



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX  
代替 GB/T 18637-2002

## 牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术

Diagnostic Techniques for Bovine Viral Diarrhea / Mucosal disease

送审稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准是依据GB/T1.1-2009规则起草。

本标准替代GB/T 18637-2002 《牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术》，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 增加了“临床诊断”方法（见4）；
- 增加了“实时荧光RT-PCR检测试验”（见5.4）；
- 增加了“BVDV抗体间接ELISA试验”（见5.5）。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会（SAC/TC 181）归口。

本标准起草单位：略。

本标准主要起草人：略

本标准的历次版本发布情况：

- GB/T 18637-2002 。

## 引 言

牛病毒性腹泻/黏膜病（Bovine Viral Diarrhea / Mucosal disease, BVD/MD, 简称BVD），是由牛病毒性腹泻/黏膜病病毒（Bovine Viral Diarrhea / Mucosal disease Virus, BVD/MDV, 简称BVDV）感染牛引起的以发热、黏膜糜烂溃疡、白细胞减少、腹泻、咳嗽及怀孕母牛流产或产出畸形胎儿为主要特征的一种传染病。BVDV在分类学上属黄病毒科（Flaviviridae），瘟病毒属（Pestivirus），是瘟病毒属的代表种，与同属的猪瘟病毒（Classical Swine Fever Virus, CSFV）及羊边界病病毒（Border Disease Virus, BDV）之间存在着结构与抗原相关性，在血清学上有交叉反应。

1946年，Olafson等在美国纽约州首先报道一种牛的疫病，其特征是消化道溃疡和下痢，称为病毒性腹泻。1953年，Ramsey和Chiver观察到了一种疾病，该病与病毒性腹泻具有相似的临床和病理综合征，并且整个消化道黏膜呈现严重糜烂和溃疡性变化，许多病牛死于出血性肠炎，命名为黏膜病。此后在美国许多州都有类似疾病发生，并且分离到了病毒。1959年，Gillespie和Baker鉴定了美国的两株病毒——纽约（New York）株和印第安纳（Indiana）株，结果证明是同一个型的病毒。1960年，Gillespie等又分离到一个Oregon C24V毒株。此毒株可在牛肾细胞上产生细胞病变，被定为标准毒，用于牛病毒性腹泻/黏膜病的血清学和病毒学研究以及实验诊断。随后在世界各地相继分离到许多病毒株。对上述所有毒株进行比较试验，结果证明：Oregon C24V毒株制备的抗血清可以中和美国和世界其他地区的各个分离株，这就充分说明黏膜病和病毒性腹泻是同一种病毒引起的。目前，该病在世界范围内广泛流行。我国于1983年首次分离到了BVDV。对牛、羊、鹿的病原学调查，表明我国牛、羊、鹿均不同程度的感染BVDV。目前，该病已严重影响着我国畜牧业的健康发展。

本标准中所描述的方法均为近几年我国在BVD临床诊断过程中常用的方法，包括临床诊断、病原的分离和鉴定、分子生物学检测技术以及血清学诊断技术，血清学诊断技术包括病毒中和试验及间接ELISA试验方法。在进行病原学诊断时优先推荐采用“实时荧光RT-PCR试验”，病毒分离和中和试验等检测方法为辅，本标准中实时荧光RT-PCR方法能够对BVDV和猪瘟病毒进行鉴别诊断，优于OIE诊断技术方法中对应标准；在进行抗体检测时优先推荐采用“BVDV抗体间接ELISA试验”，中和试验等检测方法为辅。结合我国动物防疫相关法律、法规和政策，本诊断技术标准能够成功并有效的防控和监测我国牛病毒性腹泻/黏膜病的发生和流行。

# 牛病毒性腹泻/黏膜病诊断技术

## 1 范围

本标准规定了牛病毒性腹泻/黏膜病的临床诊断和实验室诊断方法，包括临床诊断、样品的采集、保存和运输方法，病毒分离与鉴定、实时荧光RT-PCR等病原学诊断及病毒中和试验、间接ELISA试验等血清学诊断方法的适用范围与技术要求。

本标准所规定的实验技术适用于检测不同样品中牛病毒性腹泻/黏膜病病毒抗原、核酸及抗体。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 19438.1 禽流感病毒通用荧光RT-PCR检测方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB/T 27401 实验室质量控制规范动物检疫

## 3 缩略语

实时荧光RT-PCR	实时荧光反转录聚合酶链反应（Real-time reverse transcription polymerase chain reaction）
BVD/MD	牛病毒性腹泻/黏膜病（Bovine Viral Diarrhea / Mucosal disease）
BVD/MDV	牛病毒性腹泻/黏膜病病毒（Bovine Viral Diarrhea / Mucosal disease Virus）
CPE	致细胞病变效应（Cytopathic Effect）
C <sub>t</sub> （或C <sub>p</sub> ）值	每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数（Threshold Cycle, or Crossing Point）
cRNA	互补RNA（Complement RNA）
DEPC	焦碳酸二乙酯（Diethyl Pyrocarbonate）
ELISA	酶联免疫吸附试验（Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay）
FAM	羧基荧光素（Carboxyfluorescein）
FBS	胎牛血清（Fetal Bovine Serum）
FITC	异硫氰酸荧光素（Fluorescein Isothiocyanate）
HRP	辣根过氧化物酶（Horseradish Peroxidase）
MDBK	牛肾继代细胞（Madin-Darby Bovine Kidney）
MEM	最低营养需要培养基（Minimum Essential Medium）
MOI	感染复数（Multiplicity of Infection）
PBS	磷酸盐缓冲盐水（Phosphate Buffer Saline）
PBST	吐温磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffer Solution with Tween20）

RNA	核糖核酸 (Ribonucleic Acid)
RT-PCR	反转录-聚合酶链式反应 (Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction)
TCID <sub>50</sub>	组织半数感染量 (Median Tissue Culture Infective Dose)
TMB	3',3',5',5'-四甲基联苯胺 (3',3',5',5'-Tetramethylbenzidine)
Tm值	解链温度 (Melting Temperature)
VNT	病毒中和试验 (Virus Neutralisation Test)
d	天 (day)
h	小时 (hour)
min	分钟 (minute)
s	秒钟 (second)

