

前 言

流行性乙型脑炎又称日本乙型脑炎(Japanese B encephalitis),是由流行性乙型脑炎病毒引起的一种蚊媒性人兽共患传染病。成年动物和人常呈隐性感染,幼龄动物特别是马感染后,可发生脑炎症状,妊娠母猪可引起流产、死胎及木乃伊胎,公猪睾丸肿大,儿童可发生严重的脑炎。多发生于7~9月份。我国许多省(市)都有本病发生,特别是六七十年代,发病率最高。对人畜的健康可造成严重的威胁。世界动物卫生组织和日本的资料,都采用病毒分离鉴定、免疫荧光试验、血凝抑制试验、补体结合试验、血清中和试验等进行诊断。我国对本病的研究报道较多,而比较常用的诊断方法仍是本标准规定的病毒分离鉴定、血凝抑制试验、补体结合试验。病毒分离鉴定适用于流行性乙型脑炎新疫区的确定和病畜的确诊。间接免疫荧光试验适用于可疑流行性乙型脑炎病毒标本的快速检测和病毒分离株的初步鉴定。补体结合试验,由于补体结合抗体一般在病后2~3周出现,5~6周达高峰,并可维持1年以上,故可适用于流行性乙型脑炎的较早期诊断和流行病学调查,是最常用的方法。根据当时的实际需要,可任选一种或两种检疫方法,以达到准确诊断的目的。

本标准的实施,对提高乙型脑炎的诊断和疫情预测水平,及时采取防制措施,保证人畜健康,将起到重要的作用。

本标准的附录A、附录B都是标准的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国人民解放军农牧大学。

本标准主要起草人:李佑民、宣华、李金中、刘振润。

中华人民共和国国家标准

流行性乙型脑炎诊断技术

GB/T 18638—2002

Diagnostic techniques for epidemic encephalitis B

1 范围

本标准规定了流行性乙型脑炎的病毒分离与鉴定、间接免疫荧光试验、补体结合试验、血凝抑制试验等技术要求。

本标准适用于口岸、产地及集散地、饲养单位(或个人)的猪、马、骡、驴、牛、羊等的流行性乙型脑炎的诊断和检疫。

2 病毒的分离与鉴定

2.1 材料准备

2.1.1 器材:细胞培养瓶(或管),吸管,中试管,三角烧瓶,37℃水浴箱,37℃恒温箱,普通冰箱及低温冰箱,离心机及离心管,研磨器械,普通光学显微镜,G5级玻璃滤器,孔径0.45 μm的微孔滤膜,0.25 mL注射器及针头。

2.1.2 试剂:汉克氏(Hanks)液,0.5%水解乳蛋白 Hanks 液,2万 IU/mL青霉素液,2万 μg/mL链霉素液,7%碳酸氢钠液,1%胰蛋白酶液,1%酚红(中性)液,伊格尔氏(Eagle)最低必要成分培养液(EMEM),小牛血清。

2.1.3 小动物:小鼠(6 g~8 g)、乳鼠。

2.1.4 鸡胚细胞、绿猴肾传代细胞(Vero)、仓鼠肾传代细胞(BHK₂₁)、白蚊伊蚊 C6/36 传代细胞等。

2.2 病毒分离

2.2.1 样品的采取和运送

2.2.1.1 在流行的早期和发病的早期(即病毒血症阶段),无菌采取病畜的血液或脑脊髓液。

2.2.1.2 应在病畜死亡后3 h内(越早越好)采取脑组织(选大脑皮质、脑干、中脑、海马回及桥脑)数小块放于灭菌玻璃瓶。

2.2.1.3 猪应采取流产死胎的脑组织,置冰箱内立即送检。

2.2.1.4 不能立即检查者,应放-25℃~-30℃冰箱,或加50%甘油生理盐水,4℃保存送检。

2.2.2 样品的处理

2.2.2.1 血液应分离出血清或血浆。

2.2.2.2 脑脊髓液可直接应用。

2.2.2.3 脑组织应研磨成糊状,加入0.5%水解乳蛋白 Hanks 液(或碱性肉汤或10%脱脂奶生理盐水),制成10%悬液,3 000 r/min离心30 min,吸取上清液,加入青霉素500 IU/mL和链霉素500 μg/mL,在4℃处理3 h~4 h(无污染者可不加青、链霉素处理),即得接种样品。

