

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 543—2002

牛流行热微量中和试验方法

Micro-neutralization test for bovine ephemeral fever

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

牛流行热(简称 BEF)又称牛暂时热、三日热、一日热、僵硬病等,本病在亚、非和大洋洲许多国家均有发生。该病是由弹状病毒科暂时热病毒属牛流行热病毒引起的一种急性、热性传染病,呈周期性流行。在发病期间,对牛的产奶量、使役能力、增重、精液品质都有严重影响,还可导致少数病牛瘫痪,流产甚至死亡。严重危害养牛业的发展。

本标准是根据我国科研成果,与澳大利亚合作研究成果和我国的实践经验制定的。

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

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

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:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:白文彬、严隽端。

牛流行热微量中和试验方法

1 范围

本标准规定了牛流行热微量血清中和试验技术。

本标准适用于牛流行热的诊断、免疫监测和流行病学调查。

2 微量血清中和试验

2.1 器材

2.1.1 营养液和 0.05%胰酶 EDTA(简称 ATV)液,配制方法见附录 A。

2.1.2 细胞及其制备、传代、计数方法,见附录 B。

2.1.3 抗原(指示毒)、标准阳性血清、阴性血清由法定单位提供,按说明书使用。抗原毒价以及工作抗原(100 TCID_{50})测定方法见附录 C。

2.1.4 微量滴定板:无菌带盖 96 孔微量滴定板(简称微量板)。

2.1.5 微量加样器:25 μL 、50 μL 及 100 μL 单道和多道加样器,加样塑料滴头(装量为 25 μL ~100 μL ,与加样器配套使用)。

2.1.6 二氧化碳培养箱。

2.2 操作方法

2.2.1 灭活

被检血清以及阴、阳性血清用前均于 56℃ 水浴锅中灭活 30 min。

2.2.2 准备

制备工作抗原(指示毒)方法(见第 C.1 章),将已知毒价的合格种毒用生长液(见第 A.1 章)稀释成 $100\text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

2.2.3 定性试验

2.2.3.1 向微量板的每孔各加 25 μL 生长液。

2.2.3.2 在第一排加被检血清,每份占 2 孔,每孔 25 μL ,混合均匀,即成 2 倍稀释。

2.2.3.3 用多道加样器从第 1 孔取 25 μL 液体对应移入第 2 排孔内,混匀即成 4 倍稀释。再从孔内吸出 25 μL 丢弃。

2.2.3.4 每孔加工作抗原 25 μL ,混匀置 37℃ 孵育 60 min。

2.2.3.5 每孔加细胞悬液 100 μL (30 000 个细胞)。细胞计数方法见第 B.3 章。

2.2.3.6 试验对照系统的设置。每批试验的对照系统的设置:标准阳性血清,从第 1 列至第 6 列,每列 4 孔,逐列稀释(即 2 倍~64 倍),标准阴性血清、细胞对照和病毒对照各 1 列 4 孔。同时对本试验使用的工作抗原,随同试验再次进行测定。

2.2.3.7 用灭菌的盖子盖上微量板,置 37℃ 二氧化碳(CO_2)培养箱内,培养 5 d。从第 3 d 起逐日记录细胞病变效应(CPE)。

2.2.3.8 结果判定:标准阳性血清中和抗体价 ≥ 64 ,标准阴性血清、病毒对照排各孔均出现 CPE,工作抗原含量滴定在规定的范围之内(CPE 出现的孔数与毒价查阅方法见第 D.1 章),细胞对照孔正常情况下,4 倍稀释的被检血清列,两孔都出现 CPE 时,判为阴性;仅 1 孔出现 CPE,被判为可疑,应再重复试验一次;两孔均不产生 CPE 时,则被判为阳性。

2.2.4 定量试验(测定抗体滴度)

