马病毒性动脉炎中和试验

Реакция сывороточной нейтрализации на инфекцию вирусом артериита лошадей

乌鲁木齐. 中国

УРУМЧИ, КИТАЙ

11- 30- 2021

马病毒性动脉炎
Заражение вирусом артериита лошадей

- 马病毒性动脉炎 (EVA) 是一种经济上重要的马属动物病毒病。种马可以成为病毒的长期携带者，并在繁殖过程中传播病毒。一些马也会出现急性疾病。尽管成年马的死亡非常罕见，但感染怀孕母马可能会流产，而幼龄马驹可能会死于性肺炎和肠炎
- Заражение вирусом артериита лошадей (ВАЛ) является экономически важным вирусным заболеванием непарнокопытных. Жеребцы могут стать долгосрочными носителями вируса и передавать его во время размножения. Некоторые кобылы также страдают острыми заболеваниями. Хотя смерть взрослой лошади случается очень редко, у инфицированной жеребой кобылы может произойти аборт, а жеребенок может умереть от пневмонии и энтерита.

法定报告疫病
Уведомляемая болезнь

- OIE名录中须通报疫病
- **Уведомляемая болезнь в списке МЭБ**
- **世界各国须报告疫病**
- **Регистрируемая болезнь во многих странах**
- **《中华人民共和国进境动物检疫疫病名录》二类病**
- **Список B подкарантинных болезней животных, ввозимых в Китайскую Народную Республику**

地理分布
Географическое распространение

- 大多数国家/地区都发现了EAV抗体。 在北美和南美、欧洲、亚洲、非洲和澳大利亚已经报道了血清阳性马。
- 冰岛和日本没有
- **中国没有发现**
- Антитела к ВАЛ обнаружены в большинстве стран Северной и Южной Америки, Европы, Азии, Африки и Австралии.
- Отсутствует в Исландии и Японии
- Не обнаружена в Китае

病原学
Этиология

- 马动脉炎病毒：动脉炎病毒科动脉炎病毒属
- Вирус артериита лошадей (ВАЛ) из рода Arterivirus, семейство Arteriviridae
- 有囊膜的正股单链RNA病毒
- одноцепочечный вирус с оболочкой, положительно-чувствительный, одноцепочечной РНК
- 基因组12.kb，至少10个开放阅读框（ORF）
- Вирусный геном 12,7 т.п.н., не менее 10 открытых рамок считывания (ORF).

理化特性
Физические и химические характеристики

- 病毒在 56-58ºC 下在 20-30 分钟内灭活，但在 37-38ºC 下存活 2-3 天，在 4-8ºC 下存活长达 75 天。
- Этот вирус инактивируется через 20-30 минут при 56-58ºC, но может оставаться жизнеспособным в течение 2-3 дней при 37-38ºC и до 75 дней при 4-8ºC.
- 病毒对乙醚、氯仿等脂溶剂以及普通消毒剂和去污剂敏感。
- ВАЛ легко инактивируется, например, эфиром и хлороформом, обычными дезинфицирующими и моющими средствами
- 病毒在低温条件下极稳定，在-20℃保存7年仍有活性。
- Вирус чрезвычайно стабилен при низких температурах и остается живым при хранении при -20°C в течение 7 лет.
- 精液冷冻后仍具有传染性。
- Семя остается заразным после замораживания.

血清型
Серотип

- 只有一个血清型，原型毒株Bucyrus
- Только один серотип, прототип штамма Bucyrus
- 世界各地 EAV 分离株分为北美 (NA) 和欧洲 (EU) 谱系，并进一步细分为两个北美（NA-1 和 NA-2）和两个欧洲（EU-1 和 EU-2）进化枝。
- ВАЛ выделяется во всем мире: североамериканские (NA) и европейские (EU) линии, которые далее подразделяются на две североамериканские (NA-1 и NA-2) и европейские (EU-1 и EU-2) ветви.
- 时间和地理上不同的病毒野毒株之间存在基因组和抗原变异，以及毒力、致病性和中和表型方面存在差异。
- Геномная и антигенная вариативность, а также различие в их вирулентности, патогенности и фенотипе нейтрализации существует среди различных во времени и географически штаммов полевого вируса ВАЛ.
- 一些野外菌株能够引起中度至重度的临床症状，而另一些仅引起轻微的临床疾病 。
- Некоторые полевые штаммы ВАЛ способны вызывать умеренные и тяжелые клинические симптомы, тогда как другие вызывают только легкое клиническое заболевание.

