

动物疫病鉴别检测技术 第2部分：兔出血症病毒经典型与兔出血症病毒2型

Animal disease identification and detection technology—Part 2: RHDV and RHDV2

地方标准信息服务平台

2024-12-30 发布

2025-01-30 实施

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。

本文件是DB37/T 4754《动物疫病鉴别检测技术》的第2部分。DB37/T 4754已经发布了以下部分：

- 第1部分：猪瘟强毒与猪瘟疫苗弱毒；
- 第2部分：兔出血症病毒经典型与兔出血症病毒2型；
- 第3部分：禽腺病毒 I 群与禽腺病毒III群。

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。

本文件由山东省畜牧兽医局提出并组织实施。

本文件由山东省畜牧业标准化技术委员会归口。

地方标准信息服务平台

引 言

动物疫病是影响山东省畜牧业健康发展的重要因素之一。不同病原或者相同病原的不同血清型/基因型引起疫病的临床病症具有一定程度的相似性，同时，有些疫病弱毒疫苗的使用干扰了病原的检测。动物疫病鉴别检测技术标准的建立，规定了对不同病原、相同病原的不同血清型/基因型以及弱毒疫苗株的鉴别检测，为山东省动物疫病精准防控提供了技术支持，对于促进畜牧业健康发展具有重要意义。

兔出血症（Rabbit haemorrhagic disease, RHD）是由杯状病毒科（*Caliciviridae*）兔病毒属（*Lagovirus*）成员兔出血症病毒（Rabbit haemorrhagic disease virus, RHDV）引起的一种急性、强传染性、病死率高达40%~90%的传染病，其典型病变包括呼吸系统出血，实质器官淤血、肿大、出血等，我国将其列为二类动物疫病（中华人民共和国农业农村部公告 第573号），严重威胁着我国养兔业的健康发展。1984年，由RHDV经典型引起的RHD首先在我国暴发，继而在各大洲广泛流行，并不断发生遗传演变，但抗原性保持相对稳定。2010年，由RHDV2型引发的兔出血症首先在法国暴发，不仅导致育肥兔大量死亡，以RHDV经典型株制备的灭活疫苗无法提供完全免疫保护，可见其抗原性发生较大变异，之后RHDV2型在欧洲、非洲、大洋洲部分国家开始流行，在瑞典、葡萄牙、澳大利亚等国，RHDV2型已经取代RHDV经典型成为主要流行毒株。我国于2020年5月在四川省确诊了由RHDV2型引发的疫病，作为世界第一养兔大国，若该变异毒株发生大规模流行，势必加大防控难度。因此，建立一种可鉴别RHDV经典型与RHDV2型的检测技术对于该病的防控具有重要意义。《动物疫病鉴别检测技术》拟由三个部分构成：

- 第1部分：猪瘟强毒与猪瘟疫苗弱毒。目的在于规范猪瘟强毒与猪瘟疫苗弱毒 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 鉴别检测技术的操作，便于检测技术在猪瘟临床诊断、流行病学调查、检验检疫、猪瘟疫苗质量控制等方面的稳定应用。
- 第2部分：兔出血症病毒经典型与兔出血症病毒2型。目的在于规范兔出血症病毒经典型与兔出血症病毒2型实时荧光 RT-PCR 鉴别检测技术的操作，便于检测技术在兔出血症临床诊断、流行病学调查、检验检疫等方面的稳定应用。
- 第3部分：禽腺病毒 I 群与禽腺病毒 III 群。目的在于规范禽腺病毒 I 群与 III 群 PCR 鉴别检测技术的操作，便于检测技术在禽腺病毒病临床诊断、流行病学调查、检验检疫等方面的稳定应用。

动物疫病鉴别检测技术 第2部分：兔出血症病毒经典型与兔出血症病毒2型

1 范围

本文件描述了兔出血症病毒（Rabbit haemorrhagic disease virus, RHDV）经典型与兔出血症病毒2型（Rabbit haemorrhagic disease virus 2, RHDV2）实时荧光反转录聚合酶链反应（Real-time RT-PCR）鉴别检测方法。

本文件适用于兔及其产品中RHDV经典型与RHDV2型的鉴别检测。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试验原理

