

ICS 65.030.20

CCS B 41

团体标准

T/GAAA XXX—2023

规模化驴场马疱疹病毒 8 型感染诊断技术

(征求意见稿)

Diagnostic techniques for EHV-8 infection in scale donkey farm

2022-XX-XX 发布

2022-XX-XX 实施

中国畜牧业协会 发布

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》给出的规定起草。

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这些专利的责任。

本文件由中国畜牧业协会提出并归口。

本文件起草单位：聊城大学、青岛农业大学、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、西北农林科技大学、山东省农业科学院畜牧研究所、山东畜牧兽医职业学院、新疆畜牧科学院畜牧研究所、聊城市畜牧兽医局、东阿阿胶股份有限公司、禹城惠民农业科技有限公司、阳谷县荣发牧业有限公司、东阿阿胶阜新科技开发有限公司、内蒙古自治区农牧业科学院、内蒙古草原御驴科技牧业有限公司、陕西佳县佳米驴畜牧业养殖有限公司、新疆金胡杨牧业有限公司、禹城惠民农业科技有限公司、阳谷县荣发牧业有限公司。

本文件主要起草人：李亮亮、王彤彤、刘文强、王长法、刘桂芹、任慧英、刘狄萩、党瑞华、张伟、张燕、董建宝、肖海霞、王怀栋、陈建兴、何飞、嵇传良、于杰、杨涛、吴海青、白晋宇、王高平、张建玲、贾涛、张继强。

规模化驴场马疱疹病毒 8 型诊断技术

1 范围

本文件规定了马疱疹病毒 8 型诊断的试剂和材料、仪器和设备、诊断和综合判定方法，并给出了治疗建议。

本文件适用于规模化马场或驴场马疱疹病毒 8 型的流行病学调查、诊断和检测。

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。

NY/T 541 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

马疱疹病毒8型 equine herpesvirus 8

又称为驴疱疹病毒3型（AHV-3），该病毒主要导致马属动物呼吸道疾病、流产和脑脊髓炎等症状，是一种严重危害马属动物健康的病原。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件：

- a) EHV-8: 马疱疹病毒 8 型（equine herpesvirus 8）；
- b) AHV-3: 驴疱疹病毒 3 型（asinine herpesvirus 3）；
- c) FBS: 胎牛血清（Fetal Bovine Serum）；
- d) CPE: 细胞病变（Cytopathic effect）；
- e) DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐（4',6-diaminyl-2-phenylindoline dihydrochloride）。

5 试剂和材料

- 5.1 DEPC 水。
- 5.2 商品化 Taq premix 酶。
- 5.3 PCR 引物序列参见附录 A。
- 5.4 商品化培养基 MEM，胎牛血清（FBS）。
- 5.5 青霉素、链霉素，配置参见附录 B。
- 5.6 兔肾细胞系（RK-13）。
- 5.7 T25 细胞瓶。
- 5.8 0.45 μm 微孔滤膜。
- 5.9 磷酸盐缓冲液（PBS）。配置参见附录 B。
- 5.10 0.2 mL 和 1 mL 无 RNA 酶的 EP 管。
- 5.11 商品化 DNA 标准分子 Maker。
- 5.12 10 % 甲醛固定液。配置参见附录 B。
- 5.13 商品化二甲苯。
- 5.14 0.25%胰蛋白酶。配置参见附录 B。

5.15 3% H₂O₂-甲醇。配置参见附录 B。

5.16 鼠源 EHV-8 阳性血清制备方法参见附录 C。

6 仪器和设备

6.1 PCR 扩增仪。

6.2 电泳仪和电泳槽。

6.3 凝胶成像仪。

6.4 恒温水浴锅。

6.5 超低温冰箱。

6.6 细胞培养箱。

6.7 倒置显微镜。

6.8 离心机。

6.9 石蜡切片机。

7 诊断

7.1 临床症状

7.1.1 呼吸道型

引发鼻肺炎，食欲不振，常见症状初期流出大量浆状鼻液继而转变为脓性鼻液，鼻黏膜、眼结膜出现广泛充血，下颌淋巴结肿大，病驴体温升高至 40℃ 以上，同时血液中白细胞数量明显减少，整个病程可持续 2 周~3 周，感染严重的因呼吸困难而死亡。

7.1.2 流产和新生驴驹死亡型

妊娠驴多表现为隐性感染，引发突发流产，该类型疾病的潜伏期长短不一，新生驹感染 EHV-8 后易继发细菌感染而导致死亡。

7.1.3 神经性脑炎型

患病驴出现发热，神情呆滞，突然共济失调、感觉障碍，四肢僵硬、倒地抽搐、后肢瘫痪和完全瘫痪等，个别驴出现脑脊髓炎等神经症状，严重时会导致死亡。

7.2 病理变化

肺脏和脑组织出现明显的病理损伤，肺脏表现为间质性肺炎、出现嗜中性粒细胞、炎性细胞浸润、出血和肺泡间隔增厚，肺泡周围伴有结缔组织增生。脑组织非化脓性脑炎并出现神经元水肿。

