

动植物检疫参考资料

1988 (4)

# 国外动物疾病检疫方法

(一)

中华人民共和国动植物检疫总所

一九八八年八月

13687

## 前 言

随着我国对外科学技术和对外贸易的不断发展，近年来我国与国外的交往日益俱增。总所从1983~1987年，根据两国间的科学技术协议和派员随同中国种畜进出口公司选购种畜，已先后派出数百人（次）赴加拿大、美国、联邦德国等数十个国家进修学习和执行检疫任务。广大检疫技术人员不仅在国外圆满地完成了学习和检疫任务，而且还带回不少国外的技术资料，为充分发挥现有资料的作用，使动检人员更好地了解国外动物疾病检疫技术，以对照国内检疫方法，做到心中有数。总所委托塘沽动植物检疫所赵祥平、秦贞奎等同志，将上述国家的部分动物疾病检疫方法，整理汇编成册，供各口岸动检人员学习参考。文中大部分动物疾病检疫技术资料是按原文翻译而成的，其中有个别内容如：联邦德国的14种检疫方法是我出国人员根据国外资料、检疫实践整理编辑而成。由于编者水平有限，如有不当之处，请读者批评、指正。

编 者

一九八八年八月

# 目 录

## 前 言

### 一、加拿大动物疾病检疫方法

1. 伪狂犬病病毒 (Prv) 微量血清中和试验标准草案 ..... (1)
2. 测定猪血清中抗伪狂犬病病毒抗体的酶联免疫吸附试验 ..... (5)  
附: 伪狂犬病毒抗体检验盒 (供筛选用) ..... (11)
3. 猪流感病毒 (SWI) 微量血球凝集抑制试验 (HI) 标准草案 ..... (14)
4. 猪传染性胃肠炎病毒 (TGE) 微量血清中和试验标准草案 ..... (20)
5. 水泡性口炎病毒 (VS)、新泽西型 (NJ) 和印第安纳型 (IND) 微量血清中和试验标准草案 ..... (24)
6. 猪水泡病 (SVD) 病毒微量血清中和试验标准草案 ..... (28)
7. 血细胞凝集性脑脊髓炎病毒 (HEV) 微量血清中和试验标准草案 ..... (32)
8. 猪附红细胞体病间接红细胞凝集反应检验规程 ..... (36)
9. 牛病毒性腹泻病毒 (BVD) 微量血清中和试验标准草案 ..... (37)
10. 牛传染性鼻气管炎病毒 (IBR) 微量血清中和试验标准草案 ..... (42)
11. 蓝舌病病毒 (BTV)——鹿流行性出血热病毒 (EHDV) 微量血清中和试验标准草案 ..... (47)
12. 蓝舌病病毒琼脂扩散试验操作规程 ..... (48)
13. 牛白血病病毒琼脂扩散试验操作规程 ..... (50)
14. 梅迪——维士那琼脂扩散试验技术操作规程 ..... (52)
15. 马传贫琼脂扩散试验操作规程 ..... (53)
16. 马动脉管炎病毒 (EAV) 微量血清中和试验标准草案 ..... (56)
17. 马鼻腔肺炎病毒 (ERV) 微量血清中和试验标准草案 ..... (60)
18. 新城疫病毒及禽流感病毒的分离和鉴定方法 ..... (65)
19. 牛胎儿弯曲杆菌阴道粘液凝集试验抗原的生产 ..... (71)
20. 从牛的包皮粘液、阴道粘液和新鲜精液中检验胎儿弯曲杆菌的实验方法 ..... (73)
21. 牛奶样品的实验室检验方法 ..... (75)
22. 从脑脊髓组织中分离鉴定李氏杆菌的检验程序 ..... (76)
23. 沙门氏菌的分离与鉴定 ..... (76)
24. 空肠弯曲杆菌的培养方法 ..... (77)
25. 从屠宰鸡体中检验空肠弯曲杆菌的实验方法 ..... (78)

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| 26. 肠耶新氏杆菌的分离.....             | (79)  |
| 27. 羊毛的炭疽杆菌检验的实验室方法.....       | (79)  |
| 28. 土拉热费朗西丝氏菌的分离培养方法.....      | (80)  |
| 29. 弯曲杆菌的分离与鉴定.....            | (81)  |
| 30. 牛精液病毒分离标准规程.....           | (86)  |
| 31. 精液中细菌病原体的检验.....           | (88)  |
| 32. 气肿疽梭菌、腐败梭菌、诺维氏梭菌的分离方法..... | (89)  |
| 33. 猪痢疾密螺旋体的培养方法.....          | (90)  |
| 34. 衣原体的分离方法.....              | (91)  |
| 35. 衣原体的Macchiavello染色程序.....  | (91)  |
| 36. 缓冲抗原平板凝集试验程序.....          | (92)  |
| 37. 布氏杆菌病标准试管凝集试验程序.....       | (93)  |
| 38. 牛边虫病补体结合反应操作规程.....        | (96)  |
| 39. 补体结合反应试验操作程序.....          | (103) |
| 40. 副结核菌素的制造方法.....            | (115) |
| 41. 副结核菌素生产方案.....             | (117) |