2.2.2.4 怀疑有污染的样品,也可用0.45 μm微孔滤膜过滤法处理。

2.2.3 动物分离法

2.2.3.1 取6 g~8 g小鼠10只(或3~5日龄乳鼠一窝),用左手固定,在耳与眼之间用碘酒消毒。右手持吸取接种样品的0.25 mL注射器在消毒部刺入硬脑膜下,每只6 g~8 g小鼠注射0.03 mL(乳鼠

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 2002-02-19 批准

2002-05-01 实施

0.01 mL~0.02 mL)。然后用左手拇指及食指抓住小鼠头顶部皮肤,翻转左手,使小鼠腹部朝上,将其尾部夹在左手掌与小手指之间,消毒腹部,右手持注射器向腹腔内注入样品 0.2 mL~0.5 mL。

2.2.3.2 对照小鼠 2 只,按同法同剂量注射稀释液。

2.2.3.3 接种后 2 d~4 d,如对照鼠正常,而注射样品的小鼠表现松毛、弓背、沉郁、震颤、绕圈、后肢麻痹、继而死亡者,应解剖取鼠脑组织,按 2.2.2.3 制成接种样品,按 2.2.3.1 再接种小鼠。连续 2 代接种小鼠均有发病致死者,而且未检出致病细菌时,一方面继续传代并作鉴定,另一方面用冰冻干燥法保存毒种。

2.2.3.4 接种小鼠经 7 d~14 d 无一发病时,则取出 2 只,解剖取脑组织,按 2.2.2.3 制成样品盲传一代,观察 2 周如仍无死亡,即按未分离出病毒报告。

2.2.4 组织培养法

2.2.4.1 取 2.2.2 制成的样品,接种鸡胚细胞、仓鼠肾单层细胞或 Vero、BHK₂₁、C6/36 传代细胞单层,每份样品至少接种 10 管(或瓶),每管 0.1 mL~0.2 mL,37℃ 吸附 1 h,用 Hanks 液洗 1 次,加入 EMEM 液 1 mL,放 37℃ 培养 7 d~10 d。

2.2.4.2 同时设细胞对照 2 管(或瓶),不接种样品,其他步骤与接种样品管相同。

2.2.4.3 接种后观察约 10 d,第二天开始,每天在显微镜下观察细胞病变,若细胞对照管正常,而接种样品管细胞出现细胞萎缩、脱落、形成空斑等病变时,立即移种新的细胞单层,如出现相类似的病变,且日渐明显,即可收获,放 -25℃~-30℃ 冰箱保存待检。

2.2.4.4 如盲传 3 代均无细胞病变,即按未分离出病毒报告。

2.2.5 鸡胚培养法

2.2.5.1 取 2.2.2 制成的样品,接种于 6 d~8 d 龄鸡胚卵黄囊内,每胚接种 0.5 mL,每份样品至少接种 4 胚。

2.2.5.2 同时设对照鸡胚 2 个,对照鸡胚接种稀释液 0.5 mL。

2.2.5.3 置 37℃ 培养 4 d,48 h 后对照鸡胚正常,而接种样品鸡胚死亡或到期未死亡者,解剖取出鸡胚磨碎,用碱性肉汤制成 10% 悬液,3 000 r/min 离心 30 min,取上清液按 2.2.3 接种小鼠。

2.2.5.4 如小鼠发现 2.2.3.3 中死亡时,解剖取脑组织,冰冻保存待检。

2.2.5.5 如鸡胚培养 3 代均正常,即按未分离出病毒报告。

2.2.6 病毒的鉴定

经小鼠、鸡胚或组织培养法分离获得能稳定传代的病原,在细菌培养基上不生长,经除菌过滤(G5 级玻璃滤器或 0.45 μm 微孔滤膜)仍保留其繁殖力和致病力,即可以认为已分离到病毒。

2.2.6.1 初步鉴定:将待检病毒制备抗原,用血凝抑制试验(第 4 章)、补体结合试验(第 5 章)作初步鉴定,确定病毒的属性。三种方法任选一种。

2.2.6.2 最后鉴定:小鼠中和试验方法如下:

