

ICS 11.220
CCS B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 549—2025

代替 NY/T 549—2002

赤羽病诊断技术

Diagnostic techniques for akabane disease

2025-04-27 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 生物安全措施	1
6 临床诊断	1
7 样品采集、处理与运输	2
8 病毒分离鉴定	3
9 RT-PCR 检测	4
10 实时荧光 RT-PCR 检测	5
11 琼脂免疫扩散试验	5
12 微量血清中和试验	6
13 阻断酶联免疫吸附试验	8
14 综合判定	9
附录 A(规范性) 常用溶液配制	10
附录 B(规范性) RT-PCR 试验相关溶液配制	11
附录 C(资料性) RT-PCR 引物序列及荧光 RT-PCR 引物和探针序列信息	12
附录 D(规范性) AKAV 灭活抗原、标准阳性血清及标准阴性血清制备方法	14
附录 E(资料性) 琼脂免疫扩散试验结果判定示例	15
附录 F(规范性) 阻断酶联免疫吸附试验相关溶液配制	16

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 NY/T 549—2002《赤羽病细胞微量中和试验方法》，与 NY/T 549—2002 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了临床诊断(见第 6 章)；
- b) 增加了样品采集、处理与运输(见第 7 章)；
- c) 增加了病毒分离鉴定(见第 8 章)；
- d) 增加了 RT-PCR 试验(见第 9 章)；
- e) 增加了实时荧光 RT-PCR 试验(见第 10 章)；
- f) 增加了琼脂免疫扩散试验(见第 11 章)；
- g) 增加了阻断酶联免疫吸附试验(见第 13 章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：青岛海关技术中心、中国动物卫生与流行病学中心、烟台海关技术中心、南京农业大学、昆明海关技术中心、艾迪威(青岛)生物科技有限公司、天津海关技术中心、郑州国际旅行卫生保健中心、贵州省畜牧兽医研究所。

本文件主要起草人：孙涛、李超、尹伟力、李阳、邹海涛、艾军、何辉、吴发兴、肖妍、徐超、房保海、余波、徐天刚、左媛媛。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2002 年首次发布为 NY/T 549—2002；

——本次为第一次修订。



引 言

赤羽病是由赤羽病病毒(akabane virus, AKAV)引起的牛、绵羊、山羊的一种非接触性传染的病毒性疾病,主要以怀孕母畜繁殖障碍(流产、早产、死产、胎儿畸形、木乃伊胎等),以及新生动物关节弯曲和积水性无脑症为特征。赤羽病病毒属于布尼亚病毒科正布尼亚病毒属,主要通过蚊子和库蠓等媒介昆虫传播,也可通过垂直传播。该病于1949年在日本群马县赤羽村发生而得名。本文件的实施将提高我国赤羽病的诊断和监测水平,以便及时采取防控措施,为保护家畜健康和产业发展起到重要作用。

本文件的制定参考了世界动物卫生组织《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2022年英文版),并结合了我国相关技术研究新成果。

赤羽病诊断技术

1 范围

本文件规定了赤羽病的临床诊断、样品采集与处理、病毒分离鉴定、RT-PCR 方法、实时荧光 RT-PCR 方法、微量血清中和试验、阻断酶联免疫吸附试验、琼脂免疫扩散试验等方法的技术要求。

本文件适用于牛、绵羊和山羊赤羽病的诊断、检测、检疫、监测和流行病学调查。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AKAV: 赤羽病病毒(akabane virus)

BHK-21: 幼仓鼠肾细胞(baby hamster kidney)

CPE: 细胞病变(cytopathic effect)

Ct: 循环阈值(cycle threshold)

DEPC: 焦碳酸乙二酯(diethyl pyrocarbonate)

DNA: 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

EDTA: 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)

ELISA: 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay)

FITC: 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate)

Hmlu-1: 仓鼠肺细胞(hamster lung cell)

PBS: 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)

PBST: 含吐温-20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline with tween-20)

PCR: 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

RNA: 核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-PCR: 反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction)

SPF: 无特定病原体(specific pathogen free)

TCID₅₀: 半数组织感染量(median tissue culture infective dose)

TMB: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)

Vero: 非洲绿猴肾细胞(verda reno cell)

5 生物安全措施

按照 GB 19489 的规定执行。

6 临床诊断

6.1 流行病学

6.1.1 传染源:病牛、病羊及带毒动物是最主要的传染源。病毒主要存在于有病毒血症的血液中,偶尔也可从胚胎组织中分离到。

6.1.2 传播途径:主要通过蚊子和库蠓等媒介昆虫传播,一般不通过直接接触传播,可垂直传播。

6.1.3 易感动物:牛、绵羊、山羊等家养反刍动物均易感,尤以牛发病常见,马、骆驼等也可感染本病。

6.1.4 流行特点:赤羽病一般呈零星散发,但当有良好的虫媒生活环境(充沛雨水、适宜温度)及虫媒从疫区迁移至其他地区感染易感动物时,可能会导致该病大规模暴发。

6.2 临床症状

6.2.1 成年活畜:成年牛、绵羊和山羊一般无症状或出现轻微临床症状,但怀孕母畜感染后流产率和后代先天性畸形率增加,可见死胎、早产胎和木乃伊胎等。

6.2.2 新生幼畜:主要症状为先天性畸形。可见关节弯曲、积水性无脑、共济失调、肌肉发育不良等。畸形的发生率取决于母畜感染时的妊娠阶段和品种。

6.3 病理变化

神经和肌肉病变,如非化脓性脑脊髓炎、局部脑退化性脑脊髓炎造成的脑穿通、小脑症、脑积水、腹角运动神经元和轴突消失、脊髓运动神经束髓磷脂减少、伴随骨骼肌薄壁组织退化的肌管坏死和多发性肌炎等。脊髓病变导致的脊柱侧凸、驼背和关节弯曲会影响所有骨骼关节。