易感动物种类
Затронутые виды

- 马属动物（Лошадиные）
- --马 (Лошади）
- --矮马 (Пони）
- --驴 (Ослы）
- --斑马 (Зебры）
- 南美骆驼 (Южноамериканский верблюд）
- **公共卫生：Общественное здравоохранение**
- **人感染报道：无**
- Нет сообщений о заражении людей.

传播途径
Путь передачи

- 马动脉炎病毒可以通过呼吸道和性途径传播。
- 病毒可垂直传播给胎儿
- 病毒存在于呼吸道分泌物、尿液、粪便、生殖道；
- 母马在感染后的短时间内，EAV 在阴道和子宫分泌物以及卵巢和输卵管中发现。
- 种马在精液中排出 EAV，并携带病毒多年。一些携带者可能最终会清除感染。
- 母马、阉马或性不成熟的小马尚未报告真正的携带者状态。
- Заражение вирусом артериита лошадей может передаваться респираторным и половым путем.
- ВАЛ передается плоду вертикально.
- Вирус обнаружен в респираторном секрете, моче и кале, а также в репродуктивных путях.
- У кобыл ВАЛ может быть обнаружена во влагалищном, маточном секрете, а также в яичниках и фаллопиевых трубах в течение короткого периода после заражения
- Жеребцы выделяют ВАЛ с семенем и могут переносить вирус в течение многих лет. Некоторые носители могут в конечном итоге избавиться от инфекции.
- У кобыл, меринов и неполовозрелых жеребят истинное носительство не зарегистрировано.

致病机理
Патогенез

马动脉炎病毒
equine arteritis virus

↓ 呼吸道
respiratory tract

在鼻咽上皮和扁桃体组织以及支气管和肺泡巨噬细胞中增殖
multiplies in nasopharyngeal epithelium and tonsillar tissue and in bronchial and alveolar macrophages

↓ 单核细胞和 T 淋巴细胞
monocytes and T lymphocytes

区域淋巴结（例如支气管淋巴结）
regional lymph nodes (eg, bronchial lymph node)

↓ 细胞相关病毒血症
cell-associated viremia

病毒在全身扩散
dissemination of EAV throughout the body

↓

病毒定位于小血管，尤其是小血管的血管内皮和内侧肌细胞
localizes in vascular endothelium and medial myocytes of arterioles

↓

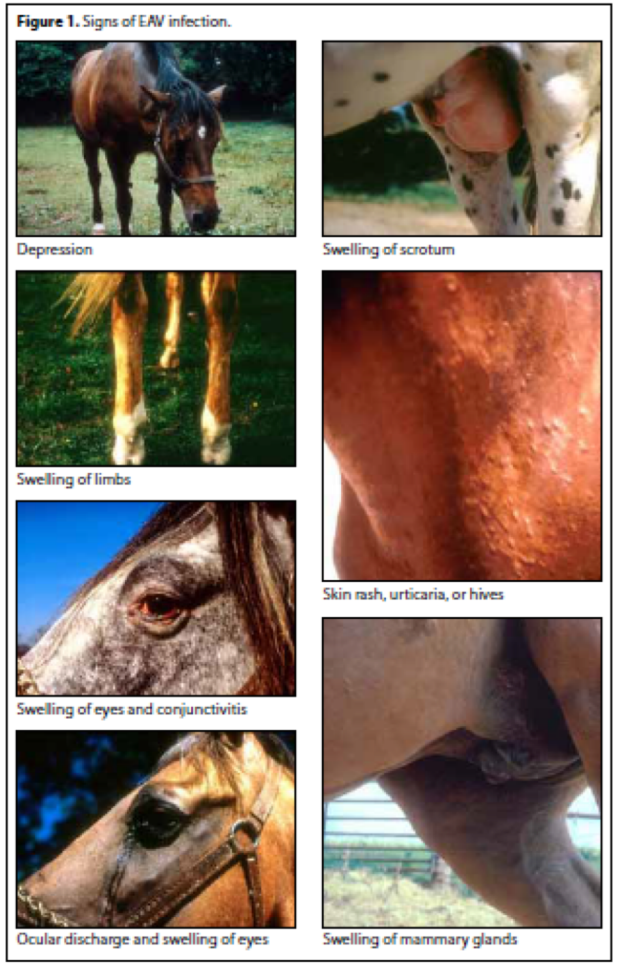
血管病变：泛血管炎
Vascular lesions: panvasculitis

