



中华人民共和国国家标准

GB/T 18935—2003

口蹄疫诊断技术

Diagnostic techniques for foot-and-mouth disease

2003-01-10 发布

2003-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局

发布

前 言

口蹄疫(food-and-mouth disease,简称 FMD)是哺乳动物的一种接触烈性传染病,可引起易感偶蹄兽潜在的严重经济损失。被世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizooties(法),OIE]列为 A 类疾病,我国列为一类动物疫病。FMD 病毒有 7 个血清型,分别为 O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3 和 Asial。本病临床上表现为口、舌、唇、鼻、蹄、乳房等部位发生水泡、破溃形成烂斑。FMD 在临床上不易与其他水泡性疾病(猪水泡病、水泡性疹和水泡性口炎)区别。

本标准的诊断方法参考 OIE《诊断试验和疫苗标准手册》(2000 版)的推荐方法,并结合我国有关动物防疫法,以及相关政策和法规制定的。在技术上与国际先进技术保持一致。其中病毒中和试验、液相阻断-酶联免疫吸附试验是国际贸易指定试验。

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 是规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:朱彩珠、卢永干。

口蹄疫诊断技术

1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)的微量补体结合试验、食道探杯查毒试验、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR),病毒中和试验、液相阻断-酶联免疫吸附试验、病毒感染相关抗原(VIA)琼脂凝胶免疫扩散(AGID)试验的技术要求。

本标准所规定的试验技术适用于检测各种不同样品中的口蹄疫病毒抗原或抗体。

2 微量补体结合试验

2.1 材料

2.1.1 样品采集和抗原制备

2.1.1.1 样品的采集、保存和运送的方法和要求见附录 A。

2.1.1.2 抗原制备:在无菌室内将水泡皮或乳鼠胴体用磷酸盐缓冲液(PBS)洗净,用灭菌滤纸吸干后称重。放在灭菌研钵中先剪碎,后加灭菌石英砂研磨。加磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.4)制成1:4悬液。水泡液也以PBS作1:4稀释,可与组织悬液合并。室温浸毒2h以上,或4℃冰箱过夜。3 000 r/min离心10 min。分离出上清液;58℃水浴灭活40 min。再3 000 r/min离心10 min。取上清液为待检抗原。

2.1.2 抗体

口蹄疫病毒O、A和亚洲-1型,及猪水泡病病毒(SVDV)豚鼠高免血清。

2.1.3 补体

健康成年公豚鼠新鲜血清。加保存液(Richardson'液)后,可4℃保存6个月。使用前滴定效价。

2.1.4 溶血素

兔抗绵羊红细胞抗血清,使用前滴定效价。

2.1.5 红细胞

成年健康绵羊红血球。试验当天制备2.8%工作液和敏化红细胞。

2.1.6 主要仪器和器材

“U”形底96孔微量滴定板,微量可调移液器及配套尖头,转头经改装可插入微量板的离心机,光电比色计。

2.1.7 缓冲液配制方法(见附录B)

2.2 预备试验

2.2.1 2.8%红细胞悬液的制备

将脱纤的(绵羊)红细胞用VBD洗涤3次。每次加5倍于红细胞体积的VBD轻摇混匀,1 500 r/min离心10 min。吸去上清液后再加入VBD,反复3次。最后吸取2.8 mL红细胞泥加入盛有97.2 mL VBD的三角瓶中,充分混匀。取0.5 mL红细胞悬液,加4.5 mL蒸馏水。对照管加5 mL蒸馏水。用波长625 nm滤光片的光电比色计测定该初配制的红细胞悬液的OD值。按标准2.8%红细胞悬液的标准OD值=42,用式(1)校正该初配红细胞悬液的浓度。

$$\text{应加缓冲液的总数(mL)} = \frac{\text{初配红细胞悬液用VBD量(mL)} \times \text{OD值}}{\text{标准OD值(42)}} \times (1)$$

例如:初配红细胞悬液 100 mL 测定 OD 值=45(大于标准值 42)。

按公式计算 $[97.2 \times 45] \div 42 = 104, 104 - 97.2 = 6.8$, 即应补加 6.8 mL 缓冲液于红细胞悬液中, 再测 OD 值将符合标准值 42。

若初配红细胞悬液的 OD 值小于 42, 可将该红细胞悬液离心, 根据式(1)计算取出多余的缓冲液, 再测 OD 值。

2.2.2 0%~100%溶血标准孔按如下方法制备

2.2.2.1 血红蛋白:取 1 mL 2.8%红细胞悬液, 加 7 mL 蒸馏水, 充分摇动直到红细胞全部溶解。再加 2 mL VB, 混匀。

2.2.2.2 0.28%红细胞:取 1 mL 2.8%红细胞悬液, 加 9 mL VBD, 混匀。

表 1 标准溶血百分比

单位为微升

孔位	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
血红蛋白	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
0.28%红细胞	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0
溶血百分比	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

2.2.2.3 溶血标准孔的制备:按表 1 所列剂量将血红蛋白和红细胞悬液加入微量板 A1~A11 各孔。1 000 r/min 离心 10 min。A6 孔为 50%溶血孔, 其红细胞沉淀图形的大小和溶血颜色深浅(OD 值)作为微量补体结合试验判定的比对标准。