- a) 首先将被检血清 56℃ 30 min 灭活;
- b) 与 10 倍连续稀释的乙型脑炎病毒等量混合,在 37℃ 感作 1 h;
- c) 给 3 周龄小鼠脑内接种,每只接种 0.03 mL,每一稀释度病毒脑内接种相同小鼠 5 只,观察 2 周;
- d) 根据各稀释度小鼠的死亡数和存活数按半数致死量(Reed-Muench)法计算 LD₅₀;
- e) 操作中要设①病毒对照组(已知参考病毒加阴性血清),②阳性血清对照组(已知参考病毒加阳性血清);

f) 试验组为③(被检病毒加阳性血清);

g) 结果判定:

组①LD₅₀—组②LD₅₀=阳性血清中和已知参考病毒的中和指数;

组①LD₅₀—组③LD₅₀=阳性血清中和被检病毒的中和指数。

两者中和指数相接近(相差≤0.5LD₅₀),即可确定分离的病毒为流行性乙型脑炎病毒。如对中和指

数结果有怀疑,可用新分离的病毒制备免疫血清,再与参考株和新分离的病毒株进行交叉中和试验。如果对应的抗原抗体反应效价高于交叉反应的效价,则表明两者有区别。

3 补体结合试验

3.1 材料准备

3.1.1 器材

试管(7.5 cm×1.0 cm),吸管(10 mL、2 mL、1 mL),试管架,水浴箱(37℃~38℃),离心机及离心管。

3.1.2 试剂

3.1.2.1 乙型脑炎抗原将病毒正常对照抗原,均由制标单位提供。

3.1.2.2 溶血素:由制标单位提供。效价应1:5 000以上。

3.1.2.3 补体:由制标单位提供冻干补体,或用3只以上豚鼠血清混合的新鲜补体。

3.1.2.4 绵羊红细胞:由健康绵羊采血,加入三倍的阿氏液(见附录A中A3)内,4℃保存可用1个月。用前取绵羊红细胞悬液适量,加5~10倍量的生理盐水(见附录A中A4),充分混匀后,以2 500 r/min离心15 min,吸弃上清液后,再加生理盐水悬浮红细胞,如此洗涤3次。最后以2 500 r/min离心20 min,吸弃上清液,沉淀的红细胞以钙镁盐水(4.1.2.7)配成1%绵羊红细胞悬液。

3.1.2.5 阳性对照血清由制标单位供应。

3.1.2.6 阴性对照血清由制标单位供应。

3.1.2.7 钙镁盐水:见附录A中A1。

3.1.3 样品

3.1.3.1 被检血清应于发病早期和病后4周各采血1次,分离血清,密装灭菌小瓶,4℃冰箱保存或立即检查。

3.1.3.2 采血分离血清过程应无菌操作,防止污染。血清须新鲜透明不溶血。

3.1.3.3 试验前应将阴性血清、阳性血清、被检血清作2倍稀释,随后依动物种类进行不同温度的加热灭活30 min。豚鼠56℃,马58℃~60℃,人、猴及小鼠60℃,牛、水牛、山羊、狗、猪、仓鼠62℃,骡、驴63℃~64℃,家兔65℃。

3.2 操作方法

3.2.1 预备试验

见附录B(标准的附录)。

3.2.2 正式试验

3.2.2.1 操作程序:

a) 取3排小试管,每排6支。

b) 于第1排的第2~6管内各加钙镁盐水(见附录A中A1)0.3 mL。

c) 2倍稀释的被检血清0.1 mL于各排第1管。

d) 于第1排第2管2倍稀释的被检血清加0.3 mL。

e) 混匀第1排第2管内容物,吸取0.5 mL,分别加于第2、第3排的第2管,各加0.1 mL,加于第1排第3管余下的0.3 mL。

f) 混匀第3管内容物,如上连续稀释并移入第2、第3排的相应管,直到第6管。

g) 结果每排形成1:2到1:64稀释度的被检血清,每管含稀释的被检血清0.1 mL。然后按表1加入乙脑病毒抗原,或正常对照抗原、钙镁盐水各0.1 mL,再加2单位的补体0.2 mL,振摇混匀后置4℃冰箱过夜,取出后置37℃水浴30 min。

