

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 537—2002

---

## 猪放线杆菌胸膜肺炎诊断技术

Diagnostic techniques for actinobacillus pleuropneumonia

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

猪放线杆菌胸膜肺炎(简称 APP)又称猪接触性传染性胸膜肺炎(porcine contagious pleuropneumonia),是猪的一种呼吸系统重要传染病。世界各国均有发生。本病主要引起猪的一种伴有胸膜炎的出血性坏死性肺炎,多呈最急性或急性病程而迅速致死,可发生于任何年龄的猪只。尤其在集约化养猪场一旦发生会造成重大经济损失。

国外用于本病的血清学诊断方法有凝集反应、琼脂扩散、间接血凝、补体结合(CF)以及酶联免疫吸附试验(ELISA)等。而最常应用的血清学诊断方法是CF和ELISA试验。细菌的鉴定除用常规方法外,也有用聚合酶链反应(PCR)方法诊断。型的鉴定常规方法有琼脂扩散和间接血凝等试验方法,近来亦有应用核糖核酸分型的试验报道。

本标准的附录A、附录B、附录C、附录D、附录E、附录F、附录G、附录H均为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

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:农业部动物检疫所。

本标准主要起草人:朱士盛、杜文金、徐瑞、王新。

## 猪放线杆菌胸膜肺炎诊断技术

### 1 范围

本标准规定了猪放线杆菌胸膜肺炎的诊断技术。

本标准酶联免疫吸附试验用于筛选试验,包括产地检疫、流行病学调查和无本病健康猪群的建立。补体结合试验适用于口岸进口猪检疫。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 4789.28—1994 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

### 3 病原学检查

#### 3.1 材料准备

##### 3.1.1 培养基

3.1.1.1 营养琼脂:按 GB 4789.28—1994 中 4.7 规定配制。

3.1.1.2 血琼脂:按 GB 4789.28—1994 中 4.6 规定配制,其中 4.6.1 成分用 4.7.1 成分代替。

3.1.1.3 尿素琼脂:按 GB 4789.28—1994 中 3.15 规定配制。

3.1.1.4 巧克力琼脂:制备方法见附录 A。

3.1.1.5 类胸膜肺炎微生物(PPLO)琼脂:制备方法见附录 A。

##### 3.1.2 其他材料

3.1.2.1 灭菌棉拭子。

3.1.2.2 革兰氏染色液:按 GB 4789.28—1994 中 2.2 规定制备和染色。

3.1.2.3 糖发酵管:按 GB 4789.28—1994 中 3.2 规定制备,3.2.1 成分中蛋白胨改为多聚蛋白胨,pH 调至 7.2,另外,按 0.5%加入糖的同时,按 0.01%加入辅酶 A 后,分装于有倒置小管的试管内,68.94 kPa(115℃蒸汽)灭菌 15 min。

3.1.2.4 鸡表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌。

##### 3.2 病料采集

3.2.1 活体病料采集:用棉拭子伸入鼻腔采集分泌物,放入无菌试管中立即送往实验室供分离。

3.2.2 死后病料采集:无菌采集具有典型病变的肺气管、肺门淋巴结、鼻腔分泌物,在最急性感染死亡的小猪,除采集上述病料外,还可取肝、脾病料。

3.2.3 样品运送:采集的样品,应在 4℃条件下 24 h 内送到实验室。

##### 3.3 病原分离

将样品按常规分离要求直接接种到血琼脂(见 3.1.1.2)表面,再用鸡表皮葡萄球菌作交叉划线,于 37℃含 5%~10%二氧化碳(CO<sub>2</sub>)下培养。继代培养用巧克力琼脂(见第 A.1 章)和 PPLO 琼脂(见第 A.2 章)。

