



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1181.3—2003

食道咽部口蹄疫病毒探查试验

Protocol of probang test for foot and mouth disease virus

2003-03-17 发布

2003-09-01 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

本标准根据 OIE/Chapter 2.1.1, 4th edition, 2000,《诊断试验和疫苗标准手册》(Manual of standards for diagnostic tests and vaccines)起草。

本标准的附录 A 为资料性附录。

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:中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、兰州生物药品厂。

本标准主要起草人:薛景山、吕宏、王小玉、陈兴芳、黄云君。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

食道咽部口蹄疫病毒探查试验

1 范围

本标准规定了反刍动物食道咽部的口蹄疫病毒查毒方法。

本标准适用于反刍动物食道咽部口蹄疫病毒的分离。

2 规范性引用文件

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及试验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

3.1

FMD foot and mouth disease

口蹄疫。

3.2

FMDV foot and mouth disease virus

口蹄疫病毒。

3.3

OP oesophageal pharyngeal fluid

食道咽部黏液。

3.4

PBS phosphate buffered saline

磷酸盐缓冲液。

3.5

CPE cytopathic effect

致细胞病变。

3.6

TTE 1,1,2-trichlorotrifluoro-ethane

三氯三氟乙烷。

3.7

L-H

水解乳蛋白溶液。

4 原理

反刍动物在感染 FMDV 后,其食道咽部具有长期带毒的特点。带毒时间因动物而异,往往数月或

数年不等。这一过程被称为“持续感染”。这一机理尚不明确的带毒现象给动物检疫带来了新的挑战。这一特定带毒部位的发现使得从临床健康的感染动物中分离出感染病毒成为可能。普鲁斑试验就是通过反对刍动物食道咽部这一特定带毒部位刮取分泌物,继而进行病毒分离鉴定的试验。试验采用特定的探杯刮取样品,用 TTE 处理样品以尽可能地降低可能存在的抗体对病毒分离的影响。将处理过的样品接种到对 FMDV 易感的初代细胞上培养以达到分离和扩增病毒的目的。将培养产物通过血清学试验或分子生物学试验方法进行鉴定从而达到确诊的目的。

5 材料准备

5.1 本标准所用用水应符合 GB/T 6682—1992 中三级水(三蒸水)的规格要求。

5.2 设备器材:食道探杯、5 mL 耐冷冻密封瓶、20 mL 广口瓶、普通恒温培养箱或二氧化碳培养箱、25 mL 细胞培养瓶或 24 孔细胞培养板、1 mL~10 mL 取液器、注射器、低温离心机、50 mL 离心管、高速组织捣碎机、倒置显微镜、剪、镊、细胞滤网或纱布、组织培养瓶或组织培养板、生物安全柜和 P3 实验室。

5.3 运输保存液:0.08 mol/L pH 7.2 PBS+0.01% 牛血清白蛋白+0.002% 酚红+抗生素(1 000 IU/mL 青霉素,100 IU/mL 制霉菌素,100 IU/mL 新霉素和 50 IU/mL 多粘菌素),用 7.5% 碳酸氢钠(NaHCO_3)调 pH 至 7.6。

5.4 细胞:从新生犊牛活体采取甲状腺制备犊牛原代甲状腺细胞(primary bovine thyroid cells),也可使用原代猪肾细胞、原代犊牛肾细胞和原代羊肾细胞。具体方法见第 7 章。

5.5 硫乙醇酸盐(T.G)培养基、0.5% 酚红、Hank's S 溶液、0.5% L-H、7.5% 碳酸氢钠(NaHCO_3)溶液、细胞培养基、细胞维持液、胰蛋白酶溶液、抗生素等的配制见附录 B。

5.6 TTE 分析纯。

6 样品的采集、保藏和运输

6.1 将灭菌食道探杯插入动物口中,趁动物吞咽之际插入食道约 15 cm,取出时有意向咽部侧壁刮取。

6.2 将刮取的 OP 液倒入 20 mL 广口瓶中检查其质量。OP 液中应含有可见的细胞成分。样品中如污染了反刍的胃内容物则会变酸使病毒失活,要弃去重采。样品中尽量不要带血液。重采样品之前要用水或 PBS 冲洗口腔。

