



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 19200—2003

## 猪水泡病诊断技术

Diagnostic techniques for swine vesicular disease

2003-06-17 发布

2003-12-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

## 前 言

猪水泡病(Swine Vesicular Disease,简称 SVD)是猪的一种烈性传染病,被世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizooties(法),OIE]列为 A 类疾病,我国将其列为一类动物疫病。本病主要在猪的蹄踵、蹄冠、唇、舌、鼻及乳头部引起水泡,临床症状与猪口蹄疫(Foot and Mouth Disease,简称 FMD)相似。

本标准提出的实验室方法主要是以世界动物卫生组织(OIE)《哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册》为依据,并结合我国实际情况制定,其中“猪水泡病反向间接血凝试验”是我国建立的方法。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E 均为规范性附录。附录 F 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:张永光、牟克斌、王永录、刘西兰、方玉珍。

## 猪水泡病诊断技术

### 1 范围

本标准规定了猪水泡病病毒分离及鉴定,反向间接血凝试验(RIHA)、琼脂凝胶免疫扩散试验(AGID)和病毒中和试验(VN)的技术要求。

本标准适用于猪水泡病的诊断。反向间接血凝试验和琼脂凝胶免疫扩散试验适用于大批样品筛选试验,包括产地检疫、疫情监测、流行病学调查和无本病健康猪群的建立;病毒中和试验(VN)适用于诊断和进出口猪检疫及抗体水平的评估。

### 2 病毒分离及鉴定

#### 2.1 材料准备

2.1.1 灭菌注射器,研钵。

2.1.2 pH 7.6、0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(PB),pH7.6、50%的丙三醇磷酸缓冲液(GPB),pH7.2、0.11 mol/L的磷酸缓冲液(PB),配制方法见附录 A。

2.1.3 仔猪肾传代细胞(IB-RS-2),乳鼠。

2.1.4 细胞培养液,见附录 B。

#### 2.2 样品的采集及处理

2.2.1 水泡液:将水泡表面用 75%酒精棉球消毒,用注射器抽取水泡液,直接放入灭菌小瓶中,加盖封口,避光送至实验室,不做处理直接用于检测。

2.2.2 水泡皮:采集鼻镜、蹄部新鲜水泡皮,采集量为 0.5 g 以上,放入预先加有 pH7.6、50%的 GPB 的灭菌瓶中,加盖封口,送至实验室。

#### 2.3 细胞分离

2.3.1 新鲜水泡液不做任何处理,可直接使用。当 IB-RS-2 长满单层细胞后,弃去培养液,加入水泡液,以能淹没细胞单层为宜,于 37℃感作 30 min,然后补加 4 倍于水泡液的细胞培养液,置 37℃培养。每天在倒置显微镜下观察 2 次,48 h 终判,若细胞培养液对照孔成立,分离病毒的细胞孔细胞出现变圆乃至脱落,则视为细胞病变(CPE)判为阳性,若 48 h 不出现 CPE,则应冻融 2 次,再传 3 代,不出现 CPE,判为阴性,出现 CPE,则需做进一步鉴定。

2.3.2 水泡皮的分离,将水泡皮用 pH7.2、0.11 mol/L PB 洗 2 次~3 次,用灭菌滤纸吸去水分,称其质量后置于加少量石英砂或玻璃砂的研钵中,按质量体积比(1:2)~(1:5)加入 pH7.2、0.11 mol/L PB 研磨,制成悬液,室温浸毒 1 h 或 4℃ 12 h,以 3 000 r/min 离心 20 min~30 min,取上清液用于病毒分离。

#### 2.4 乳鼠分离

2.4.1 乳鼠为 2~3 日龄小鼠,每份材料接种 4 只小鼠,每只颈背部皮下接种 0.1 mL~0.2 mL,在母鼠哺乳下观察 5 天。

2.4.2 若 5 天内出现神经症状乃至死亡,剥皮去头及内脏,将肌肉及骨骼一起称量,按质量体积比加 9 倍的细胞培养液,加玻璃砂研磨制成悬液,置 4℃浸毒过夜,以 1 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于进一步鉴定。

#### 2.5 反向间接血凝试验(RIHA)鉴定分离物



### 2.5.1 材料准备

2.5.1.1 96孔V型聚乙烯血凝滴定板(110度),微量振荡器或微型混合器,0.025 mL、0.05 mL 稀释用滴管、乳胶吸头或25  $\mu$ L、50  $\mu$ L 移液加样器。

