



中华人民共和国国家标准

GB/T 18638—2021

代替GB/T 18638—2002

流行性乙型脑炎诊断技术

Diagnostic techniques for Japanese encephalitis

2021-03-09发布

2021-10-01实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 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 临床诊断	1
5 实验室诊断样品采集及处理	2
6 病毒分离鉴定	3
7 病毒RT-PCR 检测方法	5
8 补体结合试验检测方法	7
9 血凝抑制试验检测方法	9
10 间接 ELISA 抗体检测方法	11
11 间接免疫荧光试验 (IFA) 检测方法	13
12 病毒中和试验检测方法	14
13 综合判定	16
附录 A (规范性附录) 病毒RT-PCR 检测方法试验用试剂配制	17
附录 B (规范性附录) 补体结合试验检测方法和血凝抑制试验检测方法用试剂配制	18
附录C (规范性附录) 补体结合试验检测方法的预备试验	20
附录 D (资料性附录) 补体结合试验检测方法及血凝抑制试验检测方法结果判定示意图	23
附录E (规范性附录) 间接 ELISA 抗体检测方法试验用试剂配制	24
附录F (规范性附录) 间接免疫荧光试验 (IFA) 检测方法试验用试剂配制	26

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准代替GB/T 18638—2002《流行性乙型脑炎诊断技术》，与GB/T 18638—2002相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 增加了“规范性引用文件”（见第2章）；
- 增加了“缩略语”（见第3章）；
 - 增加了“病毒RT-PCR检测方法”（见第7章）；
- 增加了“间接ELISA抗体检测方法”（见第10章）；
- 增加了“间接免疫荧光试验(IFA)检测方法”（见第11章）；
- 增加了“病毒中和试验检测方法”（见第12章）；
- 增加了病毒RT-PCR检测方法试验用试剂配制（见附录A）；
- 增加了补体结合试验检测方法及血凝抑制试验检测方法结果判定示意图（见附录D）；
 - 增加了间接ELISA抗体检测方法试验用试剂配制（见附录E）；
- 增加了间接免疫荧光试验(IFA)检测方法试验用试剂配制（见附录F）。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

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：军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所、温州大学、华中农业大学、吉林大学。

引 言

流行性乙型脑炎(Japanese encephalitis)又称日本乙型脑炎,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。马呈现脑炎症状,猪表现流产、死胎和睾丸炎,其他家畜和家禽大多呈隐性感染。有明显的季节性,于夏、秋季多发。本病分布很广,主要存在亚洲地区,给人畜健康和国民经济造成很大的危害和损失。

引起本病的病原体为流行性乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus),该病毒属于黄病毒科(Flaviviridae) 黄病毒属(Flavivirus),是一种单股 RNA 病毒,病毒粒子呈球形,有脂蛋白的囊膜,具有血凝活性,能凝集鸡、鸭、鹅及绵羊红细胞。该病毒对外界抵抗力不强,对化学药品较敏感,常用消毒药都有良好的灭活作用,对胰酶、乙醚、三氯甲烷等亦敏感。

世界动物卫生组织(OIE) 推荐采用病毒分离鉴定、免疫荧光试验、血凝抑制试验、补体结合试验、血清中和试验等方法进行诊断。我国对该病的研究报道较多,目前比较常用的诊断方法仍是本标准规定的临床诊断、病毒分离鉴定、血凝抑制试验、补体结合试验、RT-PCR 试验、间接ELISA 试验、间接免疫荧光试验和病毒中和试验。进行病毒分离鉴定时,要求所有样品处理应在可保证生物安全的相应级别实验室内进行操作;处理样品使用过的容器、物品、实验材料均应经有效消毒处理后方可运离实验室。

本标准的修订参考了 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》2018版(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals,2018),并结合了我国相关技术研究新成果。本标准的实施,对提高流行性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,将起到重要作用。

流行性乙型脑炎诊断技术

1 范围

本标准规定了流行性乙型脑炎(Japanese encephalitis,JE)的临床诊断和实验室诊断的技术要求。本标准适用于猪、马、骡、驴、牛、羊、狗、鸭、鹅和鸟等动物的流行性乙型脑炎的诊断和检疫。

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 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 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。

BBS 硼酸盐缓冲液(borate buffered saline)