6.3 取 2 mL OP 液与 2 mL 运输保存液混合,混合后的 pH 应是 7.6 左右,否则要调整。

6.4 将混合液保存于 5 mL 密封瓶中。样品采集后要迅速冷藏或冰冻保存。如样品需几小时以上运输,则应将其放在干冰或液氮中进行运输。在冰冻之前要将螺旋盖旋紧。

6.5 OP 液在送往实验室过程中应保持冰冻状态。如使用干冰更应注意密封,因为二氧化碳窜入会使 OP 液 pH 下降,从而灭活 FMDV。避免使用玻璃容器,因为一旦液氮窜入容器,当解冻时会使容器爆裂。无论把疑似 FMD 的 OP 液送往国内还是国外都需遵守特殊的规定。这些规定主要是防止病毒泄漏造成污染。这些规定有助于对保证样品送往目的地时处于良好状态。如样品包装采用冰制冷,要防止冰融化后流出冰袋。样品在送检之前一定要事先通知接收样品的实验室。

7 操作程序

7.1 样品的处理

将样品与等量的 TTE 混合,用组织捣碎机 10 000 r/min 乳化 3 min,6 000 r/min 离心 20 min,取上清液用于接种细胞。

7.2 犊牛甲状腺细胞的培养

7.2.1 以无菌术切开初生犊牛颈部腹侧,将甲状腺连同喉头一起剪下送入实验室。

7.2.2 在超净台中将喉软骨两侧新鲜甲状腺剪下,用 pH 7.2~7.4 的含抗生素的灭菌 L-H 冲洗血迹,

在无菌条件下剪下带被膜的两侧腺体,小心剪去被膜,分离腺体组织,去掉脂肪和结缔组织,称重(一般 10 g~15 g)。

7.2.3 用 pH7.2~7.4 的含抗生素的灭菌 L-H 冲洗三次后,将其尽可能地剪碎,再冲洗三次。

7.2.4 离心去掉液体,转入三角瓶,加入 10 倍量(体积比)的 0.5% 的胰蛋白酶溶液,磁力搅拌 10 min,弃去上清液。

7.2.5 加入等量胰蛋白酶溶液于 37℃ 下正式消化。在慢速磁力搅拌下消化 30 min~60 min,收集上层悬液,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用细胞培养基重悬沉淀。

7.2.6 反复消化 4 次~5 次,将消化的细胞悬液配制成 10^5 个细胞簇/mL 为宜(每个细胞簇由 3 个~5 个细胞组成)。

7.2.7 25 mL 培养瓶加 5 mL 悬液,24 孔板每孔加 1 mL 悬液。前者可置 37℃ 培养箱中培养,后者须置二氧化碳培养箱中培养。

7.2.8 待细胞长成单层时即可使用。

7.2.9 原代猪肾细胞、原代犊牛肾细胞和原代羔羊肾细胞的培养可参照犊牛甲状腺细胞的培养方法

7.3 OP 液的接种培养

7.3.1 弃去细胞培养基,用细胞维持液冲洗细胞单层一次。

7.3.2 25 mL 培养瓶中加入 1 mL 处理过的 OP 液。如使用 24 孔板则每孔加 0.2 mL 处理过的 OP 液。

7.3.3 经 37℃ 吸附 60 min,前者补加 4 mL 维持液,置 37℃ 培养箱培养,后者补加 0.8 mL 维持液,置二氧化碳培养箱中培养。

7.3.4 结果判定:一般 24 h~48 h 即可出现细胞病变 CPE,即类上皮细胞圆缩、散布,最后脱落(成纤维细胞仍可能保持正常)。第 5 d 做最终观察,如仍无 CPE 则需盲传一代。将收获培养物 -20℃ 以下保存。

7.4 培养物的鉴定

由于肠道病毒和鼻病毒均可引起相同的 CPE,所以收获的培养物必须进行鉴定。鉴定可使用反转录多聚酶链反应(RT-PCR)、补体结合反应试验、病毒中和试验和酶联免疫吸附试验(ELISA)等方法来具体鉴定出口蹄疫的型别。