在游离状态下，SYBR Green I染料只发出微弱的荧光，与双链DNA结合后荧光信号大幅度增强。在PCR反应过程中，SYBR Green I染料与扩增的双链DNA产物结合后发出荧光，且伴随扩增产物的指数型上升，荧光强度也随之上升并被荧光PCR仪检测从而获得荧光扩增曲线，之后进行扩增产物熔解温度（ T_m ）曲线分析，由于扩增产物GC含量差异导致 T_m 值不同。本文件引物可通用检测RHDV经典型与RHDV2型靶基因，但由于RHDV经典型扩增产物GC含量高于RHDV2型扩增产物，导致 T_m 值明显高于后者，并依此适用于RHDV经典型与RHDV2型的鉴别检测。

5 试剂或材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 TRIzol 试剂。

5.3 氯仿。

5.4 异丙醇。

5.5 反转录酶 M-MuLV 及 $5\times$ 反转录酶反应缓冲液：反转录酶浓度 $200\text{ U}/\mu\text{L}$ ，均 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

5.6 RNA 酶抑制剂： $50\text{ U}/\mu\text{L}$ ， $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

- 5.7 脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）：为 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 混合物，均为 10 mmol/L。
- 5.8 2×SYBRGreen I PCRMix：-20℃保存。
- 5.9 75%乙醇。
取无水乙醇75 mL，加灭菌水至100 mL，混匀，室温保存。
- 5.10 焦碳酸二乙酯（DEPC）水。
取1 mL DEPC加入水中至1 000 mL，充分震荡混匀，静置24 h后，121℃高压灭菌15 min，4℃保存备用。
- 5.11 磷酸盐缓冲溶液（PBS）。
取NaCl 8 g，KCl 0.2 g，KH₂PO₄ 0.2 g，Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g，依次溶于800 mL水中，用盐酸调pH值至7.4，定容至1 000 mL，置于高压灭菌锅121℃灭菌20 min，4℃保存。
- 5.12 乙二胺四乙酸二钾（EDTA-K₂）抗凝剂。
取EDTA-K₂·2H₂O 1.5 g，溶于80 mL水中，充分溶解后定容至100 mL，置于高压灭菌锅121℃灭菌20 min，室温保存。
- 5.13 一次性无菌注射器（2.5 mL）。
- 5.14 无核酸酶离心管（1.5 mL）。
- 5.15 商品化病毒核酸提取试剂盒。
- 5.16 阳性对照样品和阴性对照样品。RHDV 经典型阳性对照样品为 RHDV AV34 株（购自中国兽医药品监察所）肝组织毒，-20℃保存，RHDV2 型阳性样品为 VP60 基因体外转录的无感染性 RNA，-80℃保存；阴性对照样品为 RHDV 经典型、RHDV2 型阴性的兔肝组织悬液，-20℃保存。
- 5.17 检测 RHDV 经典型与 RHDV2 型的通用引物。Primer-F 5'-CAACCGACTGTTTGTGATGGC-3'；Primer-R 5'-ACGCGAACATGATGGGTGTGTT-3'。

6 仪器设备

- 6.1 A 型 II 级生物安全柜。
- 6.2 电子天平：精度 0.01 g。
- 6.3 高速冷冻离心机：转速≥12 000 r/min。
- 6.4 微型低速离心机：转速≤6 000 r/min。
- 6.5 冰箱：-20℃。
- 6.6 超低温冰箱：-80℃。
- 6.7 高压灭菌锅。
- 6.8 荧光 PCR 检测仪。

7 样品

7.1 肝组织样品

病死兔的病变肝组织样品采集、保存和运输按照NY/T 541执行。

7.2 血液样品

活兔血液样品采集：将活兔固定，选择耳缘静脉清晰的一侧耳朵，剃毛并消毒，压迫耳根使静脉充盈，用一次性无菌注射器（2.5 mL）针头穿刺静脉采血1.8 mL，并将新鲜血液与乙二胺四乙酸二钾抗凝剂混合，体积比为9:1（V:V）。血液样品保存和运输按照NY/T 541执行。

8 试验步骤

8.1 样品处理

8.1.1 肝脏样品

在A型II级生物安全柜处理。电子天平称取 $1.00\text{ g}\pm 0.05\text{ g}$ 样品，剪碎后加入10倍体积PBS，充分研磨成组织匀浆，装入1.5 mL无核酸酶离心管中，置高速冷冻离心机 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ r/min}$ 离心5 min，取上清液提取核酸。

8.1.2 血液样品

将血液样品装入1.5 mL无核酸酶离心管中， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻30 min后置室温融化5 min，反复3次， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ r/min}$ 离心5 min，取上清液提取核酸。