6.4 临床判定

当易感动物出现上述部分或全部临床症状和病理变化,并符合流行病学特征时,可初步判定为疑似病例。疑似病例应进一步采样送实验室诊断。

7 样品采集、运输与保存

7.1 试剂

7.1.1 保护液,按照附录 A 中 A.1 的规定配制。

7.1.2 平衡盐溶液,按照 A.2 的规定配制。

7.2 采样工具

7.2.1 器械:解剖刀、剪刀、镊子、注射器(5 mL、10 mL)及针头、真空采血管、0.22 μm 微孔滤膜过滤器。

7.2.2 容器:带螺帽容器、灭菌塑料袋。

7.2.3 个人防护用具:防护服、防护目镜或面屏、防护帽、防护靴、口罩、手套。

7.2.4 采样记录用品:采样单、记号笔、防水标签等。

7.2.5 其他:无菌棉拭子、医用棉签、医用纱布、封口膜、冰袋、冷藏箱等。

7.3 样品采集与处理

7.3.1 血液样品:采用无菌注射器直接采集发病动物抗凝血,不少于 5 mL,将抗凝血以 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,将血清 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。将血细胞用 PBS 洗涤重悬,以 3 000 r/min 重复离心 10 min,弃上清液,用加双抗(含青霉素 2 000 U/mL、链霉素 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 PBS 制成 10% 的血细胞悬液,然后反复冻融 3 次,以 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。

7.3.2 组织样品:无菌采集流产胎儿和死胎相关组织样品。选择脑、脊髓、胎盘、肝、脾、肺、肾等器官组织。取 25 g~50 g 样品放入装有 50% 甘油-PBS 保存液的样品保存管中 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存作为原始样本。从原始样本中无菌采集组织样品约 2 g,置于研钵或组织捣碎机中研磨或捣碎后用添加双抗(含青霉素 2 000 U/mL、链霉素 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的细胞培养液或 PBS 制成 10% 的组织悬液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 4 h 后反复冻融 3 次。3 000 r/min 离心 20 min,取上清液通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤器过滤除菌,标记编号后用于病原检测或 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。

7.4 样品保存与运输

采集或处理的样品在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下临时保存不超过 24 h;若需长期保存,须放置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,但应避免反复冻融。采集的样品应密封保存于 4 $^{\circ}\text{C}$,用于病原分离的样品应在 24 h~48 h 内冷链运

送到实验室。

8 病毒分离鉴定

8.1 仪器设备

- 8.1.1 倒置光学显微镜。
- 8.1.2 荧光显微镜。
- 8.1.3 CO₂ 培养箱(37 ℃)。
- 8.1.4 研钵或组织捣碎机。
- 8.1.5 离心机。
- 8.1.6 血细胞计数板。
- 8.1.7 可调微量移液器(20 μL~200 μL,100 μL~1 000 μL)。
- 8.1.8 冰箱(4 ℃、-20 ℃、-80 ℃)。
- 8.1.9 II级生物安全柜。

8.2 试剂材料

- 8.2.1 Vero、BHK-21 或 Hmlu-1,使用时配制成 3×10^5 /mL 细胞悬液。
- 8.2.2 1 d~2 d 昆明系白小鼠乳鼠。
- 8.2.3 6 d~8 d SPF 鸡胚。
- 8.2.4 PBS,按照 A.3 规定的方法配制。
- 8.2.5 细胞基础培养液,按照 A.4 规定的方法配制。
- 8.2.6 细胞完全培养液,按照 A.5 规定的方法配制。
- 8.2.7 细胞维持液,按照 A.6 规定的方法配制。
- 8.2.8 细胞分散液,按照 A.7 规定的方法配制。

8.3 病毒分离

8.3.1 细胞分离法

8.3.1.1 制备单层细胞:按常规方法将 Vero、BHK-21 或 Hmlu-1 分装在 T25 细胞培养瓶中,37 ℃ 培养 48 h,培养细胞至单层,待长至 80% 左右。

8.3.1.2 接种细胞:将处理后的 1 mL 剂量的血液或组织样品上清液接种已长成单层的细胞,每份样品接种 2 瓶。接种前需先倒去 T25 细胞培养瓶中的营养液,再加入 1 mL 处理后的病料液,置于 5% CO₂ 培养箱内 37 ℃ 培养 2 h~3 h 后吸去上清液,加 4 mL 细胞维持液,置于 5% CO₂ 培养箱内 37 ℃ 培养,24 h 后逐日观察 CPE,连续观察 7 d,收获出现 CPE 的细胞液,将细胞置于 -80 ℃ 冰箱冻融 2 次,取上清液用于病毒鉴定。

8.3.1.3 盲传:若接种细胞第一代 7 d 后未出现 CPE,收获细胞/病毒液再接种生长 48 h 的单层细胞进行盲传,即 1 mL 第一代细胞病毒液在 5% CO₂ 培养箱内 37 ℃ 培养 2 h~3 h,于 37 ℃ 吸附 2 h~3 h 后吸去上清液,加 4 mL 细胞维持液,置于 5% CO₂ 培养箱内 37 ℃ 培养,如此盲传 2 代,收获出现 CPE 的细胞液,将细胞置于 -80 ℃ 冰箱冻融 2 次,取上清液用于病毒鉴定。

