

团 体 标 准

T/CVMA X2—2019

鸭坦布苏病毒抗体血凝抑制检测方法

**Hemagglutination - inhibition detection method for the antibody
against duck Tembusu virus**

2019- XX-XX 发布

2019 - XX -XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

目 次

前 言.....	I
引 言.....	II
1 范围	1
2 规范性引用文件.....	1
3 缩略语.....	1
4 试剂和材料.....	1
5 器材和设备.....	2
6 血清样本的处理.....	2
7 操作步骤.....	3
附录 A（规范性附录）鸭坦布苏病毒血凝抑制试验抗原的制备.....	5
附录 B（规范性附录）试剂配制.....	6

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准部分条款涉及专利的使用。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：北京市农林科学院，中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人：林健、王小蕾、杨志远、杨承槐、段会娟、赵际成、刘立新、潘洁、程慧敏、侯力丹、刘月焕

中国兽医协会
CVMA

引 言

鸭坦布苏病毒病是由鸭坦布苏病毒（DTMUV）引起的鸭生殖、免疫和神经系统等多脏器损伤的急性传染病，以产蛋骤然大幅下降和雏鸭出现神经症状和死亡为主要临床特征，死亡率达到 20%。该病 2010 年起在福建、浙江、江苏、山东、河北和北京等主要蛋鸭养殖区大面积流行，已成为一种常见性疫病，给鸭产业造成了巨大的经济损失。检测诊断是疫病防制的基础，研发准确、快捷的鸭坦布苏病毒病检测试剂，对当前防控鸭坦布苏病毒病具有重要意义。鸭坦布苏病毒属于黄病毒属，现阶段国际上通用的黄病毒属血清学检测方法有酶联免疫吸附试验(ELISA)、琼脂扩散实验(AGP)、血凝抑制试验(HI)、补体结合实验(CFT)和中和试验(NT)等。其中，HI 方法具有敏感、简便的优点，在定性的同时也可以定量检测，并且不需要特殊仪器设备，更适合基层应用。本研究通过暴露病毒粒子血凝特性工艺的研究，制备了鸭坦布苏病毒 HI 试验抗原，并建立了鸭坦布苏病毒抗体 HI 检测方法，该方法敏感、特异，易于操作，能快速定量检测鸭坦布苏病毒抗体水平。

目前鸭坦布苏病毒病的检测技术尚无标准可循。制定该病的检测技术标准，将有助于保障养鸭业健康发展，预防该病的传播与危害，提高对该病的检测技术。

本文件的发布机构提请注意，申明符合本文件时，可能涉及到 4.1、7 与抗原制备及检测操作方法相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证，他愿意在公平、合理、无歧视基础上，免费许可任何组织或者个人在实施该标准时实施专利。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人：北京市农林科学院

联系人：刘月焕

地址：北京市海淀区曙光花园中路 9 号 北京市农林科学院 邮编：100097

请注意除上述专利外，本文件的某些内容能够仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

鸭坦布苏病毒血凝抑制抗体检测方法

1 范围

本标准规定了鸭坦布苏病毒（Duck Tembusu virus, DTMOV）抗体血凝抑制检测方法。
本标准适用于鸭和鹅等水禽鸭坦布苏病毒抗体的检测。

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。凡标注日期的引用文件，仅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 19489-2008 实验室生物安全通用要求

NY/T 1948-2010 兽医实验室生物安全要求通则

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DTMOV: 鸭坦布苏病毒 (Duck Tembusu virus)

HA: 血凝反应 (Hemagglutination)

HI: 血凝抑制 (Hemagglutination-Inhibition)

HAU: 血凝单位 (Hemagglutination Unit)

rpm: 转数/分钟 (Revolutions per Minute)

BABS: 牛血清白蛋白硼酸氯化钠溶液 (Bovine Serum Albumin Boric Acid Sodium Chloride Solution)

PBS: 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline)

4 试剂和材料

4.1 鸭坦布苏病毒血凝抑制试验抗原: 见附录 A。

4.2 标准阳性血清: 鸭坦布苏病毒 HB 株接种 1~4 月龄健康鸭制备, 血凝抑制试验检测鸭坦布苏病毒抗体效价 $\geq 1:80$ 。

4.3 标准阴性血清: 1~4 月龄未免疫健康鸭血清, 血凝抑制试验检测鸭坦布苏病毒抗体为阴性。

4.4 鹅红细胞悬液: 见附录 B 中的 B.1。

4.5 0.33%工作浓度的鹅红细胞悬液: 见 B.2。

4.6 10%工作浓度的鹅红细胞悬液: 见 B.3。

- 4.7 阿氏液：见 B.4。
- 4.8 PBS 缓冲液（0.01M，pH 7.2）：见 B.5。
- 4.9 VAD 溶液：见 B.6。
- 4.10 硼酸氯化钠溶液：见 B.7。
- 4.11 BABS 溶液：见 B.8。
- 4.12 25%白陶土悬浊液：见 B.9。