8.1.3 检毕样品

按照NY/T 541处理。

8.2 核酸提取

8.2.1 核酸提取方法说明

待检样品、阴性对照及阳性对照样品的RNA可使用TRIzol试剂提取，也可使用商品化病毒核酸提取试剂盒并按照说明书提取。

8.2.2 TRIzol 试剂提取样品 RNA

8.2.2.1 根据待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和取1.5 mL无核酸酶离心管，编号后每管加入 $600\ \mu\text{L}$ 的TRIzol试剂。

8.2.2.2 将待检样品、阴性对照、阳性对照样品上清液各 $200\ \mu\text{L}$ 加到相应离心管中，颠倒充分混匀。

8.2.2.3 每管加入氯仿 $200\ \mu\text{L}$ ，颠倒充分混匀， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ r/min}$ 离心15 min。

8.2.2.4 吸取8.2.2.3各管中的上清液（避免吸出中间层） $400\ \mu\text{L}$ ，转移至新的编号离心管中，每管加入等体积 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷30 min的异丙醇，颠倒充分混匀。

8.2.2.5 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ r/min}$ 离心15 min，弃去上清液，倒置于吸水纸上沥干，不同样品离心管应在吸水纸的不同位置沥干。

8.2.2.6 逐管加入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷30 min的75%乙醇 1 mL ，颠倒洗涤。

8.2.2.7 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\ 000\text{ r/min}$ 离心10 min，弃去上清液，倒置于吸水纸上沥干，不同样品离心管应在吸水纸的不同位置沥干。

8.2.2.8 微型低速离心机 $4\ 000\text{ r/min}$ 离心10 s，将管壁上的残余液体甩至管底部，用微量移液器吸弃。

8.2.2.9 室温干燥3 min，每管加入焦碳酸二乙酯（DEPC）水 $25\ \mu\text{L}$ 溶解RNA，冰浴备用。提取的RNA应尽快进行反转录反应，长时间保存放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。

8.3 荧光 RT-PCR 检测

8.3.1 反转录（RT）反应

反转录反应体系为 $20\ \mu\text{L}$ 。

- a) 第一阶段：在无核酸酶 PCR 管中加入提取的 RNA 溶液 10 μL ，脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）1.0 μL ，引物 Primer-R（10 $\mu\text{mol/L}$ ）1.0 μL ，无核酸酶水 2.5 μL ，65 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 min，然后冰浴 2 min。
- b) 第二阶段：依次加入 5 \times 反转录酶反应缓冲液 4 μL 、RNA 酶抑制剂（40 U/ μL ）0.5 μL 、反转录酶 M-MuLV（200 U/ μL ）1.0 μL ，混匀后低速离心 10 s，50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min，然后 85 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 min 终止反应。
- c) 反转录产物应在 20 min 内进行荧光 PCR 扩增，剩余产物应放置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，以便复核（如有必要）。

8.3.2 荧光 PCR 检测

8.3.2.1 反应体系的配制

样品检测反应体系为 20.0 μL ，配制见表 1。

表 1 荧光 PCR 检测反应液体系

荧光 PCR 反应液组分	1 个检测反应体系的使用量 μL
2 \times SYBRGreen I PCRMix	10.0
Primer-F（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.4
Primer-R（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.4
RT 产物（阴性对照、待检样品、阳性对照）	2.0
水	7.2
总体积	20.0

8.3.2.2 加样

将制备的阴性对照、待检样品、阳性对照 RT 产物各 2 μL 依次分别加入对应荧光 PCR 检测反应管中，扣紧管盖，混匀后低速离心 10 s。

8.3.2.3 测定

选择荧光 PCR 检测仪 SYBRGreen I 检测通道，将配制好的荧光 PCR 管按顺序放入荧光 PCR 检测仪。反应程序如下：

——第一阶段：95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min；

——第二阶段：95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s，40 个循环，每次循环 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸时收集荧光信号；

——第三阶段：熔解曲线分析，按照各品牌仪器设备推荐程序进行。

9 结果判定

9.1 结果分析条件设定

根据仪器噪声情况对阈值设定进行调整，以阈值线刚好过阴性对照样品的扩增曲线最高点为准。

9.2 质控标准

质控标准同时满足以下条件，试验有效，否则无效。

- a) 阴性对照应无 Ct (或 Cp) 值或 Ct (或 Cp) >35, 且无特异性熔解曲线。
- b) RHDV 经典型阳性对照的 Ct (或 Cp) 值应 ≤30, 并出现典型的扩增曲线及熔解曲线, 且 $T_m=84.90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (扩增曲线与熔解曲线见 A.1)。
- c) RHDV2 型阳性对照的 Ct (或 Cp) 值应 ≤30, 并出现典型的扩增曲线及熔解曲线, 且 $T_m=82.60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (扩增曲线与熔解曲线见 A.2)。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 被检样品是否感染 RHDV 经典型描述及判定

