

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1085—2002

副结核病补体结合试验操作规程

Procedure of complement fixation test
for paratuberculosis

2002-03-15 发布

2002-09-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准是按照 GB/T 1.1—1993《标准化工作导则 第 1 单元：标准的起草与表述规则 第 1 部分：标准编写的基本规定》的要求编写的。

本标准参考了国内外有关资料 and 我国在这方面的经验，制定了适合我国出入境动物检验检疫的操作方法。

本标准的附录 A、附录 B 为标准的附录。

本标准由中华人民共和国国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准起草人：曹燮政、范华炜、王玉玲。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

副结核病补体结合试验操作规程

SN/T 1085—2002

Procedure of complement fixation test for paratuberculosis

1 范围

本标准规定了副结核病补体结合试验的操作规范。

本标准适用于牛、绵羊、山羊副结核病的检验,其他哺乳动物可以参照。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法

3 器材和试剂

3.1 器材

3.1.1 玻璃试管:10 mm×75 mm,圆底,洁净,同质。

3.1.2 试管架。

3.1.3 加样器:可调式或定量式,0.05 mL~1.0 mL。

3.1.4 离心机:低速,使用水平转子。

3.1.5 水浴锅:37℃。

3.1.6 水浴锅:使用时参照附录 B 调节水温。

3.1.7 吸管:1 mL、2 mL、5 mL、10 mL。

3.2 试剂

3.2.1 试验用蒸馏水为 GB/T 6682 中的三级水。

3.2.2 溶血素:冻干品,使用时按说明用蒸馏水溶解。

3.2.3 抗原:冻干品,使用时按说明用蒸馏水溶解。

3.2.4 补体:冻干品,使用时按说明用蒸馏水溶解。

3.2.5 红细胞悬液:采健康成年绵羊血,以 1:1.2 的比例与 Alsever 氏液混匀,在 4℃ 保存 5 d 后使用。使用前摇匀后取出需量,用 20 倍量生理盐水洗涤 3 次,每次用离心机以 2 000 r/min 离心 5 min,最后一次 10 min。取沉淀的红细胞用生理盐水配制成 3% 悬液(V/V)。

3.2.6 标准阳性血清:冻干品,使用时按说明用蒸馏水溶解,并用生理盐水作 1:10 稀释后 56℃ 水浴灭能 30 min。

3.2.7 标准阴性血清:冻干品,使用时按说明用蒸馏水溶解,并作 1:10 稀释后按附录 B 水浴灭能 30 min。

3.2.8 被检血清:从被检动物静脉采血,分离血清,不能产生溶血,4℃ 保存。采血应与皮内变态反应同天进行,若需重复采血,则第二次采血应在皮试后 3 d 内进行。使用前用生理盐水作 1:10 稀释后,按附

录 B 用水浴锅灭能 30 min。

4 预备试验

4.1 配制标准溶血管(见附录 A)

4.2 溶血素效价测定

4.2.1 稀释:取溶血素原液 0.2 mL 加生理盐水 9.8 mL 混匀,制成 100 倍稀释的溶血素,再按表 1 稀释成不同倍数。

表 1 溶血素稀释表

试管号 稀释倍数	1	2	3	4	5	6	7	8	9
成分	1 000	2 000	3 000	4 000	5 000	6 000	7 000	8 000	9 000
生理盐水/mL	9	1	2	3	4	5	6	7	8
1:100 溶血素/mL	1								
1:1 000 溶血素/mL		1	1	1	1	1	1	1	1

4.2.2 按表 2 建立试验,先将溶血素与红细胞混匀,然后加入其他成分。

表 2 溶血素效价测定表

试管号 稀释倍数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
成分	1 000	2 000	3 000	4 000	5 000	6 000	7 000	8 000	9 000	溶血素 对照	补体 对照	生理盐 水对照
溶血素/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0
3%红细胞/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
生理盐水/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.75	0.75	1.0
1:20 补体/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0.25	0
混匀,37 C 水浴 15 min,2 000 r/min 离心 5 min												
结果(例)	—	—	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

4.2.3 判定:对比标准溶血管(见附录 A)进行。

4.2.3.1 表 2 中“—”为 100%溶血,“+”为 75%溶血,“++”为 50%溶血,“+++”为 25%溶血,“++++”为 0%溶血。

4.2.3.2 对照管出现如下结果时试验及判定结果成立:第 10 管溶血素对照 0%溶血,第 11 管补体对照 0%溶血,第 12 管生理盐水对照 0%溶血。

4.2.3.3 以 100%溶血的溶血素最高稀释倍数为溶血素的效价。0.25 mL 该稀释度的溶血素为一个溶血单位。表 2 所列结果(例),溶血素效价为 1:4 000,即 0.25 mL 1:4 000 稀释的溶血素含一个溶血单位。

4.2.3.4 溶血素工作液配制:本试验使用 2 个溶血单位,溶血素工作液稀释度按溶血素效价的 2 倍计算。

根据表 2 结果(例),用生理盐水将溶血素作 1:2 000 稀释,即为溶血素工作液。

4.2.3.5 致敏红细胞配制:将等量红细胞悬液与溶血素工作液混匀,37 C 水浴 15 min。

4.3 补体效价测定

4.3.1 用生理盐水将补体作 1:20 稀释。

4.3.2 用生理盐水将抗原作 1:100 稀释。

4.3.3 按表 3 建立试验。

表 3 补体效价测定表

试管号 成分	1	2	3	4	5	6	7	对照
1:20 补体/mL	0.05	0.08	0.11	0.14	0.17	0.20	0.23	0
生理盐水/mL	0.20	0.17	0.14	0.11	0.08	0.05	0.02	0.25
1:100 抗原/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
生理盐水/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
混匀,37℃水浴 60 min								
致敏红细胞/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
混匀,37℃水浴 20 min,2 000 r/min 离心 5 min								
结果(例)	卅	卅	卅	++	—	—	—	卅