病理变化
Поражения

- **最显着的肉眼发现**：水肿、充血和出血，尤其是在四肢和腹部的皮下组织；腹内和胸腔淋巴结以及小肠和大肠的水肿和出血。
- 小马驹会出现肺水肿、肺气肿和间质性肺炎、肠炎和脾脏梗塞。
- **特征性微观病变**是血管炎，主要小动脉和小静脉。
- 组织学变化:轻度病例的血管和血管周围水肿；严重病例的中膜纤维蛋白样坏死、广泛淋巴细胞浸润、内皮坏死和缺失以及血栓形成。
- Наиболее важные **общие признаки**: **отек, застой и кровоизлияния**, особенно в подкожном слое конечностей и живота; отек и кровоизлияние в брюшные и грудные лимфатические узлы, а также в тонкую и толстую кишку.
- Отек легких, эмфизема и интерстициальная пневмония, энтерит и инфаркты селезенки у жеребят
- **Характерная микроскопия**: **васкулит**, вовлекающий в основном более мелкие артериолы и венулы.
- Гистологические изменения: сосудистый и периваскулярный отек в легких формах; фибриноидный некроз средней оболочки, обширная лимфоцитарная инфильтрация, некроз и потеря эндотелия, а в тяжелых случаях тромбообразование.

临床症状
Клинические признаки

- • **发烧、食欲不振、沉郁、淋巴细胞减少**
- • лихорадка, потеря аппетита, депрессия, лимфоцитопения
- • **肢体、阴囊、鞘和乳腺水肿或肿胀**
- • отек или опухоль конечностей, мошонки, влагалища и молочных желез
- • **呼吸道症状，包括鼻腔**
- • респираторные симптомы, в том числе назальные
- • **结膜炎或“红眼病”或眼部分泌物**
- • конъюнктивит или "розовый глаз" или выделения из глаз
- • **皮疹**• кожная сыпь
- • **怀孕母马流产**
- аборт у беременной кобылы
- • **小马驹间质性肺炎和肠炎**
- • интерстициальная пневмония и энтерит у молодых жеребят



治疗
Лечение

- 大部分感染马可完全恢复
- *Больные лошади почти выздоравливают*
- 无特性的抗病毒治疗药物
- нет специального противовирусного лечения
- 支持性治疗：中度至重度发病马
- Поддерживающая терапия: лошади с умеренным и тяжелым поражением
- • 退热药жаропонижающие средства
- • 抗炎药противовоспалительные препараты
- • 利尿剂мочегонные средства
- • 充分休息адекватный отдых
- • 良好护理хороший уход

预防与控制
Профилактика и контроль

- 新引进的马应隔离 3 至 4 周
- Вновь завезенных лошадей следует изолировать на 3-4 недели.
- 隔离急性感染马，以防止通过分泌物和排泄物传播。
- Тяжело инфицированные лошади должны быть изолированы, чтобы предотвратить передачу с выделениями и экскрементами.
- 性传播可以通过良好的管理和疫苗接种来控制。
- Половую передачу можно контролировать с помощью надлежащего ведения и вакцинации.
- 为了保护怀母马，应该其他马匹分开并小群饲养
- Чтобы защитить жеребых кобыл, их следует отделять от других лошадей и содержать небольшими группами.
- 种马携带者与未感染应实施物理隔离
- Жеребцы-носители должны быть физически отделены от незараженных лошадей.
- 筛查用于繁殖的种马或精液
- Проводить скрининг жеребцов или семени, предназначенного для селекции

诊断
Диагностика

- 临床诊断：非特征性临床症状
- **Клиническая диагностика: нетипичные признаки**
- 实验室检测
- **--病原鉴定**
- **--血清型试验**
- **Лабораторные анализы:**
- ***Выявление возбудителя***
- ***Серологические тесты***

鉴别诊断
Дифференциальная диагностика

- 马病毒性动脉炎很难与呼吸道和非呼吸道马病的迹象相区分：马流感、马传染性贫血和非洲马瘟，以及盖塔病毒、亨德拉病毒、马腺病毒和马疱疹病毒 1 和 4 的感染。马病毒性动脉炎也类似于出血性紫癜 和其他链球菌感染。
- Заражение вирусом артериита лошадей трудно отличить от респираторных и нереспираторных заболеваний лошадей: гриппа лошадей, инфекционной анемии лошадей и африканской чумы лошадей, а также от инфекций вирусом Гета, вирусом Хендры, аденовирусами лошадей и вирусами герпеса лошадей 1 и 4. Заражение вирусом конского артериита также напоминает геморрагическую пурпуру и другие стрептококковые инфекции.

