

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1226—2003

---

### 禽痘抗体检测方法 红细胞凝集 抑制试验

Detection antibodies against fowl pox virus—Protocol of  
hemagglutination inhibition test

2003-05-28 发布

2003-12-01 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

本标准的附录 A 是规范性附录。

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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：林庆燕、卢体康、范万红。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

## 禽痘抗体检测方法 红细胞凝集抑制试验

### 1 范围

本标准规定了应用血凝抑制试验检测禽血清中抗禽痘病毒抗体的方法。

本标准适用于禽痘的流行病学调查、诊断、检疫和疫情监测。

### 2 引用标准

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和试验方法(eqv ISO 3696:1987)

### 3 原理

本标准采用血凝抑制方法。该方法的原理是利用某些病毒或病毒的血凝素能选择地使某种或几种动物的红细胞发生凝集,当病毒的悬液中先加入特异性抗体,且这种抗体的量足以抑制病毒颗粒或其血凝素时,则红细胞表面的受体就不能与病毒颗粒或其血凝素直接接触。这时红细胞的凝集现象就被抑制。在已知的禽痘病毒悬液中,加入待检禽血清,若其含有抗禽痘病毒抗体,则能与禽痘病毒相结合,抑制禽痘病毒的血凝作用,这种抑制作用的强弱与禽痘病毒抗体的含量有关。

### 4 仪器与试剂

#### 4.1 仪器

96孔V型微量反应板、微量加样器、微量振荡器、离心机及离心管等。

#### 4.2 试剂

4.2.1 禽痘病毒凝集抗原、抗禽痘病毒阴、阳性对照血清。

4.2.2 0.85%氯化钠、PBS液、红细胞保存液(阿氏液)、0.5%鸡红细胞悬液。其配制方法见附录A。

4.2.3 待检血清及处理:无菌采集待检动物血液,离心分离血清,56℃水浴灭活30 min。

4.2.4 试验用蒸馏水为GB/T 6682—1992中的三级水。

### 5 操作方法

#### 5.1 血凝试验(HA)

5.1.1 取干净的96孔V型微量反应板一块,按表1进行操作。

表1 禽痘抗原血凝滴度测定

单位为微升

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	对照
PBS	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
不同稀释度的抗原	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	0
0.5%红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
室温(20℃~25℃)30 min												
判定举例	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—

5.1.2 用微量加样器吸取 PBS,在板上每孔加入 50  $\mu\text{L}$ 。

5.1.3 用微量加样器吸取 50  $\mu\text{L}$  禽痘抗原放于第 1 孔内,充分混匀后,从第 1 孔中取 50  $\mu\text{L}$  移至第 2 孔,充分混匀后,从第 2 孔中取 50  $\mu\text{L}$  移至第 3 孔……至第 11 孔混匀后,取 50  $\mu\text{L}$  弃去,第 12 孔不加抗原作空白对照。

5.1.4 用微量加样器吸取 0.5% 红细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ,依次加入各孔。

5.1.5 将微量反应板置振荡器振荡 2 min,使抗原与红细胞充分混合,室温(20℃~25℃)静置 30 min 判定结果,并作好记录。

5.1.6 能引起红细胞完全凝集的病毒最高稀释度作为一个红细胞凝集单位。在血凝抑制试验时使用 4 个红细胞凝集单位的抗原。表 1 中 1:256 为一个红细胞凝集单位,4 个单位抗原的稀释倍数为 1:64。

## 5.2 血凝抑制试验(HI)(见表 2)

表 2 血清抗体血凝抑制滴度测定

单位为微升

孔 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血清稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256	阳性	阴性	抗原	空白对照
PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	0	0	25	50
不同稀释度的待检血清	25	25	25	25	25	25	25	25	(25) 阳性血清	(25) 阴性血清	0	0
抗原	(25) PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0
室温(20℃~25℃)静置 30 min												
0.5%红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
室温(20℃~25℃)静置 30 min												
判定举例	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—

5.2.1 在 96 孔 V 型微量反应板上用微量加样器加样和稀释样品。

5.2.2 每孔加 25  $\mu\text{L}$  PBS。

5.2.3 第 1 孔加入 25  $\mu\text{L}$  待检血清,依次倍比稀释至第 8 孔,最后弃去 25  $\mu\text{L}$ 。

5.2.4 第 9 孔加 25  $\mu\text{L}$  阳性血清作阳性对照孔。

5.2.5 第 10 孔加 25  $\mu\text{L}$  阴性血清作阴性对照孔。

5.2.6 第 1 孔不加抗原,只加 25  $\mu\text{L}$  PBS 作待检血清对照,第 11 孔不加待检血清作抗原对照,第 12 孔不加抗原和血清作空白对照。

5.2.7 第 2 孔至第 12 孔分别加入“血凝试验”测定的 4 个红细胞凝集单位的抗原 25  $\mu\text{L}$ 。

5.2.8 将微量反应板置振荡器振荡 2 min,室温(20℃~25℃)静置 30 min。

5.2.9 每孔各加入 25  $\mu\text{L}$  0.5% 的红细胞悬液,置振荡器中振荡 2 min 后静置 30 min,判定结果。

5.2.10 每次测定应设已知滴度的标准阳性血清对照。

## 5.3 结果判定

5.3.1 判定时应首先观察各对照孔是否完全成立。

5.3.2 红细胞凝集:红细胞分散在孔底四周均匀的颗粒状凝集且布满整个孔底,判为血凝作用为阳性“+”。

5.3.3 无凝集或凝集抑制:红细胞集中于孔底中央呈圆点状,若将微量反应板倾斜时,圆点能滚动判为血凝作用为阴性“-”或判为血凝抑制作用为阳性。

5.3.4 血凝抑制价:凡能使抗原的血凝作用完全受到抑制的最高血清稀释倍数。

5.3.5 被检血清的血凝抑制价在 1:8 以上者应判为阳性反应。

**附 录 A**  
**(规范性附录)**  
**溶液和试剂配制**

**A.1 0.85%氯化钠**

氯化钠(NaCl)	8.5 g
三蒸水加至	1 000 mL

保存于4℃备用。

**A.2 PBS液(0.01 mol/L PBS, pH 7.2)**

氯化钠(NaCl)	8 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
碳酸氢钠(NaHCO <sub>3</sub> )	1.15 g
磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2 g
三蒸水加至	1 000 mL

保存于4℃备用。

**A.3 红细胞保存液(阿氏液)**

氯化钠(NaCl)	4.2 g
枸橼酸钠(Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	8.0 g
枸橼酸(C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0.55 g
葡萄糖(C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	20.5 g
三蒸水加至	1 000 mL

保存于4℃备用。

**A.4 待检血清**

无菌采集被检动物血液,3 000 r/min离心5 min分离血清,56℃水浴灭活30 min。

**A.5 0.5%鸡红细胞悬液**

无菌采取公鸡静脉血5 mL~10 mL,加入到等量的阿氏液中摇匀,置4℃备用。临用前,用PBS洗涤3次~5次,每次3 000 r/min离心5 min,将血浆、白细胞充分洗去至上清液清亮,再将沉淀的红细胞稀释成0.5%的红细胞悬浮液。

---