2.5.1.2 稀释液I、稀释液II,配制方法见附录C。

2.5.1.3 标准抗原、标准阳性血清。

2.5.1.4 敏化红细胞诊断液,效价滴定见附录D。

### 2.5.2 操作方法

2.5.2.1 使用标准抗原进行猪水泡病与口蹄疫A、O、C、Asia-I型鉴别诊断。

2.5.2.1.1 被检样品的稀释:把8支试管排列于试管架上,自第1管开始,每管加0.5 mL 稀释液I,第一管加0.5 mL 被检样品,由左至右做二倍连续稀释(即1:6、1:12、1:24……1:768),每管容积0.5 mL。

2.5.2.1.2 按下述滴加被检样品和对照:

a) 在血凝滴定板上的第一排至第五排,每排的第8孔滴加第8管稀释被检样品0.05 mL,每排的第7孔滴加第7管稀释被检样品0.05 mL,以此类推至第1孔;

b) 每排的第9孔滴加稀释液I 0.05 mL,作为稀释液对照;

c) 第一至第五排的第10孔按顺序分别滴加猪水泡病和口蹄疫A、O、C、Asia-I型标准抗原(1:30稀释)各0.05 mL,作为阳性对照。

2.5.2.1.3 滴加敏化红细胞诊断液:先将敏化红细胞诊断液摇匀,于滴定板第一排至第五排的第1~10孔分别滴加猪水泡病和口蹄疫A、O、C、Asia-I型敏化红细胞诊断液,每孔0.025 mL,置微量振荡器上振荡1 min~2 min,20℃~35℃放置1.5 h~2 h后判定结果。

2.5.2.2 使用标准阳性血清进行猪水泡病与口蹄疫O型鉴别诊断。

2.5.2.2.1 在血凝滴定板上的第一排至第四排,每孔先各加入25  $\mu$ L 稀释液II。

2.5.2.2.2 每排第1孔各加被检样品25  $\mu$ L,然后分别由左至右做二倍连续稀释至第7孔(竖板)或第11孔(横板)。每排最后孔留作稀释液对照。

2.5.2.2.3 滴加标准阳性血清:在第一排、第二排每孔加入25  $\mu$ L 稀释液II;第二排每孔加入25  $\mu$ L 稀释至1:100的猪水泡病标准阳性血清;第四排每孔加入25  $\mu$ L 稀释至1:20的口蹄疫O型标准阳性血清;置微型混合器上振荡1 min~2 min,加盖置37℃作用30 min。

2.5.2.2.4 滴加敏化红细胞诊断液:在第一排和第二排每孔加入猪水泡病敏化红细胞诊断液25  $\mu$ L;第三和第四排每孔加入口蹄疫O型敏化红细胞诊断液25  $\mu$ L;置微型混合器上振荡1 min~2 min,加盖于20℃~35℃放置2 h后判定结果。

### 2.5.3 结果判定

2.5.3.1 按以下标准判定红细胞凝集程度:“++++”为100%完全凝集,红细胞均匀地分布于孔底周围;“+++”为75%凝集,红细胞均匀地分布于孔底周围,但孔底中心有红细胞形成的针尖大的小点;“++”为50%凝集,孔底周围有不均匀的红细胞分布,孔底有一红细胞沉下的小点;“+”为25%凝集,孔底周围有不均匀的红细胞分布,但大部分红细胞已沉积于孔底;“-”为不凝集,红细胞完全沉积于孔底成一圆点。

2.5.3.2 操作方法2.5.2.1的结果判定:稀释液I对照孔不凝集、标准抗原阳性孔凝集时试验方成立。

2.5.3.3 若只第一排孔凝集,其余四排孔不凝集,则被检样品为猪水泡病;若只第二排孔凝集,其余四排孔不凝集,则被检样品为口蹄疫A型;以此类推。

2.5.3.4 致红细胞50%凝集的被检样品最高稀释度为其凝集效价。

2.5.3.5 如出现 2 排以上孔的凝集,以某排孔的凝集效价高于其余排孔的凝集效价 2 个对数(以 2 为底)浓度以上者即可判为阳性,其余判为阴性。

2.5.3.6 操作方法 2.5.2.2 的结果判定:稀释液Ⅱ对照孔不凝集试验方可成立。

2.5.3.6.1 若第一排出现 2 孔以上的凝集(“++”以上),且第二排相对应孔出现 2 个孔以上的凝集抑制,第三排、第四排不出现凝集,判为猪水泡病阳性。若第三排出现 2 孔以上的凝集(“++”以上),且第四排相对应孔出现 2 个孔以上的凝集抑制,第一排、第二排不出现凝集则判为口蹄疫 O 型阳性。如水泡病与口蹄疫均出现阳性反应,则判为同时感染水泡病与口蹄疫。