5 器材和设备

- 恒温培养箱：37℃±1℃；
- 冰箱：2℃~8℃；
- 低速离心机；
- 微量板振荡器；
- 单道和多道微量移液器及吸头：10μL~100 μL；
- 离心管：1.5 mL、15mL；
- 96 孔 U 型微量板；
- 湿盒：塑料保鲜盒或铝制饭盒，内置湿纱布。

6 血清样本的处理

6.1 血清样本的存放与运送

血清样本若在一周内检测，可置 2℃~8℃条件下保存。若超过一周检测，应置-20℃以下冷冻保存，但应避免反复冻融。采集的血清样本可用冰袋或保温桶加冰密封等方式运输，确保样品有效。运输时间应尽量缩短。

6.2 检测前血清样本的处理

- 6.2.1 100 μL 血清加入 400 μL 25% 白陶土悬浊液。
- 6.2.2 剧烈震荡血清-白陶土混合物，每 5 分钟震荡一次，共 20 分钟。
- 6.2.3 室温下 1000 g 离心 20 分钟。
- 6.2.4 加入 100 μL 10% 鹅红细胞悬液。
- 6.2.5 每隔 5 分钟轻轻摇动上层清液，使红细胞保持悬浮状态，共 20 分钟。
- 6.2.6 室温下 800 g 离心 10 分钟，红细胞沉积于白陶土上层。
- 6.2.7 将上清液移入新管中，此液体视为 1:5 稀释的待检血清。

7 操作步骤

7.1 鸭坦布苏病毒血凝抑制试验抗原 HA 效价测定：鸭坦布苏病毒血凝抑制试验冻干抗原样品加入 1 mL BABS 复原，待抗原完全融化成澄清液体后，进行 HA 效价测定。采用 96 孔 U 型微量板进行试验，反应总体积为 100 μ L。从第 1 孔至第 12 孔，用移液器每孔加入 BABS 50 μ L，用移液器吸取被检样品 50 μ L，从第 1 孔起，依次作 2 倍系列稀释，至第 11 孔，弃去移液器内 50 μ L 液体，第 12 孔为不加样的红细胞对照孔，然后每孔加入 0.33% 的鹅红细胞。立即在微量板振摇器上摇匀，放入湿盒，置 37 $^{\circ}$ C 作用 60 分钟，观察凝集反应。具体操作方法见表 1。结果判定方法：微量板水平放置，当对照孔中的红细胞呈显著钮扣状时判定结果。以使红细胞完全凝集的最高稀释度作为判定终点。

表1 HA效价测定操作术式

单位： μ l

孔数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	红细胞对照
稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
稀释液	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
抗原	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	弃去 /
0.33%红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

7.2 4HAU 工作抗原液的制备：根据测定的血凝抑制试验抗原的 HA 效价，用 BABS 配制 4 个血凝单位（4 HAU）的抗原。血凝效价除以 8 为抗原的预稀释倍数。举例如下：抗原的 HA 效价为 1:128，稀释倍数为 128/8=16，16 倍稀释，即 1 mL 的抗原液加入 15 mL BABS 进行稀释。抗原配制完成应重新进行标定。

7.3 HI 试验：应用 96 孔 U 型微量板进行试验，反应总体积为 100 μ L。按表 2，用 BABS 将血清（待检血清处理方法见 6.2）作 2 倍系列稀释，加入 25 μ L 4HAU 工作抗原，充分振摇后，置于湿盒内 2~8 $^{\circ}$ C 过夜。取出恢复至室温后，加入 0.33% 的鹅红细胞悬液，混匀，放入湿盒，置 37 $^{\circ}$ C 作用 60 分钟，观察凝集反应。试验设阴、阳性血清对照、处理后的血清样品对照及红细胞对照。

7.4 HI 试验成立条件：微量板水平放置，当对照孔中的红细胞呈显著钮扣状时判定结果，阳性对照血清以凝集图形与红细胞对照孔一致（即红细胞呈显著钮扣状）的血清最高稀释度为判定终点，阴性对照血清孔红细胞应完全凝集。当对照阴、阳性血清的 HI 效价与已知效价相差不超过 1 个滴度时，试验结果成立。

7.5 结果判定：微量板水平放置，以待检血清凝集图形与红细胞对照孔一致（即红细胞呈显著钮扣状）的血清最高稀释度作为判定终点；如果待检血清孔红细胞完全凝集，则判为 HI 效价 < 1:5。待检血清的 HI 抗体效价 < 1:10 判为阴性，HI 抗体效价 = 1:10 判为可疑，HI 抗体效价 \geq 1:20 判为阳性。

表2 HI试验操作术式

单位: μl

孔数	1	2	3	4	5	6	7	8...	红细胞 对照	血清 对照
稀释倍数	5	10	20	40	80	160	320	640		
稀释液	/	25	25	25	25	25	25	25	50	25
被检血清	50	25	25	25	25	25	25	25	/	25
4HAU抗原	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/
0.33%红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

