



中华人民共和国国家标准

GB/T 18636—2017
代替 GB/T 18636—2002

蓝舌病诊断技术

Diagnostic techniques for bluetongue

2017-11-01 发布

2018-05-01 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

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 临床诊断 1

 3.1 流行病学 1

 3.2 临床症状 1

 3.3 病理变化 2

 3.4 结果判定 2

4 病毒分离 2

 4.1 器材 2

 4.2 试剂 2

 4.3 试验程序 2

 4.4 病毒鉴定 4

 4.5 结果判定 4

5 免疫酶染色 4

 5.1 器材 4

 5.2 试剂 4

 5.3 试验程序 4

 5.4 试验成立条件 5

 5.5 结果判定 5

6 抗原捕获酶联免疫吸附试验(AC-ELISA) 5

 6.1 器材 5

 6.2 试剂 5

 6.3 样品 5

 6.4 试验设计 5

 6.5 试验程序 5

 6.6 试验成立的条件 6

 6.7 结果判定 6

7 定型微量中和试验 6

 7.1 器材 6

 7.2 试剂 6

 7.3 试验准备 7

 7.4 筛检试验程序 7

 7.5 试验成立的条件 8

 7.6 结果判定 8

8 蚀斑及蚀斑抑制定型试验 8

 8.1 器材 8

8.2	试剂	9
8.3	蚀斑试验程序	9
8.4	蚀斑抑制试验程序	9
8.5	结果判定	9
9	反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)	9
9.1	器材	9
9.2	试剂	10
9.3	试验程序	10
9.4	试验成立的条件	11
9.5	结果判定	11
10	荧光 RT-PCR 检测	11
10.1	器材	11
10.2	试剂	11
10.3	试验程序	12
10.4	阈值设定	13
10.5	试验成立的条件	13
10.6	结果判定	13
11	琼脂免疫扩散试验(AGID)	13
11.1	器材	13
11.2	试剂	13
11.3	试验程序	14
11.4	结果判定	14
12	竞争酶联免疫吸附试验(C-ELISA)	15
12.1	器材	15
12.2	试剂	15
12.3	试验程序	15
12.4	读数和抑制率计算	16
12.5	试验成立的条件	16
12.6	结果判定	16
13	诊断结果判定	16
13.1	疑似病例	16
13.2	确诊病例	16
13.3	隐性感染	16
附录 A (规范性附录)	细胞培养液的制备	17
附录 B (规范性附录)	免疫酶染色试验用溶液的配制	18
附录 C (规范性附录)	酶联免疫试验和定型微量中和试验用溶液的配制	19
附录 D (资料性附录)	Karber 方法	21
附录 E (规范性附录)	蚀斑及蚀斑抑制定型试验	22
附录 F (规范性附录)	RT-PCR 试验用溶液和引物的配制	23
附录 G (规范性附录)	荧光 RT-PCR 引物和探针的合成与配制	24
附录 H (规范性附录)	琼脂平板的制备	25

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18636—2002《蓝舌病诊断技术》，与 GB/T 18636—2002 相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 增加了临床诊断；
- 增加了反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测方法；
- 增加了荧光 RT-PCR 检测方法。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：云南省畜牧兽医科学院、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：李华春、朱建波、花群义、肖雷、宋建领、李乐、高林、苗海生。

本标准历次版本发布情况为：

- GB/T 18636—2002。

蓝舌病诊断技术

1 范围

本标准规定了蓝舌病(Bluetongue, BT)诊断的技术方法和试验程序。

本标准适用于反刍动物蓝舌病的诊断、流行病学调查及检疫。所述方法包括临床诊断、病原分离和鉴定、病原核酸检测以及血清学检测,其中:

- 病毒分离适用于从动物的血液、脏器和精液中分离蓝舌病病毒(Bluetongue Virus, BTV);
- 免疫酶染色和抗原捕获酶联免疫吸附试验(Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, AC-ELISA)适用于对分离到的病毒进行血清群的鉴定;
- 定型微量中和试验和蚀斑及蚀斑抑制定型试验适用于对分离到的 BTV 进行血清型的鉴定;
- 反转录聚合酶链式反应(Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)和荧光 RT-PCR 检测适用于动物的血液、脏器和精液中 BTV 核酸的检测,也适用于对分离到的病毒进行血清群鉴定;
- 琼脂免疫扩散试验(Agar Gel Immunodiffusion, AGID)和竞争酶联免疫吸附试验(Competition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, C-ELISA)适用于血清样品中 BTV 抗体的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 临床诊断

