



中华人民共和国国家标准

GB/T 27536—2011

猪流感病毒分离与鉴定方法

Isolation and identification of swine influenza virus

2011-11-21 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)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:乔传玲、杨焕良、陈艳、辛晓光、陈化兰。

猪流感病毒分离与鉴定方法

1 范围

本标准规定了猪流感病毒分离与鉴定方法。

本标准适用于各种亚型猪流感的病原分离和鉴定。

2 试验材料、试剂

- 2.1 剪刀、镊子。
- 2.2 1 mL 注射器。
- 2.3 单道及多道微量移液器、吸头。
- 2.4 9~11 日龄 SPF 鸡胚。
- 2.5 犬肾细胞(MDCK)。
- 2.6 6 孔培养板。
- 2.7 DMEM 培养基。
- 2.8 HEPES 缓冲液(1 mol/L 储存液)。
- 2.9 胎牛血清。
- 2.10 TPCK-胰蛋白酶(胰蛋白酶经 TPCK 处理)。
- 2.11 0.01 mol/L pH7.0~7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)(参见附录 A 中 A.1)。
- 2.12 磷酸盐缓冲液(pH5.9)(参见附录 A 中 A.5)。
- 2.13 0.85%生理盐水(参见附录 A 中 A.2)。
- 2.14 阿氏(Alsevers)液(参见附录 A 中 A.3)。
- 2.15 0.5%红细胞悬液(参见附录 A 中 A.4)。
- 2.16 胎球蛋白(参见附录 A 中 A.6)。
- 2.17 过碘酸盐(参见附录 A 中 A.7)。
- 2.18 亚砷酸盐(参见附录 A 中 A.8)。
- 2.19 硫代巴比妥酸(参见附录 A 中 A.9)。
- 2.20 无菌蒸馏水或去离子水。

3 仪器

- 3.1 生物安全柜(柜内负压,有 HEPA 过滤器可避免细胞培养物污染及保护操作人员安全)。
- 3.2 孵化器。
- 3.3 CO₂ 培养箱。
- 3.4 台式高速冷冻离心机。
- 3.5 37℃水浴加热器。
- 3.6 煮沸锅。
- 3.7 棉拭子(医用棉签)。
- 3.8 研磨器。

4 样品采集与处理

4.1 样品的采集

病死猪,取肺脏或气管分泌物;待检活猪,用棉拭子(医用棉签)采集鼻腔深部分泌物。

4.2 样品的保存

样品应置于特定的样品保存液中进行保存。一般采用磷酸盐缓冲液(pH7.0~7.4,0.01 mol/L)、0.85%生理盐水或者不含血清的细胞培养液作为保存液(含青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 IU/mL、制霉菌素 1 000 IU/mL,牛血清白蛋白 5 mg/mL)。样品采集后应置于加冰的保温箱中、密封,24 h 内送至实验室进行处理或置-70℃保存。

4.3 样品的处理

用剪刀采组织病料置于研磨器中,按质量体积比(1:1)加入样品保存液进行研磨;将棉拭子置于装有 1 mL 样品保存液的离心管中,用镊子充分挤压后弃去拭子。以上样品室温静置作用 30 min,4℃ 3 000 r/min 离心 5 min,取上清作为接种材料。

5 样品接种

5.1 鸡胚培养

1 mL 注射器吸取处理好的样品,以 0.2 mL/胚的量经尿囊腔和羊膜腔途径接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚,每个样品接种 3 个胚,于 35℃~37℃孵化箱内孵育 72 h~96 h,弃去 24 h 内死亡鸡胚。孵化至 96 h 将鸡胚制冷后,无菌收取 24 h 以后死亡鸡胚及 96 h 仍存活鸡胚的尿囊液和羊水。