2.2.3 棋盘式滴定溶血素/补体

2.2.3.1 稀释溶血素

a) 1:100 稀释液:0.1 mL 溶血素加 9.9 mL VBD。

b) 按表 2 所示方法, 制备 8 个溶血素稀释液。

表 2 溶血素稀释液制备

单位为毫升

管号	溶血素浓度	溶血素量	VBD 量	溶血素稀释度	溶血素最终浓度
A	1:100	1.0	1.5	1:250	1:500
B	1:100	0.5	2.0	1:500	1:1000
C	1:100	1.0	9.0	1:1000	1:2000
D	1:1000	2.0	1.0	1:1500	1:3000
E	1:1000	1.5	1.5	1:2000	1:4000
F	1:1000	1.0	1.5	1:2500	1:5000
G	1:1000	0.5	1.0	1:3000	1:6000
H	1:1000	0.5	1.5	1:4000	1:8000

2.2.3.2 制备敏化红细胞

a) 取 8 支试管, 写明标签 A~H。将上述 8 个溶血素稀释液分别取 1 mL 移入相应编号的试管中。

b) 各管再加入 1 mL 标准化的 2.8%红细胞悬液。混匀。溶血素最终浓度如表 2 所列。

c) 25℃温育 20 min。

2.2.3.3 稀释补体

a) 1:10 稀释补体:0.5 mL 新鲜补体(豚鼠血清)加 4.5 mL VBD。或 0.5 mL 保存补体加 3.5 mL 蒸馏水, 就是 1:10 稀释补体。

b) 按表 3 所示, 制备 12 个补体稀释液。

表3 补体稀释液制备

单位为毫升

管号	稀释用补体浓度	补体加入量	VBD量	补体最终浓度
1	1:10	2.0	3.0	1:25
2	1:10	1.0	4.0	1:50
3	1:25	1.0	2.0	1:75
4	1:50	1.5	1.5	1:100
5	1:25	0.5	2.0	1:125
6	1:50	1.0	2.0	1:150
7	1:25	0.5	3.0	1:175
8	1:100	1.0	1.0	1:200
9	1:50	0.5	2.0	1:250
10	1:150	1.0	1.0	1:300
11	1:175	1.0	1.0	1:350
12	1:100	0.5	1.0	1:400

2.2.3.4 棋盘式滴定

2.2.3.4.1 用“U”形底微量板。首先每孔(全部96孔)加50 μL VBD缓冲液。

2.2.3.4.2 将12个补体稀释液移入微量板1列~12列。即将管1(1:25稀释)补体加入第1列(A1~H1)8孔,每孔50 μL;将管2(1:50稀释)补体加入第2列(A2~H2)8孔,每孔50 μL;依此类推,将12管补体分别加入12列各孔中。

2.2.3.4.3 将8管以8个不同浓度溶血素敏化的红细胞悬液依次加入微量板A~H行。即将A管(溶血素1:500稀释)敏化红细胞加入A行(A1~A12)12孔,每孔25 μL;将B管(溶血素1:1000稀释)敏化红细胞加入B行(B1~B12)12孔,每孔25 μL;依此类推,直至8管敏化红细胞分别加入8行各孔中。

2.2.3.4.4 37℃振荡40 min。1000 r/min离心10 min。

2.2.3.4.5 结果判定:确定补体最高稀释度时,引起50%溶血的溶血素最高稀释度。该补体最高稀释度(如1:200),即为补体效价,4倍效价为补体工作液(1:50)。该溶血素最高稀释度(如1:2000)即为溶血素效价。2倍效价为溶血素工作液(1:1000)。

2.3 定型补体结合试验

2.3.1 布局:通常牛病料鉴定“O”和“A”两个型,某些地区的病料加上“亚洲-1”型。定型布局如表4所列。A1~A4为“O”型,B1~B4为“A型”。A5、A6为“O”“A”型血清对照,B7为抗原对照,A8为补体对照,A9为空白对照。

表4 定型补体结合试验布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	○	○	○	○	◇	◆		△	※
B	●	●	●	●			◎		

2.3.2 操作步骤:补体结合试验各试剂加入量和次序列于表5。

2.3.2.1 加VBD稀释液

A2~A4、B2~B4 每孔各加25 μL;

对照A5、A6、B7孔各加25 μL;A8孔加50 μL;A9孔加100 μL。

2.3.2.2 加高免抗血清

- a) 稀释血清:将“O”、“A”两型血清分别以 VBD 作 1 : 8 稀释。
- b) A1、A5 孔加 1 : 8“O”型血清 25 μ L/孔, A2 孔加 50 μ L/孔。
B1 孔加 1 : 8“A”型血清 25 μ L/孔, B2 孔加 50 μ L/孔。

表 5 FMDV 微量补体结合试验

单位为微升

血清型	O				A				对照				
孔号	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	A5	A6	B7	A8	A9
血清稀释度	1 : 8	1 : 12	1 : 18	1 : 27	1 : 8	1 : 12	1 : 18	1 : 27	1 : 8	1 : 8	—	—	—
缓冲液	0	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25	50	100
高免血清量	25	50	50	50 弃 50	50	50	50	50 弃 50	25	25	—	—	—
被检抗原	25	25	25	25	25	25	25	25	—	—	25	—	—
补体量	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	—
37℃振荡 60 min													
敏化红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
37℃振荡 30 min													
结果	+	—	—	—	++++	++++	++	+	—	—	—	—	++++
注: “—”完全溶血; “++++”完全不溶血, “++”50%溶血, “+”75%溶血。													

c) 从 A2→A4 孔作 1 : 1.5 连续稀释:用微量移液器先将 A2 孔中的 25 μ L VBD 和 50 μ L 血清混匀,然后吸出 50 μ L 移入 A3 孔;混匀后再吸出 50 μ L 移入 A4 孔;混匀后吸出 50 μ L 弃去。A1→A4 孔的血清稀释度分别为 1 : 8、1 : 12、1 : 18、1 : 27。B2→B4 孔作同样连续稀释。