诊断
Диагностика

- 临床诊断
- 当临床症状包括发烧、抑郁、水肿、结膜炎、流鼻涕和流产时，应考虑马病毒性动脉炎。
- 很难与马的其他全身和呼吸系统疾病相鉴别。
- ***Клинический* диагноз**
- Следует подумать о ВАЛ, когда клинические признаки включают лихорадку, депрессию, отек, конъюнктивит, выделения из носа и аборты.
- Это заболевание трудно отличить от других системных и респираторных заболеваний лошадей.

病毒分离

выделение и идентификация вирусов

- 细胞：兔、马和猴肾细胞或细胞系，常用 RK-13（兔肾）细胞
- 病毒鉴定：血清中和试验、RT-PCR、免疫荧光或免疫组织化学
- 病毒鉴定：RT-PCR 试验、中和试验、间接免疫荧光试验、免疫组织化学
- Клетки: клетки или клеточные линии почек кроликов, лошадей и обезьян. Клетки РК – 13 (почки кролика) являются системой выбора.
- Идентификация вируса: *Подтверждено анализом ОТ-ПЦР, реакцией нейтрализации, методами непрямой иммунофлуоресценции, иммуногистохимией.*

样品采集
Сбор образцов для выделения вируса или ОТ-ПЦР

- 新近感染动物：鼻腔分泌物、抗凝血和精液
- 种马携带者：精液；但在呼吸道分泌物、血液或尿液中未发现
- 疑似流产病例:胎盘组织和体液以及胎儿肺、肝、淋巴网状组织（尤其是胸腺）以及腹膜或胸膜液。绒毛尿囊膜和胎肺是病毒恢复的首选组织。
- 死亡的幼驹或老马：组织标本，尤其是胸腹腔及相关器官的淋巴腺
- Недавно инфицированные животные: выделения из носа, несворачивающаяся кровь и семя.
- Жеребцы-носители: семя, но не в респираторных секретах, крови или моче.
- Подозрительные случаи аборта: ткани и жидкости плаценты и легкие плода, печень, лимфоретикулярные ткани (особенно тимус), перитонеальная или плевральная жидкость. Хориоаллантоисная оболочка и легкое плода являются предпочтительными тканями для извлечения вируса.
- Мертвые жеребята или старые кобылы: образцы тканей, особенно лимфатических узлов грудной и брюшной полостей и связанных с ними органов.

样品采集：病毒分离、RT-PCR
образцы для выделения вирусов или ОТ-ПЦР

- 细胞：兔、马和猴肾细胞或细胞系，常用 RK-13（兔肾）细胞
- 病毒鉴定：血清中和试验、RT-PCR、免疫荧光或免疫组织化学
- Клетки: клетки или клеточные линии почек кроликов, лошадей и обезьян. Клетки РК – 13 (почки кролика) являются системой выбора.
- Идентификация вируса: сывороточная нейтрализация, ОТ-ПЦР, иммунофлуоресценция или иммуногистохимия.

样品采集：血清学试验
Образцы: Серологические тесты

- 血清（2ml）：来源于促凝血（7-8ml）
- сыворотка (2 мл): из образцов свернувшейся крови 7-8 мл
- 未免疫的马：单份血清
- Для вакцинированных лошадей: единичный образец сыворотки.
- 对免疫的马（国际调运）：间隔14天采集双份血清
- Для невакцинированных лошадей (международное перемещение): парные пробы с интервалом в 14 дней.
- 急性病例（国内确诊）：间隔2-4周收集双份样品（急性期和恢复期血清）
- острый случай (национальное подтверждение): Парные пробы (сыворотка острого периода болезни и сыворотка выздоравливающего) собираются с интервалом 2-4 недели.

