SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1128—2002

赤羽病病毒微量血清中和试验操作规程

Protocol of micro-serum neutralization test for akabane virus antibodies

2002-08-02 发布　　2003-01-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
赤羽病病毒微量血清中和试验操作规程
SN/T 1128—2002
*
中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
*
开本 880×1230 1/16 印张 1/2 字数 10 千字
2002年11月第一版 2002年11月第一次印刷
印数 1—2 000
*
书号:155066·2-14747 定价 6.00 元
网址 www.bzcbs.com

版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

前　言

本标准试验方法是参考澳大利亚《动物疾病诊断技术标准》介绍的方法，并经过长期实践、改进，使之进一步具体化，而形成现行的标准。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张晓丁、苏卫、王涛、李凌枫。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

赤羽病病毒微量血清中和试验操作规程

1 范围

本标准规定了赤羽病微量血清中和试验方法。

本标准适用于动物赤羽病中和抗体的检测。

2 引用标准

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

CPE 致细胞病变作用。

$TCID_{50}$ 半数组织培养感染量。

AKV 赤羽病病毒。

4 原理

动物感染 AKV 后，能在体内产生特异性中和抗体。这种特异性中和抗体与病毒结合后，能使病毒失去对敏感细胞的感染能力，从而阻止病毒的繁殖。这一反应不但表现为一种病毒只能被相应的免疫血清所中和，而且还表现中和一定数量的病毒，必须有一定效价的免疫血清。血清中和试验以测定病毒的感染力为基础，中和抗体滴度的判定以比较病毒受免疫血清中和后的残存感染力为依据，所以必须选用对病毒敏感的细胞为实验材料，以保证实验的准确性和敏感性。

5 试剂和材料

5.1 水

本标准所用水应符合 GB/T 6682—1992 中二级水的规格。

5.2 病毒

AKV 病毒由指定单位提供。

5.3 对照血清

AKV 标准阳性血清、阴性血清由指定单位提供被检血清。

5.4 被检血清

在无菌条件下采取血样，分离血清。

5.5 细胞

BHK_{21}、Vero、Hmlu-1 传代细胞。

5.6 本标准所用溶液

配方(包括培养液、维持液、细胞分散液、稀释液)及配制方法见附录 A。

6 器械和设备

6.1 倒置光学显微镜
6.2 微型振荡器
6.3 二氧化碳培养箱
6.4 冰箱：−20℃保存血清，−70℃保存种毒。
6.5 96孔组织培养板
6.6 微量移液器(20 μL～200 μL)

7 种毒繁殖

将AKV接种于BHK21、Vero、Hmlu-1细胞单层，37℃吸附1 h后加入维持液，置37℃培养，逐日观察。待CPE达75%以上，收获病毒培养物冻融，2 000 r/min离心20 min。取上清液分装小瓶，每瓶1 mL，置−70℃保存备用。

8 毒价测定

将病毒在96孔板上作(10^0～10^{-10})倍稀释，每个稀释度作八孔，每孔病毒悬液为50 μL，补充50 μL稀释液，加入细胞悬液100 μL(3×10^5个细胞/mL)，每块板设八孔细胞对照。置5%二氧化碳培养箱于37℃培养，从48 h～120 h逐日在倒置显微镜下观察记录CPE。按Karber方法计算出病毒的$TCID_{50}$/50 μL。根据测定结果将病毒液稀释成100 $TCID_{50}$/50 μL的工作浓度。

9 试验程序

9.1 灭活

AKV标准阳性血清、阴性血清、被检血清经56℃，30 min灭活。

9.2 对照设立

——细胞对照：设2孔正常细胞对照，每孔加细胞悬液100 μL(3×10^5个细胞/mL)、稀释液100 μL。

——阳性对照：将阳性血清从1∶2稀释至1∶4，每个稀释度作2孔，每孔分别加入阳性血清和100 $TCID_{50}$/50 μL病毒悬液各50 μL，再加入细胞悬液100 μL(3×10^5个细胞/mL)。

——阴性对照：设阴性对照2孔，每孔分别加入阴性血清和100 $TCID_{50}$/50 μL病毒悬液各50 μL，再加入细胞悬液100 μL(3×10^5个细胞/mL)。

——病毒回归对照：将病毒稀释成1 000、100、10、1 $TCID_{50}$/50 μL，每个稀释度作2孔，每孔加入病毒悬液50 μL，再加入细胞悬液100 μL(3×10^5个细胞/mL)，每孔补充稀释液50 μL。

——血清毒性对照：每份被检血清按稀释度各设1孔毒性对照，每孔加各稀释度血清50 μL、稀释液50 μL和细胞悬液100 μL(3×10^5个细胞/mL)。

9.3 中和试验

将被检血清从1∶4稀释至1∶64，每个稀释度作3孔，每孔加各稀释度血清50 μL，第一孔作为血清毒性对照孔，加入稀释液50 μL和细胞悬液100 μL(3×10^5个细胞/mL)；第二、三孔为正式试验孔，每孔加入病毒悬液50 μL(100 $TCID_{50}$/50 μL)，振荡2 min～3 min，置室温(25℃)中和1 h，加入细胞悬液100 μL(3×10^5个细胞/mL)。置5%二氧化碳培养箱于37℃培养5 d，24 h后逐日在倒置显微镜下观察CPE并记录。

10 结果判定

当病毒对照在100 $TCID_{50}$/50 μL出现CPE，阳性、阴性、正常细胞、血清毒性对照全部成立时，才能

进行判定。判定时间为 48 h～120 h。被检血清在 50%出现保护判为阳性，低于 50%判为阴性。当某份血清的某一稀释度出现 50%以上保护时，该血清稀释度即为该份血清的中和抗体滴度。被检血清的中和抗体滴度达到 1∶4 以上判为阳性，低于 1∶4 判为阴性。

附 录 A
（规范性附录）
溶 液 配 方

A.1 培养液

199 培养基（也可用 MEM 或其他培养基），加入 10%无 AKV 病毒抗体胎牛血清（56℃，30 min 灭活），含青霉素 200 IU/mL，链霉素 200 μg/mL，抽滤除菌分装，置 4℃保存备用，有效期为三个月。

A.2 维持液

199 培养基（也可用 MEM 或其他培养基），加入 2%无 AKV 病毒抗体胎牛血清（56℃，30 min 灭活），含青霉素 200 IU/mL，链霉素 200 μg/mL，置 4℃保存备用，有效期为三个月。

A.3 细胞分散液

胰酶	2.50 g
乙二胺四乙酸二钠（EDTA）	0.20 g
无钙镁 PBS	1 000 mL

抽滤除菌分装，置－20℃保存备用，有效期为 6 个月。

A.4 无钙镁 PBS 液

氯化钠	8.0 g
氯化钾	0.2 g
磷酸氢二钠	1.15 g
磷酸二氢钾	0.2 g
一级水	1 000 mL

将上述成分依次溶解、分装、高压灭菌（68.94 kPa 15 min）或抽滤除菌备用，有效期为三个月。

SN/T 1128-2002

版权专有 侵权必究

*
书号：155066・2-14747
定价： 6.00 元