2.3.2.3 加抗原:除对照 A5、A6、A8、A9 孔外,各孔加待检样品 25 μ L。

2.3.2.4 加补体:除空白对照 A9 孔外,各孔加补体工作液 50 μ L。

2.3.2.5 37℃振荡 60 min。

2.3.2.6 制备敏化红细胞和加样:2.8%红细胞悬液与溶血素工作液等体积混合,25℃敏化 20 min。各反应孔加 25 μ L/孔。

2.3.2.7 37℃振荡 30 min,1 000 r/min 离心 30 min。

2.4 结果判定

2.4.1 试验成立的条件

- a) 当空白对照孔(A9)完全不溶血(++++);
- b) 补体对照孔(A8)完全溶血(—);
- c) 血清对照孔(A5 和 A6)和抗原对照孔(B7)完全溶血(—),试验才成立。

2.4.2 判定血清型

2.4.2.1 若某血清型 4 孔完全溶血(—),或仅含最高浓度血清的第 1 孔,被阻止溶血不足 50%,如表 5 所示 A1~A4 孔,则判定为“阴性”,即不是“O”型。

2.4.2.2 若某血清型 4 孔中 3 孔或 4 孔 50%以上被阻止溶血(++、+++或完全不溶血(++++)),如表 5 所示 B1~B4 孔,则判定为阳性,即该病料为 FMDV“ A”型。

3 查毒试验

3.1 样品的采集和处理

3.1.1 O-P 液样品的采集、保存和运送方法和要求见附录 A。

3.1.2 O-P液的处理:先将O-P液样品解冻。在无菌室内将O-P液(1份)倒入灭菌塑料离心管(100 mL容量)内,再加入不少于该样品三分之一量(体积)的TTE(三氯三氟乙烷,分析纯)。用高速(10 000 r/min)组织匀浆机搅拌3 min使其乳化,然后3 000 r/min离心10 min。将上层水相分装入灭菌小瓶中,作为RT-PCR检测萃取总RNA或分离病毒(接种细胞管)的材料。

3.2 操作程序

3.2.1 制备单层细胞

按常规法将仔猪肾(IB-RS-2)或幼仓鼠肾(BHK₂₁)传代细胞分装在25 mL培养瓶中,每瓶分装细胞悬液5 mL。细胞浓度 $2 \times 10^5/\text{mL} \sim 3 \times 10^5/\text{mL}$ 。37℃静止培养48 h。接种样品前挑选已形成单层,细胞形态正常的细胞瓶。

3.2.2 样品接种

每份样品接种2瓶~4瓶细胞;另设细胞对照2瓶~4瓶。接种样品时,先倒去细胞培养瓶中的营养液,加入1 mL已经TTE处理过的O-P液,室温静置30 min。然后再加4 mL细胞维持液(pH7.6~7.8)。细胞对照瓶不接种样品,倒去营养液后加5 mL细胞维持液。37℃静止培养48 h~72 h。

3.2.3 观察和记录

每天观察并记录。如对照细胞单层完好,细胞形态基本正常或稍有衰老,接种O-P液的细胞如出现FMDV典型CPE,及时取出并置-30℃冻存。无CPE的细胞瓶观察至72 h,全部-30℃冻存,作为第1代细胞/病毒液再作盲传。

3.2.4 盲传

将第1代细胞/病毒液再接种2日龄单层细胞培养物,即1 mL第1代细胞/病毒液加4 mL细胞维持液。37℃静止培养48 h~72 h。

接种后每天观察1次~2次。对上一代出现可疑CPE的样品更要注意观察。记录病变细胞形态和单层脱落程度,及时收集细胞/病毒液以备进行诊断鉴定试验。未出现CPE的观察至72 h,置-30℃冻存,作为第2代细胞/病毒液,再作盲传。至少盲传3代。

3.3 结果判定

3.3.1 以接种O-P液样品的细胞出现典型CPE为判定依据。凡出现CPE的样品判定为阳性,无CPE的为阴性。

3.3.2 为了进一步确定分离病毒的血清型,将出现CPE的细胞/病毒液作间接夹心ELISA定型。或接种3日~4日龄乳鼠,视乳鼠发病及死亡时间盲传1代~3代。再以发病致死乳鼠组织为抗原材料作微量补体结合试验,鉴定病毒的血清型。

4 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术

4.1 材料

4.1.1 样品的采集和处理

4.1.1.1 样品的采集,保存和运送方法见附录A。

4.1.1.2 处理:在无菌室内将采集的动物组织,如淋巴结、脊髓、肌肉等除去被膜及其他结缔组织,尽量选取中心洁净的部分。依据检测试验的要求,将各种组织分别剪碎,用研钵加灭菌石英砂磨碎;或将组织样品分组合成大样,用组织捣碎机磨碎。然后加0.04 mol/L PBS(pH7.4)制成1:5悬液。置室温(20℃左右)2 h以上,或4℃冰箱过夜。3 000 r/min离心10 min,取上清液作为检测材料。