血清学试验
Серологические тесты

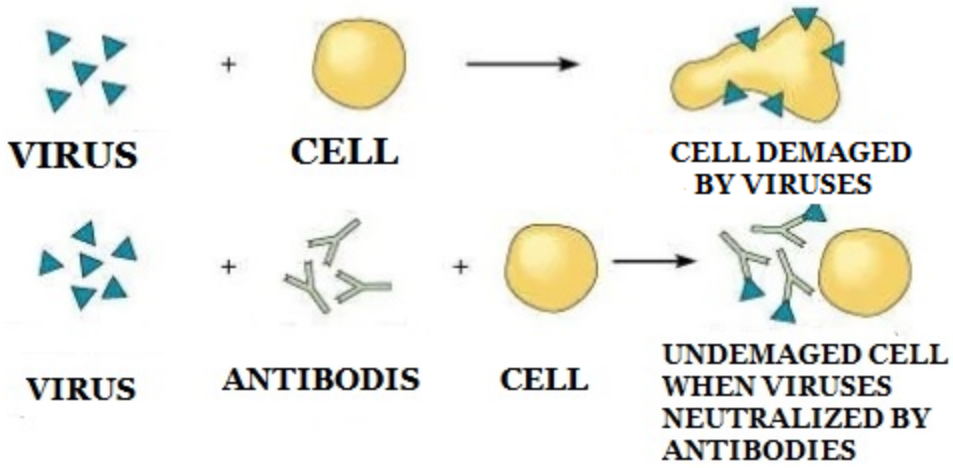
- 血清中和试验 Сывороточная нейтрализация (VN)
- 补贴结合试验 Связывание комплемента (CF)
- 直接荧光抗体试验 Непрямое флуоресцентное антитело (IFA)
- 琼脂凝胶免疫扩散试验 Иммунодиффузия в агаровом геле (AGID)
- 酶联免疫吸附试验 Иммуноферментный анализ (ИФА/ELISA)
- 荧光微球免疫试验 Иммунофлуоресцентный анализ (MIA)

血清中和试验
Тест на сывороточную нейтралиизацию [SN]

- 血清中和试验（SN）=病毒中和试验（VN）
- Сывороточная нейтрализация [SN] = нейтрализация вируса (VN)
- 高度敏感性：высокая чувствительность
- 高度特异性：высокая специфичность
- 用途：测定感染后或接种疫苗后中和抗体滴度
- Использование: Измерить титр нейтрализующих антител после заражения или вакцинации.
-
- 金标准试验：Тест по золотому стандарту
- 最经典的试验：Самый классический тест
- 确证试验： Подтверждающий тест
- 世界动物卫生组织（OIE）推荐: Рекомендовано Всемирной организацией здравоохранения животных (МЭБ).

中和试验原理

Принцип сывороточной нейтрализации



- 如果血清中存在抗体，就会与病毒结合，阻止病毒侵入细胞并阻断感染。细胞病变效应（CPE，感染引起的细胞变化）只有在细胞被感染时才会出现。
- Если в сыворотке присутствуют антитела, они связываются с вирусом и предотвращают инвазию и блокируют инфицирование клеток. Цитопатические эффекты (CPE, изменения в клетках из-за инфекции) наблюдаются только в том случае, если клетки инфицированы.

1.试验器材
1. Материал

1.1液氮罐或-80冰箱

1.1 Резервуар с жидким азотом или холодильник -80

1.2 CO_2培养箱

1.2 Инкубатор CO_2

1.3台式离心机

1.3 Настольная центрифуга

1.4水浴锅

1,4. Водяная баня

1.5 倒置显微镜

1,5. Инвертационный микроскоп

1.6细胞瓶（25 см^2）

1.6 Колба: колбы для тканевых культур (25 см2

1.7细胞板:96孔平底微量滴定板，组织培养级

1.7 Планшет: 96-луночный планшет для микротитрования с плоским дном, класс тканевой культуры

1.8微量移液器：单道[200μL、1000-μL]，12道[200μL]

1.8 Микропипетки: 200 мкл и 1000 мкл одноканальные; 200-мкл x 12-канальные

1.9 种用细胞（MCS）：RK-13 (ATCC-CCL37)，购自美国典型菌种保藏中心（ATCC）

1.9 Основной запас клеток (MCS): RK-13 (ATCC-CCL37), Американская коллекция типовых культур (ATCC)

1.10病毒：马动脉炎种毒CVL-Bucyrus株

1,10. Вирус: вирус артериита лошадей, штамм CVL-Bucyrus.

1.11 最低需要基础培养基（MEM）

1,11. Минимальная необходимая среда (MEM)

1.12胎牛血清（FCS）

1.12 Фетальная сыворотка теленка [FCS]

1.13 稀释液：无胎牛血清的 MEM

1.13 Растворитель: Минимальная необходимая среда без FCS

1.14细胞维持液:含2%FCS的MEM+1% 100X抗生素储存液

1.14 Питательная среда: MEM, содержащий 10% FCS и 1% 100-кратный запас антибиотиков

1.14细胞维持液:含10%FCS的MEM+1% 100X抗生素储存液

1.15 Поддерживающая среда: MEM, содержащий 2% FCS и 1% 100-кратного запаса антибиотиков

