

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 562—2015
代替 NY/T 562—2002

动物衣原体病诊断技术

Diagnostic techniques for animal chlamydiosis

2015-05-21 发布

2015-08-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 NY/T 562—2002《动物衣原体病诊断技术》。

本标准与 NY/T 562—2002 相比,病原检测部分增加了血清学诊断技术和 PCR 诊断技术。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:周继章、曹小安、宫晓炜、陈启伟、郑福英、李兆才、邱昌庆、殷宏。

本标准的历次版本发布情况为:

——NY/T 562—2002。

动物衣原体病诊断技术

1 范围

本标准规定了动物衣原体鸡胚分离与传代培养技术、血清学诊断技术及 PCR 诊断技术。

本标准适用于实验室动物衣原体的分离、传代培养和动物衣原体病的诊断。其中,血清学直接补体结合试验(Direct Complement Fixation Test, DCF)适用于哺乳动物(猪除外)和鸚鵡、鸽(7 岁以上老龄鸽除外)衣原体病的诊断;间接补体结合试验(Indirect Complement Fixation Test, ICF)适用于禽类(鸚鵡、鸽除外,但包括老龄鸽)和猪衣原体病的诊断;间接血凝试验(Indirect Hemagglutination Test, IHA)适用于动物衣原体病的产地检疫、疫情监测和流行病学调查;PCR 诊断技术适用于牛、羊、猪和禽衣原体病的诊断。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

工作量抗原 workload antigen

能发生完全反应的抗原量的单位,能与最高稀释度的血清呈现完全抑制溶血反应的最高抗原稀释度即为 1 个工作量抗原的效价。

2.2

指示血清 serum directed

与该抗原相应的哺乳动物抗血清。试验中测定的最高的标准血清稀释度即为 1 个工作量指示血清的效价。

2.3

补体结合试验 complement fixation test, CF

抗体与抗原反应形成复合物,通过激活补体而介导溶血反应,可作为反应强度的指示系统。以往多用于病毒学检测。

2.4

间接血凝试验 indirect hemagglutination test, IHA

将抗原(或抗体)包被于红细胞表面,成为致敏的载体,然后与相应的抗体(或抗原)结合,从而使红细胞拉聚在一起,出现可见的凝集反应。

3 动物衣原体的分离与培养

3.1 试验材料

疑似或确定为衣原体感染的样本、鸡胚、孵化箱、无菌操作间、生物安全柜、冰箱、照蛋设备、鸡胚气室开孔器、注射器、6 号针头、离心机、碘酊、70%酒精、链霉素、卡那霉素、生理盐水等。

3.2 材料要求

3.2.1 样本采集

采集的样本应无杂菌污染,包括肝脏、脾脏、流产胎儿胃液、胎衣、流产分泌物等,其中流产胎儿的胃液为首选样本。样品进行涂片姬姆萨染色(见附录 A),油镜下观察疑似有衣原体染色颗粒(原生小体, EB)为紫红色,大小 $0.2\ \mu\text{m}\sim 0.6\ \mu\text{m}$;网状体(RB)为蓝黑色,直径为 $0.6\ \mu\text{m}\sim 1.8\ \mu\text{m}$ 。样本在室外或

常温条件下放置时间不应超过 72 h,采集的样本应尽快放置于-20℃冰箱备用。如需较长时间保存,应置于-80℃超低温冰箱。

3.2.2 鸡胚要求

分离培养衣原体用的鸡胚最好为 SPF 受精鸡蛋孵育,或者受精鸡蛋至少应来自无衣原体抗体且不使用氨基类抗生素、四环素类抗生素、广谱抗菌抗病毒类药物的健康鸡群。

3.2.3 环境要求

衣原体的分离培养应在实验室内进行,少量的接种分离培养在生物安全柜内操作即可。如果接种鸡胚的数量较大,生物安全柜不能满足要求,应在无菌操作间内进行。鸡胚接种前后均在孵化箱内孵育,保证相对稳定的发育温度和湿度。

3.3 试验方法

3.3.1 样本的处理

将镜检发现疑似衣原体颗粒,或确定为衣原体且无杂菌污染的液体样本用灭菌生理盐水 1:4 稀释。如果是组织等样本,按体积大小用灭菌生理盐水 1:4 稀释后进行研磨破碎处理,3 000 r/min 离心 20 min,在 4℃冰箱中稳定 4 h 左右备用。对疑似污染的样本研磨粉碎后,用含链霉素(1 mg/mL)和卡那霉素(1 mg/mL)的生理盐水 1:4 稀释,3 000 r/min 离心 20 min,取其上清液以 4 000 r/min~6 000 r/min 再离心,取上清液 4℃冰箱稳定 4 h 左右备用。