4.1.1.3 阳性对照:以已知病毒材料,如FMDV感染乳鼠或细胞为阳性对照。与待检病料同时萃取总RNA,再反转录-PCR扩增。其扩增产物作为电泳对照样品。

4.1.2 试剂

总RNA萃取试剂盒,有商品出售。也可自行配制。包括:

a) 变性液:6 mol/L异硫氰酸胍。

- b) 2 mol/L 乙酸钠(pH4.0)。
- c) 酚-三氯甲烷-异戊醇(25 : 24 : 1)混合液。
- d) 异丙醇。
- e) AMV 反转录酶:300 U/支,10 U/ μ L。
- f) 5 \times RT 缓冲液:500 μ L(1 支)。
- g) 台克(Taq)DNA 聚合酶:100 U/支,5 U/ μ L。
- h) 10 \times PCR 缓冲液:500 μ L(1 支)。
- i) 25 mmol/L 氯化镁:500 μ L(1 支)。
- j) dNTP:包括 100 mmol/L 脱氧腺苷三磷酸(dATP)、胞苷三磷酸(dTTP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)、脱氧三磷酸鸟苷 dGTP 各 1 支。用 DEPC-ddH₂O 配制成 2.5 mmol/L dNTP,方法是 4 种脱氧核苷酸各取 10 μ L,加入 360 μ L DEPC 双蒸水中,混匀即可。
- k) 无水乙醇:用(焦碳酸二乙酯)DEPC-ddH₂O 配制成 75%乙醇。
- l) DEPC:一种 RNA 酶的强烈抑制剂。按 0.1%含量加入蒸馏水(DEPC-ddH₂O),作为 RT-PCR 反应用试剂。也用于浸泡移液器尖头、塑料管等接触 RNA 的试验器材,以减少试验过程中萃取 RNA 的失活和断裂。
- m) 矿物油。
- n) 引物:检测 FMDV 的引物对。

4.1.3 专用仪器设备

台式高速(12 000 r/min)离心机;DNA 扩增仪;稳压稳流电泳仪和水平电泳槽;电泳凝胶成相分析系统(或紫外透射仪);可调移液器一套,包括 1 μ L~20 μ L 2 支,20 μ L~200 μ L 1 支,200 μ L~1 000 μ L 1 支;与移液器匹配的滴头;1.5 mL 带盖塑料离心管(Eppendorf 管);0.5 mL 或 0.2 mL(与扩增仪配套)带盖塑料管。

4.1.4 电泳缓冲液

4.1.4.1 5 \times TBE 缓冲液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	54.0 g
硼酸	27.5 g
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH8.0)	20.0 mL
加双蒸水(ddH ₂ O)至	1 000.0 mL

4.1.4.2 1 \times TBE(电泳缓冲液)

临用时将 5 \times TBE 缓冲液 1 份加蒸馏水 4 份,混匀即可。

4.1.4.3 电泳加样缓冲液

溴酚蓝	0.25 g
甘油	30.0 mL
双蒸水	70.0 mL

4.2 操作程序

4.2.1 总 RNA 萃取

- 4.2.1.1 用 1.5 mL 带盖塑料离心管。取 300 μ L 待检样品,再加 300 μ L 变性液混匀,冰水浴 5 min。
- 4.2.1.2 加 60 μ L 2 mol/L 乙酸钠(pH4.0),混匀。
- 4.2.1.3 加 800 μ L 酚-三氯甲烷-异戊醇混和液,混匀,冰水浴 5 min。
- 4.2.1.4 8 000 r/min 离心 10 min。将上清液转入另一洁净管。

- 4.2.1.5 加 800 μL 异丙醇。混匀后置 -80°C 1 h, 或 -30°C 4 h 以上(或过夜)。
- 4.2.1.6 12 000 r/min。离心 10 min。尽量倒干液体, 留下 RNA 沉淀。
- 4.2.1.7 加 800 μL 75%乙醇。轻轻摇荡 2 次~3 次, 12 000 r/min 离心 8 min。
- 4.2.1.8 倒干液体。晾干后的 RNA 即可用于反转录。

4.2.2 反转录

反应液总量 20 μL 。向 RNA 沉淀管中依次加入下列反应物:

- 模板: 300 μL 待检样品萃取的总 RNA。
- 引物 VP1A(5 pmol/ μL): 5 μL 。
- 加 DEPC-双蒸水: 9 μL 。

高速(10 000 r/min 以上, 下同)离心 10 s。70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 然后再加:

- 5 \times RT 缓冲液: 4 μL 。
- 底物 dNTP(2.5 mmol/ μL): 1 μL 。
- AMV RT 酶(10 U/ μL): 1 μL 。

高速离心 10 s, 置 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴至少 1 h。

4.2.3 PCR 扩增

反应液总量 50 μL 。试验开始, 首先将反转录产物转入 PCR 专用小塑料管中。然后如下操作:

- 模板: 反转录产物 20 μL 。
- 引物: VP1A(12.5 pmol/ μL)2 μL , VP1B(12.5 pmol/ μL)2 μL 。
- DEPC-ddH₂O: 18.5 μL 。

高速离心 10 s。沸水浴 5 min 后, 转入冰水中骤冷。然后再加:

- 10 \times PCR 缓冲液: 3 μL 。
- 底物 dNTP(2.5 mmol/ μL): 4 μL 。
- TaqDNA 聚合酶(5 U/ μL): 0.5 μL (高速离心 10 s, 或不离心)。
- 矿物油: 40 μL 。

高速离心 10 s。

将反应管插入扩增仪中, 指令设定程序开始工作。30 个循环。

每个循环包括: 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 退火 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 聚合 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min。最后一个循环的聚合延长为 10 min。

4.3 结果分析和判定

4.3.1 1%琼脂糖凝胶板的制备

称取 1 g 琼脂糖, 加入 100 mL 1 \times TBE 缓冲液中。加热融化后加 5 μL (10 mg/mL)溴乙锭, 混匀后倒入放置在水平面上的凝胶盘中, 胶板厚 5 mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔), 放入电泳槽中, 加 1 \times TBE 缓冲液淹没胶面。

4.3.2 加样

取 6 μL ~8 μL PCR 扩增产物和 2 μL ~3 μL 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳至少加 1 孔阳性对照的扩增产物作为对照。

4.3.3 电泳

电压 80 V~100 V, 或电流 40 mA~50 mA, 电泳 30 min~40 min。

4.3.4 结果观察和判定

电泳结束后, 取出凝胶板置于紫外透射仪上打开紫外灯观察。如某一待检样品扩增产物的 DNA 带与阳性对照的带在一条直线上, 即它们与加样孔的距离相同, 则该样品判定为阳性。

5 病毒中和试验(VN)

5.1 材料

5.1.1 标准阳性血清

5.1.2 血清样品的采集和处理

动物血清样品的采集,保存和运送方法和要求详见附录 A。待检血清 56℃水浴灭能 30 min。

5.1.3 病毒

口蹄疫病毒 O、A、亚洲-1 型及 SVDV 中和试验用种毒分别适应于 BHK₂₁ 或 IB-RS-2 单层细胞。收获的病毒液测定 TCID₅₀ 后,分成 1 mL 装的小管,-60℃保存备用。

5.1.4 细胞

BHK₂₁ 或 IB-RS-2 传代细胞。

5.1.5 细胞营养液和维持液

细胞维持液:Eagle'-MEM(最低限度必须氨基酸营养液)与 0.5%水解乳蛋白/Earle'液等量混合配成,pH7.6~7.8。在中和试验中作稀释液用。

细胞营养液:细胞维持液加 10%犊牛血清(pH7.4)。培养细胞用。

5.2 操作程序

5.2.1 稀释血清

将血清作 2 倍连续稀释。一般含 4 个稀释度(如 1:4~1:32)。如有特殊需要,可作 6 个稀释度(1:4~1:128)。

稀释方法:

- 先向 96 孔微量板 A2~A4、B2~B4 各孔加稀释液,25 μL/孔。
- 将 1:4 稀释的待检血清加入 A1、B1 和 A2、B2 孔,25 μL/孔。
- 稀释:将 A2、B2 孔中的稀释液和血清混匀后吸出 25 μL 移至 A2、B2 孔。再混匀后吸出 25 μL 移至 A4、B4 孔。混匀后吸出 25 μL 弃去。

5.2.2 对照

- 血清对照。如 A5、B5 为血清对照孔,先加稀释液 25 μL/孔,再加 1/4 稀释的标准阳性血清 25 μL/孔(血清 1/8 稀释)。
- 空白对照。至少 2 孔,如 A6、B6 孔,加稀释液 100 μL/孔。
- 细胞对照。至少 2 孔,如 A7、B7 孔,加稀释液 50 μL/孔。
- 病毒对照。至少 2 孔,如 A8、B8 孔,加稀释液 25 μL/孔。

5.2.3 稀释病毒和加样

按 TCID₅₀/50 μL 滴定结果,稀释病毒至 200 TCID₅₀/50 μL。然后加入各血清稀释度孔和病毒及阳性对照孔(A8、B8),每孔 25 μL。

5.2.4 中和作用

加盖,37℃振荡 1 h。

5.2.5 加入细胞

将 2 日龄~3 日龄单层丰满,形态正常的 BHK₂₁ 或 IB-RS-2 细胞按常规消化,离心(1 000 r/min, 10 min)收集细胞,加细胞营养液制成 1×10⁶/mL~2×10⁶/mL 细胞悬液(pH7.4)。然后加入除空白对照(A6、B6)孔外的各试验孔,每孔 50 μL。

5.2.6 加盖

37℃振荡 10 min。置二氧化碳培养箱 37℃静止培养 2 d~3 d。

5.3 结果判定

FMDV 致 BHK₂₁ 或 IB-RS-2 细胞的 CPE 很典型,在普通显微镜下易于识别,通常在 48 h 后用倒置

显微镜观察即可判定结果。

试验成立的条件：

- a) 标准阳性血清孔无 CPE 出现。
- b) 细胞对照孔中细胞生长已形成单层,形态正常。
- c) 病毒对照孔无细胞生长,或有少量病变细胞存留。

血清中和滴度为 1:45 或更高者判为阳性。

血清中和滴度为 1:16~1:32 判为可疑,需进一步采样作试验,如第二次血清滴度 1:6 或高于 1:16 判为阳性。

血清中和滴度为 1:8 判为阴性。

6 液相阻断-酶联免疫吸附试验(LpB-ELISA)