## 4 临床诊断

### 4.1 流行病学

BVDV在牛群中的流行传播遵循一般传染性疾病的普遍流行规律，但是也有自身固有特点，即根据感染时间的不同表现为两种模式，出生后急性感染BVDV的牛表现为一过性排毒；怀孕120 d~150 d之前的胎牛先天性感染BVDV的表现为持续性排毒。

BVDV可以发生垂直传播，导致胎儿先天性感染，或者出生后的水平传播。BVDV传播给怀孕120 d~150 d的胎牛会导致流产、重新吸收、死胎、先天性缺陷等。

水平传播导致急性感染，急性感染可以通过各种途径传播，如直接的鼻唇间的接触、接触了带有病毒的污染物等。

### 4.2 临床症状

#### 4.2.1 亚临床感染

在免疫机能健全、血清阴性牛中，70%~90%的BVDV感染不表现出临床症状，即处于亚临床感染状态，多导致温和型发热、白细胞减少症和产生中和抗体，对奶牛可导致产奶量降低。

#### 4.2.2 急性感染

急性BVDV感染通常是指BVDV对非持续性感染、免疫机能健全牛感染及其引起的亚临床疾病。临床症状包括不同程度的高热、厌食、精神沉郁、白细胞减少、眼鼻分泌物增加、口腔腐蚀和溃疡、口腔脓包和出血、腹泻以及产奶量降低等，表现出临床症状后3 d~10 d死亡。

#### 4.2.3 严重急性感染

发生严重急性感染时显著特征为高发病率和高死亡率，各种年龄均有发生，表现为高热、肺炎和突然死亡，怀孕母牛发生流产。

#### 4.2.4 黏膜病

黏膜病 (MD) 是BVDV感染引起的一种最严重的临床类型，一般呈散发性。急性黏膜病主要表现为发病突然、高热、食欲减退、呼吸急促、产奶量降低、大量水样腹泻。腹泻通常以出现黏膜排泄、纤维蛋白样物质、血便和恶臭为特征。

### 4.3 病理变化

急性BVDV感染往往导致胃肠道、体被和呼吸系统的表皮损伤。严重急性感染病牛剖检时可见溃疡、出血、胃肠表面淤血、血性腹泻等病灶。

对急性黏膜病死亡牛进行剖检，可见大量坏死性溃疡和整个胃肠道的腐烂，鼻孔和呼吸道黏膜可见溃疡症状。

### 4.4 结果判定

出现4.2.2、4.2.3和4.2.4之一临床症状和4.3病理剖检变化的发病牛可判为疑似BVDV/MDV感染。

## 5 实验室诊断

### 5.1 样品的采集与处理

#### 5.1.1 总则

在进行病毒分离和分子生物学诊断时优先采集病变组织和鼻拭子等样品，在进行抗体定性或定量检测时优先采血分离血清和牛奶样品。采样过程中样本不得交叉污染，采样及样品前处理过程中须戴一次性手套。

#### 5.1.2 采样及处理工具

除采用一次性商品化无菌采样工具外，其他所有采样工具必须经  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，15 min 高压灭菌并烘干或经  $160\text{ }^{\circ}\text{C}$  干烤 2 h。

#### 5.1.3 样品采集

##### 5.1.3.1 血清

用无菌注射器直接采集血液至灭菌离心管或采用一次性采血管采集血液，分离血清，编号备用。

##### 5.1.3.2 组织样品

用无菌剪刀、镊子采集待检脏器或肌肉组织（可选取从肠黏膜刮取的物质或肾、肝、肺、淋巴结、脾、胸腺等作为待检组织样品；对流产、死胎，直接采集胎儿的组织；对怀疑为死于黏膜病的牛，可采集血块和各组织，尤其是肠道集合淋巴组织，如肠道样品已发生自溶，可采扁桃体和淋巴结），装入无菌采样袋或其他灭菌容器，编号备用。

##### 5.1.3.3 鼻拭子

对疑似为急性感染期或持续感染的牛，采集鼻分泌物拭子。取鼻拭子时将拭子深入鼻腔来回刮2~3次并旋转，取分泌物；将采样后的拭子放入盛有2.0 mL PBS（含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素）的采样管中，编号备用。

##### 5.1.3.4 精液

采集新鲜精液直接装入1.5 mL灭菌离心管中，编号备用；对于冷冻精液，在室温解冻后，使用无菌剪刀剪断精液保存管，将精液收集在1.5 mL灭菌离心管中，编号备用。

##### 5.1.3.5 牛奶

采用手工挤奶取样，待检牛每次挤奶时弃去前三把乳后，取样编号备用（必要时同群不同个体牛采集的牛奶可以混合）。

#### 5.1.4 样品贮运

样品采集后置保温箱中，加入预冷的冰袋，密封。样品的运输按照相关的运输要求包装，并以最快的方式（尽可能24 h内送达）送实验室进行检测。同时，附带送检单，并详细说明发病时间、采样时间、地点、动物种类、样品名称、数量、送检目的、疫病发生流行情况和临床症状、疫苗免疫情况等信息。

#### 5.1.5 样品处理

##### 5.1.5.1 血清

无菌采血后，将样品管放于室温，静置1 h，再于4℃冰箱放置1 h至过夜，2 000 r/min离心5~10 min，无菌吸取上层血清，编号备用；如果样品形成为凝血块，将样品冻融3次后，2 000 r/min离心5~10 min，无菌吸取上清液（如怀疑可能污染时按总体积的10%加入含10 000 U/mL青霉素和链霉素的PBS），编号备用。

##### 5.1.5.2 组织样品

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品2.0 g于研钵或组织匀浆器中充分研磨，再加10.0 mL PBS（含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素）混匀，2 000 r/min离心5 min后，取1.0 mL上清液转入无菌1.5 mL灭菌离心管中，编号备用。

##### 5.1.5.3 鼻拭子

用含1 000 U/mL青霉素和链霉素的细胞培养液【细胞培养液中按总体积的10%加入PBS（含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素）】4倍稀释后，2 000 r/min离心15 min取上清液，编号备用。

