



中华人民共和国国家标准

GB/T 23197—2008

鸡传染性支气管炎诊断技术

Diagnostic techniques for avian infectious bronchitis

2008-12-31 发布

2009-05-01 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

本标准对应于 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2004)2.7.6 鸡传染性支气管炎 (avian infectious bronchitis), 其一致性程度为非等效。在此基础上, 根据国内科研成果增加了反转录-聚合酶链反应和气管环组织培养血清中和试验, 用于病原的鉴定和抗体检测。

本标准的附录 A 为规范性附录, 附录 B 为资料性附录。

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(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位: 中国动物卫生与流行病学中心、华南农业大学。

本标准主要起草人: 吴延功、廖明、王志亮、郭霄峰、刘佩兰、王永玲、孙承英。

鸡传染性支气管炎诊断技术

1 范围

本标准规定了鸡传染性支气管炎病毒分离、反转录-聚合酶链反应、微量血凝抑制试验以及气管环组织培养血清中和试验等四种诊断技术的技术要求。

本标准适用于鸡传染性支气管炎的诊断和检疫。

2 临床诊断

2.1 鸡传染性支气管炎是鸡的一种急性、接触性传染病,临床上有多种表现形式,根据病变类型,可将其分为:呼吸道型、肾型等,但以经典的呼吸道型发生的最为普遍。

2.2 呼吸道型表现为呼吸困难,有罗音或喘鸣音,雏鸡感染可引起死亡。

2.3 青年鸡和产蛋鸡感染后,可引起产蛋鸡停产或产蛋下降。表现为产蛋鸡产蛋下降,产软皮蛋、砂壳蛋或畸形蛋,蛋清稀薄如水。

2.4 肾型表现为病鸡排白色稀粪,脱水,死亡率高。

2.5 符合上述临床症状之一者,可以怀疑鸡群感染鸡传染性支气管炎病毒,确诊需经实验室检验。

3 病原的分离

3.1 样品的采集

3.1.1 对于急性呼吸道型的病鸡,应采取气管渗出物;对于刚扑杀的病鸡则采取支气管和肺组织。

3.1.2 对于肾型和产蛋下降型的病鸡,应采取发病鸡的肾脏或输卵管。也可从大肠,尤其是盲肠扁桃体或粪便分离病毒,但从消化道分离到的病毒未必与现流行或发生的病毒有直接关系。

3.2 样品的处理

3.2.1 将病料放在含有 10 000 IU/mL 青霉素和 10 mg/mL 链霉素的 pH 值为 7.4 的磷酸缓冲盐水 (PBS) 内,置冰盒内送往实验室。pH 值为 7.4 的 PBS 的配方见附录 A。

3.2.2 将病料磨碎,加含抗菌素的 PBS 制成体积分数为 20% 的组织悬液,冻融 3 次,以 3 000 g 离心 20 min,取上清液,加入终浓度为 1 000 IU/mL 的青霉素和终浓度为 1 mg/mL 的链霉素,37 °C 下作用 1 h 后用于鸡胚接种。

3.3 分离培养

3.3.1 取病料上清液,接种于 5 枚 9 日龄~11 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔内,另 5 枚接种 PBS,接种量均为 0.2 mL/枚。37 °C 孵育。每天照蛋,24 h 内死亡的鸡胚弃去。收集接种后 3 d~7 d 的鸡胚尿囊液,将所有尿囊液混合,用含 1 000 IU/mL 青霉素和 1 mg/mL 链霉素的 PBS 稀释 5 倍~10 倍,继续在鸡胚内传代。典型的野毒株通常在鸡胚中传至第 2 代或第 3 代时,可见侏儒胚,传至第 3 代,某些鸡胚可出现死亡。含毒尿囊液置 -60 °C 以下可长期保存,也可以冻干 4 °C 保存。

3.3.2 将分离物经鸡胚传至 3 代或 3 代以上,收获接种后 7 d 仍存活的鸡胚,取胎儿,用剪刀剪除胎儿体外的附属物,并用吸水纸吸干胎儿表面的液体。如接种胎儿重量比对照胚最轻胎儿重量少 2 g 以上者,可初步判定为有病毒感染。

3.3.3 对病毒的进一步鉴定可通过反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 进行 (见第 4 章)。