2.5.3.6.2 致红细胞 50%凝集的被检样品最高稀释度为其凝集效价。

### 3 琼脂凝胶免疫扩散试验(AGID)

#### 3.1 材料准备

3.1.1 平皿(直径 6.0 cm)、打孔器、微量注射器或加样移液器、印相暗盒或台灯。

3.1.2 琼扩精制抗原、标准阳性血清。

3.1.3 琼脂糖凝胶缓冲液(AGB),饱和硫酸铵,pH7.2、0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH7.2、0.01 mol/L 的 PBS),配制方法见附录 E。

3.1.4 琼脂糖。

#### 3.2 操作方法

##### 3.2.1 琼脂糖平板制备

取琼脂糖 1.0 g 加入 99 mL AGB,103 kPa 10 min 融化灭菌。吸取 8 mL 琼脂液加到直径 6 cm 的平皿内,制成 3 mm 厚的琼脂板。待琼脂冷却凝固后加盖置于湿盒中,放 4℃ 冰箱备用。

##### 3.2.2 打孔

孔径、孔距均为 3 mm,按图 1 所示式样打孔。用针头将孔内的凝块挑出,并用烧热的大头针沿孔底部周围划圈封底。

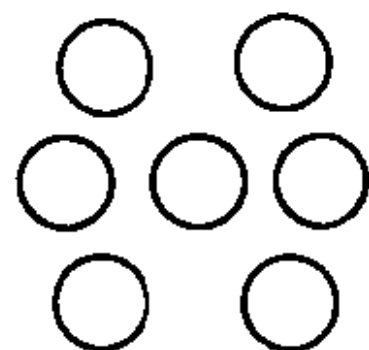


图 1 打孔式样

##### 3.2.3 被检血清样品的处理

3.2.3.1 检疫用样品的处理:56℃ 水浴灭活 30 min。

3.2.3.2 与口蹄疫鉴别及其分型诊断用样品的处理:吸取 56℃ 水浴灭活 30 min 的被检血清 0.4 mL,加 pH7.2、0.01 mol/L 的 PBS 0.4 mL,混匀,逐滴加入饱和硫酸铵溶液 0.2 mL,摇匀,室温静置 20 min,8 000 r/min 离心 15 min;取上清液逐滴加入饱和硫酸铵 0.2 mL,摇匀,室温静置 20 min,8 000 r/min 离心 15 min,沉淀物用 0.2 mL~0.4 mL pH7.2、0.01 mol/L 的 PBS 重新悬浮。此悬浮液供正式试验用。