##### 5.1.5.4 精液

冻融3次（或超声波裂解处理，用于荧光RT-PCR试验的样品也可取100 μL精液加入500 μL Catrimox-14，振荡混匀），用含1 000 U/mL青霉素和链霉素的细胞培养液制备成1:10的乳剂，2 000 r/min离心15 min取上清液，编号备用。

##### 5.1.5.5 牛奶

全脂乳样品经2 000 r/min离心15 min后或置2℃~8℃过夜，取上清，脱脂乳样品无需离心处理，直接取样编号备用。

#### 5.1.6 样品存放

采集或处理好的样品在2℃~8℃条件下保存应不超过24 h；若需长期保存，须放置-70℃冰箱，冻融不超过3次。

### 5.2 病毒分离与鉴定

#### 5.2.1 仪器

##### 5.2.1.1 倒置荧光显微镜。

##### 5.2.1.2 倒置显微镜。

- 5.2.1.3 台式离心机（最高离心速度不低于 5 000 r/min）。
- 5.2.1.4 超声波裂解仪。
- 5.2.1.5 恒温培养箱。
- 5.2.1.6 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱。
- 5.2.1.7 高速台式冷冻离心机（最高离心速度不低于 12 000 r/min）。
- 5.2.1.8 涡旋混合振荡器。
- 5.2.1.9 研钵。
- 5.2.1.10 组织匀浆器。
- 5.2.1.11 冰箱（2℃~8℃、-20℃、-70℃不同规格型号）。
- 5.2.1.12 单道（或多道）微量移液器（5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、300 μL、1 000 μL 等不同规格）。
- 5.2.2 耗材
  - 5.2.2.1 1.5 mL 离心管（无核酸酶）。
  - 5.2.2.2 5 mL 采样管。
  - 5.2.2.3 25 cm<sup>2</sup>、75 cm<sup>2</sup>、175 cm<sup>2</sup> 等不同规格的细胞培养瓶。
  - 5.2.2.4 96 孔、48 孔、24 孔、6 孔等不同规格的细胞培养板。
  - 5.2.2.5 移液器吸头（无核酸酶）（5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、300 μL、1 000 μL 等不同规格）。
  - 5.2.2.6 剪刀（含弯头剪刀）。
  - 5.2.2.7 镊子（含弯头镊子）。
  - 5.2.2.8 采样专用商品化棉拭子。
  - 5.2.2.9 一次性采血管（含针头）。
  - 5.2.2.10 2 mL、15 mL、50 mL、100 mL 等不同规格离心管。
  - 5.2.2.11 5 mL、10 mL、20 mL 等不同规格注射器。
  - 5.2.2.12 标签。
- 5.2.3 试剂
  - 5.2.3.1 PBS：配方见附录 A.1.3。
  - 5.2.3.2 吐温磷酸盐缓冲液：配方见附录 A.1.4。
  - 5.2.3.3 细胞培养液与细胞维持液：配方见附录 A.2。
  - 5.2.3.4 碳酸盐缓冲液：配方见附录 A.3。



- 5.2.3.5 10 倍汉克氏液（Hanks 液）：配方见附录 A.4。
- 5.2.3.6 牛源原代细胞培养物：制备方法见附录 B。
- 5.2.3.7 BVDV 阳性参照毒株：Oregon C24V 株。
- 5.2.3.8 胎牛血清（无 BVDV 及其抗体）或马血清，-20 °C 保存。
- 5.2.3.9 中和试验对照血清：BVDV 阳性血清和阴性血清（已 56 °C 水浴灭活 30 min）。
- 5.2.3.10 病毒液：BVDV（Oregon C24V 株）接种 MDBK 细胞收获的培养物，测定 TCID<sub>50</sub> 后，分装于小管，-70 °C 保存备用。
- 5.2.3.11 细胞：犊牛原代肾细胞、睾丸细胞、鼻甲骨细胞或 MDBK 传代细胞，细胞形态良好。

## 5.2.4 试验步骤

### 5.2.4.1 制备单层细胞

按附录 B 方法，将牛睾丸细胞、牛鼻甲骨细胞、牛肾细胞或 MDBK 细胞（任择其一），制备成细胞悬液，细胞浓度为  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  个/mL，分装在 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中，每瓶分装细胞悬液 10 mL，37 °C 恒温培养箱静置培养 24~48 h，形成单层，细胞形态正常的细胞瓶备用。

### 5.2.4.2 接种细胞

每份样品接种 3 瓶细胞，另设细胞对照 2 瓶。接种前，先弃去细胞培养瓶中的培养液，加入 1 mL 已经处理好的样品，37 °C 吸附 2~3 h。然后再加 9 mL 细胞维持液（配方见附录 A.2.2）。细胞对照瓶不接种样品，弃去培养液后加 10 mL 细胞维持液。均置于 37 °C 恒温培养箱或 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 5.2.4.3 观察和记录

每天观察并记录。如对照细胞单层完好，细胞形态正常或稍有衰老，接种病料的细胞如出现 CPE，及时取出并置 -70 °C 以下冻存备用。无 CPE 的细胞瓶，于接种后 96~144 h，取出并置 -70 °C 以下冻存备用。

### 5.2.4.4 盲传

将第 1 代无 CPE 的细胞培养物冻融 3 次后混合，3 000 r/m 离心 10 min，取上清液按 5.2.4.2、5.4.2.3 接种细胞、观察、记录、收获。对盲传过程中仍无 CPE 的细胞按同样的方法继续盲传 1 代，培养结束后取出细胞瓶置 -70 °C 以下冻存备用。

### 5.2.4.5 荧光染色鉴定

5.2.4.5.1 将长成单层的牛睾丸细胞、牛鼻甲骨细胞、牛肾细胞或 MDBK 细胞（任择其一）用 PBS 液轻轻洗涤 1 次，加入 0.25% EDTA-胰酶消化液，消化分散后，用细胞培养液制备成细胞悬液，使细胞浓度为  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  个/mL，分装于 96 孔细胞板中，0.2 mL/孔，将细胞板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。

5.2.4.5.2 将 5.2.4.3 和 5.2.4.4 备用样品，冻融 3 次后混合，3 000 r/m 离心 10 min，取上清液接种于长成 80% 以上细胞单层的 96 孔细胞板中（接种前弃去培养板孔中的细胞营养液），0.1 mL/孔，每个样品接种 4 孔，同时阳性参照毒株接种 4 孔（100~300 TCID<sub>50</sub>/孔）和正常细胞对照 4 孔。