1.16抗生素储存液（100X）：青霉素溶液（100 00μg）、链霉素溶液（100 00μg）

1.16 Запас антибиотиков (100x): раствор пенициллина 100 00 мкг и раствор стрептомицина 100 00 мкг

2.细胞准备
2. Подготовка клеток

2.1 从液氮罐或-80 冰箱取出种用细胞
2.1. Take out cell from liquid nitrogen tank or -80 refrigerator

⇩

2.2 在 37°C温水中快速融化
2.2. Thaw it quickly in lukewarm water (37°C)

⇩

2.3 在 1000rpm 离心 2 分钟
2.3. Spin at 1000rpm for 2 minutes

⇩

2.4 吸出上清液
2.4. Pipette the supernatant

⇩

2.5 加入 1-2ml 稀释液，用吸管轻轻吹打分散均匀
2.5. Add 1-2ml diluent and pipette gently to disperse evenly

⇩

2.6 使用吸管吸出细胞至细胞瓶
2.6. Move the cells to tissue culture flasks

⇩

2.7 加入 10ml 细胞培养液
2.6. Add 10ml culture medium

⇩

2.8 在 5% CO_2 培养箱 37°C培养 3-4 天
2.8. Incubate in a 5% CO_2 incubator at 37°C for 3-4 days

3. 细胞消化
3. Деструкция клеток

3.1. 在显微镜下检查细胞单层
3.1. Check cell monolayer by microscope

⇩

3.2. 当细胞单层生长到 70-95%状态时，吸出培养基。
3.2. Remove culture medium when cell monolayers grow into 70-95% confluent.

⇩

3.3. 用 5 ml 0.02% EDTA 溶液轻轻冲洗细胞单层，并用移液管吸出。
3.3. Rinse gently cell monolayer with 5 ml 0.02% EDTA and remove it

⇩

3.4. 加入 5 ml 0.02% EDTA 溶液以覆盖单层。
3.4. Add 5 ml 0.02% EDTA solution to cover the monolayer.

⇩

3.5.在 37 °C 下孵育直至单层脱离细胞瓶壁（约 3-5 分钟）。
3.5. Incubate at 37 °C until the monolayer detaches (about 3–5 minutes).

⇩

3.6. 轻轻吹打使细胞分散均匀。
6. pipette gently to disperse cells evenly.

⇩

3.7. 计数细胞
3.7. Count cells

4 .种毒制备
4. Препарат посевного вируса

4.1 从液氮罐或-80 冰箱取出种用病毒
4.1. Take out seed virus from liquid nitrogen tank or -80 refrigerator

⇩

4.2 在 37℃温水中快速融化
4.2. Thaw quickly in lukewarm water (37℃)

⇩

4.3 用吸管转移到细胞单层
4.3. Pipette virus to 3-4-day-old confluent cell monolayers in tissue culture flasks

⇩

4.4 轻轻摇晃细胞瓶使接种的病毒液覆盖整个细胞单层
4.4. Rock gently flasks to disperse the inoculum over cell monolayers

⇩

4.5 在 5%的 CO_2 培养箱 37℃温育 1 小时
4.5. Incubate for 1 hour at 37°C in a 5% CO_2 incubator

⇩

4.6 加入 10ml 细胞维持液，在 5%的 CO_2 培养箱 37℃培养 3-4 天
4.6. Add 10ml maintenance medium and incubate at 37℃ for 3-4 days in a 5% CO_2 incubator

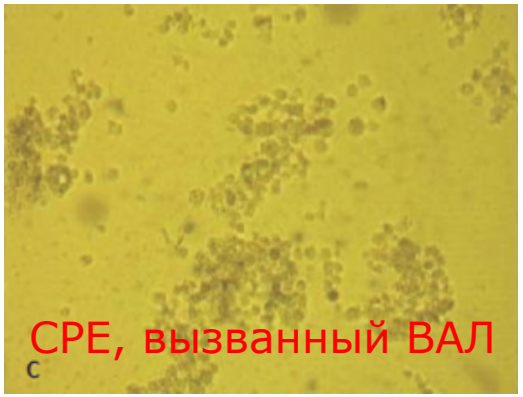
⇩

4.7 每天在显微镜下观察细胞病变（CPE）
4.7. Check daily cytopathic effect (CPE) by microscope

⇩

4.8 当 2-4 天内 CPE 超过 80%以上收集病毒培养液，冻融 1 次，用吸管吹打混匀后分装，即为中和试验用病毒，在液氮罐或-80 冰箱冻存备用。
4.8. When about 80% of cell monolayers show CPE within 2–4 days, freeze and thaw once, mix well with pipette and store in aliquots in liquid nitrogen tank or -80 ℃ refrigerator

马动脉炎病毒细胞病变 （CPE）：细胞溶解、死亡和脱落
Характерный CPE при инфекции ВАЛ: клеточный лизис, гибель и отслоение клеток.