6.1 材料

6.1.1 样品采集见附录 A,所需试剂见附录 C。

6.1.2 捕获抗体:用 FMD 病毒 7 个血清型 146S 抗原的兔抗血清,将该血清用 pH9.6 碳酸盐/重碳酸盐缓冲液稀释成最适浓度。

6.1.3 抗原:用 BHD₂₁ 细胞培养增殖 FMD 毒株制备,并进行预滴定,以达到某一稀释度,加入等体积稀释剂后,滴定曲线上线大约 1.5,稀释剂为含 0.05%吐温-20、酚红指示剂的 PBS(PBST)。

6.1.4 检测抗体:豚鼠抗 FMDV146S 血清,预先用 NBS(正常牛血清)阻断,稀释剂为含 0.05%吐温-20、5%脱脂奶的 PBS(PBSTM)。将该检测抗体稀释成最适浓度。

6.1.5 酶结合物:兔抗豚鼠 Ig-辣根过氧化物酶(HRP)结合物,用 NBS 阻断,用 PBSTM 稀释成最适浓度。

6.2 试验程序

6.2.1 包被:ELISA 板每孔用 50 μ L 兔抗病毒血清包被,室温下置湿盒过夜。

6.2.2 洗涤:用 PBS 液洗板 5 次。

6.2.3 加被检血清,在另一酶标板中加入 50 μ L 被检血清(每份血清重复做 2 次),2 倍连续稀释起始为 1:4。

6.2.4 加抗原:向 6.2.3 酶标板中加抗原,每孔内加入相应的同型病毒抗原 50 μ L,混合过置 4 $^{\circ}$ C 过夜,或在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,加入抗原后使血清的起始稀释度为 1:8。

6.2.5 将 50 μ L 的血清/抗原混合物转移到兔血清包被的 ELISA 板中,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

6.2.6 洗板同 6.2.3。

6.2.7 每孔滴加 50 μ L 前一步使用的同型病毒抗原的豚鼠抗血清,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

6.2.8 洗板:每孔加 50 μ L 酶结合物,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

6.2.9 再洗板:每孔加 50 μ L 含 0.05% H_2O_2 (3%质量浓度)的邻苯二胺。

6.2.10 加 50 μ L 1.25 mol/L 硫酸中止反应,15 min 后,将板置于分光光度计上,在 492 nm 波长条件下读取光吸收值。

6.2.11 每次试验时,设立强阳性、弱阳性和 1:32 牛标准血清以及没有血清的稀释剂抗原对照孔,阴性血清对照孔。

6.3 结果判定

抗体滴度以 50%终滴度表示,即该稀释度 50%孔的抑制率大于抗原对照孔抑制率均数的 50%。

滴度大于 1:40 为阳性,滴度接近 1:40 应用病毒中和试验复检。

7 病毒感染相关(VIA)抗原琼脂凝胶免疫扩散试验(VIA-AGID)

7.1 材料

7.1.1 血清样品的采集和处理见附录 A。

7.1.2 VIA 抗原。

7.1.3 VIA 抗体阳性(对照)血清。

7.1.4 缓冲液

0.02 mol/L Tris-0.15 mol/L 氯化钠	(pH7.6)
Tris	2.42 g
氯化钠(NaCl)	3.80 g
蒸馏水	1 000.0 mL 用浓盐酸调整 pH 为 7.6。

7.1.5 模板:用有机玻璃板制作。本试验设计了两种不同孔数的模板(图 1 和图 2 所示)。I 型由 1 个中央孔和 6 个均匀分布的周边孔组成,孔径和孔间距均为 4 mm。II 型为适应大批量检测需要设计的,由 4 组 I 型模板组成。

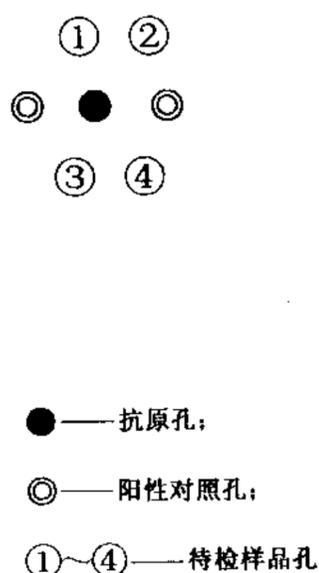


图 1 I 型模板

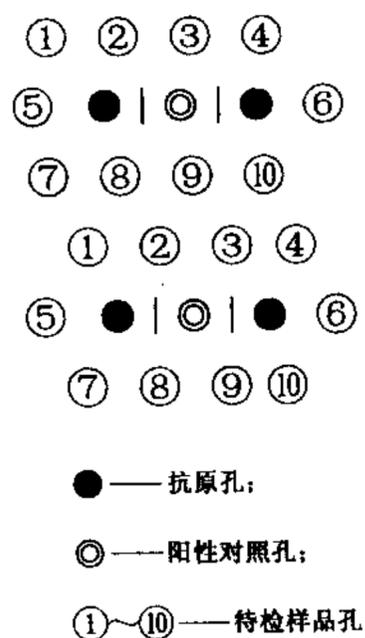


图 2 II 型模板

7.1.6 打孔器:与模板配套制作的,外径为 4 mm 的不锈钢管。

7.1.7 平皿:常用直径 6 cm 的平皿,要求底面平整光滑。

7.2 试验操作

7.2.1 琼脂糖凝胶板的制备

称取 1.0 g 琼脂糖(电泳用),置于 150 mL 容量的三角烧瓶中,再加入 100 mL 缓冲液。将三角烧瓶置于磁力搅拌器上,边搅拌边加热至沸腾使琼脂糖完全熔化。将熔化的琼脂糖溶液注入平皿中,每个平皿加 8 mL,凝胶板厚约 3 mm。待自然冷却凝固后,盖好平皿后倒置放在湿盒中,4℃冰箱保存。