4 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

4.1 核酸抽提

4.1.1 材料准备

4.1.1.1 被检样品:所采集的病料(肺或肾等组织样品、棉拭子、尿囊液和细胞培养物)应新鲜,或者置

于-20℃或-70℃低温冰箱保存。

4.1.1.1.1 组织样品的处理:往1g~3g肺脏或肾脏等组织样品中加灭菌的0.85%生理盐水研磨成5倍~10倍悬浮液,反复冻融2次~3次后,以4000g离心10min,取上清液作核酸抽提用。

4.1.1.1.2 棉拭子的处理:将棉拭子充分捻动拧干后除去拭子,0.5mL样品液经4000g离心10min,取上清液作核酸抽提用。

4.1.1.1.3 细胞培养物:取1mL细胞培养物反复冻融2次~3次后,以4000g离心10min后取上清液作核酸抽提用。

4.1.1.1.4 阴性尿囊液:10日龄SPF鸡胚尿囊液。

4.1.1.1.5 阳性病毒液:传染性支气管炎病毒M41株接种10日龄SPF鸡胚,孵育48h后收获的尿囊液。

4.1.1.2 异丙醇。

4.1.1.3 灭菌1.5mL离心管。

4.1.1.4 无RNA酶(RNase)水。

4.1.1.5 三氯甲烷(分析纯)。

4.1.1.6 无RNase水配制的75%乙醇溶液。

4.1.2 操作方法

4.1.2.1 取100μL 4.1.1.1中的上清液或尿囊液置于一灭菌的1.5mL离心管中,同时设立阴性尿囊液或阴性细胞培养液和传染性支气管炎病毒M41株阳性病毒液为对照,再分别加入900μL冰冷的裂解液,剧烈混合样品10s,室温放置5min。

4.1.2.2 加入200μL三氯甲烷,颠倒离心管混合2次,剧烈混合10s,4℃下以10000g离心15min。

4.1.2.3 吸取500μL上层水相于新的1.5mL灭菌离心管中,加入500μL异丙醇,4℃放置10min,4℃下以10000g离心15min。

4.1.2.4 小心弃去全部上清液,加入1mL无RNase水配制的75%乙醇溶液,上下轻缓颠倒两次,4℃下以7500g离心5min。

4.1.2.5 弃去全部乙醇,风干5min~10min,即制得RNA。

4.2 反转录(RT)

4.2.1 材料准备

4.2.1.1 反转录酶(reverse transcriptase)XL(AMV),核糖核酸酶抑制剂(RNasin)和反转录引物。反转录引物为6个碱基长度的随机引物,序列为5' d(NNNNNN) 3',其中N代表A或C或G或T四个碱基。

4.2.1.2 10mmol/L dNTPs。

4.2.1.3 0.5mL灭菌PCR管。

4.2.2 操作方法

4.2.2.1 在一个洁净的0.5mL灭菌PCR管中依次加入5×AMV缓冲液2μL,10mmol/L dNTPs 0.5μL,反转录引物20pmol,核糖核酸酶抑制剂(RNasin)10U,反转录酶AMV2.5U,用无RNase水补足总体积25μL,轻缓混匀。

4.2.2.2 用4.2.2.1中的反转录混合液重悬4.1.2.5中制备的RNA,置于室温10min。

4.2.2.3 放入42℃水浴1h,取出冰浴2min,所得的反应液即为反转录产物cDNA。然后将cDNA置于-20℃保存或直接做PCR。

4.3 核酸扩增

4.3.1 材料准备

4.3.1.1 Taq酶,2.5mmol/L dNTPs,100bp DNA分子质量标准。

4.3.1.2 PCR混合引物4PS:包括两对引物(Ms/Mx和3's/3'x),分别针对传染性支气管炎病毒

(IBV)基因组的 M 基因及基因组 3'末端的非编码区,这两个基因区间保守性强。在该混合引物中, Mx/Ms 的引物浓度为 4 pmol/ μ L, 3's/3'x 的引物浓度为 5 pmol/ μ L。引物序列如下:

- 3's:5'GGA AGA TAG GCA TGT AGC TT 3'(20 nt);
- 3'x:5'CTA ACT CTA TAC TAG CCT AT 3'(20 nt);
- Ms:5'CCT AAG AAC GGT TGG AAT 3'(18 nt);
- Mx:5'TAC TCT CTA CAC ACA CAC 3'(18 nt)。

