

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1244—2006

接触传染性脓疱皮炎诊断技术

Diagnostic techniques for contagious pustular dermatitis

2006-12-06 发布

2007-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

接触传染性脓疱皮炎(Contagious pustular dermatitis, CPD)又称羊口疮(ORF),是由痘病毒科的副痘病毒引起的绵羊和山羊的一种接触传染性、嗜上皮性疾病,以在口、唇、舌、鼻、乳房等部位形成丘疹、水疱、脓疱和疣状痂皮为特征。该病在我国属于第三类动物疫病,临床上很难与羊痘、口蹄疫区别。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部兽医局提出。

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、西北农林科技大学。

本标准主要起草人:龚振华,张彦明,曲志娜,郑增忍,郭福生,党岩,李会荣。

接触传染性脓疱皮炎诊断技术

1 范围

本标准规定了接触传染性脓疱皮炎病毒分离试验、电镜检查试验、动物接种试验和琼脂凝胶免疫扩散试验的诊断方法。

本标准适用于接触传染性脓疱皮炎临床诊断和实验室鉴定。

2 病原分离

2.1 器材

100 mL 玻璃细胞培养瓶, CO₂ 培养箱, 超净工作台, 离心机, 倒置显微镜。

2.2 溶液配制

2.2.1 试剂

MEM, 犊牛血清, 水解乳蛋白, 谷氨酰胺, 胰蛋白酶(为细胞培养级), 青霉素, 链霉素, 氯化钠, 碳酸氢钠, 氯化钾, 柠檬酸钠(1 个结晶水), 磷酸二氢钠(2 个结晶水), 葡萄糖, 酚红, 磷酸氢二钠(12 个结晶水), 磷酸二氢钾, 硫酸镁(7 个结晶水), 无水氯化钙。

2.2.2 溶液

青链霉素(双抗)溶液, 3% 谷氨酰胺溶液, 7.5% 的碳酸氢钠溶液, 生理盐水, 胎羊皮肤细胞生长液, 胎羊皮肤细胞维持液, Hanks 母液(10 倍浓缩液), 0.01 mol/L PBS 溶液, 0.25% 胰蛋白酶溶液, 犊牛睾丸细胞生长液, L-H 溶液, 犊牛睾丸细胞维持液。溶液配制方法按附录 A 执行。

2.2.3 原代胎羊皮肤细胞或羊、犊牛睾丸细胞, 制备按附录 B 执行。

2.3 样品的准备

2.3.1 样品的采集

2.3.1.1 采集病羊的口、唇、乳房等部位的痂皮, 置于放有干燥剂(硅胶或其他干燥剂)的灭菌烧杯中, 置冰盒内送检。

2.3.1.2 采集未破裂的丘疹、水疱液, 置含有 0.01 mol/L PBS 缓冲液的灭菌试管中, 置冰盒内送检。0.01 mol/L PBS 缓冲液的体积不能超过丘疹、水疱液体积的 2 倍。

2.3.2 样品的处理

2.3.2.1 将痂皮剪碎, 研磨, 按 1:5 的比例(W/V)稀释于 0.01 mol/L PBS 缓冲液中, 加双抗(青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 mg/mL), 制成悬液。4℃ 浸渍 16 h~20 h, 以 3 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 过滤备用。

2.3.2.2 丘疹、水疱液加双抗(青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 mg/mL), 离心取上清液, 稀释、过滤备用。

2.4 病毒分离培养

2.4.1 取 2.3.2 处理好的样品 1 mL, 接种单层胎羊皮肤细胞或犊牛睾丸细胞, 37℃ 吸附 1 h, 中间摇动一次。

2.4.2 吸附完后每瓶加入 9 mL 维持液, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.4.3 每天观察细胞病变效应(CPE), 连续观察 5 d。如果接毒后 1 d~5 d 内出现细胞变圆、肿胀, 细胞间质增宽, 折光性增强, 细胞脱落等病变, 立即收毒, 用方法 5 进行鉴定。如果盲传 3 代无 CPE, 则判

为病毒分离阴性。

3 病毒的电镜检查

3.1 器材

电镜,普通平皿,滤纸,毛细管。

3.2 试剂

pH6.8的2%磷钨酸溶液,见附录C。

3.3 样品采集和处理

方法与2.3相同,或将2.4的CPE培养液反复冻融3次,3000 r/min离心30 min,取上清液备用。

3.4 试验程序

用毛细管吸少量3.3中的样品或2.4的CPE培养液,直接滴在有支持膜的网上,悬液在网上呈半球形。2 min~3 min后,用一片干净滤纸从网边吸去液体。用另一毛细管吸一滴磷钨酸染液滴在网上染色1 min。用滤纸吸去染液,立即进行电镜观察或置干燥器内短期保存。

