



中华人民共和国国家标准

GB/T 18649—2014
代替 GB/T 18649—2002

牛传染性胸膜肺炎诊断技术

Diagnostic techniques of contagious bovine pleuropneumonia

2014-09-30 发布

2015-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

版权声明

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 18649-2014
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191216052495
防伪号: 2019-1216-0956-4659-7882
时 间: 2019-12-16
定 价: 32元

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
牛传染性胸膜肺炎诊断技术
GB/T 18649—2014

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.gb168.cn

服务热线: 400-168-0010

010-68522006

2014年9月第一版

*

书号: 155066·1-49775

版权专有 侵权必究

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 18649—2002《牛传染性胸膜肺炎(牛肺疫)诊断技术》。本标准与 GB/T 18649—2002 相比,主要技术变化如下:

- 删除了其中的微量凝集试验;
- 修改了其中的补体结合试验;
- 增加了聚合酶链式反应(PCR)检测方法和 C-ELISA 检测方法。

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:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:辛九庆、李媛。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 18649—2002。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191216052495 防伪编号: 2019-1216-0956-4659-7882 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

牛传染性胸膜肺炎诊断技术

1 范围

本标准规定了牛传染性胸膜肺炎的病原学检查、聚合酶链式反应(PCR)、补体结合试验、竞争ELISA(C-ELISA)试验诊断技术要求。病原学检查和聚合酶链式反应(PCR)适用于急性、亚急性及慢性病牛的病原诊断,补体结合试验和竞争ELISA(C-ELISA)试验适用于牛传染性胸膜肺炎感染牛的抗体检测。

本标准适用于口岸、产地及集散地、养殖企业或养殖户对牛传染性胸膜肺炎的诊断。

2 流行病学

健康牛和病牛接触,由呼吸道吸入病牛的“飞沫”是本病的主要传染途径。在该病的常在地区多见亚急性和慢性病程,以地方流行性为特点。但在新发生本病地区以急性经过为主。慢性病牛长期带菌,成为隐蔽的传染源。

3 临床症状

暴发流行时多呈急性病程,体温在41℃以上稽留。呼吸系统症状非常明显,表现为:呼吸困难,呈腹式呼吸,咳嗽弱而无力,有浆液或脓性鼻汁流出。食欲废绝。

4 病理变化

急性期病变以浆液渗出性纤维素性胸膜肺炎,间质多孔多汁,肺小叶出现各期肝变、多色,呈大理石样肺,肺胸膜和肋胸膜粘连,以及胸腔渗出液大量滞留为特征。转为慢性后逐渐形成肺包膜或坏死块。

5 病原分离鉴定

5.1 材料准备

10%马血清马丁肉汤和琼脂培养基:见附录A。

5.2 病料采集

用灭菌器械(注射器、剪刀、青霉素瓶、棉拭子等)无菌采集关节液、胸腔积液、鼻腔拭子和全血,关节液和胸腔渗出液置于青霉素瓶内。

5.3 病料的保存

病料均放入4℃冰箱内保存,并在24h内送到指定实验室。如果在24h内不能送达,应放入-20℃冰箱内保存。

5.4 培养方法

在无菌条件下吸取胸腔渗出液或关节液0.1mL~0.3mL接种于培养基中即可。鼻腔拭子用

5 mL 灭菌生理盐水(含有 100 U/mL 青霉素)浸泡 15 min 后,吸取 0.1 mL~0.3 mL 接种于培养基中即可。

5.5 结果判定

5.5.1 培养特征

5.5.1.1 培养性状和菌落形态

牛传染性胸膜肺炎病原在 10% 马血清马丁肉汤内生长初期呈轻微浑浊或呈白色点状、丝状生长,以后逐渐均匀混浊,半透明稍带乳光,不产生菌膜或沉淀,也无颗粒悬浮。在含有 10% 马血清的马丁琼脂培养基上生长迟缓,为极小的水滴状圆形略带灰色的微小菌落,中央有乳头状突起。菌落直径约 0.2 mm~0.5 mm,肉眼不易看见,需用放大镜或低倍显微镜观察。

