



中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.50~14926.55—2001

实验动物 微生物学检测方法(3)

Laboratory animal—Microbiological examination methods

2001-08-29 发布

2002-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

目 录

GB/T 14926.50—2001	实验动物	酶联免疫吸附试验	1
GB/T 14926.51—2001	实验动物	免疫酶试验	5
GB/T 14926.52—2001	实验动物	免疫荧光试验	9
GB/T 14926.53—2001	实验动物	血凝试验	12
GB/T 14926.54—2001	实验动物	血凝抑制试验	15
GB/T 14926.55—2001	实验动物	免疫酶组织化学法	19

前 言

本标准修订了 GB/T 14926.24—1994《实验动物 小鼠肺炎病毒检测方法》中的血凝抑制试验方法,将其作为一个独立标准列出。

本标准由中华人民共和国科学技术部提出并归口。

本标准起草单位:中国实验动物学会。

本标准主要起草人:贺争鸣。

中华人民共和国国家标准

实验动物 血凝抑制试验

GB/T 14926.54—2001

Laboratory animal—Haemagglutination inhibition test (HAI)

1 范围

本标准规定了血凝抑制试验(HAI)所用试剂、器材和操作步骤等。
本标准适用于实验动物病毒抗体的检测。

2 原理

某些病毒在一定的条件下,能够选择性的凝集某些动物红细胞。这种凝集红细胞的能力可被特异性抗体所抑制。

3 主要试剂与器材

3.1 试剂

3.1.1 血凝素抗原

血凝抗原除部分病毒(如痘类病毒)能与感染性颗粒分开外,大部分是与病毒的感染性颗粒相关联,凡培养于鸡胚或组织培养中的病毒及其抗原物质,经离心除去沉淀,均可用作血凝抑制试验的血凝素抗原。见 GB/T 14926.52—2001 中表 1、表 2。

3.1.2 红细胞悬液

根据不同病毒血凝所需敏感红细胞制备悬液。一般将血液保存于阿氏溶液内,使用前 pH7.4 PBS 洗三次,再悬于 pH7.4 PBS 中。

3.1.3 阳性血清

3.1.4 阴性血清

3.1.5 PBS(0.01 mol/L,pH7.4)

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
磷酸二氢钾	0.2 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.83 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

3.1.6 阿氏溶液

葡萄糖	2.05 g
枸橼酸钠	0.8 g
枸橼酸	0.055 g
氯化钠	0.42 g
蒸馏水	100 mL

115℃,30 min 灭菌,保存于 4℃。

3.2 器材

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 2001-08-29 批准

2002-05-01 实施

- 3.2.1 恒温培养箱。
- 3.2.2 微量震荡器。
- 3.2.3 微量血凝反应板(U型或V型)。
- 3.2.4 微量加样器(容量5~50 μL)或微量稀释棒。

4 操作步骤

4.1 血凝素滴定

将血凝素用PBS做连续倍比稀释,每稀释度留25 μL 于微量血凝板孔内,再加25 μL PBS和50 μL 红细胞悬液,摇匀。同时设立红细胞对照。置所需温度30~60 min,判定结果时将出现凝集“++”的最高稀释度定为血凝素的效价。

4.2 待检血清处理

将被检血清置56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min。有的血清含有非特异性抑制素,可用霍乱滤液处理,即1份血清加4份滤液,混匀后置37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴过夜,再置56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min。有的血清含有非特异性凝集素,可按血清体积1/10量加入50%红细胞悬液置4 $^{\circ}\text{C}$ 16 h或室温2 h,然后离心除去血球。

4.3 血清稀释

在微量血凝反应板(U型或V型)上,自1:10起作一系列倍比稀释,每稀释度留25 μL 于血凝板孔内,另取1:10稀释的血清25 μL ,作血清对照(见表1)。

4.4 滴加血凝素

在已稀释好的血清孔内(除血清对照孔外)加25 μL 血凝素(根据血凝素不同,稀释成4U或8U)。血清对照孔加25 μL PBS。摇匀后置所需温度作用30 min(见表3)。

4.5 血凝素单位校对

滴加血凝素的同时,将8U血凝素稀释成4U、2U、1U和1/2U,每孔25 μL ,摇匀后置所需温度作用一定时间(见表2)。

4.6 红细胞对照 加PBS 50 μL (见表2)。

4.7 血清对照(见表2)。

4.8 滴加红细胞悬液 全部试验和对照孔内,均加50 μL 红细胞悬液,摇匀后置所需温度作用一定的时间(见表3),判定结果。

5 结果判定

在对照系统(阴性血清、阳性血清、待检血清、抗原和红细胞)成立的条件下判定结果。

判定时以完全不出现血凝的血清最高稀释度为血清的血凝抑制滴度。

各孔血凝结果以++++、+++、++、+、-表示。

++++:红细胞一片凝集,均匀铺于孔底。

+++ :红细胞凝集基本同上,孔底有大圈。

++ :红细胞于孔底形成一个中等大的圈,四周有小凝块。

+ :红细胞于孔底形成一个小圈,四周有少许凝块。

- :红细胞完全不凝集,沉于孔底。

表 1 血球凝集抑制试验(检测系统)操作方法

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀释度	1/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/512	红细胞 对照
待检血清, μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
血凝素, μL		25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
在所需温度条件下作用一定时间												
PBS, μL	25											50
红细胞, μL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

表 2 血球凝集抑制试验(对照系统)操作方法

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血凝素单位	4	2	1	1/2								
PBS, μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
血凝素, μL	25	25	25	25								
阳性血清, μL					25	25	25	25				
阴性血清, μL									25	25	25	25
红细胞, μL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

表 3 血凝抑制试验条件

病毒	血凝单位	红细胞	抗原抗体作用		加红细胞后 作用温度, $^{\circ}\text{C}$	判定阳 性滴度	备注
			时间, min	温度, $^{\circ}\text{C}$			
TMEV	8	人“0”	60	22	22	20	
Sendai	4	鸡、豚鼠	30	22	22	10	
KRV	8	豚鼠	30	22	22	20	
H-1	8	豚鼠	30	22	22	20	
RHDV	8	人“0”	30	22	22	10	疫苗保护效果滴度(HAI)
CPV	8	猪	30	22 或 37	4	80	疫苗保护效果滴度(HAI)
ICHV	4	人“0”	30	37	37	160	疫苗保护效果滴度(ELISA)
RV	4	鹅	120	22	4	160	疫苗保护效果滴度(ELISA)