

ICS 65.020.30
B 44



中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.56—2008
代替 GB/T 14926.56—2001

实验动物 狂犬病病毒检测方法

Laboratory animal—Method for examination of Rabies virus

2008-12-10 发布

2009-03-01 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

GB/T 14926《实验动物》共 54 个部分,为不同微生物和病毒检测技术方法。

本部分自实施之日起代替 GB/T 14926.56—2001《实验动物 狂犬病病毒检测方法》。

本部分与 GB/T 14926.56—2001 相比主要技术差异如下:

- a) 删除原标准中“2 引用标准”内容;
- b) 对原标准中“3 原理”中所有内容改为“在微孔板上预包被纯化狂犬病毒抗原,使免疫反应在固相载体上进行。当被检血清中有狂犬病病毒抗体存在时,则与孔壁上的抗原形成抗原-抗体复合物,再与抗犬 IgG 酶标记物反应,最后通过测定酶作用底物催化后的产物,进行定性检测”;
- c) 删除原标准中所有关于血凝抑制试验的试剂、方法及结果判定;
- d) 对原标准中所有关于酶联免疫吸附试验的内容进行修改,包括试剂、方法及结果判定等;
- e) 对原标准中“6 结果判定”中增加了“6.3 基础级犬群体免疫抗体合格率:免疫抗体合格率= $(\text{被检动物抗体阳性数}/\text{被检动物总数})\times 100\%$ 。基础级犬群体免疫抗体合格率达到 70%以上可判为该犬群免疫合格”内容。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会提出并归口。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会负责起草。

本部分主要起草人:田克恭、陈西钊、曹振、王传彬、何秀敏、汤汉文。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 14926.56—2001。

实验动物 狂犬病病毒检测方法

1 范围

GB/T 14926 的本部分规定了狂犬病病毒(RV)的检测方法、试剂等。
本部分适用于犬 RV 的检测。

2 原理

在微孔板上预包被纯化狂犬病毒抗原,使免疫反应在固相载体上进行。当被检血清中有狂犬病病毒抗体存在时,则与孔壁上的抗原形成抗原-抗体复合物,再与抗犬 IgG 酶标记物反应,最后通过测定酶作用底物催化后的产物,进行定性检测。

3 主要试剂和器材

3.1 试剂

犬狂犬病毒 IgG 抗体检测试剂盒(定性),包括:

- a) 预包被狂犬病毒抗原的微孔板;
- b) 狂犬病毒 IgG 酶标记物;
- c) 狂犬病毒 IgG 阳性对照;
- d) 狂犬病毒 IgG 临界对照;
- e) 狂犬病毒 IgG 阴性对照;
- f) 显色液 A:磷酸氢=钠-柠檬酸缓冲液(0.05 mol/L, pH5.0)1 000 mL,30%过氧化氢 H_2O_2 (MW34.0)3.5 mL;
- g) 显色液 B:柠檬酸 1.052 g,乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)0.186 g,四甲基联苯胺(TMB) 0.25 g,二甲基亚砷(DMSO)8.0 mL,纯化水 992 mL;
- h) 终止液:98%硫酸 27.8 mL,纯化水 972.2 mL;
- i) 10 倍浓缩洗涤液:PBS(0.1 mol/L pH7.2~7.4)995 mL,吐温-20,5 mL;
- j) 样品稀释液:硼酸盐缓冲液(0.01 mol/L pH8.0)956.0 mL,甘油(MW92.09)40.0 mL,酪蛋白(casein)10%硫柳汞钠溶液 2.0 mL,吐温-20,1.0 mL 1%酚红溶液,1.0mL。

试剂在使用前应恢复至室温(18 °C~25 °C)。

3.2 器材

器材包括:

- a) 精密移液器 10 μ L~100 μ L;
- b) 一次性移液器吸头;
- c) 振荡器;
- d) 酶标仪(含 450 nm 波长滤光片);
- e) 37 °C 恒温培养箱;
- f) 蒸馏水或去离子水;
- g) 100 mL 量筒;
- h) 离心机;
- i) 吸水纸。

4 检测方法

4.1 样品的准备

将采集到的待检犬血液样品离心,分离出待检犬血清或血浆。应避免使用染菌、溶血和高血脂的样品;室温保存样品不应超过8 h,若试验在8 h以后进行,需将样品保存在2℃~10℃,如保存超过1周,则应保存在-20℃并避免反复冻融。

4.2 试剂配置

将10倍浓缩洗涤液恢复至室温,并振摇,然后用去离子水或蒸馏水作10倍稀释。

4.3 稀释样品

将已分离好的犬血清或血浆用样品稀释液做1:10稀释,即取50μL血清或血浆加入到500μL样品稀释液中,并充分混匀。

4.4 加样

取所需量的预包被微孔板条固定于板架上,依次加入稀释好的样品,100μL/孔,然后将阳性、阴性对照各加1孔,临界对照加3孔,100μL/孔,另留一孔不加样品作为空白对照,在记录纸上记录各样品和对照的次序或位置,剩余的板条放入密封袋中保存。

4.5 孵育

加样完成后,用封板膜覆盖板条,置37℃恒温培养箱中孵育30 min。

4.6 洗板

甩净孔中液体,拍干,用稀释好的洗涤液加满每孔,停留1 min后甩净、拍干,如此重复洗涤3次。

4.7 加酶

除空白对照外,其余各孔垂直滴加酶标记物1滴(50μL),置37℃恒温培养箱孵育30 min。

4.8 显色

重复步骤4.6洗板3次,拍干后每孔(含空白对照孔)垂直滴加显色液A、B液各1滴,置37℃恒温培养箱避光显色10 min。

4.9 终止

每孔(含空白对照孔)立即加入终止液1滴,混匀后以空白孔调零,用酶标仪450 nm波长测定A值。

5 结果判定

5.1 试验结果符合下列条件,方为有效:以空白孔调零,阴性对照值小于等于0.10,临界对照A值应在0.15~0.40之间,证明试验成立。

5.2 结果判定

5.2.1 待检样品A值大于等于临界对照A值的平均值,判为阳性;

5.2.2 待检样品A值小于临界对照A值的平均值,判为阴性。

6 结果解释

6.1 基础级犬:接种疫苗后,经ELISA检测抗体效价达到阳性值判为合格。

6.2 SPF级犬,不应进行疫苗接种,对阳性检测结果,选用同一种方法或另一种方法重试。如为阳性则判为阳性。

6.3 基础级犬群体免疫抗体合格率:

免疫抗体合格率=(被检动物抗体阳性数/被检动物总数)×100%

基础级犬群体免疫抗体合格率达到70%以上可判为该犬群免疫合格。

7 结果报告

根据判定结果,作出报告。