8.3.2 乳鼠分离法

取 1 d~2 d 健康乳鼠,每只脑内接种组织上清液 0.01 mL,每种样品接种 5 只乳鼠。每天至少观察 3 次,连续观察 7 d。及时收集濒死和发病乳鼠的脑组织,制成上清液供传代或鉴定。接种第一代乳鼠未出现发病死亡的,宜用乳鼠传代 2 次或再接种细胞或鸡胚进一步分离。

8.3.3 鸡胚分离法

用组织上清液接种 6 d~8 d SPF 鸡胚卵黄囊,每样接种 4 枚 SPF 鸡胚,每枚接种 0.1 mL。每天早、晚各照蛋 1 次,连续观察 7 d。弃去 24 h 内非特异性死亡鸡胚,收获死胚和未死亡鸡胚的绒毛尿囊膜、尿

囊液、脑、肝、脾、肾、肌肉组织等,有病变的收获病变组织,制成组织上清液,供传代或鉴定。接种第一代未出现死胚的,盲传2代,有病变的收获病变组织,制成组织上清液供鉴定,没有病变的弃去。

8.4 病毒鉴定

8.4.1 RT-PCR 试验鉴定。具体操作及结果判定按照第9章的规定执行。

8.4.2 实时荧光 RT-PCR 试验鉴定。具体操作及结果判定按照第10章的规定执行。

9 RT-PCR 检测

9.1 仪器设备

9.1.1 PCR 扩增仪。

9.1.2 台式低温高速离心机。

9.1.3 电泳仪。

9.1.4 凝胶成像分析仪。

9.1.5 微量可调移液器(2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL)。

9.1.6 II级生物安全柜。

9.2 试剂材料

9.2.1 DEPC 水,按照附录 B 中 B.1 的规定配制。推荐使用商品化 DEPC 处理的无 RNA 酶的水。

9.2.2 电泳缓冲液,按照 B.2 的规定配制。

9.2.3 1%琼脂糖凝胶板,按照 B.3 的规定配制。

9.2.4 10 \times 电泳上样缓冲液,按照 B.4 的规定配制。

9.2.5 引物(序列见附录 C 中的 C.1),引物工作浓度为 10 pmol/ μL 。

9.2.6 一步法 RT-PCR 试剂盒。

9.2.7 DNA 分子量标准(Marker DL 2 000)。

9.2.8 无 RNA 酶 PCR 管。

9.3 病毒核酸提取

采用核酸提取试剂提取各类样本中的病毒核酸,或用自动化核酸提取仪提取样本中的病毒核酸。提取被检样本时还需加入阴性对照和阳性对照。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增;若需长期保存,应放置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

9.4 反应体系配制

反应体系体积为 25 μL ,依次加入以下成分:

- a) 5 μL RNA 模板;
- b) 5 μL 5 \times 缓冲液;
- c) 1 μL dNTP 混合液;
- d) 1 μL 引物(AKAVF、AKAVR);
- e) 1 μL 2 \times 酶混合液。

加 DEPC 水补足至 25 μL ,同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

9.5 反应条件

50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 反应完成后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

9.6 电泳

制备 1%琼脂糖凝胶。取 5 μL PCR 产物与 0.5 μL 10 \times 电泳上样缓冲液混合,加入琼脂糖凝胶板的加样孔中,在另一加样孔加入 DNA 分子量标准。盖好电泳仪,插好电极,5 V/cm 电压电泳 30 min~40 min。用凝胶成像分析系统观察拍照存档,用 DNA 分子量标准比较判断 PCR 片段大小。

9.7 结果判定

9.7.1 试验成立条件:阳性对照 RT-PCR 扩增产物电泳后仅在 355 bp 处出现特异性条带,阴性对照和空白对照无此扩增带时可认为试验有效,否则无效。

9.7.2 结果判定:在试验成立条件下,被检样品 RT-PCR 扩增产物电泳后仅在 355 bp 处出现特异性条带,判定为 AKAV 核酸阳性,被检样品 RT-PCR 扩增产物电泳后无特异性条带的判为核酸阴性。

10 实时荧光 RT-PCR 检测

10.1 仪器设备

10.1.1 荧光 PCR 扩增仪。

10.1.2 台式低温高速离心机。

10.1.3 微量可调移液器(2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL)。

10.1.4 II 级生物安全柜。

10.2 试剂材料

10.2.1 DEPC 水,配制方法按照 B.1 的规定执行。推荐使用商品化 DEPC 处理的无 RNA 酶的水。

10.2.2 引物和探针(序列见 C.1),引物浓度均为 10 pmol/ μL ,探针浓度为 10 pmol/ μL 。

10.2.3 一步法荧光 RT-PCR 试剂盒。

10.2.4 无 RNA 酶 PCR 管。

10.3 病毒 RNA 提取

见 9.3。

10.4 反应体系配制

反应体系体积为 25 μL 依次加入以下成分:

- a) 5 μL RNA 模板;
- b) 12.5 μL 2 \times 实时荧光 RT-PCR 反应混合液;
- c) 1 μL 引物(AKAV23F 和 AKAV23R);
- d) 0.5 μL 探针(AKAVP);
- e) 1 μL 2 \times 酶混合液。

加 DEPC 水补足至 25 μL ,同时设置阴性对照、阳性对照和空白对照。也可选用其他商品化的荧光 RT-PCR 反应预混液。

10.5 反应条件

45 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火与延伸 45 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 采集荧光,40 个循环。