##### 3.2.4 加样

每 4 份被检样品取 5 块平皿,按图 2 所示方式加样。

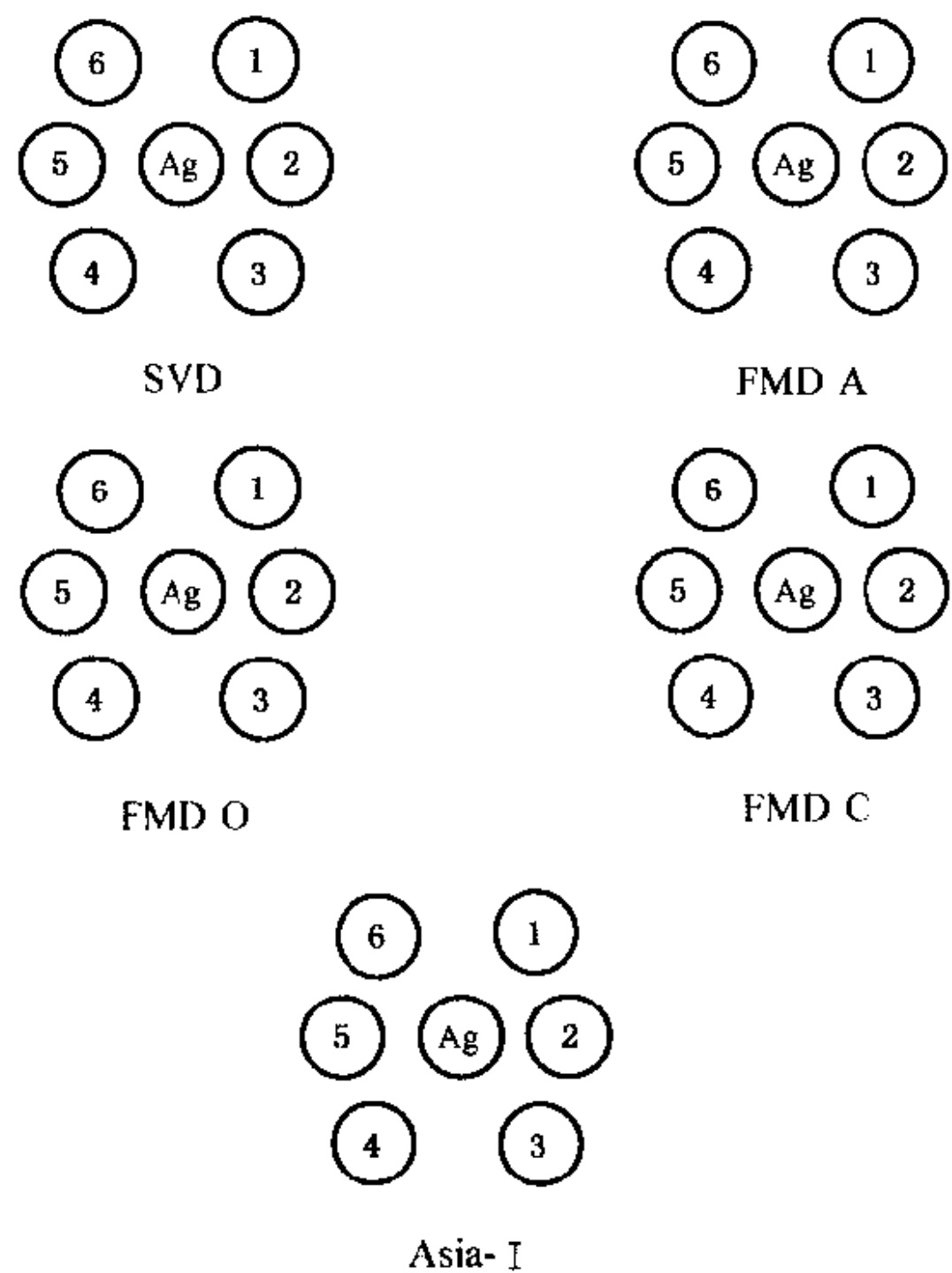


图 2 加样方式

即中央孔分别加 SVD、FMD A、O、C、Asia- I 型精制抗原 30  $\mu\text{L}$ ，每个平皿的 1、4 孔相应地加入 SVD、FMD A、O、C、Asia- I 型阳性血清(用 PBS 做 1 : 10 稀释)30  $\mu\text{L}$ ，作为阳性对照；每个平皿的 2、3、5、6 孔分别加入被检 1、2、3、4 号血清样品 30  $\mu\text{L}$ 。室温放置 2 h~3 h，待样品扩散入琼脂层后，置于潮湿小室中 37℃ 下扩散。

3.2.5 观察

扩散 24 h 后开始观察。观察时可借助灯光或自然光源，也可用暗背景或用产生暗视野的观察箱，一般观察 5 d~7 d 后做最终判定。

3.3 结果判定

3.3.1 每个平皿的 1、4 孔与中央孔之间均出现沉淀线试验方可成立。

3.3.2 每个平皿的 2、3、5、6 四个样品孔与中央孔之间若出现沉淀线，则判为阳性，并与中央孔所加的抗原同病(型)；若未出现沉淀线，则判为阴性。

4 病毒中和试验(VN)

4.1 材料准备

- 4.1.1 50  $\mu\text{L}$  移液加样器，微量细胞培养板，100 mL 细胞培养瓶，温箱，二氧化碳培养箱，倒置显微镜。
- 4.1.2 细胞：仔猪肾传代细胞(IB-RS-2)。
- 4.1.3 细胞培养液(细胞生长液、细胞维持液)，配制方法见附录 B。
- 4.1.4 标准病毒、标准阴性血清、标准阳性血清。

