

SZDB/Z

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 206-2016

H7N9 亚型禽流感病毒抗体血凝抑制试验检测方法

Protocol of Haemagglutination Inhibition Test for Detection of Avian
Influenza Virus Antibody Subtype H7N9

2016-11-15 发布

2016-12-01 实施

深圳市市场监督管理局 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 原理	1
4 术语与缩略语	1
5 仪器与试剂	1
6 生物安全要求	2
7 样品采集和处理	2
8 微量血凝（HA）试验测定抗原效价和回测抗原操作方法	2
9 微量血凝抑制（HI）试验	3
附录 A（规范性附录）常用试剂配制	5
附录 B（资料性附录）H7N9 血凝及血凝抑制试验结果记录表格	6

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准的附录A为规范性附录。

本标准由深圳市检验检疫科学研究院提出。

本标准起草单位：深圳市检验检疫科学研究院、深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心、江西出入境检验检疫局、珠海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：林庆燕、孙洁、廖立珊、秦智锋、杨俊兴、吕建强、唐金明、杨春华、罗宝正。

H7N9 亚型禽流感病毒抗体血凝抑制试验检测方法

1 范围

本标准规定了H7N9亚型禽流感病毒抗体血凝抑制试验的操作规程和技术要求。
本标准适用于H7N9亚型禽流感病毒抗体检测、监测和流行病学调查。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB/T 18936 高致病性禽流感诊断技术

GB 19442 高致病性禽流感防治技术规范

3 原理

血凝抑制（HI）试验的原理是禽流感病毒表面具有的血凝素蛋白能和红细胞浆膜上的唾液酸受体物质特异结合，当一定量病毒和适当比例的红细胞混合后发生凝集，此为血凝（HA）现象。而用禽流感病毒特异性抗体和病毒作用，干扰了病毒和红细胞的结合从而抑制了血凝，此为血凝抑制（HI）现象。本标准通过HA-HI试验，用已知的H7N9亚型禽流感病毒来检查被检血清中的相应的H7N9亚型禽流感病毒抗体和滴定相应的H7N9亚型禽流感病毒抗体的含量。

4 术语与缩略语

下列术语与缩略语适用于本文件。

AIV: avian influenza virus, 禽流感病毒。

HA: haemagglutination, 血凝。

HAU: haemagglutination unit, 凝集单位。

HI: haemagglutination inhibition, 血凝抑制。

PBS: pH7.2, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液。

5 仪器与试剂

5.1 仪器与材料

主要的仪器与材料如下：

a) 台式冷冻离心机；

b) 96孔V形微量反应板；

- c) 微型振荡器;
- d) 冰箱 (2℃~8℃, -20℃, -80℃);
- e) 单通道可调微量移液器 (10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL) 及相应滴头;
- f) 多通道可调微量移液器 (10 μL~100 μL) 及相应滴头;
- g) 45°倾斜的白色判读板。

5.2 试剂

5.2.1 试剂级别

除另有规定, 本方法试验用水应符合GB/T 6682规定的一级水, 所用化学试剂均为分析纯。

5.2.2 标准抗原及标准阴、阳性血清

禽流感病毒H7N9亚型血凝抑制抗原、禽流感病毒H7亚型 (H7N9株) 阳性血清和阴性血清由哈尔滨兽医研究所提供。置-20℃或更低温度冻存。使用时取适量配制成工作液, 避免多次冻融。

5.2.3 其它试剂

- a) 0.01 mol/L PBS (pH 7.2~7.4, 配制方法见附录A);
- b) 阿氏液 (Alsever's液) (配制方法见附录A);
- c) 1%鸡红细胞悬液 (配制方法见附录A)。

6 生物安全要求

样品采集、样品处理及检测过程所涉及的实验操作, 应参照GB 19489的规定进行。

7 样品采集和处理

7.1 样品采集

7.1.1 一般要求

样品的采集、保存及运输应符合GB/T 18088、GB/T 18936和GB 19442的相关要求。

7.1.2 样品采集和处理

按照常规方法采集全血样品, 常温下放置4 h让血清自然析出, 并将血清于台式冷冻离心机上1000 g离心5 min, 直接取上层血清进行检测或保存。非鸡禽类血清, 应进行红细胞吸附试验以去除非特异性凝集。具体方法为: 向0.5 mL血清中加入25 μL鸡红细胞泥 (配制方法附录A), 轻轻震荡混匀, 室温 (20℃~25℃) 静置30 min, 1000 g离心5 min, 吸取上清用于检测或保存。

7.2 样品的保存和运输

样品的运送按照《出入境动物检疫采样》(GB/T 18088) 进行。处理后的血清可立即用于检测, 若不能立即检测, 可于2℃~8℃冰箱中暂时存放不超过三天; -20℃保存不超过三个月; -80℃以下可长期保存。样品应置于低温、密封的容器内运输。

8 微量血凝 (HA) 试验测定抗原效价和回测抗原操作方法

8.1 微量血凝 (HA) 试验

微量血凝 (HA) 试验方案按表1进行。

表1 微量血凝 (HA) 试验

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原血凝效价	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	
PBS (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
抗原 (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	弃 25
PBS (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1%鸡红细胞(μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
反应温度及时间	室温 (20℃~25℃), 反应40 min											
结果判定												

8.2 操作步骤

微量血凝试验按以下步骤进行:

- 常向96孔V形微量反应板中加入PBS, 25 μL/孔。
- 吸取禽流感病毒H7亚型血凝抑制抗原加入第1列孔, 25 μL/孔, 倍比稀释至第11列孔, 再从第11列孔各吸取25 μL弃之。第12列孔作为空白对照。
- 向V形微量反应板中加入PBS, 25 μL/孔。
- 向V形微量反应板中加入1%鸡红细胞悬液, 25 μL/孔, 置微量振荡器上振荡约15 s。
- 置室温 (20℃~25℃) 反应40 min后观察结果。

8.3 HA 结果判读

将V型反应板置于45° 倾斜的白色判读板上, 30 s后开始判读, 并在60 s内判读完毕。空白对照孔红细胞呈现明显的泪珠状流淌表明试验有效。红细胞完全凝集孔 (无泪珠状流淌) 的抗原最高稀释倍数为该抗原的HA效价, 代表1个凝集单位 (1HAU)。

8.4 4HAU 抗原的配制

4HAU抗原的配制按以下步骤进行:

- 根据8.3的试验结果, 配制4HAU禽流感病毒抗原工作液。计算出含4个HAU的抗原浓度, 将HA效价除以4即为配制4HAU抗原工作液应稀释的倍数。
- 取配制的4HAU抗原工作液25 μL, 用PBS作倍比稀释, 使每孔含有2HAU、1HAU、0.5HAU 和 0.25HAU, 每孔补加25 μL PBS, 再加1%鸡红细胞悬液, 25 μL/孔, 室温 (20℃~25℃) 反应 40 min;
- 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4HAU抗原使用液, 测定HA效价, 至相符为止。

9 微量血凝抑制 (HI) 试验

9.1 微量血凝抑制 (HI) 试验

微量血凝抑制 (HI) 试验方案按表2进行。

表2 微量血凝抑制 (HI) 试验

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血清HI效价	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	
PBS (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
血清 (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	弃 25
4HAU抗原	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
反应温度及时间	室温 (20℃~25℃) 反应 30 min											
1%鸡红细胞 (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
反应温度及时间	室温 (20℃~25℃) 反应 40 min											
结果判定												

9.2 操作步骤

微量血凝抑制试验按以下步骤进行：

- 向96孔V形微量反应板加入PBS，25 μL/孔；
- 取被检血清25 μL于第1列孔中，混匀后吸取25 μL加入第2列孔，依次倍比稀释至第11列孔，弃去25 μL，第12列孔作为抗原对照；
- 加入4HAU抗原工作液，25 μL/孔，置微量振荡器上振荡约15 s；
- 每次检测时应设已知滴度的禽流感病毒H7亚型阳性血清对照、阴性血清对照和红细胞对照（即只含有25 μL 1%红细胞和50 μL PBS）；
- 置室温（20℃~25℃）反应30 min；
- 加入1%鸡红细胞悬液，25 μL/孔，置微量振荡器上振荡约15s；
- 室温（20℃~25℃）反应 40 min。

9.3 结果判定

结果判定按以下步骤进行：

- 将V型反应板置于45°倾斜的白色判读板上，30 s后开始判读，并在60 s内判读完毕；
- 检查各个对照。抗原对照孔出现红细胞完全凝集，且阴性血清HI效价不大于2²，阳性血清HI效价误差不超过1个滴度，红细胞对照孔无凝集现象，呈现明显的泪珠状流淌，表明试验有效；
- 以完全抑制4HAU抗原的血清最高稀释倍数作为HI效价。HI效价大于或等于2⁵为阳性，HI效价小于2⁴为阴性，HI效价等于2⁴为可疑，需重复试验，重复试验结果仍为2⁴，判为阳性；
- HI试验结果记录：将对应血清HI效价记录在血清HI效价记录表（附录B）中。

附录 A
(规范性附录)
常用试剂配制

A.1 0.01mol/L PBS (pH7.2~7.4)

磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.58 g
磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.39 g
氯化钠 (NaCl)	8.5 g

加三蒸去离子水800mL, 完全溶解后用HCl 调节溶液pH至7.2, 最后加三蒸去离子水定容至1000 mL。经121℃, 15min高压灭菌, 保存于室温或4℃冰箱中备用。

A.2 阿氏液 (Alsever's液)

氯化钠 (NaCl)	4.2 g
柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8.0 g
柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	0.55 g
葡萄糖 ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	20.5 g

加三蒸去离子水800 mL, 完全溶解后用1 mol/L NaOH或1 mol/L HCL调节溶液pH至6.1, 最后加三蒸去离子水定容至1000 mL。用孔径为0.22 μm 的滤膜进行过滤除菌。保存于4℃ 备用。

A.3 鸡红细胞泥和 1% 鸡红细胞悬液

采集至少3只未免疫H7亚型禽流感疫苗的成年鸡或无禽流感、新城疫等血凝抑制抗体的成年鸡静脉血液与等体积阿氏液混合摇匀, 加入适量PBS, 充分混匀, 1000 g离心5 min, 吸出含有血浆、白细胞的上清, 重复3~5次至充分除去血浆和白细胞, 吸去所有上清后, 得到的沉淀为鸡红细胞泥。用PBS将鸡红细胞泥配制成含1%鸡红细胞泥的悬液, 即1%的鸡红细胞悬液。

附录B

(资料性附录)

H7N9血凝及血凝抑制试验结果记录表格

表B.1 抗原HA效价记录表

日期												板号	
抗原 编号	抗原 HA 效价												
	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	

表B.2 血清HI效价记录表

日期												板号	
样品 编号	血清 HI 效价												
	2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	2 ¹¹	