4.3.1.3 0.5 mL 灭菌离心管。

4.3.1.4 2.0%琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭),其配制方法见附录 A。

4.3.2 操作方法

4.3.2.1 在一个洁净的 0.5 mL 灭菌 PCR 管中依次加入无 RNase 水 18.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 4PS PCR 混合引物 1.5 μ L, 2.5 U *Taq* 酶 0.5 μ L, 轻缓混匀。

4.3.2.2 加入 2 μ L 4.2.2.3 中制备中的 cDNA, 轻缓混匀。

4.3.2.3 置于 PCR 仪中运行, 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 7 min。同时, 设立以传染性支气管炎病毒 M41 株的 cDNA 为模板的阳性 IBV 病毒对照和阴性尿囊液或阴性细胞培养物的 cDNA 为模板的阴性对照。

4.3.2.4 PCR 产物的检测: 待 PCR 反应结束后, 每个 PCR 样品取 5 μ L 于含 0.5 μ g/mL EB 的 2.0% 琼脂糖凝胶孔中电泳, 同时加入 5 μ L 标准 100 bp DNA 分子量标准物作为参照。在 75 V 恒压电泳 30 min, 取凝胶置于紫外灯下观察或成像。

4.4 检测与判定

4.4.1 阳性对照在约 740 bp 和 290 bp 处分别有一条特异的 DNA 条带, 阴性对照则无相应的特异条带出现, 则实验成立。

4.4.2 待检样品在相应位置如出现特异性条带, 或者仅在约 740 bp 出现条带或者仅在约 290 bp 处出现特异条带, 则均可判为阳性。

4.4.3 如果需要进一步验证的话, 可将获得的大小约为 740 bp 或 290 bp 的 PCR 产物回收纯化后测序, 将测序结果提交美国国家生物技术信息中心(NCBI)进行 BLAST 分析。如果 BLAST 结果显示: 大小约为 740 bp 的测定序列与基因数据库(GenBank)中注册的 IBV 膜蛋白序列同源性最高, 或者大小约为 290 bp 的测定序列与 GenBank 中注册的 IBV 基因组 3'末端序列同源性最高, 则进一步确证检测结果阳性。

5 微量血凝抑制试验

5.1 准备

5.1.1 器材

5.1.1.1 微量反应板: 96 孔, V 形底, 同一次试验使用的反应板孔底角度应相同。

5.1.1.2 塑料采血管: 内径 2 mm, 长 10 cm。

5.1.2 试剂

5.1.2.1 稀释液: pH7.4 磷酸缓冲盐水(PBS)。

5.1.2.2 浓缩抗原: 由指定单位提供, 按说明书使用, 置 4 $^{\circ}$ C 保存。

5.1.2.3 标准阳性血清: 由指定单位提供, 按说明书使用。

5.1.2.4 阿氏液(Alsever), 配制方法见附录 A。

5.1.2.5 1%鸡红细胞悬液: 采不少于 3 只健康成年鸡血液, 以 1:2 的比例与阿氏液混匀, 用 20 倍量 PBS 洗涤 3 次~4 次, 每次以 1 500g 离心 5 min, 最后一次 10 min, 用 PBS 配成体积分数为 1%的悬液。

5.1.3 被检血清

刺破鸡羽下静脉, 用毛细塑胶管引进血流 6 cm~8 cm 长, 烧融一端, 镊夹封口。血液凝固析出血清

后 1 500g 离心 5 min, 剪取血清端, 封口备用。

注: 普查或疾病流行时, 每群采血鸡不少于 30 只。

5.2 操作

5.2.1 微量血凝试验

5.2.1.1 于 V 形血凝板的每孔中滴加 PBS 25 μ L, 共滴四排。

5.2.1.2 吸取抗原滴加于第一列孔, 每孔 25 μ L, 然后按由左到右顺序倍比稀释至第 11 列孔, 再从第 11 列孔各吸 25 μ L 弃之。最后一列不加抗原作对照。各孔补加 PBS 25 μ L。

5.2.1.3 于每孔中加入 1% 红细胞悬液 25 μ L, 置微量混合器上振荡 1 min。

5.2.1.4 放室温下 (22 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C) 40 min 后根据血凝图像判定结果。