3.1 流行病学

3.1.1 蓝舌病是由呼肠孤病毒科环状病毒属的蓝舌病病毒引起,由库蠓通过叮咬传播,感染反刍动物致其发病的非接触性传播的虫媒病毒病。

3.1.2 BTV 主要引起绵羊发病和死亡,牛和山羊常为隐性感染,偶有发病和死亡。

3.1.3 蓝舌病的发生和分布与库蠓有密切关系,主要爆发于库蠓大量活动的夏秋季节,特别以池塘、河流多的低洼地区多见。

3.1.4 易感动物对口腔途径感染有很强的抵抗力,发病动物的分泌物和排泄物内病毒含量极低,不会引起蓝舌病的传播。

3.2 临床症状

3.2.1 潜伏期 3 天~9 天。病初羊体温为 40.5 ℃~42 ℃,呈稽留热型,一般持续 2 天~3 天。

3.2.2 病羊双唇水肿及充血,出现流涎和流鼻涕等现象。口腔充血,后呈青紫或蓝紫色,很快口腔黏膜

发生溃疡和坏死,鼻腔有脓性分泌物,干后呈痂,引起呼吸困难。鼻腔和口腔病变一般在 5 天~7 天愈合。

3.2.3 舌头充血、点状出血、肿大,严重的病例舌头发绀,表现出蓝舌病的特征症状。

3.2.4 角基部和蹄冠周围有红圈。蹄冠和蹄叶发生炎症,甚至有些动物蹄壳脱落,出现跛行,行动僵直。

3.2.5 有时腹泻、粪便带血,孕羊流产。

3.2.6 全身皮肤呈弥散性发红,皮肤上有针尖大小出血点或出血斑,被毛易折断和脱落。

3.2.7 致死多由于并发肺炎和胃肠炎所致。动物的死亡率与许多因素有关,一般为 2%~30%,如果感染发生在阴冷、湿润的深秋季节,死亡率更高。

3.2.8 一般情况,牛感染 BTV 后几乎不表现临床症状,但可长时间保持病毒血症。欧洲 BTV-8 型感染牛后能出现流涎、流鼻涕和口腔充血等临床症状。

3.3 病理变化

3.3.1 鼻液稀薄,并有水样或黏液性出血。

3.3.2 脾脏肿大。肾充血和水肿,皮质部可见界限清楚的淤血斑。

3.3.3 肺表现为肺泡充血,局部水肿,支气管充满泡沫,胸腔可能积有数升浆液样液体。

3.3.4 心包积水,有点状出血,左心室与肺动脉基部常有明显的心内膜出血。

3.4 结果判定

反刍动物出现上述临床症状和病理变化,且符合蓝舌病流行病学特点,可判定为疑似蓝舌病。

确诊采集发热期病畜的血液,也可采集死后不久尸体上淋巴结、脾脏、肝脏等进行实验室诊断。

4 病毒分离

4.1 器材

4.1.1 鸡胚孵化器(35℃),恒温培养箱(30℃)及二氧化碳培养箱(37℃)。

4.1.2 冰箱(4℃、-20℃和-80℃)。

4.1.3 微型雕刻电钻、照蛋器、组织捣碎器、超声波粉碎器、低速离心机及倒置显微镜。

4.1.4 平皿,眼科剪刀,眼科镊子。

4.1.5 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,多道加样器及滴头。

4.2 试剂

4.2.1 细胞:蚊子细胞(C6/36),仓鼠肾细胞(BHK-21)或非洲绿猴肾细胞(Vero)。

4.2.2 细胞培养液(配制方法见附录 A)。

4.2.3 10 日龄~11 日龄鸡胚。

4.3 试验程序

4.3.1 样品采集和保存

无菌采集动物的肝素抗凝血、脏器(脾、肝、肾、淋巴结)或精液。用于病毒分离的样品应置冷藏容器中保存,在 24 h 内送到实验室,并立即进行处理。

4.3.2 样品处理

4.3.2.1 生物安全措施

样品处理的生物安全措施按照 GB 19489 进行。

4.3.2.2 血液样品处理

取肝素抗凝血 200 μ L, 加入 1 mL PBS(磷酸盐缓冲液), 1 000 r/min 离心 10 min; 细胞沉淀再用 1 mL PBS 洗涤 2 次, 离心弃上清液; 细胞沉淀加入 900 μ L 灭菌双蒸水, 混匀, 确保红细胞充分裂解。经处理的样品当天使用, 使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存, 剩余样品置 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

4.3.2.3 组织样品处理

取动物脾、淋巴结、肝、肾各 2 g, 剪碎后加入 10 mL PBS(含青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 μ g/mL), 置乳钵中研磨, 4 $^{\circ}$ C 冰箱中浸提 4 h。取上清液 2 mL 用超声波裂解处理(100 μ A, 1 min~2 min), 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 1 mL, 加入 4 mL 灭菌双蒸水, 混匀。经处理的样品当天使用, 使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存, 剩余样品置 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

4.3.2.4 精液样品处理

取精液样品 0.2 mL, 用 PBS 作 1 : 10 稀释, 经处理的样品当天使用, 使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存, 剩余样品置 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

4.3.3 鸡胚接种

4.3.3.1 选择 10 日龄~11 日龄发育良好的鸡胚, 在照蛋灯下, 用铅笔在鸡胚上标记静脉位置和开孔区, 涂抹碘酊消毒, 用微型雕刻电钻开窗备用。

4.3.3.2 在生物安全柜内, 用标注好样品编号的 1 mL 注射器, 吸取制备好的样品准备接种鸡胚。

4.3.3.3 在照蛋灯下, 每个鸡胚静脉接种 0.1 mL 样品, 每份样品接种 5 个鸡胚, 接种后用擦镜纸封口, 置 35 $^{\circ}$ C 孵化箱培养。

4.3.3.4 每日观察一次并记录, 24 h 内死亡的鸡胚为非特异性死亡, 废弃。

4.3.3.5 分别收集接种后 24 h~120 h 死亡的鸡胚和 120 h 后存活的鸡胚肝脏, 将其按质量体积比 1 : 10 加入 PBS 捣碎, 2 000 r/min 离心 10 min。取上清液备用。

4.3.4 细胞接种

4.3.4.1 将 4.3.3.5 制备的上清液用第 6 章(AC-ELISA)或第 9 章(RT-PCR)或第 10 章(荧光 RT-PCR)的技术方法进行检测。用检测结果为阳性的样品接种两个长满单层 C6/36 细胞的培养管或 25 cm^2 培养瓶, 每管(瓶)接种 0.2 mL, 置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 7 天, 移至 4 $^{\circ}$ C 保存。

4.3.4.2 将接种后 7 天的两管(瓶)C6/36 细胞吹打后合并, 接种两管(瓶)BHK-21 细胞, 每管(瓶)0.2 mL, 加入维持液, 置于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱培养, 每天在显微镜下观察 1 次, 将出现细胞变圆或脱落等细胞病变效应(CPE)的管(瓶)或接种后 7 天未出现 CPE 的管(瓶)移至 4 $^{\circ}$ C 保存。出现 CPE 者收获, 无 CPE 者在 BHK-21 细胞盲传三代, 仍无 CPE 者弃之。

4.3.5 病毒保存及工作液的制备

4.3.5.1 将出现 CPE 的 BHK-21 细胞收获, 2 000 r/min 离心 20 min, 病毒悬液用 1 mL 无菌小管分装, 置 -80 $^{\circ}$ C 保存作为原始毒。

4.3.5.2 取 1 管原始毒于 BHK-21 细胞上传代 1 次, 分装, -80 $^{\circ}$ C 保存, 记为“原始毒+1”。

4.3.5.3 “原始毒+1”按 4.3.5.2 方法增殖, 分装, 部分 -80 $^{\circ}$ C 保存, 作为贮存毒液, 部分 4 $^{\circ}$ C 保存, 作为

工作毒液,用于病毒鉴定。

4.4 病毒鉴定

对 4.3.5.3 中分离到的病毒,选用第 5 章(免疫酶染色试验)或第 6 章(AC-ELISA)或第 9 章(RT-PCR)或第 10 章(荧光 RT-PCR)检测方法进行血清群鉴定。也可选用第 7 章(定型微量中和试验)或第 8 章(蚀斑及蚀斑抑制定型试验)进行血清型鉴定。