5.2.4.5.3 接种后细胞板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中吸附 2 h~3 h, 每孔补加维持液 0.1 mL, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 72~120 h (根据细胞病变程度确定培养时间)。

5.2.4.5.4 培养结束后, 弃去细胞板孔中液体, 用 PBS 轻轻洗涤一次, 吸干, 加入 80% 的冷丙酮, 0.1 mL/孔, 4 °C 固定 10~15 min。

#### 5.2.4.5.5 免疫荧光试验

5.2.4.5.5.1 弃去孔中丙酮, 室温自然晾干。每孔分别加入 FITC 标记的抗 BVDV 荧光抗体工作液 50 μL, 37 °C 孵育 1 h; 或每孔先加入牛抗 BVDV 特异性阳性血清工作液 50 μL, 37 °C 孵育 1 h 后, PBS 洗涤 3 次, 再每孔加入 FITC 标记的抗牛 IgG 荧光抗体工作液 50 μL, 37 °C 孵育 1 h。

5.2.4.5.5.2 PBS 洗涤 3 次后, 弃去孔中液体, 在倒置荧光显微镜下观察各细胞孔中的荧光情况。

#### 5.2.4.5.5.3 结果观察与记录

染色后, 应立即在蓝色激发光下观察并及时记录, 记录可分为:

- a) (-) 无荧光;
- b) (+) 荧光微弱, 细胞形态不清晰;
- c) (++) 荧光较亮, 细胞形态清晰;
- d) (+++~++++) 荧光较强, 明亮闪烁, 细胞形态清晰。

BVDV 阳性参照毒株接种孔的细胞, 胞浆应出现黄绿色荧光, 正常细胞对照孔应无荧光。

#### 5.2.4.5.6 免疫荧光抑制试验

5.2.4.5.6.1 取 5.2.4.5.4 中固定后的细胞板, 在相应的细胞孔中滴加牛抗 BVDV 的阳性血清工作液, 0.1 mL/孔, 置 37 °C 孵育 1 h 后, PBS 轻轻洗涤 3 次。

5.2.4.5.6.2 每孔分别加入 FITC 标记的抗 BVDV 荧光抗体工作液 50 μL, 37 °C 孵育 1 h。

5.2.4.5.6.3 PBS 洗涤 3 次后, 弃去孔中液体, 在倒置荧光显微镜下观察各细胞孔中的荧光情况。

5.2.4.5.6.4 结果观察与记录: 同 5.2.4.5.5.3。BVDV 阳性参照毒株接种孔和正常细胞对照孔均应无荧光。

#### 5.2.4.5.7 结果判定

5.2.4.5.7.1 当 5.2.4.5.5.3 正常细胞对照为 a), 阳性对照为 d); 5.2.4.5.6.4 正常细胞对照为 a), 阳性对照为 a) 或 b) 时, 试验结果成立。否则判为结果无效, 应重检。

5.2.4.5.7.2 当 5.2.4.5.5.3 被检样品孔结果为 c) 或 d), 5.2.4.5.6.4 被检样品孔结果为 a) 或 b) 时判定被检样品为 BVDV 阳性。当 5.2.4.5.5.3 被检样品孔结果为 b), 5.2.4.5.6.4 被检样品孔结果为 a) 时应重检, 重检结果与首次结果一样时, 判定被检样品为 BVDV 阳性。

5.2.4.5.7.3 其他情况判定分离样品为 BVDV 阴性。

### 5.3 病毒中和试验

#### 5.3.1 仪器

同 5.2.1。

### 5.3.2 耗材

同 5.2.2。

### 5.3.3 试剂

同 5.2.3。

### 5.3.4 试验步骤

#### 5.3.4.1 定量测定

5.3.4.1.1 用多道移液器于 96 孔细胞培养板中加入稀释液（无血清的 MEM），50  $\mu\text{L}$ /孔。

5.3.4.1.2 用单道移液器取 50  $\mu\text{L}$  灭活后的被检血清于细胞板的第一排孔中，每份样品加 4 孔。

5.3.4.1.3 用多道移液器（调至 50  $\mu\text{L}$ ）从第一排孔开始连续作倍比稀释，直至最后一个孔，并从最后一排的孔中弃去 50  $\mu\text{L}$  稀释液。

5.3.4.1.4 用稀释液将病毒液（Oregon C24V 株）稀释成 100 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu\text{L}$  的工作液。

5.3.4.1.5 用多道移液器从第二排孔开始每孔加病毒工作液 50  $\mu\text{L}$ ，第一排孔加 50  $\mu\text{L}$  稀释液作为被检血清毒性对照，同时设阳性血清对照、阴性血清对照和正常细胞对照各 4 孔及病毒液回归对照  $10^0 \sim 10^{-3}$  的 4 个稀释度，每个稀释度各 4 孔。

5.3.4.1.6 将细胞板置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 2 h~3 h。

5.3.4.1.7 将长成单层的牛睾丸细胞、牛鼻甲骨细胞、牛肾细胞或 MDBK 细胞（任择其一）用 PBS 液轻轻洗涤 1 次，加入 0.25% EDTA-胰酶消化液，消化分散后，用细胞培养液制备成细胞悬液（约含  $2 \times 10^5$  个细胞/mL~ $5 \times 10^5$  个细胞/mL）加入到上述各试验孔中，100  $\mu\text{L}$ /孔。

5.3.4.1.8 将细胞板置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 6 d，从第 4 d 开始观察，于第 6 d 判定各孔细胞病变情况。

#### 5.3.4.2 定性测定

5.3.4.2.1 用多道移液器于 96 孔细胞培养板中加入稀释液（无血清的 MEM），40  $\mu\text{L}$ /孔。

5.3.4.2.2 用单道移液器取 10  $\mu\text{L}$  灭活后的被检血清于细胞板与被检血清样品编号相应的孔中，每份样品加 4 孔。

5.3.4.2.3 病毒工作液配制见 5.3.4.1.4。

5.3.4.2.4 用多道移液器将病毒工作液加入到上述试验孔中，50  $\mu\text{L}$ /孔，同时设阳性血清对照、阴性血清对照和正常细胞对照各 4 孔及病毒液回归对照  $10^0 \sim 10^{-3}$  的 4 个稀释度，每个稀释度各 4 孔。