5.5.1.2 染色镜检

取马丁肉汤培养物涂片置于温箱中干燥后在酒精灯上轻微火焰固定,再用 3%~5% 铬酸蒸馏水溶液固定 1 min~2 min,水洗,浸入用蒸馏水稀释的 1:30 姬姆萨氏染液中染色,染液缸放入普通冰箱内过夜。染色后取出用蒸馏水清洗,自然干燥后用 800 倍~1 000 倍显微镜观察。菌型为多形态,以球点形最常见,大小在 125 nm~250 nm。

5.5.2 生化特征

5.5.2.1 糖发酵试验

在进行糖发酵试验时,将各种糖培养管(见附录 B)加无菌的马血清 0.2 mL,再加被检菌液 0.1 mL 置 37 °C 下培养 5 d~7 d。

结果判定:丝状支原体丝状亚种 SC 型可轻度分解葡萄糖、麦芽糖、糊精、淀粉,产酸,使培养基变黄,而不产气;不能分解果糖、草糖、半乳糖和水杨苷。

5.5.2.2 硫化氢(H₂S)试验

将被检菌液接种于 10% 马血清马丁肉汤或琼脂斜面上,取一片乙酸铅滤纸条(见附录 C),夹在试管的棉塞下悬挂,置 37 °C 培养 5 d~7 d,滤纸条变黑或棕褐色为阳性反应。

5.5.2.3 硝酸盐还原试验

向硝酸盐还原培养基(见附录 D 中 D.1)中加 10% 无菌马血清,然后将被检菌液 0.1 mL 接种于硝酸盐还原培养基中,同时设不接种的对照,于 37 °C 培养 5 d~7 d。于 5 d 和 7 d 时取 1 mL 培养液置于干净试管中,再各滴 0.1 mL 试剂甲液和乙液(见 D.2),对照管同样加试剂。

结果判定:若试管菌液呈现红色或橙色者为阳性反应;如无红色出现,则可加 0.1 mL 二苯胺试剂,若呈现蓝色反应,则表示培养基中有硝酸盐存在;如不呈蓝色反应,表示硝酸盐和形成的亚硝酸盐已被还原成其他物质,则仍判定为硝酸盐还原试验阳性反应。

5.5.2.4 靛基质试验

向靛基质试验培养基(见附录 E 中 E.1)中加入 10% 无菌马血清,再将被检菌液 0.1 mL 接种于培养基中,37 °C 培养 5 d~7 d 后,滴加试剂 0.1 mL 于培养物液面,轻轻摇动,红色为阳性反应,黄色为阴性反应。

5.5.2.5 甲基红(MR)试验

按 10% 的体积向甲基红(MR)试验培养基(见附录 F 中 F.1)中加入无菌马血清,再接种被检菌液 0.1 mL,37 °C 培养。于培养第五天时取 1 mL 培养液于另一支试管中,并加 0.1 mL 试剂,如培养液呈现红色为 MR 试验阳性;黄色者为阴性,继续培养至第七天,再进行试验。

5.5.2.6 维培二氏(V-P)试验

可用下列三种试剂进行 V-P 试验:

a) Barritt's 试剂法

取被检菌液 2 mL 加甲液 1 mL、乙液 0.4 mL(见附录 G 中 G.1),充分混合,在 5 min 内呈粉红色反应为阳性。

b) O'Meara's 试剂法

取被检菌液 2 mL 加等量试剂(见 G.2)混合,充分振荡试剂,在 5 min 内呈现粉红色者为阳性反应。

c) 硫酸铜试剂法

取被检菌液 2 mL 加等量硫酸铜试剂(见 G.3)混合,充分振荡试剂,在 5 min 内呈粉红色反应为阳性。

上述三种方法为阴性,继续培养,再进行观察。

6 聚合酶链式反应(PCR)

6.1 材料与试剂

6.1.1 引物。

6.1.1.1 特异性引物:SC1 和 SC2 为丝状支原体丝状亚种 SC 型(MmmSC)特异性引物。

6.1.1.2 引物序列。

SC1:ATATACTTCTGTCTAGTAATATG;