4.5 结果判定

上述血清群或血清型鉴定中的任何一项阳性者,可判定为病毒分离阳性。

5 免疫酶染色

5.1 器材

5.1.1 恒温箱(37℃)、二氧化碳培养箱(37℃)。

5.1.2 冰箱(4℃和-20℃)、倒置显微镜。

5.1.3 96 孔组织培养板(平底)、滴头、三角烧瓶(50 mL)、吸水纸。

5.1.4 多道加样器、单道加样器(0.5 μL~10 μL、5 μL~40 μL、40 μL~200 μL、200 μL~1 000 μL)。

5.2 试剂

5.2.1 4.3.3.5 或 4.3.5.3 获得的病毒未知毒株。

5.2.2 蓝舌病病毒悬液,流行性出血病病毒悬液。

5.2.3 BHK-21 细胞,使用浓度 2.5×10^5 个细胞/mL~ 3.3×10^5 个细胞/mL。

5.2.4 细胞培养液(配制方法见附录 A)。

5.2.5 小鼠抗蓝舌病病毒 VP7 单克隆抗体(BTV-Mab),4℃保存。

5.2.6 山羊抗鼠免疫球蛋白 G(IgG)辣根过氧化物酶联合物,-20℃保存,使用前解冻,置 4℃备用。

5.2.7 细胞固定液(8%的福尔马林),0.05%吐温 20 的 PBS(PBST),1%明胶 PBST。

5.2.8 底物:3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)液(配制方法见附录 B)。

5.3 试验程序

5.3.1 96 孔组织培养板中加待检病毒,每个样品 4 孔,每孔加入 20 μL。

5.3.2 设细胞对照 4 孔,每孔加入细胞生长液 20 μL;阳性对照 4 孔,每孔加入已知蓝舌病病毒悬液 20 μL;阴性对照 4 孔,每孔加入加其他环状病毒群成员如流行性出血病病毒 20 μL。

5.3.3 每孔加入 BHK-21 细胞悬液 180 μL,置 37℃ 5%二氧化碳培养箱培养,逐日观察。当样品孔出现细胞病变时,每孔加入细胞固定液 200 μL,室温静置 10 min,移弃细胞固定液和培养液。

5.3.4 PBST 洗涤 5 次。

5.3.5 用含 1%明胶的 PBST 将 BTV-Mab 稀释至体积分数为 20%的工作液,每孔加入 50 μL,置湿盒中,37℃孵育 90 min。

5.3.6 PBST 洗涤 5 次。

5.3.7 用含 1%明胶的 PBST 按 1:1 000 稀释酶结合物,每孔加入 50 μL,置湿盒中,37℃孵育 90 min。

5.3.8 PBST 洗涤 5 次,在吸水纸上拍干。

5.3.9 每孔加底物 100 μL,室温静置 30 min。

5.3.10 PBST 洗涤 2 次,在吸水纸上拍干。

5.4 试验成立条件

用倒置显微镜观察判定。当阴性对照和细胞对照孔细胞不着色,而阳性对照孔中的感染细胞被染成红棕色时,试验成立。

5.5 结果判定

样品中有红棕色细胞,则判为阳性,否则判为阴性。

6 抗原捕获酶联免疫吸附试验(AC-ELISA)

6.1 器材

6.1.1 恒温箱(37℃)、冰箱(4℃和-20℃)。

6.1.2 微量振荡器、混合仪、酶标洗板仪及酶标读板仪。

6.1.3 96孔高吸附性酶标板、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、多道加样器及滴头、50 mL三角烧瓶、吸水纸。

6.2 试剂

6.2.1 捕获抗体:牛(或羊)抗BTV抗血清,-20℃保存。

6.2.2 检测抗体:兔抗BTV核衣壳抗血清,-20℃保存。

6.2.3 酶结合物:山羊抗兔IgG辣根过氧化物酶结合物,-20℃保存,使用前解冻,置4℃备用。

6.2.4 阳性对照:BTV细胞毒或感染的鸡胚组织悬液。

6.2.5 阴性对照:正常细胞培养物或鸡胚组织悬液。

6.2.6 缓冲液: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)、含5%脱脂奶的PBST(PBST-SM)。配制方法见附录C。

6.2.7 底物:四甲基联苯胺储存液(室温避光保存)、30%过氧化氢(H₂O₂),配制方法见附录C。

6.3 样品

6.3.1 4.3.3.5的上清液。

6.3.2 4.3.4.2的出现细胞病变的细胞培养物,使用前用PBST倍比稀释。

6.3.3 临床样品,处理方法见4.3.2。

6.4 试验设计

每个样品两孔,两个不同BTV血清型作阳性对照各2孔,细胞或鸡胚组织悬液作阴性对照2孔。

6.5 试验程序

6.5.1 用碳酸盐缓冲液将捕获抗体作1:1 000倍稀释,每孔加入50 μL至酶标板,置密闭温盒中,4℃过夜。

6.5.2 PBST洗涤5次。

6.5.3 按每个样品两孔,每孔50 μL分别加入待检样品和对照样品,室温静置60 min,再置37℃振荡30 min。

6.5.4 PBST洗涤5次。

6.5.5 用 PBST-SM 按 1 : 2 000 稀释检测抗体,每孔加 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 振荡 30 min。

6.5.6 PBST 洗涤 5 次。

6.5.7 用 PBST-SM 按 1 : 3 000 稀释酶结合物,每孔加 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 振荡 30 min。

6.5.8 PBST 洗涤 5 次,在吸水纸上拍干。

6.5.9 将底物按比例稀释(取 9.7 mL 乙酸-柠檬酸缓冲液,分别加入 300 μ L 四甲基联苯胺储存液和 5 μ L 30%过氧化氢),每孔加 50 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 避光反应 10 min~15 min,每孔加入 50 μ L 2 mol/L 硫酸终止反应。

6.5.10 在酶标读板仪读取 450 nm 波长的光度吸收值(OD_{450})。

6.6 试验成立的条件

阳性对照的 OD_{450} 大于 0.8,阴性对照的 OD_{450} 小于阳性对照 OD_{450} 的 15%时,试验成立。

6.7 结果判定

样品孔 OD_{450} 大于或等于阴性对照孔 OD_{450} 的两倍时判为阳性,否则判为阴性。

7 定型微量中和试验

7.1 器材

7.1.1 二氧化碳培养箱(37 $^{\circ}$ C)、冰箱(4 $^{\circ}$ C 和 -80 $^{\circ}$ C)。

7.1.2 倒置显微镜、微型振荡器、磁力搅拌器。

7.1.3 96 孔平底细胞培养板,单道微量加样器(0.5 μ L~10 μ L、5 μ L~10 μ L、40 μ L~200 μ L、200 μ L~1 000 μ L)及滴头,多道加样器及滴头。

7.2 试剂

7.2.1 病毒

待检病毒选用第 5 章(免疫酶染色试验)或第 6 章(AC-ELISA)或第 9 章(RT-PCR)或第 10 章(荧光 RT-PCR)检测方法进行血清群鉴定,经鉴定为 BTV 的毒株,通过细胞空斑克隆纯化 3 次后 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