3.3.2 鸡胚的准备

试验前 7 d,应将分离用的受精鸡蛋放入孵化箱孵育。弃去过大会、过小、破壳、软壳、畸形壳蛋等,形成 7 日龄发育的鸡胚。接种前 1 d,应弃去发育不良及死亡胚体,选择发育良好的鸡胚,划定气室及标记发育体的位置以备用。

3.3.3 鸡胚的接种

用碘酊消毒气室部位、开孔,孔大小以注射用针头进入为宜,接种深度为 1.5 cm~2.0 cm。每个鸡胚无菌操作接种 0.4 mL 上述处理好的样本于卵黄囊内,蜡封蛋壳针孔,置于 37℃~38.5℃孵化箱内孵育。

3.3.4 鸡胚卵黄囊膜的收集

弃去接种后 72 h 内死亡的鸡胚,收集接种后 4 d~10 d 内死亡鸡胚卵黄囊膜继续传代,直至接种鸡胚规律性死亡(即接种后 4 d~7 d 内死亡)。初次接种分离时,接种后 10 d 内未死亡鸡胚,收集第 10 d 未死亡鸡胚卵黄囊膜,涂片姬姆萨染色。显微镜下观察疑似有衣原体染色颗粒,应将该卵黄囊膜继续传代 3 代~4 次。直至出现规律性死亡为止。继续传代时,将收集的鸡胚卵黄囊膜研磨破碎处理,加入生理盐水稀释(1 个卵黄囊膜加入 4 mL 生理盐水)后,3 000 r/min 离心 20 min,在 4℃冰箱中稳定 4 h 左右后,接种 7 日龄发育良好的鸡胚传代。

3.4 结果判定

初次分离时,传代鸡胚在接种后 4 d~7 d 内出现规律性死亡,可初步判定为衣原体感染,进一步的确认需要进行细菌学检测和 PCR 鉴定。初次接种分离时,接种后 10 d 内未死亡鸡胚,取卵黄囊膜涂片染色,显微镜观察疑似有衣原体染色颗粒,应继续使用鸡胚传代 3 次~4 次,仍然不死亡且显微镜检查未发现疑似衣原体颗粒者,可判为衣原体感染阴性。

4 动物衣原体病的 PCR 诊断

4.1 试验材料

4.1.1 仪器

PCR 反应仪、低温高速离心机、稳压稳流电泳仪、紫外凝胶成像仪。

4.1.2 试剂

TE buffer、Proteinase K、溶菌酶、Taq DNA 聚合酶、SDS、饱和酚、无水乙醇、酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）、琼脂糖等。

4.1.3 引物

登录 Genbank, 下载相关的基因序列, 设计合成了 2 对引物。

第一对引物:

MP1: 5'- ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG - 3';

MP2: 5'- TTAGAATCTGAATTGAGCATTTCAT - 3'。

第二对引物:

MP3: 5'- CAGGATACTACGGAGATTATGTTT - 3';

MP4: 5'- GATTAGATTGAGCGTATTGGAA - 3'。

4.2 方法

4.2.1 衣原体基因组 DNA 的提取

取新鲜或冰冻组织块或鸡胚卵黄膜 $0.3\text{ cm}^3 \sim 0.5\text{ cm}^3$, 剪碎、研磨。加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ TE 缓冲液, 转入到 1.5 mL 的 Eppendorf 管中。以 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的 TE 缓冲液冲洗匀浆器, 冲洗液一并转入 Eppendorf 管中。加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 20% 的 SDS (终浓度 1%), 混匀; 加入 Proteinase K 至终浓度为 $200\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 混匀后 60°C 作用 30 min 。振摇混匀后转入 37°C 水浴 2 h , 期间振摇数次。加入溶菌酶 $30\text{ }\mu\text{L}$, 置于 65°C 水浴 30 min 。取出置沸水浴中 5 min 。加入等体积的饱和酚, 倒转混匀, 4°C $7\ 500\text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min , 取上层水相, 重复操作一次; 加入等体积的酚：氯仿：异戊醇 (25：24：1), 颠倒摇匀 2 次~3 次, 4°C $7\ 500\text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min 。转移上清液于另一离心管中。加入 2.5 倍体积的预冷无水乙醇, -20°C 沉淀 30 min , $12\ 000\text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min , 弃去所有液相。用 1 mL 70% 乙醇漂洗 2 次~3 次, 每次 $12\ 000\text{ r}/\text{min}$ 离心 2 min 。真空或室温干燥, DNA 沉淀物用 $25\text{ }\mu\text{L}$ 无菌双蒸水溶解, 保存在 -20°C 备用。