CFT 补体结合试验(complement fixation test)

CPE 细胞病变效应(cytopathic effect)

DEPC 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)

DNA 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTP 脱氧核糖三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)

ELISA 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay)

FITC 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate)

HRP 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)

JEV 流行性乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus)

PBS 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)

RNA 核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-PCR 反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction)

TCID₅₀ 半数组织培养感染剂量(median tissue culture infective dose)

4 临床诊断

4.1 易感动物

猪、马、骡、驴、牛、羊、狗、鸭、鹅和鸟等多种动物均可被感染，其中猪的感染最为常见。

4.2 临床症状

4.2.1 猪感染后出现发热，少数猪会出现神经症状。怀孕母猪可引起流产、产死胎，公猪出现睾丸肿大。

4.2.2 马感染后体温升高(39℃~41℃)，出现神经症状(沉郁或狂躁不安)，姿势异常，走路摇晃或转圈，四肢呈游泳状态。

GB/T 18638—2021

4.2.3 其他动物多为隐性感染，无明显临床症状。

4.3 病理变化

4.3.1 感染猪病理变化

4.3.1.1 流产胎儿脑水肿，皮下血样浸润，肌肉似水煮样，腹水增多。

4.3.1.2 肝、脾、肾有坏死灶。

4.3.1.3 全身淋巴结出血，肺瘀血、水肿，子宫黏膜充血、出血和有黏液，胎盘水肿或见出血。

4.3.1.4 公猪睾丸实质充血、出血和小坏死灶，睾丸硬化，体积缩小，与阴囊粘连，实质结缔组织化。

4.3.2 感染马病理变化

4.3.2.1 脑脊液增量，血管充血，脑膜下出血。

4.3.2.2 脑组织有不同形态的软化灶，脑神经细胞浓缩、变性、坏死，甚至有脱髓现象。

4.3.2.3 呈小胶质细胞增生反应，并呈卫星现象——假嗜神经或嗜神经。

4.3.2.4 皮下组织轻度黄染，心冠脂肪胶样浸润，心内膜和心外膜有出血点，肾包膜下出血。

4.4 初步诊断

4.4.1 易感动物出现上述临床症状和病理变化，可判定为疑似JEV 感染。

4.4.2 确诊应采集样品进行实验室诊断。

5 实验室诊断样品采集及处理

5.1 器材

5.1.1 组织研磨器。

5.1.2 G5级玻璃滤器。

5.1.3 孔径0.45 μm的微孔滤膜。

5.1.4 注射器(0.2 mL和10 mL)及针头。

5.1.5 离心管(1.5 mL和10 mL)。

5.1.6 医用防护服。

5.1.7 灭菌玻璃瓶(10 mL)。

5.2 试剂

5.2.1 汉克氏(Hank's)液。

5.2.2 0.5%水解乳蛋白 Hank's 液。

5.2.3 20000 IU/mL青霉素液。

5.2.4 20000 μg/mL链霉素液。

5.3 样品采集

5.3.1 生物安全措施

样品采集的生物安全措施符合GB/T 18088的规定。

5.3.2 脑脊髓液样品采集

在流行性乙型脑炎流行早期和发病早期(即病毒血症阶段),无菌采集动物的脑脊髓液,每头应不少

于1 mL, 穿刺部位在两髂连线中点稍下方第七腰椎间隙。

5.3.3 睾丸样品采集

采集种公病畜的异常(肿胀或萎缩)睾丸, 切成小块, 置于灭菌玻璃瓶。

5.3.4 病死动物脑组织样品采集

应在病畜(包括流产死胎)死亡后3 h 内采取脑组织(选大脑皮质、脑干、中脑、海马回及桥脑)数小块, 置于灭菌玻璃瓶。

5.3.5 血清样品采集

无菌采集病畜血液, 每头应不少于5 mL, 无菌分离血清, 装入离心管中, 加盖密封后冷藏或冷冻保存。

5.4 样品处理

5.4.1 生物安全措施

样品处理的生物安全措施符合GB 19489的规定。

5.4.2 组织样品处理

将采集的动物脑组织或睾丸组织在组织研磨器中充分研磨, 加入青霉素500 IU/mL 和链霉素500 pg/mL, 加入0.5%水解乳蛋白Hank's 液, 制成10%悬液, 4℃浸泡3 h~4 h, 3000 r/min 离心30 min, 取上清液备用。