7.2.2 打孔

按检测样品的数量选用模板。揭开平皿,将模板放在凝胶板上方,打孔器垂直插入模板孔中并穿透凝胶直至底面。打完孔后拿开模板,用细针头轻轻挑出孔中的凝胶块,将平皿底部在酒精灯上略烤封底。

7.2.3 加样

用微量移液器每孔加样 20 μL。抗原孔(中央孔)加 VIA 抗原;对照孔(I 型中央孔左、右侧的 2 个周边孔,II 型 2 个中央孔之间的孔)加 VIA 阳性对照血清;其余各孔(I 型 4 孔/板,II 型 20 孔/板)加待

检血清样品。

7.2.4 扩散

加完样后盖上平皿,放入湿盒中。置于室温 15℃~25℃任其扩散。

7.3 结果判定

7.3.1 加样后 24 h 开始观察,每天观察并记录,至 120 h 时判定结果。当阳性对照与抗原孔之间出现清晰沉淀线时,如图 1 和图 2 中所示,本试验成立。

7.3.2 待检血清与抗原孔之间出现沉淀线,并与阳性对照沉淀线末端相融,如图 1 中 1 孔,该血清判定为“阳性”。

7.3.3 待检血清与抗原孔之间虽然未出现沉淀线,但阳性对照沉淀线的末端弯向待检血清孔,如图 1 中 3 孔,该血清判定为弱阳性。

7.3.4 待检血清与抗原孔之间未出现沉淀线,如图 1 中 2 和 4 孔,该血清判定为阴性。

7.3.5 血清孔之间出现的沉淀线,为非特异性反应。

附录 A

(规范性附录)

水泡性疾病诊断样品的采集、保存和运送

A.1 样品的采集和保存

A.1.1 组织样品

A.1.1.1 样品的选择

用于病毒分离、鉴定的样品以发病动物(牛、羊或猪)未破裂的舌面或蹄部、鼻镜、乳头等部位的水泡皮和水泡液最好。对临床健康但怀疑带毒的动物可在屠宰后采集组织样品如淋巴结、脊髓、肌肉等作为检测材料。

A.1.1.2 样品的采集和保存

A.1.1.2.1 未破裂水泡中的水泡液用灭菌注射器吸出后装入灭菌小瓶中(可加适量抗菌素),加盖并用胶带封口,严防进水,4℃~8℃冷藏。

A.1.1.2.2 剪取新鲜水泡皮放入灭菌小瓶中,加适量 50%甘油-磷酸盐缓冲液(pH7.4),加塞塞紧并用胶带封口,-30℃以下保存。

A.1.1.2.3 在屠宰时采集组织样品 3 g~5 g 装入洁净的食品塑料袋内,用封口机封口或结扎紧袋口后立即放入盛有冰块的保温瓶(箱)内。然后尽快送往-30℃冰箱中冷冻保存。

每份样品的包装瓶(袋)上均要贴上标签,写明采集地点、动物种类、编号、时间等。

A.1.2 牛、羊食道-咽部分泌物(O-P液)样品

A.1.2.1 样品的采集

被检动物在采样前禁食(可饮水)12 h,以免反刍胃内容物严重污染 O-P 液。采样用的特制探杯(probang cup)在使用前经 0.2%柠檬酸或 2%氢氧化钠浸泡,再用自来水冲洗。每采完一头动物,探杯都要重复进行消毒和清洗。采样时动物站立保定,操作者左手打开牛口腔,右手握探杯,随吞咽动作将探杯送入食道上部 10 cm~15 cm 处,轻轻来回移动 2 次~3 次,然后将探杯拉出。如采集的 O-P 液被反刍胃内容物严重污染,要用生理盐水或自来水冲洗口腔后重新采样。

A.1.2.2 样品的保存

在采样现场将采集到的 8 mL~10 mL O-P 液倒入容量 25 mL 以上,事先加有 8 mL~10 mL 细胞培养维持液,或 0.04 mol/L PB,(pH7.4)的灭菌容器如广口瓶,细胞培养瓶或大试管中。加盖翻口胶塞后充分摇匀。贴上防水标签,并写明样品编号、采集地点、动物种类、时间等,尽快放入装有冰块的冷藏箱内。然后转往-60℃冰箱保存。

A.1.3 血清

无菌操作采集动物血,每头不少于 10 mL。自然凝固后无菌分离血清装入灭菌小瓶中,可加适量抗菌素,加盖密封后冷藏保存。每瓶贴标签并写明样品编号、采集地点、动物种类、时间等。

A.2 样品的运送

将封装和贴上标签,已预冷或预冰冻的样品装入冰瓶或保温泡沫塑料盒内,同时加放-30℃预冰冻的保冷剂和适当的填充材料,再加盖密封。包装盒上注明“小心!! 易碎易变质生物材料,途中不许打开;无商业价值。”以最快方式,派专人送到或航寄到农业部指定的单位。样品需写明送样单位名称和联系人姓名、联系地址、邮编、电话及电传号码等。

