

## 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1188—2006

---

### 水泡性口炎诊断技术

Diagnosis techniques for vesicular stomatitis

2006-07-10 发布

2006-10-01 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

水泡性口炎(VS)是由弹状病毒科的水泡性口炎病毒(VSV)引起的马、牛和猪的一种水泡性疾病,被世界动物卫生组织(OIE)列为 A 类动物疫病,我国将其列为二类疫病。本病临床上与口蹄疫、猪水泡病、猪水泡疹很难区别,主要表现为口唇部有水泡、溃疡、糜烂,影响采食,导致生长缓慢,影响经济效益。

OIE 采用组织细胞、鸡胚、实验动物等方法分离水泡性口炎病毒,进一步用间接夹心酶联免疫吸附试验(IS-ELISA)和补体结合试验(CF)对分离的病毒进行鉴定;在国际贸易中,OIE 指定用液相阻断酶联免疫吸附试验(LP-ELISA)、病毒中和试验(VN)和补体结合试验(CF)检测水泡性口炎血清样品。

本标准中水泡性口炎的病毒分离试验、IS-ELISA 试验和病毒中和试验,是根据 OIE《哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断实验和疫苗标准手册》(2000 版)中的诊断技术以及国内近年来在水泡性口炎方面的研究成果而制定的,其中病毒分离试验、IS-ELISA 试验和病毒中和试验均与 OIE 的标准性文件等效。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防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:李其平、龚振华、陆明哲、郑增忍、郭福生、蒋正军、王海霞。

## 水泡性口炎诊断技术

### 1 范围

本标准规定了水泡性口炎(VS)的病毒分离鉴定试验、间接夹心酶联免疫吸附试验(IS-ELISA)和病毒中和试验(VN)的技术要求。

本标准适用于水泡性口炎流行病学调查、临床诊断和实验室检测等。

### 2 病原分离与鉴定

#### 2.1 病原分离

##### 2.1.1 器材

100 mL 玻璃细胞培养瓶,恒温水浴箱,CO<sub>2</sub> 培养箱,超净工作台,倒置显微镜。

##### 2.1.2 试剂及溶液配制

MEM 营养液,PBS 缓冲液,犊牛血清,7.5%碳酸氢钠溶液,青霉素(10<sup>4</sup> TU/mL)与链霉素(10<sup>4</sup> mg/mL)溶液,3%的谷氨酰胺溶液,Hanks 液,灭菌生理盐水,0.25%胰蛋白酶溶液,缓冲甘油(pH 7.2~7.7),配制方法见附录 A。

##### 2.1.3 样品的采集

2.1.3.1 采集发病动物口鼻部位的水泡皮和水泡液,水泡皮加入含 50%甘油的 PBS 缓冲液中,水泡液置于含 2%犊牛血清和 5%葡萄糖的灭菌生理盐水中,冷藏送检。保存液的体积不能超过水泡皮或水泡液体积的 2 倍。

2.1.3.2 不能获得水泡皮和水泡液时,牛可用探杯采集食道/咽(OP)黏液,猪可采集咽喉拭子,置于无血清的细胞培养液中,冷藏送检。无血清细胞培养液的体积不能超过黏液或咽喉拭子的 2 倍。

##### 2.1.4 样品的处理

2.1.4.1 将水泡皮剪碎,研磨,悬浮于 5 倍体积的 pH 7.2、0.2 mol/L 的 PBS 缓冲液中(含青霉素 1 000 IU/mL、链霉素 1 000 mg/mL),4℃ 浸渍 16 h~20 h,以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用 0.2 μm 微孔滤膜过滤。

2.1.4.2 将水泡液、OP 液、棉拭子浸液加青霉素至 1 000 IU/mL、链霉素至 1 000 mg/mL,离心,取上清液,用 0.2 μm 微孔滤膜过滤。

##### 2.1.5 细胞接种

2.1.5.1 将 2.1.4 的样品 1 mL 接种长成单层的 VERO 细胞、BHK-21 细胞或 IB-RS-2 细胞,37℃ 吸附 1 h,中间摇动一次。