5.4.3 怀疑有污染的样品, 可用0.45 μm 微孔滤膜过滤法处理。

6 病毒分离鉴定

6.1 器材

6.1.1.25 cm² 细胞培养瓶。

6.1.2 吸管。

6.1.3 试管。

6.1.4 水浴箱。

6.1.5 恒温培养箱。

6.1.6 倒置显微镜。

6.2 试剂

6.2.1.7 %碳酸氢钠液。

6.2.2 1%胰蛋白酶液。

6.2.3 1%酚红(中性)液。

6.2.4 最低必要成分培养液(MEM)。

6.2.5 小牛血清。

6.3 试验动物与细胞

6.3.1 清洁级BALB/c 小鼠(6 g~8 g)。

6.3.2 3日龄乳鼠。

6.3.3 乳仓鼠肾细胞系(BHK-21)。

6.3.4 非洲绿猴肾细胞系(Vero)。

6.3.5 白纹伊蚊传代细胞系(C6/36)。

6.4 操作程序

6.4.1 乳鼠分离病毒

6.4.1.1 接种：5.3.2中采集的脑脊髓液和5.4.2中制备的上清液，取6 g~8g 小鼠10只(或3日龄乳鼠1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0.5 mL注射器在消毒部位刺入硬脑膜下，每只小鼠注射0.03 mL(或乳鼠0.01 mL)。然后用左手拇指及食指抓住小鼠头顶皮肤，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0.5 mL(或乳鼠0.2 mL)。同时设健康对照，对照鼠按同法同剂量接种MEM培养液。

6.4.1.2 观察记录：接种12 h以后，对小鼠(或乳鼠)进行连续观察。健康对照鼠接种后应无异常表现。若被检样品中含有JEV，通常在接种7 d内，实验鼠出现JEV感染症状，表现为松毛、弓背、沉郁、震颤、绕圈、后肢麻痹，死亡。

6.4.1.3 盲传：若接种小鼠(或乳鼠)第一代96 h后未见发病症状，则处死第一代乳鼠，按5.4.2所述方法将小鼠(或乳鼠)脑组织制成1:5组织悬液，按6.4.1.1所述方法再次接种小鼠(或乳鼠)。如此盲传3代。

6.4.1.4 收集发病死亡鼠，无菌解剖取鼠脑组织，按5.4.2所述方法将乳鼠脑组织制成样品，置-70℃保存，用于病毒鉴定。

6.4.2 细胞分离病毒

6.4.2.1 制备单层细胞：按常规法将传代细胞(BHK-21、Vero或C6/36)分装在25 cm²细胞培养瓶中，每瓶分装细胞悬液5 mL，细胞浓度应为 2×10^5 个/mL~ 3×10^5 个/mL，37℃培养48 h。

6.4.2.2 接种细胞：5.3.2中采集的脑脊髓液和5.4.2中制备的上清液，或6.4.1.4中制备的鼠脑组织样本离心后取上清液，接种BHK-21、Vero或C6/36传代细胞。每份样品接种2瓶细胞，另设对照细胞2瓶。接种前，先倒去细胞培养瓶中营养液，加入1 mL已经处理好的病料液，37℃吸附1 h，用Hank's液洗1次，再加入4 mL细胞维持液。对照细胞不接种样品，倒去营养液后加4 mL细胞维持液，37℃培养3 d~5 d。

6.4.2.3 观察和记录：若被检样品中含有JEV，通常在接种2 d~3 d后出现CPE，主要呈现细胞萎缩、脱落形成空斑。对照细胞单层完好，细胞形态基本正常。收获细胞液，置-70℃保存，用于病毒鉴定。

6.4.2.4 盲传：如接种细胞第1代72 h后未出现CPE，收获细胞/病毒液按6.4.2.2所述方法再接种生长48h的单层细胞进行盲传，即1 mL第1代细胞/病毒液加4 mL细胞维持液，37℃培养。如此盲传3代。