h) 各管再加致敏绵羊红细胞悬液0.2 mL,37℃感作30 min后判定。

表 1 正式试验滴加法

mL

| 管号 | 0.1 被检血清 (或阴、阳性血清)的稀释倍数 | 工作价抗原 | 2 单位补体 | 致敏绵羊 红细胞 | 结果 举 例 | | | | | | |
|----|----------------------------|----------|--------|-------------|---------------------------------|--------------------|----------|------------|------------|------------|------|
| | | | | | | 阳性 血清 | 阴性 血清 | 被检 血清 1 | 被检 血清 2 | 被检 血清 3 | |
| 1 | 1:2 | (乙脑抗原) | 0.2 | 0.2 | 振荡后置 4℃ 冰箱过夜,取出后置 37℃ 水浴 30 min | 振荡后置 37℃ 水浴 30 min | ++++ | — | — | ++++ | ++++ |
| 2 | 1:4 | | | | | | ++++ | — | — | ++++ | ++ |
| 3 | 1:8 | | | | | | ++++ | — | — | ++++ | — |
| 4 | 1:16 | | | | | | — | — | — | + | — |
| 5 | 1:32 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 6 | 1:64 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 1 | 1:2 | (正常对照抗原) | 0.2 | 0.2 | 振荡后置 4℃ 冰箱过夜,取出后置 37℃ 水浴 30 min | 振荡后置 37℃ 水浴 30 min | — | — | — | — | — |
| 2 | 1:4 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 3 | 1:8 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 4 | 1:16 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 5 | 1:32 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 6 | 1:64 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 1 | 1:2 | (钙镁盐水对照) | 0.2 | 0.2 | 振荡后置 4℃ 冰箱过夜,取出后置 37℃ 水浴 30 min | 振荡后置 37℃ 水浴 30 min | — | — | — | — | — |
| 2 | 1:4 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 3 | 1:8 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 4 | 1:16 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 5 | 1:32 | | | | | | — | — | — | — | — |
| 6 | 1:64 | | | | | | — | — | — | — | — |

3.2.2.2 对照:

3.2.2.2.1 补体对照:取 3 排小试管,每排 4 支(共 12 管)。于 3 排的第 1 管、第 2 管、第 3 管和第 4 管中分别加入 0.05、0.1、0.15 和 0.2 mL 的 2 单位补体,并追加 0.25 mL、0.2 mL、0.15 mL 和 0.1 mL 钙镁生理盐水,使各管液量均为 0.3 mL。随后于第 1 排各管中加入病毒抗原,第 2 排加入正常抗原,第 3 排加入钙镁生理盐水,每管 0.1 mL。振荡混匀后,与正式试验管一起置 4℃ 冰箱过夜,而后 37℃ 水浴 30 min,再每管加入致敏绵羊红细胞悬液 0.2 mL,振荡均匀,与正式试验管置 37℃ 水浴中 30 min 后判定。补体 0.15 mL 和 0.2 mL 管应完全溶血,0.1 mL 管 50%抑制溶血,0.05 mL 管应完全抑制溶血。

3.2.2.2.2 阳性血清对照:按 3.2.2.1 操作。

3.2.2.2.3 阴性血清对照:按 3.2.2.1 操作。

3.3 结果判定

3.3.1 结果表示方法见附录 B(标准的附录)中 B3.4。血清效价以 50%抑制溶血(++)为判定终点。正式试验结果举例中被检血清 2 的效价为 1:8,被检血清 3 的效价为 1:4。

3.3.2 判定试验结果时,各对照管的结果应符合要求,否则试验应重做。

3.3.3 患畜恢复期血清比急性期血清的抗体滴度增长 4 倍以上,可诊断为流行性乙型脑炎病畜。单份血清抗体滴度 1:16 以上,结合临床症状,可诊断为流行性乙型脑炎病畜。1:4 可作为马骡感染阳性的最低抗体滴度。

