



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4828—2017

韦塞尔斯布朗病抗体血凝抑制试验 检测方法

Quarantine protocol for antibodies against Wesselsbrol disease virus by HI

2017-07-21 发布

2018-03-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：刘艳华、高志强、谷强、张伟、蒲静、乔彩霞、尹羿、汪琳、张利峰、凌凤俊。

韦塞尔斯布朗病抗体血凝抑制试验 检测方法

1 范围

本标准规定了进出口动物韦塞尔斯布朗病抗体的血凝抑制试验检测方法。
本标准适用于进出口动物韦塞尔斯布朗病抗体的检测。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PBS:	磷酸盐缓冲盐水
HA:	血凝试验
HI:	血凝抑制试验
HAU:	血凝单位

3 设备、材料和试剂

3.1 设备

- 3.1.1 台式离心机。
- 3.1.2 振荡器。
- 3.1.3 冰箱。
- 3.1.4 恒温箱。
- 3.1.5 微量可调移液器。

3.2 材料和试剂

- 3.2.1 96 孔 V 型微量反应板。
- 3.2.2 含 0.4% 卵清蛋白的 pH 7.5PBS 和含 0.4% 卵清蛋白的 pH 5.7PBS, 配制方法见附录 A。
- 3.2.3 阿氏(Alsevers)液, 配制方法见附录 B 的 B.1。
- 3.2.4 0.5% 鹅红细胞悬液, 配制方法见 B.2。
- 3.2.5 韦塞尔斯布朗病血凝抗原, 阳性血清和阴性血清。

3.3 被检血清

无菌采集动物血液, 凝固后离心分离血清, 56℃ 灭活处理 30 min 后, 置于 4℃ 或 -20℃ 保存备用。
被检血清须采用高岭土-鹅红细胞吸附法去除非特异性凝集素。按如下方法进行处理: 0.1 mL 被检血清, 加入 0.4 mL pH 7.5 磷酸盐缓冲液, 再加入 0.5 mL 25% 高岭土, 充分振荡混合, 室温作用 20 min, 然后 1 000 r/min 离心 30 min 取上清, 加入 25 μL 0.5% 鹅红细胞悬液, 轻轻振荡, 冰浴吸附 20 min, 1 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 即为 1:10 稀释的被检血清。

4 操作步骤

4.1 血凝试验(见表 1)

- 4.1.1 在微量反应板的每孔均加入 25 μL 含 0.4%卵清蛋白的 pH 7.5 PBS。
- 4.1.2 吸取 25 μL 韦塞尔斯布朗病血凝抗原加入第 1 孔,反复吹打混匀。
- 4.1.3 从第 1 孔吸取 25 μL 液体加入第 2 孔,混匀后吸取 25 μL 液体加入第 3 孔,如此对倍稀释至第 11 孔,第 11 孔混匀后吸弃 25 μL。
- 4.1.4 每孔加入 25 μL 含 0.4%卵清蛋白的 pH 5.7PBS。
- 4.1.5 每孔加入 50 μL0.5%鹅红细胞悬液(加之前,红细胞悬液要充分摇匀)。
- 4.1.6 轻轻振荡混匀,在 20℃~25℃下静置 60 min 后观察结果。
- 4.1.7 血凝效价确定:对照孔(第 12 孔)红细胞应呈现明显的纽扣状沉淀于孔底。将板倾斜,观察红细胞有无呈泪珠状流淌,完全血凝(不流淌)的抗原最高稀释倍数为该抗原的血凝效价,代表 1 个血凝单位(HAU)。
- 4.1.8 根据 4.1.7 的结果,使用含 0.4%卵清蛋白的 pH 7.5 PBS 配制 4HAU 的病毒抗原,以完全血凝的病毒最高稀释倍数作为终点,终点稀释倍数除以 4 即为 4HAU 抗原的稀释倍数。例如表 2 抗原效价为 2⁴(1:16),4HAU 抗原的稀释倍数为 2²(1:4)。
- 4.1.9 将 25 μL 含 4 个血凝单位的抗原用 PBS 做等量倍比稀释,使每孔(25 μL)含有 2HAU、1HAU、0.5HAU 和 0.25HAU,每孔补加 25 μL PBS,再加入 50 μL 0.5%鹅红细胞悬液,判定血凝结果与预期结果是否相符合。2HAU、1HAU 孔红细胞应出现完全凝集,0.5HAU 孔红细胞应出现 50%凝集,0.25HAU 孔红细胞应不凝集。若不相符,应重新配制抗原,测定效价。

