI%	71.99%	71.98%	72.25%	63.54%	76.28%	75.47%



(4) 竞争 ELISA 临界值的确定：用竞争 ELISA 检测经病毒中和实验检验的 CPIV3 抗体阳性山羊血清 126 份和 CPIV3 抗体阴性血清 79 份，计算其阻断率，经统计学 ROC 分析，通过与中和实验结果比较和特异性和敏感性分析，以  $PI > 35\%$  时判定血清样品为 CPIV3 抗体阳性， $PI \leq 35\%$  时判定血清样品为 CPIV3 抗体阴性。同样地，用竞争 ELISA 检测经病毒中和实验检验的 BPIV3 抗体阳性牛血清 59 份和 BPIV3 抗体阴性血清 33 份，计算其阻断率，经统计学 ROC 分析，通过与中和实验结果比较和特异性和敏感性分析，以  $PI > 38\%$  时判定血清样品为 BPIV3 抗体阳性， $PI \leq 38\%$  时判定血清样品为 BPIV3 抗体阴性。

## (二) 综述报告

牛副流感病毒 3 型属副黏病毒科副黏病毒亚科呼吸道病毒属成员，为单链负股有囊膜的 RNA 病毒。牛副流感病毒 3 型以侵害牛呼吸器官引起牛高热，呼吸困难和咳嗽为主要特征，严重危害养牛业，对养牛业造成巨大经济损失。

目前，检测牛副流感的方法主要有病毒分离、中和试验、PCR 方法、ELISA、血凝和血凝抑制试验等。其中，PCR 检测技术是目前被广泛使用的一种快速诊断技术，在动物疫病诊断、物种鉴别、食品检验等领域被广泛应用，其技术成熟度高，试剂商业化程度高，运行成本较低，便于基层实验室使用。而本标准采用的病毒分离、免疫荧光、反转录 PCR 及实时荧光定量反转录 PCR 方法，具有快速、重复性好、用样量少、无辐射的优点。同时，该方法中的荧光探针可有效避免生物荧光背景的干扰，该方法对于牛副流感临床发病早期、排毒期等弱阳性病例具有明显的诊断优势。

山羊副流感病毒 3 型系标准起草单位首先报道的新病原，尚无其他文献报道其检测方法。在临床诊断方面，其与牛副流感在病原学、遗传特性、致病特点方法具有相似性，主要依据本课题组流行病学数据以及实验室试验数据总结确定呼吸道症状与病变为诊断指标。在病原学诊断方面，通过比对 CPIV3 与牛副流感病毒 3 型 (BPIV3) 基因序列差异，设计特异性引物及探针，建立了特异的核酸检测方法，重点评价与 BPIV3 的交叉反应，确保能鉴别两种病毒。国外文献报道的有限数量的羊群副流感病毒抗体检测研究均采用牛副流感病毒作为检测抗原，本单位鉴定 CPIV3 后，血清学检测技术中的中和试验采用 CPIV3 作为抗原，参考 BPIV3 等相关病毒的检测技术并结合课题组具体试验数据制定本标准指标。

### （三）技术经济论证

本标准制定前，特别进行了临床应用为验证本标准实验方法的科学性、准确性，本标准制定前专门对吉林省现代肉牛产业体系项目实施和吉林省动物疫病流行病学专项调查工作开展过程中收集的典型牛副流感病例的 28 份牛腔鼻拭子、组织等样品，使用试剂盒核酸提取基因组，应用本标准建立的实时荧光定量反转录 PCR 方法进行检测。C<sub>mt</sub> 值 ≤ 36 且出现“S”型曲线即可判定为 BPIV3 阳性，临床样品检测效果如下图 16 所示。

