ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 575—2002

牛传染性鼻气管炎诊断技术

Diagnostic techniques for infectious bovine rhinotracheitis

2002-08-27 发布 2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前　言

牛传染性鼻气管炎(infectious bovine rhinotracheitis，简称 IBR)是由牛疱疹病毒 1 型(BHV-1)感染家养牛和野生牛引起的一种病毒性传染病，被世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英)，Office International des Epizooties(法)，OIE]列为 B 类疾病，我国农业部列为二类动物疫病。该病广泛分布于世界各地，该病死亡率较低，许多感染牛呈亚临床症状经过，往往由于细菌继发感染导致更为严重的呼吸道疾病。本标准所规定的技术与 OIE 推荐的相应技术一致。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

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：农业部动物检疫所。

本标准主要起草人：封启民、李昌琳、李晓成、李其平。

牛传染性鼻气管炎诊断技术

1 范围

本标准规定了牛传染性鼻气管炎(IBR)诊断技术要求。

本标准规定的病毒分离方法适用于牛传染性鼻气管炎病毒的分离;微量血清中和试验和酶联免疫吸附试验适用于牛群检疫、流行病学调查及牛群抗体水平的检测。

2 牛传染性鼻气管炎病毒分离鉴定

2.1 材料准备

2.1.1 病料的采集

2.1.1.1 呼吸道拭子:用灭菌拭子伸入鼻道采取分泌物,然后放入含青霉素1 000 IU/mL,链霉素1 000 μg/mL,pH7.2 的 Earles 液中。也可用棉拭子刮取眼分泌物,并用相同的方法处理。

2.1.1.2 阴道拭子:用棉拭子采集脓疱性外阴阴道炎早期病变的阴道黏液,放入含青霉素1 000 IU/mL,链霉素1 000 μg/mL,pH7.2 的 Earles 液中。

2.1.1.3 脑组织样品:在剖检时无菌采集脑组织。

2.1.1.4 流产胎儿组织样品:刚死亡的胎儿,无菌采集肺、肾、脾等各种组织样品,放入每 1.0 mL 含有 1 000 IU 青霉素,1 000 μg 链霉素,pH7.2 的 Earles 液中。

2.1.1.5 精液:至少采集新鲜精液,或冷冻精液 0.5 mL,置液氮中保存备用。

2.1.2 样品的运送

采集的样品立即放入 4℃冰箱保存,在 24 h 内送到实验室。

2.1.3 样品处理

2.1.3.1 收到棉拭子样品后,先经冻融两次,并充分振动,拧干棉拭子,将样品液经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为组织培养的接种分离材料。

2.1.3.2 组织样品先用 Earles 液或 Hanks 液(pH7.2)制成 20%的匀浆悬浮液,再经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为接种分离材料。

2.1.3.3 精液冻融两次或超声波裂解,再经 10 000 r/min 离心 10 min,新鲜精液通常对细胞有毒性,在接种前应预先作稀释处理,用 Earles 液作 1∶15 稀释。

2.2 操作方法

样品接种:取经处理过的样品 0.2 mL 接种到已形成良好单层的牛肾或睾丸原代或次代细胞培养瓶中。每份样品接种 4 瓶,于 37℃吸附 1 h 后,倾去接种液,用 Earles 液洗三次,最后加入含 3%(不含 IBR 抗体)的犊牛血清细胞维持液 1 mL。置 37℃培养,逐日观察细胞病变;若 7 天仍不出现致细胞病变,则收获培养物继代于新制备的细胞上,盲传三代后,观察细胞病变,出现病变者收获培养物,保存于 −70℃待鉴定。

2.3 病毒鉴定

病毒致细胞病变特点是细胞变圆,聚合,呈葡萄串状、拉网状,最后脱落。取出现上述病变的细胞培养物,经冻融、裂解两次后,以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清再作下列试验。

2.3.1 **组织培养感染剂量($TCID_{50}$)的测定**

按 Reed-Muench 方法测定,计算分离物 $TCID_{50}$终点。

2.3.2 **分离物作血清中和试验**

用 IBR 标准阳性血清(效价 1∶32 以上)和阴性血清分别与该分离物作中和试验(固定血清-稀释病毒法)按 Reed-Muench 法分别计算 $TCID_{50}$。