3.5 结果判定

电镜内发现有椭圆形的线团样病毒粒子或发现表面有绳索样结构、以“8”字形相互交织排列的病毒粒子,用方法5进行鉴定。

4 动物接种试验

4.1 试验程序

取样品上清液(见方法2.3)或经细胞培养出现CPE的细胞培养液(见方法2.4)0.2 mL,划痕接种健康3~5月龄羔羊唇黏膜。

4.2 结果判定

若接种后3 d~4 d出现划线红肿,5 d~7 d出现水疱或脓疱等典型的临床症状,用方法5进行鉴定。若无症状,则判为阴性。

5 琼脂凝胶免疫扩散试验

5.1 器材

直径6 cm普通平皿,内径4 mm打孔器,微量加样器,37℃恒温箱。

5.2 试剂

标准阳性抗原、标准阳性血清,1%的琼脂凝胶,配制方法见附录D。

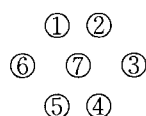
5.3 样品采集和处理

方法与2.3相同,或经细胞培养出现CPE的培养液(2.4)。

5.4 试验方法

5.4.1 用pH7.2、0.01 mol/L PBS缓冲液配制1%的琼脂凝胶,琼脂融化后,待温度达到50℃左右时,倾注于预先准备好的灭菌平皿内,厚度4 mm,待凝固后备用。

5.4.2 用内径4 mm的打孔器在已凝固的琼脂凝胶平皿上打梅花孔(排列如下图所示)。孔距为3 mm,打孔后用针挑出切下的琼脂块,火焰封底。



5.4.3 用微量加样器吸取抗原或血清滴于孔内:中间孔滴加标准阳性血清,周围的1、3、5孔滴加被检样品,2、4、6孔滴加标准阳性抗原,所有孔以加满不溢出为度。加样后静置10 min,放入37℃湿盒中进

行反应。

5.4.4 分别在 24 h、48 h、72 h 观察并记录结果。

5.5 结果判定

判定时将琼脂平皿置于暗背景或侧强光照射下观察。

5.5.1 标准阳性血清和标准阳性抗原之间出现一条清晰的白色沉淀线,则认为试验可以成立,若无沉淀线或沉淀线不明显,则本试验不能成立,应重做。

5.5.2 被检样品与标准阳性血清之间出现明显清晰白色沉淀线,该沉淀线与标准阳性抗原孔和阳性血清之间的沉淀线末端相融合,被检样品判为阳性。

5.5.3 被检样品孔与标准阳性血清之间无沉淀线,标准阳性抗原和阳性血清之间的沉淀线直伸被检样品孔边,被检样品判为阴性。

5.5.4 被检样品孔与标准阳性血清孔之间不形成完整的沉淀线,但标准阳性抗原孔与标准阳性血清之间的沉淀线在被检样品孔端向标准阳性血清孔侧弯曲,该被检样品判为弱阳性,应重复试验,若重复仍为弱阳性反应则判为阳性。

5.5.5 在标准阳性血清与检测样品孔之间的沉淀线粗而混浊,该沉淀线与标准阳性抗原与标准阳性血清之间的沉淀线交叉并直伸抗原孔边时则认为非特异性反应,应重复试验,若重复仍为交叉,被检样品判为阴性。

5.5.6 凡在试验后 24 h、48 h、72 h 出现沉淀线时,应如实记录,并判定结果;凡在 72 h 仍未出现沉淀线时,则被检样品判为阴性。

6 综合判定

6.1 按 5 对样品上清液(见 2.3)或经细胞培养出现 CPE 的细胞培养液(见 2.4)检测为阳性时,则判定动物感染接触传染性脓疱皮炎病毒。

6.2 用 3 或 4 判为阳性的样品,经 5 试验确认为阳性结果,则判定动物感染接触传染性脓疱皮炎病毒。

6.3 用 5 判为阴性的样品,则判定动物未感染接触传染性脓疱皮炎病毒。

附录 A
(规范性附录)
病毒分离试剂

A.1 胎羊皮肤细胞生长液

MEM	35 mL(按常规方法配制)
犊牛血清	30 mL
L-H(0.5%水解乳蛋白-Hank's液)	35 mL
双抗溶液	1 mL
3%谷氨酰胺	1 mL

用7.5%的碳酸氢钠调pH至7.0~7.2。置4℃保存。

A.2 青链霉素(双抗)溶液

青霉素	1 000 000 IU
链霉素	1 000 000 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.3 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.4 7.5%的碳酸氢钠溶液

碳酸氢钠(NaHCO ₃)	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 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(一个结晶水)(NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	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

上述试剂依次溶于量筒中。胰酶用少量水调化后加入一部分水置37℃温箱中水浴溶解1 h(时间

视溶化程度定,需透彻清亮),溶解的胰酶倒入量筒中,用7.5%的碳酸氢钠调pH至7.6~7.8,定容至1 000 mL后过滤除菌,分装小瓶,并作菌检,置-20℃冰箱保存。