## 二、美国动物疾病检疫方法

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| 1. 布氏杆菌病的分离、鉴定和分型实验室操作程序.....    | (121) |
| 2. 布氏杆菌环状沉淀反应试验的步骤和方法.....       | (126) |
| 3. 牛布氏杆菌补体结合试验.....              | (130) |
| 4. 牛布氏杆菌病补体结合试验微量法.....          | (137) |
| 5. 诊断布氏杆菌病的标准凝集试验程序.....         | (145) |
| 6. 弓形体病间接荧光抗体试验操作程序.....         | (148) |
| 7. 边虫补体结合试验微量法.....              | (154) |
| 8. 细胞污染霉形体的检查方法.....             | 159   |
| 9. 猪细小病毒的诊断.....                 | (161) |
| 10. 用酶联免疫吸附试验检测猪伪狂犬病病毒抗体.....    | (163) |
| 11. 猪痢疾密螺旋体的分离与鉴定.....           | (166) |
| 12. 伪狂犬病和传染性胃肠炎微量中和试验.....       | (167) |
| 13. 蓝舌病病毒分离操作方法.....             | (169) |
| 14. 蓝舌病微量补体结合试验.....             | (171) |
| 15. 蓝舌病补体结合试验的标准诊断程序.....        | (173) |
| 16. 梅迪/维士那中和试验标准规程.....          | (179) |
| 17. 绵羊进行性肺炎——山羊关节炎脑炎琼扩试验的检测..... | (181) |
| 18. 绵羊和山羊的慢病毒感染的血清学诊断.....       | (182) |
| 19. 山羊关节脑炎病毒血清学抗原生产方法.....       | (183) |

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| 10. 滴定疫苗中牛传染性鼻气管炎病毒的补充分析方法.....       | (185) |
| 11. 用病毒噬斑方法滴定牛传染性鼻气管炎中和抗体的补充实验方法..... | (187) |
| 22. 牛传染性鼻气管炎病毒中和抗体的补充分析方法.....        | (190) |
| 23. 牛传染性鼻气管炎中和试验程序.....               | (193) |
| 24. 从牛血清中分离牛病毒性腹泻病毒的程序.....           | (194) |
| 25. 滴定疫苗中牛病毒性腹泻病毒的补充分析方法.....         | (195) |
| 26. 牛病毒性腹泻中和抗体滴定的补充实验方法.....          | (197) |
| 27. 牛病毒性腹泻中和抗体滴定的补充分析方法.....          | (198) |
| 28. 微量滴定法检测IBR/IPV中和抗体的程序.....        | (199) |
| 29. 副结核补体结合反应试验——微量法.....             | (200) |
| 20. 牛恶性卡他热血清学标准诊断方法.....              | (207) |
| 31. 新城疫和鸡瘟的诊断.....                    | (207) |
| 32. 进口禽鸚鵡热的诊断程序.....                  | (211) |
| 33. 检测禽血清中禽毒霉形体抗体的标准试验程序.....         | (212) |

### 三、联邦德国动物疾病检疫方法

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| 1. 牛病毒性腹泻/粘膜病检疫方法.....        | (215) |
| 2. 检查牛病毒性腹泻/粘膜病抗体操作程序.....    | (217) |
| 3. 检查牛病毒性腹泻/粘膜病病毒的操作程序.....   | (217) |
| 4. 检查牛传染性鼻气管炎抗体的操作程序.....     | (218) |
| 5. 布氏杆菌病试管凝集反应操作程序.....       | (218) |
| 6. 布氏杆菌病微量补体结合反应操作程序.....     | (219) |
| 7. 检查牛白血病抗体琼扩试验操作程序.....      | (220) |
| 8. 副结核微量补体结合反应试验操作程序.....     | (221) |
| 9. 牛白细胞分离牛病毒性腹泻——粘膜病病毒.....   | (224) |
| 10. 弓形体病Latex试验操作程序.....      | (226) |
| 11. 血清中和试验的方法.....            | (226) |
| 12. 牛传染性鼻气管炎 ELISA试验操作方法..... | (228) |
| 13. 口蹄疫病的检测方法.....            | (229) |

### 四、泰国动物疾病的检疫方法

|                                      |       |
|--------------------------------------|-------|
| 1. 日本脑炎(乙型脑炎)的血球凝集试验和血球凝集抑制试验方法..... | (235) |
| 2. 猪支气管败血波氏杆菌的分离.....                | (237) |
| 3. 口蹄疫病毒微量血清中和试验.....                | (238) |
| 4. 猪结核菌素试验.....                      | (239) |

|                                    |       |
|------------------------------------|-------|
| 5. 弓形体病的微量滴定法 .....                | (240) |
| 6. 微量血清——病毒中和试验方法 .....            | (241) |
| 7. 埃氏密螺旋体痢疾的诊断 .....               | (242) |
| 附: 家畜布氏菌病的诊断标准                     |       |
| 1. FAO/WHO 布氏杆菌病专家委员会推荐的诊断标准 ..... | (243) |
| 2. 美国农业部凝集反应技术和诊断标准 .....          | (244) |
| 3. 欧州共同体凝集反应技术和诊断标准 .....          | (246) |
| 4. 澳大利亚凝集反应诊断标准 .....              | (248) |
| 5. 我国的凝集反应诊断标准 .....               | (248) |
| 6. 补体结合反应抗体国际单位计算法 .....           | (250) |
| 7. 补体结合反应的标准化的 .....               | (252) |
| 8. 欧州共同体标准血清和国际标准血清的比较 .....       | (255) |