SC2:CTGATTATGATGACAGTGGTCA。

6.1.1.3 引物浓度:浓度为 5 pmol/ μ L。

6.1.2 Taq 酶(5 U/ μ L)。

6.1.3 电泳缓冲液(TAE)。

6.1.4 琼脂糖:浓度为 1.5%。

6.1.5 DNA 分子质量标准。

6.2 试验程序

6.2.1 样品的采集与处理

6.2.1.1 组织样品的采集

参照 5.2 进行。

6.2.1.2 标准阳性样品的处理

用 1 mL 马丁汤培养基(含 10% 马血清,不含抗生素)溶解冻干菌种后,加入 9 mL 马丁汤内,混匀后从中吸取 1 mL 菌液加入到下一试管中,共稀释 9 管,另 1 管做空白对照。置于 37 °C 培养箱内培养 7 d~10 d,每日观察,待菌体个数达到每毫升 10^8 颜色变化单位(color change unit,CCU)时收获。

6.2.2 基因组 DNA 的提取

使用商品化的基因组 DNA 提取试剂盒,参照说明书进行操作。

6.2.3 PCR 反应

采用 20 μL 反应体系:

10 \times 缓冲液	2.0 μL
2.5 mmol/L dNTPs	1.6 μL
10 μmol 引物 1	1.0 μL
10 μmol 引物 2	1.0 μL
模板 DNA	1.0 μL
10u/ μL Taq 酶	0.5 μL
纯水	12.9 μL
总体积	20.0 μL

瞬时离心,置 PCR 仪内进行 PCR 循环。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。采用常规方法配制的 1.5% 琼脂糖进行制板并电泳检测。

6.3 PCR 产物的判定

6.3.1 标准阳性样品扩增出 277 bp 片段而空白对照不能扩增出任何条带,则 PCR 反应判定为有效。如标准阳性样品不能扩增出目的大小片段,或空白对照扩增出目的片段,则反应无效。

6.3.2 在 PCR 反应有效的前提下,待检样品扩增出的 DNA 片段为 277 bp,可判定待检样品为阳性,否则待检样品为阴性。

7 补体结合试验

7.1 材料准备

7.1.1 试验用巴比妥缓冲液,使用时作 1:5 稀释,配制方法见附录 H。

7.1.2 绵羊红细胞悬液使用阿氏液,制备方法见附录 I。

7.1.3 6% 绵羊红细胞悬液制备见附录 J。

7.1.4 抗原、标准阳性血清、阴性血清采用国际标准品,溶血素由兽医生物药品厂供应,按说明书使用。溶血素效价滴定见附录 K。

7.1.5 致敏绵羊红细胞制备:使用 12 单位 HD_{50} (50% 溶血程度) 的溶血素与等体积的 6% 绵羊红细胞混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,期间间隔 5 min 摇动一次。

7.1.6 补体效价滴定方法见附录 L。

7.1.7 抗原效价滴定方法见附录 M。

7.2 操作方法

7.2.1 被检血清、标准阴性血清、阳性血清均用巴比妥缓冲液作 1:10 稀释,于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中灭活 30 min。

7.2.2 在 96 孔微量反应板中,每孔加入 25 μL 抗原、25 μL 被检血清、25 μL 2.5 U 补体,振荡混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。

7.2.3 每孔加入 25 μL 致敏后的绵羊红细胞,振荡混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。

7.2.4 设标准阳性血清、阴性血清、补体对照、溶血素对照、红细胞对照以及抗原抗补体活性对照。具

体试验步骤见表 1。

表 1

步骤编号	1	2	3	4	5	6	7
试剂	抗原	被检血清	补体	振荡混匀后 37 °C 孵浴	致敏绵羊 红细胞	振荡混匀后 37 °C 孵浴	观察 试验结果
剂量	25 μL	25 μL	25 μL	30 min	25 μL	30 min	

7.3 结果判定

7.3.1 96 孔微量反应板 125 g 离心 2 min 或静止 10 min, 当所有对照成立的情况下, 判定被检孔补体结合百分率。

7.3.2 判定补体结合百分率方法见附录 N。

7.3.3 判定标准:

当所有对照成立的情况下, 判定++++为阳性; +、++、+++为疑似; -为阴性。

对于疑似样品需重新采集血清进行复检, 如果仍为疑似, 则应做病理学和病原学检查。

8 竞争酶联免疫吸附试验(C-ELISA)