对照病毒应为国际标准毒株。

7.2.2 阳性血清

BTV 24 个血清型国际标准阳性血清(中和抗体效价,筛检试验不低于 1 : 20,确认试验不低于 1 : 320)。

7.2.3 阴性血清

无 BTV 抗体和细胞毒性的牛血清。

7.2.4 细胞

Vero 细胞,使用浓度 1.5×10^5 个细胞/mL。

7.2.5 细胞培养液及维持液

配制方法见附录 A。

7.2.6 0.1% 萘黑蓝染色液

配制方法见附录 C。

7.3 试验准备

7.3.1 病毒繁殖

- 7.3.1.1 将 Vero 细胞应用转管或静止培养方法培养,当细胞形成单层后,换为维持液培养。
- 7.3.1.2 接入待检病毒,37℃培养,连续观察 7 天,记录 CPE。
- 7.3.1.3 细胞出现 CPE 后,用吸管吹打管壁,取病毒悬液用同样的方法接种 Vero 细胞连续传 3 代~5 代。
- 7.3.1.4 将最后一代的病毒液分装于 1 mL 病毒管作为待检病毒贮存液-80℃保存。
- 7.3.1.5 将待检病毒贮存液接种于单层 Vero 细胞上,37℃培养,逐日观察,待 CPE 达到 75%以上时收毒,分别置于-80℃和 4℃冻融 3 次,置无菌离心管 2 000 r/min 离心 20 min,取上清液分装于 1 mL 小管,4℃保存备用。

7.3.2 毒价滴定

- 7.3.2.1 将待检病毒和对照病毒用细胞生长液作 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 稀释。
- 7.3.2.2 按每孔 50 μ L,每个稀释度 8 孔将稀释后的病毒加进 96 孔平底细胞培养板。设细胞对照孔 8 孔,每孔各加入细胞生长液 50 μ L。
- 7.3.2.3 上述各孔再补加入细胞生长液 50 μ L,随后加入细胞悬液 100 μ L。
- 7.3.2.4 置 37℃含 5%的二氧化碳培养箱内培养,连续观察 10 天,每天记录结果。
- 7.3.2.5 当细胞无污染,且细胞对照孔中的细胞层完整的前提下,计算细胞半数感染量 TCID₅₀ (参见附录 D)。

7.4 筛检试验程序

7.4.1 试验设计及记录表见表 1。

表 1 各型 BTV 血清和对照排列

序号	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。 注 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。 注 3: V 表示病毒对照,V10⁰~V10⁻³ 4 个稀释度,每个稀释度占用 4 孔。 注 4: C.C.表示细胞对照。 注 5: S 为阴性血清对照。 注 6: 本表如不填写上述数字,即可作记录表用。												

7.4.2 阳性血清经 56℃ 30 min 处理后,作 1:20 稀释。

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

7.4.4 将 50 μL 阳性血清、50 μL 待检病毒液分别加入对应的孔, 振荡后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 中和 1 h, 然后加入 100 μL 细胞悬液。

7.4.5 按下列步骤设置病毒对照、细胞对照和阴性对照:

病毒对照: 取病毒工作液, 用细胞生长液作稀释 10^0 、 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 。

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 。

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 。

7.4.6 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% 二氧化碳培养箱培养, 连续观察 10 天, 每天记录结果。

7.4.7 培养 10 天后, 每孔加入 0.1% 萘黑蓝染色液 50 μL ~100 μL , 室温静置 2 h~3 h, 用水漂洗, 晾干。

7.5 试验成立的条件

7.5.1 细胞对照组应不出现细胞病变。

7.5.2 病毒对照, 应保证在 100 个 TCID_{50} 的病毒液 10^0 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} 和 10^{-4} 孔全无细胞病变。

7.5.3 阴性对照应全部出现细胞病变。

7.6 结果判定

7.6.1 符合 7.5 的条件, 出现细胞病变记为 CPE+, 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 7.6.2 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 7.6.3 作进一步鉴定; 若所有抗体组均出现细胞病变, 按 7.6.4 进行。

7.6.2 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} ~ 10^{-6} 稀释, 每个稀释度加 8 孔, 每孔 50 μL , 其中前四孔每孔加 1:20 稀释的初定型标准阳性血清 50 μL , 后四孔每孔加 1:20 稀释的阴性犍牛血清 50 μL , 振荡混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% 二氧化碳培养箱中培养 10 天, 判定结果。当标准阳性血清中和滴度较其阴性血清孔高两个或两个以上, 而待检病毒也出现类似情况, 则可判定为该型病毒。

7.6.3 有细胞病变的两型的阳性血清(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 100 TCID_{50} 被测病毒, 各种试剂的加样量和顺序按 7.4.4 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两个或两个以上并与标准毒试验结果基本一致, 则可定为该型。

7.6.4 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做血清型特异鉴定, 若仍然不被 24 个血清型抗体中和, 则需要进一步鉴定。

8 蚀斑及蚀斑抑制定型试验

8.1 器材

8.1.1 二氧化碳培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$)、冰箱(4 $^{\circ}\text{C}$ 和 -80 $^{\circ}\text{C}$)。

8.1.2 倒置显微镜、微型摇床、磁力搅拌器。

8.1.3 6 孔细胞培养板、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、10 mL 吸管。

8.2 试剂

8.2.1 细胞: Vero 细胞。

8.2.2 参考阳性血清: 以 1~24 型蓝舌病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 °C 保存。

8.2.3 病毒: 将保存病毒在敏感细胞上繁殖数代, 反复冻融 3 次, 离心取上清液, -80 °C 保存。

8.2.4 滤纸圆片, 0.5% 中性红, 4% 低熔点琼脂糖(配制方法见附录 E)。

8.3 蚀斑试验程序

8.3.1 将 Vero 细胞(0.5×10^6 个细胞/mL)加入 6 孔细胞培养板, 每孔 2 mL, 放入湿盒内置 37 °C 5% 二氧化碳培养箱培养 48 h~72 h 直至长成致密单层。

8.3.2 用吸管将长满单层的 6 孔细胞培养板中的培养液吸出。

8.3.3 将待测病毒用无血清细胞培养液从 10^{-1} ~ 10^{-7} 递次稀释, 将 0.2 mL 10^{-3} ~ 10^{-7} 的病毒稀释液分别加入细胞培养板 1 孔~5 孔, 第 6 孔加 0.2 mL 细胞培养液作为细胞对照。将细胞培养板置微型摇床轻轻摇动, 37 °C 感作 60 min。

8.3.4 用加样器依次从细胞对照孔、 10^{-7} ~ 10^{-3} 将病毒液移弃。

8.3.5 将 1% 低熔点琼脂糖(50 °C 3.5 mL 4% 低熔点琼脂糖与 25 °C 10.5 mL 细胞培养液混匀)迅速加入细胞培养板, 每孔 2 mL, 室温静置 15 min, 放入湿盒内置 37 °C 二氧化碳培养箱培养。