A.6 胎羊皮肤细胞维持液

MEM	40 mL
L-H	40 mL
犊牛血清	20 mL
双抗溶液	1 mL
3%谷氨酰胺	1 mL

置4℃保存备用。

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 犊牛睾丸细胞生长液

MEM	20 mL
L-H	70 mL
双抗溶液	1 mL
3%谷氨酰胺	1 mL
犊牛血清	10 mL

临用前用7.5%的碳酸氢钠溶液调pH为7.0~7.2,4℃保存备用。

A.9 Hanks 母液(10 倍浓缩液)

氯化钠(NaCl)	80 g
12 水磷酸氢二钠(12 个结晶水)($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.6 g
氯化钾(KCl)	4.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.6 g
7 水硫酸镁(7 个结晶水)($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g
葡萄糖	10.0 g
无水氯化钙(CaCl_2)	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。等其他药品溶解后,加入混匀,定容至1 000 mL。

A.10 L-H(0.5%水解乳蛋白-Hanks 液)

水解乳蛋白	5 g
Hanks 母液(10 倍浓缩液)	100 mL
0.5%酚红	4 mL
双蒸水	896 mL

68.9 kPa 高压 10 min,置4℃冰箱中保存。

A.11 犊牛睾丸细胞维持液

MEM	48 mL
L-H	48 mL
双抗溶液	1 mL
3%谷氨酰胺	1 mL
犊牛血清	2 mL

临用前用 7.5% 的碳酸氢钠溶液调 pH 为 7.0~7.2, 4℃ 保存备用。

A.12 0.01 mol/L PBS 溶液

0.2 mol/L PB	50 mL
氯化钠(NaCl)	8.5 g
双蒸水	加至 1 000 mL

A.12.1 pH7.2、0.2 mol/L PB 溶液

溶液甲	28 mL
溶液乙	72 mL

混合后,置室温保存备用。

A.12.2 溶液甲

磷酸氢二钠(12个结晶水)($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	71.632 g
双蒸水	1 000 mL

A.12.3 溶液乙

磷酸二氢钠(2个结晶水)($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	31.2 g
双蒸水	1 000 mL

附 录 B
(资料性附录)
细 胞 培 养

B.1 胎羊皮肤细胞的培养

B.1.1 无菌取健康胎羊腹部或后肢内上侧皮肤小块,放入灭菌平皿中,用眼科剪刀剪成 $0.5\text{ mm}^3 \sim 1\text{ mm}^3$ 的小块。

B.1.2 用含双抗(青霉素 100 IU/mL ,链霉素 100 mg/mL)的灭菌生理盐水(见附录 A)冲洗数次,直至无血液,用 Hanks 液(见附录 A)冲洗 3 次,倒掉 Hanks 液后移入灭菌三角烧瓶内。

B.1.3 加入皮肤组织 4 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶洗 2 次,第 3 次加入胰蛋白酶后放入 37°C 恒温水浴箱中消化 30 min 。

B.1.4 用吸管吸出胰酶,加入 Hanks 液反复吹打,使成细胞悬液,用 4 层纱布过滤。

B.1.5 滤液 $2\ 000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,取细胞沉淀用生长液(见附录 A)悬浮,分装于 100 mL 细胞瓶 ($4 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 细胞/ mL),于 37°C 、 5% CO_2 培养箱中培养。

B.2 犊牛睾丸细胞的培养

B.2.1 无菌采取 1~3 日龄健康黑白花犊牛睾丸,直接放入灭菌平皿中,用含双抗(青霉素 100 IU/mL 、链霉素 100 mg/mL)的灭菌生理盐水冲洗 4 次,直至无血液。

B.2.2 取出睾丸,放入平皿内,用眼科剪刀和镊子去掉白膜,将实质置于一灭菌烧杯中,加入双抗溶液(青霉素 $10\ 000\text{ IU/mL}$ 、链霉素 $10\ 000\text{ mg/mL}$)冲洗一次。

B.2.3 倒出液体,将实质剪碎,用 Hanks 液冲洗 4 次,加入实质 4 倍体积的 0.25% 的胰蛋白酶溶液冲洗 2 次,第 3 次加入胰酶后放入 37°C 恒温水浴箱中消化 20 min 。

B.2.4 用吸管吸出胰酶,加入 Hanks 液少许,用吸管反复吹打,使细胞分散悬浮。

B.2.5 用 4 层纱布过滤,滤液以 $2\ 000\text{ r/min}$ 离心 15 min ,去上清,用生长液悬浮细胞,分装于细胞瓶 ($4 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 细胞/ mL),于 37°C 、 5% CO_2 培养箱中培养。

附 录 C
(规范性附录)
电 镜 检 查 试 剂

C.1 2%磷钨酸

磷钨酸	2 g
蒸馏水	定容至 100 mL

用 1 mol/L 的氢氧化钠调 pH 为 6.8, 滤过后盖紧瓶盖, 4℃ 储存。

附 录 D
(规范性附录)
琼脂凝胶免疫扩散试剂

D.1 1%琼脂凝胶

琼脂	1 g
0.01 mol/L PBS 溶液	100 mL

混匀加热融化,待温度达 50℃左右时,倒平板。凝固后倒置于 4℃ 储存。