3.4 病原鉴定

3.4.1 培养形态及染色特性

3.4.1.1 于血琼脂平板培养 24 h~48 h,胸膜肺炎放线杆菌(APP)为露珠样的小菌落,直径 1 mm~2 mm。

3.4.1.2 多数菌株产生  $\beta$  溶血带,靠近鸡表皮葡萄球菌菌苔的菌落较大,随着与葡萄球菌生长线的距离增加而变小或不生长,即所谓“卫星现象”。

3.4.1.3 取典型菌落作革兰氏染色,应为革兰氏阴性小球杆菌,两极着色。继代培养中呈明显多形态。幼龄培养物中偶有成丝状。

3.4.1.4 被分离菌具有以下特点即可初步判定为猪胸膜肺炎放线杆菌:

- a) 染色镜检为革兰氏阴性杆菌或多形态;
- b) 在血琼脂培养基上生长具有溶血现象;
- c) 生长培养需要 V 因子,即具有“卫星现象”。

3.4.2 生化特性

3.4.2.1 V 因子需要测定:按 3.3 接种和 3.4.1 观察。有“卫星现象”为需要 V 因子。

3.4.2.2 尿素酶试验:将分离菌接种于尿素琼脂(见 3.1.1.3)斜面上,于 37℃温箱中培养 3 h~12 h,斜面变粉红色者为尿素酶试验阳性。

3.4.2.3 溶血性:将待检菌接种于血琼脂,37℃培养 18 h~24 h 后观察结果。多数菌株产生  $\beta$  溶血带。

3.4.2.4 过氧化氢酶试验:取干净的载玻片,在上面滴 1 滴 3%过氧化氢溶液,挑取一环斜面培养的试验菌,在过氧化氢溶液中混匀,若有气泡出现则为过氧化氢酶试验阳性。

3.4.2.5 CAMP<sup>1)</sup>试验:在血琼脂平皿上方用具有  $\beta$  溶血的金黄色葡萄球菌划一横线,在此横线下方,隔 0.3 cm~0.5 cm 处划垂直线接种被检菌,置 37℃培养 24 h,横线与垂直线相邻空间的溶血区明显增大者为阳性。

3.4.2.6 糖发酵试验:从琼脂斜面上挑取少量待检菌培养物,接种于糖发酵管(见 3.1.2.3)培养液内,于 37℃温箱内培养 2 d~3 d,能分解某种糖会产酸或产酸产气。产酸时,可使颜色变黄,产气者于倒置小发酵管内出现气泡。

3.4.2.7 被检菌生化特性鉴定详见表 1。

3.4.2.8 被检菌生长特性测定,凡 CAMP 反应、尿素酶试验均为阳性,能分解 D-木糖、甘露醇,不分解棉子糖、阿拉伯胶糖者,并具有 3.4.1.4 特性的,即可确认为猪胸膜肺炎放线杆菌。

表 1 生化特性鉴定

特性	胸膜肺炎放线杆菌	放线杆菌分类群 Minor	放线杆菌分类群 C	放线杆菌分类群 D	放线杆菌分类群 E	放线杆菌分类群 F	副猪嗜血杆菌
V 因子需要	V	+	+	+	V(60)	+	+
尿素酶	+	+	-	-	-	-	-
溶血性	V	V	-	-	-	-	-
过氧化氢酶	-(12)	-(13)	+	-	-	+	+
CAMP	+	-	-	-	-	-	-
葡萄糖产酸	+	+	+	+	V(30)	+	+
阿拉伯胶糖	-	-	+	+(86)	-	-	-
乳糖	-(6)	+(91)	-	+	-	V(30)	-

1) 对 B 族  $\beta$  溶血性链球菌的初步鉴定。

表 1(续)

特性	胸膜肺炎放线杆菌	放线杆菌分类群 Minor	放线杆菌分类群 C	放线杆菌分类群 D	放线杆菌分类群 E	放线杆菌分类群 F	副猪嗜血杆菌
甘露醇	+	-	-	+	-	-	-
蔗糖	+	+	+	+	-(10)	+	+
木糖	+(88)	-(30)	-	V(50)	-	-(25)	-
半乳糖	+	+(87)	+	+	-	+	+
甘露糖	+	+	+	+	-(10)	+	+
棉子糖	-	+	+	+	-	-	-
山梨醇	-	-	-	+	-	-	-
麦芽糖	+	+	+	+	V(20)	+	+