4.2.2 PCR 反应体系及条件

4.2.2.1 推荐使用反应体系

第一次 PCR 扩增:

10×PCR buffer(含 Mg^{2+})	5 μL
dNTPs	4 μL
MP1 和 MP2 引物	各 1 μL
模板(被检样本总 DNA)	4 μL
无菌双蒸水	34.75 μL
Taq DNA 聚合酶	0.25 μL

第二次 PCR 扩增:

10×PCR buffer(含 Mg^{2+})	5 μL
dNTPs	4 μL
MP3 和 MP4 引物	各 1 μL
模板(一扩产物)	2 μL
无菌双蒸水	36.75 μL
Taq DNA 聚合酶	0.25 μL

样本检测时, 同时要设阳性对照和空白对照。阳性对照模板为衣原体 MOMP 基因阳性质粒, 空白对照为双蒸水, 其他体系成分不变。如果是采用其他更好的反应体系时, 可根据具体情况调整体系。

4.2.2.2 反应条件

一扩: 首先 95°C 充分变性 5 min ; 然后 35 个循环, 分别为 94°C 变性 1 min , 52.5°C 退火 1 min , 72°C 延伸 2 min ; 最后 72°C 延伸 10 min 。

二扩:35个循环,分别为94℃变性30s、51.6℃退火1min、72℃延伸2min;最后72℃延伸10min。

4.3 电泳

4.3.1 制板

取1g琼脂糖加入100mL电泳缓冲液,摇匀,加热溶化后制作1%琼脂糖凝胶板。

4.3.2 加样

PCR反应结束,取二次扩增产物各5μL(包括被检样本、阳性对照、空白对照)、DL2000DNA分子质量标准5μL进行琼脂糖凝胶电泳。

4.3.3 电泳条件

小心地移去梳子,将凝胶放入电泳槽。加入电泳缓冲液,使液面高出凝胶表面1mm~2mm。如加样孔内有气泡,应尽量用吸管吸出。用微量移液器将样本与上样缓冲液按1:5混合,加入孔内使沉入孔底;80V~100V恒压电泳,使DNA向阳极方向移动。

4.3.4 凝胶成像仪观察

扩增产物电泳结束后,用凝胶成像仪观察检测结果、拍照,记录试验结果。

4.4 结果判断举例

4.4.1 判定说明

将扩增产物电泳后用凝胶成像仪观察,DNA分子质量标准、阳性对照、空白对照为如下结果时试验方成立,否则应重新试验。DL2000DNA分子质量标准(Marker)电泳道从上到下依次出现2000bp、1000bp、750bp、500bp、250bp、100bp6条清晰的条带。阳性对照二扩产物约为480bp大小清晰的条带。在样本检测时,大多一扩反应因扩增产物量小而难以看见电泳条带。若一扩产物出现大小约1170bp的条带,可直接判定为阳性。空白对照电泳道不出现任何条带。

4.4.2 样本结果判定

在同一块凝胶板上电泳后,当DNA分子质量标准、各组对照同时成立时:被检样本一扩产物电泳出现大小约1170bp的条带,可直接判定为阳性(+);若一扩反应产物电泳没有约1170bp条带,二扩反应产物电泳出现一条480bp的条带,判为阳性(+)。被检样本一扩反应产物电泳没有约1170bp的条带,二扩反应产物电泳没有出现大小为480bp的条带,判为阴性(-)。结果判定示意图见附录B。

5 动物衣原体病血清学诊断技术

5.1 补体结合试验(CF)

5.1.1 材料准备

5.1.1.1 器材

12mm×37mm试管、试管架、水浴箱、U型96(8×12)孔微量滴定板、生理盐水。

5.1.1.2 补体

商品补体,按说明书使用和保存,试验前对供试补体需经补体效价滴定。补体效价滴定方法见附录C。

5.1.1.3 溶血素

试验前对供试溶血素需经效价滴定。溶血素效价滴定见附录D。

5.1.1.4 1%绵羊红细胞悬液

制备方法见附录E,敏化红细胞制备见C.2。

5.1.1.5 被检血清

应无溶血、无腐败(可加入0.01%硫柳汞或0.01%叠氮钠防腐),试验前需灭能。不同畜禽血清灭能的温度和时间见附录F。

5.1.1.6 标准抗原和标准阳性、阴性血清

抗原和阳性血清效价滴定的方法见附录 G。

5.1.2 操作方法

5.1.2.1 直接补体结合试验(DCF)

