

前 言

本标准根据我国近二十年对蓝舌病诊断的研究成果和技术的发展,参考世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizootic(法),OIE]标准性文件《世界动物卫生组织推荐的诊断方法和生物制品标准手册》2.1.9条“蓝舌病”和澳大利亚动物疫病标准诊断方法“Bluetongue”一章而编写的。本标准引用了GB/T 18089—2000《微量中和试验及病毒分离和鉴定方法》有关规定方法。

蓝舌病是由库蠓传播、蓝舌病病毒引起的侵害反刍动物的严重传染病。蓝舌病病毒系呼肠孤病毒科环状病毒属B群成员。国际已知有24个血清型,在血清学上与环状病毒属相关病毒有交叉反应;该病毒主要引起绵羊发病和死亡,牛及其他反刍动物常为隐性感染,但可通过媒介昆虫传播本病。鉴于该病的诊断和检疫技术复杂,因此应建立该病的综合诊断技术标准,这是制定本标准的宗旨。

本标准规定的方法,分别适用于病毒分离鉴定、病原检测、病毒血清型鉴定和抗体检测等不同需要。本标准的附录A、附录B都是标准的附录,附录C是提示的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室、农业部动物检疫所、天津动植物检疫局。

本标准主要起草人:张念祖、杨承谕、李志华、张富强、胡玉玲、张开礼、马洪超、赵祥平、向文彬。

中华人民共和国国家标准

蓝舌病诊断技术

GB/T 18636—2002

Diagnostic techniques for bluetongue

1 范围

本标准规定了蓝舌病的诊断技术和程序。

本标准适用于蓝舌病的诊断和检疫。4、5、6章用于病毒分离鉴定和病原检测,7、8章用于病毒的血清型鉴定,9、10章用于抗体检测。

2 引用标准

下列标准所包括的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 18089—2000 蓝舌病微量血清中和试验及病毒分离和鉴定方法

3 病毒分离和鉴定

3.1 器械和设备

3.1.1 96孔组织培养板(平底,简称96孔板),单道微量加样器(0.5 μL ~10 μL ,5 μL ~10 μL ,40 μL ~200 μL ,200 μL ~1 000 μL)及滴头,八道连续加样器(50 μL ,100 μL ,150 μL ,200 μL)及滴头。

3.1.2 4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,普通恒温培养箱及二氧化碳培养箱。

3.1.3 鸡胚开孔器,照蛋箱或鸡胚用灯,组织捣碎器及擦镜纸(高压灭菌备用)。

3.1.4 超声波粉碎器,低速离心机,倒置显微镜及荧光显微镜。

3.2 试剂与材料

3.2.1 肝素抗凝血采血管。

3.2.2 细胞:蚊子细胞(C6/36)、仓鼠肾细胞(BHK₂₁)或非洲绿猴肾细胞(Vero)。

3.2.3 细胞培养液及分散液(按常规配方配制)。

3.2.4 蓝舌病单克隆抗体(8A3B6、7D3A2)。

3.2.5 蓝舌病荧光抗体。

3.2.6 10~11日龄鸡胚。

3.3 病毒分离

3.3.1 样品的采集和制备见GB/T 18089—2000中8.1。

3.3.2 鸡胚接种见GB/T 18089—2000中8.2。

3.3.3 接种细胞

3.3.3.1 将捣碎的鸡胚肝组织离心,2 000 r/min,10 min,取上清液。为避免不必要的“盲传”,先对待分离材料进行捕获酶联免疫吸附(ELISA)试验(见第6章),将呈阳性的反应材料接种C6/36细胞,每份样品接两管(瓶),每管(瓶)接0.2 mL。将接种细胞置于30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养7 d。

3.3.3.2 吹打接种的C6/36细胞,接种于BHK₂₁细胞,每份C6/36接种八管(瓶)BHK₂₁,每管0.2 mL,接种的BHK₂₁细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中,吸附1 h,加入维持液,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养,逐日观察细胞病变。出现细