送检材料应附有详细说明,包括采样时间、地点、动物种类、样品名称、数量、保存方式及有关疫病发生流行情况和临床症状等。

附 录 B
(规范性附录)
缓冲液的配制

B.1 巴比妥钠缓冲盐水(Veronal Buffer, VB;5倍浓缩液)

巴比妥酸	5.75 g
巴比妥钠	3.75 g
氯化钠(NaCl)	85.0 g
氯化钙(CaCl ₂)	0.28 g
氯化镁(6H ₂ O)(MgCl ₂ · 6H ₂ O)	1.68 g
蒸馏水(dH ₂ O)	2 000 mL

先将巴比妥酸溶于500 mL加热至沸的蒸馏水中。冷却后加入其他成分,加蒸馏水至2 000 mL,充分混匀。分装入带塞的瓶中,103 kPa蒸汽灭菌15 min。塞紧瓶塞,4℃保存。

B.2 微量补体结合试验缓冲液(VBD, Veronal Buffer 工作液)

巴比妥钠缓冲盐水(VB,5倍浓缩液)	100 mL
蒸馏水(dH ₂ O)	400 mL

用碳酸氢钠调整pH至7.4。试验当天现配现用。

B.3 补体保存液(Richardson'液)

A液:硼酸(H ₃ BO ₃)	0.93 g
硼砂(Na ₂ B ₄ O ₇ · H ₂ O)	2.29 g
山梨醇	11.47 g

加饱和氯化钠溶液至100 mL混匀,室温保存。

B液:硼砂(Na ₂ B ₄ O ₇ · H ₂ O)	0.75 g
叠氮钠(NaN ₃)	0.81 g

加饱和氯化钠溶液至100 mL混匀。室温保存。

使用方法:8份豚鼠血清加1份A液、1份B液,混匀后置4℃可保存6个月。

用补体时,取1份保存补体加7份蒸馏水,即1:10稀释补体。

附 录 C
(规范性附录)
试剂的配制

C.1 PBS(磷酸盐缓冲液)的配制

C.1.1 0.1 mol/L PBS

氯化钠(NaCl)	80.0 g
氯化钾(KCl)	2.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	30.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	2.0 g
蒸馏水(dH_2O)	1 000.0 mL

C.1.2 0.04 mol/L PBS(pH7.2~7.4)

0.1 mol/L PBS	400 mL
蒸馏水(dH_2O)	600 mL

103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。室温或 4℃ 冰箱保存。

C.1.3 50%甘油-PBS(pH7.4)

0.04 mol/L PBS 与纯甘油(A. R.)等量混和, 调正 pH 至 7.4。分装成小瓶。

103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。室温或 4℃ 冰箱保存。

C.2 ELISA 缓冲液、试剂

C.2.1 0.05 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 , pH9.6(包被缓冲液)

A 液: 碳酸钠(Na_2CO_3)	1.68 g
蒸馏水(dH_2O)	400.0 mL
B 液: 碳酸氢钠(NaHCO_3)	2.86 g
蒸馏水(dH_2O)	200.0 mL

400 mL A 液与 150 mL 左右 B 液混合, 调整 pH 至 9.6。

C.2.2 稀释液 A

0.1 mol/L PBS	50 mL
蒸馏水(dH_2O)	450 mL
吐温-20	0.25 mL

C.2.3 3.3 mmol/L OPD(邻苯二胺)

OPD	0.1 g
柠檬酸-PB	200 mL

在暗室中操作, 溶解后分装 6 mL/瓶, -20℃ 保存。

C.2.4 柠檬酸-PB(pH5.0)

柠檬酸(H_2O)	2.6 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9.2 g
蒸馏水(dH_2O)	500.0 mL

C.3 细胞培养液

C.3.1 Eagle'-MEM(最低限度必须氨基酸营养液)

10×Eagle'-MEM 营养液

Eagle'-MEM 营养剂	9.5 g
蒸馏水(dH ₂ O)	100.0 mL

溶解后滤过除菌。将双蒸馏水 103 kPa 高压灭菌 30 min,然后将滤过的营养液按 1:10,即100 mL 营养液加入 900 mL 灭菌蒸馏水中。室温保存。

C.3.2 0.5%水解乳白蛋白/Earle'液

氯化钠(NaCl)	6.8 g
氯化钾(KCl)	0.4 g
氯化钙(CaCl ₂)	0.2 g
硫酸镁(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2 g
磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄)·H ₂ O	0.14 g
葡萄糖	1.0 g
10%酚红	2.0 mL
水解乳白蛋白	5.0 g

加双蒸水(ddH₂O)至 1 000.0 mL

按配方称取各成分并逐个溶解,最后加双蒸水至 1 000 mL。过滤除菌,或 69 kPa 高压蒸汽灭菌 15 min。室温或 4℃保存。

C.3.3 细胞维持液

Eagle'-MEM 营养液	50 mL
0.5%水解乳白蛋白/Earle'液	50 mL
5%碳酸氢钠(NaHCO ₃)调整 pH 至 7.6~7.8。	

C.3.4 细胞营养液

Eagle'-MEM 营养液	45 mL
0.5%水解乳白蛋白/Earle'液	45 mL
犊牛血清	10 mL
5%碳酸氢钠(NaHCO ₃)调整 pH 至 7.2~7.4。	