检测结果符合以下描述时, 分别判定 RHDV 经典型阴性或 RHDV 经典型阳性。

- a) 无 Ct (或 Cp) 值或 Ct (或 Cp) >35, 判为阴性; 若 Ct (或 Cp) 值 ≤35, 且无特异性熔解曲线, 判为阴性。
- b) Ct (或 Cp) 值 ≤30, 出现典型的扩增曲线, 且熔解曲线 T_m 值为 $85.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 表示样品中存在 RHDV 经典型核酸, 判为阳性 (样品扩增曲线与熔解曲线见 A.3)。
- c) $30 < \text{Ct (或 Cp) 值} \leq 35$, 且熔解曲线与阳性对照相符, 判定为疑似, 再次检测仍介于此区间, 判定为阳性。

9.3.2 被检样品是否感染 RHDV2 型描述及判定

检测结果符合以下描述时, 分别判定 RHDV2 型阴性或 RHDV2 型阳性。

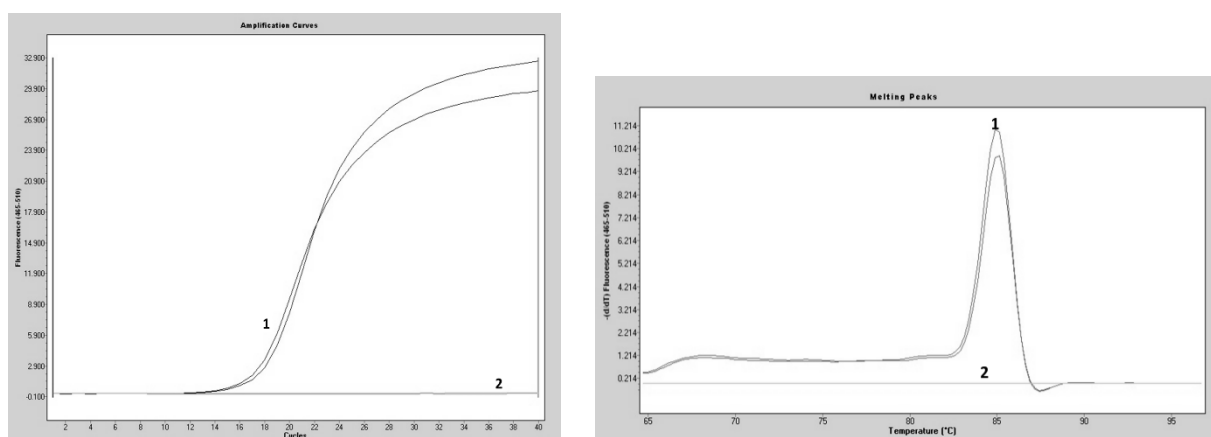
- a) 无 Ct (或 Cp) 值或 Ct (或 Cp) >35, 判为阴性; 若 Ct (或 Cp) 值 ≤35, 且无特异性熔解曲线, 判为阴性。
- b) Ct (或 Cp) 值 ≤30, 且出现典型的扩增曲线, 熔解曲线 T_m 值为 $83.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 表示样品中存在 RHDV2 型核酸, 判为阳性 (样品扩增曲线与熔解曲线见 A.3)。
- c) $30 < \text{Ct (或 Cp) 值} \leq 35$, 且熔解曲线与阳性对照相符, 判定为疑似, 再次检测仍介于此区间, 判定为阳性。

9.3.3 RHDV 经典型与 RHDV2 型鉴别检测描述及判定

被检样品同时符合 9.3.1 与 9.3.2 阴性对照、阳性对照、阳性样品检测结果的描述时, 且 T_m 相差约 $1.1\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 2.8\text{ }^{\circ}\text{C}$, T_m 值高者判为 RHDV 经典型阳性, T_m 值低者判为 RHDV2 型阳性。