中国兽医协会
CVMA

附录 A

(规范性附录)

鸭坦布苏病毒血凝抑制试验抗原的制备

A.1 材料

鸭坦布苏病毒 HB 株：由北京市农林科学院畜牧兽医研究所分离、鉴定和保存；

1~3 日龄 BALB/c 乳鼠：购买 SPF 级成年 BALB/c 鼠后繁殖；

丙酮、甲醛、明胶、蔗糖：均为分析纯的商品化试剂；

PBS 缓冲液 (0.01M, pH 7.2)：见 B.5。

A.2 方法

A.2.1 接种及收获：鸭坦布苏病毒 HB 株 (DTMUV-HB 株) 脑内接种 BALB/c 乳鼠，接种后 6 日收获存活乳鼠。无菌操作收集感染脑组织，匀浆，称重。

A.2.2 提纯：按照 W/V=1:4 的比例向脑组织匀浆中加入 8.5% 的无菌蔗糖溶液，混匀。在搅动状态下，将匀浆逐滴加入匀浆量 20 倍体积的冷丙酮中。500 g 离心 5 分钟，弃去上清液，将沉淀物用与上述相同量的冷丙酮悬浮，冰浴至少 1 小时。500 g 离心 5 分钟，弃去上清液。将沉淀物收集到无菌试管内，500 g 离心 5 分钟，弃去上清液，将沉淀物分装在干燥管内，-70℃ 冷冻过夜。

A.2.3 提纯产物冻干：提取物真空冷冻干燥 6 小时 ($\leq -80^{\circ}\text{C}$)。

A.2.4 水化：按照原匀浆量 V/V=1:1.2 的比例，加入无菌 PBS 缓冲液，充分溶解冻干产物 12~24 小时。8000g 离心 1 小时，取上清。

A.2.5 灭活：水化产物加入适宜浓度的甲醛灭活，颠倒混匀后，4℃ 静置 72 小时。

A.2.6 成品冻干：灭活后的水化产物按抗原与保护剂 7: 1 的比例加入由蔗糖、明胶配制的冻干保护剂，按照预设的冻干曲线真空冷冻制成冻干固态抗原。

A.3 生物安全操作及处理

实验过程中的生物安全要求应严格按照 GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求、NY/T 1948-2010 兽医实验室生物安全要求通则的规定进行操作。

附录 B
(规范性附录)
试剂配制

B.1 鹅红细胞悬液的配制

健康 2~36 月龄鹅 2~4 只，翅静脉采血，按 1:1 加入阿氏液抗凝。1500 rpm 离心 5 分钟，去除阿氏液及白细胞。用 PBS 缓冲液洗涤红细胞 2 次，每次 1500 rpm 离心 10 分钟，弃上清，加入浓红细胞体积 10 倍以上的 PBS 摇匀，2~8℃ 静置存放，保存时间不超过 10 天。

B.2 0.33%工作浓度的鹅红细胞悬液的配制

静置存放的鹅红细胞悬液使用前弃去上清，重新加入 PBS 摇匀，以 1500rpm 离心 15 分钟，用 VAD 溶液配制成 0.33%浓度的红细胞悬液。2~8℃ 存放，保存时间不超过 48 小时。

B.3 10%工作浓度的鹅红细胞悬液的配制

静置存放的鹅红细胞悬液使用前弃去上清，重新加入 PBS 摇匀，以 1500rpm 离心 15 分钟，用 PBS 缓冲液配制成 10%红细胞悬液，2~8℃ 存放。保存时间不超过 48 小时。

B.4 阿氏液的配制

称取 2.05g 葡萄糖，0.8g 柠檬酸钠，0.055g 柠檬酸，0.42g NaCl，加去离子水至 100 mL，调整 pH 值至 6.1，115℃ 灭菌 30 分钟。2~8℃ 保存。

B.5 PBS 缓冲液 (0.01M, pH 7.2) 的配制

称取 8.0 g NaCl，0.2 g KCl，2.89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，0.2 g KH_2PO_4 ，加入去离子水至 1000 mL，溶解后调 pH 值，120℃ 灭菌 30 分钟。2~8℃ 保存。

B.6 VAD 溶液的配制

称取 8.77 g NaCl，11.1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，24.96 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，加入去离子水至 1000 mL，2~8℃ 保存。该溶液与等量 BABS 混合后 pH 值为 6.2。

B.7 硼酸氯化钠溶液的配制

称取 8.77 g NaCl, 4.42 g H₃BO₃, 0.96 g NaOH, 加入去离子水至 1000 mL, 调整 pH 值为 9.0, 2~8℃ 保存。

B.8 BABS 溶液的配制

称取 0.1 g 牛血清白蛋白 V, 加入硼酸氯化钠溶液至 100 mL。

B.9 25% 白陶土悬浊液的配制

称取 25 g 白陶土, 加入 100 mL 硼酸氯化钠溶液。白陶土购自 Acros 公司。用前摇匀。

中国兽医协会
CVMA