如分离物引起典型的 IBR 细胞病变,并且经血清中和试验,其阳性血清组和阴性血清组的 $TCID_{50}$ 对数之差≥2.5,则判该分离物为 IBR 病毒。

3 微量血清中和试验

3.1 材料准备

3.1.1 **器材**

灭菌的 96 孔细胞培养板,50 μL、100 μL、300 μL 微量移液器,灭菌的塑料滴头,无毒透明胶带(其宽度与培养板一致),灭菌的塑料锥形带盖离心管,倒置显微镜。

3.1.2 **试验材料**

IBR Baitha-Nu/67 弱毒株冻干毒,标准阳性血清,标准阴性血清。

3.1.3 **细胞培养液**

细胞培养液的配制方法见附录 A(规范性附录)。

3.1.4 **细胞**

无菌采取犊牛肾或睾丸,按常规胰蛋白酶消化法制备牛肾(BK)或睾丸(BT)细胞,置 37℃温箱培养,长成良好单层备用,一般使用继代细胞,但不超过 4 代,传代细胞系(MDBK)也可使用。

3.1.5 **病毒抗原制备**

将 IBR Baitha-Nu/67 弱毒株冻干毒用 L-E 细胞培养液(0.5%水解乳蛋白-Earle 液)作 10 倍稀释,长成良好单层的 BK 或 BT 细胞瓶,用 Earles 液洗二次后,按原培养液十分之一量接毒,置 37℃温箱吸附 1 h,然后加入 pH7.1～7.2 内含青霉素 200 IU/mL,链霉素 200 μg/mL 的 L-E 液至原培养液量,37℃培养,待 80%～90%细胞出现典型的 IBR 病变时收获培养物,冻融两次后,以 3 000 r/min 离心 20 min,其上清液即为病毒抗原。测定病毒滴度($TCID_{50}$)并分装小瓶,每瓶 1 mL,做好标记和收毒日期,贮存于－70℃备用。半年内病毒滴度保持不变。

3.1.6 **病毒滴度测定**

将制备的病毒抗原,用 pH7.0～7.2 L-E 液作 10 倍递增稀释至 10^{-7},每一个滴度接种细胞培养板 4 孔,每孔 50 μL。随后每孔加入细胞悬液(含 50 万～60 万细胞/mL)100 μL 和细胞培养液 50 μL。设 4 孔细胞对照,用透明胶带封板,置 37℃培养,观察一周,每天记录细胞病变情况。

50%细胞培养物感染量($TCID_{50}$):按 Reed-Muench 方法计算。

即 $TCID_{50}$＝50%百分数的病毒稀释度的对数＋距离比值×稀释系数(10)的对数。

$$\text{距离比值}=\frac{\text{高于 }50\%\text{的百分数}-50}{\text{高于 }50\%\text{的百分数}-\text{低于 }50\%\text{的百分数}}$$

3.1.7 **被检血清**

无菌采集分离血清,不加任何防腐剂。

3.2 操作方法

3.2.1 血清均于水浴中 56℃灭活 30 min。

3.2.2 将一瓶已知滴度 IBR 病毒抗原,用 pH7.0～7.2 L-E 液稀释成含 100$TCID_{50}$/50 μL。

3.2.3 取 0.3 mL 病毒悬液与等量的被检血清于塑料锥形管(或小试管中)中混合,置 37℃温箱中和 1 h。

3.2.4 将已中和的被检血清-病毒混合物加入培养板孔内,每个样品接种 4 孔,每孔 100 μL。

3.2.5 于每一样品孔加入 100 μL 细胞悬液，用透明胶带封板，置 37℃温箱培养。

3.2.6 每次试验时需设以下对照。

a) 标准阳性血清加抗原和标准阴性血清加抗原对照，其操作程序同 3.2.4、3.2.5；

b) 被检血清毒性对照：每份被检血清样品接种 2 孔，每孔 50 μL，再加细胞悬液 100 μL；

c) 细胞对照：每孔加 100 μL 细胞悬液，再加细胞培养液 100 μL。

3.2.7 实际使用病毒抗原工作量测定。将病毒抗原工作液（100$TCID_{50}$/50 μL）作 10 倍递增稀释至 10^{-3}，取病毒抗原工作液及每个稀释度接种 4 孔，每孔 50 μL，加细胞培养液50 μL，再加细胞悬液 100 μL，按 Reed-Muench 方法，计算本次试验 $TCID_{50}$/50 μL的实际含量。

3.3 结果判定

3.3.1 判定方法

接种后 72 h 判定结果。当病毒抗原工作液对照，标准阴性血清对照均出现典型细胞病变；标准阳性血清对照无细胞病变，被检血清对细胞无毒性，细胞对照正常，病毒抗原实际含量在 30$TCID_{50}$～300$TCID_{50}$时，方能判定，否则被认为无效。

