

附录 A
(规范性附录)
实验室生物安全要求

- A.1 PRNT:所有操作在 BSL-3 实验室中进行,操作人员防护、所有使用物品和废弃物按 BSL-3 要求进行。
- A.2 病毒分离:所有操作在 BSL-3 实验室中进行,操作人员防护、所有使用物品和废弃物按 BSL-3 要求进行。
- A.3 PCR:前期所有操作在 BSC(生物安全柜)内进行,病毒裂解液加入后可转移至生物安全 2 级(BSL-2)实验室进行操作。
- A.4 动物尸体解剖:所有操作在 BSL-3 实验室中进行,操作人员防护、所有使用物品和废弃物按 BSL-3 要求进行。
- A.5 其他有关西尼罗病毒的操作:前期所有操作在 BSC 内进行,能有效灭活病毒的去垢剂或病毒裂解液加入后,方可转移至 BSL-2 实验室进行操作。

注:BSL-3:生物安全 3 级实验室,BSL-2:生物安全 2 级实验室,BSC:生物安全柜。

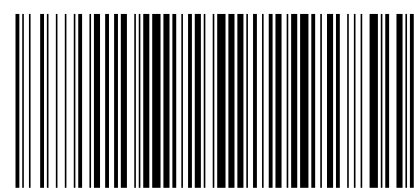


中华人民共和国国家标准

GB/T 27518—2011

西尼罗病毒病检测方法

Diagnostic of west nile virus infections



GB/T 27518-2011

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-44034

定价: 16.00 元

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
中国国家标准化管理委员会 发布

9 IgM 捕获 ELISA

9.1 实验步骤

0.5 mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释抗马 IgM 作为捕获抗体包被平底 96 孔 ELISA 板每孔 100 μL ；包被板在 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育过夜。使用前，用含有 0.05% 吐温-20 的 0.01 M pH7.2 PBS 洗板两次，每孔用 200 μL ~300 μL ；用 PBS 新配制的 5% 脱脂奶粉封板，每孔加 300 μL ，并在室温中孵育 60 min，孵育后，移去封闭液，并用 PBS 洗板 3 次；被检和对照血清用 PBS 作 1 : 400 稀释（脑脊髓液作 1 : 2 稀释），每份样品加双排孔（每份样品共加 4 个孔），每孔 50 μL ，包括用和样品同样方法制备的对照阳性和阴性血清；盖板上，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育 75 min；移去血清，并用 PBS 洗板 3 次；用 PBS 稀释病毒和正常抗原，加 50 μL 病毒抗原到每份被检血清和对照血清一排孔中，并加 50 μL 正常抗原到每份被检血清和对照血清的第二排孔中；盖板上，并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育过夜；移去孔中抗原，并用 PBS 洗板 3 次；用 PBS 稀释辣根过氧化物酶结合的抗黄病毒单克隆抗体，每孔加 50 μL ；盖板上，并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min；移去结合物，并用 PBS 洗板 6 次；每孔加 50 μL 新配制的 ABTS 底物和过氧化氢（0.1%），在室温中孵育 30 min。

9.2 结果判定

在 405 nm 测光密度值，如果含有病毒抗原的被检样品孔的光密度至少是含病毒抗原的阴性血清对照孔的光密度的两倍，并至少是含有对照抗原的被检样品平行试验孔的光密度的两倍，该被检样品被认为是阳性。

10 结果判定

10.1 组织、血、脑脊液或其他体液中分离到西尼罗病毒，说明动物感染了 WNV。

10.2 组织、血、脑脊液或其他体液中用 RT-PCR 检测到西尼罗病毒基因，判定为西尼罗病毒 RT-PCR 检测结果阳性，或判定为西尼罗病毒基因检测结果阳性。说明动物感染了 WNV。

10.3 IgM 捕捉 ELISA 检测到西尼罗病毒 IgM 抗体，判定为西尼罗病毒 IgM 捕捉 ELISA 结果阳性。说明动物感染了 WNV。

10.4 IgM 捕捉 ELISA 结果判定为可疑，并用蚀斑减少中和试验检测到西尼罗中和抗体，判定为西尼罗病毒抗体检测结果阳性。说明动物感染了 WNV。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
西尼罗病毒病检测方法

