ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 85—2021

口蹄疫病毒田间分离株与疫苗株抗原匹配关系（r1 值）测定方法

Protocol for testing foot-and-mouth disease virus antigenic-match（r1 value）between vaccine and field viruses

中国兽医协会 CVMA

2021－12－23 发布　　2021－12－23 实施

中　国　兽　医　协　会　　发 布

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。

本文件不涉及专利。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院兰州兽医研究所、中国兽医药品监察所。

本文件主要起草人：靳野、何继军、杨亚民、吴锦艳、刘永杰、吕律、马维民、卢炳州、杨帆、曹伟军、郭建宏、张强、刘湘涛、李俊平。

中国兽医协会 CVMA

口蹄疫病毒田间分离株与疫苗株抗原匹配关系（r1 值）测定方法

1 范围

本文件规定了口蹄疫病毒（foot-and-mouth disease virus, FMDV）田间分离株与疫苗株抗原匹配关系（r1值）测定用试剂和器材、实验程序、实验成立条件、血清抗体效价计算、r1值计算及结果判定。

本文件适用于评价FMDV田间分离株与疫苗株的抗原匹配关系（r1值）。

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）适用于本文件。

GB/T 18935 口蹄疫诊断技术

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

r1 值

用病毒中和实验（VNT）测定FMDV田间分离株与疫苗株抗原的匹配关系。

4 试剂和器材

4.1 试剂

4.1.1 胎牛血清（或新生牛血清）

商品化血清，用于细胞培养。

4.1.2 阳性对照血清

FMDV感染动物或口蹄疫疫苗免疫动物血清，按GB/T 18935标定为FMDV抗体阳性，中和抗体效价应≥1:256，经56 ℃水浴灭活30 min。

4.1.3 阴性对照血清

未感染过FMDV，且未免疫过口蹄疫疫苗的动物血清，经56 ℃水浴灭活30 min。

4.1.4 疫苗免疫血清

口蹄疫疫苗免疫动物血清，经56 ℃水浴灭活30 min。

4.1.5 田间分离株与疫苗株

田间分离株分离自口蹄疫发病动物组织，适应于BHK-21或IB-RS-2单层细胞后收获病毒液，测定$TCID_{50}$后分装，-70 ℃保存备用，采用GB/T 18935所述方法进行血清型、毒株谱系鉴定。疫苗株为农业农村部行政管理部门批准的口蹄疫疫苗制苗种毒。FMDV培养相关实验应符合GB 19489规定。

4.1.6 细胞

BHK-21或IB-RS-2传代细胞，代次≤15代。

4.1.7 胰酶溶液

用于消化、分散细胞。

4.1.8 细胞营养液

含10%胎牛（新生牛）血清的细胞维持液，按照附录A.1配制，用于细胞培养。

4.1.9 细胞维持液

不含血清的Eagle’s-MEM（Minimum Eagle's Medium, MEM）或含0.5%水解乳白蛋白的Earle's液，按照附录A.2 配制，用于血清和病毒稀释。

4.1.10 细胞染色液

10%福尔马林配制的0.05%亚甲基兰溶液。

4.2 试剂和器材

生物安全柜、CO_2培养箱、水浴锅、倒置生物显微镜、细胞培养板、细胞培养瓶、吸管、冻存管、移液器及吸头。

5 实验程序

5.1 FMDV $TCID_{50}$预测定

将FMDV在96孔培养板上作10倍连续稀释，即10^{-1}，10^{-2}，10^{-3}…10^{-11}，每孔50 μL病毒液和100 μL细胞悬液（24 h内长满单层，一般每毫升100～150万个细胞），每个稀释度接种8孔。每块板的最后一列设8孔正常细胞对照，每孔加50 μL稀释液（不加病毒）和100 μL细胞悬液。置37 ℃、5% CO_2培养箱培养，观察致细胞病变效应（Cytopathic Effect, CPE）。72 h后判定结果，必要时将板固定并作常规染色（先用10%福尔马林固定30 min，然后置于10%福尔马林配制的0.05%亚甲基兰溶液中浸泡染色30 min，最后用水温和冲洗培养板）后判定结果。未病变细胞呈蓝色，病变细胞脱落或不着色。依据CPE情况，按Reed-Muench法计算病毒$TCID_{50}$。