5.2.1.5 凝集程度的判定

- 完全凝集(++): V 形孔的尖部无红细胞沉淀块;
- 不完全凝集(+): V 形孔的尖部有较明显的红细胞沉淀块, 但整个孔底散布较多的凝集红细胞;
- 不完全沉淀(±): V 形孔的尖部有较多的沉淀红细胞, 孔底其他部分有少量凝集红细胞散布;
- 完全沉淀(-): 红细胞都沉积于 V 形孔的尖部, 孔底其他部分无可见的红细胞。

5.2.1.6 以出现完全凝集的抗原最大稀释度为该抗原的血凝滴度。每次做四排, 以几何均值表示结果。

5.2.1.7 计算出含 4 个血凝单位的抗原浓度, 将血凝滴度除以 4 即为 4 个血凝单位的抗原应稀释的倍数。

5.2.2 微量血凝抑制试验

5.2.2.1 取 25 μ L PBS 分别加入 V 形 96 孔微量血凝板的各孔内。

5.2.2.2 吸取被检血清 25 μ L 于第 1 孔中, 混匀后吸 25 μ L 于第 2 孔, 依次倍比稀释至第 11 孔, 最后弃去 25 μ L。

5.2.2.3 除第 1 列孔不加抗原外, 吸取 4 个血凝单位的抗原 25 μ L 加入第 2 列 ~ 第 12 列各孔。

5.2.2.4 置室温下振荡 30 min。

5.2.2.5 加 25 μ L 1% 红细胞悬液于各孔中, 振荡混匀后, 室温下静置 40 min, 判读结果。

5.2.2.6 第 1 列孔为血清对照孔, 第 12 列孔为抗原对照孔, 每次测定还应设已知滴度的标准阳性血清作对照。

5.2.2.7 判定

- 红细胞凝集程度的判定, 同 5.2.1.5 的规定;
- 血凝抑制试验结果的判定, 在抗原对照出现完全凝集, 血清对照出现完全沉淀的情况下, 以完全抑制红细胞凝集的最大稀释倍数为该血清的血凝抑制滴度。若鸡群没有接种过鸡传染性支气管炎疫苗, 且有的鸡血清滴度达到 $4\log_2$ 以上, 说明鸡群已受传染性支气管炎的感染。

6 气管环组织培养血清中和试验

6.1 材料准备

6.1.1 器材

眼科剪、眼科镊子、平皿、吸管、薄青霉素瓶 (5 mL、10 mL)、注射器、离心管、超净工作台、37 $^{\circ}$ C 培养箱、倒置显微镜、冰箱。

6.1.2 试剂

Hank's 液、0.4% 酚红溶液、7% 碳酸氢钠 (NaHCO_3) 溶液、MEM 综合培养液、犍牛血清 (使用前经 56 $^{\circ}$ C 灭能 30 min)、抗菌素溶液, 配方见附录 A。

6.1.3 SPF 鸡胚

于 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育至 18 日龄 ~ 20 日龄。

6.1.4 抗原

按说明书使用,置 -70°C 冰箱冻结保存。

6.1.5 血清

6.1.5.1 标准阳性血清:按说明书使用,用前经 56°C 灭能30 min。

6.1.5.2 标准阴性血清:按说明书使用,用前经 56°C 灭能30 min。

6.1.5.3 被检血清:每群鸡随机采取10份~20份血样,分离血清。

6.1.5.4 采血法:用灭菌注射器经心脏无菌采血2 mL~3 mL,迅速移入灭菌离心管内,待凝固析出血清后,以1 500g离心5 min,将血清移入青霉素瓶内。试验前将血清经 56°C 灭能30 min后备用。

6.2 操作方法

6.2.1 气管环组织培养(TOC)

取18日龄~20日龄的鸡胚,用碘酊消毒气室部位,于超净工作台内打开蛋壳,用无菌眼科镊子拨开蛋壳膜和绒毛尿囊膜,小心取出鸡胚,置于灭菌的平皿内。用眼科剪剪开鸡胚颈部皮肤,找出气管,仔细地去除气管周围的结缔组织和脂肪,取出气管于含100 U/mL青霉素和100 μg /mL链霉素的Hank's液中轻轻洗两次,然后用眼科剪将气管剪成1 mm厚的气管环组织。将一个气管环组织置于一个青霉素瓶内,加入含2%犊牛血清的MEM培养液(pH值7.2~7.4)1 mL,置 37°C 培养箱内培养24 h后,取出置倒置显微镜下观察。观察前轻轻振荡,使培养物分泌的黏液溶于液体中。见气管环组织培养物上皮完整、纤毛运动活泼,即可供作传染性支气管炎病毒的测定。