2.2.4.1 向微量板的每孔各加 25 μL 生长液。

2.2.4.2 每份被检血清在微量板第 1 列占 4 孔,每孔加 25 μL 即待检血清为 2 倍稀释。

2.2.4.3 用多道加样器将 2 倍稀释的每份待检血清混匀后,吸取 25 μL 对应移入第 2 排孔内,混匀即为 4 倍稀释,以此类推,直至稀释 ≥ 64 倍,最后一列各孔内混合血清各丢弃 25 μL 。

2.2.4.4 每孔各加工作抗原 25 μL ,但细胞对照不加工作抗原,置 37℃下孵育 60 min。

2.2.4.5 每孔加 100 μL 细胞悬液(30 000 个细胞)。

2.2.4.6 盖上灭菌盖,置 37℃二氧化碳(CO_2)箱内培养 5 d。从第 3 d 起逐日记录 CPE。

2.2.4.7 对照系统各项试验内容、方法与定性试验相同。

2.2.4.8 半数感染量的终点、中和抗体价计算和查阅方法见附录 D。

附录 A

(规范性附录)

营养液和 0.05 %胰酶 EDTA 配制方法

A.1 RPMI 1640 营养液的配制

RPMI 1640 粉末	10.4 g
无离子水或双蒸馏水	1 000 mL

充分溶解后经 0.22 μm 孔径微孔滤膜滤过除菌。

细胞培养生长液是在滤过除菌营养液的基础上,按 10%加入灭活犊牛血清,100 IU/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素,然后用 1 mol/L 盐酸(HCl)溶液调整 pH 值至 7.2 左右。

细胞培养维持液的犊牛血清含量为 2%。

A.2 胰酶 EDTA 的配制

氯化钠	8.0 g
氯化钾	0.4 g
葡萄糖	1.0 g
碳酸氢钠	0.58 g
0.4%胰蛋白酶	0.5 g
EDTA	0.5 g

将前 3 种试剂加入到容器内,添加一定量的双蒸馏水搅拌全溶后,再将其余试剂缓慢加入到该溶液内搅拌全溶,最后补加双蒸馏水到 1 000 mL,混匀,调 pH 值至 7.6,以微孔滤膜(孔径为 0.22 μL)滤过除菌。分装若干小瓶,置 -20℃ 下保存备用。

附录 B

(规范性附录)

细胞及其制备、传代、计数方法

B.1 细胞复苏培养

取出液氮内冻存的 BHK₂₁ 细胞安瓶 1 支, 置 37℃ 水浴, 全融后迅速开封, 立即移入装 10 mL 生长液 (见第 A.1 章) 的 100 mL 方瓶内, 放 37℃ 下静止培养一夜, 换同量生长液继续培养, 经 2 d~3 d 天即可形成良好的细胞单层。

B.2 细胞传代

将上述形成良好单层细胞培养瓶内生长液倒掉, 以含 0.05% 胰酶 EDTA (见第 A.2 章) 4 mL 加入培养瓶中进行消化, 待细胞单层疏松拉网时, 用吸管贴壁反复吹打数次, 制成均匀散在细胞悬液, 加入 0.4 mL 犊牛血清混匀, 以终止胰酶 EDTA 对细胞的作用。随后以 1 000 r/min 的速度离心 5 min, 细胞沉淀按 1:5 分钟率进行传代。

B.3 细胞计数

进行微量血清中和试验时, 每孔加进约 30 000 个细胞。细胞计数的具体方法是: 将发育良好的一方瓶单层细胞, 按 B.2 方法消化离心处理后, 制成 4 mL 细胞悬液。取该液 0.1 mL 加生长液 9.9 mL 混匀, 以毛细管吸取少量细胞悬液加入到白细胞计算板的计算室内, 在显微镜下观察, 并按式 (B.1)、式 (B.2)、式 (B.3) 计算:

$$n = 4 \text{ 大区平均细胞数} = \frac{4 \text{ 大区细胞数}}{4} \dots\dots\dots (B.1)$$

$$\text{细胞数 / mL} = n \times 10^6 \dots\dots\dots (B.2)$$

为配成 10 mL 的 3×10^5 / mL 细胞悬液, 求出应加的细胞液数量 (X)。

$$X = \frac{3 \times 10^5 \times 10}{n \times 10^6} = \frac{3}{n} \dots\dots\dots (B.3)$$