10.6 结果判定

10.6.1 试验成立条件:阳性对照实时荧光 RT-PCR 扩增出现 S 形扩增曲线且 C_t 值 \leq 30;阴性对照及空白对照无 S 形扩增曲线且无 C_t 值,可认为试验有效。

10.6.2 结果判定:在试验有效的条件下,有 S 形扩增曲线且 C_t 值 \leq 35,判为 AKAV 核酸阳性;35 $<$ C_t 值 \leq 40 判为可疑,需重新抽提核酸进行实时荧光 RT-PCR 检测。若重复检测结果仍为可疑,则认为 AKAV 核酸阳性; C_t 值 $>$ 40,判为 AKAV 核酸阴性;无 C_t 值且无 S 形扩增曲线,判为 AKAV 核酸阴性。

11 琼脂免疫扩散试验

11.1 仪器设备

11.1.1 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱。

11.1.2 烧杯(200 mL)。

11.1.3 搅拌棒。

11.1.4 电磁炉

- 11.1.5 微量可调移液器(10 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。
- 11.1.6 灭菌平皿(9 cm~15 cm)。
- 11.1.7 打孔器(中心 1 孔,周围 6 孔,孔径 3 mm,孔距 4 mm)。

11.2 试剂材料

- 11.2.1 标准 AKAV 阳性灭活抗原,按照附录 D 中 D.1 的规定配制。
- 11.2.2 标准 AKAV 阳性血清。按照 D.2 的规定配制。
- 11.2.3 标准 AKAV 阴性血清。按照 D.3 的规定配制。
- 11.2.4 琼脂糖。
- 11.2.5 Proclin300。

11.3 试验步骤

- 11.3.1 琼脂板制备:称取琼脂糖 1.0 g、NaCl 8.0 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g,溶于 100 mL 蒸馏水中、搅拌均匀,加热溶化后加入 50 μ L Proclin300,冷却至 45 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$ 时倒平皿,琼脂厚度为 3 mm。琼脂完全凝固后将其置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 1 周。如当天使用,则需将平皿打开,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱倒置干燥 30 min。
- 11.3.2 打孔封底:在制备好的琼脂平皿上用打孔器打孔,并挑出孔内琼脂。中心 1 孔,周围 6 孔,孔径 3 mm,孔距 4 mm,在火焰上封底。
- 11.3.3 加样、孵育、观察:中心孔加入标准 AKAV 灭活阳性抗原,第 1 孔、第 4 孔分别加入标准 AKAV 阳性血清和标准 AKAV 阴性血清,其他孔分别加入待检样品,20 μ L/孔。静置 5 min~10 min,将加样后的平皿轻轻倒置放入填有湿纱布的盒内,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱。48 h 观察结果,72 h 判定结果。

11.4 试验成立条件

标准 AKAV 阳性血清与标准 AKAV 灭活阳性抗原孔之间形成清晰沉淀线,标准 AKAV 阴性血清与标准 AKAV 灭活阳性抗原孔之间未形成清晰沉淀线。

11.5 结果判定

待检血清与标准 AKAV 灭活阳性抗原孔之间形成清晰沉淀线,且与标准 AKAV 阳性血清沉淀线末端相吻合时,待检血清判为阳性;待检血清与标准 AKAV 灭活阳性抗原孔之间无沉淀线形成,待检血清判为阴性(见附录 E)。

12 微量血清中和试验

12.1 仪器设备

- 12.1.1 CO_2 细胞培养箱。
- 12.1.2 96 孔细胞培养板。
- 12.1.3 倒置显微镜。
- 12.1.4 微量可调移液器(10 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。
- 12.1.5 II 级生物安全柜。

12.2 试剂材料

- 12.2.1 病毒:AKAV 细胞毒。
- 12.2.2 细胞:BHK-21、Vero 或 Hmlu-1。
- 12.2.3 细胞基础培养液,按照 A.4 的规定配制。
- 12.2.4 细胞完全培养液,按照 A.5 的规定配制。
- 12.2.5 细胞维持液,按照 A.6 的规定配制。
- 12.2.6 细胞分散液,按照 A.7 的规定配制。
- 12.2.7 标准 AKAV 阳性灭活抗原,按照 D.1 的规定配制。
- 12.2.8 标准 AKAV 阳性血清,按照 D.1 的规定配制。

12.2.9 标准 AKAV 阴性血清,按照 D.3 的规定配制。

12.3 试验程序

12.3.1 细胞毒毒价滴定

12.3.1.1 用细胞基础培养液在 96 孔细胞板上将 AKAV 细胞毒做连续 10 倍比稀释,终点稀释度至 10^{-10} 。

12.3.1.2 每个稀释度设立 8 孔,每孔加入 100 μL AKAV 细胞毒,然后加入 100 μL 细胞悬液(3×10^5 个/mL),每块细胞板设立 8 孔空细胞对照,置于 CO_2 细胞培养箱中 37°C 培养 5 d。

12.3.1.3 细胞培养 5 d 后,在倒置显微镜下观察并记录 CPE,按 Karber 法计算 TCID_{50} 。

TCID_{50} (用常用对数表示)按公式(1)计算。

$$\lg \text{TCID}_{50} = L + d(s - 0.5) \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$\lg \text{TCID}_{50}$ ——半数组织培养感染剂量的对数;

