

3404 红细胞凝集抑制试验法（标准草案）

1 血凝素工作液配制

1.1 凝素凝集价测定 50孔板或试管法按表1, 96孔微量板法按表2术式进行。用PBS (0.1mol/L, pH值 7.0~7.2, 下同) 将血凝素稀释成不同倍数, 加入与抑制试验中血清量等量的PBS, 再加入1%鸡红细胞悬液。将50孔板或试管前后左右摇匀, 将96孔微量板在振荡器上摇匀, 置室温 (15~25°C) 20~40分钟或置2~8°C 40~60分钟, 当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。结果判定标准见附录3403, 以使红细胞完全凝集 (++++) 的最高稀释度作为判定终点。

1.2 血凝素工作液配制及检验

1.2.1 4HAU血凝素的配制 如果血凝素凝集价测定结果为1:1024 (举例), 4个血凝单位 (即4HAU) = 1024/4 = 256 (即1:256)。取PBS 9.0ml, 加血凝素 1.0ml, 即成1:10稀释, 将1:10稀释液 1.0ml 加入到 24.6ml PBS 中, 使最终浓度为1:256。

1.2.2 检验 检查4HAU的红细胞凝集价是否准确, 应将配制的1:256稀释液分别以1.0ml的量加入PBS 1.0ml、2.0ml、3.0ml、4.0ml、5.0ml和6.0ml中, 使最终稀释度为1:2、1:3、1:4、1:5和1:7。然后, 从每一稀释度中取0.25ml, 加入PBS 0.25ml, 再加入1%鸡红细胞悬液 0.25ml, 混匀。

如果用微量板, 方式相同。即从每一稀释度中取0.025ml, 加入PBS 0.025ml, 再加入1%鸡红细胞悬液 0.025ml, 混匀。

将血凝板置室温 (15~25°C) 20~40分钟或置2~8°C 40~60分钟, 如果配制的抗原液为4HAU, 则1:4稀释度将给出凝集终点; 如果4HAU高于4个单位, 可能1:5或1:6为终点; 如果较低, 可能1:2或1:3为终点。应根据检验结果将血凝素稀释度做适当调整, 使工作液确为4HAU。

表1 血凝素凝集价测定 (50孔板或试管法) 术式 (以1%鸡红细胞悬液为例)

单位: ml

孔或管号	1	2	3	4	5	6	7	8...	对照
血凝素稀释倍数	5	10	20	40	80	160	320	640	
PBS	0.4	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘弃	0.25
血凝素	0.1	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
PBS	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
1%鸡红细胞悬液	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

表2 血凝素凝集价测定 (96孔微量板法) 术式 (以1%鸡红细胞悬液为例)

单位: ml

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8...	对照
血凝素稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256	
PBS	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘弃	0.025
血凝素	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
PBS	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
1%鸡红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

2 红细胞凝集抑制 (HI) 试验

2.1 50孔板法或试管法 按表3用PBS将本血清作2倍系列稀释,加入含4HAU的血凝素液,并设PBS和血凝素对照,充分振摇后,置室温(15~25℃)下至少20分钟或在置2~8℃下至少40~60分钟,再加入1%鸡红细胞悬液,置室温(15~25℃)20~40分钟或置2~8℃40~60分钟,当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。以使红细胞凝集被完全抑制的血清最高稀释度作为判定终点。

表3 红细胞凝集抑制试验(50孔板或试管法)术式(以1%鸡红细胞悬液为例) 单位: ml

孔或管号	1	2	3	4	5	6	7...	病毒对照	红细胞对照
稀释倍数	5	10	20	40	80	160	320		
PBS	0.4	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5
	} \	} \	} \	} \	} \	} \	} \ 弃 0.25		
本血清	0.1	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25		
4HAU 抗原	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
1%鸡红细胞悬液	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

2.2 96孔微量板法 与50孔板法方式相同,各分量及加样顺序见表4。

表4 微量红细胞凝集抑制试验(96孔板或试管法)术式(以1%鸡红细胞悬液为例) 单位: ml

孔号	1	2	3	4	5	6	7...	病毒对照	红细胞对照
稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128		
PBS	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05
	} \	} \	} \	} \	} \	} \	} \ 弃 0.025		
本血清	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025		
4HAU 抗原	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
1%鸡红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

附注: 1%鸡红细胞悬液的标定

对首次配制的鸡红细胞悬液应进行标定。取配好的红细胞悬液(附录3702)60ml,自然沉淀后,弃掉上部PBS 50ml,混匀后装入离心管内,以10000r/min离心5分钟,红细胞压积应为6.0%。

修订说明:

1. 本标准系在2020年版《中国兽药典》附录3404的基础上提出修订。
2. 依据2024年第2次审查会议建议,同意将“室温”反应温度修改为“室温(15~25℃)”。理由:《中国兽药典》2020版三部凡例中指定室温范围为10~30℃,但在检验中发现,高温在HA试验中易引起试验不成立,故以加括弧的形式对室温的温度范围加以限制,修改为“室温(15~25℃)”。
3. 会议同意根据国家标准GB/T 17999.2-2008,增加血凝反应程度判定标准。
4. 依据2024年第2次审查会议建议,删除增加“或适宜稀释液”“其它红细胞悬液(.....)”,“或置37℃60分钟”的修改。
5. 修订完善后的标准,与2020年版兽药典三部附录3404相比,主要有2处修改,一是规定了室温的温度限定为(15~25℃),二是增加了血凝反应程度标准。其余属于文字规范性修订。修订之处已用红色字体标出。