3.3.2 判定标准

未经稀释的被检血清能使 50%或 50%以上细胞孔不出现病变者判为阳性。

4 酶联免疫吸附试验

4.1 材料准备

4.1.1 抗原

标准阴性血清，阳性血清和抗牛免疫球蛋白-辣根过氧化物酶标记抗体。

4.1.2 溶液

抗原包被缓冲液、封闭液、洗涤液、底物溶液和终止液，配制方法见附录 B(规范性附录)。

4.1.3 器材

聚苯乙烯酶标反应板，酶标仪，微量可调移液器(20 μL～200 μL)和滴头。

4.2 操作方法

4.2.1 抗原包被

用包被缓冲液将抗原稀释至工作浓度包被反应板，每孔 150 μL，4℃包被 12 h，包被板置 4℃下 30 d 内均可使用。

4.2.2 洗板

甩掉孔内的包被液，注满洗涤液，再甩干，如此连续操作五遍。

4.2.3 封闭

每孔注满封闭液，置 37℃封闭 90 min，然后按 4.2.2 洗涤。

4.2.4 加样

标准阴、阳性血清和被检血清均用封闭液作 100 倍稀释，每份被检血清加 2 孔，每孔 150 μL。每块板均设标准阴、阳性血清及稀释液对照各 2 孔。加样完毕后封板，放 37℃孵育 1 h，再按 4.2.2 洗涤。

4.2.5 加酶标记抗体

每孔加入用封闭液稀释至工作浓度的酶标记抗体 150 μL。置 37℃再孵育 1 h，按 4.2.2 洗涤。

4.2.6 加底物

每孔加底物溶液 150 μL，置室温(20℃左右)避光反应 20 min。

4.2.7 终止反应

每孔加终止液 25 μL。

4.3 结果判定

4.3.1 *P*/*N* 比法：被检样品(*P*)的吸光度值和阴性标准样品(*N*)值之比。

$P/N<1.50$　判为阴性

$2.0>P/N>1.50$　判为可疑

$P/N\geqslant2.0$　判为阳性

4.3.2　目视比色法：被检血清孔近于或浅于标准阴性血清孔者判为阴性；略深于标准阴性血清孔者判为可疑；明显深于标准阴性血清孔者判为阳性。

4.3.3　凡可疑被检血清均应重检，仍为可疑时，则判为阴性。

附 录 A
（规范性附录）
细胞培养液配制

最低要素培养基（MEM）	45%
0.5%水解乳蛋白-Earle's 液（L-E）	45%
犊牛血清	10%
谷氨酰胺	0.03%
青、链霉素	200 IU/mL

混合后用碳酸氢钠（$NaHCO_3$）调至 pH6.8～7.0。

附 录 B
（规范性附录）
酶联免疫吸附试验试剂的配制

B.1 包被缓冲液（pH9.6 碳酸盐缓冲液）

碳酸钠（Na_2CO_3）	1.59%
碳酸氢钠（$NaHCO_3$）	2.93%
氯化钠（NaCl）	7.30%

加无离子水至 1 000 mL。

B.2 洗涤液（pH7.4，0.05%吐温-磷酸盐缓冲液）

磷酸二氢钾（KH_2PO_4）	0.20 g
磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$）	2.90 g
氯化钾（KCl）	0.20 g
氯化钠（NaCl）	8.20 g
吐温-20（Tween-20）	0.5 mL

加无离子水至 1 000 mL。

B.3 封闭液的配制

三羧甲基氨基甲烷（Tirs）	6.06 g
氯化钠（NaCl）	8.80 g
乙二胺四乙酸二钠（EDTA）	0.37 g

加无离子水至 1 000 mL。

用 1 mol/L 盐酸调 pH 至 7.4，临用前加入吐温-20（Tween-20）和健康马血清，使终浓度分别达 0.1%和 3%。

B.4 底物溶液

磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）	7.30 g
柠檬酸（$C_6H_8O_2 \cdot H_2O$）	5.10 g

加无离子水至 1 000 mL。

临用前称 40 mg 邻苯二胺溶解在 100 mL 上述溶液中，完全溶解后再加 0.15 μL 3%过氧化氢(H_2O_2)，混合后立即使用。

B.5 终止液〔2 mol/L 硫酸(H_2SO_4)〕的配制

浓硫酸	22.2 mL
无离子水	177.8 mL