

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 568—2002

肠病毒性脑脊髓炎诊断技术

Diagnostic techniques for enterovirus encephalomyelitis

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本病属于细小核糖核酸病毒科的肠道病毒属肠道病毒 I 型(简称 PEV)。病毒主要感染动物的中枢神经系统并繁殖,使运动神经节细胞变性,导致非化脓性脑脊髓炎。此病多见于哺乳仔猪和断奶仔猪,成年猪多为隐性感染,引起发烧、厌食、共济失调、四肢麻痹和痉挛,该病的发病率和死亡率都很高,造成严重的经济损失。

肠病毒性脑脊髓炎(Enterovirus encephalomyelitis),曾称做捷申/塔尔凡氏病(Teshen/Talfan disease),是猪的一种严重病毒性传染病,被世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health (英),Office International des Epizootic(法),OIE]和我国农业部分别列为 B 类和二类动物疫病。

本标准是依据 OIE《诊断试验和疫苗标准手册》(2000 年版)(Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines,2000)第 2.6.3 章规定的主要技术制定的。两者的主要差异是:

——本标准根据本国和国外实践经验规定了使用主要致病原 PEV-1 型病毒作为抗原,未采用 2-13 型 PEV,未采用酶联免疫吸附(ELISA)技术;

——本标准根据本国实践经验将操作程序更加具体化。

本标准附录 A、附录 B 是规范性附录。

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:农业部动物检疫所。

本标准主要起草人:封启民、李昌琳。

肠病毒性脑脊髓炎诊断技术

1 范围

本标准规定了(猪)肠病毒性脑脊髓炎诊断技术要求。

本标准适用于(猪)肠病毒性脑脊髓炎的病原鉴定及流行病学检查,进出口检疫和免疫抗体的检测。

2 临床症状检查

临床上分为四个型,即急性型、亚急性型、慢性型和温和型,此外还有无症状仅检出抗体的隐性感染,根据临床症状和病理变化(见第3章)可作出怀疑性诊断。

该病潜伏期为2 d~28 d。

2.1 急性型

病猪首先出现体温升高,多在40.0℃~41.1℃左右或更高,病猪表现为厌食、倦怠、呕吐、严重鼻炎、腹泻及行动失调。发病1 d~2 d后,体温降至正常,出现中枢神经系统症状,如寒战、感觉过敏、抽搐、共济失调、四肢僵直(特别是后肢)、角弓反张和昏迷,接着发生麻痹,病猪呈犬坐姿或于一侧卧地,前肢作划水样,受声响或触摸刺激时,可引起四肢不协调运动,或角弓反张,也可见面部麻痹和失音。病猪发生便秘。传染性脑脊髓炎的病程发展迅猛,瘫痪出现后的2 d~3 d,就有80%~95%的病猪可因呼吸中枢麻痹而死亡,有些病猪死于吸入性肺炎,有些病例急性期之后食欲有所恢复,但见消瘦并伴有麻痹症状。

2.2 亚急性型

病程为6 d~8 d,症状与急性型相似,但较轻缓,死亡较少。

2.3 慢性型

多发于成年猪,病程为几周到几个月,特征为沉郁、行动困难,尾部麻痹、前肢瘫痪,其中有20%的病猪因肺炎、褥疮、败血症等原因死亡。

2.4 温和型

毒力较低的毒株引起,症状较轻,发病率和死亡率较低,主要侵害仔猪。病初体温升高,运动失调。这些症状大多在几天内消失,但有些病猪则随后出现兴奋、发抖、平衡失调、运动失调,最后麻痹等症状。

3 组织病理学检查

组织学诊断采集的样品有大脑、小脑、间脑、延髓和颈腰部脊髓。这些样品用甲醛固定,制成切片,用常规组织学方法染色,显微镜检查可发现血管周围非化脓性淋巴细胞浸润,浸润现象限于灰质部,偶尔波及白质部。间脑和小脑有明显的变化;大脑半球较轻,病的后期神经元细胞变性,并被胶质结缔组织细胞代替;常见非化脓性脑脊髓炎,特别是在小脑部分。

4 病毒分离及鉴定

4.1 材料准备

4.1.1 病料的采集

将发病期的猪扑杀,用无菌操作法取脑和脊髓样品,放在pH7.2的磷酸甘油缓冲液(PBS)中(PBS

和甘油等量混合),配方见附录 A。

4.1.2 细胞

PK₁₅或 IBRS₂猪肾细胞,至生长良好的单层细胞。

4.1.3 细胞培养液

配方见附录 B。

4.2 病料的处理

4.2.1 处理

4.2.1.1 将组织块切碎,在研钵中,用 PBS 制成质量浓度为 10%的组织悬液, -70℃冻融两次。

4.2.1.2 以 5 000 r/min 离心 30 min。

4.2.1.3 取上清,以 1:1 的比例加三氯甲烷,充分震荡,混合 1 h,置于 4℃ 14 h~16 h。再以同样速度离心 30 min,从水相底部取出病毒接种液。