5.1.2.1.1 试验方法

5.1.2.1.1.1 试管法

按表 1 的程序操作。试验要同时设抗补体对照、阳性血清对照、阴性血清对照、抗原对照、溶血素对照和生理盐水对照。

表 1 直接补体结合试验(试管法)

单位为毫升

成分	被检血清						对 照					效 价
	试 管						阳性血清	阴性血清	抗原	溶血素	生理盐水	
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	2 工作量	1:4	2 工作量			
血清	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1				
2 工作量抗原	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			
2 单位补体	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		
生理盐水									0.1	0.2	0.4	
混匀后,4℃ 16 h~18 h 感作,取出后 37℃ 水浴 30 min												
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	
混匀,37℃ 水浴 30 min												
判定	++++	++++	+++	++	+	-	++++	-	-	-	++++	1:32
	全不溶血	全不溶血	25% 溶血	50% 溶血	75% 溶血	全溶血	全不溶血	全溶血	全溶血	全溶血	全不溶血	

5.1.2.1.1.2 微量法

用 U 型 96 孔反应板,按表 2 的程序操作。试验同时设抗补体对照、阳性血清对照、阴性血清对照、抗原对照、溶血素对照和生理盐水对照。

表 2 直接补体结合试验(微量法)

单位为微升

成分	被检血清						各项对照					效 价
	试 验 孔						阳性血清	阴性血清	抗原	溶血素	生理盐水	
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	2 工作量	1:4	2 工作量			
血清	25	25	25	25	25	25	25	25				
2 工作量抗原	25	25	25	25	25	25	25	25	25			
2 单位补体	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
生理盐水									25	50	100	
混匀后,4℃ 16 h~18 h 感作,取出后 37℃ 水浴 30 min												
敏化红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
混匀,37℃ 水浴 30 min												
判定	++++	++++	+++	++	+	-	++++	-	-	-	++++	1:32
	全不溶血	全不溶血	25% 溶血	50% 溶血	75% 溶血	全溶血	全不溶血	全溶血	全溶血	全溶血	全不溶血	

5.1.2.1.2 结果判定举例

在最后一次 37℃ 水浴 30 min 后, 立即进行试验结果判定。

各组对照为如下结果时试验方能成立, 否则应重复试验:

- a) 被检血清抗补体对照: 完全溶血(-);
- b) 阳性血清加抗原对照: 完全抑制溶血(+++);
- c) 阴性血清加抗原对照: 完全溶血(-);
- d) 抗原对照: 完全溶血(-);
- e) 溶血素对照: 完全溶血(-);
- f) 生理盐水对照: 完全不溶血(++++)。

5.1.2.1.3 判定标准

5.1.2.1.3.1 兔血清

- a) 被检血清效价 $\geq 1:16$ (++) 判为阳性;
- b) 被检血清效价 $\leq 1:8$ (+) 判为阴性。
- c) 被检血清效价 = $1:16$ (+) 或 $1:8$ (++) 判为可疑; 重复试验仍为可疑, 则判为阳性。

5.1.2.1.3.2 绵羊、山羊、牛、幼龄鸽、鸚鵡等血清

- a) 被检血清效价 $\geq 1:8$ (++) 判为阳性;
- b) 被检血清效价 $\leq 1:4$ (+) 判为阴性;
- c) 被检血清效价 = $1:8$ (+) 或 $1:4$ (++) 判为可疑; 重复试验仍为可疑, 则判为阳性。

5.1.2.2 间接补体结合试验(ICF)

5.1.2.2.1 试验方法

5.1.2.2.1.1 试管法

按表 3 的程序操作。

表 3 间接补体结合试验(试管法)