6.5 病毒鉴定

对发病死亡的小鼠(或乳鼠)和出现CPE的细胞培养液，选用病毒RT-PCR检测方法(第7章)通过核酸鉴定和分析进行病毒鉴定。

6.6 结果判定

6.6.1 小鼠(或乳鼠)盲传3代无发病症状，细胞盲传3代未见细胞病变，且经6.5所述方法检测阴性者，判定为JEV 分离阴性。

6.6.2 对发病死亡小鼠(或乳鼠)和出现CPE的细胞培养液,经6.5所述方法检测阳性者,判定为JEV分离阳性。

7 病毒RT-PCR检测方法

7.1 器材

- 7.1.1 台式高速(12000 r/min)离心机。
- 7.1.2 基因扩增仪。
- 7.1.3 稳压稳流电泳仪。
- 7.1.4 水平电泳槽。
- 7.1.5 电泳凝胶成像分析系统(或紫外透射仪)。
- 7.1.6 成套可调移液器(量程范围0.5 μL~1000μL)及匹配的吸头。
- 7.1.7 带盖的塑料离心管。
- 7.1.8 无RNA酶的离心管与吸头。
- 7.1.9 PCR管。

7.2 试剂

7.2.1 通用试剂

- 7.2.1.1 变性液: 6 mol/L 异硫氰酸胍或Trizol裂解液。
- 7.2.1.2 酚氯仿抽提液: 苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)混合液。
- 7.2.1.3 异丙醇: 分析纯。
- 7.2.1.4 75%乙醇: 无水乙醇(分析纯)与DEPC水按3:1配制而成。
- 7.2.1.5 DEPC水: 将DEPC按0.1%(体积分数)加入双蒸馏水(dd H₂O)配制而成。

7.2.2 RT-PCR试剂

- 7.2.2.1 10×一步RNA PCR缓冲液。
- 7.2.2.2 逆转录酶(AMV):5 U/μL。
- 7.2.2.3 RNase抑制剂: 40 U/μL。
- 7.2.2.4 优化的AMV Taq:5 U/μL。
- 7.2.2.5 dNTP混合液: 包括dATP、dTTP、dCTP、dGTP,各10 mmol/L。
- 7.2.2.6 MgCl₂:25 mmol/L。
- 7.2.2.7 引物: PAGE 纯度,在PCR反应体系中的终浓度各50 pmol/L。
 - 7.2.2.7.1 上游引物: 5'-GACACTGGATGTGCCATTGAC-3';
 - 7.2.2.7.2 下游引物: 5'-GGCATTCCCTTTGTCTCAGGTC-3'。

7.2.3 电泳试剂

7.2.3.1 电泳缓冲液：50×TAE 贮存液(见附录 A)，临用时加蒸馏水配成1×TAE 缓冲液。

7.2.3.2 琼脂糖：国产或进口的低熔点琼脂糖，制胶时用。

7.2.3.3 电泳加样缓冲液：含溴酚蓝0.25 g、丙三醇(甘油)30 mL、双蒸水70 mL。

7.2.3.4 DNA分子质量标准：分子大小范围100 bp~1000 bp,100 bp梯度。

7.3 样品准备

7.3.1 在生物安全柜中，将采集到的病料组织(如脑、死胎、睾丸)置乳钵中(冰上操作)，剪碎，加灭菌石

英砂研磨；然后加0.04 mol/L PBS(pH 7.4)(见附录B中B.5)制成1:5的悬液；置4℃冰箱过夜，再于-20℃~-30℃冻融2次，3000 r/min离心10 min，取上清液作为检测材料。

7.3.2 液体样品(如脑脊液、病毒细胞培养物)可直接用于提取总RNA，而组织研磨液(若混有脂肪)在提取总RNA之前，需用等量酚氯仿抽提。

7.3.3 阳性对照样品：以已知病毒材料(如JEV感染乳鼠或细胞培养物)为阳性对照，与待检病料同时提取总RNA(冰上操作)，再进行定性RT-PCR，其扩增产物可作为电泳阳性对照样品。

7.4 操作程序

7.4.1 总RNA提取

7.4.1.1 在核酸提取室操作。RNA提取使用变性液手工提取，也可使用等效的商品化试剂盒。

7.4.1.2 取n个灭菌的1.5 mL无RNA酶离心管，其中n为待检样品数+阳性对照+阴性对照，对每个离心管进行编号。

7.4.1.3 每管加入600 μL变性液，再分别加入被检样品、阳性对照及阴性对照各200 μL，颠倒10次混匀，最后加入200 μL酚氯仿抽提液，涡旋振荡5 s，4℃条件下12000 r/min离心15 min。