6.2.2 传染性支气管炎病毒对气管环组织培养半数感染量(TOC- ID_{50})的滴定

随机从 -70°C 冰箱中取出一支抗原,用不含犊牛血清的MEM培养液(pH值7.2~7.4)按 10^{-1} 至 10^{-9} 稀释,每个稀释度的培养液接种5个气管环组织培养物,取5个不接种病毒的气管环组织培养物,每个加入稀释液1 mL作为空白对照。置 37°C 温箱内培养6 d后判定结果。

6.2.3 TOC- ID_{50} 结果判定

6.2.3.1 气管环组织培养出现病变的判定

- ++:气管环组织培养物周边无纤毛运动,上皮细胞脱落;
- +:气管环组织培养物周边有50%以上纤毛停止运动,上皮细胞不完全脱落;
- ±:气管环组织培养物周边有50%~99%纤毛停止运动,上皮细胞不脱落;
- :气管环组织培养物周边纤毛运动正常,上皮细胞不脱落。

6.2.3.2 取培养6 d的气管环组织培养物,振荡以除去黏附在培养物黏膜表层的黏性分泌物,置倒置显微镜下观察,并记录结果。判定结果时,以气管环组织培养物表现“+”或“++”的计为感染,以表现“±”或“-”的计为不感染。

6.2.3.3 按Reed-Muench法计算TOC- ID_{50} ,参见附录B。

6.2.3.4 将气管环组织培养(TOC)试验重复再做三次。计算出四次测定结果的几何平均值。该平均值即为该批抗原滴度,置 -70°C 可使用一年,但抗原严禁反复冻融。

6.2.4 气管环组织培养血清中和试验

采用恒量病毒、变量血清的中和试验方法。将待检血清用不含犊牛血清的MEM培养液先作1:10稀释后,再作倍比稀释,如1:2,1:4, ..., 1:256等。取每个稀释度的血清2.5 mL,加入2.5 mL 200个TOC- ID_{50} 病毒,充分混匀后置 37°C 温箱内感作1 h,每个滴度的混合液分别接种于5个气管环组织培养物,使每个气管环组织培养物浸于1 mL混合液中。置 37°C 培养箱内培养6 d后判定结果。

6.2.5 对照

在进行中和试验的同时,设以下对照:

- 病毒对照:将抗原用Hank's液稀释成每个接种剂量含 10^{-2} 个~ 10^2 个TOC- ID_{50} ,每个滴度接种于5个气管环组织培养物,接种量为1 mL;
- 血清毒性对照:将低倍稀释的待检血清加入5个气管环组织培养物,每个加1 mL;

- c) 气管环组织培养物空白对照:取 5 个气管环组织培养物,各加入 1 mL 培养液;
- d) 阳性血清和阴性血清对照:与待检血清进行平行试验,操作步骤同 6.2.4。

6.3 结果判定

6.3.1 气管环组织培养出现病变的结果判定方法参见 6.2.3.1。

6.3.2 对照试验应出现下列结果:

- a) 气管环组织培养物空白对照,应表现为“±”或“-”;
- b) 病毒对照, 10^{-1} 个、 10^{-2} 个 TOC-ID₅₀ 组应出现“±”或“-”,而 10^2 个 TOC-ID₅₀ 组必需出现“++”;
- c) 血清毒性对照,气管环组织培养物应出现“-”;
- d) 阳性对照血清应呈现预期的中和效价,阴性血清无中和效价。

6.3.3 在对照结果正常的情况下,记录气管环组织培养物纤毛运动和上皮细胞脱落的情况,以在病毒血清混合作用后能使气管环组织培养物出现“+”的血清的最高稀释倍数为该血清的终点滴度。按 Reed-Muench 法计算血清的中和效价。

7 综合判定

7.1 IBV 的诊断方法有多种。依据临床症状和病理变化只可作出初步诊断,确诊应依靠实验室检查。病毒的分离与鉴定多用于急性病例的确诊和新疫区的确定,RT-PCR 适用于该病病原的快速诊断。血清学方法可用于 IBV 抗体的检测和血清型的鉴定。微量血凝抑制试验群体水平上进行血清学诊断较易操作、特异性强、敏感性高。气管环组织培养血清中和试验操作复杂,仅适于 IBV 鉴定。