单位为毫升

成分	被检血清						间接补反对照		直接补反对照	抗原对照	效价
	试验管						阳性血清	阴性血清	指示血清		
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1工作量	1:4	1工作量		
血清	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			
1 工作量抗原	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
混匀后, 4℃ 6h~8h 感作											
1 工作量指示血清	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		
2 补体单位	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
生理盐水									0.1	0.2	
混匀后, 4℃ 过夜(或 8h~10h), 取出后 37℃ 水浴 30 min											
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	
混匀, 37℃ 水浴 30 min											
判定	-	-	+	++	+++	++++	-	++++	++++	-	
	全溶血	全溶血	75% 溶血	50% 溶血	25% 溶血	全不溶血	全溶血	全不溶血	全不溶血	全溶血	
										1:32	

5.1.2.2.1.2 微量法

按表 4 的程序操作。

表 4 间接补体结合试验(微量法)

单位为微升

成分	被检血清						间接补反对照		直接补反对照	抗原对照	效价
	试验管						阳性血清	阴性血清	指示剂血清		
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1工作量	1:4	1工作量		
血清	25	25	25	25	25	25	25	25			
1工作量抗原	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
混匀后,4℃ 6h~8h感作											
1工作量指示血清	25	25	25	25	25	25	25	25	25		
2补体单位	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
生理盐水									25	50	
混匀后,4℃过夜(或8h~10h),取出后37℃水浴30min											
敏化红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
混匀,37℃水浴30min											
判定	-	-	+	++	+++	++++	-	++++	++++	-	1:32
	全溶血	全溶血	75%溶血	50%溶血	25%溶血	全不溶血	全溶血	全不溶血	全不溶血	全溶血	

5.1.2.2.2 结果判定举例

最后一次37℃水浴30min后,立即判定。

对照试验为如下结果时试验方能成立,否则应重复试验:

- a) 被检血清抗补体对照:完全溶血(-);
- b) 阳性血清加抗原加指示血清:完全溶血(-);
- c) 阴性血清加抗原加指示血清:完全抑制溶血(++++);
- d) 抗原对照:完全溶血(-)。

5.1.2.2.3 判定标准

5.1.2.2.3.1 鸭血清

- a) 被检血清效价 $\geq 1:16$ (++)判为阳性;
- b) 被检血清效价 $\leq 1:8$ (+)判断为阴性;
- c) 被检血清效价 $= 1:16$ (+)或 $1:8$ (++)判为可疑;重检仍为可疑判为阳性。

5.1.2.2.3.2 猪、鸡、鹌鹑等血清

- a) 被检血清效价 $\geq 1:8$ (++)判为阳性;
- b) 被检血清效价 $\leq 1:4$ (+)判断为阴性;
- c) 被检血清效价 $= 1:8$ (+)或 $1:4$ (++)判为可疑;重检仍为可疑判为阳性。

5.2 间接血凝试验(IHA)

5.2.1 材料

5.2.1.1 器材

96孔(8×12)V型(110°)聚苯乙烯滴定板,25μL、50μL微量移液器或稀释棒,微量振荡器,水浴箱等。

5.2.1.2 敏化红细胞

为衣原体纯化灭活抗原致敏的雄性绵羊红细胞。

5.2.1.3 对照血清

标准阳性血清的血凝效价为 $1:2048 \sim 1:4096$,标准阴性血清的血凝效价 $\leq 1:4$ 。

5.2.1.4 被检血清

应无溶血、无腐败。必要时,可加入硫柳汞或叠氮钠以防腐,其含量分别为 0.01%和 0.2%。试验前灭能。

5.2.1.5 稀释液

为含 1%灭能健康兔血清的 0.15 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS),制备方法见附录 H。

5.2.2 操作方法

5.2.2.1 稀释被检血清

每份被检血清用 8 孔,每孔滴加稀释液 50 μL;用微量移液器或稀释棒吸(蘸)取被检血清 50 μL 加入第 1 孔,充分混匀后再吸(蘸)取 50 μL 加入第 2 孔……依次做倍比连续稀释至第 8 孔(1:2,1:4,1:8,……,1:256),混匀后从第 8 孔弃去 50 μL。

5.2.2.2 加抗原

将抗原摇匀后,每孔滴加 1%抗原敏化红细胞悬液 25 μL。

5.2.2.3 设对照

在每块 V 型滴定板上做试验,要同时设立对照,即敏化红细胞空白对照 1 孔;阳性血清(1:64)加敏化红细胞对照 1 孔;阴性血清(1:4)加敏化红细胞对照 1 孔。所有对照样的稀释与被检血清相同。