然后取细胞液 X mL, 加细胞生长液 (见第 A.2 章) 到 10 mL。

附 录 C

(规范性附录)

抗原毒价及工作抗原(100 TCID₅₀)测定方法

C.1 抗原(指示毒)制备

取生长良好的方瓶或转瓶 BHK₂₁ 单层细胞,倾去细胞生长液,将冻结保存的毒种用 RPMI 1640 营养液的细胞维持液(见第 A.1 章)稀释 100 倍,按细胞生长液量的五分之一接种于单层细胞于 37℃ 吸附 1 h,倾去病毒液,添加与细胞生长液量相同的细胞维持液。置 37℃ 培养,每日观察 1 次~2 次,当细胞病变达 75% 以上时收获,反复冻融 3 次后,放 -40℃ 冰箱冻结保存备用。

C.2 抗原毒价(TCID₅₀)测定

用 RPMI 1640 生长液将上述制备的抗原作 10 倍系列稀释,取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 四个滴度分别接种于每孔含 100 μL BHK₂₁ 细胞液的 96 孔塑料板的 4 个孔内,每孔 25 μL。同时设不接毒的细胞孔对照。放 37℃ 二氧化碳(CO₂)培养箱,培养 5 d,观察 CPE 出现孔数,计算毒价(见第 D.1 章)和 TCID₅₀,新鲜的抗原毒价应 ≥ 10^{6.0} TCID₅₀。

C.3 工作抗原毒价(100 TCID₅₀)的测定和计算方法

测定和计算的具体步骤如下:首先将待检抗原(病毒液)作 10 倍、50 倍稀释,前者称 A 液,后者称 B 液,同时对 A、B 液进行毒价(用以 10 的对数表示)测定。例如 A 液的毒价是 3.5, B 液的毒价是 2.75,那么则取 (3.5~2.75) ÷ 4 = 0.19 作为等差常数,然后用 A 液的毒价值顺次减去常数,当所得的差等于或接近 2 时的病毒稀释度即为工作抗原用量(100 TCID₅₀)(见表 C.1)。

表 C.1 TCID₅₀ 计算示例

A 液病毒稀释度	1 : 10	1 : 20	1 : 30	1 : 40	1 : 50	1 : 60	1 : 70	1 : 80	1 : 90	1 : 100
A 液毒价值减去 系数值的差	3.5-0.19 =3.31	3.31-0.19 =3.12	3.12-0.19 =2.93	2.93-0.19 =2.74	2.74-0.19 =2.55	2.55-0.19 =2.36	2.36-0.19 =2.17	2.17-0.19 =1.98	1.98-0.19 =1.79	