L ——病毒的最低稀释倍数;

d ——稀释系数,即组距;

s ——细胞病变比值的和。

12.3.2 血清中和

12.3.2.1 将待检血清 56°C 水浴 30 min 灭活。

12.3.2.2 用基础培养基将待检血清作 1:4 稀释,每份待检血清设立 2 孔,每孔加入 50 μL 待检血清和 50 μL AKAV 细胞毒(病毒滴度为 100 $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$),轻轻振荡 96 孔板,使已稀释血清与细胞毒充分混合,置于 CO_2 细胞培养箱中 37°C 培养 1 h 后,每孔加入 100 μL 细胞悬液(3×10^5 个/mL)。

12.3.2.3 设立对照:

- a) 设立正常细胞对照 2 孔,每孔加细胞培养液 100 μL ;
- b) 设立阳性血清对照:将阳性血清从 1:4 开始 2 倍稀释至高于标定效价的 2 个滴度(例如,标定效价为 1:64,则需稀释至 1:256),每个稀释度加 2 孔,每孔分别加已稀释阳性血清和病毒工作液各 50 μL ,混匀;
- c) 设立阴性血清对照 2 孔,每孔加阴性血清和病毒工作液各 50 μL ,混匀;
- d) 设立病毒回归对照:将病毒工作液作 10 倍递增稀释至 10^{-3} ,使病毒含量分别为 100 $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ 、10 $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ 、1 $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ 、0.1 $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$,每个稀释度加 4 孔,每孔加稀释病毒液和细胞培养液各 50 μL ,混匀;
- e) 设立血清毒性对照:每份血清按稀释度各设 1 孔毒性对照,每孔加各稀释度血清和细胞培养液各 50 μL ,混匀;
- f) 将上述对照置于 5% CO_2 细胞培养箱中 37°C 培养 1 h 后,每孔加入 100 μL 细胞悬液(3×10^5 个/mL)。

12.3.2.4 将加完细胞悬液的细胞培养板置于 5% CO_2 培养箱中, 37°C 培养 5 d,在倒置光学显微镜下观察 CPE 并记录。

12.4 试验成立条件

正常细胞对照孔细胞生长正常、无 CPE,血清毒性对照孔不出现 CPE,标准 AKAV 阴性血清出现 CPE,标准 AKAV 阳性血清中和抗体滴度位于标定滴度 ± 1 个滴度范围内,病毒实际用量在 30 $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ ~ 300 $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ 范围内,试验成立,可进行结果判定。

12.5 结果判定

1 孔以上(含 1 孔)被检血清孔不出现 CPE 的最高稀释度,即为被检血清的中和抗体滴度。在试验成立的前提下,待检样品中和抗体滴度 $\geq 1:4$,判定为 AKAV 抗体阳性;待检样品中和抗体滴度 $< 1:4$,判定为 AKAV 抗体阴性。

13 阻断酶联免疫吸附试验

13.1 仪器设备

- 13.1.1 酶标仪。
- 13.1.2 洗板机。
- 13.1.3 微量移液器(10 μL、200 μL、1 000 μL)。
- 13.1.4 恒温培养箱。

13.2 试剂材料

- 13.2.1 AKAV 细胞毒。
- 13.2.2 HRP 标记 AKAV G 蛋白单克隆抗体。
- 13.2.3 AKAV 灭活抗原,按照 D.1 的规定配制。
- 13.2.4 标准 AKAV 阳性血清,按照 D.2 的规定配制。
- 13.2.5 标准 AKAV 阴性血清,按照 D.3 的规定配制。
- 13.2.6 包被缓冲液,按照附录 F 中 F.1 的规定配制。
- 13.2.7 洗液,按照 F.2 的规定配制。
- 13.2.8 封闭液,按照 F.3 的规定配制。
- 13.2.9 样品稀释液/酶标抗体稀释液,按照 F.4 的规定配制。
- 13.2.10 终止液,按照 F.5 的规定配制。
- 13.2.11 商品化单组分 TMB 底物溶液。
- 13.2.12 96 孔酶标板。

13.3 试验步骤

- 13.3.1 抗原包被:用抗原包被液将灭活 AKAV 稀释至 2.5 μL/mL 后,加入酶标板孔内,每孔 100 μL,置于 4 ℃ 条件下过夜(14 h~18 h)。
- 13.3.2 洗板:酶标板用洗液洗 5 次,每孔 300 μL。将酶标板在吸水材料上拍干。
- 13.3.3 封闭:酶标板每孔加入 200 μL 封闭液,于 37 ℃ 孵育 1 h。弃去孔中液体,将酶标板在吸水材料上拍干。
- 13.3.4 样品检测:用样品稀释液将标准 AKAV 阳性血清、标准 AKAV 阴性血清和待检血清按照 1:4 进行稀释,混匀,每孔 100 μL,37 ℃ 孵育 45 min。其中,标准 AKAV 阳性血清和标准 AKAV 阴性血清均做 2 孔重复。
- 13.3.5 按照 13.3.2 冲洗酶标板。
- 13.3.6 加酶标抗体:用酶标抗体稀释液将 HRP 标记 AKAV G 蛋白单克隆抗体稀释至工作浓度,每孔 100 μL,室温(22 ℃~25 ℃)孵育 60 min。
- 13.3.7 按照 13.3.2 冲洗酶标板。
- 13.3.8 加底物溶液:每孔加入 100 μL 商品化单组分 TMB 底物溶液,室温(22 ℃~25 ℃)避光孵育 30 min。
- 13.3.9 加终止液:每孔加入 100 μL 终止液终止显色反应。
- 13.3.10 在酶标仪 450 nm 波长处读值。

