ICS 11.220
B 41

NY

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

需要全本请访问 www.ertongbook.com

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 $TCID_{50}$/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 μg/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。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

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 BHK_{21} 细胞安瓿 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：

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

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

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)。

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

然后取细胞液 XmL，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 $TCID_{50}$）测定方法

C.1 抗原（指示毒）制备

取生长良好的方瓶或转瓶 BHK_{21} 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（$TCID_{50}$）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 BHK_{21} 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（CO_2）培养箱，培养 5 d，观察 CPE 出现孔数，计算毒价（见第 D.1 章）和 $TCID_{50}$，新鲜的抗原毒价应≥$10^{6.0}TCID_{50}$。

C.3 工作抗原毒价（100 $TCID_{50}$）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 $TCID_{50}$）（见表 C.1）。

表 C.1 $TCID_{50}$ 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 $TCID_{50}$ 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	++++		10^0	++++		10^0	++++	
10^{-1}	----		10^{-1}	+++-		10^{-1}	++++	
10^{-2}	----	0.5+1.6	10^{-2}	----	1.25+1.6	10^{-2}	++--	2.0+1.6
10^{-3}	----		10^{-3}	----		10^{-3}	----	
10^{-4}	----		10^{-4}	----		10^{-4}	----	
10^0	++++		10^0	++++		10^0	++++	
10^{-1}	+---		10^{-1}	++++		10^{-1}	++++	
10^{-2}	----	0.75+1.6	10^{-2}	----	1.5+1.6	10^{-2}	+++-	2.25+1.6
10^{-3}	----		10^{-3}	----		10^{-3}	----	
10^{-4}	----		10^{-4}	----		10^{-4}	----	
10^0	++++		10^0	++++		10^0	++++	
10^{-1}	++--		10^{-1}	++++		10^{-1}	++++	
10^{-2}	----	1.0+1.6	10^{-2}	+---	1.75+1.6	10^{-2}	++++	2.50+1.6
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 $10^a/25\ \mu L$ 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 $\log 40=1.6$ 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。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

中华人民共和国农业
行业标准
牛流行热微量中和试验方法
NY/T 543—2002
*
中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
*
开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 15 千字
2002年12月第一版 2002年12月第一次印刷
印数 1—1 500
*
书号:155066·2-14813 定价 10.00 元
网址 www.bzcbs.com

版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

NY/T 543-2002