2.1.5.2 加入 9 mL 维持液,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

2.1.5.3 每天观察细胞病变效应(CPE),连续观察 3 天。

2.1.5.4 如果细胞出现圆缩、聚集、固缩、脱落等病变,则进一步按方法 2.2 进行病原鉴定。盲传 3 代无病变者按 2.1.8 处理。

##### 2.1.6 鸡胚接种

2.1.6.1 将鸡胚卵置于蛋架上,气室朝上,以碘酒、酒精棉球消毒气室,用剪刀去除气室部蛋壳。

2.1.6.2 用无菌眼科镊子撕去一小片内壳膜,在绒毛尿囊膜上滴入 2.1.4 中的样品 0.2 mL。

2.1.6.3 用无菌脱脂棉撕成薄片盖住蛋壳,用蜡封口,于 37℃ 孵育。

2.1.6.4 如果鸡胚 2 天内死亡,鸡胚周身呈明显充血、出血,尿囊膜肥厚,收获尿囊膜按 2.2 方法进行进一步鉴定。盲传 3 代无病变者按 2.1.8 处理。

#### 2.1.7 乳鼠接种

2.1.7.1 将 2.1.4 的样品颈部皮下接种 2 日~7 日龄乳鼠,每只接种 0.2 mL。

2.1.7.2 每天观察乳鼠病变,连续观察 5 天。

2.1.7.3 如果乳鼠出现死亡、生长不良等病变,则按 2.2 方法进行进一步鉴定。盲传 3 代无病变者按 2.1.8 处理。

#### 2.1.8 可疑非免疫动物样品

盲传 3 代未分离到病毒者,可进一步采集 7 d~14 d 后的该动物血清,用方法 3 进行抗体检测。若检测结果为阴性,则判为无 VSV 感染;若检测结果为阳性,则判为有 VSV 感染。

### 2.2 病原鉴定 - 间接夹心酶联免疫吸附试验 (IS - ELISA)

2.2.1 器材 40 孔带盖灭菌酶标板,单道可调(10  $\mu$ L~200  $\mu$ L)移液器,8 和 12 道可调(50  $\mu$ L~200  $\mu$ L)移液器,灭菌塑料滴头。

#### 2.2.2 试剂及溶液

2.2.2.1 试剂:抗原,豚鼠抗 VSV 的标准 NJ 型和 IND 型血清,兔抗 VSV 的标准 NJ 型和 IND 型血清,兔抗豚鼠 IgG,正常兔血清,卵白蛋白,TMB 底物。

2.2.2.2 溶液:pH 7.2、0.2 mol/L 的 PBS 缓冲液,pH 9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液,PBSTB,配制见附录 A。

### 2.3 样品

样品采集、处理与 2.1.3~2.1.4 相同。

### 2.4 操作方法

2.4.1 用 pH 9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液将兔抗 VSV 的 NJ 型阳性血清、IND 型阳性血清和正常兔血清包被 ELISA 板,每孔 50  $\mu$ L,于 4 $^{\circ}$ C 过夜。

2.4.2 弃包被液,每孔用磷酸缓冲盐水(PBS)洗 1 次,加 50  $\mu$ L 1% 的卵白蛋白(用 PBS 液稀释),在室温下封板 1 h。

2.4.3 弃封闭液,每孔用 PBSTB 冲洗 3 次。

2.4.4 将被检样品悬液或 2.1 中致病变的分离培养物 50  $\mu$ L 加到相应的孔中,每份样品均作双孔,振荡,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

2.4.5 弃反应液,每孔用 PBSTB 冲洗 5 次。

2.4.6 将与包被 ELISA 板的兔抗 VSV 标准阳性血清相应的豚鼠抗 VSV 的标准 NJ 型和 IND 型阳性血清用 PBSTB 稀释,分别加 50  $\mu$ L 到相应的孔中,振荡,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

2.4.7 重复 2.4.5。

2.4.8 将过氧化物酶兔抗豚鼠 IgG 结合物用 PBSTB 稀释,每孔加入 50  $\mu$ L,振荡,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