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 2002-02-19 批准

2002-05-01 实施

胞病变(CPE)者收获,无细胞病变(CPE)者在BHK₂₁细胞盲传三代,仍无细胞病变弃之。

3.3.4 病毒保存及工作液的制备

3.3.4.1 BHK₂₁上出现细胞病变的病毒悬液用1 mL 无菌小管分装,作为原始毒,置-80℃保存。

3.3.4.2 用原始毒于BHK₂₁细胞上扩增,分装保存,记为“原始毒+1”。

3.3.4.3 “原始毒+1”按3.3.3.2方法增殖,分装、保存,作为贮存毒液。

3.3.4.4 贮存毒液增殖分装,4℃保存,作为工作毒液,用于病毒鉴定。

3.4 病毒鉴定

鉴定方法见GB/T 18089—2000中9.1及本标准4.6。

4 免疫酶染色(immunoenzyme stain)

4.1 器械和设备

4.1.1 96孔组织培养板(平底),单道加样器(0.5 μL~10 μL,5 μL~40 μL,4 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL)及滴头,八道加样器(50 μL,100 μL,150 μL,200 μL)及滴头,稀释试剂用小瓶。

4.1.2 普通恒温箱(37℃),4℃、-20℃冰箱及倒置显微镜。

4.2 试剂与材料

4.2.1 病毒分离获得的未知毒株。

4.2.2 仓鼠肾细胞(BHK₂₁),使用浓度 2.5×10^5 个/mL~ 3.3×10^5 个/mL。

4.2.3 培养液基础培养液/汉克氏液(BHE/HANKS)液+10%犊牛血清+1%青霉素、链霉素液(最低浓度为100 IU或μg/mL,4℃保存)。

4.2.4 蓝舌病单克隆抗体(8A3B6,7D3A2),4℃保存,羊(或兔)抗鼠免疫球蛋白G(IgG)辣根过氧化物酶联结合物。

4.2.5 IgG浓度1.3 mg/mL,在-20℃以下保存。

4.2.6 8%的福尔马林(即37%~40%甲醛水溶液)。

4.2.7 溶液配制:磷酸盐缓冲液(pH7.4)+0.05%吐温-20(PBST)。

1%明胶PBST。

底物3-氨基-9-乙基吖唑(AEC)液配制方法见附录A(标准的附录)。

4.3 操作程序

4.3.1 96孔组织培养板中加待检病毒(3.3.4.4),每个样品4孔,20 μL/孔。

4.3.2 设细胞对照4孔(加细胞生长液20 μL/孔),阳性对照4孔(加已知蓝舌病病毒悬液20 μL/孔),阴性对照4孔(加其他环状病毒群成员如鹿流行性出血病病毒20 μL/孔)。

4.3.3 每孔加入BHK₂₁细胞悬液180 μL(2.0×10^5 个/mL),置37℃5%二氧化碳中培养,逐日观察。

4.3.4 当样品孔出现细胞病变时,每孔加入8%福尔马林200 μL,室温静置10 min,移弃福尔马林和细胞培养液。

4.3.5 用PBST(见附录B)洗涤5次。

4.3.6 加单克隆抗体(8A3B6+7D3A2;用含1%明胶的PBST作1:5稀释)50 μL/孔,放于湿盒中,37℃,孵育90 min。

4.3.7 用PBST洗涤5次。

4.3.8 加酶结合物(抗鼠IgG辣根过氧化物酶结合物,用含1%明胶的PBST作1:1 000稀释)50 μL/孔,放于湿盒中,37℃,反应90 min。

4.3.9 加底物(AEC),每孔100 μL,室温静置30 min,用倒置显微镜观察。

4.4 判定

阴性对照、细胞对照不着色,而阳性对照中的感染细胞被染成红棕色时,试验成立。样品中有红棕色细胞,则判为阳性(表明此样品为蓝舌病病毒),否则,判为阴性。

5 抗原捕获酶联免疫吸附试验 (antigen capture ELISA)

5.1 器械和设备

5.1.1 96孔高吸附性酶标实验板,单道加样器(0.5 μL ~10 μL 、5 μL ~40 μL 、40 μL ~200 μL 、200 μL ~1 000 μL)及滴头,八道加样器(50 μL 、100 μL 、150 μL 、200 μL)及滴头,稀释试剂用小瓶。