# 一、加拿大动物疫病检疫方法

## 伪狂犬病毒微量血清中和试验标准草案

### 一、材料

1. 被检血清：样品采集于商品化血液管中。
2. 已知滴度的伪狂犬病阳性对照血清：采集于先前无伪狂犬病毒抗体的试验感染仔猪。
3. 伪狂犬病阴性对照血清：采自于试验感染前的正常仔猪血清。
4. 已知效价的伪狂犬病毒。
5. 适于伪狂犬病毒的猪肾细胞。(PK—15)  
注：另外一种猪肾细胞系IBRS<sub>2</sub>也适宜。
6. 商品血清：犊牛血清，检查其对细胞的生长和维持能力，并检查IBR，BVD和伪狂犬病毒抗体阴性，没有霉形体污染。
7. 微量移液器，0.025ml和0.050ml单头或多头加样器。
8. 微量稀释棒：0.025ml稀释棒
9. 九十六孔带盖平底微量反应板。(Falcon)
10. 稀释液MEM—E灭菌液 加有：青霉素200u/ml、链霉素200μg/ml、庆大霉素50μg/ml、1% w/v MEM非必需氨基酸—MEM<sup>1</sup>(NEAA)、1% w/v L—谷氨酰胺、1% w/v 水解乳蛋白、0.075% w/v 除菌NaHCO<sub>3</sub>。
11. PK—15细胞生长液：稀释液加20%犊牛血清。
12. 无钙、镁离子PBS液：用作消化PK—15细胞前的冲洗液。
13. 胰酶—EDTA：消化PK—15细胞。  
(0.05% w/v 胰酶，0.01% w/v EDTA)
14. 灭菌蒸馏水，冲洗微量稀释棒。
15. 12×75mm稀释管和管架。
16. 250ml灭菌烧杯，内装20—25ml灭菌蒸馏水刚好浸没微量稀释棒头部。
17. 支架，当进行火焰灭菌时，支托微量稀释棒。
18. 灭菌吸水纸，吸去微量稀释棒头部多余液体。
19. 一次性灭菌吸管，1 ml和5 ml。
20. 自动移液器及灭菌移液器头。

### 二、试验准备：

注：本试验在高度隔离实验室进行。

#### 1. 血清样品的处理

- ①收到血液后，分离血清（必要时可进行离心），把装在带软木盖试管内的血清于

-20℃保存。

②根据实验表格把血清编号

③血清样品经56℃，30分钟灭活。

## 2. 实验表格的准备

①根据血清样品的数量

注：本试验是猪在进口前或出口前的鉴定试验。血清首先在1：2稀释度进行筛选，此稀释度不包括滴加病毒后所引起的稀释

A. 根据出口至某些国家的要求，可用未稀释的血清进行试验。

B. 决定终点滴度。（双份血清或根据进口国家要求）

C. 血清滴度测定以2倍递进稀释至1：256。如果第一次未能测出终点，则将血清继续稀释重新试验。

②根据对照试验的数量

A. 伪狂犬病毒阳性血清对照（做8个稀释度，每稀释度3孔）。

B. 伪狂犬病毒阴性血清对照（做2个稀释度，每稀释度3孔）。

C. 细胞对照（最少6孔）

D. 工作抗原对照（6孔）

E. 伪狂犬病毒回归试验（做4个稀释度，每稀释度6孔）。

## 3. 微量反应板标记及编号

### 4. 微量稀释棒的清洗及预湿

①每次将3支微量稀释棒浸入盛有灭菌蒸馏水的250ml烧杯中，轻摇几次后拿出，放入第二个盛有灭菌蒸馏水的250ml烧杯中，轻摇几次后再拿出，用灭菌吸水纸吸干稀释棒头内残留的水分。

②置微量稀释棒头部于酒精灯火焰上20秒钟，然后放入盛有20—25ml灭菌蒸馏水的250ml烧杯中。烧杯周围加有冰块以保持灭菌蒸馏水的冷却。

③稀释血清时，将稀释棒从冷却的蒸馏水中取出，在灭菌吸水纸上吸干头部残留的水分，再放入微量反应板的血清孔内。

④稀释下一个血清样品时，再重复上述过程。

## 三、试验程序

### 1. 筛选试验血清样品的稀释

①用0.025ml微量加样器或多功能加样器在微量反应板的每一孔中加入0.025ml MEM—E稀释液

②将每支已经清洗和预湿的0.025ml微量稀释棒插入血清样品中，吸取0.025ml血清加入微量反应板的第一排前三孔中。（即A排1、2和3孔）、转动微量稀释棒6—10次作1：2稀释。