4.2 操作方法

本试验是 50  $\mu\text{L}$  量的等体积试验。

- 4.2.1 被检血清和阴性、阳性血清处理：56℃ 水浴灭活 30 min。
- 4.2.2 稀释病毒：用细胞维持液(见附录 B)将已测病毒滴度的病毒液稀释至含 100TCID<sub>50</sub>。并按式(1)计算病毒稀释倍数(X)。

$$X = (A - B) \text{ 的对数} \dots\dots\dots (1)$$



式中：X——稀释倍数；

A——已测得 50  $\mu\text{L}$  病毒稀释液中所含病毒  $\text{TCID}_{50}$  数量的常用对数；

B——中和试验要求每孔病毒量( $100\text{TCID}_{50}$ )的常用对数，本试验为 2。

4.2.3 稀释血清：从 1:4 稀释开始，将血清在板上横向做二倍连续稀释，每份血清做两排孔。

4.2.3.1 被检血清的稀释：用细胞维持液从 1:4 开始做二倍连续稀释，一般至 1:64，若进行中和抗体效价评估可进一步做二倍连续稀释。

4.2.3.2 阴性血清的稀释：用细胞维持液做 1:4、1:8 稀释。

4.2.3.3 阳性血清的稀释：用细胞维持液将已知效价的阳性血清从 1:4 开始做二倍连续稀释，直至血清效价后两个稀释度。若血清效价为 1:256，稀释至 1:1024。

4.2.4 病毒-血清中和：向被检血清和阴性、阳性血清各稀释度的微量板孔中，逐孔加入等量(50  $\mu\text{L}$ )的稀释病毒液(每 50  $\mu\text{L}$  悬液中病毒含量为  $100\text{TCID}_{50}$ )，加盖后于 37℃ 孵育 1 h。

4.2.5 接种细胞：向每个血清-病毒混合物及对照孔中加入 50  $\mu\text{L}$  浓度为每毫升  $10^6$  个细胞的 IB-RS-2 细胞悬液。细胞对照孔加维持液 100  $\mu\text{L}$ ，阴性、阳性血清对照孔各加血清 50  $\mu\text{L}$  和维持液 50  $\mu\text{L}$ ，病毒滴度复测对照孔加各稀释度病毒 100  $\mu\text{L}$ 。

4.2.6 培养与观察：微量板加盖，用透明胶带密封，于 37℃ 温箱中孵育 48 h~72 h；也可选用合适的盖子将板盖紧，置于含 5% 二氧化碳的培养箱中，在 37℃ 孵育 48 h~72 h。每天用倒置显微镜观察致细胞病变(CPE)，并记录结果。

猪水泡病病毒(SVDV)的 CPE：在光学显微镜下 SVDV 致病变的细胞变圆，固缩而成颗粒状，聚集成堆或散在，大小均匀，折光率强，细胞质内有空泡，部分细胞脱落或崩解成碎片。在观察时应注意区分病变与衰老或理化等因素造成的细胞变性死亡。

### 4.3 结果判定

37℃ 孵育 72 h 后，可将板最后固定并进行常规染色。用 10% 福尔马林盐水固定 30 min，再将微量板浸入用 10% 甲醛配制的 0.05% 亚甲蓝中染 30 min，并将板在水龙头下冲洗干净，做最终判定。

#### 4.3.1 判定条件

细胞层蓝染是阳性，不着色为阴性。

正常细胞对照：生长良好，无 CPE，细胞层蓝染。

阴性血清对照：效价 1:4 及以下，细胞层不着色。

阳性血清对照：再现原血清效价或允许误差在原效价的 2 倍以内( $2^{\pm 1}$ )。原血清效价为 1:256，允许误差范围为(1:125)~(1:512)。

病毒滴度复测对照：再现原病毒滴度或允许误差在原滴度的  $\pm 0.5$  以内( $\pm 0.5 \lg \text{TCID}_{50}$ )。如病毒原滴度为  $10^{-7.0}$ ，病毒复测滴度应在  $10^{-6.5} \sim 10^{-7.5}$  之间。