4 血凝抑制试验

4.1 材料准备

4.1.1 器材

96孔V型微量血凝板,25 μ L移液管及吸头;微量振荡器;自动稀释器或稀释棒;离心机及离心管。

4.1.2 试剂

生理盐水;0.4%牛血清白蛋白 pH9.0 硼酸缓冲液(BABS);25%白陶土悬液;阿氏液(血球保存液);不同pH磷酸盐缓冲液[见附录A(标准的附录)]。

4.1.3 鹅红细胞

取无菌的5 mL~10 mL注射器及针头一付,从健康鹅的翅静脉无菌采血2 mL~3 mL,随即注入盛有15 mL左右阿氏液的三角烧瓶内,不时摇动3 min后,置于4℃冰箱过夜。次日将红细胞倒入刻度离心管,平衡后,2 000 r/min离心5 min,弃上清液,加入10倍量生理盐水充分混匀,2 000 r/min离心5 min,如此反复3次。第3次用同样速度离心10 min,然后吸尽上清液。再用1 mL吸管插入离心管内的红细胞泥的中心部,吸取所需的红细胞,通过对不同pH值的磷酸盐缓冲液(见附录A中A6)试验,选取最适pH的磷酸盐缓冲液配成0.33%和8%的鹅红细胞悬液备用。

4.1.4 血凝素

由制标单位提供,其效价的测定见附录C(标准的附录)。

4.1.5 样品的采集及处理

应于发病早期和病后3~4周各采血1次,分离血清,立即检查或4℃冰箱保存待检。

试验前,被检血清作如下处理,以除去非特异性血凝抑制物质和非特异性凝集素。取被检血清0.1 mL,加pH7.4磷酸盐缓冲液(见附录A中A6)0.4 mL,而后加热灭能,灭能温度同补体结合试验的被检血清的处理(3.1.3.3),灭能后加25%白陶土悬液(见附录A中A5)0.5 mL,用力振荡摇匀,置37℃1 h或室温过夜后,1 000 r/min离心5 min。取上清液再加8%鹅红细胞悬液0.05 mL,混匀后,置37℃30 min,1 000 r/min离心5 min,上清液即为1:10稀释的被检血清。

同时检查血清中的免疫球蛋白M(IgM)时,应另取被检血清0.1 mL,加pH7.4磷酸盐缓冲液0.4 mL,70℃加热30 min,而后按上述方法处理。

阳性血清和阴性血清亦需同样处理。

4.2 操作方法

4.2.1 8单位血凝素的配制:如测定的血凝素效价为1 280倍,则用预冷的0.4%pH9.0的硼酸缓冲液(见附录A中A2)将血凝素原液作160倍稀释。

4.2.2 在微量血凝板的第1排(横)各孔的上边分别标记被检血清号、阴性血清号、阳性血清号。第1行(纵)各孔的外侧边标记血清的稀释度。最后一排作红细胞对照。

4.2.3 第2排到第7排各孔加入0.4%pH9.0的硼酸缓冲液25 μ L。第8排加50 μ L。

4.2.4 第1、2排按已标记的血清号每孔分别加相应的血清25 μ L。

4.2.5 自动稀释器,先经生理盐水预温,并排净液体,插入第2排各孔,充分混合后,蘸取25 μ L到第3排,依次倍比稀释至第7排,最后从第7排各孔中蘸取25 μ L弃去,第8排作红细胞对照。

4.2.6 除第8排外,各孔分别加入8个单位的血凝素25 μ L,在微量振荡器上振荡3 min,置室温(20℃~25℃)30 min。

4.2.7 各孔分别加入0.33%鹅红细胞悬液25 μ L,摇匀后置37℃恒温箱30 min,取出判定结果。

4.3 结果判定

判定时先看对照。当被检血清对照、阴性血清对照和红细胞对照均完全不凝集,血凝素对照除1单位孔呈“++”或“+”凝集,而8单位孔、4单位孔、2单位孔均完全凝集时即可由前向后逐孔检查被检血清的抑制效价。以能完全抑制红细胞凝集的被检血清的最高稀释倍数作为该血清的血凝抑制抗体效价,

表 2(举例)血清的血凝抑制抗体效价为 1 : 160。患畜恢复期血清的血凝抑制抗体效价比急性期的血清高 4 倍以上,或单份血清作免疫球蛋白 M(IgM)处理后,处理后血清的抗体效价比处理前的降低 2 个滴度以上时,均可诊断为流行性乙型脑炎病畜。马骡流行性乙型脑炎感染的血凝抑制抗体最低滴度暂定为 1 : 40。

表 2 微量血凝抑制试验(举例)

