



中华人民共和国国家标准

GB/T 34739—2017

动物狂犬病病毒中和抗体检测技术

Detecting technique of neutralization antibody against rabies virus in animals

2017-11-01 发布

2018-05-01 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。

本标准参考世界动物卫生组织(OIE)2013 年版《国际陆生动物卫生法典》2.1.13 狂犬病的相关内容。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所。

本标准主要起草人:扈荣良、张守峰、刘晔、张菲。



动物狂犬病病毒中和抗体检测技术

1 范围

本标准规定了用于动物狂犬病血清中和抗体定量测定的荧光抗体病毒中和试验(FAVN)的血清样品采集、实验操作方法及结果判定。

本标准适用于动物个体狂犬病免疫效果的定量测定、群体免疫覆盖率监测及狂犬病流行风险评估。

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—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489—2008 实验室 生物安全通用要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ATV:抗生素-胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(Antibiotic-Trypsin-Versene)

BHK-21:乳仓鼠肾细胞系(Baby Hamster Kidney-21)

BSL-2:生物安全 2 级实验室(Biosafety Laboratory Level 2)

CVS:狂犬病标准攻击毒株(Challenge Virus Standard)

FAVN:荧光抗体病毒中和试验(Fluorescent Antibody Virus Neutralization Test)

FITC:异硫氰酸荧光黄(Fluorescein Isothiocyanate)

MEM:细胞基础培养基(Eagle's Minimum Essential Medium)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate-Buffered Saline)

TCID₅₀:半数细胞感染量(Median Tissue Culture Infective Dose)

4 试剂和材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.1 水:GB/T 6682—2008,二级水。

4.2 商品化的狂犬病阴性标准犬血清。

4.3 商品化的狂犬病阳性标准犬血清,用前稀释至 0.5 IU/mL。

4.4 FITC 标记的抗狂犬病病毒抗体,用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4, 见 A.1)稀释成工作液,现用现配。

4.5 MEM(见 A.2)。

4.6 细胞培养用抗生素溶液(见 A.3)。

4.7 抗生素-胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(ATV)溶液(见 A.4)。

4.8 固定液:80%丙酮(见 A.5)。

警示——丙酮易燃,有害健康。

4.9 BHK-21 细胞。

4.10 狂犬病标准攻击毒株 CVS-11,滴度应 $\geq 10^5$ TCID₅₀/mL。

5 器材和设备

5.1 8道移液器,50 μ L~200 μ L($\pm 2\%$)。

5.2 96孔微量培养板。

5.3 37℃ 5%二氧化碳培养箱。

5.4 倒置荧光显微镜。

5.5 普通冰箱和超低温冰箱。

5.6 细胞计数器。

5.7 20 μ L~200 μ L 吸头。

5.8 BSL-2 级生物安全柜。

6 动物血清的采集

无菌采集动物血液不少于 2 mL,室温或 37℃ 静置 60 min。4℃ 放置 1 h 至过夜后,6 000 r/min 离心 5 min,收集上清,−20℃ 以下保存待检。样品采集应详细记录动物品系、大小、免疫史、芯片号码、主人姓名等信息。

7 FAVN 实验操作

7.1 安全防护

本检测应在满足 GB 19489—2008 的 BSL-2 级生物安全实验室内进行。进行本检测的人员应采取针对性防护措施(见附录 B)。

7.2 材料准备

7.2.1 细胞

按常规方法培养 BHK-21 细胞,1 个 75 cm² 的细胞培养瓶(10 mL 培养液)细胞刚长成单层后(4×10^6 细胞/mL),可以用于 2 块 96 孔(每孔细胞数为 2×10^4 个/孔)细胞培养板的检测。

7.2.2 待测血清

待测血清在 56℃ 下灭活 30 min。灭活时,将血清样本放在 56℃ 恒温水浴箱内,水面要高于血清液面,但不要超过试管高度。

7.2.3 检测用培养板

以 96 孔细胞培养板进行检测。每个检测批次除了需要待测血清样品测定板(见 C.3)若干以外,还需设血清对照板(见 C.1)和病毒对照板(见 C.2)各 1 块。