注：“V”为可变；“+”为阳性；“-”为阴性；(数字)为百分数。

### 3.4.3 型鉴定

#### 3.4.3.1 琼脂扩散试验

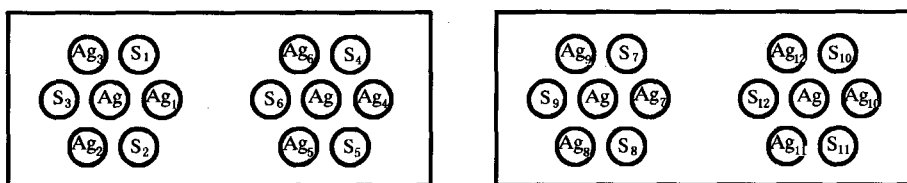
3.4.3.1.1 将初步判定为 APP 菌按附录 B 方法制备多糖抗原,作为琼脂扩散抗原。

3.4.3.1.2 APP1~12 型因子血清。

3.4.3.1.3 琼脂凝胶的制备:取琼脂糖 1.0 g,氯化钠 0.85 g,加蒸馏水至 100 mL,在沸水浴中溶化后,加 1% 硫柳汞 1 mL,混匀后按制板所需体积分装(如用 25.4 mm×76.2 mm 载玻片,胶厚 2 mm,需加琼脂凝胶 3.87 mL),4℃ 保存备用。

3.4.3.1.4 琼脂板的制备:临用前,取分装好的 4℃ 保存琼脂凝胶管,在沸水中溶化后,倒在水平玻璃板或载玻片上,凝固后按图 1 打孔,孔径 5 mm,孔距 5 mm,胶厚 2 mm,火焰封底。

3.4.3.1.5 加样:中间孔加待检菌多糖抗原,周边孔加 APP1~12 型因子血清和对应型标准株多糖抗原,加量以加满为宜(见图 1)。



Ag——待检菌多糖抗原;

Ag<sub>1</sub>~Ag<sub>12</sub>——分别为 APP1~12 型标准株多糖抗原;

S<sub>1</sub>~S<sub>12</sub>——分别为 App1~12 型标准株因子血清。

图 1 琼脂扩散示意图

3.4.3.1.6 加样完毕后,将凝胶板放入湿盒置 37℃ 温箱中反应,24 h 后观察并记录结果。

#### 3.4.3.2 型判定

被检抗原与标准型因子血清之间出现明显清晰的沉淀线,并与标准型抗原和标准型因子血清之间形成的沉淀线完全融合。即可判为该相关血清型。能与其中任何一型呈阳性反应,该菌又具 3.4.1.4 特性的,即可确认为猪胸膜肺炎放线杆菌。