μL

| 血清稀释度 | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 红细胞对照 |
|-----------------------|----|----|----|----|-----|-----|------|-------|
| 0.4% pH9.0 硼酸缓冲液 | | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 50 |
| 10 倍稀释血清 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | |
| 8 单位血凝素 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | |
| 振荡 3 min 后,置室温 30 min | | | | | | | | |
| 0.33% 鹅红细胞 (pH6.4) | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| 摇匀后置 37℃ 恒温箱 30 min | | | | | | | | |
| 判定结果 | — | — | — | — | — | ++ | ++++ | — |

附 录 A
(标准的附录)
试剂的配制

A1 钙镁溶液(用于补体结合试验)

| | |
|--|--------|
| 氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) | 10.0 g |
| 氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 4.0 g |

加蒸馏水至 100 mL。105 kPa 20 min 高压灭菌。

A2 0.4%牛血清白蛋白 pH9.0 硼酸缓冲液(BABS)(用于血凝抑制试验)

母液 I : 0.05 mol/L 硼砂溶液

| | |
|--|--------|
| 硼砂($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) | 5.2 g |
| 双蒸馏水或无离子水加至 | 250 mL |

母液 II : 0.2 mol/L 硼酸溶液

| | |
|-------------------------------|--------|
| 硼酸(H_3BO_3) | 1.2 g |
| 加双蒸馏水或无离子水至 | 100 mL |

使用液: 母液 I 32 mL + 母液 II 8 mL + 生理盐水 460 mL。配好后测定 pH, 如不到 9.0, 可加适量 0.05 mol/L 硼砂溶液。105 kPa 20 min 高压灭菌。临用前, 在使用液中添加 0.4% 牛血清白蛋白。

A3 阿氏液(用于血凝抑制试验和补体结合试验)

| | |
|----------------------|--------|
| 葡萄糖 | 2.05 g |
| 柠檬酸钠 | 0.8 g |
| 氯化钠(NaCl) | 0.42 g |

加双蒸馏水或无离子水至 100 mL, 56 kPa 20 min 高压灭菌。

A4 生理盐水(用于补体结合试验和血凝抑制试验)

| | |
|----------------------|-------|
| 氯化钠(NaCl) | 8.5 g |
|----------------------|-------|

加双蒸馏水或无离子水至 1 000 mL, 105 kPa 20 min 高压灭菌。

A5 25%白陶土悬液(用于血凝抑制试验)

取优质白陶土粉末 25 g, 加 pH7.4 磷酸盐缓冲液至 100 mL, 105 kPa 20 min 高压灭菌。4℃ 保存, 可用 1 个月。临用前摇匀。

A6 不同 pH 值磷酸盐缓冲液(PBS)

母液 I : 1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液配制

| | |
|---------|--------|
| 无水磷酸氢二钠 | 9.47 g |
|---------|--------|

加双蒸馏水或无离子水至 1 000 mL

母液 II : 1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液配制

| | |
|-------|--------|
| 磷酸二氢钾 | 9.08 g |
|-------|--------|

加双蒸馏水或无离子水至 1 000 mL

pH5.8 PBS: 母液 I 8.0 mL + 母液 II 92 mL + 生理盐水 566 mL;

pH6.0 PBS:母液 I 12.2 mL+母液 II 87.8 mL+生理盐水 566 mL;
 pH6.2 PBS:母液 I 18.6 mL+母液 II 81.4 mL+生理盐水 566 mL;
 pH6.4 PBS:母液 I 26.7 mL+母液 II 73.3 mL+生理盐水 566 mL;
 pH6.6 PBS:母液 I 37.5 mL+母液 II 62.5 mL+生理盐水 566 mL;
 pH7.4 PBS:母液 I 80.8 mL+母液 II 19.2 mL+生理盐水 566 mL。
 校正 pH 值后,105 kPa 20 min 高压灭菌。

附录 B

(标准的附录)

补体结合试验的预备试验

B1 溶血素效价滴定

B1.1 溶血素的稀释:吸取溶血素 0.1 mL(含 50%甘油者用 0.2 mL),加钙镁盐水 9.9 mL(含 50%甘油者加 9.8 mL),混匀后即为 1:100 的溶血素,然后取 1:100 溶血素 1 mL 加钙镁盐水 4 mL,即为 1:500 的溶血素,再按表 B1 进行稀释。