7.3 检测操作

7.3.1 血清的稀释

7.3.1.1 在培养板上分别标记清楚样品对应编号,每个样品的同一个稀释度设 4 个重复,稀释直接在

96孔培养板中进行。

7.3.1.2 血清对照板(见C.1)第1~6列、第A~D行孔为阳性标准犬血清;第1~6列、第E~H行孔为阴性标准犬血清。每孔加入100 μ L MEM。

7.3.1.3 待测血清样品测定板(见C.3)第1~9列、第A~H行孔为待测样品,每4列用于1份样品的检测。每孔加入100 μ L MEM。

7.3.1.4 在血清对照板(见C.1)第1列、第A~D行孔中加入50 μ L 阳性标准犬血清,第1列、第E~H行孔中加入50 μ L 阴性标准犬血清。在待测血清样品测定板(见C.3)第1列、第A~D行孔中加入50 μ L 1号待测样品,第1列第E~H行孔中加入50 μ L 2号待测样品。

7.3.1.5 用50 μ L 多道移液器对血清样品进行连续的3倍稀释,每个稀释度共设4个重复。产生1/3, 1/9, 1/27, 1/81, 1/243, 1/729, 1/2 187, 1/6 561 和 1/19 683 的稀释倍数。其中对照血清只稀释6列,到1/729。弃掉从最后一行孔中吸出的50 μ L 液体。

7.3.2 病毒的滴定

7.3.2.1 在病毒对照板(见C.2)第1列、第A~D行孔中加入100 μ L MEM,第2~6列、第A~D行孔中加入150 μ L MEM,用于病毒滴度的测定;在第9~10列、第A~H行孔中加入200 μ L MEM 用作培养基对照;在第11~12列、第A~H行孔中加入150 μ L MEM 用作细胞对照。

7.3.2.2 CVS-11病毒液在-60 $^{\circ}$ C以下冰柜中贮存。用时取出1份,置于生物安全柜中融化,立即用MEM将病毒稀释成100 TCID₅₀/50 μ L,稀释总体积满足每个细胞培养板不少于5 mL。

7.3.2.3 向病毒对照板(见C.2)第1~2列、第A~D行加入50 μ L CVS-11病毒(100 TCID₅₀)。

7.3.2.4 病毒和培养基混匀后,从第2列的A~D行吸取50 μ L 加入到第3列的A~D行,如此连续稀释至第6列。每稀释一次要更换一次吸头。

7.3.2.5 弃去最后一排孔中的50 μ L CVS-11病毒液于0.1%氢氧化钠溶液中。

7.3.3 病毒与血清的中和

7.3.3.1 病毒的加入

待测血清样品测定板(见C.3)、血清对照板(见C.1)内全部各孔均加入7.3.2.2稀释的CVS-11病毒50 μ L(100 TCID₅₀)。吸头不应接触液面。加入病毒后以培养板盖盖好。

7.3.3.2 中和

将上述全部培养板从生物安全柜中取出,置37 $^{\circ}$ C温箱中,中和60 min(最多不超过90 min)。

7.3.4 细胞的加入

7.3.4.1 在中和结束前10 min,准备BHK-21细胞:弃细胞瓶中的培养基,细胞加入3 mL~5 mL 1 $\times$ ATV 覆盖单层细胞,轻轻摇晃数次后,弃消化液。重复洗涤1次。

7.3.4.2 加入2 mL~5 mL 1 $\times$ ATV,置37 $^{\circ}$ C消化约5 min。震动细胞瓶,使细胞脱落。

7.3.4.3 加入10 mL MEM,取少许于细胞计数板中,用细胞计数器或在镜下对细胞进行计数。

7.3.4.4 加入MEM,调整细胞密度至4.0 $\times$ 10⁵ 个/mL。

7.3.4.5 除培养基对照孔外,在每孔中加入50 μ L 细胞悬液。整个操作过程中吸头不应接触液面和孔壁。加细胞后培养板加盖。

7.3.5 培养

全部培养板从生物安全柜中取出,置37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳培养箱中培养48 h。