## 4 补体结合试验

### 4.1 材料准备

4.1.1 巴比妥缓冲液(VBD),配制方法见附录 C。

4.1.2 抗原、标准阳性血清、标准阴性血清，稀释补体用的标准犍牛血清。

4.1.3 溶血素：效价滴定见附录 D。

4.1.4 补体：效价滴定方法见附录 E。

4.1.5 敏化红细胞：制备方法见附录 F。

4.1.6 标准溶血管：制备方法见附录 G。

4.2 操作方法

4.2.1 待检血清以及标准阴、阳性血清，均用生理盐水作 1 : 10 稀释于 60℃ 水浴锅中灭活 30 min。

4.2.2 每份待检血清用 2 支康氏管(10 mm×100 mm)，每管加入 1 : 10 稀释灭活血清 0.2 mL。

4.2.3 其中一管加工作量抗原 0.2 mL，另一管加 VBD 液 0.2 mL。

4.2.4 每管加入 50% 溶血补体量(5C'H<sub>50</sub>)补体 0.4 mL。

4.2.5 摇匀，放 4℃ 冰箱冷感作 15h~18 h。

4.2.6 每管加入致敏红细胞 0.2 mL。

4.2.7 37℃ 水浴 30 min。

4.2.8 不溶管以 1 000 r/min 离心 5 min，与标准管比色判定。

4.2.9 设标准阳性血清、标准阴性血清、补体对照(包括抗原、VBD)以及红细胞对照，各要素加量见表 2。

表 2 CF 试验操作程序

成分	被检血清		阳性血清对照		阴性血清对照		补体对照						红细胞对照
							抗原			VBD			
	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	5C'H <sub>50</sub>	2.5C'H <sub>50</sub>	1.25C'H <sub>50</sub>	5C'H <sub>50</sub>	2.5C'H <sub>50</sub>	1.25C'H <sub>50</sub>	
血清	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2							
抗原		0.2		0.2		0.2	0.2	0.2	0.2				
VBD	0.2		0.2		0.2		0.2	0.4	0.5	0.4	0.6	0.7	0.8
5C'H <sub>50</sub>	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.1	0.4	0.2	0.1	
摇匀，放 4℃ 冰箱 15 h~18 h													
敏化红细胞	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
37℃ 水浴 30 min，不溶者 1 000 r/min 离心 5 min，与标准管比色判定													
对照正确溶血/(%)	100		100	0~30	100	90~100	100	85~100	0~50	100	90~100	10~50	0

5 判定

5.1 对照组应符合正确溶血百分比(见表 2)，试验方成立，否则应重做。

5.2 判定标准：

- a) 被检血清 1 : 10 稀释 ≤ 30% 溶血为阳性(+)；
- b) 被检血清 1 : 10 稀释 > 50% 溶血为阴性(-)；
- c) 介于阴、阳性之间为可疑(±)；
- d) 可疑应重检，仍为可疑判为阳性。

6 酶联免疫吸附试验(ELISA)

6.1 材料准备

6.1.1 猪放线杆菌胸膜肺炎 1~12 型 ELISA 多价抗原、葡萄球菌 A 蛋白(SPA)辣根过氧化物酶

(HRP)标记物(HRP-SPA),以及标准阴、阳性血清。

6.1.2 试验溶液:配制方法见附录 H。

## 6.2 操作方法

6.2.1 抗原包被:用抗原包被液(见第 H.1 章),将猪放线杆菌胸膜肺炎 ELISA 抗原稀释成一个单位的抗原,用微量加样器将稀释好的抗原,加入到酶标板各孔内,每孔 50  $\mu\text{L}$ ,加盖后放 37 $^{\circ}\text{C}$  吸附 4 h,再转入 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱放置 18 h~20 h。

6.2.2 洗涤:甩掉酶标板孔内的抗原包被液,加入冲洗液(见第 H.2 章),室温下浸泡 2 min,甩去冲洗液,用吸水纸吸干并驱除孔内气泡。再重新加入冲洗液,按同法洗两次。

6.2.3 加入被检血清:被检血清先用血清稀释液(见第 H.3 章)作 1:200 稀释,每份血清加两孔,每孔 50  $\mu\text{L}$ 。

6.2.4 对照:每块酶标板均设标准阳性、阴性血清和空白孔对照。血清稀释和加量与 5.2.3 相同,空白对照加血清稀释液 50  $\mu\text{L}$ 。

6.2.5 加样完毕后加盖置 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱内 40 min。

6.2.6 取出酶标板将其甩干,用冲洗液洗涤 4 次。洗涤方法同 5.2.2。

6.2.7 加酶标记的 SPA:HRP-SPA 标记物用稀释液按标签记载之效价稀释后使用,每孔内加入 50  $\mu\text{L}$ 。置 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴或温箱中 30 min。