7.4.1.4 将上层透明液体(约400 μL)转移到一个新的无RNA酶离心管中，加入等体积预冷的异丙醇，每个离心管对应编号。

7.4.1.5 12000 r/min离心15 min，弃去上清液，沿管壁缓缓加入0.8 mL 75%乙醇，颠倒3次~6次混匀，12000 r/min离心10 min。反复洗涤两次后，将离心管倒扣于吸水纸上，自然晾干或用移液器移去残液。

7.4.1.6 加入20 μL DEPC水，轻轻混匀，溶解RNA。提取的RNA应尽快进行反转录扩增或放置于-70℃冰箱保存。

7.4.1.7 提取过程中要注意交叉污染，移液过程每份样品都需更换吸头，不同样品离心管倒扣在吸水纸上不同位置。

7.4.2 一步法RT-PCR

7.4.2.1 反应体系配制

扩增体系配制如下：

10×一步RNA PCR缓冲液	2.5 μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	5 μL
dNTP(各10 mmol/L)	2.5 pL
RNase抑制剂(40 U/μL)	0.5 μL
AMV(5 U/μL)	0.5 μL
优化的AMV Taq(5 U/pL)	0.5 μL
下游引物(50 pmol/μL)	0.5 μL
上游引物(50 pmol/pL)	12.5 μL
DEPC水	

7.4.2.2 反应程序设置

扩增程序设置如下:

a) 50°C, 30 min;

b) 94°C, 5 min;

c) 94°C, 40 s; 55°C, 30 s; 72 °C, 30 s; 30次循环;

d)72 °C,7 min。

7.4.3 扩增产物电泳检测

7.4.3.1 琼脂糖凝胶板的制备：称取1g 琼脂糖，加入100 mL 1×TAE缓冲液中，加热融化后加5 μL (10 mg/mL) 溴化乙锭，混匀后倒入放置在水平面上的凝胶盘中，胶板厚5 mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子，待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔)，放入电泳槽中，加1×TAE 缓冲液淹没胶面。

7.4.3.2 加样：取6 μL~8μL PCR 扩增产物和2 μL~3μL 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳至少加1孔阳性样品的扩增产物作为对照。同时加DNA Marker作分子量大小对照。

7.4.3.3 电泳：在电压80 V~100 V或电流25 mA~40 mA条件下电泳10 min。

7.4.3.4 凝胶成像：电泳结束后，取出凝胶板，置于紫外透射仪上打开紫外灯观察。阳性样品PCR 产物条带大小应为430 bp, 与阳性对照一致，同时阴性对照无条带。

7.4.3.5 DNA测序分析：将阳性样品PCR 产物测序分析，验证阳性样品DNA 条带是否属于流行性乙型脑炎病毒。

7.5 结果判定

扩增产物的DNA 条带为430 bp, 与阳性对照一致，同时阴性对照无条带；且测序分析验证为流行性乙型脑炎病毒，即判为阳性。

8 补体结合试验检测方法

8.1 器材

8.1.1 试管(7.5 cm×1.0 cm)。

8.1.2 吸管(10 mL、2 mL、1 mL)。

8.1.3 试管架。

8.1.4 水浴锅(37℃~38℃)。

8.1.5 离心机。

8.1.6 离心管。

8.2 试剂

8.2.1 抗原：流行性乙型脑炎抗原和病毒阳性对照抗原。

8.2.2 溶血素：效价大于1:5000。

8.2.3 补体：取3只~5只成年豚鼠新鲜血清混合而成。

8.2.4 1%绵羊红细胞悬液：采集适量健康绵羊抗凝血，加入2.5倍~3倍体积的阿氏液(见B.1)，可放于4℃冰箱保存1个月。用时取适量绵羊红细胞悬液，加入5倍~10倍体积的生理盐水(见B.2)，充分混匀，以2000 r/min 离心15 min, 弃上清液。如此洗涤3次。再加入5倍~10倍体积的生理盐水悬浮红细胞，充分混匀，以2500 r/min 离心15 min, 弃上清液，沉淀的红细胞以生理盐水配成1%红细胞悬液。