7.2 当在临床上怀疑有 IBV 感染时,可根据实际情况,由上述几种方法中选用一种或两种方法进行确诊,对于未接种过 IBV 疫苗,经任何一种方法检测呈阳性结果时,都可最终判定为 IBV 感染鸡群。对接种过 IBV 疫苗并在疫苗免疫期内的鸡或已超过疫苗免疫期的鸡,当病毒分离鉴定试验为阳性结果时,可终判为 IBV 感染鸡;当仅血清学试验呈阳性结果时,应结合病史和疫苗接种史进行综合判定,不可一律视为 IBV 感染鸡群。

附录 A
(规范性附录)
试剂配制

A.1 pH7.4 磷酸缓冲盐水(PBS)的配制

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	29.02 g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2.96 g
氯化钠(NaCl)	8.5 g

取上述试剂溶于 1 000 mL 蒸馏水中, 68.94 kPa 灭菌 15 min, 4 °C 保存。

A.2 2.0%琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭)

在 100 mL TAE 缓冲液(0.04 mol/L 乙酸, 0.001 mol/L EDTA) 中加入 2.0 g 琼脂糖, 熔化后加入溴化乙锭(EB)至终浓度 0.5 μg/mL 后即可使用(按 1:10 稀释)。

A.3 阿氏液的配制

葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	2.25 g
柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	6.91 g
柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	6.06 g
氯化钠(NaCl)	0.42 g

加蒸馏水至 100 mL, 溶解, 分装, 70 kPa 灭菌 20 min, 4 °C 保存备用。

A.4 Hank's 液的配制

A.4.1 成分

A.4.1.1 母液 A

A.4.1.1.1 溶液 1

氯化钠(NaCl)	100 g
氯化钾(KCl)	8 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2 g
氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	2 g

将上述各成分溶于 800 mL 无离子水中。

A.4.1.1.2 溶液 2

取氯化钙(CaCl_2) 2.8 g, 溶于 100 mL 无离子水中。

A.4.1.1.3 配制

将 A.4.1.1.1 和 A.4.1.1.2 两种溶液混合后, 加无离子水至 1 000 mL, 并加 2 mL 三氯甲烷作为防腐剂, 保存于 0 °C~4 °C 冰箱内。

A.4.1.2 母液 B

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.2 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	3.04 g
葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	8.5 g

将上述三种成分溶于 800 mL 无离子水中, 最后加入 100 mL 0.4% 酚红溶液。加无离子水至 1 000 mL, 加入 2 mL 三氯甲烷防腐, 0 °C~4 °C 保存。

A. 4.2 应用液

取母液 A、B 各 1 份,无离子水 18 份,混匀后 66.94 kPa 灭菌 15 min,置 0℃~4℃ 冰箱内备用。使用时于 100 mL Hank's 液中加 7% 碳酸氢钠调 pH 值至 7.2~7.6。

A. 5 0.4% 酚红液的配制

称取酚红置研钵中,逐渐滴入 0.1 mol/L 氢氧化钠(NaOH),不断研磨至颗粒完全溶解,再加入适量去离子水,使酚红最终浓度为 0.4%。

A. 6 7%NaCO₃ 的配制

称取 7 g 碳酸氢钠溶于 100 mL 去离子水中,68.94 kPa 灭菌 15 min,置 0℃~4℃ 备用。

A. 7 抗菌素溶液的配制

取青霉素 1 000 000 IU、链霉素 1 000 000 μg,用灭菌去离子水配成 100 mL 的上述两种抗菌素的混合液。分装小瓶,于 -20℃ 冻结保存。使用时于 100 mL Hank's 液或培养液中加入此种抗菌素溶液 1 mL。

附录 B

(资料性附录)