5.1.2 普通恒温箱(37 $^{\circ}\text{C}$),水浴箱(37 $^{\circ}\text{C}$),4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,微量振荡器,混合仪,酶标洗板仪及酶标读板仪。

5.2 试剂与材料

5.2.1 捕捉抗体:牛抗蓝舌病病毒-23(BTV-23)型抗体,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

5.2.2 检测抗体:兔抗蓝舌病病毒-20(BTV-20)型核芯抗体,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

5.2.3 结合物:抗兔 IgG 辣根过氧化物酶结合物,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

5.2.4 溶液配制:碳酸盐缓冲液(pH9.4),乙酸-柠檬酸盐缓冲液(pH6.0);磷酸盐缓冲液(pH7.4)。

四甲基联苯胺储存液(室温避光保存);

30%过氧化氢(H_2O_2);

含脱脂奶的 PBST(PBST-SM)。

配制方法见附录 B(标准的附录)。

5.2.5 9~11日龄鸡胚。

5.3 样品处理

5.3.1 对细胞培养物样品不需特殊处理,使用前用 PBST 对倍稀释。

5.3.2 对临床样品的处理方法见 3.3.1。

5.4 实验设计和样品编号

5.4.1 每个样品 2 孔,同时设蓝舌病病毒-1(BTV-1)、蓝舌病病毒-23(BTV-23)阳性对照各 2 孔,阴性对照 2 孔(对照已知蓝舌病阳性和阴性细胞培养物或鸡胚肝脏悬液)。

5.4.2 包被:用碳酸盐缓冲液(见 B1)对捕捉抗体作 1 000 倍稀释,加入酶标实验板 50 μL /孔,置密闭湿盒中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

5.4.3 用 PBST(见 B1)洗涤 5 次并晾干。

5.4.4 加待检样品:按实验设计每孔加样 50 μL 后,室温静置 60 min,再在 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 30 min。

5.4.5 用 PBST 洗涤 5 次。

5.4.6 加检测抗体:用 BPST-SM(见 B2)对检测抗体作 1:2 000 稀释,每孔 50 μL 加入实验板,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 30 min。

5.4.7 用 PBST 洗涤 5 次。

5.4.8 加酶结合物:用 BPST-SM 对酶结合物作 1:3 000 稀释,每孔 50 μL 加入实验板,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 30 min。

5.4.9 用 PBST 洗涤 5 次。

5.4.10 加底物:按以下比例对底物进行稀释,9.7 mL 乙酸-柠檬酸缓冲液+50 μL 30%过氧化氢+300 μL 四甲基联苯胺储存液(见附录 C),每孔 50 μL 加入实验板,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 10 min~15 min,用 2 mol/L 的硫酸 50 μL /孔,终止反应。

5.4.11 在酶标读板仪读取 280 nm 波长的吸光度值。

5.5 结果判定

在阳性和阴性对照成立的前提下,当样品孔光吸收值为阴性对照孔两倍或两倍以上时判为阳性(表明样品中存在蓝舌病抗原),否则判为阴性。

6 定型微量中和试验

6.1 器械和设备

6.1.1 96孔组织培养板(平底,简称96孔板),单道微量加样器(0.5 μL~10 μL,5 μL~10 μL,40 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL)及滴头,8道连续加样器(50 μL,100 μL,150 μL,200 μL)及滴头。

6.1.2 4℃、-20℃及-80℃冰箱,普通恒温培养箱及二氧化碳培养箱。

6.1.3 倒置显微镜,微型振荡器及磁力搅拌器。

6.2 试剂与材料

6.2.1 病毒

待定型病毒须经群特异性试验鉴定为蓝舌病的毒株并经3次克隆达到纯化;对照病毒为蓝舌病病毒-24(BTV-24)型标准株。

6.2.2 阳性血清(抗血清)

蓝舌病毒24个血清型国际准抗血清型(或应用蓝舌病毒24个血清型国际准毒株自制,中和抗体效价应尽可能高,筛检试验不低于1:20,校正试验不低于1:320,并无细胞毒性)。

