

团 体 标 准

T/CVMA 284—2025

牛流感病毒抗体血凝抑制试验检测方法

Hemagglutination inhibition test for detection of antibody against
bovine influenza

2025 - 8 - 13 发布

2025 - 8 - 13 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA
全国团体

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国动物疫病预防控制中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、广东省农业科学院农业生物基因研究中心、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、北京中科基因技术股份有限公司。

本文件主要起草人：刘颖昞、徐琦、李琦、王传彬、顾小雪、毕一鸣、苗清新、余界石、邓国华、原霖、司国辉、周智、倪建强、亢文华、刘玉良、孙雨、赵柏林、李晓霞、汪葆玥、王睿男、胡冬梅、刘琳、王胜华、于宁卫、张媛、邢蕊文、徐超。

中国兽医协会
CVMA
全国团体

牛流感病毒抗体血凝抑制试验检测方法

1 范围

本文件规定了牛流感病毒抗体血凝抑制试验的技术要求。
本文件适用于牛流感病毒抗体的检测。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

血凝 Hemagglutination, HA

流感病毒颗粒表面的血凝素蛋白，具有识别红细胞表面受体并使红细胞凝集的特性。可通过观察红细胞凝集现象，判定病毒效价。

3.2

血凝抑制 Hemagglutination inhibition, HI

抗体特异性结合HA分子的抗原位点，干扰流感病毒血凝素蛋白与红细胞受体之间的结合，抑制流感病毒血凝素蛋白凝集红细胞的能力。

3.3

受体破坏酶 Receptor Damage Enzyme, RDE

别名神经氨酸苷酶，可破坏红细胞表面与病毒结合的受体，用于降低哺乳动物血清与红细胞表面受体的非特异性结合，减少被检血清中包含的非特异性红细胞凝集抑制物质的影响。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HA：血凝（Hemagglutination）

HAU：血凝单位（Hemagglutination unit）

HI：血凝抑制（Hemagglutination Inhibition）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate buffer saline）

RDE（II）：II型受体破坏酶（Receptor Damage Enzyme）

5 设备和材料

- 5.1 可控温水浴锅（37 °C、56 °C）。
- 5.2 计时器。
- 5.3 微量移液器（量程为2 μL ~ 20 μL、20 μL ~ 200 μL和200 μL ~ 1000 μL）。
- 5.4 1.5 mL 离心管。
- 5.5 96 孔血凝板（V型，90°，以下简称为血凝板）。

6 试剂

- 6.1 阿氏液（Alsever's Solution），按照附录A中A.1配置。
- 6.2 压积鸡红细胞和1%（体积分数）鸡红细胞悬液，按照附录A.2配置。
- 6.3 PBS（0.01 mol/L，pH 7.2），按照附录A.3配置。
- 6.4 受体破坏酶，RDE（II），购买商品化试剂，按说明书使用。
- 6.5 分离培养所得的流感病毒血凝素分型标准抗原，或采用商品化试剂。
- 6.6 禽流感抗体阳性血清（禽流感抗体阳性的动物血清，可为其他物种的血清，如鸡血清）。
- 6.7 禽流感抗体阴性血清（禽流感抗体阴性的动物血清，可为其他物种的血清，如鸡血清）。

7 血凝抑制试验（HI）

7.1 样品前处理

7.1.1 鸡红细胞吸附去除特异性凝集素

使用PBS将牛血清稀释5倍（体积分数）。将压积鸡红细胞按1:10的比例（体积分数）加入稀释后的牛血清。例如：20 μL待测牛血清在离心管中稀释至100 μL，加入10 μL压积红细胞。轻轻颠倒混匀，在4 °C下孵育15 min进行吸附；轻轻颠倒混匀，在4 °C下再次孵育15 min。以2000 r/min转速在4 °C下离心5 min，使鸡红细胞沉淀。小心吸取上层血清。

注：若样品无非特异性吸附，可不使用鸡红细胞预吸附去除非特异性凝集素。非特异性凝集检测的方法请参考附录B。

7.1.2 RDE处理去除非特异性病毒抑制

将RDE按说明书配制至工作浓度，在按7.1.1处理后的牛血清中，加入4倍体积的工作浓度的RDE。示例：在7.1.1中，将20 μL待测牛血清在离心管中稀释至100 μL进行红细胞吸附，离心后得到吸附后的血清中，含原始血清20 μL，则应加入80 μL RDE。