由对应表可见,差值 1.98 接近 2,故把待检抗原(病毒液)稀释 80 倍,即为微量血清中和试验所用的 100 TCID₅₀ 工作抗原。

C.4 标准阳性血清

系用牛流行热病毒强毒人工感染 1 岁的小公奶牛或自然感染牛耐过后 3 周~4 周,采集分离的血清经中和抗体效价测定其效价应 ≥ 128 倍。

C.5 标准阴性血清

系采自非污染区健康牛分离的血清,经血清中和试验检查,应无牛流行热特异抗体。

附录 D
(资料性附录)
毒价计算法

D.1 细胞病变(CPE)出现孔数与查阅毒价法

见表 D.1。

表 D.1 改进的 Reed-Meunch 法毒价查阅表

病毒稀释 滴度	CPE 出现孔数	毒价 (a+b)	病毒稀释 滴度	CPE 出现孔数	毒价 (a+b)	病毒稀释 滴度	CPE 出现孔数	毒价 (a+b)
10 ⁰	++++	0.5+1.6	10 ⁰	++++	1.25+1.6	10 ⁰	++++	2.0+1.6
10 ⁻¹	-----		10 ⁻¹	+++--		10 ⁻¹	++++	
10 ⁻²	-----		10 ⁻²	-----		10 ⁻²	++---	
10 ⁻³	-----		10 ⁻³	-----		10 ⁻³	-----	
10 ⁻⁴	-----		10 ⁻⁴	-----		10 ⁻⁴	-----	
10 ⁰	++++	0.75+1.6	10 ⁰	++++	1.5+1.6	10 ⁰	++++	2.25+1.6
10 ⁻¹	+-----		10 ⁻¹	++++		10 ⁻¹	++++	
10 ⁻²	-----		10 ⁻²	-----		10 ⁻²	+++--	
10 ⁻³	-----		10 ⁻³	-----		10 ⁻³	-----	
10 ⁻⁴	-----		10 ⁻⁴	-----		10 ⁻⁴	-----	
10 ⁰	++++	1.0+1.6	10 ⁰	++++	1.75+1.6	10 ⁰	++++	2.50+1.6
10 ⁻¹	++---		10 ⁻¹	++++		10 ⁻¹	++++	
10 ⁻²	-----		10 ⁻²	+-----		10 ⁻²	++++	
10 ⁻³	-----		10 ⁻³	-----		10 ⁻³	-----	
10 ⁻⁴	-----		10 ⁻⁴	-----		10 ⁻⁴	-----	
注：本表的终末毒价以 TCID ₅₀ =10 ^{a+b} /mL 表示。其中以微量板测定的毒价 10 ^a /25 μL 表示，由于 1 mL (1 000 μL)比 25 μL 大 40 倍，所以改成终末毒价时，需在前者基础上，加 log40=1.6 即为终末毒价，用 a+b 之和表示。								

测定毒价的各滴度列，每增加一个 CPE 孔，毒价就提高 0.25，个别情况下，相邻的病毒浓度大的测毒列，CPE 孔未现，而病毒浓度低的测毒列，反而出现 1 个或 2 个 CPE 孔，此时应将后者向病毒浓度大的测毒列移动。

关于确定终末毒价的举例：如稀释度为 10⁻² 的待检病毒列 4 孔均出现 CPE，其毒价则为 2.5+1.6=4.1，以此类推，被测病毒稀释到 10⁻⁷ 时，有 3 孔出现 CPE，其毒价则为 7.25+1.6=8.85。

D.2 中和抗体效价计算和查阅方法

见表 D.2。

表 D.2 改进的 Reed-Meunch 法中和抗体价查阅表

血清稀释倍数	微量板孔号及 CPE 出现情况			
	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4
	+ - - -	+ + - -	+ + + -	+ + + +
2	2	2	2(1.6)	1(1.4)
4	5	4	3	3
8	10	8	6	6
16	19	16	12	11
32	38	32	25	22
64	77	64	51	45
128	154	128	102	89
256	309	256	204	177
512	616	512	407	354
1 024	1 230	1 024	812	707
2 048	2 455	2 048	1 622	1 413
注：中和抗体效价位于纵向血清稀释倍数与横向 CPE 出现孔数的交叉点上。如血清稀释 4 时，该排 4 孔中 1 孔出现 CPE，中和抗体价为 5；2 孔出现 CPE，中和抗体为 4；3、4 孔出现 CPE 时，中和抗体价均为 3；又如血清稀释 64 倍时，该排 4 孔中 1 孔出现 CPE，中和抗体价为 77；2 孔出现 CPE，中和抗体价为 64；3 孔出现 CPE，中和抗体价为 51；4 孔全出现 CPE，中和抗体价为 45，其他情况类推。				