8.3.6 24 h 后, 逐日显微镜下观察蚀斑出现情况至 96 h。

8.3.7 将 14 mL 1% 低熔点琼脂糖加入 300 μ L 0.5% 中性红, 混匀后迅速加入细胞培养板, 每孔 1 mL。室温静置 15 min, 放入湿盒内置 37 °C 二氧化碳培养箱培养 24 h。

8.3.8 结果判读: 蓝舌病病毒在 Vero 细胞上形成直径约 1 mm 近圆形白色蚀斑, 健康细胞层颜色为深红色, 计数各稀释度蚀斑数并作记录, 计算每毫升蚀斑形成单位(PFU/mL)。

8.4 蚀斑抑制试验程序

8.4.1 按照 8.3.1 方法培养细胞。

8.4.2 用吸管将长满单层的 6 孔细胞培养板中的培养液吸出。

8.4.3 将待检病毒稀释至 10^6 PFU/mL, 每孔加入 0.2 mL, 37 °C 感染 60 min, 吸出病毒液。

8.4.4 将 1% 低熔点琼脂糖(50 °C 3.5 mL 4% 低熔点琼脂糖、25 °C 10.5 mL 细胞培养液和 300 μ L 0.5% 中性红混匀)迅速加入细胞培养板, 每孔 2 mL, 室温静置 15 min。

8.4.5 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, 将细胞培养板放入湿盒内置 37 °C 二氧化碳培养箱培养。

8.4.6 48 h 后逐日观察结果, 测量抑制圈直径。并作好记录, 拍照。

8.5 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, 直径在 1.2 cm~2.0 cm 之间, 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, 颜色较淡, 此为交叉反应所致。

9 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

9.1 器材

9.1.1 PCR 检测仪、高速台式冷冻离心机、台式离心机、混匀器、冰箱(4 °C、-20 °C 和 -80 °C)。

9.1.2 微量可调移液器(10 μL 、100 μL 、1 000 μL)及配套带滤芯吸头、离心管(2 mL)、PCR 反应管。所有实验容器均用 DEPC 水处理后高压灭菌分装。

9.2 试剂

若无特殊说明,所有化学试剂均为常规分析纯级试剂。

9.2.1 琼脂糖、溴化乙锭、去离子甲酰胺、异丙醇。1XTAE 电泳缓冲液,配制方法见附录 F。实验用水应符合 GB/T 6682 的要求。

9.2.2 市售核酸提取试剂盒和核酸扩增试剂盒均按说明书使用。

9.2.3 引物:引物的序列和配制见附录 F。本标准中的蓝舌病病毒反转录聚合酶链式反应检测方法中所采用的引物与 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2014)中的引物序列一致。

9.2.4 阳性对照:BTB 细胞培养物(浓度为 100 TCID₅₀,用细胞培养液或 BTB 阴性健康牛 EDTA 抗凝血稀释)。

9.2.5 阴性对照:细胞培养液或 BTB 阴性健康牛 EDTA 抗凝血。

9.3 试验程序

本方法的实验室生物安全管理见 GB 19489,实验室设置与管理见 SN/T 1193。

9.3.1 病毒 RNA 提取

9.3.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管,其中 n 为被检样品、阳性样品与阴性样品的总数,在离心管上做好标记。

9.3.1.2 将组织病料匀浆,加 PBS 液制成 1:8 至 1:12 悬液,2 000 r/min 离心 10 min,取上清备用;血液 1 000 r/min 离心 10 min,细胞沉淀加等体积的无 RNase 的水混合备用。阴、阳性对照无需前处理。

9.3.1.3 用市售核酸提取试剂盒提取病毒 RNA。提取的 RNA 液冰上保存备用,若需长期保存应放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

9.3.2 病毒双链 RNA 变性

在 PCR 反应管中加入所提取的核酸样品 2 μL ,甲酰胺 1 μL ,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,速取出置冰上。

9.3.3 RT-PCR 扩增反应

9.3.3.1 RT-PCR 反应体系配制

9.3.2 的反应产物管内,按下列方法配制 25 μL RT-PCR 扩增反应体系:

10 $\times$ 一步法 RNA PCR 缓冲液	2.5 μL
25 mmol/L MgCl ₂	5 μL
10 mmol/L dNTP 混合物	2.5 μL
40 U/ μL Rnase 抑制剂	0.5 μL
5 U/ μL AMV RTase XL 反转录酶	0.5 μL
5 U/ μL AMV-Optimized Taq 酶	0.5 μL
引物 BTB M6-A 和 M6-B 混合液	0.5 μL
无 RNase 水	10 μL

9.3.3.2 RT-PCR 反应参数设置

将 9.3.3.1 的 PCR 反应管放入 PCR 检测仪,按下列参数进行反应:

第一阶段,48 ℃ 30 min,95 ℃ 3 min,1 个循环;
第二阶段,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环;
第三阶段,72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。

9.3.4 nested-PCR 扩增反应

9.3.4.1 nested-PCR 反应体系配制

在新的 PCR 管内,按下列方法配制 25 μ L nested-PCR 扩增反应体系:

10 $\times$ Taq 缓冲液	2.5 μ L
5 U/ μ L Taq 酶	0.12 μ L
2.5 mmol/L dNTP 混合物	2 μ L
引物 BTV M6-C 和 M6-D 混合液	1 μ L
9.3.3.2 的 RT-PCR 扩增产物	1 μ L
双蒸水	18.5 μ L

9.3.4.2 nested-PCR 反应参数设置

将 PCR 反应管放入 PCR 检测仪,按下列参数进行反应:

第一阶段,94 ℃ 2 min,1 个循环;
第二阶段,94 ℃ 30 s,51 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s,30 个循环;
第三阶段,72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。

9.3.5 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物

9.3.5.1 取 10 μ L nested-PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳。

9.3.5.2 5 V/cm 恒压电泳 20 min。

9.3.5.3 凝胶成像仪下观察电泳结果,拍照记录。

9.4 试验成立的条件

阳性对照样品出现 100 bp 扩增条带,同时阴性对照样品无扩增目标条带。

9.5 结果判定

符合 9.4 的条件,被检样品扩增产物电泳出现 100 bp 目标条带,判断为 RT-PCR 扩增阳性,表明样品中存在蓝舌病病毒核酸。被检样品无扩增条带,判断为 RT-PCR 扩增阴性,表明样品中无蓝舌病病毒核酸。

10 荧光 RT-PCR 检测

10.1 器材

10.1.1 荧光 PCR 检测仪、高速台式冷冻离心机、台式离心机、混匀器。

10.1.2 冰箱(4 ℃、-20 ℃和-80 ℃)。

10.1.3 微量可调移液器(10 μ L、100 μ L、1 000 μ L)及配套带滤芯吸头、离心管(2 mL)、PCR 反应板或 PCR 反应管、荧光 PCR 反应板或荧光 PCR 反应管。