5. 病毒滴度测定
5. Определение титра вируса

5.1 在 96 孔微量细胞板上每孔加 25μL 稀释液
5.1. Add 25μL of diluent in all wells of microtiter plate;

⇩

5.2 将冻存的种毒作 10^{-1}、10^{-2}....10^{-8} 系列稀释
5.2. Make 10-fold serial dilution of the seed virus from 10^{-1}, 10^{-2},...10^{-8}

⇩

5.3 每一稀释度接种 8 孔，每孔 25μL
5.3. Add 25μL of diluented virus in 8 wells for each dilution, i.e. eight 25 μL replicates per dilution

⇩

5.4 加 100μl 的 RK-13 细胞悬液（2.5×105/mL）于各孔中
5.4. Add 100μl of RK-13 cell suspension (2.5×105/mL) in each wel

⇩

5.5 在 5% CO_2 加湿的培养箱 37°C 培养 3-4 天
5.5. Incubate the plate for 3-4 days at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO_2 in air.

⇩

5.6 每天观察 CPE
5.6. Observe daily all wells by microscopy for the CPE appearance

⇩

5.7 记录结果，按 Spearman–Kärber 法计算病毒滴度 $TCID_{50}$
5.7. Record results and calculate virus titer $TCID_{50}$ by to Spearman-Kärber method.

应用 Spearman-Karber法计算病毒滴度
Рассчитать титр вируса по методу Спирмана-Карбера.

应用 Spearman-Karber 法计算病毒滴度

Log10 病毒稀释度	出现 CPE 孔数	总孔数	备注
-1	10	10	
-2	10	10	
-3	10	10	
-4	10	10	
-5	10	10	X=5
-6	6	10	
-7	1	10	10+6+1=17
-8	0	10	

Spearman-Kärber 公式

病毒滴度 = (X – d/2 + [d • S])，其中

--X = Log10 全部孔出现 CPE 的稀释度 CPE (=5)

--d =Log10 稀释倍数 (1)

--S = 从出现 CPE 的最高稀释度开始累计各稀释度出现 CPE 的孔比例总和([10+6+1]/10)

Log10 50% 终点滴度 = - [5 - ½ + 1 (17/10)] = -6.2

病毒滴度 = $10^{6.2}$ $TCID_{50}$/mL.

Calculation of virus titer using the Spearman-Karber method

Log10 virus dilution	Wells showing CPE	Total of wells	Note
-1	10	10	
-2	10	10	
-3	10	10	
-4	10	10	
-5	10	10	X=5
-6	6	10	
-7	1	10	10+6+1=17
-8	0	10	

Spearman-Kärber formula:

Virus titer = (X – d/2 + [d • S]), where:

--X = Log10 of dilution with all wells showing CPE (=5)

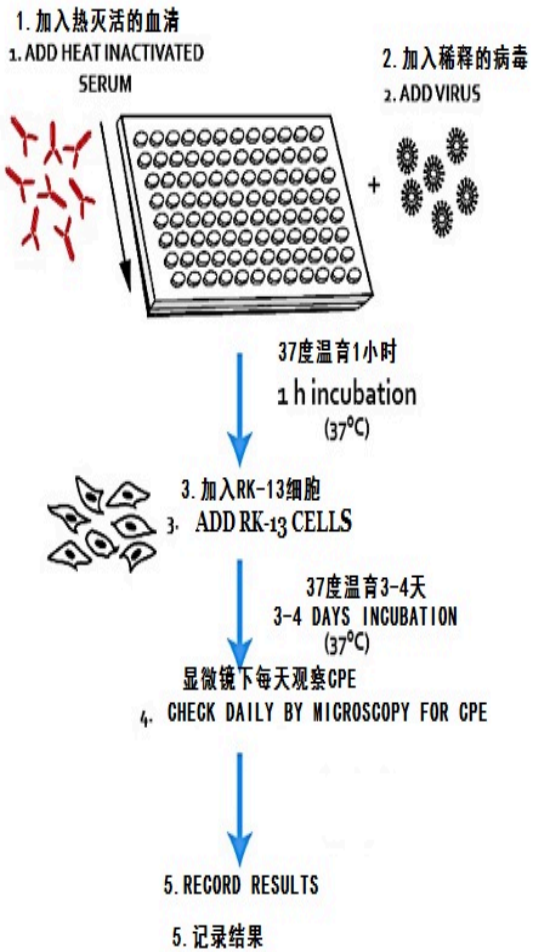
--d =Log10 of dilution factor (1)

--S=Sum of proportions of wells showing CPE for all dilutions tested ([10+6+1

Log10 of 50% endpoint dilution = - [5 - ½ + 1 (17/10)] = -6.2

Titre of the virus = $10^{6.2}$ $TCID_{50}$/mL.