附 录 A
(资料性附录)
试 剂 配 置

A.1 0.5%酚红的配制

酚红	5 g
氢氧化钠(0.1 mol/L)	150 mL
水	850 mL

用研钵研磨酚红,同时逐滴加入氢氧化钠(0.1 mol/L),直至完全溶解。加水定容至1 000 mL。121℃ 15 min灭菌。取1 mL接于硫乙醇酸盐(T.G)培养基中培养进行细菌检验,无细菌生长方可使用。

A.2 Hank's 溶液的配制(10倍浓缩)

甲液:	氯化钠(NaCl)	80.0 g
	氯化钾(KCl)	4.0 g
	氯化钙(CaCl ₂)	1.4 g
	氯化镁(MgCl ₂ · 7H ₂ O)	2.0 g
乙液:	磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	1.52 g
	磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.6 g
	葡萄糖	10.0 g
	1%酚红	16 mL

将甲和乙液分别加入450 mL水中,分别混匀后将乙液加入甲液中,边加边搅拌。补足水至1 000 mL,用滤纸过滤后加三氯甲烷2 mL,置2℃~8℃保存。其工作液即用水做10倍稀释。

A.3 Eagles 加强培养基(E-MEM)的配制

按商品标识配制,经赛氏滤器过滤除菌。经菌检后方可使用(方法同第A.1章)。

A.4 0.5%L-H 的配制

水解乳蛋白	5.0 g
Hank's 工作液	1 000 mL

完全溶解后,经116℃ 10 min灭菌,置2℃~8℃保存。经菌检后方可使用(方法同第A.1章)。使用前以7.5%碳酸氢钠(NaHCO₃)溶液调pH至7.2~7.4。

A.5 7.5%碳酸氢钠溶液的配制

碳酸氢钠	75 g
水	1 000 mL

完全溶解后,赛氏滤器过滤除菌。经菌检后方可使用(方法同第A.1章)。

A.6 细胞培养基的配制

Eagles 加强培养基(E-MEM)	44%
0.5%L-H 的配制	44%
无口蹄疫抗体的未灭能犏牛血清	10%

抗生素(参照下表选用)	1%
7.5%碳酸氢钠调 pH 至 7.4	1%

A.7 细胞维持液的配制

将细胞培养基中犊牛血清的含量调整到 2%, E-MEM 和 L-H 的含量做相应的增加。

A.8 抗生素的选用及参考工作浓度(/mL)

根据实际应用情况将推荐的以下抗生素配成浓缩液保存。使用时选择其中的 2 种~3 种即可。

两性霉素 B	1.25 μ g
制霉菌素	100 IU
庆大霉素	50 μ g
卡那霉素	50 μ g
新霉素	50 μ g
青霉素 G	100 IU~200 IU
硫酸链霉素	100 μ g~200 μ g
多黏菌素 B	100 IU

A.9 胰蛋白酶溶液的配制

甲液: 无钙、镁 PBS 胰蛋白酶溶液的配制: 无钙、镁 PBS 1 000 mL, 加胰蛋白酶(1:250)25 g, 溶解后赛氏过滤器过滤除菌。取 1 mL 接于硫乙醇酸盐(T.G)培养基中培养。其余置-20℃保存。

乙液: Versene 溶液的配制

氯化钠(NaCl)	8.0 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	1.15 g
EDTA	0.2 g

将上述试剂依次溶于 500 mL 水中, 补足水至 1 000 mL。分装后 121℃ 15 min 灭菌。取 1 mL 接于硫乙醇酸盐(T.G)培养基中培养。其余置室温保存。

C. 0.5%胰蛋白酶工作液的配制: 取甲液 20 mL 加入 80 mL 乙液中。

A.10 硫乙醇酸盐(T.G)培养基的配制

酪胨	15.0 g
酵母浸膏粉	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
硫乙醇酸钠	0.5 g
L-半胱氨酸盐	0.5 g
琼脂粉	0.5 g
氯化钠	2.5 g
0.2%美蓝溶液	0.5 mL

将上述试剂逐一加入 500 mL 双蒸水中, 边搅拌边加。溶解后补足水至 1 000 mL, 每 5 mL 分装一支试管。121℃ 15 min 灭菌。避光保存于室温。