在37 °C下，将RDE与牛血清的混合溶液孵育18 h ~ 20 h。将血清样本在56 °C水浴中加热30 min，使RDE灭活。加入适量PBS，使牛血清的最终稀释度达到1:10。RDE处理后的血清可在4 °C下储存过夜，如果需要更长时间的储存，需冷冻保存在-20 °C或更低的温度下。

7.2 HA 试验操作步骤

7.2.1 使用微量移液器在 96 孔血凝板 A 行的第 1 孔 ~ 第 12 孔加入 25 μL PBS, 并依次标记为 A1 孔 ~ A12 孔。

7.2.2 吸取流感病毒血凝素分型标准抗原溶液轻轻涡旋, 混合均匀, 向 A1 孔中加入 25 μL 待测病毒抗原。

7.2.3 从 A1 孔中吸取 25 μL 病毒液, 从 A1 孔连续转移至 A11 孔, 进行 2 倍梯度稀释。从 A11 孔中弃去 25 μL , A12 孔作为 PBS 对照。

7.2.4 每孔加 25 μL PBS。

7.2.5 吸取 25 μL 1.0% (体积分数) 鸡红细胞悬液, 添加至板上 A 行的所有孔中。轻扣血凝板混合反应物, 室温 (20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$) 静置 30 min, 环境温度高于 30 $^{\circ}\text{C}$ 时, 可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 60 min, 当对照孔的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

7.2.6 结果判定时, 将血凝板倾斜 45 $^{\circ}$, 观察红细胞有无泪珠状流淌, 完全无泪珠状流淌 (100% 凝集) 表明该抗原稀释度可导致红细胞发生完全血凝, 导致完全血凝的病毒最高稀释度即 HA 效价。例如, 当第 8 个孔的红细胞发生完全血凝, HA 效价为 2 8 , 即 1: 256。

7.3 HI 试验操作步骤

7.3.1 根据 HA 试验测定的效价配制 4 个凝集单位 (即 4HAU) 的抗原/病毒, 示例: 抗原/病毒溶液的 HA 效价为 2 8 , 将病毒/抗原进行 1: 256 稀释即为 1HAU, 4HAU 则为将病毒/抗原溶液进行 1: 64 稀释。

7.3.2 回滴检查。配制的 4HAU 抗原需经回滴检查血凝效价是否准确, 将配制的 4HAU 抗原进行稀释, 使最终稀释度为 1: 2、1: 3、1: 4、1: 5、1: 6 和 1: 7。取各个稀释度的 4HAU 抗原溶液 25 μL , 加入 PBS 25 μL , 再加入 1.0% 鸡红细胞悬液 25 μL 混匀。将血凝板在室温 (20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$) 静置 30 min 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 如果配制的抗原液为 4HAU, 则 1: 4 稀释度将出现凝集终点; 如果高于 4HAU, 可能 1: 5 或 1: 6 为终点; 如果低于 4HAU, 可能 1: 2 或 1: 3 为终点。4HAU 抗原应根据回滴检测结果调整准确。

7.3.3 在血凝板的第 2 孔 ~ 第 11 孔加入 25 μL PBS, 第 12 孔加入 50 μL PBS。

7.3.4 第 1 孔加入 50 μL 经 7.1 前处理后的血清, 从第 1 孔中吸取 25 μL 血清, 从第 1 孔连续转移至第 10 孔, 进行 2 倍梯度稀释。从 10 号孔中弃去 25 μL , 第 11 孔为抗原对照, 第 12 孔为 PBS 空白对照。

7.3.5 第 1 孔 ~ 第 11 孔均加入 25 μL 4HAU 抗原, 在室温 (20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$) 静置 30 min 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 60 min。

7.3.6 每孔加入 25 μL 1.0% (体积分数) 鸡红细胞悬液, 震荡混匀, 在室温 (20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$) 静置 30 min 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 60 min。空白对照孔 (第 12 孔) 红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