8.1 材料与试剂

使用从世界卫生组织指定生产商处购买的商品化试剂盒。

8.2 试验程序

8.2.1 将待检血清(1/10)和工作浓度单抗(稀释液为 pH7.4 的 PBS, 含 0.5% 马血清和 0.05% 的吐温 20)各 50 μL 加入各孔中, 同时设立标准阴性血清、标准强阳性血清、标准弱阳性血清以及结合物对照孔、单抗对照孔。将 ELISA 反应板置于摇床上 37 °C 反应 1 h, 缓缓摇动。

8.2.2 用 PBS 溶液(pH7.4, 内含 0.05% 的吐温 20)冲洗 ELISA 板两次, 向所有孔中加入 100 μL 酶结合物, 37 °C 反应 30 min。

8.2.3 用 PBS 溶液(pH7.4, 内含 0.05% 的吐温 20)冲洗 ELISA 板三次, 向所有孔中加入 100 μL 底物, 37 °C 反应 30 min。

8.2.4 向所有孔中加入 100 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 以 405 nm 波长读取 OD 值。

8.2.5 质量控制:

- 单抗对照孔(C_m)OD 值应在 0.5~2.0 之间(最好接近于 1.0);
- 结合物对照孔(C_c)OD 值应小于 0.3;
- 标准阴性血清(CN)抑制百分比应小于 35%;
- 标准弱阳性血清(CP+)抑制百分比在 50%~80%之间;
- 标准强阳性血清(CP++)抑制百分比在 60%~90%之间。

8.3 结果判定

8.3.1 单个样品抑制率按式(1)计算。

$$\text{单个样品抑制率} = \frac{[\text{单抗对照孔}(C_m) \text{ 的 OD 值} - \text{样品的 OD 值}]}{[\text{单抗对照孔}(C_m) \text{ 的 OD 值} - \text{标准阴性血清对照}(CN) \text{ 的 OD 值}] \times 100\%} \quad \dots\dots(1)$$

- 8.3.2 被检样品抑制率等于或低于 40% 为阴性。
- 8.3.3 被检样品抑制率在 40%~50% 之间为疑似。
- 8.3.4 被检样品抑制率等于或大于 50% 为阳性。
- 8.3.5 对于疑似样品需重新采集血清进行复检,如果仍为疑似,则应做病理学和病原学检查。

9 综合判定

本病的最终确诊需综合流行病学、临床症状、病理剖检、血清学和病原学结果进行。血清学阳性并不表明感染本病。病原分离并鉴定是确诊本病的最重要根据。

附 录 A
(规范性附录)
支原体培养基的制备

A.1 10%马血清马丁肉汤(pH7.8~8.0)

将制备的马丁肉汤分装于灭菌试管内,每管 4.5 mL,添加无菌马血清 0.5 mL。

A.2 10%马血清马丁琼脂

马丁肉汤中加入琼脂,使含量达到1.3%~1.5%,经 121 kPa 高压灭菌 30 min 即成马丁琼脂。在灭菌的 6 cm~8 cm 直径培养皿内加无菌马血清 1 mL,再添加煮沸融化降温至 55 °C~60 °C 的马丁琼脂 9 mL,轻轻摇动混合均匀,静置凝固后即成马丁琼脂培养基。

全国动物卫生标准化技术委员会

附 录 B

(规范性附录)

糖培养基管的制备

取蛋白胨水(pH7.8~8.0)100 mL、氯化钠 0.5 g、所需各种糖类 0.5 g~1.0 g,溶解各成分,加入 1.6%溴甲酚紫酒精溶液指示剂 0.1 mL 混匀。分装到试管中,每管 2 mL,管内装有倒置的小玻璃管(杜汉氏发酵管)。经 106.4 kPa 20 min 灭菌备用。

订单号: 0100191216052495 防伪编号: 2019-1216-0956-4659-7882 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附 录 C
(规范性附录)
乙酸铅纸条的制备

取滤纸剪成 6.5 cm×0.6 cm 大小的纸条,置平皿中,经 112 kPa 20 min 灭菌,烘干。再将滤纸条浸泡在灭菌的饱和乙酸铅溶液(10 g 乙酸铅溶于 50 mL 沸蒸馏水中,即为饱和乙酸铅溶液),浸透后取出,置无菌平皿内,37 ℃ 烘干,保存于灭菌的试管中备用。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附录 D