③如需作进一步稀释，从第一排三孔中吸取0.025ml 1：2稀释的血清样品加到下一排的三孔中稀释成1：4。这样，就得到了1：2和1：4两个稀释度，每稀释度3孔。

④根据需要，将所有血清样品，阳性对照和阴性对照血清继续进行稀释。

⑤如果需要的稀释滴度终点未到达时，将样品重新作进一步稀释。

## 2. 未稀释的被检血清

### ①筛选试验只做未稀释血清。

A. 被检血清孔内不加稀释液。

B. 用自动微量移液器和灭菌微量吸头吸取 0.025ml 被检血清加至微量反应板的三孔中。(每个微量反应板可做32份血清样品)

### ②从未稀释血清样品起始的滴度测定。

A. 每个血清样品起始第一排三孔不加稀释液, 但以后各排都加 0.025ml 稀释液。

B. 用自动微量移液器和灭菌微量吸头吸取 0.05ml 被检血清加到第一排没有稀释液的三孔内。

C. 用 3 支 0.025ml 微量稀释棒吸取第一排三孔内的被检血清 0.025ml 移到下一排三孔内旋转 6—10 次作 1:2 稀释。

D. 按照筛选试验血清样品稀释方法完成滴度测定。

### ③伪狂犬病毒阳性和阴性对照血清的稀释。

A. 阳性血清对照: 按前述方法以两倍递进稀释作 8 个稀释度, 其稀释度是 1:2—1:256。

B. 阴性血清对照: 按前述方法以两倍递进稀释作 2 个稀释度, 即 1:2 和 1:4。

### ④被检血清对照和细胞对照的准备。

A. 用 0.025ml 微量移液器吸取 0.025ml MEM—E 稀释液加到每个被检血清 每个稀释度的第三孔中。

注: 此列孔作为血清对照, 不加入工作抗原, 加稀释液是使每孔中液体体积相同。

B. 细胞对照孔中每孔加入 0.050ml MEM—E 稀释液。

注: 工作抗原对照孔和病毒回归试验孔也加入 0.025ml MEM—E 稀释液

### ⑤工作抗原的滴加。

根据预先测定好的病毒效价, 将伪狂犬病毒稀释成每 0.025ml 含 100 个 TCID<sub>50</sub>。

A. 用 0.025ml 微量移液器在每份被检血清各个稀释度头两孔中滴加 0.025ml 工作抗原液, 第三孔为血清对照孔。

B. 在工作抗原对照孔内, 每孔加入 0.025ml 工作抗原液

### ⑥工作抗原的回归试验。

此试验用于测定实验中工作抗原所含的致半数细胞病变量 (TCID<sub>50</sub>/0.025ml) 将工作抗原作 10<sup>-1</sup>—10<sup>-4</sup> 稀释。

A. 取 0.50ml 工作抗原液加到盛有 4.5ml MEM—E 稀释液的试管中, 混匀后取出 0.50ml 加至下一支盛有 0.45ml MEM—E 稀释液的试管中。(每次稀释需换新的吸管)

B. 用 0.025ml 微量移液器从 10<sup>-4</sup> 稀释度开始滴加, 每个稀释度作 6 孔, 每孔 0.025ml, 这样, 四个稀释度就得了 10、1、0.1 和 0.01 个致半数细胞病变量 (TCID<sub>50</sub>/0.025ml)。

⑦把微量反应板盖好, 置 37°C 湿度 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1 小时 (5% CO<sub>2</sub>)。

### ⑧PK—15 细胞悬液的准备。

A. PK—15 细胞生长在表面积为 75cm<sup>2</sup> 的 Falcon 塑料培养瓶中, 在接种细胞 2 天

后, 细胞形成平整、融合的单层。

B. 将营养液倒掉, 用25ml无钙、镁离子的PBS液冲洗细胞表面两次, 再用25ml胰酶—EDTA溶液冲洗细胞表面, 轻摇几次后倒出, 培养瓶内留大约1—2ml液体

C. 放置培养瓶于37°C培养箱约10分钟, 当细胞脱落后加入10mlMEM—E细胞生长液制成细胞悬液。

D. 试验中, 每孔最少需要50,000细胞, 每一个75cm<sup>2</sup>培养瓶通常可以做两块微量反应板。

⑨用0.050ml微量移液器在96孔板的每一孔都加入0.050ml含有50,000细胞的PK—15细胞悬液, 将盖盖好后放置于37°C, CO<sub>2</sub>湿度培养箱中(5%CO<sub>2</sub>)。在第三天进行结果判定。

#### 四、结果判定

1. 细胞对照孔内细胞必须正常。

2. 病毒回归试验所得效价与原测定效价相差不能超过 $\pm 0.5 \text{Log}_{10}$ 。(应用 Reed 和 Munch方法)

注: 如果试验用抗原的效价超出这个范围, 则对种毒效价重新测定, 并重做试验。

3. 工作抗原对照孔必须出现完全细胞病变, 如细胞圆缩, 细胞肿大以及最后的细胞崩解脱落

4. 阴性血清对照孔出现完全病变。

5. 阳性血清对照的效价与原测定的效价不能超出一个滴度。(2倍稀释)(如需要, 应重新校正)。

6. 在判定试验血清样品结果前, 首先判定血清样品的对照孔, 对照孔细胞正常, 则记录(—), 如果对照孔细胞出现病变形态(如皱缩、变圆)则记录“T”, 表示细胞毒性作用。