6.2.8 取出酶标板,将其甩干,用冲洗液冲洗 3 次,洗涤方法同 5.2.2。

6.2.9 加底物溶液:每孔加入新配制的底物溶液(见第 H.4 章)100  $\mu\text{L}$ ,置 37 $^{\circ}\text{C}$  避光反应,待标准阳性血清孔呈现淡黄色时终止反应(反应时间与室温有关约 5 min~10 min)。

6.2.10 终止反应:每孔加入终止液(见第 H.5 章)50  $\mu\text{L}$ 。

## 6.3 判定

6.3.1 在酶标仪 490 nm 波长处,测定酶标板的每孔光吸收值,求出每份被检两孔的平均光吸收值( $S$ ),除以同板标准阴性两孔的平均光吸收值( $N$ ),则得出每份被检血清的  $S/N$  值。

判定标准:每份血清 1:200 倍稀释的  $S/N$  值 $\geq 4$  为阳性, $S/N \leq 3.5$  的为阴性, $S/N$  介于 3.5 和 4 之间的为疑似。

6.3.2 目测判定:在无酶标仪情况下,可用直接目测方法。对各孔反应液颜色的深浅程度进行比较,被检样品的反应液颜色与标准阳性血清孔的颜色基本相同,呈淡棕红色判为阳性,颜色浅于标准阳性孔或无色者,判为阴性(判定时酶标板下衬以白色背景)。

**附 录 A**  
(规范性附录)  
培养基制备

**A. 1 巧克力琼脂**

**A. 1.1 猪肝汤制备**

A. 1.1.1 取洗净新鲜猪肝 400 g 和新鲜猪胃用清水洗 1~2 遍后剥离胃粘膜 200 g, 将两组织经绞碎后, 放入 5 000 mL 玻璃瓶中, 加入无离子水 4 000 mL, 按体积分数为 1% 加入盐酸, 于 55℃~56℃ 温箱内消化 24 h (前 8 h, 每小时摇振 1 次, 然后静置)。

A. 1.1.2 用乳胶管以虹吸法吸取上清, 煮沸 30 min, 用氢氧化钠 (NaOH) 调 pH 至 7.8, 分装于 500 mL 盐水瓶中, 103.4 kPa 121℃ 蒸汽灭菌 20 min, 放 4℃ 冰箱备用。

**A. 1.2 巧克力琼脂制备**

A. 1.2.1 取 A. 1.1 制备的猪肝汤 1 瓶, 按 2%~2.5% 加入琼脂, 加热熔化后, 103.4 kPa 灭菌 20 min, 待冷至 50℃ 时加入脱纤兔血 (或羊血), 每 100 mL 培养基加入脱纤血 8 mL, 摇匀。

A. 1.2.2 立即放于 83℃ 水浴加热 5 min~10 min, 边加热边摇动 (以血形成小颗粒状凝块为准, 夏季灭菌约 5 min, 冬季为 10 min) 后倾注平皿或分装于灭菌试管, 制成斜面。

**A. 2 PPLO 琼脂**

**A. 2.1 鸡肉汤制备**

去脂鸡肉绞碎后, 按 1:3 加无离子水浸泡, 置 4℃ 18 h~24 h, 次日煮沸 30 min, 乘热用绒布过滤除渣, 再用滤纸过滤。分装, 103.4 kPa 灭菌 20 min, 放 4℃ 冰箱备用。

**A. 2.2 PPLO 琼脂制备**

取 PPLO 琼脂粉 (Difco) 3.8 g, 溶于 100 mL 鸡肉汤中, 在水浴中加热使其完全熔化后, 103.4 kPa 灭菌 15 min, 冷至 55℃ 时, 按无菌要求加入先前已抽滤无菌 1% 辅酶 A 和 10% 葡萄糖各 1 mL, 健康马血清 (或鸡血清) 5 mL, 倾注平板或试管, 制成斜面。