附录 A
(资料性)
典型扩增曲线与熔解曲线

RHDV阴性、阳性样品Real-time PCR扩增曲线及熔解曲线见图A.1。

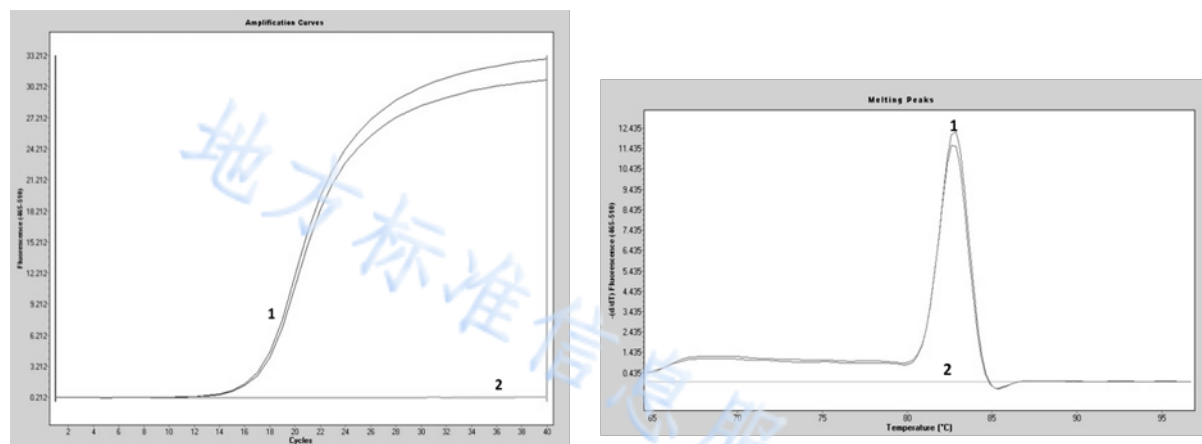


标引序号说明：

- 1——阳性对照 (T_m 值84.90 °C)；
2——阴性对照。

图A.1 RHDV 阴性、阳性样品 Real-time PCR 扩增曲线及熔解曲线

RHDV2阴性、阳性样品Real-time PCR扩增曲线及熔解曲线见图A.2。

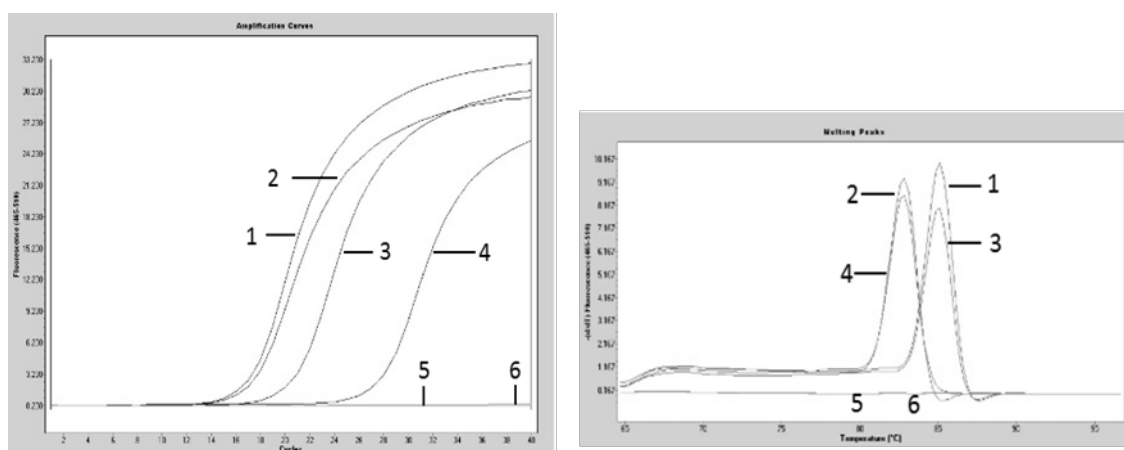


标引序号说明：

- 1——阳性对照 (T_m 值82.60 °C)；
2——阴性对照。

图A.2 RHDV2 阴性、阳性样品 Real-time PCR 扩增曲线及熔解曲线

RHDV与RHDV2阴性、阳性样品Real-time PCR扩增曲线及熔解曲线比较见图A.3。



标引序号说明：

- 1——RHDV阳性对照样品（ T_m 值85.12℃）；
- 2——RHDV2阳性对照样品（ T_m 值82.83℃）；
- 3——RHDV临床阳性样品（ T_m 值85.05℃）；
- 4——RHDV2临床阳性样品（ T_m 值82.81℃）；
- 5——阴性对照样品（无 T_m 值）；
- 6——临床阴性样品（无 T_m 值）。

图A.3 RHDV与RHDV2阴性、阳性样品 Real-time PCR 扩增曲线及熔解曲线比较

地方标准信息服务平台