(规范性附录)

硝酸盐还原试验培养基和指示剂的配制

D.1 硝酸盐还原试验培养基的配制

取营养肉汤或马丁肉汤 100 mL, 硝酸钾(KNO_3) 0.1 g, 调 pH 至 7.8~8.0, 分装试管, 112 kPa 20 min 灭菌备用。

D.2 指示剂的配制

试剂 1: 甲液: 对氨基苯磺酸 0.5 g, 5 mol/L 乙酸; 乙液: α -萘胺 0.5 g, 5 mol/L 乙酸 100 mL。

试剂 2: 二苯胺试剂: 二苯胺 0.5 g 溶于 100 mL 浓硫酸中, 用 20 mL 蒸馏水稀释。

附 录 E

(规范性附录)

靛基质试验培养基和指示剂的配制

E.1 靛基质试验培养基的配制

蛋白胨 1 g,氯化钠 0.5 g,色氨酸 0.1 g,蒸馏水 100 mL。溶解各成分,调 pH 至 7.8~8.0,分装试管,经 106.4 kPa 20 min 灭菌备用。

E.2 指示剂的配制

对二甲基氨基苯甲醛 5 g,95%乙醇 75 mL,浓盐酸 25 mL。将对二甲基氨基苯甲醛溶于乙醇中,再缓缓加入浓盐酸即成。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附 录 F

(规范性附录)

甲基红(MR)试验培养基和指示剂的配制

F.1 甲基红(MR)试验培养基的配制

蛋白胨 0.7 g, 葡萄糖 0.5 g, 磷酸氢二钾 0.5 g, 蒸馏水 100 mL。各成分溶解后, 调 pH7.8~8.0, 分装试管。经 106.4 kPa 20 min 灭菌备用。

F.2 指示剂的配制

甲基红 0.02 g, 95%酒精 60 mL, 蒸馏水 40 mL。先将甲基红研磨, 溶解于酒精中, 再加蒸馏水即成。

附 录 G

(规范性附录)

维培二氏(V-P)试验培养基的配制

G.1 Barritt's 试剂的配制

甲液:6% α -萘酚酒精溶液。乙液:40%氢氧化钾溶液。

G.2 O'Meara's 试剂的配制

氢氧化钾(或氢氧化钠)40 g,肌酐(creatinine) 0.3 g,溶于蒸馏水 100 mL,经 106.4 kPa 20 min 灭菌备用。

G.3 硫酸铜的配制

1 g 硫酸铜溶于 40 mL 浓氨水中,加 10%氢氧化钾 960 mL 即成。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附 录 H
(规范性附录)

巴比妥缓冲液(VB)配制

氯化钠	85 g
巴比妥酸	5.75 g
巴比妥钠	3.75 g
氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1.68 g
氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.37 g
灭菌双蒸水	2 000 mL

用盐酸调节 pH 至 7.3,使用时用灭菌双蒸水作 1 : 5 稀释。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附录 I
(规范性附录)
阿氏液配制

A 液

葡萄糖	20.5 g
灭菌双蒸水	200 mL

B 液

柠檬酸钠	12.0 g
氯化钠	4.2 g
灭菌双蒸水	800 mL

用 5% 柠檬酸调节 B 液 pH 至 6.1。混合 A 液、B 液，用蔡氏滤器过滤除菌。

全国动物卫生标准化技术委员会专用

附 录 J

(规范性附录)

6%绵羊红细胞的制备

无菌采集健康公绵羊静脉血,脱纤后用阿氏液悬浮,1 500 g 洗涤 3 次,每次 10 min。收集红细胞沉淀,用阿氏液配成 6%悬液,4 ℃放置 48 h 后使用,但最多使用不超过 3 周。

附 录 K
(规范性附录)
溶血素效价测定

溶血素效价的测定:取 0.1 mL 溶血素作 10 倍系列稀释至 1:1 000 作为基础液,其稀释方法见表 K.1。

表 K.1

单位为毫升

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释度	1:2 000	1:3 000	1:4 000	1:5 000	1:6 000	1:8 000	1:10 000	1:15 000
1:1 000 溶血素	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
VB	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	7.0	9.0	14.0
总量	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0	15.0

