



中华人民共和国国家标准

GB/T 17999.2—2008
代替 GB/T 17999.1—1999

SPF 鸡 微生物学监测 第 2 部分: SPF 鸡 红细胞凝集抑制试验

SPF chicken—Microbiological surveillance—
Part 2: Hemagglutination inhibition test for SPF chicken

2008-12-31 发布

2009-05-01 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 17999《SPF 鸡 微生物学监测》分为 10 个部分：

- 第 1 部分：SPF 鸡 微生物学监测总则；
- 第 2 部分：SPF 鸡 红细胞凝集抑制试验；
- 第 3 部分：SPF 鸡 血清中和试验；
- 第 4 部分：SPF 鸡 血清平板凝集试验；
- 第 5 部分：SPF 鸡 琼脂扩散试验；
- 第 6 部分：SPF 鸡 酶联免疫吸附试验；
- 第 7 部分：SPF 鸡 胚敏感试验；
- 第 8 部分：SPF 鸡 鸡白痢沙门氏菌检验；
- 第 9 部分：SPF 鸡 试管凝集试验；
- 第 10 部分：SPF 鸡 间接免疫荧光试验。

本部分为 GB/T 17999 的第 2 部分。

本部分修订参照了 GB/T 18936—2003《高致病性禽流感诊断技术》、SN/T 1109—2002《新城疫微量红细胞凝集抑制 试验操作规程》、SN/T 1182.2—2004《禽流感微量红细胞凝集抑制试验》、NY/T 551—2002《产蛋下降综合征诊断技术》、OIE《陆生动物(哺乳动物、禽鸟和蜜蜂)诊断试验和疫苗手册》(第五版)中的有关规定。

本部分代替 GB/T 17999.1—1999《SPF 鸡 红细胞凝集抑制试验》。

本部分与 GB/T 17999.1—1999 相比主要变化如下：

- 增加了规范性附录 A“试剂的配制”和资料性附录 B“1%鸡血红细胞悬液的制备”；
- 增加了对 V 形孔微量血凝板进行试验的结果判定；
- 对禽流感病毒、新城疫病毒、传染性支气管炎病毒、禽腺病毒 III 群(EDS)鸡毒支原体和滑液囊支原血凝抑制抗体的判定标准进行了修改。

本部分的附录 A 为规范性附录，附录 B 为资料性附录。

本部分由中华人民共和国农业部提出。

本部分由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本部分起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心、济南斯帕法斯家禽有限公司。

本部分主要起草人：曲连东、刘家森、韩凌霞、邵卫星、朱果、单忠芳、姜骞、司昌德、于海波、孟庆文。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 17999.1—1999。

SPF 鸡 微生物学监测

第 2 部分:SPF 鸡 红细胞凝集抑制试验

1 范围

GB/T 17999 的本部分规定了红细胞凝集抑制试验的技术要求。

本部分适用于对 SPF 鸡进行以下病原微生物的血凝抑制抗体检测:禽流感病毒 (Avian Influenza Virus), 传染性支气管炎病毒 (Infectious Bronchitis Virus), 新城疫病毒 (Newcastle Disease Virus), 禽腺病毒 III 群 (减蛋综合征病毒) (Avian Adenovirus Group III), 鸡毒支原体 (*Mycoplasma gallisepticum*), 滑液囊支原体 (*Mycoplasma synoviae*)。

2 原理

许多病原微生物具有凝集动物红细胞的能力, 这种凝集红细胞的能力能被特异性抗体所抑制, 因此可用已知病原微生物检测相应的血凝抑制性抗体。

3 试剂和器材

3.1 试剂

- 3.1.1 血凝抗原。
- 3.1.2 阴性、阳性血清。
- 3.1.3 被检血清。
- 3.1.4 鸡红细胞。
- 3.1.5 0.85% 氯化钠 (NaCl) (见附录 A)。
- 3.1.6 阿氏液 (见附录 A)。

3.2 器材

- 3.2.1 96 孔微量血凝板 (U 形孔或 V 形孔)。
- 3.2.2 微量移液器 (量程为 25 μL 、50 μL 、100 μL) 或可调微量移液器 (量程涵盖 25 μL 、50 μL 、100 μL) 及吸头。
- 3.2.3 水浴锅。
- 3.2.4 离心机与刻度离心管。