6.2.3 阴性血清

无蓝舌病抗体和细胞毒性的新生犊牛血清。

6.2.4 细胞

非洲绿猴肾细胞(Vero),使用浓度 1.5×10^6 个/mL。

6.2.5 细胞生长液

199培养液+双抗各含200单位(μg)/mL+10%新生犊牛血清(不含蓝舌病抗体,使用前56℃,30 min灭活)。

6.2.6 细胞维持液

199培养液+双抗各200个单位(μg)/mL,亦可加2%胎牛血清(FCS)(同上)。

6.2.7 0.1%萘黑蓝染色液(见C6)。

6.3 试验准备

6.3.1 病毒繁殖

应用转管或静止培养方法,在Vero细胞在转管中形成单层后,换为维持液,将待检病毒接入,37℃培养,连续观察7 d,记录细胞病变结果。病毒要在Vero细胞上适应3~5代,用1 mL吸管充分吹打管壁,取病毒悬液用同样的方法传代,最后一代的病毒液分装于1 mL小管,作为检测病毒贮存液-80℃保存。使用时接种于单层细胞上,37℃培养,逐日观察,待细胞病变达到75%以上时收毒,在-80℃和4℃间冻融三次,置无菌离心2 000 r/min离心20 min,取上清液分装于1 mL小管,4℃保存备用。

6.3.2 毒价滴定

用细胞生长液将病毒作 10^{-1} ~ 10^{-6} 稀释,加进96孔板,每个稀释度8孔,每孔50 μL,再加细胞生长液50 μL。细胞对照8孔,仅加细胞生长液100 μL,然后每孔各加入细胞悬液100 μL,置37℃二氧化碳培养箱内培养(二氧化碳浓度为5%),观察10 d,在细胞对照成立的前提下,记录结果,按细胞半数感染量(Karber)方法[见附录C(提示的附录)]计算病毒的每50 μL中所含50%组织细胞感染量。

6.4 筛检试验

6.4.1 实验设计及记录表见表1。

表1 各型BTV血清和对照排列

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	1			9			17			V10 ⁻³	S	C.C.		
B	2			10			18			V10 ⁻³	S	C.C.		
C	3			11			19			V10 ⁻³	S	C.C.		
D	4			12			20			V10 ⁻³	S	C.C.		
E	5			13			21			V10 ⁰	V10 ⁻¹	V10 ⁻²		
F	6			14			22			V10 ⁰	V10 ⁻¹	V10 ⁻²		
G	7			15			23			V10 ⁰	V10 ⁻¹	V10 ⁻²		
H	8			16			24			V10 ⁰	V10 ⁻¹	V10 ⁻²		

注

- 1 表中粗黑框表示细胞培养板内各孔的布位。1~9为检测区,10~12为对照区。
- 2 黑框内数字表示不同型标准血清的型号,每型血清各加入3孔。
- 3 V表示病毒对照,V10⁰~V10⁻³4个稀释度,每个稀释度占用4孔。
- 4 C.C.表示细胞对照。
- 5 S为阴性血清对照。
- 6 本表如不填写上述数字,即可作记录表用。

6.4.2 阳性血清经56℃30 min灭活后,作1:20稀释。

6.4.3 将待检病毒用细胞生长液稀释为每50 μL含100个TCID₅₀,作为病毒工作液。

6.4.4 将试验各组分加入微量反应板,程序是:

- a) 50 μL 阳性血清;
- b) 50 μL 病毒液(待检样品孔为每50 μL含100个TCID₅₀);
- c) 振荡后置37℃中和1 h;
- d) 100 μL 细胞悬液(1.5×10⁶个细胞/mL)。