表 B1 溶血素的稀释

| 试管号 | 钙镁盐水 μL | 1:500 溶血素 μL | 稀释倍数 |
|-----|------------|--------------------|----------|
| 1 | 0.1 | 0.1 | 1:1 000 |
| 2 | 0.3 | 0.1 | 1:2 000 |
| 3 | 0.5 | 0.1 | 1:3 000 |
| 4 | 0.7 | 0.1 | 1:4 000 |
| 5 | 0.9 | 0.1 | 1:5 000 |
| 6 | 1.1 | 0.1 | 1:6 000 |
| 7 | 1.3 | 0.1 | 1:7 000 |
| 8 | 1.5 | 0.1 | 1:8 000 |
| 9 | 1.7 | 0.1 | 1:9 000 |
| 10 | 1.9 | 0.1 | 1:10 000 |

B1.2 溶血素的滴定:取一支 1 mL 吸管,由高稀释度开始,将各管已稀释的溶血素吸到另一排小试管内,每管 0.1 mL,然后按表 B2 依次加入补体、钙镁盐水及 1%绵羊红细胞,摇匀后,置 37℃水浴中 30 min,观察结果。

表 B2 溶血素的滴定

| 试管号 | 溶血素 | | 补体(1:50) mL | 钙镁盐水 mL | 1%绵羊红细胞悬液 mL | 结果 |
|-----|----------|---------|----------------|------------|-----------------|-------|
| | 稀释度 | 量 mL | | | | |
| 1 | 1:1 000 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 全溶 |
| 2 | 1:2 000 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 全溶 |
| 3 | 1:3 000 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 全溶 |
| 4 | 1:4 000 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 全溶 |
| 5 | 1:5 000 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 全溶 |
| 6 | 1:6 000 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 全溶 |
| 7 | 1:7 000 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 大部分溶解 |
| 8 | 1:8 000 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 微溶 |
| 9 | 1:9 000 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 不溶 |
| 10 | 1:10 000 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 不溶 |

B1.3 溶血素单位计算:能使红细胞完全溶解的溶血素的最高稀释度,称为1个溶血素单位。表2中判定结果为第6管,即0.1 mL 1:6 000的溶血素含有1个单位。试验中应用2个单位的溶血素,即将溶血素稀释成1:3 000,则0.1 mL中含有2个单位溶血素。

B2 补体效价滴定

B2.1 滴定方法:吸取补体0.1 mL,加钙镁盐水4.9 mL,即1:50稀释补体,然后按表B3的量,分别加入三排小试管中,再依次加入钙镁盐水、4个单位溶血素或1:5稀释抗原,混匀后,放37℃水浴中30 min,再加入致敏绵羊红细胞(1%绵羊红细胞悬液与等量2个单位溶血素相混合,放37℃水浴中15 min),摇匀后,放37℃水浴中30 min,观察结果。

B2.2 补体单位的计算:能使红细胞完全溶解的最小补体量为一个单位,正式试验和抗原滴定时都用2个单位的补体。如表B3所示,0.12 mL的1:50补体为一个单位,2个单位补体应为0.24 mL的1:50补体,由于正式试验和抗原滴定时每管应加的补体量为0.2 mL,故需按式(B1)换算其稀释度:

$$X = \frac{(50 \times 0.2)}{0.24} = 41 \dots\dots\dots(B1)$$

将未稀释补体稀释成1:41,即可使0.2 mL内含2个单位的补体。具体方法是在1 mL补体内加40 mL钙镁盐水,即为1:41稀释。

表 B3 补体效价的滴定

| 管号 | 补体 mL | 稀释抗原 mL | 钙镁盐水 mL | | 致敏红细胞 mL | | 结果举例 |
|-----------|----------|------------|------------|----------------------------|-------------|----------------------------|------|
| 病毒抗原 | | | | | | | |
| 1 | 0.05 | 0.1 | 0.25 | | 0.2 | | 不溶 |
| 2 | 0.08 | 0.1 | 0.22 | | 0.2 | | 微溶 |
| 3 | 0.10 | 0.1 | 0.20 | | 0.2 | | 微不溶 |
| 4 | 0.12 | 0.1 | 0.18 | | 0.2 | | 全溶 |
| 5 | 0.14 | 0.1 | 0.16 | | 0.2 | | 全溶 |
| 6 | 0.16 | 0.1 | 0.14 | | 0.2 | | 全溶 |
| 正常脑组织对照抗原 | | | | | | | |
| 7 | 0.05 | 0.1 | 0.25 | 放置 37℃ 水浴中 30 min | 0.2 | 放置 37℃ 水浴中 30 min | 不溶 |
| 8 | 0.08 | 0.1 | 0.22 | | 0.2 | | 微溶 |
| 9 | 0.10 | 0.1 | 0.20 | | 0.2 | | 微不溶 |
| 10 | 0.12 | 0.1 | 0.18 | | 0.2 | | 全溶 |
| 11 | 0.14 | 0.1 | 0.16 | | 0.2 | | 全溶 |
| 12 | 0.16 | 0.1 | 0.14 | | 0.2 | | 全溶 |
| 盐水对照 | | | | | | | |
| 13 | 0.05 | — | 0.35 | | 0.2 | | 不溶 |
| 14 | 0.08 | — | 0.32 | | 0.2 | | 微溶 |
| 15 | 0.10 | — | 0.30 | | 0.2 | | 微不溶 |
| 16 | 0.12 | — | 0.28 | | 0.2 | | 全溶 |
| 17 | 0.14 | — | 0.26 | | 0.2 | | 全溶 |
| 18 | 0.16 | — | 0.24 | | 0.2 | | 全溶 |

B3 病毒抗原效价的滴定

抗原滴定一般按方阵法进行,即用倍比稀释的已知阳性血清与倍比稀释的抗原进行试验。按表 B4 进行抗原和血清稀释,表中举例说明效价滴定结果。

B3.1 滴定方法

按表 4 纵横排列试管,分别加入稀释的抗原和免疫血清各 0.1 mL。每管加入稀释补体 0.2 mL(含 2 个单位)。

表 B4 抗原效价滴定(举例)

| 病毒抗原 | 免疫血清 | | | | | | | 正常血清(1:4) 抗补体对照 | 病毒抗原 抗补体对照 |
|------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|--------------------|---------------|
| | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | | |
| 1:2 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | — | — | — |
| 1:4 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | — | — | — |
| 1:8 | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | ++ | ++ | — | — | — |
| 1:16 | ++++ | ++++ | ++++ | ++ | ++ | ++ | — | — | — |
| 1:32 | ++++ | ++++ | +++ | ++ | + | + | — | — | — |
| 1:64 | ++++ | ++++ | ++ | ++ | + | + | — | — | — |
| 1:128 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 正常抗原(1:4)抗 补体对照免疫血清 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 抗补体对照 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

B3.2 对照管设置

B3.2.1 免疫血清抗补体对照:将免疫血清稀释为 1:2、1:4、1:8,每管 0.1 mL,每个稀释度再加入钙镁盐水 0.1 mL、稀释补体 0.2 mL,但不加抗原。

B3.2.2 病毒抗原抗补体对照:将病毒抗原稀释为 1:2、1:4、1:8,每管各加 0.1 mL,再加钙镁盐水 0.1 mL,稀释补体 0.2 mL。

B3.2.3 正常血清抗补体对照:在 7 管 1:4 正常血清 0.1 mL 中,分别加入不同稀释度的病毒抗原 0.1 mL,稀释补体 0.2 mL。

B3.2.4 正常抗原抗补体对照:在 7 管 1:4 正常抗原 0.1 mL 中,分别加入不同稀释度的免疫血清 0.1 mL,稀释补体 0.2 mL。

B3.2.5 溶血素对照:加钙镁盐水 0.4 mL 于 1 支小试管中。

B3.3 感作

将各管摇匀,置 4℃ 冰箱内过夜,次日取出,放于 37℃ 水浴中 30 min,每管加入致敏绵羊红细胞悬液 0.2 mL,置 37℃ 水浴内 30 min,判定结果。

B3.4 结果判定

完全抑制溶血者为“++++”,75%抑制溶血者为“+++”,50%抑制溶血者为“++”,25%抑制溶血者为“+”,完全不抑制溶血者为“—”。与最高稀释度免疫血清发生 100%或 75%抑制溶血的抗原,其抗原的最高稀释倍数就是抗原的效价。表 B4 举例为 1:32。正式试验时须用较高浓度(约 4~8 倍)的抗原,一般用抗原原液的 1:4 或 1:8 稀释液。