6. 中和试验程序
6. Тест на сывороточную нейтрализацию (SN)



6.1 待检血清和对照血清在56℃水浴中灭活30分钟。
6.1. Inactivate test sera and control sera for 30 minutes in a water bath at 56°C.

6.2 在微量滴定板上，每孔加25μl无FCS的MEM。
6.2. Add 25 μl of FCS-free MEM to all wells of the microtiter plates.

6.3血清做倍比稀释，即混合后取25 μL，加入下一孔，充分混合，同法依次稀释，直至最后一孔。每板可测定6个血清样。
6.3. Make doubling dilutions of each serum by sequential mixing and transfer of 25 μl to each subsequent row of wells. Six sera can be assayed in each plate.

6.4 每孔加25 μL稀释的病毒（100 TCID50/孔）。
6.4. Add 25 μl of diluted virus to each well (100 TCID50/well).

6.5 滴定板在含5% CO2的培养箱中37℃孵育1小时。
6.5. Incubate the microtiter plates for 1 hour at 37°C in 5% CO2 atmosphere.

6.6 每孔加100μL RK-13细胞悬液（用细胞培养液配成5 x 10^5个细胞/mL）。
6.6. Add 100 μl of RK-13 cell suspension (5 × 10^5 cells/ml) to each well.

6.7 滴定板在含5% CO2的培养箱中37℃孵育3~4天。
6.7. Incubate the plates for 3–4 days at 37°C in an atmosphere of 5% CO2 in air.

6.8 显微镜下检查CPE，记录实验结果。
6.8. Examine the plates by microscopy for CPE and record the results on a worksheet.

注意：出于安全原因，所有试验必在二级生物安全柜中进行，以防止细胞污染和病毒扩散。
Примечание: из соображений безопасности все процедуры тестирования должны выполняться в шкафу биобезопасности класса II, чтобы предотвратить заражение клеток и распространение вируса.

检查所有试验对照
Проверьте все контрольные элементы теста

6.10 检查所有试验对照正常且种毒滴度为30–300 TCID50。

6.10. The validity of the test is confirmed by establishing that all controls are normal and the working dilution of seed virus contained 30–300 TCID50 virus.

6.10.1 细胞对照（无病毒）：细胞单层完整，无CPE

6.10. 1. cell control (no virus): intact cell monolayers without CPE

6.10.2 血清毒性对照：细胞单层完整，无CPE

6.10. 2. serum cytotoxicity control: intact cell monolayers without CPE

6.10.3 阳性血清对照：细胞单层完整，无CPE

6.10. 3. positive serum control: intact cell monolayers without CPE

6.10.4 阴性血清对照：细胞单层破坏，出现CPE

6.10. 4. negative serum control: destroyed cell monolayers with CPE

6.10.5 病毒对照（病毒回归滴定）：每孔加入的病毒量在30–300 $TCID_{50}$之间

6.10. 5. Virus control (virus back titration): Make sure that actual amount of virus added to each well is between 30–300 $TCID_{50}$.

7.试验器材
7. Требования протокола

- 7.1 未免疫的马，血清中和试验，血清1:4稀释，结果为阴性；或
- 7,1. Для вакцинированных лошадей: тест на сывороточную нейтрализацию при разведении сыворотки 1: 4 с отрицательным результатом; ИЛИ
-
- 7.2 免疫的马，间隔14天采集双份血清，做血清中和试验，抗体滴度稳定不变或降低，并采集抗凝血进行RT-PCR试验或病毒分离结果为阴性。
- 7,2. Для невакцинированных лошадей тесты на сывороточную нейтрализацию парных образцов с интервалом в 14 дней, второй результат, который продемонстрировал стабильные или снижающиеся титры антител. Животные должны пройти тест ОТ-ПЦР или тест выделения вируса с отрицательными результатами, с использованием образцов несвернувшейся крови.

谢 谢

Спасибо