

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 549—2002

赤羽病细胞微量中和试验方法

Cells microneutralization test for akabane disease

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

赤羽病(akabane disease,又名阿卡斑病)是由赤羽病病毒(akabane disease virus)引起的牛、绵羊和山羊的一种多型性传染病。该病以流产、早产、死胎、畸形产为特征,能引起先天性关节弯曲和积水性无脑症。

本病的病原是赤羽病病毒,属布尼病毒科布尼病毒属,病毒表面有两种糖蛋白(G1和G),它们分别诱导中和抗体和血凝抑制抗体产生。本病的血清学诊断方法为细胞微量中和试验。

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:农业部动物检疫所。

本标准主要起草人:周立桥、李昌琳、封启民、李其平。

赤羽病细胞微量中和试验方法

1 范围

本标准规定了赤羽病(akabane disease)细胞微量中和试验技术要求。
本标准适用于牛、羊赤羽病感染的定性以及免疫群体抗体水平的评估。

2 材料准备

- 2.1 96孔细胞培养物,移液器(50 μ L、200 μ L)滴头,无毒透明塑料胶带,小试管。
- 2.2 Vero 细胞或 SVP 细胞。
- 2.3 抗原、标准阳性血清、标准阴性血清。
- 2.4 被检血清,无菌采集,不加防腐剂。

3 操作方法

3.1 准备

- 3.1.1 取一支已知滴度的赤羽病病毒(AKV),用199细胞培养液稀释成100TCID₅₀/50 μ L,作为工作浓度抗原。
- 3.1.2 被检血清、标准阳性血清、标准阴性血清均56℃灭活30 min,用199液做1:4稀释(即50 μ L血清加入150 μ L 199液中)。
- 3.1.3 按常规微量中和试验法每个样品接种4孔,每孔分别加被检稀释血清和工作浓度抗原各50 μ L,轻轻振荡培养板使抗原与稀释血清充分混合,将培养板加盖置37℃培养箱内中和1 h。
- 3.1.4 每孔滴加SVP细胞或Vero细胞悬液(20万/mL)100 μ L,用透明塑料胶带封板,置37℃温箱内培养,用倒置显微镜观察细胞病变情况(通常72 h内引起细胞病变)。

3.2 对照设置

每次试验均要设置标准阳性、阴性血清对照、病毒对照、正常细胞对照和抗原实际用量的回归滴度对照。

- 3.2.1 标准阳性、阴性血清对照,将已稀释好的标准阳性、阴性血清分别加入培养板4孔内,每孔50 μ L,然后各孔加入工作浓度抗原50 μ L。
- 3.2.2 病毒对照:将工作浓度抗原滴加培养板4孔内,每孔50 μ L,补加细胞生长液50 μ L。
- 3.2.3 将以上三种对照置37℃温箱内1 h,然后于各孔内加入100 μ L细胞悬液,置37℃温箱内培养,72 h后在倒置显微镜下观察结果。
- 3.2.4 正常细胞对照:于培养板4孔内各加100 μ L细胞悬液,然后再于各孔补加细胞生长液100 μ L。
- 3.2.5 抗原实际用量的回归滴度的测定:在每次试验中,应对使用的100TCID₅₀/50 μ L抗原进行实际用量的测定,将工作浓度抗原作10倍递增稀释到10⁻³,每个稀释度接种4孔,每孔50 μ L,立即补加细胞生长液50 μ L,置37℃温箱内1 h,然后每孔加入100 μ L细胞悬液,计算该试验中TCID₅₀/50 μ L的实际用量。

4 结果判定

- 4.1 将培养板放置37℃温箱内培养72 h进行初判,120 h进行终判。在倒置显微镜下检查细胞病变

(CPE)。当病毒抗原对照、标准阴性血清加抗原对照均出现细胞病变,标准阳性血清加抗原对照,无细胞病变,被检血清对细胞无毒性,正常细胞对照亦正常,病毒抗原实际用量在 $30\text{TCID}_{50}/50\ \mu\text{L}\sim 300\text{TCID}_{50}/50\ \mu\text{L}$ 范围内方能判定结果,否则被认为无效。

4.2 判定标准:定性试验判读标准是被检血清在 1:4 及 1:4 以上稀释度能使 50%及 50%以上的细胞孔不出现病变者判为阳性。抗体效价滴定的判读标准是以被检血清的最高稀释 50%及 50%以上的细胞孔不出现病变为该被检血清的中和效价。