**附 录 B**  
(规范性附录)  
多糖抗原的提取

**B. 1** 将接种在 PPLO 琼脂上生长 6 h 的 APP 培养物用适量生理盐水洗下, 以 4 000 r/min 离心 15 min, 去上清液, 再用生理盐水洗一次。

**B. 2** 沉淀菌体按 1:15 (V/V) 加入无离子水, 混匀后置于 68℃ 水浴中, 使瓶中菌液接近水浴温度, 再加入等体积 68℃ 90% 酚液, 置 68℃ 水浴 15 min~20 min, 其间不断搅拌。

**B. 3** 取出后在冰浴中冷却到 10℃ 左右。

**B. 4** 在 4℃ 下以 7 000 r/min 离心 20 min, 离心后分三层即水层、酚层和不溶解的部分。

**B. 5** 小心吸取上部水层。

**B. 6** 将酚层和不溶性物质再加入与 B. 2 中等量的 68℃ 无离子水, 搅拌后放 68℃ 水浴 15 min~20 min, 然后再重复 B. 3~B. 5 程序提取一次。

**B. 7** 将两次收集的水层混合, 即为 APP 琼脂扩散抗原。



## 附录 C

(规范性附录)

## 巴比妥缓冲液(VBD)的配制

## C.1 储藏缓冲液的配制

将下列试剂按次序加入 2 000 mL 体积的容器中:

氯化钠	83 g
蒸馏水	500 mL
巴比妥钠	10.19 g
1 mol/L 氯化镁溶液 <sup>2)</sup>	5 mL
0.3 mol/L 氯化钙溶液 <sup>3)</sup>	5 mL
蒸馏水加到	1 970 mL
再加入 1 mol/L 盐酸	20 mL~30 mL

混匀,取样用蒸馏水作 1:5 稀释,检查 pH 值应为 7.2~7.3,然后置低温冻存。

## C.2 明胶水溶液的配制

C.2.1 将 1.0 g 明胶加入 100 mL 蒸馏水中,煮沸溶解。

C.2.2 用蒸馏水稀释到 800 mL,4℃ 冰箱内保存供一周内使用。

## C.3 VBD 液的配制

将 1 体积的 C.1 液加到 4 倍体积 C.2 液中,摇匀置冰箱保存,供当日使用。

## 附录 D

(规范性附录)

## 溶血素效价滴定

D.1 先将溶血素用 VBD(见附录 C)作 1:100 稀释(取 0.2 mL 含等量甘油的溶血素,加 9.8 mL VBD),按表 D.1 制备 6 管不同稀释倍数溶血素。

表 D.1 溶血素稀释

单位为毫升

试管号	1	2	3	4	5	6
稀释倍数	1 000	2 000	2 500	3 000	4 000	8 000
VBD	9	1	1.5	2	3	7
1:100 溶血素	1					
1:1000 溶血素		1	1	1	1	1

D.2 取 6 以康氏管,分别标上六个溶血素稀释度,每管各加 1.0 mL 标准红细胞悬液(见第 F.2 章),再加上不同稀释倍数的溶血素 1.0 mL 到相应的管中,37℃ 水浴 15 min,即成敏化红细胞。

D.3 用冷至 4℃ 的 VBD 液将补体作 1:400 稀释,放 4℃ 冰箱于 2 h 内使用。

2) 1 mol/L 氯化镁溶液:将 20.3 g 氯化镁( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )加入 100 mL 蒸馏水中。

3) 0.3 mol/L 氯化钙溶液:将 44 g 氯化钙( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )加入 100 mL 蒸馏水中。

D.4 取 6 支康氏管,分别标上各溶血素稀释度,每管加 VBD 0.4 mL,1:400 补体 0.4 mL(根据补体效价高低,可用大于或小于 1:400 的稀释度),再在各管内加入不同稀释度溶血素敏化的红细胞悬液 0.2 mL。

D.5 混匀后置 37℃水浴 1 h,取出后以 1 000 r/min 离心 5 min,与标准溶血管比较(标准溶血管制备见附录 G),求得各管溶血度的百分率(见图 D.1)。