当上述对照正常时，该中和试验成立并按下列方法和标准判定。

#### 4.3.2 判定

4.3.2.1 两孔的细胞都病变，细胞层不着色，判定为中和抗体阴性。

4.3.2.2 两孔的细胞都不病变，细胞层蓝染，判定为中和抗体阳性。

4.3.2.3 其中一孔细胞病变、不着色，另一孔细胞不病变、蓝染，判定为可疑。

4.3.2.4 中和抗体效价评估：病毒-血清混合物能使细胞孔 50% 不发生 CPE 的血清最高稀释度，即为该血清的中和抗体效价。

#### 4.3.3 判定标准

根据 OIE《哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病 诊断试验和疫苗标准手册》(2000 版)推荐的水泡病诊断方法，被检血清中和滴度达 1:45 或更高判为阳性，按凯波尔(Kärber)氏计算方法计算血清中和滴度，计算方法参见附录 F，1:16~1:32 判为可疑，1:11 及以下判为阴性。如果必要，可疑及个别阳性样品应重检。

附录 A  
(规范性附录)  
缓冲液配制方法

A.1 pH7.6、0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(PB)的配制

甲液:磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 17.9 g  
加蒸馏水至 1 000 mL。  
乙液:磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 7.8 g  
加蒸馏水至 1 000 mL。  
取甲液 870 mL,乙液 130 mL 混合,即为 pH7.6、0.05 mol/L 的 PB。

A.2 pH7.6、50%的丙三醇磷酸缓冲液(GPB)的配制

1 容积的丙三醇(分析纯或化学纯)与等量的 pH7.6、0.05 mol/L PB 混合,103 kPa 高压 10 min 灭菌即成。

A.3 pH7.2、0.11 mol/L 磷酸缓冲液(PB)的配制

甲液:磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 39.4 g  
加蒸馏水至 1 000 mL。  
乙液:磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 17.2 g  
加蒸馏水至 1 000 mL。  
取甲液 720 mL、乙液 280 mL 混合,即为 pH7.2、0.11 mol/L 的 PB。

附录 B  
(规范性附录)  
细胞培养液配制方法

细胞生长液的配制:

|                                                       |                                 |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 犊牛血清                                                  | 10%                             |
| Eagle-MEM(Eagle 是最低限度必要成分培养液)                         | 45%                             |
| 0.5%LH(水解乳蛋白,Lactalbumin Hydrolysate)-Hanks(或 Earles) | 45%                             |
| 青、链霉素                                                 | 各 100IU/mL、100 $\mu\text{g/mL}$ |
| 7.5%碳酸氢钠                                              | 调 pH 至 7.2                      |

细胞维持液的配制:不含犊牛血清的细胞生长液。



**附 录 C**  
(规范性附录)  
稀释液配制方法

**C.1 稀释液 I 的配制**

|                                               |         |
|-----------------------------------------------|---------|
| 聚乙二醇-12000                                    | 0.5 g   |
| 兔血清(62℃水浴灭活 30 min)                           | 10.0 mL |
| 叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )                         | 1.0 g   |
| 加 pH7.2、0.11 mol/L 的 PB 至 1 000 mL,置 4℃~8℃存贮。 |         |

**C.2 稀释液 II 的配制**

|                                                                         |          |
|-------------------------------------------------------------------------|----------|
| 0.1 mol/L 磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )  | 115.0 mL |
| 0.1 mol/L 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) | 385.0 mL |
| 氯化钠( $\text{NaCl}$ )                                                    | 8.5 g    |
| 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)                                                            | 25.0 mg  |
| 吐温-80(Tween-80)                                                         | 0.05 mL  |
| 叠氮钠( $\text{NaN}_3$ )                                                   | 1.0 g    |
| 用蒸馏水稀释至 1 000 mL,加犊牛血清 5 mL,置 4℃~8℃存贮。                                  |          |

**附 录 D**  
(规范性附录)  
敏化红细胞诊断液活力滴定方法

标准抗原做 1:10 稀释(实际浓度为 1:30),然后在微量板孔内进行连续稀释,即 1:60、1:120……1:3840,并滴加敏化红细胞诊断液测定其活力。当活力低于 1:60 时不能使用。

**附 录 E**  
(规范性附录)  
缓冲液及饱和硫酸铵配制方法

**E.1 琼脂糖凝胶缓冲液(AGB)的配制**

|                                        |        |
|----------------------------------------|--------|
| 甘氨酸                                    | 15.0 g |
| 巴比妥钠                                   | 0.52 g |
| 叠氮钠                                    | 1.0 g  |
| 加蒸馏水至 200 mL,用 0.2 mol/L 盐酸调 pH 至 7.9。 |        |

**E.2 pH7.2、0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)的配制**

|                                                                  |        |
|------------------------------------------------------------------|--------|
| 甲液:磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) | 39.4 g |
| 加蒸馏水至 1 000 mL。                                                  |        |