5.3.4.2.5 重复 5.3.4.1.6~5.3.4.1.8 步骤。

#### 5.3.4.3 双份血清测定

5.3.4.3.1 双份被检血清取自同一动物，间隔 21 d，血清样品按 5.1.3.1 采集和 5.1.5.1 处理。

5.3.4.3.2 试验操作方法同 5.3.4.2.1。

#### 5.3.4.4 结果判定

培养至第6 d时进行判定。当细胞对照孔内细胞单层生长良好，病毒回归对照结果在30 TCID<sub>50</sub>/50 μL~300 TCID<sub>50</sub>/50 μL范围之内，阳性血清对照孔不出现CPE，阴性血清对照孔出现CPE，证明试验成立，可进行结果判定，否则试验不成立，应重检。

##### 5.3.4.4.1 定量测定

记录每份血清各稀释度的4个孔中出现CPE的孔数，按照Reed-Muench法（见附录E）计算各血清的抗体滴度。

##### 5.3.4.4.2 定性测定

被检血清在1:5稀释时有2个或2个以上孔的细胞未出现CPE，该血清即为阳性。

##### 5.3.4.4.3 双份血清测定

当相隔21 d的第2份血清的抗体滴度高于第一份血清4倍或4倍以上时，则证明该动物正在发病过程中。

#### 5.4 实时荧光 RT-PCR 检测试验

##### 5.4.1 仪器

5.4.1.1 台式离心机（最高离心速度不低于 5 000 r/min）。

5.4.1.2 超声波裂解仪。

5.4.1.3 高速台式冷冻离心机（最高离心速度不低于 12 000 r/min）。

5.4.1.4 荧光 PCR 检测仪及配套反应管（板）。

5.4.1.5 涡旋混合振荡器。

5.4.1.6 研钵。

5.4.1.7 组织匀浆器。

5.4.1.8 冰箱（2 ℃~8 ℃、-20 ℃、-70 ℃不同规格型号）。

5.4.1.9 单道微量移液器（5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、300 μL、1 000 μL 等不同规格）。

##### 5.4.2 耗材

5.4.2.1 1.5 mL 离心管（无核酸酶）。

5.4.2.2 5 mL 采样管。

5.4.2.3 剪刀（含弯头剪刀）。

5.4.2.4 镊子（含弯头镊子）。

5.4.2.5 采样专用商品化棉拭子。

5.4.2.6 标签。

### 5.4.3 试剂

5.4.3.1 总则：除另有说明，所用试剂均为分析纯，所用液体试剂均需使用无 RNA 酶的容器进行分装。

5.4.3.2 TRIzol（2℃~25℃保存）、氯仿（2℃~8℃预冷）、异丙醇（-20℃预冷）、Catrimox-14，均为自商品化试剂。

5.4.3.3 DEPC 水：见附录 A.5。

5.4.3.4 75%乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制，-20℃预冷。

5.4.3.5 PBS（含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素）：配方见附录 A.1.5。

5.4.3.6 BVDV 荧光 RT-PCR 检测引物、探针序列，反应液配方及使用注意事项：见附录 C。

5.4.3.7 荧光 RT-PCR 试验阳性、阴性对照

——阳性对照为灭活 BVDV 的细胞培养物或 BVDV 5'-UTR 基因体外转录 cRNA 溶液。

——阴性对照为已知 BVDV 阴性的动物组织悬液或者 MDBK 传代细胞。

### 5.4.4 试验步骤

5.4.4.1 实验室的标准化设置与生物安全管理

本方法的实验室设置与管理见 GB/T 19438.1；实验室生物安全管理见 GB 19489。

5.4.4.2 样品核酸提取

5.4.4.2.1 在样本制备区进行。采取 TRIzol 裂解法提取，也可采用其他等效的 RNA 提取方法，如柱式提取法。

5.4.4.2.2 待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用  $n$  表示，取  $n$  个灭菌 1.5 mL 离心管，逐管编号。

5.4.4.2.3 每管加入 600  $\mu$ L TRIzol。

5.4.4.2.4 每管分别加入已处理的待检样品、阳性对照、阴性对照各 200  $\mu$ L，充分混匀。

5.4.4.2.5 每管加入 200  $\mu$ L 氯仿，充分颠倒混匀。于 4℃、12 000 r/min 离心 15 min。

5.4.4.2.6 新取  $n$  个灭菌的 1.5 mL 离心管，逐管编号，每管加入 500  $\mu$ L 异丙醇（-20℃预冷）。

5.4.4.2.7 吸取本标准 5.4.4.2.5 各管中的上清液 500  $\mu$ L，转移至 5.4.4.2.6 相应的管中，避免吸出中间层，颠倒混匀。

5.4.4.2.8 于 4℃、12 000 r/min 离心 15 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。

5.4.4.2.9 逐管加入 600  $\mu$ L 75%乙醇（-20℃预冷），颠倒洗涤。

5.4.4.2.10 于 4℃、12 000 r/min 离心 10 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。

5.4.4.2.11 4 000 r/min 离心 10 s, 将管壁上的残余液体甩到管底部, 用微量移液器尽量将其吸干。注意一份样本换用一个吸头, 吸头不要碰到有沉淀一面。

5.4.4.2.12 室温干燥 3 min。不宜过于干燥, 以免 RNA 不溶。

5.4.4.2.13 每管加入 25  $\mu$ L DEPC 水, 轻轻混匀, 溶解管壁上的 RNA, 2 000 r/min 离心 5 s, 获得 RNA 溶液, 冰浴保存备用 (4  $^{\circ}$ C 保存不超过 8 h, 若需长期保存须放置 -70 $^{\circ}$ C 冰箱)。

#### 5.4.4.3 扩增试剂的准备与配制

在反应混合物配制区进行。

每个检测反应体系需使用 15  $\mu$ L 荧光 RT-PCR 反应液。根据 5.4.4.2.2 中设定的 n 值, 按附录 C 中表 C.2 配制反应液, 充分混匀后分装, 每管 15  $\mu$ L。转移反应管至样本制备区。