7.3 病毒分离

7.3.1 样品采集

活驴用鼻拭子采集或全血取样，也可用病死驴的肺脏或流产驴的胎盘、脐带、胎儿组织等病料。

7.3.2 操作方法

取适量 EHV-8 阳性的组织病样，加入 PBS 借助组织研磨仪匀浆，放入 5 mL 离心管，反复冻融 3 次，4000 rpm 离心 10 min，收集上清后加入 1000 IU/mL 青霉素和 1000 μg/mL 链霉素，经 0.45 μm 滤膜除菌后，取 1 mL 过滤液接种到单层 RK-13 细胞中，试验设置空白对照组，37℃ 吸附 2 h 后，加入适量 2% FBS MEM，放置培养箱 3 d~5 d，每天借助倒置显微镜观察是否出现细胞病变（CPE）即细胞出现变圆、聚集、拉丝，并最终全部脱落。

7.3.3 结果判定

若接种 RK-13 细胞未出现 CPE，应将细胞培养物冻融后盲传三代，若盲传后没有 CPE 出现，则判定为阴性。若 RK-13 细胞出现 CPE，应立即用 PCR 检测进行确诊。

7.4 PCR 检测

7.4.1 DNA 抽提

将采集组织样品包括驴的鼻拭子、血液及病死驴的肺、流产胎儿等组织器官，加入无菌 PBS 研磨匀浆，5000 g 离心 15 min，收集 100 μ L 上清液借助商品化病毒 DNA 提取试剂盒制备 DNA，冻存备用。

7.4.2 PCR 检测

在 0.2 mL PCR 薄壁管中配置 PCR 体系：15 μ L Ex Taq premix、上下游引物（20 μ mol/L）各 1 μ L、待测样品 DNA 模版 2 μ L，加水至 30 μ L。设置空白对照（以水为模版）。反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；94 $^{\circ}$ C 60 s、58 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 60 s，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min，4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1%核酸胶进行分析，设立 DNA 标准分子 Maker 作为对照，待电泳结束，用凝胶成像系统观察电泳结果。

7.4.3 测序分析

将待测样品扩出的阳性片段克隆到 pMD18-T 载体送生物公司测序。

7.4.4 结果判定

若电泳结果显示，待测样品扩增出大小为 316bp 的核酸片段，则初步判定 EHV-8 核酸阳性，同时空白对照没有条带，否则视为无效。若测序的结果与 GenBank 提供的标准序列同源性大于 90%，则判定为 EHV-8 感染阳性，否则判定为 EHV-8 感染阴性。

7.5 间接免疫荧光检测

7.5.1 操作方法

将 EHV-8 标准毒株和待鉴定的样品分别接种 RK-13 细胞，待病变达到 50%~70%，用预冷的 75%乙醇（4 $^{\circ}$ C）固定 10 min，弃掉乙醇，用 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min，分别孵育鼠抗 EHV-8 阳性血清和阴性血清，设置空白对照，置于恒温培养箱 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBS 漂洗 3 次，每次 5 min，加入绿色荧光标记羊抗鼠二抗（1:5000），置于恒温培养箱 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。加入 DAPI 染细胞核 2 min 后，PBS 漂洗 3 次后，借助倒置荧光显微镜观察结果。

7.5.2 结果判定

7.5.2.1 若 EHV-8 阴性血清与空白对照细胞均无着色，且鼠抗 EHV-8 阳性血清与标准毒株感染细胞反应为绿色荧光，则判定阴性对照、阳性对照成立。

7.5.2.2 在符合 7.5.2.1 的条件下，若待鉴定样品毒感染细胞与鼠抗 EHV-8 阳性血清反应为绿色，则判定为 EHV-8 阳性。

7.6 免疫组织化学检测

7.6.1 样品采集

采集疑似 EHV-8 感染的病死驴的肺、胎盘、流产胎儿等组织，按 NY/T 541 规定的方法执行。

7.6.2 固定

摘取组织后迅速放入 10% 甲醛固定液中，根据组织块大小确定固定时间，期间更换一次固定液。

7.6.3 切片制作

修整已固定好的组织块，大小一般为 0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.5 cm，用流水冲洗修整好的组织块 8 h~24 h，然后进行脱水、透明、浸蜡包埋和切片，具体程序如下：70%酒精（2 h） \rightarrow 80%酒精（2 h） \rightarrow 85%酒精（1 h） \rightarrow 90%酒精（40 min） \rightarrow 95%酒精（40 min） \rightarrow 100%酒精 I（30 min） \rightarrow 100%酒精（30 min） \rightarrow 酒精+二甲苯（1:1）（5 min） \rightarrow 二甲苯 I（5 min） \rightarrow 二甲苯 II（5 min） \rightarrow 石蜡 I（1 h） \rightarrow 石蜡 II（1 h） \rightarrow 修块 \rightarrow 切片（厚度为 5 μ m~7 μ m）。