13.4 样品阻断率计算

样品阻断率按照公式(2)计算。

$$PI = \frac{OD_S}{OD_{NC}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中:

PI ——样品阻断率；

OD_s ——待检血清在 450 nm 波长处的 OD 值；

OD_{NC} ——阴性对照在 450 nm 波长处的平均 OD 值。

13.5 试验成立条件

阴性对照在 450 nm 波长处的 OD 值 >0.6 ，且阳性对照在 450 nm 波长处的 OD 值与阴性对照在 450 nm 波长处的 OD 值的比值 <0.5 ，说明试验条件成立。

13.6 结果判定

在试验成立的前提下，待检样品 PI 值 $<30\%$ ，判为 AKAV 抗体阳性；待检样品 PI 值 $\geq 30\%$ ，判为 AKAV 抗体阴性。

14 综合判定

14.1 临床诊断判定为疑似病例的易感动物，经第 8 章、第 9 章或第 10 章任一项检测为 AKAV 阳性的，判定为赤羽病确诊病例。

14.2 临床无明显特异症状的同群或具有流行病学相关性易感动物，采集血液或组织样品经第 9 章或第 10 章任一项检测为阳性的，判定为 AKAV 核酸阳性。

14.3 临床无明显特异症状的非免疫动物，经第 11 章、第 12 章或第 13 章任一项检测为 AKAV 抗体阳性的，判定为该动物曾经感染过 AKAV。

附 录 A
(规范性)
常用溶液配制

A.1 保护液(50% 生理盐水)

将生理盐水缓慢倒入盛有甘油的容器中,按 1:1 体积比充分混合。

A.2 平衡盐溶液

A.2.1 母液 A

称取氯化钠 160 g、氯化钾 8 g、硫酸镁 2 g、氯化镁 2 g 和氯化钙 2.8 g,溶于 800 mL 去离子水中,加去离子水定容至 1 L,4 °C 保存。

A.2.2 母液 B

称取磷酸二氢钾 1.2 g、磷酸氢二钠 3.04 g、葡萄糖 20 g,溶于 800 mL 去离子水中,最后加入 100 mL 0.4% 酚红溶液。加去离子水定容至 1 L,4 °C 保存。

A.2.3 平衡盐溶液

取母液 A 和母液 B 各 1 份,去离子水 18 份,混匀后分装,120 °C 高压蒸汽灭菌 20 min,4 °C 保存。使用前,用无菌 7% 碳酸氢钠溶液调平衡盐溶液 pH 至 7.2~7.6。

A.3 0.01 mol/L pH 7.4 PBS(磷酸盐缓冲液)

所需试剂为:

- a) 氯化钠(NaCl) 8.50 g;
- b) 氯化钾(KCl) 0.20 g;
- c) 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.89 g;
- d) 磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.20 g。

加蒸馏水至 1 000 mL,将上述成分依次溶解,分装,121 °C 高压灭菌 15 min。室温保存,有效期 1 个月。

A.4 细胞基础培养液(MEM 培养基,pH 7.2)

称取 MEM 干粉 9.5 g 和碳酸氢钠(NaHCO_3)2.2 g,加去离子水 1 000 mL 溶解,加入青霉素至终浓度 100 U/mL,加入链霉素至终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,充分搅拌均匀,0.22 μm 滤器过滤除菌后,4 °C 保存。

A.5 细胞完全培养液(含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基,pH 7.2)

量取 900 mL 基础培养基加入 100 mL 灭活胎牛血清,加入谷氨酰胺至终浓度 2 mmol/L,充分搅拌均匀,0.22 μm 滤器过滤除菌后,4 °C 保存。

A.6 细胞维持液(含 2% 胎牛血清的 MEM 培养基,pH 7.2)

量取 980 mL 基础培养基加入 20 mL 灭活胎牛血清,加入谷氨酰胺至终浓度 2 mmol/L,充分搅拌均匀,0.22 μm 滤器过滤除菌后,4 °C 保存。

A.7 细胞分散液

称取胰酶 2.5 g、乙二胺四乙酸二钠(EDTA) 0.2 g,加入 1 000 mL 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 溶解,抽滤除菌,分装,置于-20 °C 保存备用,有效期 6 个月。

附 录 B
(规范性)
RT-PCR 试验相关溶液配制

B.1 DEPC 处理的灭菌双蒸水

灭菌双蒸水 100 mL,加入 DEPC 50 μ L,室温过夜,121 $^{\circ}$ C 高压 15 min,分装到 1.5 mL 的无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中。

B.2 电泳缓冲液

所需试剂为:

- a) 三羟甲基氨基甲烷(Tris base) 24.2 g;
- b) 冰乙酸 10 mL;
- c) 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0) 10 mL。

加双蒸水至 100 mL,配制成 50 \times TAE,室温保存备用,使用时用双蒸水稀释为 1 \times TAE。

B.3 1%琼脂糖凝胶

琼脂糖凝胶:称取 0.8 g~1 g 琼脂糖于 100 mL 1 \times TAE 缓冲液中,加热融化后充分摇匀,待冷至 50 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C时,加入 5 μ L 10 mg/mL 的溴化乙锭(EB)储存液或其他商品化可用于琼脂糖凝胶电泳的 DNA 染料。摇匀,倒入插好梳子的电泳板上,凝固后取下梳子,备用。

B.4 10 \times 电泳上样缓冲液配方

所需试剂为:

- a) 聚蔗糖 25 g;
- b) 灭菌双蒸水 100 mL;
- c) 溴酚蓝 0.1 g;
- d) 二甲苯青 0.1 g。

附录 C
(资料性)