上述液体总量200 μL。

6.4.5 对照

a) 病毒对照:取病毒工作液,用细胞生长液作稀释10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³四个稀释度,每个稀释度4孔,每孔50 μL,加100 μL细胞悬液,补生长液50 μL达到总量200 μL。

b) 细胞对照:设4孔,每孔加细胞悬液100 μL,补生长液100 μL达到总量200 μL。

c) 阴性对照:设4孔,每孔加入1:20稀释的阴性血清50 μL,蓝舌病病毒工作液50 μL,细胞悬液100 μL。

d) 置37℃培养箱(二氧化碳浓度为5%)培养10 d。

如长期保存可用0.1%萘黑蓝染液染色,每孔加染色液50 μL~100 μL,室温静置2~3 h,用水漂洗,晾干。

6.5 筛检结果判定

6.5.1 判定条件

6.5.1.1 细胞对照组应不出现细胞病变。

6.5.1.2 病毒对照,应保证在100个TCID₅₀的病毒液10⁰和10⁻¹稀释度的各孔均出现CPE,10⁻²有1~2个孔出现细胞病变,10⁻³~4孔全无细胞病变。

6.5.1.3 阴性对照应全部出现细胞病变。

6.5.2 判定标准

在以上对照成立的情况下,如出现细胞病变记为CPE+,如不出现细胞病变为CPE-。若某一型抗

体组均无细胞病变,其他型的抗体组均有细胞病变,则可初步认为是该血清型病毒,再按 6.5.3 进一步确认;若两个或两个以上的血清型抗体组无细胞病变,则认为可能是其中的某个型,按 6.5.4 作进一步鉴定;若所有抗体组均出现细胞病变,按 6.5.5 进行。

6.5.3 病毒仅被某型标准阳性血清中和

将待定型病毒与初定型的同型标准毒分别作 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 稀释,每个稀释度加 8 孔,每孔 $50 \mu\text{L}$,其中前四孔每孔加 1:20 稀释的初定型标准阳性血清 $50 \mu\text{L}$,后四孔每孔加 1:20 稀释阴性的犊牛血清 $50 \mu\text{L}$,振荡混匀,37℃,5%二氧化碳培养箱中培养 10 d,判定结果。当标准毒的标准毒阳性血清中和滴度较其阴性血清孔高 2 个或 2 个以上,而待检病毒也出现类似情况,则可判定为该型病毒。

6.5.4 有细胞病变的两型的抗血清(已知滴度),分别作 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 等倍比稀释,每稀释度均为 4 孔,每孔各加 100TCID₅₀ 被测病毒,各种试剂的加样量和顺序按 6.4.4 进行。以四孔完全抑制细胞病变的最高稀释度作为判定终点,若某型抗体中和滴度比其他型高出 2 个或 2 个以上并与标准毒试验结果基本一致,则可定为该型。

6.5.5 均不被 24 个血清型抗体中和的病毒,可能为多型混合感染或新的血清型,则需进行克隆化,克隆化的病毒再按上述方法作血清型特异鉴定,若仍然不被 24 个血清型抗体中和,则可能属于新型。

7 空斑及空斑抑制定型试验

7.1 材料准备

7.1.1 传代细胞 生长良好的 SVP(非洲绿猴肾细胞系中一种特殊细胞株)或 Vero 传代细胞,在直径为 6 cm 或直径 9 cm 的培养皿中 48~72 h 长成致密单层。

7.1.2 参考阳性血清:以 1~24 型蓝舌病毒制备的无菌高效价、型特异性血清,琼扩效价在 1:2 以上, -20℃ 保存。

7.1.3 病毒:将保存病毒在敏感细胞上繁殖数代,反复冻融三次,离心取上清液, -70℃ 保存。

7.1.4 滤纸圆片:直径为 0.2 cm 定量分析滤纸片,置小容器内 103.4 kPa(15 磅/吋²,121℃)30 min 高压灭菌,烘箱内烘干备用。

7.1.5 0.1%中性红:双蒸的无离子水配制 0.1%中性红,2143 Pa 高压灭菌 30 min,4℃ 冰箱保存备用。

7.1.6 低熔点琼脂糖:以磷酸盐缓冲液将低熔点琼脂糖配制成 1%浓度,103.4 kPa 高压灭菌 30 min,溶解后放 43℃ 水浴锅备用。

7.2 空斑试验

7.2.1 将长满单层的培养皿营养液倒出,用灭菌磷酸盐缓冲液冲洗两遍。

7.2.2 将病毒用磷酸盐缓冲液从 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 递次稀释,每皿加 0.3 mL(6 cm 皿)或 0.75 mL(9 cm 皿)。37℃ 感作 40 min 吸出病毒液。