8.2.5 标准阳性对照血清。

8.2.6 标准阴性对照血清。

8.2.7 钙镁溶液：见B.3。

8.3 被检样品

8.3.1 被检血清：应于发病早期和病后第4周各采血1次，无菌分离血清，密封装入灭菌小瓶，2℃~8℃保存或-20℃长期保存。操作过程中应避免污染，且须保证血清新鲜透明不溶血。

8.3.2 灭活处理：试验前应将标准阳性血清、标准阴性血清及被检血清进行灭活。灭活时间均为30 min。不同种类动物灭活温度存在差异，其中豚鼠56℃，马58℃~60℃，人、猴及小鼠60℃，牛、水牛、山羊、狗、猪及仓鼠62℃，骡和驴63℃~64℃，家兔65℃。

8.4 操作程序

8.4.1 预备试验

见附录C。

8.4.2 正式试验

8.4.2.1 试剂的稀释

8.4.2.1.1 将溶血素、抗原及补体按预备实验测定的结果进行稀释。

8.4.2.1.2 将灭活后的标准阳性血清、标准阴性血清及被检血清分别进行2倍连续系列稀释。标准阳性血清稀释倍数要大于其标注效价，标准阴性血清一般作3个连续稀释梯度。

8.4.2.2 操作程序

8.4.2.2.1 取3排小试管，每排6支，按照拟加入的抗原类型均分为3组，即流行性乙型脑炎抗原组、正常对照抗原组、钙镁溶液组。

8.4.2.2.2 将倍比稀释的被检血清分别加入到对应的小试管中，具体操作程序见表1。

8.4.2.2.3 于各稀释度的血清中分别加入0.1 mL 抗原，即流行性乙型脑炎抗原、正常对照抗原、钙镁溶液。

8.4.2.2.4 于各管中加入补体0.2 mL。

8.4.2.2.5 振荡摇匀，4℃冰箱过夜感作。

8.4.2.2.6 于各管中加入致敏绵羊红细胞悬液0.2 mL。

8.4.2.2.7 37℃水浴感作30 min, 而后对结果进行判定。

表 1 试验组滴加法

试管号		1	2	3	4	5	6
被检血清	血清稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	加入量/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
流行性乙型脑炎抗原(或正常对照抗原、							

钙镁溶液)加入量/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
补体加入量/mL	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
第一次感作	4 °C冰箱过夜					
致敏绵羊红细胞量/mL	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
第二次感作	37 °C水浴30 min					
结果判定示例	++++	++++	++++	+		

8.4.2.3 对照

8.4.2.3.1 标准阳性血清：按照8.4.2.2操作进行。

8.4.2.3.2 标准阴性血清：按照8.4.2.2操作进行。

8.4.2.3.3 血清抗补体稀释对照：按照表2操作进行。

8.4.2.3.4 红细胞对照：按照表2操作进行。

8.4.2.3.5 抗原对照：按照表2操作进行。

8.4.2.3.6 补体对照：按照表2操作进行。

表 2 对照组滴加法

对照组别	不同稀释度血清抗补体对照						红细胞对照	抗原对照	补体对照
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64			
血清加入量/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			
抗原加入量/mL								0.1	—
稀释液加入量/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.1	0.2
补体加入量/mL	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		0.2	0.2
第一次感作	4 ℃冰箱过夜								
致敏绵羊红细胞量/mL	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
第二次感作	37 ℃水浴30 min								
结果判定示例	++++	++++	++++	++	+	—	++++		

8.5 结果判定

8.5.1 判定标准：各对照组结果均成立时方可进行结果判定，否则应考虑重新采集血液或改用其他方法。各对照组结果如下：

- a) 标准阳性血清：抑制溶血，结果与已知效价相差±1个滴度；
- b) 标准阴性血清：100%溶血(—)；
- c) 血清抗补体对照组：100%溶血(—)；
- d) 红细胞对照组：不溶血(++++)；
- e) 抗原对照组：不溶血(++++)；
- f) 补体对照组：50%溶血(++)。

8.5.2 结果表示方法见C.3.2。血清效价以50%抑制溶血(++)为判定终点(溶血判定示意图见图D. 1)。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要
下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/177021131134006135>