RT-PCR 引物序列及荧光 RT-PCR 引物和探针序列信息

C.1 RT-PCR 引物序列及荧光 RT-PCR 引物和探针序列

引物和探针序列如表 C.1。

表 C.1 引物和探针序列

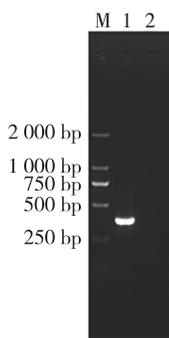
引物/探针名称	引物序列(5'-3')	反应类型	产物大小, bp	基因
AKAVF	CACAACCAAGTGTGCGATCTTA	RT-PCR	355	S
AKAVR	AAGTTRACATCCATTCCATR			
AKAV23F	ACCAGAAGAAGGCCAAGATG	荧光 RT-PCR	145	S
AKAV23R	TGGAGCGTAAAGGCAGTGT			
AKAVP	FAM-ACGCCACAACCAAGTGTGCGATC-BHQ1			

C.2 RT-PCR 扩增产物参考序列(5'-3')

CACAACCAAGTGTGCGATCTTACTTTTGCAGGGGTCAAATTTACAGTGGTTAATAACCAT
TTTCCCAGTACACTGCAAATCCAGTGTGAGACACTGCCTTTACGCTTCACCGCATCTCGGGC
TACTTAGCTCGCTGGGTTGCTGAGCAGTGCAAGGCCAATCAGATCAAATTTGCAGAGGCAGC
TGCCACAATTGTGATGCCACTGGCTGAGGTGAAGGGTTGCACCTGGAGTGATGGGTATGCAA
TGTACCTGGGATTTGCCCTGGTGTGAGATGTTTCTGGAAACCTTTGAGTTCTACCCACTGG
TCATCGACATGCACCGTGTGATAAAAAGATGGAATGGATGTCAACTT

C.3 RT-PCR 产物电泳图

RT-PCR 产物电泳图如图 C.1。



标引序号说明：
M —— DL 2 000 DNA Marker；
1 —— 阳性；
2 —— 阴性。

图 C.1 RT-PCR 产物电泳图

C.4 实时荧光 RT-PCR 扩增产物参考序列(5'-3')

ACCAGAAGAAGGCCAAGATGGTCTTACATAAGACGCCACAACCAAGTGTTCGATCTTACT
TTTGCAGGGGTCAAATTTACAGTGGTTAATAACCATTTCCCCAGTACTGCAAATCCAGT
GTCAGACTGCCTTTACGCTCCA

C.5 实时荧光 RT-PCR 扩增曲线示意图

实时荧光 RT-PCR 扩增曲线示意图如图 C.2。

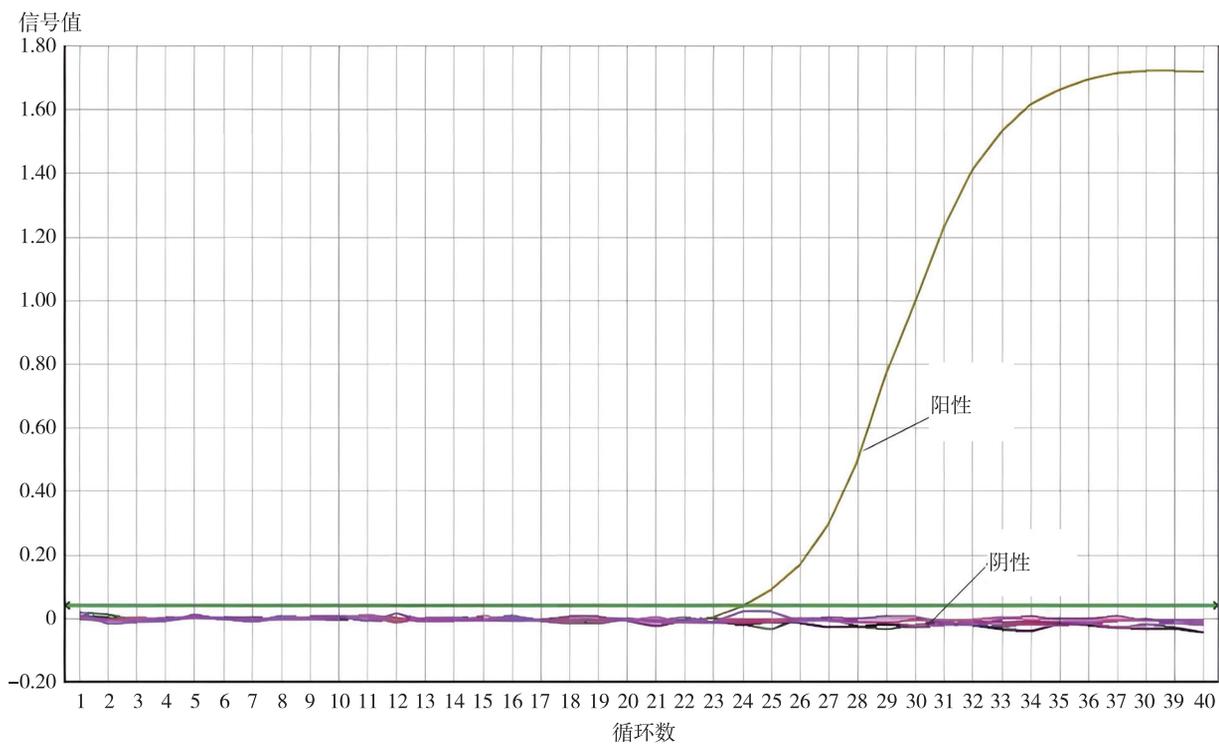


图 C.2 AKAV 核酸实时荧光 RT-PCR 典型扩增曲线示意图

附 录 D

(规范性)