7.2.3 用磷酸盐缓冲液轻洗 3 次。将 0.1%中性红按 1:100 的比例加入低熔点琼脂糖中,在超净台冷却 1 min 后,轻轻倒入 5 mL(6 cm 皿)或 15 mL(9 cm 皿),30 min 后,倒置 37℃ 二氧化碳培养箱中。

7.2.4 24 h 后,逐日检查空斑情况,至 120 h 止,判读结果。蓝舌病病毒空斑,在 SVP 或 Vero 细胞上出现直径约 1 mm 近圆形白色空斑,健康细胞层颜色为深红色,计数各稀释度空斑数并作记录,计算每毫升空斑形成单位(PEU/mL)。

7.3 空斑抑制试验

7.3.1 将培养好的单层细胞用磷酸盐缓冲液轻洗 2 遍,将待检病毒稀释至 10^6 PFU/mL,每盘放入 0.3 mL(6 cm 皿)或 0.75 mL(9 cm 皿),37℃ 感染 40 min,吸出病毒液。

7.3.2 将培养皿用磷酸盐缓冲液冲洗 3 遍,将 0.1%中性红按 1:100 比例加入已溶化 43℃ 的 1%琼脂中,摇匀,轻轻倒入皿中,6 cm 皿加 5 mL,9 cm 皿加 15 mL,静置 30 min。

7.3.3 将 24 个型参考阳性血清按一定顺序,用滤纸片浸入血清后,轻轻置于琼脂上静置 15 min 后,记清型号倒置,二氧化碳培养箱 37℃ 培养。

7.3.4 48 h 后逐日观察结果,测量抑制圈直径。并作好记录,拍照,按 7.3.5 判定。

7.3.5 结果判定

相应型血清的抑制圈为围绕血清滤纸片的边缘较整齐的深红色的环形带,直径一般在 1.2 cm~2.0 cm 左右,可判定某病毒为该血清型;个别情况下,另一型也同时出现一定的抑制圈,但抑制圈的直径一般不超过 0.6 cm,边缘较不整齐,颜色亦较淡,此为交叉反应所致,应加以鉴别。必要时,可重复试验。

8 琼脂免疫扩散试验(AGID)

8.1 材料和器械

8.1.1 抗原和阴、阳性血清

按说明书要求使用。

8.1.2 器械

直径 6 cm 平皿;

外径 4 mm 打孔器;

眼科手术镊子。

8.1.3 待检血清

血清应无污染,3 个月内在 4℃ 保存,常温保存 15 d 内,可用于检测。

8.2 试验方法

8.2.1 琼脂平皿的制作

8.2.1.1 琼脂糖基配制:

琼脂糖 0.8 g~0.9 g

生理盐水 100 mL

按 1:10 000 比例加入叠氮钠或硫柳汞,调整 pH7.4~7.6,高压消毒 10 min。

8.2.1.2 琼脂平皿制备:融化的琼脂待冷至 45℃~50℃ 时,以无菌手术倒入直径 6 cm 平皿中,每平皿约 7 mL。厚度约为 4 mm,待凝固后置 4℃ 保存备用。

8.2.1.3 打孔:用直径 4 mm 金属打孔器在已凝固的琼脂糖凝胶平皿上打孔(各孔排例如图 1 所示)。孔距为 3 mm,打孔后用针挑出切下的孔内琼脂块,封底。

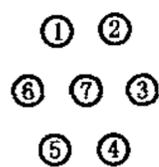


图 1 布局

8.2.2 加样:用微量加样器或毛吸管,吸取抗原或血清滴于孔内;中央孔滴加抗原,周围的 1、3、5 孔滴加待检血清,2、4、6 孔滴标准阳性血清,样品以加满不溢出为度。加样后静置 10 min,放入 37℃ 温箱中进行反应。分别在 24 h、48 h、72 h 观察并记录结果。