2.4.9 重复 2.4.5。

2.4.10 每孔加活化的 TMB 底物 50  $\mu$ L,在室温下反应 15 min,随后加入 50  $\mu$ L 1M 硫酸终止反应,用酶标仪测定吸光值。

2.4.11 设标准阳性抗原对照。

#### 2.4.12 结果判定

2.4.12.1 读取样品与抗 VSV 的 NJ 型、IND 型阳性血清和正常兔血清反应的吸光值,计算双孔平均值。

2.4.12.2 对照抗原与其相应血清反应的吸光值较其与另一型血清反应的吸光值和正常兔血清反应的吸光值大 20%，试验成立。

2.4.12.3 如果某个血清型反应的吸光值与另一血清型反应的吸光值和正常兔血清反应的吸光值相比较，其样品吸光值大于后两者 20%，则被检样品为感染该相应血清型的 VSV。

2.4.12.4 如果某个血清型反应的吸光值与另一血清型反应的吸光值和正常兔血清反应的吸光值相比较，其样品吸光值大于后两者，但不超过 20%，应重复试验，如仍不超过 20%，则为阴性。

### 3 中和试验(本方法用于检测 VSV 抗体)

#### 3.1 器材

96 孔细胞培养板,其他器材同 2.1。

#### 3.2 试剂及溶液配制

VSV 的 NJ 型、IND 型病毒,VSV 的 NJ 型、IND 型阳性血清和阴性血清,细胞培养用培养液及溶液配制与 2.1.2 相同。

#### 3.3 样品的采集和处理

无菌采集血液,常规分离血清,将待检血清样品置 56℃ 水浴灭活 30 min。

#### 3.4 操作方法

##### 3.4.1 病毒半数组织培养感染量(TCID<sub>50</sub>)的测定

3.4.1.1 将 VSV 标准毒株接种于长成单层的 IB-RS-2 细胞,接种量为培养基液的 1/10,37℃ 培养,待出现病变后,冻融,收获病毒。

3.4.1.2 用 MEM 培养液将 VSV 病毒作连续 10 倍稀释,即  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ ……每个稀释度取 50 μL 加入 96 孔细胞培养板中,随后加入经 0.25% 胰酶消化的 IB-RS-2 细胞悬液 150 μL(总细胞数约为  $3 \times 10^5$  个左右),每个稀释度作 8 个孔重复,并设正常细胞对照。置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。

3.4.1.3 逐日观察细胞病变,共观察 3 d~4 d,记录细胞病变孔数。按照 Reed - Muench 法计算病毒的 TCID<sub>50</sub>。

##### 3.4.2 中和试验

3.4.2.1 在细胞培养板各孔中加入 50 μL MEM 培养液,随后在第 1 孔中加入 1:2 稀释待检血清 50 μL 混合后,用微量移液器取出 50 μL,加到第 2 孔中,混匀后取出 50 μL 再加入第 3 孔中,依此类推,直到第 10 孔,血清稀释度即为 1:4、1:8……1:2 048,每份待检血清稀释度作 4 个孔重复。

3.4.2.2 将 50 μL 含 1 000 个 TCID<sub>50</sub> 的病毒液加到不同稀释度血清孔中,37℃ 作用 1 h。

3.4.2.3 每血清孔中加入 100 μL 经胰酶消化分散的 IB-RS-2 细胞悬液(总细胞数约为  $3 \times 10^5$  个左右)。

3.4.2.4 设立对照组。

3.4.2.4.1 病毒回归试验:每次试验每一块板上都设立病毒对照,先将 1 000 TCID<sub>50</sub>/50 mL 病毒液作 0.1、1、10、100、1 000 倍稀释,每个稀释度作 4 孔,每孔加 50 μL 病毒液,然后每孔加 150 μL IB-RS-2 细胞悬液(总细胞数约为  $3 \times 10^5$  个)。

3.4.2.4.2 阳性血清、阴性血清、待检血清和正常细胞对照。

3.4.2.5 逐日观察,记录病变和非病变孔数,共观察 3 d~4 d。病毒回归试验 1 000 TCID<sub>50</sub> 值应为 500~1 330 之间,阳性血清和阴性血清的滴度在其预先测定的平均值 2 倍以内,待检血清和正常细胞对照成立,测定结果方有效,否则该试验不能成立。

