



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1182.2—2004

禽流感微量红细胞凝集抑制试验

Haemagglutination-inhibition test for avian influenza

2004-06-01 发布

2004-12-01 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 为规范性附录。

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：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：徐海聂、薛景山、潘文波、廖秀云、周思波、王小玉。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

禽流感微量红细胞凝集抑制试验

1 范围

本标准规定了用微量红细胞凝集抑制试验检测禽流感抗体的试验方法。

本标准适用于禽类禽流感检疫、疫情监测和流行病学调查。

2 试剂和材料

2.1 试剂纯度

所有化学试剂均为分析纯。

2.2 pH7.2, 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)

配制方法见附录 A。

2.3 红细胞泥

配制方法见附录 A。

2.4 1%鸡红细胞悬浮液

将鸡红细胞泥用 PBS 稀释成 1% 悬浮液。

2.5 标准抗原

禽流感 H5、H7、H9 等标准抗原。

2.6 标准血清

禽流感 H5、H7、H9 等标准阳性血清和标准阴性血清。

2.7 被检血清

2.7.1 无菌采取动物血液,凝固后离心分离血清,置于 4℃ 或 -20℃ 保存备用。

2.7.2 除鸡外其余禽的血清需先确定是否存在非特异性凝集。有特异性凝集的,血清按下列方法进行:每 0.5 mL 血清加 25 μ L 鸡红细胞泥,轻轻振荡,静置 30 min, 2 000 r/min 离心 2 min~5 min, 红细胞沉聚,取出吸附过的血清供检。

2.8 器材

架盘天平、分析天平、离心机、V 型微量血凝板、微型振荡器、可调移液器、恒温箱等。

3 操作方法

3.1 微量血凝试验

微量血凝试验见表 1。

表 1 禽流感微量血凝试验

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原滴度(log ₂)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	对照
PBS/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
抗原倍比稀释/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
PBS/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1%鸡红细胞/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
作用时间及温度	室温(约 20℃)下静置 40 min 左右											
判定举例	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-

弃去
25

3.1.1 在 V 型微量血凝板上,每孔加入 PBS 25 μ L。

3.1.2 孔 1 加禽流感标准抗原 25 μ L,反复吹打充分混匀,移出 25 μ L 至孔 2;吹打混匀,移出 25 μ L 至孔 3,依次类推作等量倍比稀释至孔 11,孔 11 弃去 25 μ L。孔 12 不加抗原设立为红细胞对照。

3.1.3 每孔加入 PBS 25 μ L。

3.1.4 每孔加入 1% 鸡红细胞悬浮液 25 μ L,立即置微型振荡器上振荡或手持血凝板绕圆圈混匀。

3.1.5 室温(约 20℃)下静置 40 min 左右;如果室温太高,可在 4℃ 静置约 60 min。对照红细胞呈明显的圆点状时进行抗原效价判定。完全血凝的抗原最高稀释度为该抗原的血凝效价,即一个血凝单位(HAU)。

3.1.6 4 HAU 抗原的标定

3.1.6.1 根据 3.1.5 测定的抗原的血凝效价,计算 4 HAU 抗原的稀释倍数。例如表 1 抗原效价为 2^5 (1:128),其 4 个单位抗原效价为 2^3 (1:32),则将抗原稀释 32 倍。

3.1.6.2 将 25 μ L 含 4 HAU 的抗原用 PBS 做等量倍比稀释,使每孔(25 μ L)含有 2 HAU、1 HAU、0.5 HAU、0.25 HAU,每孔补加 PBS 25 μ L,再加入 1% 鸡红细胞 25 μ L,判定血凝图像与预期结果是否相符。2 HAU、1 HAU 孔红细胞应出现完全凝集,0.5 HAU 孔红细胞应出现 50% 凝集,0.25 HAU 孔红细胞应不凝集。若与此不符,应重新配制抗原,测定效价。

3.2 微量血凝抑制试验

微量血凝抑制试验见表 2。

表 2 禽流感微量血凝抑制试验

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血清稀释度(\log_2)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PBS/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
被检血清倍比稀释/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
4 HAU 抗原/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
作用时间及温度	室温(约 20℃)下静置至少 30 min											
1% 鸡红细胞/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
作用时间及温度	室温(约 20℃)下静置约 40 min											
判定举例	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	++++	++++	++++

弃去
25

3.2.1 在 V 型微量血凝板上,每孔加入 PBS 25 μ L。

3.2.2 孔 1 加入被检血清 25 μ L,作等量倍比稀释至孔 12。

3.2.3 每孔加入 4 HAU 的抗原 25 μ L,混匀。

3.2.4 室温(约 20℃)下静置至少 30 min,或 4℃ 静置 60 min。

3.2.5 每孔加入 1% 鸡红细胞悬浮液 25 μ L,混匀,室温(约 20℃)下静置 40 min 左右;如果室温太高,可在 4℃ 静置约 60 min。待对照红细胞呈明显的圆点状时判定结果。

3.2.6 每次测定应设已知滴度的阳性血清、阴性血清和红细胞对照(仅含 25 μ L 1% 鸡红细胞和 50 μ L PBS)。

3.2.7 结果判定

3.2.7.1 红细胞均匀分散在孔底周围、倾斜血凝板时不流淌判为完全凝集,记作++++;75%凝集记作+++;50%凝集记作++;25%凝集记作+;红细胞集中在孔底中央呈圆点、倾斜血凝板时流淌判定为不凝集或血凝抑制,记作—。

3.2.7.2 检查各种对照。阴性血清滴度 $\leq 2^2$ (1:4),阳性血清误差不超过一个滴度,红细胞对照无自凝现象,试验成立,进行结果判定。

3.2.7.3 能完全抑制 4 HAU 抗原的血清最高稀释度判为该血清的血凝抑制滴度。

3.2.7.4 血清的血凝抑制滴度 $\geq 2^4$ (1:16),判为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
试 剂 配 制

A.1 pH7.2, 0.1 mol/L PBS

甲液:磷酸氢二钠($12\text{H}_2\text{O}$) 35.82 g,氯化钠 8.5 g,加蒸馏水至 1 000 mL。

乙液:磷酸二氢钠($2\text{H}_2\text{O}$) 15.60 g,氯化钠 8.5 g,加蒸馏水至 1 000 mL。

甲液 72 mL,乙液 28 mL,混匀。121℃高压蒸汽灭菌 15 min,置室温或 4℃保存。

A.2 阿氏液的配制

葡萄糖	2.05 g
-----	--------

柠檬酸钠($2\text{H}_2\text{O}$)	0.80 g
-------------------------------	--------

氯化钠	0.42 g
-----	--------

蒸馏水	加至 100 mL
-----	-----------

溶解后,以 10%柠檬酸调节 pH 至 6.1,分装,117℃高压蒸汽灭菌 15 min,4℃保存。

A.3 红细胞泥的配制

采集 SPF 鸡或无禽流感、新城疫等血凝抑制抗体的成年鸡血,放入等量阿氏液中摇匀,置 4℃冰箱中保存备用。临用前用 PBS 洗涤 3 次~5 次,每次以 2 000 r/min 离心 5 min,将血浆、白细胞充分洗去至上清液清亮,弃上清液,留存沉淀的红细胞。