4 操作程序

4.1 红细胞悬液的制备和抗原血凝效价测定

4.1.1 1% 鸡红细胞悬液的制备

参见附录 B。

4.1.2 抗原血凝效价测定

4.1.2.1 于 96 孔微量血凝板的第 1 孔~第 12 孔加入生理盐水 25 μL , 共作 2 排。每排的第 1 孔加入抗原 25 μL , 用微量移液器, 从第 1 孔~第 11 孔对抗原作系列倍比稀释: 即将第 1 孔的抗原与生理盐水用移液器反复吹吸 3 次后, 吸出 25 μL 移至第 2 孔, 再反复吹吸 3 次后, 吸出 25 μL 移至第 3 孔, 依此类推, 直至第 11 孔。从第 11 孔中吸出 25 μL 弃去, 此孔抗原的最终稀释度为 1: 2¹¹ (即 11 log₂)。第 12 孔作为对照孔。

- 4.1.2.2 每孔中加入 25 μL 生理盐水,再加入 1%鸡红细胞悬液 25 μL 。
- 4.1.2.3 将血凝板置振荡器上 500 r/min 振荡 1 min ~2 min。
- 4.1.2.4 在室温 18 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 20 min~40 min,或 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 15 min~20 min,或 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 60 min。
- 4.1.2.5 抗原血凝效价判定:在反应时间内,对照孔的红细胞全部沉淀时,观察判读血凝结果。
对于使用 U 形孔微量血凝板进行的试验,可根据表 1 中列举的标准进行判读。

表 1 血凝试验结果判读标准

类别	孔底所见	结果
1	红细胞全部凝集,均匀铺于孔底,即 100%红细胞凝集	++++
2	红细胞凝集基本同类别 1,但孔底有大圈	+++
3	红细胞于孔底形成中等大的圈,四周有小凝块	++
4	红细胞于孔底形成小圆点,四周有少许凝集块	+
5	红细胞于孔底呈小圆点,边缘光滑整齐,即红细胞完全不凝集	-

注:能使红细胞完全凝集(100%凝集,即++++)的抗原最高稀释度为该抗原的血凝效价,此效价为 1 个血凝单位。注意对照孔应呈现完全不凝集(-),否则此次试验无效。

对于使用 V 形孔微量血凝板进行的试验,将血凝板倾斜 70°,观察沉淀于孔底的红细胞是否沿倾斜面向下呈线状流动,以出现全部凝集(红细胞无流动)的抗原最大稀释度为该抗原的血凝效价,该效价为 1 个血凝单位。

若血凝效价高于 11 \log_2 时,可继续增加稀释孔数,进行血凝效价测定。
血凝试验举例说明见表 2。

表 2 微量血凝试验操作、结果判定举例

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
滴度(\log_2)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	对照
生理盐水/ μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
倍比稀释的抗原/ μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	弃去 25 μL
生理盐水/ μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1%鸡红细胞/ μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
作用温度、时间	18 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$, 静置 20~40 min											
判定举例	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	-

血凝价判定为 9 \log_2 。

4.2 血清的处理和血凝抑制试验

4.2.1 被检血清样品准备

被检血清,包括阳性、阴性血清,置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 30 min~45 min,以破坏补体及血凝抑制因子。

4.2.2 抗原准备

进行血凝抑制试验时各种抗原所用血凝单位为 4 个血凝单位。

以 4 个血凝单位抗原的配制为例:如果某抗原的血凝效价为 9 \log_2 ,配制 4 个血凝单位则进行 1:2⁷ 稀释(2⁹/2²=2⁷),取生理盐水 11.8 mL,加入 1:10 稀释的抗原 1.0 mL,混合均匀即可。

4.2.3 抗原血凝效价的重测定

4.2.3.1 为了确证血凝抑制试验时使用抗原的活性,有必要对已配制的 4 个血凝单位抗原进行血凝效

价的再测定,此项试验常与血凝抑制试验同时进行。

4.2.3.2 第1孔分别加入50 μL 4个血凝单位抗原。

4.2.3.3 第2孔~第4孔各加生理盐水25 μL。

4.2.3.4 将抗原分别作系列倍比稀释至第4孔,从第4孔吸25 μL弃去。

4.2.3.5 每孔加1%鸡红细胞悬液25 μL。

4.2.3.6 将血凝板置微量振荡器上以500 r/min振荡1 min~2 min。

4.2.3.7 室温18℃~22℃感作20 min~40 min左右。

4.2.3.8 观察结果,4、2、1血凝单位孔红细胞出现完全凝集,0.5血凝单位孔红细胞出现50%凝集。若不相符,则应重新标定抗原的血凝单位,同时进行的血凝抑制试验也需重新进行。