7. 在加有病毒的血清样品孔内, 出现CPE的记为(+), 未出现CPE的记为(—)

注: 血清滴度以加入工作抗原之前的血清稀释度为准

8. 筛选血清的结果判定

①当加有工作抗原的所有孔中出现CPE时则报告此样品为伪狂犬病毒抗体阴性。

②当血液样品有一孔或多于一孔未出现CPE时, 则报告此样品为伪狂犬病毒抗体阳性。

③此判定方法适合于要求伪狂犬病毒抗体阴性的检验。

注: A. 如果试验血清在1:2稀释时有毒性作用, 则报告1:2产生毒性作用, 请重新送样。

B. 如要求作进一步稀释, 试验血清在1:2产生毒性作用而没有CPE出现或仅有一孔CPE出现在1:4稀释, 则报为阳性结果”。

C. 如果试验样品出现污染, 需重新试验以确定污染不是来自于血液。

9. 筛选未稀释血清试验的结果判定

①如果被检血清有一孔或两孔无CPE出现, 则报告未稀释血清伪狂犬病毒抗体阳

性。

②被检血清如有CPE出现，则报告“未稀释血清伪狂犬病毒抗体阴性”

③如被检血清出现毒性作用，则报告“未稀释血清毒性作用”，请重新送样。

10. 求滴度。

当血清样品需要终点滴度时，其50%的终点可按下列方法判定。

①如果细胞病变（CPE）出现于某一血清稀释度两孔中的一孔，则此稀释度为该血清50%的终点。

②如果在某一血清稀释度的两孔中都未出现CPE而下一个稀释度的两孔都出现CPE，50%的终点判为两个稀释度之间。

③如果在相连的两个稀释度中均只有一孔出现CPE时，习惯上把此现象认为前一个滴度的CPE孔能够传到下一个滴度，则50%终点在两个稀释度之间。

④在双份同样血清比较时，如恢复期的血清滴度比急性期至少高于四倍时才认为血清阳转。

⑤有毒性作用的血清结果判定，参照筛选血清结果判定部分的“注”。

赵祥平 译

林建辉 校

## 测定猪血清中抗伪狂犬病 病毒抗体的酶联免疫吸附试验

### 一、试验试剂的准备

#### 1. 猪伪狂犬（PrV）抗原和细胞对照抗原

（1）在490cm<sup>2</sup>的旋转培养瓶中准备至少20瓶非洲绿猴肾细胞（Vero）系，并使其成长完全单层（通常需2—3天）。

（2）弃营养液，并用PBS冲洗细胞面。

（3）其中10瓶细胞每瓶接种10ml由PBS作1：10稀释的PrV病毒（毒价为10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml）；另10瓶细胞每瓶加10mlPBS作对照。

（4）将所有细胞置转速为1转/分（ICPM）的旋转培养箱中，37℃培养1小时以上。

（5）弃接种液，每瓶加25ml无犊牛血清的维持液[MEM+双抗（青霉素200U/ml和链霉素（200μg/ml）+1%非必需氨基酸）。

（6）在37℃的1CPm的转速培养过夜。

（7）在接种PrV的细胞瓶中出现80—90% CPE时，将所有瓶放于-70℃冻结。

（8）取出细胞瓶，并使PrV感染细胞瓶和细胞对照瓶分别在室温下解冻，猛力摇晃，使瓶内细胞脱壁。

（9）分别收集感染细胞培养物和对照细胞培养物。

（10）在4℃，3000RPM（1800×g）下分别离心两种收集液30分钟，

(11) 用AMICON超滤器15倍浓缩离心后的上清液, 滤膜能滞留大于50000道尔顿的分子。

(12) 用10ml步骤(11)得到的浓缩后的上清液重新悬浮步骤(10)得到的细胞沉淀物, 然后用超声波裂解器以3个裂解量处理细胞沉淀物悬液30秒钟。

(13) 分别将超声波裂解后的材料与相应的经步骤(11)浓缩的PrV及细胞对照悬液混合。

(14) 加等量溶解性缓冲液至第(13)步的悬液, 4°C下搅拌24小时。

(15) 4°C, 27000 r.p.m离心2小时。

(16) 离心后可看到三个层次: a. 顶层为脂蛋白层; b. 明亮的中层为含有病毒糖蛋白抗原或细胞对照抗原; c. 底层为细胞碎片。弃上下层, 收集中层。

(17) 用0.45μ的微孔滤器除菌的碳酸盐缓冲液, 稀释中层至10ml, 再用紫外光电比色计测出总蛋白含量(PrV抗原15.3mg/ml, 对照抗原16.0mg/ml)。

(18) PrV抗原和细胞对照抗原分别以5ml分装, 并注明批号, 抗原类型和日期, 贮于-70°C。

(19) 抗原在用于试验前, 需测定其工作性能, 确定其最佳工作浓度(方法见第四部分)。

(20) 为防止外来疾病的传播, 抗原在离开高度安全系数的实验室前, 需将分装后的抗原置于一合适容器, 4°C下用r射线照射(6.0mrad)