5.2.2.4 振荡

加致敏红细胞后将 V 型滴定板放在微量振荡器上振荡 1 min,置于室温(冬季置于 35℃温箱)2 h,判定结果。操作程序见表 5。

表 5 间接红细胞凝集试验程序及判定结果举例

单位为微升

成分	被检血清稀释度								各项对照		
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	敏化红细胞	阳性血清 1:64	阴性血清 1:4
稀释度	50	50	50	50	50	50	50	50	50		
被检血清	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
敏化红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
放在微量振荡器上震荡 1 min,置于室温(冬季放于 35℃温箱)2 h											
判定结果	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	++++	-

注:表中所示被检血清的血凝效价为 1:128。

5.2.3 结果判定举例

凝集程度的标准如下:

++++:红细胞 100%凝集,呈一均匀的膜布满整个孔底;

+++ :红细胞 75%凝集,形成的膜均匀地分布在孔底,但在孔底中心有红细胞形成的一个针尖大小点;

++ :红细胞 50%凝集,在孔底形成的薄膜边缘呈锯齿状,孔底为一红细胞圆点;

+ :红细胞 25%凝集,孔底红细胞形成的圆点较大;

± :红细胞沉于孔底,但周围不光滑或圆点中心有空斑;

- :红细胞完全沉于孔底,呈光滑的大圆点。

加抗原后所设各项对照均成立、否则应重做,正确对照的结果是:

- a) 抗原敏化红细胞应无自凝(—);
- b) 阳性血清对照应 100%凝集(++++);
- c) 阴性血清对照应无凝集(—)。

5.2.4 结果判定

5.2.4.1 哺乳动物

- a) 血凝效价 $\geq 1:64$ (++)判为阳性;
- b) 血凝效价 $\leq 1:16$ (++)判为阴性;
- c) 血凝效价介于两者之间判为可疑。

5.2.4.2 禽类

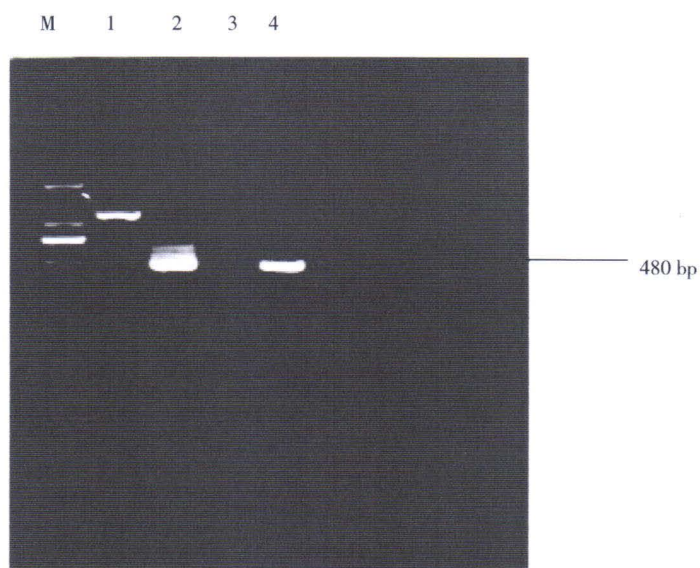
- a) 血凝效价 $\geq 1:16$ (++)判为阳性;
- b) 血凝效价 $\leq 1:4$ (++)判为阴性;
- c) 血凝效价介于两者之间判为可疑;
- d) 可疑者复检,仍为可疑判为阳性,或用 CF 试验复检。

附 录 A
(规范性附录)
姬姆萨染色方法

- A. 1 以 1 g 的姬姆色素染料加入 66 mL 甘油,混匀,60℃保温溶解 2 h,再加入 66 mL 甲醇混匀,即配成姬姆色素原液。此原液用前用 PBS(6.8)稀释 10 倍左右就可以使用。
- A. 2 按常规方法制备血涂片,待血膜干后,用甲醇固定 2 min~3 min。
- A. 3 将血涂片或骨髓涂片放置染色架上,滴加稀释好的染色液,使覆盖全部血膜,室温染色 15 min~30 min。
- A. 4 用自来水缓慢从玻片一端冲洗(注意:勿先倒去染液或直接对血膜冲洗),晾干后镜检。

