



中华人民共和国国家标准

GB/T 34720—2017

山羊接触传染性胸膜肺炎诊断技术

Diagnostic techniques for contagious caprine pleuropneumonia

2017-11-01 发布

2018-05-01 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

订单号: 0100191216052481 防伪编号: 2019-1216-0944-3390-1749 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

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参考世界动物卫生组织 OIE《陆生动物疫病诊断试验和疫苗手册》(2015 年版)第 2.7.6 章山羊接触传染性胸膜肺炎诊断技术部分规定。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

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:中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:逯忠新、储岳峰、高鹏程、赵萍、贺英、陈胜利。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及附录 D 与《一种用于检测山羊支原体山羊肺炎亚种抗体的间接血凝诊断试剂盒》相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人姓名:逯忠新、储岳峰、赵萍、高鹏程、贺英、郭晗

地址:甘肃省兰州市城关区徐家坪 1 号

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

山羊接触传染性胸膜肺炎诊断技术

1 范围

本标准规定了山羊接触传染性胸膜肺炎临床症状、病理变化、流行病学临床诊断及病原分离鉴定、PCR、间接血凝试验等实验室诊断的技术要求。

本标准适用于山羊接触传染性胸膜肺炎的诊断。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp:碱基对(Base Pair)

CCPP:山羊接触传染性胸膜肺炎(Contagious Caprine Pleuropneumonia)

CCU:颜色变化单位(Color Change Unit)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside Triphosphates)

IHA:间接血凝试验(Indirect Hemagglutination Assay)

Mccp:山羊支原体山羊肺炎亚种(*Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*)

MTA:改良 Thiaucourt 氏琼脂培养基(Modified Thiaucourt's Agar)

MTB:改良 Thiaucourt 氏肉汤培养基(Modified Thiaucourt's Broth)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

PPLO:类胸膜肺炎微生物(Pleuropneumonia-like Organism)

TAE:核酸电泳缓冲液(Tris-Acetic acid-EDTA)

Taq 酶:*Taq* DNA 聚合酶(*Taq* DNA Polymerase)

3 临床诊断

3.1 临床症状

3.1.1 急性病例:潜伏期 2 d~28 d。初期病羊咳嗽、不愿走动并出现发热(达 41 °C 或以上),逐渐出现呼吸急促(有时会发出呼噜声)和剧烈咳嗽等症状,发病后期,病羊四肢外展站立且脖颈伸直,口鼻持续流涎,鼻孔逐渐被脓性分泌物堵住,舌头伸出,死亡。

3.1.2 慢性病例:病程持续时间长,可达数月,一般仅表现消瘦、厌食、间歇性咳嗽、流涕和发热(持续 3 d~10 d)等。

3.2 病理变化

3.2.1 病变仅局限于胸腔。

3.2.2 急性病例:肺组织肝变(多数为单侧非对称性肝变,呈葡萄酒颜色)、肺和胸膜粘连、胸腔积有纤维性渗出液等,严重时胸腔渗出物暴露于空气中在肺表面形成一层胶状包膜。

3.2.3 慢性病例:肺组织局部出现小面积肝变或坏死灶。

3.3 流行病学

3.3.1 本病主要依靠飞沫和接触传播,一年四季均有流行,冬春季节多发。

3.3.2 所有年龄、性别的山羊对本病均易感。耐过病羊在相当长时间内可通过呼吸道向外界排毒,成为传染源。

3.3.3 环境和应激因素如营养缺乏、气候骤变、羊群密集、长途调运、寒冷潮湿等情况下易诱发本病。

3.3.4 非疫区首次发病羊多呈急性经过,死亡率高;疫区羊发病多呈慢性经过,死亡率低。

3.4 临床诊断结果判定

符合 3.1、3.2、3.3 的临床症状、病理变化及流行病学特征的发病羊,可判定为疑似山羊接触传染性胸膜肺炎。

4 实验室诊断

4.1 样品的采集与运输

4.1.1 样品的采集

4.1.1.1 将棉拭子伸入待检山羊鼻腔内采集分泌物;无菌采集肺脏病变部位、特别是病变部位和非病变部位交界处的肺组织和纵隔淋巴结;若有胸水则无菌采集后,分别放入灭菌容器保存。

