

ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 543—2002

牛流行热微量中和试验方法

Micro-neutralization test for bovine ephemeral fever

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

牛流行热(简称 BEF)又称牛暂时热、三日热、一日热、僵硬病等,本病在亚、非和大洋洲许多国家均有发生。该病是由弹状病毒科暂时热病毒属牛流行热病毒引起的一种急性、热性传染病,呈周期性流行。在发病期间,对牛的产奶量、使役能力、增重、精液品质都有严重影响,还可导致少数病牛瘫痪,流产甚至死亡。严重危害养牛业的发展。

本标准是根据我国科研成果,与澳大利亚合作研究成果和我国的实践经验制定的。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 为规范性附录,附录 D 为资料性附录。

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:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:白文彬、严隽端。

牛流行热微量中和试验方法

1 范围

本标准规定了牛流行热微量血清中和试验技术。

本标准适用于牛流行热的诊断、免疫监测和流行病学调查。

2 微量血清中和试验

2.1 器材

2.1.1 营养液和 0.05%胰酶 EDTA(简称 ATV)液,配制方法见附录 A。

2.1.2 细胞及其制备、传代、计数方法,见附录 B。

2.1.3 抗原(指示毒)、标准阳性血清、阴性血清由法定单位提供,按说明书使用。抗原毒价以及工作抗原(100 TCID_{50})测定方法见附录 C。

2.1.4 微量滴定板:无菌带盖 96 孔微量滴定板(简称微量板)。

2.1.5 微量加样器:25 μL 、50 μL 及 100 μL 单道和多道加样器,加样塑料滴头(装量为 25 μL ~100 μL ,与加样器配套使用)。

2.1.6 二氧化碳培养箱。

2.2 操作方法

2.2.1 灭活

被检血清以及阴、阳性血清用前均于 56 C 水浴锅中灭活 30 min。

2.2.2 准备

制备工作抗原(指示毒)方法(见第 C.1 章),将已知毒价的合格种毒用生长液(见第 A.1 章)稀释成 $100\text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

2.2.3 定性试验

2.2.3.1 向微量板的每孔各加 25 μL 生长液。

2.2.3.2 在第一排加被检血清,每份占 2 孔,每孔 25 μL ,混合均匀,即成 2 倍稀释。

2.2.3.3 用多道加样器从第 1 孔取 25 μL 液体对应移入第 2 排孔内,混匀即成 4 倍稀释。再从孔内吸出 25 μL 丢弃。

2.2.3.4 每孔加工作抗原 25 μL ,混匀置 37 C 孵育 60 min。

2.2.3.5 每孔加细胞悬液 100 μL (30 000 个细胞)。细胞计数方法见第 B.3 章。

2.2.3.6 试验对照系统的设置。每批试验的对照系统的设置:标准阳性血清,从第 1 列至第 6 列,每列 4 孔,逐列稀释(即 2 倍~64 倍),标准阴性血清、细胞对照和病毒对照各 1 列 4 孔。同时对本试验使用的工作抗原,随同试验再次进行测定。

2.2.3.7 用灭菌的盖子盖上微量板,置 37 C 二氧化碳(CO_2)培养箱内,培养 5 d。从第 3 d 起逐日记录细胞病变效应(CPE)。

2.2.3.8 结果判定:标准阳性血清中和抗体价 ≥ 64 ,标准阴性血清、病毒对照排各孔均出现 CPE,工作抗原含量滴定在规定的范围之内(CPE 出现的孔数与毒价查阅方法见第 D.1 章),细胞对照孔正常情况下,4 倍稀释的被检血清列,两孔都出现 CPE 时,判为阴性;仅 1 孔出现 CPE,被判为可疑,应再重复试验一次;两孔均不产生 CPE 时,则被判为阳性。