7.3.6 细胞固定与荧光抗体染色

7.3.6.1 细胞的固定

7.3.6.1.1 将细胞培养板从温箱中转移到Ⅱ级生物安全柜中,弃培养基于 0.1%氢氧化钠溶液中。

7.3.6.1.2 将培养板直接浸入第一个固定液容器内,片刻后取出,将孔中的溶液弃回至固定液中。

7.3.6.1.3 将培养板浸入第二个固定液容器内,20 min~45 min 后,将孔中的溶液弃回至固定液中。细胞培养板从Ⅱ级生物安全柜中取出,自然干燥或用吸水纸吸干。

7.3.6.2 荧光抗体染色

7.3.6.2.1 FITC 标记的抗狂犬病病毒核蛋白荧光抗体用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)稀释至工作浓度后,加到所有检测检测细胞板中,50 μ L/孔。

7.3.6.2.2 置 37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳培养箱中温育 60 min。

7.3.6.2.3 弃标记抗体于 0.1%氢氧化钠溶液中,用 0.01 mol/L PBS 洗 2 次,倒置培养板于吸水纸上干燥。

8 结果观察与判定

8.1 染色结果观察

8.1.1 观察顺序

按病毒滴定板、血清对照板、待测血清板顺序观察。

8.1.2 观察结果记录

在荧光显微镜下观察染色情况,观察每孔所有视野,结果为定性判定,以“+”表示 1 个以上的荧光细胞,只记录含有荧光颗粒的细胞孔,表示含有未被中和的病毒。无荧光颗粒记的细胞孔为“-”。在见表 C.4、表 C.5、表 C.6 中记录观察结果。

8.1.3 CVS-11 病毒滴度的计算

计数病毒滴定区(见 C.2, A2~D6 区域)内有荧光细胞的孔数 N , CVS-11 病毒滴度($TCID_{50}$)为 $4^{(N+2)/4}$ 。

8.1.4 血清狂犬病中和抗体效价的计算

将观察结果参数代入下列公式计算待检血清的中和抗体效价(E):

$$E = 0.5 \times (A_t/A_c) \times 3^{(B_t-B_c)/4}$$

式中:

E ——中和抗体效价,单位为 IU/mL;

A_t ——待测血清整列孔均无荧光染色的血清最大稀释倍数;

A_c ——阳性标准犬血清整列孔均无荧光染色的血清最大稀释倍数;

B_t ——待测血清在 A_t 稀释度后出现的无荧光染色的孔数;

B_c ——标准血清在 A_c 稀释度后出现的无荧光染色的孔数。

8.2 检测结果判定

8.2.1 判定成立条件

病毒滴定结果的计算值应介于 30~300 之间;细胞对照、培养基对照孔观察结果应全部判定为“—”。

8.2.2 结果判定

中和效价不低于 0.5 IU/mL 时,判定为该份血清的来源动物具备狂犬病免疫保护能力,否则判定为无免疫保护能力。



附 录 A
(规范性附录)
试剂及其配制

A.1 0.01 mol/L, pH 7.4 磷酸缓冲盐水溶液(PBS)

称取氯化钠 85.00 g, 磷酸氢二钠 15.49 g, 磷酸二氢钠 2.03 g, 加蒸馏水溶解, 定容至 10 L, 以 2 mol/L 氢氧化钠调至 pH 7.4。

A.2 细胞培养用 MEM 培养基

无菌量取 MEM 培养基 920 mL, 加入胎牛血清 50 mL、7.5% 碳酸氢钠溶液 10 mL、200 mmol/L L-谷氨酰胺 10 mL、抗生素溶液(见 A.3)10 mL。4 °C 保存。