5.2 稀释血清

用细胞维持液将4.1.2至4.1.4血清在培养板上从1:4开始作2倍系列稀释，每份血清至少平行稀释2排孔，每孔50 μL。

5.3 加入病毒

在上述每孔中加入50 μL含100 $TCID_{50}$的病毒液。

5.4 对照设立

正常细胞对照：每块培养板上均设立2～4孔不接种病毒的正常细胞对照，每孔加入50 μL细胞维持液。

阴性血清对照：设2~4孔，每孔加50 μL阴性血清及50 μL含100 $TCID_{50}$的病毒液。

阳性血清对照：阳性血清和被检血清平行稀释2排孔。

病毒对照：另设一块培养板测定本次实验中病毒的实际滴度（$TCID_{50}$），用以计算病毒的实际使用量。

5.5 中和反应

封闭培养板，置37 ℃、5% CO_2 温箱培养1 h。

5.6 加入细胞

血清与病毒中和1 h后，每孔加入50 μL细胞悬液，置37 ℃、5% CO_2温箱培养。对照孔体积不足150 μL时，用稀释液补全体积。

5.7 染色

48 h后，显微镜下预先作适当判读。72 h后判定结果。必要时作常规染色后判定结果。

6 实验成立条件

正常细胞对照：在整个实验中一直保持良好的生长形态，染色呈蓝色；

阴性血清对照：阴性血清对照孔应全部出现CPE，染色不着色；

阳性血清对照：阳性血清对照抗体效价应在标定值±1 个滴度以内。

病毒对照：根据实验中病毒的实际滴度（$TCID_{50}$），计算病毒的实际使用量。每孔使用的病毒含量应在 32～320 $TCID_{50}$范围内。

当以上对照均成立时，实验有效。

7 血清抗体效价计算

以血清/病毒混合物的50%终点表示血清的最终滴度，可通过Spearman－Kärber方法计算。

8 r1 值计算及结果判定

8.1 r1 值计算公式

r1值的计算见公式（1）。

$$r1 = \frac{a}{b} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

r1 ——口蹄疫病毒田间分离株与疫苗株抗原的匹配关系。

a —— 疫苗血清与田间流行毒株中和效价的倒数。

B ——疫苗血清与疫苗毒株中和效价的倒数。

8.2 结果判定

当r1值≥0.3时，表明田间分离株与疫苗株抗原匹配近，疫苗株配制的疫苗能够保护田间分离株。当r1值＜0.3时（需重复3次，r1值均＜0.3），表明田间分离株与疫苗株抗原匹配远，提示疫苗株配制的疫苗可能不能有效保护田间流行毒；在此情况下，应通过本动物免疫攻毒保护试验验证该疫苗对田间分离株的保护效果。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A
（规范性）
溶液配制

A.1 Eagle’s-MEM

10×Eagle’s-MEM 营养液：Eagle’s-MEM营养剂9.5 g，加超纯水100.0 mL。溶解后过滤除菌。用无菌超纯水将10×营养液按1:10稀释，即100 mL营养液中加入900 mL无菌超纯水中即为使用浓度营养液，4 ℃保存备用。

A.2 0.5%水解乳白蛋白/Earle’s液

氯化钠 (NaCl)	6.8 g
氯化钾 (KCl)	0.4 g
氯化钙 ($CaCl_2$)	0.2 g
硫酸镁 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 g
磷酸二氢钠（$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	0.14 g
葡萄糖	1.0 g
10%酚红	2.0 mL
水解乳白蛋白	5.0 g

按上述配方称取各成分并逐个溶解，最后加超纯水至 1000 mL，过滤除菌后，4 ℃保存备用。

中国兽医协会 CVMA