7.6.4 组化染色

二甲苯 I（15 min） \rightarrow 二甲苯 II（15 min） \rightarrow 100%酒精 I（2 min） \rightarrow 100%酒精 II（2 min） \rightarrow 95%酒精 I（2 min） \rightarrow 95%酒精 II（2 min） \rightarrow 85%酒精（2 min） \rightarrow 75%酒精（2 min） \rightarrow 蒸

T/CAAA xxx-2021

馏水洗（2 min）→ 3% H₂O₂-甲醇溶液（30 min）→ PBS 洗（5 min×3 次）→ 0.25% 胰蛋白酶（37℃ 20 min）→ PBS 洗（5 min×3 次）→ 5% BSA（37℃ 30 min）→ 鼠源 EHV-8 阳性血清作为一抗（湿盒，4℃ 过夜），PBS 代替一抗作为阴性对照）→ PBS 洗（5 min×3 次）→ HRP 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗（湿盒，37℃ 60 min）→ PBS 洗（5 min×3 次）→ DAB 显色（在镜下控制显色剂显色时间）→ 自来水终止反应 → 苏木素复染 → 95% 酒精（3 min×2 次）→ 100% 酒精（3 min×2 次）→ 二甲苯透明（5 min×2 次）→ 中性树胶封片。

7.6.5 结果判定

普通显微镜观察如组织细胞中有棕黄色的着色点则判定为阳性，阴性对照无棕黄色着色。

8 综合判定

若病驴出现呼吸困难，流产和脑脊髓炎等症状，且出现典型间质性肺炎病理变化或病毒性脑炎，则可判定为疑似 EHV-8 感染，需采用 PCR 检测和病原分离等方法确诊。

9 治疗

对于发病的驴应立即隔离，采取对症治疗措施，及时淘汰 EHV-8 阳性的驴。

附录 A
(资料性)

PCR 引物和目的基因参考序列

A.1 PCR 引物 (5' → 3')

EHV-8-gG -F: TCAGACTGTCACCTCGTGGGA

EHV-8-gG -R: CCTGAAGGCCGTTAACACA

A.2 EHV-8 gG 基因参考序列 (大小为 316 bp)

TCAGACTGTCACCTCGTGGGAGTCATACACCTATCCAAATACGCTGAGGCAGGCCACCGGACCCAGACCTTGTTGGTAGGTGCAG
TTGGACTCAGAAATCTTGGCTCAGGCATGGAAGTTTGTGGTGATGAAACGTACGACACCATCCGCGCAGAAGCAAAAAATCTAGAGACC
CACGTACACTCCAGTGCAGCGGATTCGTCTCCGAAAACCAATTGTCGCAGGAAAACGTAAACATTCCCGAAGTTGCCACCTGCGAAG
CTGCCAAAACGAAGACAATGCACACACAGGGGTGTGTTAAACGGCCTTCAGG

参考序列病毒株: EHV-8 SDL66, (GenBank: MW816102)

附录 B

(规范性)

试剂及其配制

B.1 青霉素-链霉素溶液：氨苄青霉素 G 钠盐、硫酸链霉素

青霉素 G 钠盐 100 mg/mL：称取 5 g 氨苄青霉素粉末，加入 50 mL 灭菌水，溶解后用 0.22 μm 滤膜过滤。

硫酸链霉素 100 mg/mL：称取 5 g 硫酸链霉素粉末，加入 50 mL 灭菌水，溶解后用 0.22 μm 滤膜过滤。

B.2 磷酸盐缓冲液 (PBS)：1L PBS (pH7.4) 配方

磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)：0.27 g，磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)：1.42 g，氯化钠 (NaCl)：8 g，氯化钾 (KCl) 0.2 g，加去离子水约 800 mL 充分搅拌溶解，然后加入浓盐酸调 pH 至 7.4，最后定容到 1 L。

B.3 10%甲醛固定液

购买商品化的甲醛水溶液浓度一般为 35%~40%，取 250 mL 甲醛水溶液，加至含 750 mL 去离子水的容器中，混匀后备用。

B.4 0.25%胰蛋白酶

称取 0.25 g 胰蛋白酶溶入 100 ml PBS 中，0.22 μm 滤膜过滤除菌备用。

B.5 3% H_2O_2 -甲醇

将 10 ml 30 % H_2O_2 加入到 90 ml 甲醇中，保存在-20℃备用。

附录 C (规范性)

鼠源 EHV-8 阳性血清的制备方法

购买 SPF 级 BALB/c 小鼠，攻毒之前通过尾静脉采集阴性血清备用，通过滴鼻方式感染 EHV-8 野毒株，待小鼠出现嗜睡，逆毛现象，立即采集少量血液进行 EHV-8 抗原检测。随后感染_1_周后，通过眼眶采血，5000 g 离心 10 min 收集 EHV-8 阳性血清备用。