#### 5.4.4.4 加样

在样本制备区进行。

在上述 5.4.4.3 的反应管中分别加入 5.4.4.2.13 中制备的 RNA 溶液 10  $\mu$ L, 使每管总体积达到 25  $\mu$ L, 记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后, 瞬时离心。

#### 5.4.4.5 荧光 RT-PCR 反应

在检测区进行。

将 5.4.4.4 加样后的反应管放入荧光 PCR 检测仪内, 记录反应管摆放顺序。选定 FAM 作为报告基团, BHQ1 无荧光淬灭基团。反应参数设置如下:

——第一阶段, 反转录 42  $^{\circ}$ C/30 min (或按反转录酶说明书进行设定);

——第二阶段, 预变性 94  $^{\circ}$ C/3 min;

——第三阶段, 92  $^{\circ}$ C/15 s, 45  $^{\circ}$ C/30 s, 72  $^{\circ}$ C/60 s, 5 个循环;

——第四阶段, 92  $^{\circ}$ C/10 s, 56  $^{\circ}$ C/60 s, 40 个循环, 在第三阶段每个循环的退火延伸时收集荧光。

试验结束后, 根据收集的荧光曲线和  $C_t$  (或  $C_p$ ) 值判定结果

#### 5.4.4.6 结果判定

##### 5.4.4.6.1 结果分析条件设定

阈值设定原则: 根据仪器噪声情况进行调整, 以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。

##### 5.4.4.6.2 质控标准

5.4.4.6.2.1 阴性对照无  $C_t$  (或  $C_p$ ) 值并且无扩增曲线。

5.4.4.6.2.2 阳性对照的  $C_t$  (或  $C_p$ ) 值应  $\leq 28$ , 并出现典型的扩增曲线 (见附录 D)。

5.4.4.6.2.3 如阴性和阳性对照不满足以上条件, 此次实验视为无效。

##### 5.4.4.6.3 结果描述及判定

###### 5.4.4.6.3.1 阴性

无  $C_t$  (或  $C_p$ ) 值并且无扩增曲线, 表示样品中无 BVDV。

###### 5.4.4.6.3.2 阳性

$C_t$  (或 $C_p$ ) 值 $\leq 35$ , 且出现典型的扩增曲线, 表示样品中存在BVDV核酸。

#### 5.4.4.6.3.3 有效原则

$C_t$  (或 $C_p$ ) 值 $> 35$ , 且出现典型的扩增曲线的样品建议复检。复检仍出现上述结果的, 判为阳性, 否则判为阴性。

### 5.5 BVDV 抗体间接 ELISA 试验

通过审批的商品化试剂盒均可使用, 本标准以美国IDEXX公司生产的试剂盒为例。

#### 5.5.1 仪器

5.5.1.1 台式离心机 (最高离心速度不低于 5 000 r/min)。

5.5.1.2 往复式微量振荡器。

5.5.1.3 涡旋混合振荡器。

5.5.1.4 96 孔酶标仪 (450 nm 单波长或者 450 nm 和 650 nm 双波长检测)。

5.5.1.5 洗板机 (手动、半自动或自动系统)。

5.5.1.6 恒温培养箱。

5.5.1.7 冰箱 (2 °C~8 °C、-20 °C、-70 °C不同规格型号)。

5.5.1.8 单道 (或多道) 微量移液器 (5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、300  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L 等不同规格)。

#### 5.5.2 耗材

5.5.2.1 1.5 mL 离心管。

5.5.2.2 BVDV 抗原包被板。

5.5.2.3 一次性采血管 (含针头)。

5.5.2.4 标签。

5.5.2.5 移液器配套吸头 (无菌)。

5.5.2.6 加样槽。

5.5.2.7 pH 试纸。

5.5.2.8 吸水纸。

5.5.2.9 封板膜。

#### 5.5.3 试剂 (均为商品化试剂盒中配备)

5.5.3.1 BVDV 标准阳性血清。

5.5.3.2 BVDV 阴性血清。

5.5.3.3 ELISA 样品稀释液。

5.5.3.4 HRP 标记兔抗牛 IgG 结合物。

5.5.3.5 TMB 底物。

5.5.3.6 终止液。

5.5.3.7 10 倍浓缩洗涤液。

#### 5.5.4 试验步骤

##### 5.5.4.1 洗液准备

首先将10倍浓缩的洗液置于18℃~26℃，混悬后确定析出的盐类全部溶解。将浓缩洗液用蒸馏水或去离子水作1:10稀释（估计每板需要30 mL浓缩液加入270 mL蒸馏水）。无菌条件下制备的洗涤液在2℃~8℃可保存1周。

##### 5.5.4.2 血清或血浆样品

5.5.4.2.1 取出包被板，并在操作记录表上标记样品的位置，其中阴、阳性对照各设2孔。

5.5.4.2.2 用8或12道的移液器在每孔中加入100 μL 样品稀释液。

5.5.4.2.3 在相应的2个阴性孔中各加入25 μL 阴性对照。

5.5.4.2.4 在相应的2个阳性孔中各加入25 μL 阳性对照。

5.5.4.2.5 其他各孔中均加入25 μL 的样品。每个样品必须更换吸头。以下操作按照第5.5.4.4步骤继续进行。

##### 5.5.4.3 牛奶样品

5.5.4.3.1 取出包被板，并在操作记录表上记录样品的位置，其中阴、阳性对照各设2孔。

5.5.4.3.2 只在阴性对照和阳性对照的各两个孔中加入100 μL 样品稀释液。

5.5.4.3.3 在相应的2个阴性孔中各加入25 μL 阴性对照。

5.5.4.3.4 在相应的2个阳性孔中各加入25 μL 阳性对照。

5.5.4.3.5 其他各孔中均加入未稀释100 μL 牛奶样品（乳脂层下的无脂乳）。

5.5.4.4 轻弹微量反应板或用振荡器振荡，将反应板中的溶液混匀。

5.5.4.5 在18℃~26℃孵育90 min 或者在2℃~8℃的冰箱中过夜孵育(12 h~18 h)，低温过夜的操作用于多份牛奶样品混合样品。两种操作都要将反应板封密以防液体蒸发。也可置湿盒中孵育。