AKAV 灭活抗原、标准阳性血清及标准阴性血清制备方法

D.1 AKAV 灭活抗原制备方法

AKAV 接种 Vero(或 HmLu-1、BHK)单层,37 ℃ 5% CO₂ 条件下培养 72 h 至 80% 细胞出现细胞病变,收取细胞培养物;收获的细胞培养物反复冻融 3 次,5 000 r/min 4 ℃ 离心 30 min,收集上清液;缓慢搅拌上清液,加入 NaCl 至终浓度为 0.5 mol/L;加入等体积的 10% PEG6000 溶液,颠倒混匀,4 ℃ 条件下静置过夜(14 h~16 h);8 000 r/min 4 ℃ 离心 30 min,收集沉淀;加入适量 PBS 溶液重悬沉淀,4 ℃ 条件下静置过夜(14 h~16 h);1 0000 r/min 4 ℃ 离心 60 min,收集沉淀,加入原细胞培养物 1/10 体积的 PBS 溶液重悬;按照体积比加入 0.5% 的二乙烯亚胺,充分混匀后置于 37 ℃ 持续搅拌灭活,8 h 后加入 4 倍摩尔量的硫代硫酸钠,混匀,终止灭活;BCA 法测定蛋白浓度,小量分装,-80 ℃ 保存备用。

D.2 AKAV 标准阳性血清制备方法

AKAV 灭活抗原 150 μg 与 ISA206 佐剂按照体积比 1 : 1 混匀乳化,颈部皮下免疫 90 日龄 AKAV 阴性犍牛,共免疫 3 次,每次间隔 4 周,三免后 2 周抽取少量血液检测 AKAV 抗体,合格后大量收集血液,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,加入 0.05% Proclin300,充分混匀,小量分装,-20 ℃ 保存备用。

D.3 AKAV 标准阴性血清制备方法

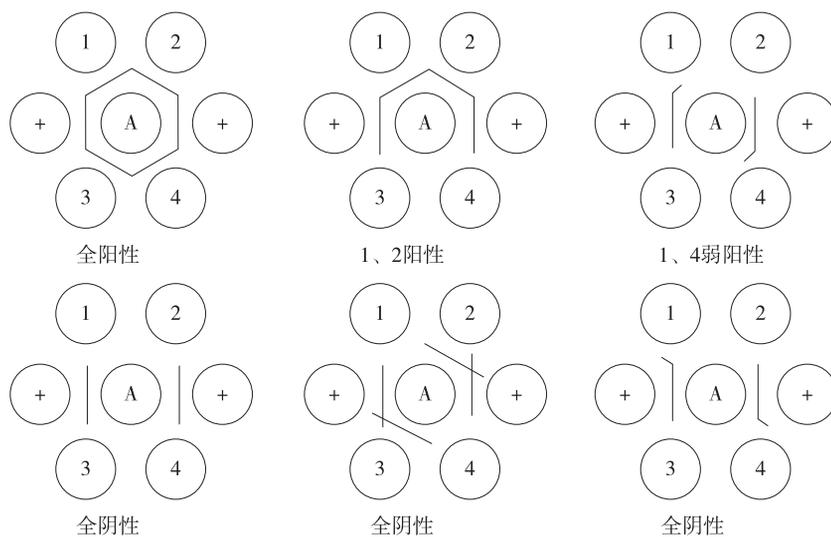
90 日龄 AKAV 抗原抗体双阴性牛采集外周血,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,加入 0.05% Proclin300,充分混匀,小量分装,-20 ℃ 保存备用。

附 录 E

(资料性)

琼脂免疫扩散试验结果判定示例

琼脂免疫扩散试验结果判定示例如图 E.1 所示。



标引序号说明：

- A —— AKAV 灭活抗原；
- ＋ —— 标准 AKAV 阳性血清；
- 1、2、3、4 —— 待检血清。

图 E.1 抗体检测结果判读示意图

附 录 F

(规范性)

阻断酶联免疫吸附试验相关溶液配制

F.1 包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液,pH 9.6)

称取碳酸钠(Na_2CO_3) 1.59 g、碳酸氢钠(NaHCO_3) 2.93 g,溶于 950 mL 去离子水中,调节 pH 为 9.6 ± 0.02 ,定容至 1 000 mL,4 °C 保存,有效期 1 周。

F.2 洗液(含 0.05%吐温-20 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液,pH 7.6)

量取 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS) 950 mL,加入吐温-20(Tween-20) 0.5 mL,充分搅拌均匀,定容至 1 000 mL,4 °C 保存,有效期 1 周。

F.3 封闭液(5%脱脂乳)

称取脱脂奶粉 5 g,溶于 100 mL 洗液,充分搅拌均匀,4 °C 保存,有效期 1 周。

F.4 样品稀释液/酶标抗体稀释液(含 5%牛血清白蛋白的 PBST 溶液)

称取牛血清白蛋白(BSA) 5 g,溶于 100 mL 洗液,充分搅拌均匀,4 °C 保存,有效期 1 周。

F.5 终止液

量取去离子水 170 mL,缓慢加入浓硫酸(18 mol/L H_2SO_4) 10 mL,充分搅拌均匀,4 °C 保存。