按照表 K.2 程序加入各种试验成分,在 37 °C 水浴 30 min,1 500 g 离心 10 min。将 100% 溶血管的液体与等体积 VB 混合制成 50% 溶血比色管。能使红细胞液 50% 溶血(HD₅₀)的溶血素最大稀释度作为溶血素效价,使用 12 个单位的 HD₅₀。

表 K.2

单位为毫升

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
溶血素稀释度	1:100	1:1 000	1:2 000	1:3 000	1:4 000	1:5 000	1:6 000	1:8 000	1:10 000	1:15 000	
溶血素用量	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
1:20 补体	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
6% 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
VB	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.8
振荡后 37 °C~38 °C 水浴 30 min											
结果判定	—	—	—	—	—	—	±	±	±	±	+
注:“+”抑制溶血,“±”部分溶血,“—”全部溶血。											

如表 K.2 中第 8 管溶血程度达到 50%,而空白对照管都没有溶血现象,则该批溶血素的效价即为 1:8 000,使用 12 个单位的 HD₅₀,则应将溶血素作 8 000/12=666.6 倍稀释。

附录 L
(规范性附录)
补体效价测定

使用 VB 稀释补体,具体操作见表 L.1 和表 L.2。

表 L.1

管号	1	2	3	4	5	6
VB/mL	1.45	1.70	1.95	2.20	2.45	2.70
补体/mL	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
稀释度	1 : 30	1 : 35	1 : 40	1 : 45	1 : 50	1 : 55

表 L.2

管号	1	2	3	4	5	6
补体稀释度	1 : 30	1 : 35	1 : 40	1 : 45	1 : 50	1 : 55
VB/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
补体/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
最终补体 稀释度	1 : 60	1 : 70	1 : 80	1 : 90	1 : 100	1 : 110

将 1 : 30~1 : 110 各稀释度补体 25 μ L 加入 1.5 mL 离心管中,每个补体稀释度孔中加入 25 μ L VB,再加入 25 μ L 致敏后的绵羊红细胞,振荡混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后 125 g 离心 2 min,判定结果。

补体效价判定:使绵羊红细胞 100% 溶解的补体最高稀释度即是该补体效价。检测时使用 2.5 U 补体。例如补体在 1 : 60 时使绵羊红细胞 100% 溶解,那么该补体效价为 60,使用时应作 $60/2.5=24$ 倍稀释。

附录 M
(规范性附录)
抗原效价测定

M.1 用 VB 液 2 倍连续稀释抗原,从 1 : 10 到 1 : 640。

M.2 用 VB 液 2 倍连续稀释阳性血清,从 1 : 10 到 1 : 1 280。

M.3 使用 96 孔微量反应板对抗原进行方阵滴定。具体操作如图 M.1。每孔分别加入对应稀释度的抗原 25 μL 、阳性血清 25 μL 、2.5 U 补体 25 μL ,振荡混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。每孔加入致敏后的绵羊红细胞 25 μL ,振荡混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。125 g 离心 2 min 判定结果。同时设 0.5 U、1 U、2.5 U 补体对照,致敏红细胞对照,每个抗原稀释度的抗补体对照。

	1	2	3	4	5	6	7	8	抗原
A	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—	1 : 10
B	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	—	1 : 20
C	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	1 : 40
D	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	1 : 80
E	+	++	+++	+++	+++	+	—	—	1 : 160
F	—	—	—	—	—	—	—	—	1 : 320
G	—	—	—	—	—	—	—	—	1 : 640
阳性血清	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1 280	

图 M.1

M.4 当对照全部成立的情况下,补体 100% 被结合的阳性血清最高稀释度对应的抗原最高稀释度即是抗原效价。如图 M.1 所示,当阳性血清 1 : 160、抗原 1 : 80 时,抗原抗体复合物能够结合 100% 补体,那么该抗原效价为 1 : 80。检测时使用 2 个单位,将抗原作 $80/2=40$ 倍稀释。

附录 N
(规范性附录)
补体结合百分率判定

补体结合百分率判定见表 N.1。

表 N.1

补体结合百分率	判定结果
100%	++++
75%	+++
50%	++
25%	+
0%	-