10.2 试剂

除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯。

10.2.1 市售核酸提取试剂盒和荧光核酸扩增试剂盒均按说明书使用。

10.2.2 引物和探针:引物和探针的合成和配制见附录 G。

10.2.3 阳性对照:BTV 细胞培养物(浓度为 100 TCID₅₀,用细胞培养液或 BTV 阴性健康牛 EDTA 抗凝血稀释)。

10.2.4 阴性对照:细胞培养液或 BTV 阴性健康牛 EDTA 抗凝血。

10.3 试验程序

本方法的实验室生物安全管理见 GB 19489,实验室设置与管理见 SN/T 1193。

10.3.1 RNA 提取

参照 9.3.1 进行。

10.3.2 荧光 RT-PCR 扩增

10.3.2.1 扩增试剂准备

取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管,其中 n 为被检样品、阳性样品与阴性样品的和。从试剂盒中取出相应的荧光 RT-PCR 反应液、RT-PCR 酶混合液,在室温下融化后,2 000 r/min 离心 5 s。按表 2 计算试剂用量,吸取到一个离心管中,充分混合均匀。

表 2 荧光 RT-PCR 反应体系配制表

体系组分	每个反应的用量/ μL	n 个反应的用量/ μL
2 $\times$ RT-PCR 混合物	12.5	$12.5 \times (n+1)$
25 $\times$ RT-PCR 酶混合物	1	$n+1$
混合引物(各 20 $\mu\text{mol/L}$)	1	$n+1$
混合探针(各 3 $\mu\text{mol/L}$)	1	$n+1$
总量	15.5	$15.5 \times (n+1)$
注: n 为被检样品、阳性样品与阴性样品的和。		

10.3.2.2 试剂分装

标记荧光 PCR 反应板(管),将混合好的反应液分装到 PCR 板(管)中,每孔(管)15.5 μL 。

10.3.2.3 病毒双链 RNA 变性

标记 PCR 变性板(管),将提取的核酸样品加入 PCR 变性板(管)中,每个核酸样品 12 μL 。95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 变性,速取出置冰上。

10.3.2.4 加变性 RNA 于反应液

将 9.5 μL 变性后的 RNA 移加至对应的含有反应混合液的荧光 PCR 反应板(管)中,封板(或盖紧管盖),2 000 r/min 离心 30 s。

10.3.2.5 荧光 RT-PCR 反应

将荧光 PCR 反应板(管)放入荧光 PCR 检测仪,按下列参数进行反应:

第一阶段,42 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,1 个循环;

第二阶段,95 ℃ 3 min,1 个循环;
第三阶段,95 ℃ 5 s,60 ℃ 40 s,40 个循环。
在第三阶段每个循环的退火延伸时收集荧光。

10.4 阈值设定

试验检测结束后,根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

10.5 试验成立的条件

- 10.5.1 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。
- 10.5.2 阳性对照的 Ct 值应<28,并出现典型的扩增曲线。否则,此次试验视为无效。

10.6 结果判定

10.6.1 阴性

无 Ct 值并且无典型扩增曲线,表明样品中无蓝舌病病毒核酸。

10.6.2 阳性

Ct 值≤35,且出现典型的扩增曲线,表明样品中存在蓝舌病病毒核酸。

10.6.3 可疑

如 35<Ct 值≤40,判为可疑。此时重复扩增检测,如果出现典型的扩增曲线 Ct 值≤40 判为样本阳性,表明蓝舌病病毒核酸阳性;否则,判为样品阴性。

11 琼脂免疫扩散试验(AGID)

11.1 器材



11.1.1 4 ℃冰箱,直径 9 cm 塑料培养平皿,7 孔金属打孔器(孔径为 5 mm,孔间中心距离为 7 mm,各孔排列如图 1 所示),保鲜盒。

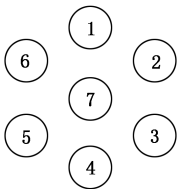


图 1 排列示意图

11.1.2 单道微量加样器(40 μL~200 μL)及滴头,10 mL 吸管。

11.2 试剂

- 11.2.1 BTV 抗原:将保存病毒在敏感细胞上繁殖数代,反复冻融 3 次,离心取上清液,灭活,浓缩 50 倍~100 倍,4 ℃保存。
- 11.2.2 阳性血清:BTV 抗体阳性的牛血清或羊血清,中和抗体效价不低于 1 : 320。
- 11.2.3 阴性血清:无 BTV 抗体的牛血清或羊血清。

11.2.4 待检血清:血清应无污染,3个月内在4℃保存,常温保存15天内,可用于检测。

11.3 试验程序

11.3.1 琼脂平皿的制作

11.3.1.1 琼脂糖基配制(配制方法见附录H)。

11.3.1.2 琼脂平皿制备:融化的琼脂待冷至45℃~50℃时,以无菌操作倒入直径9cm平皿中,每平皿约15mL。厚度约为4mm,待凝固后置4℃保存备用。

11.3.1.3 打孔:用打孔器按图2布局在已凝固的琼脂糖凝胶平皿打孔,每个平皿打6组,用弯钩挑出孔内琼脂块。

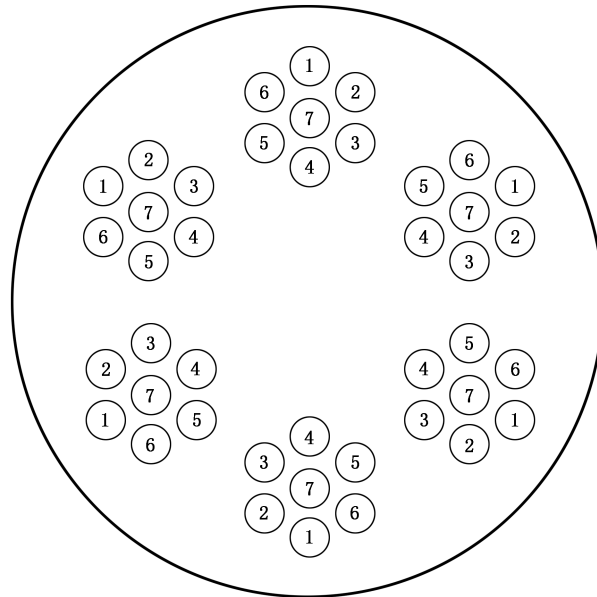


图2 布局示意图

11.3.1.4 按顺时针方向从1~6标记6组,每组各孔从顺时针方向确定为1、2、3、4、5、6号孔,中心孔为7号孔。1号孔靠近平皿边缘,4号孔靠向平皿中心。

11.3.2 加样

用微量加样器将50μL待检血清分别加入到1、3、5号孔,将50μL标准阳性血清分别加入2、4、6号孔,将50μL标准抗原加入7号孔,放入湿盒内,置室温(15℃~25℃)进行反应。分别在24h、48h、72h观察并记录结果。