4.2.4 血凝抑制试验

4.2.4.1 血凝板每排检测一份被检血清,设阳性血清与阴性血清对照。

4.2.4.2 第1孔~第12孔每孔加入25 μL生理盐水。

4.2.4.3 吸取血清25 μL加入第1孔中,混匀后吸取25 μL加入第2孔中,依此类推倍比稀释到第11孔,弃去25 μL,第12孔作为空白对照孔。

4.2.4.4 第1孔~第11孔分别加入25 μL 4个血凝单位抗原。血凝板置微量振荡器上以500 r/min振荡1 min~2 min。

4.2.4.5 每孔加入1%鸡红细胞悬液25 μL,以500 r/min振荡1 min~2 min混匀,置室温(18℃~22℃)静置20 min~40 min或4℃静置60 min,此时对照孔(第12孔)的红细胞已沉淀为一个圆点。

4.2.4.6 静置完毕,对于使用U形孔微量血凝板进行的试验,根据表1中列举的标准进行判读。对于使用V形微量血凝板进行的试验,将血凝板倾斜70°,使沉淀于孔底的红细胞沿倾斜面向下呈线状流动。呈现与红细胞对照孔(第12孔)一样者为完全不凝集孔,出现完全不凝集的血清最高稀释度为该被检血清血凝抑制效价。血凝抑制试验举例说明见表2。

表2 微量血凝抑制试验操作、结果判定举例

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
滴度(log ₂)	1							8	9	1	11	对照
生理盐水/μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
倍比稀释的被检血清/μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	弃去 25 μL
4个血凝单位抗原/μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
作用温度、时间	18℃~25℃,静置20~40 min											
1%鸡红细胞/μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
作用温度、时间	18℃~25℃,静置20~40 min											
判定举例	-	-	-	-	-	+	++	+++	++++	++++	++++	-

被检血清血凝抑制价为1:32(2⁵)。

5 结果判定

5.1 检查各种对照。阴性血清血凝抑制滴度应≤1:4(2²),阳性血清血凝抑制滴度与已知滴度不应相差一个滴度以上。红细胞对照无血凝现象。

5.2 禽流感病毒、新城疫病毒、传染性支气管炎病毒、禽腺病毒Ⅲ群(EDS)的血清血凝抑制效价≥1:16(2⁴)判为阳性;鸡毒支原体、滑液囊支原体的血清血凝抑制效价≥1:64(2⁶)判为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 阿氏液(Alsever's)

葡萄糖 2.05 g,氯化钠(NaCl)0.42 g,柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.8 g,柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.055 g,加蒸馏水定容至 100 mL,过滤,121 °C 高压灭菌 15 min,4 °C 保存备用。

A.2 0.85%生理盐水(pH 7.4)

氯化钠 4.25 g,溶于 500 mL 蒸馏水,调 pH 至 7.4,121 °C 高压灭菌 15 min,4 °C 保存备用。

附 录 B

(资料性附录)

1%鸡血红细胞悬液的制备

B.1 鸡血采集

用注射器吸取阿氏液约 1 mL,取 3 周龄~10 周龄 SPF 鸡(最少两只),从胸骨尖下方约 1.3 cm 处将注射器针头刺入心脏,吸取心血约 2 mL~4 mL,与 10 mL 阿氏液轻轻混合并置于离心管中。

B.2 鸡红细胞洗涤

将离心管中的血液经 1 500 r/min~1 800 r/min 离心 8 min,弃上清液和沉淀红细胞上层的白细胞薄膜,再次加入阿氏液,再重复以上过程后,加入阿氏液 20 mL,重悬沉淀,轻轻混合成红细胞悬液。

B.3 红细胞体积(压积)

准确计算保存在阿氏液中的鸡红细胞悬液体积(V_1),经 1 500 r/min~1 800 r/min 离心 8 min,吸取上清液,计算其体积(V_2),计算红细胞体积 V_3 ($V_3=V_1-V_2$)。

B.4 1%鸡红细胞悬液

1 倍体积(mL)的红细胞,加入 99 倍体积(mL)的生理盐水,用吸管反复吹吸使生理盐水与红细胞均匀混合。

参 考 文 献

- [1] GB/T 18936—2003 高致病性禽流感诊断技术
 - [2] NY/T 551—2002 产蛋下降综合征诊断技术
 - [3] SN/T 1109—2002 新城疫微量红细胞凝集抑制 试验操作规程
 - [4] SN/T 1182.2—2004 禽流感微量红细胞凝集抑制试验
-