4.1.1.2 无菌采集羊颈静脉血,常规方法分离血清。

4.1.2 样品运输与保存

4.1.2.1 样品采集后,置冰上冷藏送至实验室检测。

4.1.2.2 血清储存应置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,检测前应在 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min。

4.1.2.3 棉拭子、组织样品和胸水储存应置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

4.2 器械与设备

4.2.1 普通培养箱; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.2.2 组织匀浆设备。

4.2.3 低温台式高速离心机。

4.2.4 生物安全柜或超净工作台。

4.2.5 普通光学显微镜。

4.2.6 PCR 扩增仪。

4.2.7 电泳仪和电泳槽。

4.2.8 凝胶成像系统或紫外检测仪。

4.2.9 涡旋振荡器。

4.2.10 微型震荡器。

4.2.11 水浴箱。

4.2.12 96 孔 V 型(110°)聚苯乙烯血凝反应板。

4.2.13 移液器。

4.3 病原分离与鉴定

4.3.1 试剂与材料

除另有规定外,生物试剂为生化试剂级、化学试剂为分析纯。MTB 培养基(见 A.1)、MTA 培养基(见 A.2)。

4.3.2 样品处理

4.3.2.1 鼻拭子置于 1 mL MTB 培养基中,充分捻动,挤干后弃去拭子,3 000 r/min 离心 10 min,取上清 0.5 mL,作为接种材料。

4.3.2.2 组织样品用剪刀剪碎,每 0.1 g 加 MTB 培养基 0.9 mL,研磨匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清 0.5 mL,作为接种材料。

4.3.2.3 胸水用 MTB 培养基 1:1 稀释后,3 000 r/min 离心 10 min,取上清 0.5 mL,作为接种材料。

4.3.3 样品接种

取样品上清液接种 4.5 mL MTB 培养基,标记为 10^{-1} 管,并作 10 倍系列稀释至 10^{-3} 管。同时,从各个稀释度(10^{-1} ~ 10^{-3})试管中取 0.2 mL 接种 MTA 培养基(培养皿),用封口膜封口。将 3 个稀释度的 MTB 试管和 MTA 平皿置 37 °C 培养。

4.3.4 观察结果及克隆纯化

4.3.4.1 MTB 培养物

4.3.4.1.1 连续观察 7 d。若培养基颜色变黄、不浑浊或轻微浑浊,则判为样品分离疑似阳性,取样按 4.3.5 方法进行鉴定;同时取样接种到 MTA 培养基上,按 4.3.4.2 方法进行克隆纯化。

4.3.4.1.2 若培养基变黄但明显浑浊,应将 3 管培养物用孔径 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,再接种到 MTB 培养基中,按 4.3.4.1.1 方法进行观察和克隆纯化。

4.3.4.1.3 若培养基不变黄且不浑浊,则 3 管均盲传 1 代,按 4.3.4.1.1 方法进行观察和克隆纯化;盲传后仍未变黄则弃之。

4.3.4.2 MTA 培养物

4.3.4.2.1 接种 3 d 后每天用低倍显微镜(4 倍~10 倍物镜)观察培养皿,连续观察至第 15 天。若有支原体生长,应为典型的有“中心脐”菌落:肉眼不易看见的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,直径约 0.2 mm~0.5 mm;则判为样品分离疑似阳性。切取菌落(含琼脂块),倒置在一个新的 MTA 培养基的琼脂表面,轻轻动琼脂块进行克隆纯化,切取克隆纯化的单个菌落(含琼脂块)进行鉴定。

4.3.4.2.2 若 15 d 后仍未见支原体菌落生长,则弃之。

4.3.5 支原体鉴定

将 4.3.4.1 和 4.3.4.2 中样品分离疑似阳性的培养物和克隆纯化的单个菌落,按照 4.4 做进一步鉴定。

4.3.6 结果判定

样品分离疑似阳性,且 PCR 方法鉴定结果阳性,则判为山羊接触传染性胸膜肺炎病原分离阳性,表述为检出山羊支原体山羊肺炎亚种。否则,表述为未检出山羊支原体山羊肺炎亚种。