11.4 结果判定

将琼脂平皿置暗背景在侧光照射下观察。结果判定标准如下:

- 标准阳性血清与抗原孔之间出现一条清晰的白色沉淀线,试验成立。标准阳性血清与抗原孔之间无沉淀线或沉淀线不明显,试验不成立;
- 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3);
- 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4);
- 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,应反复试验,若重复仍为弱阳性反应时判阳性(见图5);

- e) 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(见图6);
- f) 试验后24 h、48 h、72 h判定为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。

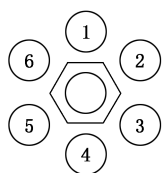


图3 阳性(1,3,5)

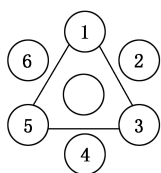


图4 阴性(1,3,5)

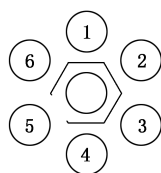


图5 弱阳性(5)

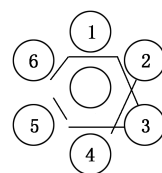


图6 非特异性(3,5)

12 竞争酶联免疫吸附试验(C-ELISA)

12.1 器材

12.1.1 普通恒温箱(37℃)、水浴箱(37℃)。

12.1.2 冰箱(4℃和-20℃)、微量振荡器、混合仪、酶标洗板仪及酶标读板仪。

12.1.3 96孔中度吸附性酶标板、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、多道加样器及滴头、50 mL三角烧瓶。

12.2 试剂

12.2.1 阳性对照血清: BTV抗体阳性的牛血清或羊血清,中和抗体效价1:640。用1:10、1:80倍稀释作为强、弱阳性对照血清。

12.2.2 阴性对照血清: 蓝舌病抗体阴性的牛血清或羊血清,试验中以1:10稀释。

12.2.3 单克隆抗体(单抗): 鼠抗蓝舌病病毒VP7单克隆抗体(BTV-Mab)。

12.2.4 酶结合物: 山羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)辣根过氧化物酶结合物,-20℃保存,使用前解冻,置4℃备用。

12.2.5 0.05 mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.6)、乙酸-柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)、磷酸盐缓冲液(PBST)、四甲基联苯胺储存液、30%过氧化氢(H₂O₂)、含1%脱脂奶的PBST(PBST-SM)、1 mol/L硫酸。配制方法见附录C。

12.3 试验程序

12.3.1 包被抗原

用碳酸盐缓冲液将抗原稀释到指定的工作浓度,加入96孔中度吸附性酶标板,每孔50 μL,4℃过夜。用PBST洗板5次,铝箔袋抽真空密封4℃保存。

12.3.2 加样

12.3.2.1 待检样品: 将待检血清用PBST-SM作1:10稀释,每份样品2孔,每孔50 μL加入酶标板。

12.3.2.2 对照样品: 将强阳性血清、弱阳性血清和阴性血清分别用PBST-SM作1:10稀释,每个对照样品设2孔,每孔加50 μL。空白对照两孔,每孔加PBST-SM 50 μL。

12.3.3 反应

置37℃温箱振荡1 h。

12.3.4 加 BTV-Mab

用 PBST-SM 将 BTV-Mab 稀释到指定的工作浓度,每孔加 50 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱振荡 30 min。

12.3.5 加酶结合物

用 PBST-SM 将酶结合物稀释到指定的工作浓度,每孔加 50 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 30 min。

12.3.6 洗板

用 PBST 洗板 5 次,在吸水纸上拍干。

12.3.7 加底物和终止液

将底物按比例稀释(取 9.7 mL 乙酸-柠檬酸缓冲液,分别加入 300 μL 四甲基联苯胺储存液和 5 μL 30% 过氧化氢),每孔加 100 μL ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 10 min~15 min,每孔加入 100 μL 2 mol/L 硫酸终止反应。

12.4 读数和抑制率计算

12.4.1 在酶标读板仪读取 450 nm 波长的光度吸收值(OD_{450})。

12.4.2 抑制率(%)(I)按式(1)计算:

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

式中:

A_s ——样品光度吸收值;

A_n ——标准阴性光度吸收值。

12.5 试验成立的条件

阴性对照 OD_{450} 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。

12.6 结果判定

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。

13 诊断结果判定

13.1 疑似病例

符合 3.4 者。

13.2 确诊病例

疑似病例和 4.5 或 9.5 或 10.6 中任何一项阳性者。

13.3 隐性感染

符合 4.5 或 9.5 或 10.6 或 11.4 或 12.6 中任何一项阳性者,但不符合 3.2 者。

第 11 章(AGID)的方法存在特异性差和结果判读主观的缺点,建议对 11.4 检测阳性动物用第 12 章(C-ELISA)的方法进行验证。

附 录 A
(规范性附录)
细胞培养液的制备

A.1 MEM 营养液的配制

MEM 干粉	9.6 g
去离子水	1 000 mL

充分溶解后经 0.22 μm 孔径微孔滤膜滤过除菌。

细胞培养生长液是在滤过除菌营养液的基础上,按 10%加入灭活犊牛血清和 100 IU/mL 青霉素和链霉素,然后用 7.5% NaHCO_3 溶液调整 pH 值至 7.2。

细胞培养维持液是在滤过除菌营养液的基础上,按 2%加入灭活犊牛血清和 100 IU/mL 青霉素和链霉素,然后用 7.5% NaHCO_3 溶液调整 pH 值至 7.2。

A.2 M199 营养液的配制

M199 干粉	9.6 g
去离子水	1 000 mL

充分溶解后经 0.22 μm 孔径微孔滤膜滤过除菌。

细胞培养生长液是在滤过除菌营养液的基础上,按 10%加入灭活犊牛血清和 100 IU/mL 青霉素和链霉素,然后用 7.5% NaHCO_3 溶液调整 pH 值至 7.2。

细胞培养维持液是在滤过除菌营养液的基础上,按 2%加入灭活犊牛血清和 100 IU/mL 青霉素和链霉素,然后用 7.5% NaHCO_3 溶液调整 pH 值至 7.2。

A.3 胰酶消化液配制

氯化钠(NaCl)	8 g
氯化钾(KCl)	0.4 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.4 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.08 g
碳酸氢钠(NaHCO_3)	0.35 g
EDTANa_2	0.2 g
Trypsin	2.5 g

用去离子水定容至 1 000 mL,静置 4 h,用 0.22 μm 孔径微孔滤膜滤过除菌。分装 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

附 录 B
(规范性附录)
免疫酶染色试验用溶液的配制

B.1 PBST

氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	2.29 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.20 g
加水至	1 000 mL
吐温-20	0.50 mL