8.3 结果判定

判定时将琼脂平皿置暗背景或侧强光照射下观察。标准阳性血清与抗原孔之间出现一条清晰的白色沉淀线,则认为试验可以成立;如果沉淀线没有或不明显则本试验不能成立,应重做。结果判定标准如下:

a) 阳性:待检血清孔与抗原孔之间出现明显清晰白色沉淀线,并与标准阳性血清孔的沉淀线相融合(见图 2);

b) 阴性:待检血清孔与抗原孔之间无沉淀,标准阳性血清孔的沉淀线直伸孔边,判为阴性(见图 3);

c) 弱阳性:标准阳性血清孔沉淀线在被检孔处向抗原孔侧弯曲,但不形成完整的线,则待检血清判为弱阳性,应重复试验,若重复仍为弱阳性反应时判阳性(见图 4);

d) 非特异性反应:在抗原孔与待检血清之间的沉淀线粗而混浊,或与标准阳性血清孔沉淀线交叉并直伸孔边时则认为非特异性反应,应重试(见图 5);

e) 试验后 24 h、48 h、72 h 判定中凡出现沉淀线均应记录,并判为阳性,凡 72 h 仍未见沉淀反应者判为阴性。

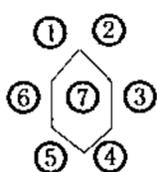


图 2 阳性(1.3.5)

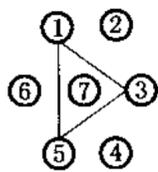


图 3 阴性(1.3.5)

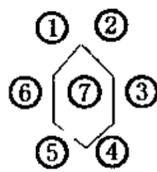


图 4 弱阳性(5)

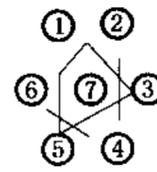


图 5 非特异性(3.5)

9 竞争酶联免疫吸附试验(C-ELISA)

9.1 材料

9.1.1 化学制剂溶液

吐温-20 磷酸盐缓冲液(见 B1);

底物(四甲基联苯胺溶液,TMB)储备液(见 C3);

样品稀释液[含脱脂奶的 PBST(PBST-SM)](见 C4)。

9.1.2 生物制剂

9.1.2.1 阳性对照血清:此血清以 1:10、1:80 被稀释作为强、弱阳性对照血清。

9.1.2.2 阴性对照血清:蓝舌病抗体阴性的牛血清,试验中以 1:10 对照稀释。

9.1.2.3 单克隆抗体(单抗):蓝舌病毒 VP7 的单克隆抗体(群特异性单抗)。

9.1.2.4 酶结合物:辣根过氧化物酶交联的山羊抗小鼠血清。

9.1.2.5 设备和器械:

96 孔酶联免疫吸附试验(ELISA)反应板;

带嘴塑料瓶(500 mL),用手洗板;

加样器(10 μ L、50 μ L、100 μ L~200 μ L 多道加样器);

酶标仪(使用波长为 450 nm)。

9.2 试验程序

9.2.1 包被抗原

按照说明书将抗原稀释到工作浓度,每孔加 50 μ L,在室温保湿条件下过夜。用 PBST 洗板 5 次,铝箔纸密封 4 $^{\circ}$ C 保存。

9.2.2 加样

将待检血清用 PBST-SM 作 1:10 稀释,每孔加 50 μ L,每份样品使用两孔。空白对照两孔,各加 PBST-SM 50 μ L。

强阳性血清对照两孔,各孔加 50 μ L;

弱阳性血清对照两孔,各加入 50 μ L;

阴性血清对照两孔,各加入 50 μ L。

9.2.3 反应

置 37 $^{\circ}$ C 温箱振荡 1 h。

9.2.4 加单克隆抗体

按照说明书要求用 PBST-SM 将单抗稀释到工作浓度,每孔加 50 μ L。37 $^{\circ}$ C 温箱振荡 30 min。

9.2.5 加酶结合物

按说明书将酶结合物用 PBST-SM 稀释到工作浓度,每孔加 50 μL 。37℃振荡 30 min。

9.2.6 用 PBST 洗板 5 次。

9.2.7 加底物和终止

将新配制的底物(见 5.4.10)液迅速向每孔加入 100 μL ,反应 10 min~20 min。每孔加终止液 100 μL 。

9.3 读数和判定

9.3.1 读数用酶标仪设置对照孔,以波长 450 nm 读取每孔吸光度值。

9.3.2 计算抑制率:以式(1)计算抑制率(I):

$$I(\%) = \left(1 - \frac{A_s}{A_n}\right) \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中: A_s ——样品吸光度;