乙液：磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

17.2 g

加蒸馏水至 1 000 mL。

取甲液 720 mL、乙液 280 mL 混合，即为 pH7.2、0.01 mol/L 的 PBS。

### E.3 饱和硫酸铵的配制

将 760 g 硫酸铵加入 1 000 mL 蒸馏水，加温完全溶解（温度不超过 80℃）；室温放置冷却后，用浓氨水调 pH 至 7.2~7.4。在室温下有少量硫酸铵析出，其上清液即为饱和硫酸铵。

## 附 录 F

（资料性附录）

### 凯玻尔(Kärber)计算方法

#### F.1 固定病毒-稀释血清法(β法)

这种方法是将不同稀释度的血清与固定量病毒液（一般为 100 个  $\text{TCID}_{50}$ ）混合，置适当的条件下感作一定时间以后，再将血清-病毒混合物接种于敏感细胞中，测定被检血清阻止组织培养细胞发生病毒感染的的能力及其效价。以能够保护 50% 组织培养细胞不发生病变、感染或死亡的血清最高稀释倍数，作为该血清的 50% 中和效价( $\text{PD}_{50}$ )。按式(F.1)计算。

$$\text{PD}_{50}(\text{以对数表示}) = L + d(S - 0.5) \dots\dots\dots (\text{F.1})$$

式中：

$L$ ——最低稀释度(用对数表示)；

$d$ ——组距，即稀释系数(用对数表示)；

$S$ ——各组死亡(或感染)或保护的比值[死亡(或感染)数/接种数]的和(用对数表示)。

举例说明如下(见表 F.1)：

表 F.1 Kärber 法计算中和滴度示例

| 血清稀释度              | 保护比率         | 血清稀释度                  | 保护比率      |
|--------------------|--------------|------------------------|-----------|
| $1/4 = 10^{-0.6}$  | $4/4 = 1$    | $1/256 = 10^{-2.4}$    | $0/4 = 0$ |
| $1/16 = 10^{-1.2}$ | $3/4 = 0.75$ | $1/1\,024 = 10^{-3.0}$ | $0/4 = 0$ |
| $1/64 = 10^{-1.8}$ | $2/4 = 0.5$  |                        |           |

注：接种剂量为 0.1 mL。

$$L = -0.6 \quad d = -0.6 \quad S = 2.25$$

$$\begin{aligned} \text{PD}_{50}(\text{以对数表示}) &= -0.6 - 0.6(2.25 - 0.5) \\ &= -1.65 \end{aligned}$$

即待检血清的 50% 中和效价  $= 10^{-1.65} = 1/45$ ，也就是 1 : 45 稀释的待检血清可保护 50% 的组织培养细胞免于感染、死亡或出现 CPE。

#### F.2 固定血清-稀释病毒法(α法)

这种测定方法是在固定量的血清中，加入等量不同稀释度的病毒，用对照非免疫血清(对照组)和待检血清同时进行测定，计算每一组的  $\text{TCID}_{50}$ ，然后计算中和指数(表 F.2)。按式(F.2)计算：

$$\text{中和指数} = \frac{\text{试验组 } \text{TCID}_{50}}{\text{对照组 } \text{TCID}_{50}} \dots\dots\dots (\text{F.2})$$

表 F.2 固定血清稀释病毒法计算中和指数示例

| 病毒稀释度    | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | $10^{-7}$ | TCID <sub>50</sub> |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------------|
| 对照血清组保护率 |           |           |           | 4/4       | 3/4       | 1/4       | 0/4       | $10^{-5.5}$        |
| 待检血清组保护率 | 4/4       | 2/4       | 1/4       | 0/4       | 0/4       | 0/4       | 0/4       | $10^{-2.2}$        |

根据表 F.2 计算：

$$\text{中和指数} = \frac{\text{试验组 TCID}_{50}}{\text{对照组 TCID}_{50}} = \frac{10^{-2.2}}{10^{-5.5}} = 1995$$

说明待检血清中和病毒的能力为对照血清的 1995 倍。通常，待检血清的中和指数大于 50 者，即可判为阳性；10~49 为可疑；小于 10 为阴性。



参 考 文 献

世界动物卫生组织(OIE). 农业部畜牧兽医局译. 哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病 诊断试验和疫苗标准手册. 中国农业科学技术出版社, 2002

---