B.2 1%明胶 PBST

称取明胶 1 g,加 PBST 100 mL 溶解,4 ℃ 保存备用。

B.3 3-氨基-9-乙基吖唑(AEC)液

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

将 AEC 用 DMSO 溶解后,加至 50 mL 乙酸盐缓冲液(pH 6.0)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 C
(规范性附录)

酶联免疫试验和定型微量中和试验用溶液的配制

C.1 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6 包被用)

碳酸钠(Na_2CO_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。	

C.2 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 pH 9.6, 高压灭菌 4 ℃保存。	

C.3 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。

C.4 10×PBST

氯化钠(NaCl)	80 g
氯化钾(KCl)	2 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	22.9 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	2 g
吐温-20	5 mL
加蒸馏水至	1 000 mL
磁力搅拌器搅拌充分溶解,室温放置备用。	

C.5 PBST 使用液

10 倍 PBST	100 mL
蒸馏水	900 mL

C.6 PBST-SM

PBST	100 mL
脱脂奶粉	1 g

C.7 2 mol/L 硫酸

双蒸馏水	160 mL
浓硫酸	20 mL

C.8 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 D
(资料性附录)
Karber 方法

Karber 法的计算见式(D.1)用常用对数(lg)计算：
$$\lg \text{TCID}_{50} \text{ (或 } \text{LD}_{50} \text{、} \text{ELD}_{50} \text{)} = L + d(s - 0.5) \quad \dots\dots\dots \text{(D.1)}$$

式中：
 L ——病毒的最低稀释度的对数(lg)；
 d ——稀释系数，即组距；
 s ——细胞病变比值的和。
以下例(见表 D.1)说明：

表 D.1 病毒 TCID₅₀ 滴定

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

本例 $L = -2, d = -1, s = 4/4 + 4/4 + 4/4 + 3/4 + 2/4 + 0/4 = 4.25$
代入公式： $\lg \text{TCID}_{50} = -2 + (-1) \times (4.25 - 0.5)$
 $= -5.75$
 $\text{TCID}_{50} = 10^{-5.75}$
查反对数表可得 $\text{TCID}_{50} = 1/560\,000$
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。

附 录 E
(规范性附录)
蚀斑及蚀斑抑制定型试验

E.1 滤纸圆片制备

直径为 0.2 cm 定量分析滤纸片,置小容器内 103.4 kPa 30 min 高压灭菌,烘箱内烘干备用。

E.2 0.1%中性红

0.1 g 中性红溶解于双蒸无离子水,103.4 kPa 高压灭菌 30 min,4 ℃ 冰箱保存备用。

E.3 4%低熔点琼脂糖

低熔点琼脂糖 4 g 溶解于 100 mL 蒸馏水,103.4 kPa 高压灭菌 30 min,4 ℃ 保存。

附 录 F
(规范性附录)
RT-PCR 试验用溶液和引物的配制

F.1 50×TAE 电泳缓冲液

Tris	242 g
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	37.2 g
醋酸	57.1 mL
去离子水	1 000 mL

F.2 1×TAE

50×TAE	20 mL
去离子水	1 000 mL

F.3 琼脂糖凝胶

琼脂糖粉末	2 g
1×TAE 电泳缓冲液	100 mL

微波炉中溶解后,冷却至 60 ℃左右,加入溴化乙锭贮液使其最终浓度为 0.5 μg/ mL,并充分混匀。

F.4 RT-PCR 引物序列、合成及配制

表 F.1 RT-PCR 引物序列、合成及配置

引物名称	序列(5'-3')	用途及检测靶基因位置
BTV M6-A	GTTCTCTAGTTGGCAACCACC	用于 RT-PCR 扩增 BTV RNA 6 片段的第 11~284 位核苷酸
BTV M6-B	AAGCCAGACTGTTTCCCGAT	用于 RT-PCR 扩增 BTV RNA 6 片段的第 11~284 位核苷酸
BTV M6-C	GCAGCATTTTGAGAGAGCGA	用于 Nested-PCR 扩增 BTV RNA 6 片段的第 170~270 位核苷酸
BTV M6-D	CCCGATCATACATTGCTTCCT	用于 Nested-PCR 扩增 BTV RNA 6 片段的第 170~270 位核苷酸
注 1: 引物可由生物公司合成,纯度为 HPLC 级。		
注 2: 用 DEPC 水溶解、稀释引物。将 RT-PCR 扩增用引物 BTV M6-A 和 BTV M6-B 混合,终浓度为各 20 μmol/L; 将 Nested-PCR 扩增用引物 BTV M6-C 和 BTV M6-D 混合,终浓度为各 20 μmol/L。-20 ℃保存备用。		

附 录 G
(规范性附录)

荧光 RT-PCR 引物和探针的合成与配制

引物和探针的序列、合成与配制见表 G.1。

表 G.1 引物和探针的序列、合成与配制

引物或探针名称	序列(5'-3')	靶基因中的位置
BTV _{rsa} 291F	GCGTTCGAAGTTTACATCAAT	291-311
BTV _{rsa} 387R	CAGTCATCTCTCTAGACACTCTATAATTACG	387-357
BTV _{uni} 291F	GCTTTTGAGGTGTACGTGAAC	291-311
BTV _{uni} 381R	TCTCCCTTGAAACTCTATAATTACG	381-357
BTV-S1-RSA341-320	FAM-CGGATCAAGTTCACTCCACGGT-BHQ1	341-320
BTV-S1-346-323	FAM-TCCTCCGGATCAAGTTCACTCCAC-BHQ1	346-323
注 1: 引物 BTV_{rsa}291F 和 BTV_{rsa}387R 主要用于扩增东方型 BTV 毒株的 RNA 1 目标片段, 探针 BTV-S1-RSA341-320 主要用于检测东方型 BTV 毒株的 RNA 1 的扩增片段。 注 2: 引物 BTV_{uni}291F 和 BTV_{uni}381R 主要用于扩增西方型 BTV 毒株的 RNA 1 目标片段, 探针 BTV-S1-RSA341-320 主要用于检测西方型 BTV 毒株的 RNA 1 的扩增片段。 注 3: 引物和探针可由生物公司合成, 纯度为 HPLC 级。 注 4: 合成好的 4 条引物用无 RNase 的水溶解, 稀释并混合, 浓度为各 20 μmol/L, -20 ℃ 保存备用。 注 5: 合成好的 2 条探针用无 RNase 的水溶解, 稀释并混合, 浓度为各 3 μmol/L, -20 ℃ 保存备用。		

附 录 H
(规范性附录)
琼脂平板的制备

琼脂糖	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 pH 值至 7.4~7.6 之间,103.4 kPa 高压消毒 20 min,融化的琼脂待冷至 45 ℃~50 ℃时,倒入直径 9 cm 平皿中,每平皿约 15 mL,厚度约为 4 mm,待琼脂凝固后置 4 ℃保存备用。