4.2.1.4 每毫升加入 1 000 IU 青霉素和 1 000 μg 链霉素,室温静置 1 h。

4.2.2 病毒分离操作方法

单层原代猪肾细胞或猪肾传代细胞,如 PK₁₅或 IBRS₂,最适合分离本病毒。

a) 取 10 支单层细胞培养管,做上标记,并弃去营养液。

b) 每管加 0.1 mL 可疑组织悬液,加塞后,放在旋转培养箱中培养,1 h 后,弃去接种物,每管用 PBS 液洗涤 3 次。

c) 最后每管加 1 mL 不含犊牛血清的维持液,再把培养管放在加旋转培养箱中,37℃培养。

每天用显微镜观察细胞,如果有猪传染性脑脊髓炎病毒存在,则 3 d~4 d 可看到典型的细胞病变(CPE),其特征是出现小病灶,病灶中的细胞圆缩,有折光性。进一步培养,CPE 增多直到所有细胞脱壁。经过数代培养,病毒繁殖良好,一般在 24 h~48 h 后出现完全的 CPE,下一步就可进行病毒分离物的鉴定。

4.2.3 分离物的鉴定

4.2.3.1 病毒中和试验

从细胞培养物中收获的分离物用维持液从 10⁻¹~10⁻⁶作 10 倍连续稀释,两排孔加稀释的分离液,第一排孔加等量的 10 倍稀释的标准血清;第二排孔按同样稀释度加入等量阴性血清。混合物置 4℃ 孵育过夜,然后,接种到旋转培养管或微量板的孔中,72 h 后根据细胞病变进行判定。

判定标准:如果与阳性血清作用的分离物滴度比与阴性血清作用的滴度至少低 10³ 以上,即可判为分离物为猪传染性脑脊髓炎病毒。

4.2.3.2 间接荧光抗体试验

操作步骤:

a) 将分离物接种在布满单层猪肾细胞的盖玻片上,同时进行阴、阳性样品对照试验。

b) 12 h 后将细胞玻片(盖玻片)取出,用 PBS 冲洗 3 次,用冷丙酮固定 5 min。

c) 将细胞玻片放入湿盒内,加入已用 PBS 作 1:10 稀释的兔或猪抗猪传染性脑脊髓炎病毒高免血清。

d) 盖好湿盒,置 37℃ 孵育 60 min。

e) 取出细胞玻片,用 PBS 冲洗 3 次,然后加入异硫氰荧光素标记的抗兔或抗猪山羊血清(预先测好工作浓度),最后置 37℃ 孵育 30 min。

f) 细胞玻片用 PBS 冲洗 3 次,风干,用 0.1 mol/L pH8.6 的磷酸甘油缓冲液封片。

细胞玻片经处理后,用荧光显微镜检查,首先观察对照片,确定特异性荧光,荧光为苹果绿色,并位于细胞浆中和细胞核外周。

5 微量血清中和试验

5.1 材料准备

5.1.1 器材:灭菌的 96 孔细胞培养板, 50 μL 、100 μL 、300 μL 微量移液器, 灭菌的塑料滴头、无毒透明胶带, 灭菌塑料锥形具塞离心管, 倒置显微镜。

5.1.2 病毒抗原, 标准阳性血清, 标准阴性血清。

5.1.3 PK₁₅ 或 IBRS₂ 细胞。

5.1.4 细胞培养液: 配方见附录 B。

5.2 操作方法

5.2.1 血清 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中灭活 30 min。

5.2.2 用细胞培养液将待检血清在 96 孔微量细胞培养板中从 1:2 开始作 2 倍系列稀释至 1:256, 每个稀释度加 4 孔, 同时设立阳性血清和阴性血清对照, 每孔各加 50 μL 。

5.2.3 用细胞培养液预先将原种病毒稀释成含 100 TCID₅₀/50 μL 工作液, 每孔加 50 μL , 震荡均匀。

5.2.4 将微量板加盖后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳(CO₂) 培养箱中和 1 h~1.5 h。

5.2.5 病毒回归滴定, 即将病毒工作液用稀释液作 4 个 10 倍系列稀释(10⁻¹~10⁻⁴), 每个稀释度作 4 孔, 每孔加 50 μL , 另加稀释液。

5.2.6 每孔加 100 μL 细胞悬液(细胞数约为 5 \times 10⁵/ μL)。

5.2.7 同时设立阳性血清对照: 1:4 稀释血清 50 μL +50 μL 病毒工作液+100 μL 细胞悬液。阴性血清对照: 1:4 稀释血清 50 μL +50 μL 病毒工作液+100 μL 细胞。正常细胞对照: 细胞悬液 100 μL +细胞培养液 100 μL 悬液。

5.2.8 将微量板震荡摇匀后密封, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳(CO₂) 温箱培养 2 d~7 d。

5.3 结果判定

用倒置显微镜检查微量板孔中的特异性细胞病变(CPE), 48 h~72 h 就可以判定结果, 当病毒回归滴度结果确定在 30TCLD₅₀~300TCLD₅₀ 之间; 阳性血清对照孔不出现病变, 阴性血清对照孔出现细胞病变; 不加病毒的细胞孔正常, 方可判读结果。

判定结果: 当被检血清中和病毒的稀释度在 1:8 或更高, 则判为阳性。

附 录 A
(规范性附录)

0.01 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	8.7 g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.89 g
氯化钠(NaCl)	22.8 g
加蒸馏水至 3 000 mL。	

附 录 B
(规范性附录)

细胞培养液的配制

以总量 100 mL 计:

MEM	90 mL
犊牛血清	10 mL
谷氨酰胺	0.3 mg/mL
青霉素	200 IU/mL
链霉素	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

用 5.6%碳酸氢钠(NaHCO_3)调 pH7.0~7.2。