4.4 PCR 方法

4.4.1 试剂与材料

灭菌生理盐水(0.85%氯化钠溶液),市售基因组 DNA 提取试剂盒,2×PCR 反应预混合液(含 *Taq* 酶),6×PCR 上样缓冲液,DNA 分子质量标准,适宜的核酸染料,TAE 电泳缓冲液(见 B.1),1%的琼脂糖电泳凝胶板(见 B.2)。

采用引物 *Mccp*-spe-F/*Mccp*-spe-R 用于山羊支原体山羊肺炎亚种核酸的检测,靶基因为 *arcD* 基因,产物大小为 318 bp。

上游引物(*Mccp*-spe-F):5'-ATCATTTTTTAATCCCTTCAAG-3'。

下游引物(*Mccp*-spe-R):5'-TACTATGAGTAATTATAATATATGCAA-3'。

引物浓度均配成 20 pmol/μL。

4.4.2 样品处理

鼻拭子、组织和胸水等样品按 4.3.2 方法处理,将获得的上清液经 13 000 r/min 离心 20 min 后,弃上清,收集沉淀,提取 DNA。

MTB 培养物,13 000 r/min 离心 20 min 后,弃上清,收集沉淀,提取 DNA。

MTA 单个菌落(含琼脂块),浸入 1 mL 灭菌生理盐水,室温浸泡 30 min,涡旋震荡,3 000 r/min 离心 10 min,取上清,13 000 r/min 离心 20 min 后,弃上清,收集沉淀,提取 DNA。

4.4.3 样品 DNA 提取

用市售基因组 DNA 提取试剂盒,按试剂盒说明书操作,提取基因组 DNA,立即进行 PCR 反应或 -20 °C 保存。

4.4.4 PCR 反应

4.4.4.1 反应体系

按下列方法配制 50 μL PCR 反应体系:

2×PCR 预混合液(含 <i>Taq</i> 酶)	25 μL
上游引物	1 μL
下游引物	1 μL
灭菌去离子水	18 μL
DNA 模板	5 μL

每次反应设阴、阳性样品对照,阴性样品对照用 MTB 培养基提取的 DNA 作为模板,阳性对照用 *Mccp* 灭活培养物提取的 DNA 作为模板;同时设阳性质粒对照(含靶基因片段序列,参见附录 C)和空白对照(灭菌去离子水)。

4.4.4.2 反应程序

95 °C 3 min 进行预变性;然后进行 35 个循环的扩增(94 °C 30 s,47 °C 30 s,72 °C 30 s),最后 72 °C 延伸 5 min,4 °C 保存。

4.4.5 反应产物电泳观察

取 PCR 产物各 5 μL(包括被检样品,阴性对照样品、阳性对照样品、阳性质粒对照和空白对照)分别与 1 μL 6×PCR 上样缓冲液混匀,连同 DNA 分子质量标准,在 1%琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像

系统中观察结果。

4.4.6 质控标准

当阳性对照(样品、质粒)有 318 bp 的特异性扩增条带,阴性样品和空白对照没有相应的条带,说明质控合格。

4.4.7 结果判定

样品有大小为 318 bp 的特异性扩增条带判为 PCR 结果阳性,表述为检出山羊支原体山羊肺炎亚种核酸。样品无特异性的阳性扩增条带判为 PCR 结果阴性,表述为未检出山羊支原体山羊肺炎亚种核酸。

4.5 血清学检测(间接血凝试验)

4.5.1 试剂与材料

间接血凝试验抗原,间接血凝试验阴性对照血清、阳性对照血清,间接血凝稀释液,配制方法见附录 D。

4.5.2 操作方法

4.5.2.1 稀释被检血清和阴、阳性对照血清

在 96 孔聚丙烯反应板上进行。每份血清用 1 排孔,从第 1 孔开始,至第 8 孔,每孔滴加稀释液 25 μ L,用微量移液器吸取被检血清 25 μ L 加入第 1 孔,充分混匀后吸取 25 μ L 加入第 2 孔依次做倍比连续稀释至第 7 孔(1:2、1:4、1:8...1:128),混匀后从第 7 孔弃去 25 μ L,第 8 孔作为空白对照。