5.2 细胞培养

在生物安全柜中操作,将 60%~80%长满单层的 MDCK 细胞的 6 孔细胞培养板用细胞培养液(不含胎牛血清,含有 TPCK 处理的胰酶 2 μg/mL 的 DMEM 培养基)洗三次,加入适量的处理样品,置于 5% CO₂、37℃培养箱中培养 1 h~2 h,期间每隔 30 min 轻轻摇动一次。感作完毕,弃去感作物,用含有胰酶的培养液洗三次,加入适量的细胞维持液,5% CO₂、37℃培养箱内继续培养 5 d~7 d,期间观察细胞病变(CPE)的形成情况。如出现 CPE(特征病变为:细胞肿胀圆化,细胞间隙增大,细胞核固缩或破裂,严重时细胞部分或全部脱落),收集细胞培养上清。

5.3 结果判定

收获鸡胚液或细胞培养上清,测定其血凝活性(具体操作见 6.1)。若 HA 反应阳性说明可能有粘病毒科的病毒,应采用 HA-HI 试验进行血凝素亚型的鉴定;若无血凝活性或血凝价很低,应盲传 3~5 代,若仍阴性,则认为病毒分离阴性。

6 亚型鉴定

6.1 HA 试验

6.1.1 在微量反应板的 1~12 孔均加入 0.05 mL PBS,换吸头。

6.1.2 吸取 0.05 mL 待鉴定病毒液,加入第 1 孔,反复抽打 3~5 次混匀。

6.1.3 从第1孔吸取0.05 mL病毒液加入第2孔,混匀后吸取0.05 mL加入第3孔,如此进行对倍稀释至第11孔,从第11孔吸取0.05 mL弃之,换吸头。第12孔作为红细胞对照。

6.1.4 每孔均加入0.05 mL 0.5%(体积分数)鸡红细胞悬液(将鸡红细胞悬液充分摇匀后加入)。

6.1.5 轻轻混匀,室温(20℃~25℃)下静置10 min~30 min后观察结果(如果环境温度太高,可置4℃环境下)。对照孔红细胞显著呈钮扣状时判定结果。

6.1.6 结果判定:将反应板倾斜45°,观察红细胞若没有呈泪滴状流淌,则判为HA阳性;完全血凝(不流淌)的病毒最高稀释倍数为病毒的HA效价(血凝单位用HAU表示)。反之,判为HA阴性。

6.2 HI 试验

6.2.1 标定参考毒株抗原及待鉴定病毒分别为4 HAU(25 μL)。

6.2.2 在微量反应板的第1~11孔加入0.025 mL PBS,第12孔加入0.05 mL PBS。

6.2.3 加0.025 mL标准阳性血清至第1孔,充分混匀后吸出0.025 mL于第2孔,依次对倍稀释至第11孔,从第11孔吸取0.025 mL弃去。

6.2.4 1~11孔均分别加入0.025 mL 4 HAU参考毒株抗原及待鉴定病毒,第12孔作为红细胞对照。室温(20℃~25℃)下静置10 min~30 min。

6.2.5 每孔均加入0.05 mL 0.5%(体积分数)鸡红细胞悬液(将鸡红细胞悬液充分摇匀后加入),轻轻混匀,室温(20℃~25℃)下静置10 min~30 min后,观察结果(对照孔红细胞显著呈钮扣状时判定结果)。

6.2.6 结果判定:按照HA试验进行结果判定。如果待鉴定病毒样品的血凝活性被这一亚型阳性血清所抑制,则该样品判为这一血凝素亚型阳性。(检测结果成立的条件:已知抗原与相应的阳性血清反应后出现预期的HI效价,同时抗原的反馈标定结果均为4 HAU;反之试验重新进行。)

6.3 NI 试验(全量法以N1和N2分型血清为例)

6.3.1 将N1、N2标准阳性血清和阴性血清分别按原液、10倍、100倍稀释,并分别加入标记好的相应试管中。

6.3.2 将已经确定HA亚型的待检病毒液稀释至HA价为16 HAU,每管均加入0.05 mL,混匀37℃水浴1 h。

6.3.3 每管加入的胎球蛋白溶液(50 mg/mL)0.1 mL,混匀,拧上盖后37℃水浴16 h~18 h。

6.3.4 室温冷却后,每管加入0.1 mL过碘酸盐混匀,室温静置20 min。

6.3.5 每管加入1 mL碘试剂(参见附录A中A.8),振荡至棕色消失、乳白色出现。

6.3.6 每管加入2.5 mL硫代巴比妥酸试剂(参见附录A中A.9),将试管置煮沸的水浴中15 min,不出现粉红色的为神经氨酸酶抑制阳性,即待检病毒的神经氨酸酶亚型与加入管中的标准神经氨酸酶分型血清亚型一致。