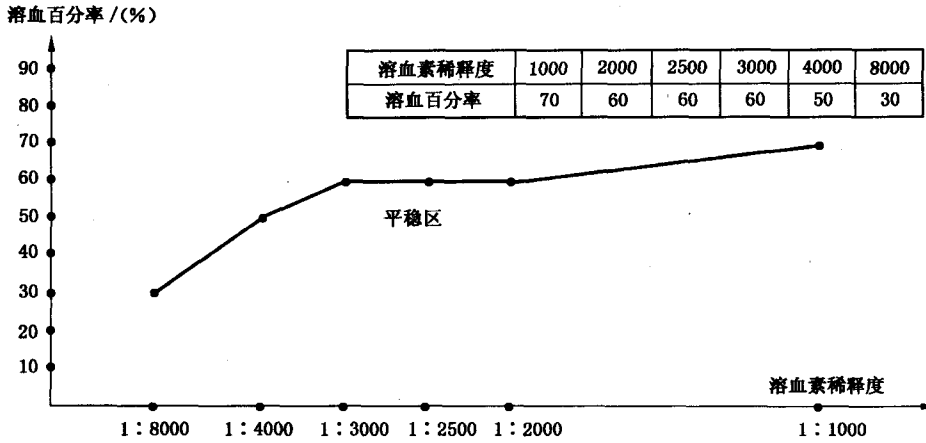


图 D.1 溶血素溶血情况举例

溶血素效价<sup>4)</sup>:取平稳区的第二个稀释度(见图 D.1),1:2500 稀释度为 1 单位溶血素。

附录 E  
(规范性附录)  
补体效价滴定

E.1 取 4 只康氏管,按表 E.1 加入试剂,混匀,37℃水浴 30 min,其间摇动一次。

表 E.1 补体效价滴定

单位为 2 毫升

试剂	管 号			
	1	2	3	4
VBD	0.6	0.55	0.5	0.4
1:400 稀释补体	0.2	0.25	0.3	0.4
致敏红细胞	0.2	0.2	0.2	0.2

E.2 取出后,1 000 r/min 离心 5 min,与标准溶血管(见附录 G)比较,当一管与标准管不能确切相比时,取左右两标准管溶血度平均值。

E.3 5 单位 50%溶血补体量(5C'H<sub>50</sub>)的确定:先计算每管的溶血比率,溶血百分比/非溶血百分比(例如溶血百分比为 35%,则比率为 35/100-35=0.54),以每管的溶血比率为横坐标,每管所用 1:400 补体的毫升数为纵坐标,在双对数坐标纸上作图,现以图 E.1 表示一次补体效价滴定的实例。

第 1~4 管的溶血百分比分别为 20%、40%、50%、60%,其相应的比率分别是 0.25、0.67、1.0、1.5,在图 E.1 中可标出 1~4 管的四点,分别作 1、2 管和 3、4 管两点的连线,再取两条连线的中点作第三条连线,从该连线与比率 1 的相交点向纵坐标引一条与横坐标平行的线,其与纵坐标的交点所表示的毫升数,即为一个单位 50%溶血的补体量。本例为 1:400 补体 0.32 mL。5 单位(5C'H<sub>50</sub>)则为 0.32×5=1.6 mL,原补体的稀释数按下式计算:

4) 一次测定后 3 个月不需测定。

$$400 : (0.32 \times 5) = X : 0.4$$

$$X = 100$$

100 倍稀释补体 0.4 mL 则含有 5C'H<sub>50</sub>。

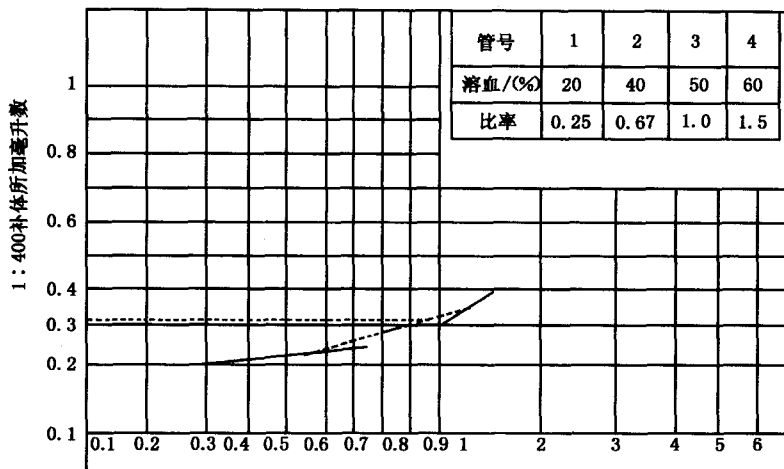


图 E.1 补体效价滴定

## 附录 F

(规范性附录)

### 敏化红细胞制备

#### F.1 阿氏液配制

柠檬酸钠( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0.8 g、葡萄糖 2.05 g、氯化钠 0.42 g、枸橼酸 0.032 5 g、蒸馏水 100 mL, 将上述成分混匀溶化, 56 kPa 15 min 灭菌备用。

#### F.2 红细胞悬液

采成年公绵羊血液, 于阿氏液中稳定 3 d~5 d 后使用。用前用 VBD 液(见附录 C)洗 3~4 次, 最后一次以 2 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 取下层红细胞泥, 用 VBD 液配成 670 000 红细胞/ $\text{mm}^3$  的标准红细胞悬液(即取红细胞泥 1.0 mL, 加 VBD 液 47.77 mL)。

#### F.3 敏化红细胞

于试验前取标准红细胞悬液加等量的 1 单位溶血素混合, 37℃ 水浴 15 min 即成。

## 附录 G

(规范性附录)

### 标准溶血管的制备

#### G.1 血红蛋白溶液的制备

取 1.0 mL 标准羊红细胞悬液(见第 F.2 章), 加入装有 7.0 mL 蒸馏水的试管中, 充分振荡, 使红细胞全部裂解, 再加入 2.0 mL VBD(见附录 C)储藏液, 充分混合。

**G.2 十分之一标准羊红细胞悬液的制备**

将标准羊红细胞悬液作 1 : 10 稀释。

**G.3 标准溶血管配制**

标准溶血管按表 G.1 配制。

**表 G.1 标准溶血管配制**

溶血程度/(%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
血红蛋白溶液/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
十分之一标准红细胞悬液/mL	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	

摇匀, 1 000 r/min 离心 5 min, 冰箱保存。

**附 录 H**

(规范性附录)

**ELISA 试验溶液配制(试剂要求分析纯)方法**

**H.1 抗原包被液**

0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液, 碳酸钠 1.59 g, 碳酸氢钠 2.93 g, 加双蒸水至 1 000 mL, 4℃ 冰箱保存限一周内使用, 经 103.4 kPa 灭菌 15 min 后可长期使用。

**H.2 冲洗液(0.05 mol/L pH7.4 PBS-Tween20)**

0.2 mol/L 磷酸氢二钠 210 mL, 0.2 mol/L 磷酸二氢钾 40 mL, 加无离子水至 1 000 mL, 再加入 30 g 氯化钠和 2 mL Tween 20。

**H.3 血清稀释液**

冲洗液内加入 5% 犊牛血清即可。

**H.4 底物溶液**

0.1 mol/L 柠檬酸溶液 25 mL

0.2 mol/L 磷酸氢二钠 25 mL

双蒸水 50 mL

以上三种溶液混匀即为 pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液。

取 100 mL pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液, 在 pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液 100 mL 内加入 40 mg 邻苯二胺(OPD), 临用前加入 80 μL 30% 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)。

**H.5 反应终止液[2 mol/L 硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)]**

取浓硫酸(纯度 98%) 1 mL 加 8 mL 去离子水即可。