4.5.2.2 加间接血凝试验抗原

从第 1 孔开始,至第 8 孔,每孔滴加间接血凝试验抗原 25 μ L。

4.5.2.3 震荡

加间接血凝试验抗原后将 V 型反应板放在微型震荡器上震荡 1 min,盖上玻璃板,置 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 2 h,观察和判定凝集程度。

4.5.2.4 凝集程度的判定标准

用下列符号表示红细胞凝集程度:

- “++++”,表示 100%红细胞被凝集,形成一层均匀膜,布满整个孔底。
- “+++”,表示约 75%红细胞被凝集,在孔底形成一层薄膜,面积比前者稍小。
- “++”,表示约 50%红细胞凝集,在孔底形成薄膜凝集,边缘松散或呈锯齿状。
- “+”,表示约 25%红细胞凝集,在孔底呈稀薄、散在、少量凝集,孔底有小圆点。
- “±”,表示 25%以下红细胞凝集,沉于孔底,但周围不光滑或中心有空斑。
- “—”,表示无红细胞凝集,完全沉于孔底,呈光滑的圆点。

4.5.3 实验成立的条件

所设各项对照出现如下结果则试验成立,否则应重做:

- 空白对照孔应全部无红细胞凝集,凝集强度为“—”。
- 阳性血清对照孔应全部凝集,凝集强度为“++++”。

——阴性血清对照孔仅 1 : 2 稀释度允许有不同程度凝集,其余各孔均应无凝集,凝集强度为“—”。

4.5.4 结果判定

以出现 4.5.2.4 中“++”或以上凝集反应的最大稀释孔判定为样品的血凝效价。当实验符合 4.5.3 的条件,样品血凝效价 $\geq 1 : 8$ 判为抗体阳性,表述为山羊接触传染性胸膜肺炎血清学阳性。样品血凝效价 $\leq 1 : 2$ 判为抗体阴性,表述为山羊接触传染性胸膜肺炎血清学阴性。当样品血凝效价介于二者之间判为可疑,应重新检测,重新检测结果仍为可疑,则判为抗体阳性,表述为山羊接触传染性胸膜肺炎血清学阳性。

5 综合判定

凡具有 4.3.6、4.4.7、4.5.4 中任何一项阳性者,均判为山羊接触传染性胸膜肺炎阳性。

附 录 A
(规范性附录)
病原分离溶液的配制

A.1 MTB 培养基

A.1.1 成分

PPLO 肉汤(不含结晶紫)	21 g/L
25%鲜酵母浸液	100 mL/L
灭活马血清	200 mL/L
5%醋酸铊溶液	4 mL/L
青霉素	20 万 IU/L
葡萄糖	2 g/L
丙酮酸钠	2 g/L
0.4%酚红	0.18 mL

A.1.2 制备方法

将 21 g PPLO 肉汤溶于 700 mL 去离子水中,116 °C 高压灭菌 30 min,其余成分混合溶解后用 0.22 μm 滤膜过滤,无菌加入冷却的 PPLO 肉汤中,用灭菌的 1 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 7.6~7.8,分装试管或锥形瓶等,2 °C~8 °C 保存备用。

A.2 MTA 培养基

A.2.1 成分

PPLO 琼脂	35 g/L
灭活马血清	200 mL/L
25%酵母浸出液	100 mL/L
5%醋酸铊	4 mL/L
青霉素	20 万 IU/L
葡萄糖	2 g/L
丙酮酸钠	2 g/L
0.4%酚红	5 mL/L

A.2.2 制备方法

PPLO 琼脂 35 g 溶于 700 mL 去离子水,116 °C 高压灭菌 30 min,其余成分用 0.22 μm 滤膜过滤;灭菌后的 PPLO 琼脂冷却至 50 °C 左右时加入预热到 50 °C 左右的滤膜过滤部分,用灭菌的 1 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 7.6~7.8,倾倒平皿或斜面等,2 °C~8 °C 保存备用。