7 注意事项

7.1 标准抗原稀释液浓度为4个HAU,并且在每次试验前进行标定。

7.2 孵育时间要严格控制。红细胞对照完全沉淀时要迅速判读。在一些病毒株中可见红细胞从病毒中解脱,如果有这种情况的发生,要提前判定或置4℃下孵育。

7.3 红细胞悬液始终符合标准。

7.4 反应试剂要按规定保存和使用。为避免反复冻融和细菌污染,应以无菌操作将试剂分装成小包装。

7.5 冻干的试剂应按照说明书中规定的体积重新溶解并保存。

7.6 操作过程生物安全注意事项见附录B。

附 录 A
(资料性附录)
相关试剂的配制

A.1 0.01 mol/L pH7.0~7.4PBS

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.42 g
KH ₂ PO ₄	0.27 g
灭菌双蒸水	800 mL

NaOH 或者 HCl 调 pH7.0~7.4, 灭菌双蒸水加至 1 000 mL 定容, 121 ℃ 高压灭菌 15 min 或过滤除菌。

A.2 0.85%生理盐水

NaCl 8.5 g, 加灭菌双蒸水 1 000 mL 定容, 121 ℃ 高压灭菌 15 min 或过滤除菌。

A.3 阿氏(Alsevers)液

葡萄糖	2.05 g
柠檬酸钠	0.8 g
柠檬酸	0.055 g
氯化钠	0.42 g
灭菌双蒸水	至 100 mL
NaOH 或者 HCl	调 pH6.1

121 ℃ 高压灭菌 15 min, 2 ℃~8 ℃ 保存备用。

A.4 0.5%红细胞悬液

采集 SPF 公鸡或无禽流感和新城疫等抗体的健康公鸡的血液与等体积阿氏液混合, 用 PBS 液洗涤 3 次, 以 3 000 r/min 离心 5 min, 洗涤后用 PBS 配成 0.5% (体积分数) 红细胞悬液, 2 ℃~8 ℃ 保存备用。

A.5 PBS, pH5.9

A 溶液[0.4 mol/L 磷酸二氢钠(NaH₂PO₄)]: 称取 27.6 g NaH₂PO₄, 溶于 500 mL 去离子水中。

B 溶液[0.4 mol/L 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)]: 称取 28.4 g Na₂HPO₄, 溶于 500 mL 去离子水中。

取 81 mL 溶液 A, 19 mL 溶液 B 混匀配成 0.4 mol/L PBS, pH5.9。如果需要, 用适当的溶液 A 或 B 调 pH 值。室温保存。

A.6 胎球蛋白(底物)

胎球蛋白	0.5 g
PBS, pH5.9	20 mL
去离子水	20 mL

分装成 5 mL, -20 ℃ 保存。

A.7 过碘酸盐溶液

过碘酸钠	4.28 g
去离子水	38 mL

加热溶解, 室温冷却后加 62 mL 85% 正磷酸混匀, 置棕色瓶中, 室温、避光保存。

A.8 砷试剂

亚砷酸钠	10.0 g
无水硫酸钠	7.1 g
去离子水	100 mL

加热溶解, 室温冷却后加 0.3 mL 浓硫酸, 室温保存。

A.9 硫代巴比妥酸

无水硫酸钠	14.2 g
硫代巴比妥酸	1.2 g
去离子水	200 mL

沸水中加热溶解, 室温保存。据硫代巴比妥酸的质量, 一般配好 10 h 后溶液中出现沉淀, 因此该溶液要使用前配置。

附 录 B
(规范性附录)
生物安全注意事项

B.1 所有的操作过程应在生物安全二级(biology security level 2:能够安全操作,对实验室工作人员和动物致病性低的,对环境有轻微危害的病原微生物的生物安全水平)实验室中进行。

B.2 亚型鉴定要求有全套的流感病毒血凝素(HA)分型血清和神经氨酸酶(NA)分型血清。