##### 3.4.3 抗体中和效价

按照 Spearman - Karber 法计算抗体中和效价。如抗体效价大于 1:40,则判为 VSV 抗体阳性。

**附 录 A**  
**(规范性附录)**  
**培养基及溶液的配制**

**A.1 细胞生长液**

MEM	按常规方法配制
犊牛血清	10%
双抗溶液	1%
谷氨酰胺	1%
丙酮酸钠	1%

用 7.5% 的碳酸氢钠调 pH 至 7.0~7.2。置 4℃ 保存。

**A.2 细胞维持液** 按常规方法配制 MEM, 在 MEM 中按体积比加入:

犊牛血清	2%
双抗溶液	1%
3% 谷氨酰胺	1%

用 7.5% 的碳酸氢钠调 pH 至 7.0~7.2。置 4℃ 保存。

**A.3 双抗(青链霉素)溶液**

青霉素	100 万 IU
链霉素	100 万 mg
双蒸水	100 mL

将双蒸水放于 500 mL 瓶中高压 103.4 kPa 20 min。青链霉素用少量双蒸水溶解后,再用双蒸水定容至 100 mL。

**A.4 7.5%的碳酸氢钠溶液**

碳酸氢钠(NaHCO <sub>3</sub> )	7.5 g
双蒸水	100 mL

先将滤器灭菌后,加入液体过滤后分装于青霉素瓶中放 4℃ 保存备用。

**A.5 3%谷氨酰胺溶液**

谷氨酰胺	3 g
双蒸水	100 mL

过滤除菌,分装于青霉素瓶中冻结保存。

**A.6 0.25%胰蛋白酶溶液**

氯化钠(NaCl)	8.0 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
柠檬酸钠(2 个结晶水)	1.0 g

磷酸二氢钠(1个结晶水)	0.05 g
葡萄糖	1.0 g
胰蛋白酶	2.5 g
0.5%酚红	4 mL
加双蒸水	1 000 mL

上述试剂依次溶解,胰酶可先用少量水 37℃ 温箱中水浴溶解至透彻清亮,倒入量筒中,用 7.5% 的碳酸氢钠调 pH 至 7.6~7.8,定容至 1 000 mL,过滤除菌,分装小瓶,置 -20℃ 冰箱保存。

#### A.7 生理盐水

氯化钠(NaCl)	8.5 g
双蒸水	1 000 mL

氯化钠融化后分装,103.4 kPa 15 min 高压,室温保存。

#### A.8 Hanks 原溶液

氯化钠(NaCl)	80 g
磷酸氢二钠(12个结晶水)	0.6 g
氯化钾(KCl)	4.0 g
磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.6 g
硫酸镁(7个结晶水)	2.0 g
葡萄糖	10.0 g
无水氯化钙(CaCl <sub>2</sub> )	1.4 g
双蒸水	1 000 mL

在配制时,应先将无水氯化钙用一小烧杯加入约 100 mL 双蒸水,置 4℃ 冰箱中溶解。等其他药品融完后,加入混匀,定容至 1 000 mL。用滤纸过滤后,加入 2 mL 氯仿,经充分混匀后,置 4℃ 冰箱中保存。

#### A.9 pH 7.2、0.2 mol/L PBS 溶液

溶液甲(A9.1)	28 mL
溶液乙(A9.2)	72 mL
氯化钠(NaCl)	0.85 g

等氯化钠溶解后,置室温保存备用。

##### A.9.1

磷酸氢二钠(12个结晶水)	71.632 g
双蒸水	1 000 mL

##### A.9.2

磷酸二氢钠(2个结晶水)	31.2 g
双蒸水	1 000 mL

#### A.10 pH 9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液

碳酸钠(Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO <sub>3</sub> )	2.93 g
迭氮钠	0.2 g
双蒸水	加至 1 000 mL

**A.11 PBSTB**

吐温 - 20	0.05%
卵白蛋白	1%
正常兔血清	2%
正常牛血清	2%
PBS 补足至	100 mL

---