附 录 B
(规范性附录)
PCR 反应溶液的配制

B.1 TAE 电泳缓冲液(pH 8.0)的配制

Tris(羟基甲基氨基甲烷)碱	242 g
EDTA	37.2 g
冰乙酸	57.1 mL

加去离子水至 1 000 mL,使用前用去离子水 50 倍稀释。

B.2 1%的琼脂糖电泳凝胶板制备

将琼脂糖 1 g 加入 100 mL 1×TAE 电泳缓冲液中,加热融化,温度降至 60 °C 左右时加入适宜的核酸染料,均匀铺板,厚度为 3 mm~5 mm。

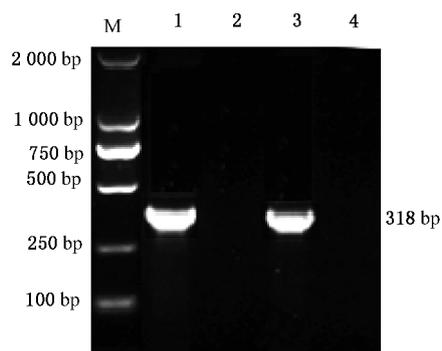
附录 C

(资料性附录)

PCR 检测电泳例图及靶基因片段的 DNA 序列

C.1 PCR 检测电泳例图

PCR 检测电泳例图见图 C.1。



说明：

M —— DNA 分子质量标准 DL2000；

1 —— 阳性质粒对照；

2 —— 空白对照；

3 —— 阳性样品对照；

4 —— 阴性样品对照。

图 C.1 PCR 检测电泳例图

C.2 PCR 扩增靶基因(*arcD*)片段序列

大写字母为引物所在位置(Gabes 株, Genbank Accession No.: AY529462)：

ATCATTTTTAATCCCTTCAAGtagtggaattgacggtgcagtattccattattaattggtgtgttttaaacaacaagat
 gtattagcttcaggatcaattacagcattttcatttgcatcagggttagttaacttaattactccaacaagtggtgtgttatgggagtattgcaattaca
 agaatcgattatggaaaatttgtaaaggatttagtccattgtagcagttattatcagtaagttcattaaccttattattgataggtggagcaattggtgg
 aacaaTTGCATATATTATAATTACTCATAGTA(318 bp)

附录 D

(规范性附录)

间接血凝试验材料的制备和溶液的配制

D.1 间接血凝试验阳性对照血清的制备

D.1.1 Mccp 免疫用抗原的制备

D.1.1.1 灭活抗原

用 MTB 培养基培养 Mccp 模式株 F38, 取对数生长期培养物 2 L ($\geq 1.0 \times 10^8$ CCU/mL), 向菌液中加入 40% 甲醛溶液, 使其终浓度为 0.2%, 随加随摇, 使其充分混合, 置 37 °C 灭活 12 h (以瓶内温度达 37 °C 开始计时), 期间振摇 3 次~4 次, 灭活后 4 °C 12 000 r/min 离心 30 min, 沉淀物用 0.15 mol/L pH 6.4 PBS 悬浮, 如上离心洗涤 3 次后, 配成原培养液体积的 1/100, 测定浓度后稀释至 10 mg/mL 备用。

D.1.1.2 弗氏佐剂抗原

市售弗氏不完全佐剂与 Mccp 灭活抗原等量混合、乳化, 制成弗氏不完全佐剂抗原备用; 市售弗氏完全佐剂与 Mccp 灭活抗原等量混合、乳化, 制成弗氏完全佐剂抗原备用。

D.1.2 免疫家兔和分离血清

选用体重 2 kg 左右的健康雄性家兔。第一次免疫, 用充分乳化的弗氏完全佐剂抗原, 于每只兔两后腿足部皮下, 淋巴结处及背部皮下多点接种, 接种量为 1.5 mL, 14 d 后仍以上述抗原和剂量由背部皮下多点接种, 进行第二次免疫; 隔 11 d 后, 以弗氏不完全佐剂抗原, 由每只兔肩部肌肉 2 点, 背部皮下多点接种, 接种剂量为 3 mL, 为其第三次免疫; 11 d 后, 取制备好的不含佐剂的灭活抗原 (10 mg/mL) 由每只兔耳静脉注射 1.5 mL, 进行第四次高免, 隔 14 d 后采血, 常规方法分离血清。