附录 B
(规范性附录)
PCR 结果判定示意图

PCR 结果判定示意图见图 B.1。



说明：

M——DL2 000™Marker, 从上往下为 2 000 bp、1 000 bp、750 bp、
500 bp、250 bp、100 bp；

1——条带为一扩产物；

3——阴性对照；

2——条带为二扩产物；

4——样本阳性扩增结果。

图 B.1 PCR 结果判定示意图

附录 C
(规范性附录)
补体效价测定

- C.1 用生理盐水将补体做 1 : 60 稀释。
- C.2 敏化红细胞: 1% 红细胞悬液加等量的 2 个工作单位量的溶血素, 37°C 水浴 15 min。
- C.3 按表 C.1 测定补体效价。

表 C.1 补体效价测定

单位为毫升

试管号	抗原							生理盐水						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
2 单位抗原	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	—	—
生理盐水	0.27	0.25	0.22	0.20	0.18	0.16	0.14	0.37	0.35	0.32	0.30	0.28	0.26	0.24
1 : 60 补体	0.03	0.05	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.03	0.05	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16
混匀, 37°C 水浴 30 min														
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	0.2
混匀, 37°C 水浴 30 min														
判定	+++ +	+++	++	+	—	—	—	+++ +	+++	++	+	—	—	—
	全不溶血	25% 溶血	50% 溶血	75% 溶血	全溶血	全溶血	全溶血	全不溶血	25% 溶血	50% 溶血	75% 溶血	全溶血	全溶血	全溶血

C.4 以能完全溶血的最小补体量为一个单位, 正式试验使用两个单位。表 C.1 例中补体一个单位量为 0.12 mL, 按式(C.1)计算出补体的使用稀释倍数。即

$$\begin{aligned}
 \text{原补体应稀释倍数} &= \frac{\text{使用时每管加入量} \times \text{滴定时补体稀释倍数}}{\text{一个单位补体量} \times 2} \\
 &= \frac{0.2 \times 60}{0.12 \times 2} = 50 \dots\dots\dots (C.1)
 \end{aligned}$$

附录 D
(规范性附录)
溶血素效价测定

D.1 先将溶血素 1 : 100 稀释(0.2 mL 含甘油的溶血素加 9.8 mL 生理盐水),按表 D.1 稀释成不同倍数。

表 D.1 溶血素稀释

单位为毫升

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
稀释倍数	1 000	2 000	3 000	4 000	5 000	6 000	7 000	8 000	9 000
生理盐水	9	1	2	3	4	5	6	7	8
1 : 100 溶血素	1								
1 : 100 溶血素		1	1	1	1	1	1	1	1

D.2 再按表 D.2 操作,测定溶血素效价。

表 D.2 溶血素效价测定

单位为毫升

管 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	对 照		
稀释倍数	1 000	2 000	3 000	4 000	5 000	6 000	7 000	8 000	9 000	补体	1 : 100 溶血素	1%红细胞
稀释溶血素	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0.1	0
生理盐水	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.5
1 : 60 补体	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0
1%红细胞	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
充分摇匀,37℃水浴 30 min												
判 定	—	—	—	—	—	—	—	+	++	++++	—	++++
	全溶血	全溶血	全溶血	全溶血	全溶血	全溶血	全溶血	75% 溶血	50% 溶血	全不 溶血	全溶 血	全不 溶血

D.3 以完全溶血的溶血素最高稀释倍数为一个溶血素单位,表 D.2 所示为 7 000 倍。正式试验时,使用两个溶血素单位,本例为 3 500 倍。

附 录 E
(规范性附录)

1%绵羊红细胞悬液的制备

E.1 从成年健康公绵羊颈静脉采血于灭菌的装有玻璃珠的三角烧瓶中,均匀摇动脱去纤维蛋白,按1:1(V/V)加入红细胞保存液,混匀后分装于灭菌链霉素瓶中(5 mL~10 mL),4℃冰箱可保存2个月。使用时,将红细胞移入离心管,1 500 r/min~2 000 r/min离心15 min,弃上清液,在沉淀中加入生理盐水,摇匀后再离心。如此反复洗红细胞3次~4次,直至上清液无色透亮为止,弃上清。取洗涤好的红细胞泥1 mL悬浮于99 mL的生理盐水中,即成1%红细胞悬液。

E.2 红细胞保存液配方:葡萄糖 20.5 g,氯化钠 4.2 g,柠檬酸三钠 8 g,柠檬酸 0.55 g,蒸馏水加至1 000 mL,101.8 kPa高压灭菌20 min,备用。