GB/T 27518—2011

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100013)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2012 年 2 月第一版 2012 年 2 月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44034 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

7.6.3.2 样品同时用 E 基因和 NSI 基因进行荧光 PCR 后,结果均为阴性者判定为不含有西尼罗病毒核酸。

7.6.3.3 样品同时用 E 基因和 NSI 基因进行荧光 PCR 后,其中之一结果均为阴性者,用套式 PCR 再次进行检测,结果为阳性者判定为含有西尼罗病毒核酸,结果为阴性者判定为不含有西尼罗病毒核酸。

7.6.4 荧光 PCR 和套式 PCR 的外源引物扩增可采用等效的一步法 RT-PCR 试剂盒进行检测,其操作和结果判定根据试剂盒的说明书进行,但应优化引物和 TaqMan 探针浓度,确保检测的特异性和灵敏度与本标准的方法等效。

7.6.5 应用荧光 PCR 和套式 PCR 检测西尼罗病毒核酸结果为阳性者,必要时应对扩增产物进行核酸序列分析验证。

8 蚀斑减少中和试验(PRNT)

8.1 操作程序

8.1.1 病毒培养

WNV 标准毒株接种至处于对数生长期 80%~90% 满度非洲绿猴肾(Vero)细胞,37℃ 吸附 1 h 后,弃去病毒液,加入细胞维持液,5%二氧化碳培养箱中 37℃ 培养 3 d~4 d,待 70%~80% 细胞出现 CPE,-20℃ 冻融 2 次,分装,-80℃ 冻存备用。

8.1.2 PFU 测定

保存病毒用 MEM 连续 10 倍稀释,接种于 80%~90% 满度单层 Vero 细胞的 96 孔板,每个稀释度接种 8 孔,100 μL/孔,同时设 8 孔细胞对照,每孔加入 MEM 100 μL,5%二氧化碳培养箱中 37℃ 孵育 1 h~2 h,弃去孔内病毒液,加入不含中性红的营养琼脂 100 μL/孔,5%二氧化碳培养箱中 37℃ 培养 4.5 d,加入含中性红的营养琼脂 100 μL/孔,5%二氧化碳培养箱中 37℃ 避光培养,12 h 后观察 CPE,计算病毒的 PFU。

8.1.3 蚀斑减少中和试验

待检血清、标准阳性血清和标准阴性血清用 MEM 做连续 2 倍稀释后,加入等体积 50 μL 含有 100 PFU 的病毒悬液,充分混匀,37℃ 作用 1 h 后,将血清与病毒混合液接种至 80%~90% 满度单层 Vero 细胞的 96 孔板,每个稀释度接种 8 孔,100 μL/孔。同时将稀释好的 50 μL 中 100 PFU 的病毒悬液做 10 倍、100 倍、1 000 倍稀释,接种 80%~90% 满度单层 Vero 细胞的 96 孔板,每个稀释度接种 4 孔~8 孔,100 μL/孔,作为病毒回归对照。稀释好的 50 μL 中 100 PFU 的病毒悬液接种 4 孔~8 孔,100 μL/孔,作为病毒对照。MEM 接种 4 孔~8 孔,100 μL/孔,作为细胞对照。所有处理好的细胞于 5%二氧化碳培养箱中 37℃ 孵育 1 h~2 h,弃去孔内液体,加入不含中性红的营养琼脂 100 μL/孔,5%二氧化碳培养箱中 37℃ 培养 4.5 d,加入含中性红的营养琼脂 100 μL/孔,5%二氧化碳培养箱中 37℃ 避光培养,12 h 后观察 CPE,按 Reed-Muench 方法计算血清的中和效价。

8.2 结果判定

8.2.1 回归对照的病毒浓度为每 50 μL 30 PFU~300 PFU 范围内,并且标准阴阳性对照血清的抗体效价在 1 个滴度误差范围内,试验成立,试验结果成立的条件下方能判定样品的结果,否则,试验结果不成立,查找原因,并重做试验。

8.2.2 待检样品中和效价大于等于 1:10 者判为阳性。

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:中华人民共和国北京出入境检验检疫局、北京百欧赛地生物工程技术开发中心。

本标准主要起草人:杨秀娟、孙福军、丁若愚、田茵、田睿、王飞、杨静。