TOC-ID₅₀和血清中和效价滴定的 Reed-Meünch 法B.1 TOC-ID₅₀的测定

将病毒液在灭菌的 10 mL 青霉素瓶内作连续的 10 倍稀释,即用 5 mL 吸管吸取 1 mL 病毒液,加入已装有 9 mL 的无血清 MEM 培养液的第 1 个小青霉素瓶内,将混合液充分振荡,并另换一支新的 5 mL 吸管,吹打混合后,吸取 1 mL 移于第 2 瓶 9 mL 的 199 培养液中,更换吸管,如上充分振荡和吹打混匀后,再吸取 1 mL 加入第 3 瓶,连续如此操作,即可做成连续的一系列 10× 稀释液。吸取每一稀释度的病毒液 1 mL,加入含纤毛上皮运动良好的气管环组织培养物的青霉素瓶内,每个稀释度的病毒液接种 5 瓶。于 37 °C 静止培养,逐日观察,共观察 5 d。按表 B.1 所举例子计算 TOC-ID₅₀。

表 B.1 TOC-ID₅₀的测定和计算(Reed-Meünch 法)

病毒液稀释度	观察结果		累 计		TOC 总数	出现病变的瓶数 所占百分率/%
	病变 TOC 数	正常 TOC 数	病变 TOC 数	正常 TOC 数		
10 ⁻¹	↑ 5	↓ 0	28	0	28	100(28/28)
10 ⁻²	↑ 5	↓ 0	23	0	23	100(23/23)
10 ⁻³	↑ 5	↓ 0	18	0	18	100(18/18)
10 ⁻⁴	↑ 5	↓ 0	13	0	13	100(13/13)
10 ⁻⁵	↑ 4	↓ 1	8	1	9	88.9(8/9)
10 ⁻⁶	↑ 3	↓ 2	4	3	7	57.1(4/7)
10 ⁻⁷	↑ 1	↓ 4	1	7	8	12.5(1/8)
10 ⁻⁸	↑ 0	↓ 5	0	12	12	0(0/12)
10 ⁻⁹	↑ 0	↓ 5	0	17	17	0(0/17)

出现病变的 TOC 数和正常 TOC 数分别列于表 B.1 的第 2 列和第 3 列,它们的累计数分别列于第 4 和第 5 列(根据箭头所示方向),第 6 列为 TOC 总数,第 7 列为出现病变的 TOC 数占 TOC 总数的百分率。可见该病毒株的 TOC-ID₅₀在 10⁻⁶(57.1%)和 10⁻⁷(12.5%)之间,其确切稀释倍数可按下列公式计算:

$$\frac{57.1\%(\text{高于 } 50\% \text{ 的百分数}) - 50\%}{57.1\%(\text{高于 } 50\% \text{ 的百分数}) - 12.5\%(\text{低于 } 50\% \text{ 的百分数})} = 0.16$$

因此该病毒的 TOC-ID₅₀应是 10^{-6.16}/mL。查反对数,得 1 445 000,即该病毒 1 445 000 稀释可保护 50%的气管环组织培养物免于出现病变。

B.2 测定血清中和效价的 Reed-Meünch 法

取 200 个 TOC-ID₅₀的病毒液,加入等量不同稀释度的待检血清,充分混合并感作后,接种 TOC,按表 B.2 示例计算血清中和效价。

表 B.2 固定病毒稀释血清法示例

血清稀释度 (病毒量固定)	感染 TOC 数	正常 TOC 数	累 计 和			
			感 染	正 常	感染比例	保护率/%
1 : 4($10^{-0.6}$)	0 ↓	5 ↑	0	11	0/11	100
1 : 16($10^{-1.2}$)	1 ↓	4 ↑	1	6	1/7	85.7
1 : 64($10^{-1.8}$)	3 ↓	2 ↑	4	2	4/6	33.3
1 : 256($10^{-2.4}$)	5 ↓	0 ↑	5	0	5/5	0
1 : 1 024($10^{-3.0}$)	5 ↓	0 ↑	14	0	5/5	0

按 Reed-Meunch 法计算,血清稀释度介于 $10^{-1.2}$ 和 $10^{-1.8}$ 之间时能保护 50% TOC 免受感染。

距离比例 = $(85.7 - 50) / (85.7 - 33.3) = 35.7 / 52.4 = 0.68$

高于 50% 保护率血清稀释度的对数 + 距离比例 × 稀释系数的对数

$= -1.2 + 0.68 \times (-0.6) = -1.2 - 0.41 = -1.61$

-1.61 的反对数 = 1/40, 即 1 : 40 稀释的待检血清可保护 50% 的 TOC 免受感染。