



中华人民共和国国家标准

GB/T 27535—2011

猪流感 HI 抗体检测方法

Detection method of hemagglutination inhibition antibody
against swine influenza

2011-11-21 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:乔传玲、杨焕良、陈艳、辛晓光、陈化兰。

猪流感 HI 抗体检测方法

1 范围

本标准规定了猪流感病毒血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验的技术要求。
本标准适用于猪流感血清 HI 抗体的检测。

2 仪器

水浴箱、4℃冰箱等。

3 试验材料

单道及多道微量移液器、吸头。

4 试剂

- 4.1 0.01 mol/L pH7.2 PBS(参见附录 A 中 A.1)。
- 4.2 胰酶溶液(参见附录 A 中 A.2)。
- 4.3 0.01 mol/L KIO_4 溶液(参见附录 A 中 A.3)。
- 4.4 1%丙三醇盐水(参见附录 A 中 A.4)。
- 4.5 阿氏(Alsevers)液(参见附录 A 中 A.5)。
- 4.6 0.5%鸡红细胞悬液(参见附录 A 中 A.6)。
- 4.7 HI 试验抗原和阴、阳性血清(参见附录 A 中 A.7)。

5 血凝(HA)试验

- 5.1 用多道微量移液器在微量反应板的1~12孔均加入0.05 mL PBS,换吸头。
- 5.2 吸取0.05 mL 抗原,加入第1孔,反复抽打3~5次混匀。
- 5.3 从第1孔吸取0.05 mL 抗原加入第2孔,混匀后吸取0.05 mL 加入第3孔,如此进行对倍稀释至第11孔,从第11孔吸取0.025 mL 弃之,换吸头。第12孔作为红细胞对照。
- 5.4 每孔均加入0.05 mL 0.5%(体积分数)鸡红细胞悬液(将鸡红细胞悬液充分摇匀后加入)。
- 5.5 轻轻混匀,室温(20℃~25℃)下静置20 min 后观察结果(如果环境温度太高,可置4℃环境下)。对照孔红细胞显著呈钮扣状时判定结果。
- 5.6 结果判定:将反应板倾斜45°,观察红细胞若没有呈泪滴状流淌,则判为 HA 阳性;完全血凝(不流淌)的病毒最高稀释倍数代表1个血凝单位(HAU)。

6 血凝抑制(HI)试验

6.1 操作步骤

- 6.1.1 血清样品的处理:待检血清样品需经“胰酶-加热-高碘酸盐方法”处理,以去除血清中非特异性

凝集抑制因子。其步骤为：先加 0.15 mL 胰酶溶液于 0.3 mL 血清中，在 56 ℃ 水浴灭活 30 min 后冷却至室温；加 0.9 mL 高碘酸钾，混合，室温孵育 15 min；加 0.9 mL 丙三醇盐溶液，混合，室温孵育 15 min；加 0.75 mL 生理盐水并混合，置 4 ℃ 保存备用。

6.1.2 根据 HA 试验中测定的 HI 抗原效价配制 4HAU 的抗原。HA 效价除以 4 即为含 4HAU 抗原的稀释倍数。例如，HA 效价 256，则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 64(256 除以 4)。

6.1.3 在微量反应板的 2~11 孔加入 0.025 mL PBS，第 12 孔加入 0.05 mL PBS。

6.1.4 吸取 0.05 mL 血清(待检血清、阳性血清及阴性血清)加入第 1 孔内，从中吸取 0.025 mL 于第 2 孔，充分混匀后吸 0.025 mL 于第 3 孔，依次对倍稀释至第 11 孔，从第 11 孔吸取 0.025 mL 弃去。

6.1.5 1~11 孔均加入含 4HAU 混匀的抗原 0.025 mL，第 12 孔作为红细胞对照。室温(20 ℃~25 ℃)下静置 10 min~30 min。