A_n ——标准阴性吸光度。

9.3.3 判定前提:阴性对照吸光度(A_n)应在范围 0.8~1.4 内;强阳性抑制率应大于 85%;弱阳性抑制率应在 35%~50%之间。如果实际值与此值偏离较大,则不具备判定条件。

9.3.4 判定:样品的抑制率(I)大于 60%判为蓝舌病病毒抗体阳性;小于 40%判为阴性;40%~60%判为弱阳性,应重复,如仍为此值可定为弱阳性。

附录 A
(标准的附录)
免疫酶染色所需试剂

A1 PBST

氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	2.29 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.20 g
加水至	1 000 mL
吐温-20	0.50 mL

A2 1%明胶 PBST

称取明胶,加 PBST 100 mL,水溶解,4℃保存备用。

A3 3-氨基-9-乙基吖唑(AEC)液

3-氨基-9-乙基吖唑(AEC)	20 mg
二甲基亚砜(DMSO)	3 mL

将 AEC 于 DMSO 中溶解后,加至 50 mL 乙酸盐缓冲液(pH6.0)中,再加 30%过氧化氢 30 μL 充分混匀备用(该溶液不适宜保存,现用现配)。

附录 B
(标准的附录)

抗原捕捉酶联免疫试验和定型微量中和试验用试剂溶液

B1 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6 包被用)

碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO ₃)	2.93 g
硫柳汞	0.10 g
加蒸馏水至	1 000 mL 4℃保存备用

B2 乙酸-柠檬酸缓冲液

甲液:

乙酸钠	8.2 g
双蒸馏水	1 000 mL

乙液:

柠檬酸	2.10 g
双蒸馏水	100 mL

用乙液调整甲液至 pH9.6,高压灭菌 4℃保存。

B3 四甲基联苯胺(TMB)储存液

称取 3'-3',5',-5'四甲基联苯胺 30 mg 于 100 mL 甲醇中,室温搅拌数小时至完全溶解,用棕色瓶避光保存。

B4 PBST-SM

PBST	100 mL
脱脂奶粉	1 g

B5 2 mol/L 硫酸

双蒸馏水	160 mL
浓硫酸	20 mL
B6 0.1% 萘黑蓝染色液配制	
萘黑(naphthalene black)	1.0 g
乙酸	60.0 mL
乙酸钠(无水)	13.6 g
加蒸馏水至	100 mL

附录 C
(提示的附录)
Karber 方法

Karber 法的公式见式(C1)用常用对数(lg)计算:

$$\lg TCID_{50} \text{ (或 } LD_{50}, EID_{50}) = L + d(s-0.5) \quad \dots\dots\dots (C1)$$

式中: *L*——病毒的最低稀释倍数;
d——稀释系数,即组距;
s——细胞病变比值的和(不包最低稀释度细胞病变的比值)。

以下例(见表 C1)说明:

表 C1 病毒 TCID₅₀ 滴定

病毒稀释度	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
病毒稀释度 (lg)	-2	-3	-4	-5	-6	-7
细胞病变比值	4/4	4/4	4/4	3/4	2/4	0/4

本例 $L = -2, d = -1, s = 4/4 + 4/4 + 3/4 + 2/4 + 0/4 = 4.25$

代入公式: $\lg TCID_{50} = -2 + (-1) \times (4.25 - 0.5)$
 $= -5.75$

$$TCID_{50} = 10^{-5.75}$$

查反对数表可得 $TCID_{50} = 1/560\,000$

如各稀释度均为 0.1 mL,那么 1 mL 中含 5 600 000 个 TCID₅₀或 10^{6.75}个 TCID₅₀。

病毒毒价通常以每毫升含多少 TCID₅₀(或 LD₅₀、ELD₅₀)表示,本例病毒毒价为每毫升含 5 600 000 个 TCID₅₀。