D.2 间接血凝试验阴性对照血清的制备

选取经血清学证实为山羊接触传染性胸膜肺炎抗体阴性的健康山羊, 颈静脉采血, 无菌分离血清; 或选取健康雄性家兔, 心脏或颈动脉插管采血, 无菌分离血清。

D.3 间接血凝试验抗原的制备

D.3.1 Mccp 纯化多糖抗原的制备

用 MTB 培养基培养 Mccp 模式株 F38, 取对数生长期培养物 2 L ($\geq 1.0 \times 10^8$ CCU/mL), 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 用冰醋酸调节上清液 pH 至 5.0, 煮沸 1 h, 待冷却后用普通滤纸过滤, 收集滤液; 于滤液中加入无水乙醇至最终浓度为 80%, 充分振摇, 离心收集沉淀, 沉淀物即为多糖抗原粗制品。将粗制多糖抗原溶解在适量灭菌水中, 加入等体积配置好的 60% 苯酚 (体积分数), 混匀, 68 °C 水浴 1 h, 取出置 4 °C 过夜后, 经 6 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 并用 0.1 mol/L 氯化钙溶液透析 24 h; 加入 2 倍体积的无水乙醇, 混匀, 置 4 °C 过夜后, 再经 7 000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀物用无水乙醇和丙酮分别洗涤, 然后用灭菌水溶解, 过滤除菌后, 即为纯化多糖抗原。将多糖抗原浓度稀释为 150 μ g/mL, -20 °C 保存备用。

D.3.2 5%绵羊红细胞悬液的配制

颈静脉无菌采取健康成年雄性绵羊血液于灭菌的装有玻璃珠的锥形烧瓶中,均匀摇动脱去纤维蛋白,按体积比与等量的红细胞保存液混匀,混匀后分装于灭菌瓶中(5 mL~10 mL),2℃~8℃冰箱可保存2个月。使用时,将红细胞移入离心管,3 000 r/min离心30 min,弃上清液,沉淀物用0.15 mol/L pH 7.2 PBS悬浮,如上洗涤4次,配成5%红细胞悬液。

D.3.3 绵羊红细胞戊二醛化和鞣酸化

取5%红细胞悬液5份与2℃~8℃保存的2.5%戊二醛1份混合,置磁力搅拌器上室温搅拌醛化2 h,以3 000 r/min离心5 min,弃上清液,沉淀用0.15 mol/L pH 7.2 PBS悬浮,如上洗涤3次,配成5%的醛化红细胞悬液,加0.01%的硫柳汞防腐,2℃~8℃冰箱保存。用抗原致敏前,将5%的醛化红细胞悬液与等量的新配1:20 000鞣酸溶液混合,置37℃水浴30 min,以3 000 r/min离心5 min,弃上清液,沉淀物用0.15 mol/L pH 6.4 PBS悬浮,如上洗涤3次,配成5%醛化-鞣酸化红细胞悬液。

D.3.4 抗原敏化红细胞的制备

分别取1份5%醛化-鞣酸化红细胞与1份Mccp纯化多糖抗原,37℃水浴作用30 min,其间不断搅拌,以3 000 r/min离心5 min沉积红细胞,用含1%灭活健兔血清0.15 mol/L pH 7.2 PBS悬浮,如上洗涤3次,配成10%致敏红细胞悬液。使用前,用稀释液稀释成1%的使用液,即为间接血凝抗原。

D.4 间接血凝稀释液配制

D.4.1 成分

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	19.34 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	2.86 g
氯化钠(NaCl)	4.25 g
去离子水加至	1 000 mL

D.4.2 制备方法

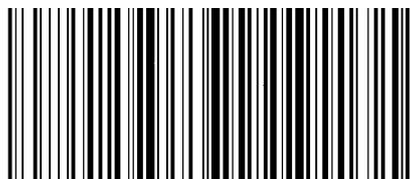
各成分溶解到去离子水后,103.41 kPa(121℃)高压30 min灭菌后,按99 mL溶液加入灭活健康兔血清(56℃水浴灭活30 min)1 mL混合,即为间接血凝稀释液。

 **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 34720-2017
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191216052481
防伪号: 2019-1216-0944-3390-1749
时 间: 2019-12-16
定 价: 24元



GB/T 34720-2017

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
山羊接触传染性胸膜肺炎诊断技术
GB/T 34720—2017

*

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.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2017年11月第一版

*

书号: 155066·1-57912

版权专有 侵权必究