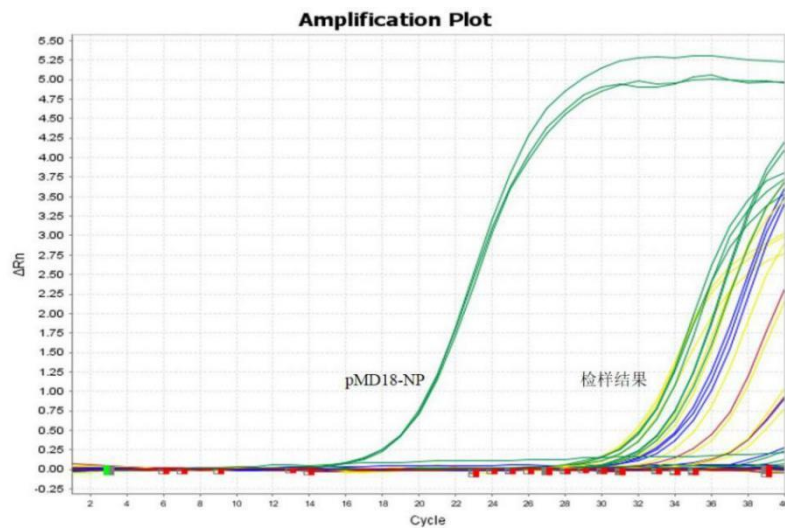


图 16： BPIV3 实时实时荧光定量反转录 PCR 法临床应用检测结果

本标准所述的病原学检测技术和血清学检测技术均为疾病诊断常用的技术，病毒分离与中和试验操作要求稍高，但是疾病诊断的金标准，核酸检测与 ELISA 抗体检测方法适合普通实验室开展流行病学调查及疾病检测，经济实用，检测单位可根据自身试验条件选择合适的检测技术。

### （四）预期的经济效果

牛、羊副流感是危害养牛业和养羊业主要呼吸道疾病之一，既影响牛和羊的数量发展又影响牛和羊的质量和食品安全，每年约 20% 的牛或羊因该病死亡，严重阻碍我国养牛业、养羊业发展，给养牛业和养羊业造成巨大经济损失。本标准的制定和颁布为预防和诊断该病将提供统一的操作方法，避免实验操作误差延误诊断时机，保证防治工作顺利开展。

本标准制定的理论和实践基础强，具有一定的实用性、可操作性和针对性，可作为推荐性行业标准在全国牛和山羊副流感防治工作中进行推广应用。

## 四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国内同

## 类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品有关数据对比情况

本标准未采标。通过联机检索未查询到国内外相关标准。

### 五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

主要说明标准与相应法律法规和强制性标准之间的衔接、协调情况。列出与标准密切相关的法律法规、强制性标准的名称和编号。

本标准为首次制定，与有关法律法规不产生冲突。本标准的制定，对于更好的贯彻和执行《中华人民共和国动物防疫法》等法律法规具有重要意义。

### 六、重大分歧意见的处理经过和依据

说明各方面专家对标准主要内容（如参数、指标、试验方法）有哪些重大分歧，以及标准起草单位在修改完善标准过程中，对专家分歧意见的处理主要依据和处理结果。对同一方法或问题有不同解决方案的应讨论出最佳方案。

无。

### 七、标准性质（强制性，推荐性）的建议，特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

严格按照立项下达的性质编写。无需增加解释文字。建议将本修订标准批准为推荐性标准。

建议将《牛羊副流感病毒 3 型诊断技术》批准为推荐性国家标准，便于推广和积累数据。

### 八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）

《牛羊副流感病毒 3 型诊断技术》（NY/T ××××-××××）通过后，由全国动物卫生标准化技术委员会颁布实施。标准发布后，标准起草单位举办技术培训班，对有关技术人员进行相关技术强化操作培训。

### 九、废止现行有关标准的建议

无

### 十、其他应予说明的事项。

主要包括标准项目任务完成中有关标准名称变更、对有争议问题、遗留问题处理、尚需探讨的问题和制定或修订配套标准的说明等。

无。