5.5.4.6 吸出反应孔中的液体物质并弃入合适的废液缸中。

5.5.4.7 用近300 μL 左右的洗涤液洗涤每个板孔5次。在每一次洗涤后，甩去每个板孔中的液体，在最后一次甩掉后，在吸水材料上用力扣板，吸去剩余的液体，在加入下一个试剂前，避免孔壁变干。

5.5.4.8 每个反应孔中加入100 μL 酶标抗体，在18℃~26℃孵育30 min±2 min。

5.5.4.9 重复步骤5.5.4.6和5.5.4.7。



5.5.4.10 在每个反应孔中加入 100  $\mu$ L TMB 底物。

5.5.4.11 在 18  $^{\circ}$ C~26  $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min  $\pm$  1 min。在第一个孔加入 TMB 底物液后开始计时，按照加 TMB 底物的顺序，在每个反应孔中加入 100  $\mu$ L 的终止液终止反应。

5.5.4.12 将酶标仪在空气中调零。

5.5.4.13 在 450 nm 波长（或双波长 450 nm 和 650 nm）测定和记录样品以及对照的吸光值。

#### 5.5.4.14 计算结果

阳性对照 OD 值的平均值（PC<sub>x</sub>）与阴性对照 OD 值得平均值（NC<sub>x</sub>）之间（P-N）的差必须  $\geq$  0.150，且阴性对照平均值（NC<sub>x</sub>）必须  $\leq$  0.250，检测结果视为有效。否则，应重做试验。

#### 5.5.4.15 结果判定

##### 5.5.4.15.1 血清、血浆和单个牛奶样品

$S/P$  值 = (样品 OD 值 - 阴性对照 OD 平均值) / (阳性对照 OD 平均值 - 阴性对照 OD 平均值)

$S/P$  值  $<$  0.20 的被检样品，判为 BVDV 抗体阴性。

$0.30 > S/P$  值  $\geq$  0.20 的被检样品，判为 BVDV 抗体可疑。该样品应重新检测，并以重检的结果进行判定，重检后如仍为可疑，判为阳性。

$S/P$  值  $\geq$  0.30 的被检样品，判为 BVDV 抗体阳性。

##### 5.5.4.15.2 多份牛奶的混合样品

$S/P$  值 = (样品 OD 值 - 阴性对照 OD 平均值) / (阳性对照 OD 平均值 - 阴性对照 OD 平均值)

$S/P$  值  $<$  0.20 的被检样品，判为 BVDV 抗体阴性。

$S/P$  值  $\geq$  0.20 的被检样品，判为 BVDV 抗体阳性。

## 6 综合判定

### 6.1 病原学判定

凡符合流行病学特点，具有临床症状和病理剖检变化，具有 5.2.4.5.7.2 者判为样品中 BVDV 病原阳性；凡具有 5.4.4.6.3.2 者判为样品中 BVDV 病毒核酸阳性。

### 6.2 血清学判定

凡具有 5.3.4.4、5.5.4.15 中任何一项为阳性者判为样品中 BVDV 抗体阳性。

## 附录 A

### (规范性附录)

### 溶液配制

以下所用试剂均为分析纯。

#### A.1 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配方

##### A.1.1 A液

0.2 mol/L磷酸二氢钠水溶液:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  27.6 g, 溶于去离子水中, 最后定容至1 000 mL, 备用。

##### A.1.2 B液

0.2 mol/L磷酸氢二钠水溶液:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  53.6 g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.6 g或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  35.6 g), 加去离子水溶解, 最后定容至1 000 mL, 备用。

##### A.1.3 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 磷酸盐缓冲液的配制

取A液14 mL, B液36 mL, 加NaCl 8.5 g, 用去离子水定容至1 000 mL。经过滤除菌后, 备用。

##### A.1.4 吐温磷酸盐缓冲液的配制

取A液14 mL, B液36 mL, 加NaCl 8.5 g, 加0.5mL 吐温-20, 用去离子水定容至1 000 mL。经过滤除菌后, 备用。

##### A.1.5 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) (含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素) 的配制

取A液14 mL, B液36 mL, 加NaCl 8.5 g, 牛血清白蛋白5 g, 用去离子水定容至1 000 mL。经过滤除菌后, 无菌条件下分别按10 000 U/mL加入青霉素和链霉素, 备用。

#### A.2 细胞培养液与细胞维持液

##### A.2.1 细胞培养液

Eagle's -MEM培养液	87.5 mL
胎牛血清	10 mL
7.5% 碳酸氢钠	1.5 mL
调节pH值至7.2~7.4, 充分混匀, 现配现用。	

##### A.2.2 细胞维持液

Eagle's -MEM培养液	95.5 mL
胎牛血清	2 mL
7.5% 碳酸氢钠	1.5 mL
调节pH值至7.2~7.4, 充分混匀, 现配现用。	

### A.3 碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.6)

#### A.3.1 A液

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.68 g, 加去离子水溶解, 最后定容至400 mL。

#### A.3.2 B液

$\text{NaHCO}_3$  2.86 g, 加去离子水溶解, 最后定容至200 mL。

#### A.3.3 0.05mol/L碳酸盐缓冲液

将400 mL A液与150 mL B液混合, 调节pH至9.6, 4 °C保存。

### A.4 10倍汉克氏液 (Hanks液)

称取 $\text{NaCl}$  40 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.6 g,  $\text{KCl}$  2.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g, 葡萄糖5.0 g,  $\text{CaCl}_2$  0.7 g, 加去离子水溶解, 最后定容至500 mL, 充分溶解后, 4 °C保存, 备用。

汉克氏液为100 mL10倍汉克氏液与900 mL去离子水混合均匀, 配制而成, 4 °C, 保存。

### A.5 DEPC水

将DEPC加入去离子水(符合GB/T 6682要求)中至终浓度为0.1% (v/v), 充分混合均匀后作用12 h, 分装, 121 °C  $\pm$  2 °C 高压灭菌30 min, 冷却后冷藏备用。