7.4 结果判定

7.4.1 结果成立的条件

将血凝板倾斜 45 $^{\circ}$, 当抗原对照 (第 11 孔) 完全凝集, 且已知禽流感抗体阳性血清与抗原反应后, 出现预期的 HI 效价, 阴性血清与抗原反应为 HI 结果阴性, 结果方可成立。

7.4.1 HI 效价结果判定

以红细胞完全凝集的最后1孔，即完全抑制4HAU抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的HI效价。第1孔待检牛血清经过处理后，稀释度为1: 10，如果有1个孔发生完全抑制，此时血清的效价即为1: 10；如果第2个孔发生完全抑制，此时血清的效价即为1: 20。当血清效价 \geq 1: 20，则判为阳性。

注：如果实验孔的红细胞出现凝集点，伴有不规则边缘，并呈现不流淌状态，判定为非特异性凝集，建议样品重新前处理后再次检测。

8 注意事项

- 8.1 1%（体积分数）的红细胞悬液可能存在批次间差异。
- 8.2 冻干试剂应按照说明书规定重新溶解和保存。
- 8.3 抗原溶液、红细胞悬液、RDE等均应在试验时重新配制。

附录 A
(规范性)
试剂的配制

A.1 阿氏液

称取葡萄糖 2.05 g、柠檬酸钠 0.8 g、柠檬酸 0.055 g、氯化钠 0.420 g，加蒸馏水至 100 mL，散热溶解后调 pH 值至 6.1，在 69 kPa 和 115 °C 下高压灭菌 15 min，4 °C 保存备用。

A.2 1% 鸡红细胞悬液

采集至少三只成年 SPF 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，加入适量 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2)，轻轻颠倒混匀，以 1000 r/min (相当于 100 g ~ 200 g) 离心 10 min，洗涤 3 次，最后一次离心后得到压积红细胞。用 PBS 配成 1% (体积分数) 红细胞悬液，4 °C 保存备用。

A.3 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 的配制

称量 1.42 g 磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)，0.27 g 磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)，和 8.0 g 氯化钠 (NaCl)，加蒸馏水溶解，最后定容至 1000 mL。调整 pH 至 7.2，121 °C 灭菌 15 min，PBS 一经使用，于 4 °C 保存不应超过 3 周。

附录 B

(资料性)

牛血清非特异性凝集素检测方法

B.1 牛血清非特异性凝集素

有些牛血清可能对鸡红细胞产生非特异性凝集，可先用待检血清按B.2检测，如果待检血清出现红细胞凝集现象，则说明有非特异凝集因子存在，宜按7.1.1的方法，用鸡红细胞对待检血清进行预吸附。

B.2 牛血清非特异性凝集素的检测方法

B.2.1 将 25 μL PBS 加入血凝板的第 2 孔至第 11 孔。

B.2.2 向第 1 孔中加入 50 μL 预稀释 10 倍的待检牛血清。从第 1 孔吸取 25 μL 血清加入第 2 孔，从第 2 孔连续转移至第 11 孔，进行 2 倍梯度稀释。从第 11 孔中，弃去 25 μL 。

B.2.3 向第 1 孔至第 11 孔中加入 25 μL PBS，使各孔的总体积为 50 μL ，轻轻拍打平板，确保血清与 PBS 混合，第 12 孔加入 50 μL PBS 作为鸡红细胞对照。

B.2.4 向所有孔中加入 50 μL 1.0 %的鸡红细胞悬液。轻扣血凝板使之混合。

B.2.5 在室温（20 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ ）下孵育 30 min，使红细胞沉降，当对照孔的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

B.2.6 将血凝板倾斜 45 $^{\circ}$ ，观察红细胞有无泪珠状流淌，然后记录出现红细胞凝集的样本。血清稀释度为 1: 20 或更高的孔中出现鸡红细胞凝集的血清样本需进行鸡红细胞预吸附。如果仅在第一个孔（血清稀释度为 1: 10）中观察到凝集，则无需使用鸡红细胞进行吸附。

参考文献

- [1] GB/T 18936-2025 禽流感诊断技术
 - [2] GB/T 27535-2011 猪流感HI抗体检测方法
 - [3] WOAH Terrestrial Manual 2023, CHAPTER 3.9.7 INFLUENZA A VIRUSES OF SWINE
-

中国兽医协会
CVMA