表 1 血凝试验

步骤 序号	试验项目	孔号											对照
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	0.4% 卵清蛋白的 pH 7.5 PBS/μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
2	抗原倍比稀释/μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	弃去 25
3	0.4% 卵清蛋白的 pH 5.7 PBS/μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
4	0.5% 鹅红细胞/μL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
5	作用时间及温度条件	在 20℃~25℃下静置 60 min											
6	判定举例	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2 血凝抑制试验(见表 2)

- 4.2.1 在微量反应板的每孔均加入 25 μL 含 0.4%卵清蛋白的 pH 5.7 PBS。
- 4.2.2 吸取 25 μL 已经处理 1:10 稀释的被检血清加入第 1 孔内,充分混匀后吸取 25 μL 于第 2 孔内,如此对倍稀释至第 10 孔,混匀后吸弃 25 μL。最后 2 孔不加血清,分别作抗原对照和空白对照。
- 4.2.3 除空白对照孔外,每孔加入 4HAU 的抗原 25 μL,空白对照孔加入 25 μL 含 0.4%卵清蛋白的 pH 5.7 PBS,在 20℃~25℃下静置 60 min。
- 4.2.4 每孔加入 50 μL 0.5%鹅红细胞悬液(加之前,红细胞悬液要充分摇匀)。

- 4.2.5 轻轻振荡混匀,在 20℃~25℃下静置 60 min 后观察结果。
- 4.2.6 每次测定应设阳性血清和阴性血清对照,按被检血清进行系列稀释测定。

表 2 血凝抑制试验

步骤 序号	试验项目	孔号										抗原 对照	空白 对照
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.4% 卵清蛋白的 pH 5.7 PBS/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50
2	被检血清倍比稀释/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0	0
3	4HAU 抗原/ μ L	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	0
4	作用时间及温度条件	在 20℃~25℃下静置 60 min											
5	0.5% 鹅红细胞/ μ L	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
6	作用时间及温度条件	在 20℃~25℃下静置 60 min											
7	判定举例	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—

弃去
25

5 结果判定

- 5.1 判定时首先观察对照孔是否成立。
- 5.2 红细胞凝集:红细胞均匀分散在孔底周围,将板倾斜,红细胞不流淌判为完全凝集,判定为血凝作用阳性,记作“+”。
- 5.3 无凝集:红细胞集中在孔底中央呈圆点、倾斜血凝板时呈泪珠状流淌,判定为不凝集或血凝抑制,记作“—”。
- 5.4 血凝抑制价:以能使 4 个 HAU 抗原凝集红细胞作用完全被抑制的血清最高稀释倍数,称为该血清的血凝抑制价(如表 2 的血凝抑制价为 1 : 160)。
- 5.5 血凝抑制价大于或等于 1/40 为阳性,血凝抑制价等于 1/20 为可疑,需重复试验,重复试验结果仍为 1/20,判为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
含 0.4% 卵清蛋白 PBS 配制

A.1 A 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液：
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g，溶于蒸馏水中，最后稀释至 1 000 mL。

A.2 B 液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液：
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g)，加蒸馏水溶解，最后稀释至 1 000 mL。

A.3 含 0.4% 卵清蛋白 pH 7.5 PBS 的配制

0.2 mol/L A 液 8 mL
0.2 mol/L B 液 42 mL
氯化钠 8.5 g
4 g 卵清蛋白
用蒸馏水定容至 1 000 mL，过滤除菌后 2℃~8℃ 冰箱保存。

A.4 含 0.4% 卵清蛋白 pH 5.7 PBS 的配制

0.2 mol/L A 液 46.75 mL
0.2 mol/L B 液 3.25 mL
氯化钠 8.5 g
4 g 卵清蛋白
用蒸馏水定容至 1 000 mL，过滤除菌后 2℃~8℃ 冰箱保存。

附 录 B

(规范性附录)

阿氏(Alsevers)液、0.5%鹅红细胞悬液配制

B.1 阿氏(Alsevers)液配制

葡萄糖 20.5 g

二水合柠檬酸钠 8.0 g

柠檬酸 0.55 g

NaCl 4.2 g

溶于蒸馏水,并稀释至 1 000 mL,用 1 mol/L 的 NaOH 或 1 mol/L 的 HCl 调节至 pH=6.1,用孔径为 0.22 μm 的滤膜进行过滤除菌。

B.2 0.5%鹅红细胞悬液制备

采集鹅血液与等体积阿氏液混合摇匀,用 5 倍量生理盐水洗涤 3 次,每次均以 1 000 r/min 离心 10 min,直至上清透明无色。配制红细胞悬液时,再用含 0.4% 卵清蛋白 pH 5.7 PBS 洗涤 1 次,以 1 000 r/min 离心 10 min,取沉淀红细胞用含 0.4% 卵清蛋白 pH 5.7 PBS 配成体积分数为 0.5% 鹅红细胞悬液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。