A.3 细胞培养用抗生素溶液

以 MEM 培养基溶解市售抗生素, 达到青霉素浓度 100 IU/mL, 链霉素浓度 100 mg/mL, 分装后 -20 °C 保存。

A.4 抗生素-胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(ATV)溶液

无菌量取 10× ATV 浓缩液(Gibco)50 mL, 加灭菌蒸馏水 450 mL, 混匀, 4 °C 保存(本品可以其他细胞培养用胰酶消化液替代)。

A.5 80%丙酮

警示——丙酮易燃, 有害健康。

量取丙酮 800 mL, 加蒸馏水定容至 1 000 mL。

附 录 B
(规范性附录)

狂犬病中和抗体检测操作者个人防护措施

B.1 人员免疫

进行狂犬病抗体的操作者应进行狂犬病暴露前免疫,每年进行 2 次血清狂犬病病毒中和抗体检测,中和抗体效价应不低于 0.5 IU/mL。

B.2 实验室条件

操作者所在实验室及使用的检测设备应满足 GB 19489 要求。

B.3 个人防护

操作时应佩戴口罩、手套,着长袖工作服。

B.4 操作注意事项及意外处置

应避免锐物刺伤和割伤,发生外伤后,应立即停止实验,以肥皂水冲洗伤口不少于 15 min,并加强免疫狂犬病疫苗 1 剂。



附 录 C
(规范性附录)

检测所需细胞板加样示例及记录表格

C.1 参考血清对照板加样示例(见图 C.1)

	1	2	3	4	5	6	
	3	9	27	81	243	729倍	
A							
B							
C							
D							阳性标准犬血清(0.5 IU/mL)
E							阴性标准犬血清
F							
G							
H							

注：每孔加入 100 μ L MEM, 50 μ L 标准阳性血清加到第 1 列的 A~D 行孔内, 50 μ L 阴性血清加到第 1 列的 E~H 行孔内。

图 C.1 参考血清对照板加样示例

C.2 病毒滴度测定板加样示例(见图 C.2)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1	4	16	64	256	1 024			培养基对照		细胞对照	
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

注：在第 1 列的 A~D 行孔内加入 100 μ L MEM,在第 2~6 列的 A~D 行及细胞对照的第 11、12 列的 A~H 行孔内加入 150 μ L MEM,在第 9、10 列的 A~H 行的培养基对照孔中加入 200 μ L 的 MEM,在第 1、2 列的 A~D 行孔中加入 50 μ L 病毒液(含 100TCID₅₀)。

图 C.2 病毒滴度测定板加样示例

C.3 待测血清样品板加样示例(见图 C.3)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	1/3	1/9	1/27	1/81	1/243	1/729	1/2 187	1/6 561	1/19 683	
A										待测血清1
B										
C										
D										
E										待测血清2
F										
G										
H										

注：在第 1~9 列的 A~H 行孔内加入 100 μ L MEM,在第 1 列的 A~D 行孔内加入 50 μ L 1 号待测血清样品,在第 1 列的 E~H 行孔内加入 50 μ L 2 号待测血清。

图 C.3 待测血清样品板加样示例

C.4 FAVN 检测对照培养板观察记录表格(见表 C.1、表 C.2)

表 C.1 参考血清对照板观察记录表

稀释倍数	3	9	27	81	243	729
阳性标准 犬血清 (0.5 IU/mL)						
阴性标准 犬血清						

表 C.2 病毒滴度测定板观察记录表

病毒稀释倍数						空白列	对照			
1	4	16	64	256	2 014		培养基对照		细胞对照	

C.5 FAVN 检测待测样品板观察记录表格(见表 C.3)

表 C.3 待测样品板观察记录表

血清稀释倍数								
3	9	27	81	243	729	2 187	6 561	19 683
注：有荧光细胞的孔记录为加号(+)，本表可只记录有荧光细胞的孔。								