(21) 经r射线照射后的抗原, 在装动至其它实验室前, 必须进行定性和确定最佳的工作浓度(方法见第四部分)。上述提纯病毒的方法是Snyder和Erickson法的改良方法。

## 2. 溶解性缓冲液(Tris/甘氨酸/TritonX-100)

Tris-base            0.61g/L            蒸馏水(0.005M)

甘氨酸              0.75g/L            蒸馏水(0.01M)

Triton X-100    1.0ml/100ml       蒸馏水(1.0%)

用5N NaOH调PH至8.9, 4°C保存不得超过一周。

## 3. 抗原稀释缓冲液(碳酸盐缓冲液0.06M, PH9.6)

NaHCO<sub>3</sub>            3.8g

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>           1.93g

蒸馏水            1000ml

用5N NaOH调PH值至9.6, 4°C保存不超过一周, 用前检测PH值。

## 4. 磷酸盐缓冲液(PBS) PH7.2

NaCl                8.5g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>          0.315g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>          1.1g

蒸馏水            1000ml

调PH至7.2, 保存时间为一周。

## 5. PBS-吐温缓冲液(PBST, 0.01M, PH7.2)

PBS 1000ml

吐温—20 0.5ml

6. 底物溶液配制：按每一平板所需量配。

(1) 柠檬酸缓冲液。(0.05M PH5.0)

柠檬酸 0.96g

蒸馏水 100ml

用5N NaOH调PH至5.0, 4°C保存。每一平板需20ml

(2) ABTS (40mM)

(2—2吡嗪—22—3—乙基苯噻唑—6—磺酸) 0.2195g

蒸馏水 10ml

4°C密封保存。每板需0.5ml。

(3) 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液。每板需0.3ml。

注：用前先将各试剂预至室温，仅在用前才加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

7. 兔抗猪IgG—辣根过氧化物酶标记抗体原液：

(1) 用蒸馏水恢复酶标记抗体至规定毫升数。

(2) 再用经过滤除菌的PBS将其稀释至1:10。

(3) 分装，-20°C或-70°C保存。

(4) 用前稀释酶标记抗体至预先确定的工作浓度(用PBST稀释)，并使其预至室温。

## 二、酶标记抗体最佳工作浓度的确定：

为了弄清商品辣根过氧化物酶标记的兔抗猪IgG(重链+轻链)抗体的免疫学灵敏度，用固相猪免疫球蛋白的一系列浓度来滴定是必要的，其具体步骤如下：

1. 用碳酸盐缓冲液2倍递进稀释猪免疫球蛋白，使蛋白浓度从1000ng/ml至62.5ng/ml。

2. 按图表一所示，每孔加100μl上述各浓度猪免疫球蛋白液。

3. 封板，置室温吸附过夜(25°C)

4. 用PBST2倍递进稀释酶标记抗体，使其浓度从1:500到1:4000

5. 用PBST洗滴定板4次

6. 按图表一所示，每孔加100μl各浓度的酶标记抗体稀释液

7. 封板，室温感作1小时

8. 在感作期间，准备ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>底物溶液。

9. 用PBS(不是PBST)冲洗滴定板四次。

10. 随即加底物溶液100ml至每孔，平置振荡器上振荡20分钟。在加底物的同时，用另一空白微量板加100μl底物作空白读数。

11. 将滴定板置于单波长吸收光谱读数仪上进行读数，波长为414nm。

12. 在坐标系中标出每一浓度的酶标记抗体的OD值，酶标记抗体的最佳工作浓度即为与包被的100μl含500μg/ml猪免疫球蛋白在标准条件下作用，所得OD值为0.5时的稀释度。(见图表一)

|                                         |   | 1    | 2   | 3   | 4   | 5    | 6    | 7    | 8   | 9   | 10  | 11   | 12  |
|-----------------------------------------|---|------|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|-----|------|-----|
| 酶1:500<br>标1:1000<br>记1:2000<br>抗1:4000 | A | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62.5 | PBsT |      |     |     |     |      |     |
|                                         | B |      |     |     |     |      |      |      |     |     |     |      |     |
|                                         | C |      |     |     |     |      |      |      |     |     |     |      |     |
|                                         | D |      |     |     |     |      |      |      |     |     |     |      |     |
|                                         | E |      |     |     |     |      |      | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62.5 | PBT |
|                                         | F |      |     |     |     |      |      |      |     |     |     |      |     |
|                                         | G |      |     |     |     |      |      |      |     |     |     |      |     |
|                                         | H |      |     |     |     |      |      |      |     |     |     |      |     |
| 猪IgGng/ml                               |   |      |     |     |     |      |      |      |     |     |     |      |     |

图表一兔抗猪IgG-辣根过氧化酶标记抗体工作浓度的确定

### 三、确定PrV抗原和细胞对照抗原的最佳工作浓度:

PrV和细胞对照两种抗原最佳工作浓度的确定,是依据一些参照血清以方阵滴定来确定的,这些血清必须反映出各种感染状态下样品的各种PrV活性。本研究所使用的质量控制血清由三种血清组成: P50,来自一无病原及中和试验阴性猪的阴性血清; P21,弱阳性血清,来源于一实验感染PrV,中和试验滴度为1:4的猪; P34,强阳性血清,来源于另一实验感染PrV,中和试验滴度为1:64的猪。抗原工作浓度确定的具体步骤如下:

1. 用碳酸盐缓冲液将PrV抗原和细胞对照抗原作4组5倍递进稀释,使其浓度为20 $\mu$ g/ml到0.16 $\mu$ g/ml
2. 按图表2每孔加100 $\mu$ l上述各稀释度的抗原稀释液。
3. 封板,室温感作过夜。
4. 准备5组4倍递进稀释的各质量控制血清,稀释液为PBST,起始浓度为1:40
5. 用PBST洗板四次。
6. 按图表二每孔加100 $\mu$ l相应的血清。
7. 封板,室温感作3小时
8. 在感作时,准备酶标记抗体至确定的工作浓度,稀释液为PBST。
9. 用PBST洗板四次
10. 加酶标记抗体至所有板孔
11. 封板,室温感作1小时
12. 在感作时,准备ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>底物溶液,加液前预至室温。
13. 用PBS洗板四次。
14. 随即加底物,每孔加100 $\mu$ l,置振荡器上振荡20分钟,同时在另一板的第一行加100 $\mu$ l底物,作读数仪的空白读数。

15. 用单波长吸收光谱平板读数仪上以414nm的波长进行读数。

16. 获得正确的OD值并将平均OD值在半对数座标纸中绘出来。OD值在纵座标上表示, 抗原浓度以对数形式在横座标上表示。选择PrV抗原的工作浓度是依据对三种参照血清在最大敏感性和最小非特异性时抗原的最高稀释度来确定的。(见图表二)

血清稀释度 1 : 40 160 640 2560 10240 40960

| 释<br>原<br>抗 | 1 : 40 160 640 2560 10240 40960 |        |   |   |   |   | 1 : 40 160 640 2560 10240 40960 |         |   |    |    |    |
|-------------|---------------------------------|--------|---|---|---|---|---------------------------------|---------|---|----|----|----|
|             | 1                               | 2      | 3 | 4 | 5 | 6 | 7                               | 8       | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A           | 20                              |        |   |   |   |   | 20                              |         |   |    |    |    |
| B           | 4                               | 细胞对照抗原 |   |   |   |   | 4                               | PRV 抗原  |   |    |    |    |
| C           | 0.8                             |        |   |   |   |   | 0.8                             |         |   |    |    |    |
| D           | 0.16                            |        |   |   |   |   | 0.16                            |         |   |    |    |    |
| E           | 20                              |        |   |   |   |   | 20                              |         |   |    |    |    |
| F           | 4                               | PRV 抗原 |   |   |   |   | 4                               | 细胞对照 抗原 |   |    |    |    |
| G           | 0.8                             |        |   |   |   |   | 0.8                             |         |   |    |    |    |
| H           | 0.16                            |        |   |   |   |   | 0.16                            |         |   |    |    |    |

图表二 抗原工作浓度的确定

#### 四、本试验操作步骤

通过间接酶联免疫吸附试验筛选方法可以测定大批量血清样本中抗PrV 抗体的存在, 也可以通过滴定作定量试验。样本血清最好不灭活。

##### 1. 筛选血清的酶联免疫吸附试验。

猪血清样本中PrV抗体的存在表明先前感染过PrV。特异的抗 PrV 抗体通常在感染后 7—10天出现并可持续很长时间。虽然被感染的猪能够康复, 但可被认为成为携带者。筛选试验用血清只用 1 : 40的稀释度。这个稀释度既能适合阴性对照血清 (P50) 产生最低限反应, 又能测出弱阳性对照血清 (P21)。当筛选大批血清时, 为了控制好质量, 每一滴定板均应有三个对照血清。具体方法如下:

①按照已确定的PrV和细胞对照抗原工作浓度用碳酸盐缓冲液进行稀释。

②按图表三每孔加100μl工作浓度的抗原。

③封板, 室温过夜。

④用PBST按 1 : 40稀释被检血清和三个对照血清。

⑤用PBST冲洗滴定板 4次

⑥按表三每孔加入100μl相应的血清, 以对角形式共作二组。

⑦封板, 室温感作三小时。

⑧感作时, 用PBST按已确定的标记抗体工作浓度稀释标记抗体。

⑨用PBST冲洗滴定板 4次

⑩每孔加100μl工作浓度的酶标记抗体。

| 阴性细胞对照抗原 |             |        |   |    |    |    | 阳性PRV抗原 |        |   |    |    |    |
|----------|-------------|--------|---|----|----|----|---------|--------|---|----|----|----|
|          | 1           | 2      | 3 | 4  | 5  | 6  | 7       | 8      | 9 | 10 | 11 | 12 |
|          | QC          |        |   |    |    |    | QC      |        |   |    |    |    |
| A        | PBS         | 被检血清 1 | 5 | 9  | 13 | 17 | PBS     | 被检血清 1 | 5 | 9  | 13 | 17 |
| B        | P50<br>1:40 | 2      | 6 | 10 | 14 | 18 | P50     | 2      | 6 | 10 | 14 | 18 |
| C        | P21<br>1:40 | 4      | 7 | 11 | 15 | 19 | P21     | 3      | 7 | 11 | 15 | 19 |
| D        | P34<br>1:40 | 3      | 8 | 12 | 16 | 20 | P34     | 4      | 8 | 12 | 16 | 20 |
| E        | PBS         | 被检血清 1 | 5 | 9  | 13 | 17 | PBS     | 被检血清 1 | 5 | 9  | 13 | 17 |
| F        | P50         | 2      | 6 | 10 | 14 | 18 | P50     | 2      | 6 | 10 | 14 | 18 |
| G        | P21         | 3      | 7 | 11 | 15 | 19 | P21     | 3      | 7 | 11 | 15 | 15 |
| H        | P34         | 4      | 8 | 12 | 16 | 20 | P34     | 4      | 8 | 12 | 16 | 20 |