6.1.6 每孔加入 0.05 mL 0.5%(体积分数)的鸡红细胞悬液混匀，轻轻混匀，室温(20 ℃~25 ℃)下静置 10 min~30 min(若环境温度太高，可置 4 ℃ 条件下进行)，在红细胞对照孔呈钮扣状沉于孔底时即可判定结果。

6.2 结果判定

6.2.1 检测结果成立的条件：已知阳性血清与相应抗原反应后出现预期的 HI 效价，阴性血清与抗原反应 HI 结果为阴性；反之试验重新进行。

6.2.2 以完全抑制 4 个 HAU 抗原的血清最高稀释倍数作为 HI 效价。待检猪血清经过处理后已作 10 倍稀释，如果血凝抑制有一个孔发生抑制，此时血清的效价即为 1:10，判为阳性。

6.2.3 未经疫苗免疫的猪只经过 14 d 后再次采样，测定，如果第二次的抗体高于第一次 2 个滴度，判为该猪处于感染期。

7 注意事项

7.1 标准抗原稀释液浓度为 4 个 HAU，并且在每次试验前进行标定。

7.2 孵育时间要严格控制。红细胞对照完全沉淀时要迅速判读。在一些病毒株中可见红细胞从病毒中解脱，如果有这种情况的发生，要提前判定或置 4 ℃ 下孵育。

7.3 红细胞悬液始终符合标准。

7.4 反应试剂要按规定保存和使用。为避免反复冻融和细菌污染，应以无菌操作将试剂分装成小包装。

7.5 冻干的试剂应按照说明书中规定的体积重新溶解并保存。

附录 A
(资料性附录)
相关试剂的配制

A.1 0.01 mol/L pH 值 7.2 PBS

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.42 g
KH ₂ PO ₄	0.27 g
灭菌双蒸水	800 mL

NaOH 或者 HCl 调 pH(7.0~7.4),灭菌双蒸水加至 1 000 mL 定容,121 ℃ 高压灭菌 15 min 或过滤除菌。

A.2 胰酶溶液

胰酶(P-250)	200 mg
0.01 mol/L PBS	加至 25 mL

过滤除菌,分装保存于-20 ℃或-70 ℃,每 6 个月重新配制胰酶。

A.3 0.01 mol/L KIO₄ 溶液

KIO ₄	230 mg
0.01 mol/L PBS	加至 100 mL

过滤除菌,KIO₄ 溶液新鲜配制,在 1 周内使用。

A.4 1%丙三醇盐水

丙三醇	1 mL
0.01 mol/L PBS	99 mL

过滤除菌。

A.5 阿氏(Alsevers)液

葡萄糖	2.05 g
柠檬酸钠	0.8 g
柠檬酸	0.055 g
氯化钠	0.42 g
灭菌双蒸水	至 100 mL

NaOH 或者 HCl 调 pH 6.1

121 ℃ 高压灭菌 15 min,2 ℃~8 ℃ 保存备用。

A.6 0.5%鸡红细胞悬液

采集2~3只SPF公鸡或无禽流感和新城疫等抗体的健康公鸡的血液与等体积阿氏液混合,用PBS液洗涤3次,以3 000 r/min离心5 min,洗涤后用PBS配成0.5%(体积分数)红细胞悬液,2℃~8℃保存备用。

A.7 HI试验抗原和阴、阳性血清

抗原系用猪流感病毒接种SPF鸡胚,收获感染鸡胚液,用甲醛溶液灭活,经浓缩后,加适宜稳定剂,经冷冻真空干燥制成。用于HI试验,检测猪流感病毒的抗体。

阳性血清系用猪流感病毒灭活疫苗免疫SPF鸡,采血、分离血清,加适宜稳定剂,经冷冻真空干燥制成;阴性血清系采集SPF鸡血,分离血清,冻干制成。用于猪流感病毒HI试验,分别作为阳性与阴性对照。使用冻干的抗原和血清时均按瓶签上规格标注的量,用灭菌生理盐水溶解。