附录 F
(资料性附录)
各种畜禽血清灭能温度和时间

不同畜禽血清灭能温度和时间见表 F.1。未注明者,血清的灭能温度同时适应于本标准的 CF 和 IHA 试验。

表 F.1 不同畜禽血清灭能温度和时间

动物种类	灭能温度,℃	灭能时间,min
鸡	56	35
豚鼠、火鸡、鸭、鸽、鹅、鹦鹉、鹌鹑	56	30
黄牛、猪	56(CF)和 62(IHA)	30
水牛、山羊、犬(1:2 稀释)	62	30
马、兔(1:2 稀释)	65	30
绵羊	58~59	30
骡、驴(1:2 稀释)	62~64	30
骆驼	54	30

附 录 G
(规范性附录)
抗原、阳性血清效价滴定方法

G.1 测定抗原、血清效价

- G.1.1 取 80 支试管,排成纵横各 9 排的方阵(第 9 排缺 1 管)。
- G.1.2 抗原和阳性血清分别从 1:8~512 做倍比稀释,阴性血清做 1:4 稀释。设抗原、血清和生理盐水对照。
- G.1.3 按表 G.1 加阳性血清,每个稀释度加 7 管,每管加 0.1 mL。抗原对照组第 1 排不加血清,而用 0.1 mL 生理盐水代替。
- G.1.4 按表 G.1 加抗原,每个稀释度加 7 管,每管加 0.1 mL。血清对照不加抗原,而用 0.1 mL 生理盐水代替。
- G.1.5 每管中加入 2 单位补体 0.2 mL。
- G.1.6 摇匀,置于 4℃ 冰箱感作 16 h~18 h,取出放在 37℃ 水浴中 30 min。
- G.1.7 每管加入敏化红细胞 0.2 mL。
- G.1.8 混匀,置于 37℃ 水浴 30 min 后,取出静置 2 h~3 h,判定结果。
- G.1.9 效价判定:能与最高稀释度的阳性血清呈现完全抑制溶血(++++)反应的最高抗原稀释度,即为抗原效价(一个工作量)如表 G.1 所示,抗原效价为 1:128,阳性血清效价为 1:256(一个血清工作量)。

表 G.1 抗原和阳性血清滴定举例

抗 原	血 清							阴性血 清 1:4	抗原抗补 体对照
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512		
1:8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	—
1:16	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	—
1:32	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	—
1:64	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—
1:128	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—
1:256	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	—	—
1:512	++++	++++	++++	+++	++	+		—	—
血清抗补 体对照	—	—	—	—	—	—	—	—	盐水对照 ++++

G.2 指示血清

间接补体结合试验所用的指示血清,即直接补体结合试验中的阳性对照血清。其效价如 G.1 中所测,间接补体结合正式试验时,采用一个血清工作量。

G.3 间接补体结合试验用阳性血清对照效价的滴定

G.3.1 先将间接补体结合试验用阳性血清对照(鸭或猪的免疫血清),用生理盐水从 1:4 至 1:512 做

倍比稀释。抗原和指示血清均稀释成一个工作量,按表 G.2 程序进行滴定。

G.3.2 效价判定:能与一个工作量抗原呈现完全溶血(一)的最高血清稀释度为该血清效价。如表 G.2 所示 1:32。

表 G.2 间接补体结合试验用阳性血清效价测定表

血清稀释度	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:4	抗原对照	指示血清对照	生理盐水对照
血清加量	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			
1 工作量抗原	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		0.1	0.1	
混匀,4℃ 6 h~8 h 感作												
1 工作量指示血清	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			0.1	
2 单位补体	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
生理盐水									0.2	0.2	0.1	0.5
混匀,4℃ 16 h~18 h 感作,取出后 37℃ 水浴 30 min												
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
混匀,37℃ 水浴 30 min												
判定	—	—	—	—	+	++	+++	++++	—	—	++++	++++
	全溶血	全溶血	全溶血	全溶血	75% 溶血	50% 溶血	25% 溶血	全不溶血	全溶血	全溶血	全不溶血	全不溶血

附 录 H
(规范性附录)

含 1%灭能健康兔血清 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 稀释液的配制方法

H.1 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 配制

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	19.34 g
磷酸二氢钾	2.86 g
氯化钠	4.25 g
蒸馏水	加至 500 mL

103.41 kPa 30 min 灭菌。

H.2 健康兔血清

灭能。

H.3 含 1%灭能健康兔血清 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 稀释液的配制

0.15 mol/L pH 7.2 PBS	99 mL
灭能健康兔血清	1 mL

二者混合,即为含 1%灭能健康兔血清 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 稀释液。