阳性PRV抗原

阴性细胞对照抗原

图表三 本试验之一筛选试验

- ⑪封板，室温感作1小时。
  - ⑫在感作时，按底物溶液配方备好ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，使其预至室温。
  - ⑬用PBS（不是PBST）冲洗滴定板4次
  - ⑭随即加入100μl底物至各孔，并放于振荡器上准确地振荡20分钟。同时，加入100μl底物至另一空白板第一行的各孔，作空白读数。
  - ⑮在414nm单波长吸收光谱下，用读数仪读数。
  - ⑯将获得的OD值列表显示，按照判定标准报告结果。
2. 猪血清终点滴度的测定
- ①和筛选步骤1—3相同。
  - ②从1:40开始用PBST对被检血清进行4倍连续稀释。
  - ③用PBST冲洗滴定板4次
  - ④根据图表4每孔加100μl相应的稀释血清
  - ⑤和筛选试验7—15相同。
  - ⑥获得正确的OD值，通过和已知阴性血清OD值的比较，确定被检血清的ELISA滴度，我们用给以相等或小于P50在1:40稀释度时得到的OD值的那一血清稀释度表示酶联免疫吸附试验滴度。

## 五、计算机联接和软件的数据处理

在基础语音中已设计出了处理读数仪获得的原始数据的常用计算机程序。我们编制的程序适合于以对角模式每个待检血清做两孔，在同一板上有PrV和CC抗原的ELISA试验。此程序将计算OD平均值，且能通过PrV抗原所得OD值减去CC抗原OD值来校正所得OD平均值，以保证每对样品有一个标准的偏差和百分率的不同。

阴性细胞对照抗原

阳性PRV抗原

|   | 1           | 2               | 3          | 4  | 5  | 6  | 7   | 8               | 9  | 10 | 11 | 12 |
|---|-------------|-----------------|------------|----|----|----|-----|-----------------|----|----|----|----|
| A | PBS         | 被检血清<br>1:40 #1 | #2<br>1:40 | #3 | #4 | #5 | PBS | 被检血清<br>1:40 #1 | #2 | #3 | #4 | #5 |
| B | P50<br>1:40 | 1:160           | 1:160      |    |    |    | P50 | 1:160           |    |    |    |    |
| C | P21<br>1:40 | 1:640           | 1:640      |    |    |    | P21 | 1:640           |    |    |    |    |
| D | P34<br>1:40 | 1:2560          | 1:2560     |    |    |    | P34 | 1:2560          |    |    |    |    |
| E | PBS         | 被检血清<br>1:40 #1 | #2<br>1:40 | #3 | #4 | #5 | PBS | 被检血清<br>1:40 #1 | #2 | #3 | #4 | #5 |
| F | P50         | 1:160           | 1:160      |    |    |    | P50 | 1:160           |    |    |    |    |
| G | P21         | 1:640           | 1:640      |    |    |    | P21 | 1:640           |    |    |    |    |
| H | P34         | 1:2560          | 1:2560     |    |    |    | P34 | 1:2560          |    |    |    |    |

阳性PRV抗原

阴性细胞对照抗原

图表四 本试验之二终点滴度的测定

李超美 译

林建辉 校

# 附：伪狂犬病毒抗体检验盒

(供筛选用)

## 一、试剂：

1. 包被了猪伪狂犬病病毒 (PRV) 的微孔板。
2. 抗猪辣根过氧化物连接物，被保存在含有稳定蛋白质的Tris缓冲液中。用噻汞撒和庆大霉素作防腐。
3. 强阳性对照：猪抗PRV保存于含有稳定蛋白质的PB液中，用叠氮钠作防腐。
4. 弱阳性对照：猪抗PRV保存于含有稳定蛋白质的PB液中，用叠氮钠作防腐。
5. 阴性对照：对PRV不起反应的猪血清，保存于含有稳定蛋白质的PB液中，用叠氮钠作防腐。
6. 样品稀释液，含稳定蛋白质的PB液，用叠氮钠作防腐。
7. ABTS浓缩物，用庆大霉素防腐。
8. ABTS稀释液，含过氧化氢的柠檬酸盐——PB溶液，用庆大霉素作防腐。
9. 洗液：10倍浓缩PB溶液，用庆大霉素作防腐。

## 二、必需材料但不配备

1. 0.12%氢氟酸 (HF)：用蒸馏水/去离子水把1ml浓缩的HF (48%) 稀释