**附 录 B**  
**(规范性附录)**  
**牛源原代细胞培养物制备**

- B.1 选择健康初生（1 d~2 d）公犊牛，颈动脉放血致死，无菌采取睾丸、肾脏、或鼻甲组织。
- B.2 将组织（牛肾只剪取皮质部）剪成  $1\text{ mm}^3\sim 2\text{ mm}^3$  的小块组织，用含 300 U/mL 双抗的汉克氏液漂洗 2 次~3 次，弃去漂浮的组织 and 上清液。
- B.3 按组织量的 5 倍加入 0.25% 胰酶-汉克氏液（pH 7.4~7.8），置 37 °C 水浴中消化 30 min~40 min，沉淀片刻，除去胰酶。
- B.4 用汉克氏液洗涤 2 次~3 次，加入适量细胞培养液吹打数次并分散已消化疏松的组织，用 4 层纱布过滤组织悬液，将滤过液用细胞培养液配制成  $4\times 10^5$  个/mL~ $7\times 10^5$  个/mL 的细胞悬液。
- B.5 将细胞悬液分装于细胞培养瓶，置 37 °C 恒温培养箱中培养，备用。

附 录 C  
(规范性附录)  
引物探针序列及荧光 RT-PCR 反应液配方

### C.1 引物探针序列

表C.1 引物探针序列

引物或探针名称	序列 (5'-3')	基因组位置 (nt)	检测靶基因
上游引物	CAGCGAMGGCCGAAAAGA	3-17	5'-UTR
下游引物	TGACGACTNCCCTGTACTCAG	178-198	
探针	FAM-CCATGCCCTTAGTAGGACTAGCA-BHQ1	107-128	
<p>注1: 上游、下游引物及探针均为简并引物。            注2: 引物和探针可由生物公司合成, 纯度为HPLC级, 用DEPC水溶解并稀释至终浓度10 μmol/L, -20 °C保存备用。            注3: 引物探针是根据已发布的毒株序列进行设计, 基因组位置参考毒株Bovine viral diarrhea virus strain Oregon C24V (GenBank登录号: AF091605.1)。</p>			

### C.2 荧光RT-PCR反应液配方

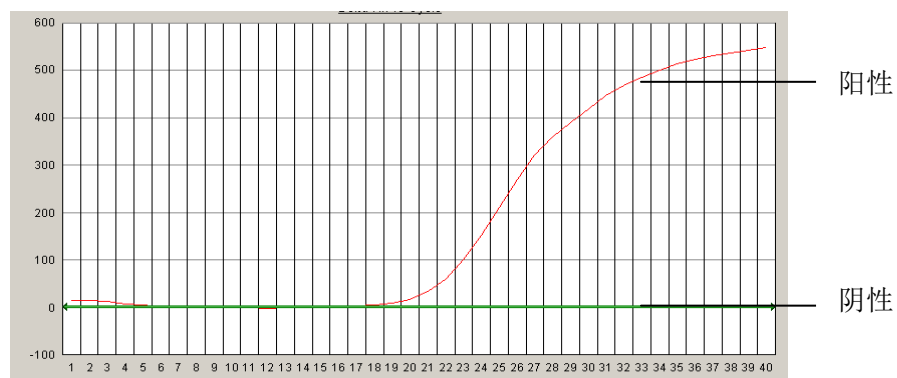
表C.2 荧光 RT-PCR 反应液配方

荧光RT-PCR反应液组分	1 个检测体系的加入量
5×RT 缓冲液 <sup>a</sup> (Mg <sup>2+</sup> 浓度 15 mmol/L)	5.0 μL
dNTP (2.5 mmol/L)	1.0 μL
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	2.0 μL
上游引物 (10 μmol/L)	1.0 μL
下游引物 (10 μmol/L)	1.0 μL
探针 (10 μmol/L)	0.5 μL
M-MLV 反转录酶 (200 U/μL)	0.5 μL
RNA酶抑制剂 (40 U/μL)	0.25 μL
<i>Taq</i> 酶 <sup>b</sup> (5 U/μL)	0.25 μL
DEPC 水	3.5 μL
<p><sup>a</sup> 5×RT 缓冲液的组成为: 375 mmol/L KCl、15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、50 mmol/L DTT、250 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3, 25 °C)。  <sup>b</sup> <i>Taq</i> 酶: 具有 5'→3'外切活性。</p>	

### C.3 注意事项

在检测过程中, 必须严防不同样品间的交叉污染。  
 反应液分装时应避免产生气泡, 上机前检查各反应管是否盖紧, 以免荧光物质泄露污染仪器。

附录 D  
(资料性附录)  
典型扩增曲线示意图



图D.1 牛病毒性腹泻/黏膜病病毒核酸荧光 RT-PCR 典型扩增曲线示意图

附 录 E  
(规范性附录)  
Reed-Muench 法计算方法

## E.1 中和抗体效价测定结果示例

表 E.1 中和抗体效价测定结果示例

血清稀释度 (病毒定量)	细胞病变孔 比例 (CPE)	细胞病变孔数	无细胞病变孔数	累计结果		
				细胞病 变孔数	无细胞病 变孔数	细胞病变率 (%) CPE (%)
1:4( $10^{-0.60}$ )	0/4	0	4			0
1:16( $10^{-1.20}$ )	1/4	1	3	1	5	17
1:64( $10^{-1.81}$ )	2/4	2	2	3	2	60
1:256( $10^{-2.41}$ )	4/4	4	0	7	0	100
1:1024( $10^{-3.01}$ )	4/4	4	0	11	0	100

从表中可见，半数保护数 ( $PD_{50}$ ) 介于  $10^{-1.20}$  和  $10^{-1.81}$  之间，按 Reed-Muench 法计算距离比例，即：

$$\text{距离比例} = \frac{50 - \text{低于 50\% 的 CPE 百分率}}{\text{高于 50\% 的 CPE 百分率} - \text{低于 50\% 的 CPE 百分率}} = \frac{50 - 17}{60 - 17} = 0.77$$

按公式： $PD_{50} = \text{低于 50\% 死亡 (CPE) 百分率的血清稀释度的对数} + \text{距离比例} \times \text{稀释系数的对数}$   
 $= -1.20 + 0.77 \times \lg 1/4 = -1.20 + 0.77 \times (-0.6) = -1.20 - 0.46 = -1.66$

查 -1.66 的反对数 = 0.0218 (1:45.9)

即该血清的中和抗体效价为  $10^{-1.66}$  (1:45.9)。