4.3.4 判定:对比标准溶血管(见附录 A)进行。

4.3.4.1 表 3 中“—”为 100%溶血,“+”为 75%溶血,“++”为 50%溶血,“卅”为 25%溶血,“卅”为 0%溶血。

4.3.4.2 当对照管出现 0%溶血时判定结果。

4.3.4.3 以 100%溶血的最小补体量为一个补体单位,表 2 结果(例)为 0.17 mL 1:20 补体。

4.3.4.4 补体工作液配制:先根据式(1)算出补体工作液的稀释倍数。

$$K = \frac{20}{V} \times 0.25 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:K——补体使用稀释倍数;

V——补体用量。

按表 3 中第 5 管为例:

$$\text{补体使用稀释倍数} = \frac{20}{0.17} \times 0.25 = 29.4$$

使用时用生理盐水将补体作 1:29 稀释,用量为 0.25 mL。

4.4 抗原效价的确认或测定:根据供应单位的抗原说明书来决定是否需要抗原效价的测定。如不需测定,则在确认抗原效价后按说明稀释使用;如需测定,则按下列步骤进行。

4.4.1 用生理盐水将抗原依次作 1:50、1:100、1:200、1:400 稀释。

4.4.2 用生理盐水将阳性血清依次再作 1:20、1:40、1:80 稀释。

4.4.3 标准阴性血清不再稀释。

4.4.4 按表 4 建立试验。

4.4.5 判定:对比标准溶血管(见附录 A)进行。

4.4.5.1 表 5 中“—”为 100%溶血,“+”为 75%溶血,“++”为 50%溶血,“卅”为 25%溶血,“卅”为 0%溶血。

4.4.5.2 当血清对照管、抗原对照管、补体对照管出现 100%溶血,而红细胞对照管出现 0%溶血时判定抗原效价。

表 4 副结核抗原测定表

试管号 成分	抗原稀释度				血清对照	抗原对照	补体对照	红细胞对照
	1	2	3	4				
1:50	1:100	1:200	1:400					
抗原/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0.25	0	0

表 4(完)

成分		试管号	1	2	3	4	血清 对照	抗原 对照	补体 对照	红细胞 对照
		抗原 稀释度	1:50	1:100	1:200	1:400				
阳性 血清	1:10/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0	
	1:20/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0	
	1:40/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0	
	1:80/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0	
1:10 阴性血清/mL		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0	0	0	
1 单位补体/mL		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0	
生理盐水/mL		0	0	0	0	0.25	0.25	0.50	0.75	
混匀,37 C 水浴 60 min										
致敏红细胞/mL		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
混匀,37 C 水浴 20 min,2 000 r/min 离心 5 min										

4.4.5.3 以与阳性血清各稀释度发生抑制溶血最强的抗原最高稀释度为抗原效价。0.25 mL 该稀释度的抗原为一个抗原单位,本试验使用 2 单位抗原。

4.4.5.4 抗原效价判定举例见表 5。

表 5 副结核抗原效价判定举例表

溶血度 血清	试管号	1:50	1:100	1:200	1:400	血清 对照	抗原 对照	补体 对照	红细胞 对照
1:10/mL		+++	+++	+++	+++	—	—	—	+++
1:20/mL		+++	+++	+++	+++	—	—	—	+++
1:40/mL		+++	+++	+++	++	—	—	—	+++
1:80/mL		+	++	++	—	—	—	—	+++
1:10 阴性血清/mL		—	—	—	—	—	—	—	+++

表 5 中所示,抗原效价为 1:200,本试验时用 2 单位抗原,即将抗原作 1:100 稀释。

5 本试验操作方法

5.1 按表 6 建立本试验。

表 6 副结核补体结合试验本试验操作表

成分	试管类别	被检血清		阳性 血清	阴性 血清	抗原 对照	补体 对照	红细胞 对照
		试验管	对照管					
1:10 被检血清/mL		0.25	0.25	0	0	0	0	0
1:10 阳性血清/mL		0	0	0.25	0	0	0	0
1:10 阴性血清/mL		0	0	0	0.25	0	0	0
2 单位抗原/mL		0.25		0.25	0.25	0.25	0	0
1 单位补体/mL		0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0
生理盐水/mL		0	0.25	0	0	0.25	0.5	0.75

表 6(完)

试管类别 成分	被检血清		阳性 血清	阴性 血清	抗原 对照	补体 对照	红细胞 对照
	试验管	对照管					
混匀, 37 C 水浴 60 min							
致敏红细胞/mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
混匀, 37 C 水浴 20 min, 2 000 r/min 离心 5 min							

5.2 判定

5.2.1 判定方法

5.2.1.1 先观察对照管结果。当阳性血清管和红细胞对照管出现 0% 溶血, 阴性血清对照管、抗原对照管、补体对照管及被检血清对照管均出现 100% 溶血时判定被检血清结果。

5.2.1.2 对比标准溶血管(见附录 A)对被检血清管进行判定, 并作如下记录:

- 卅 90% 以上抑制溶血, 即 90% 结合;
- 卅 75% 抑制溶血, 即 75% 结合;
- ++ 50% 抑制溶血, 即 50% 结合;
- + 25% 抑制溶血, 即 25% 结合;
- 100% 溶血, 即 0% 结合。

5.2.2 判定标准: 被检血清 1 : 10¹¹ 稀释时小于 50% 结合为阴性。

1) 有的双边条款规定被检血清 1 : 8 或 1 : 5 稀释时小于 50% 结合为阴性。此时在试验中被检血清和标准血清的稀释度应作相应的改变。

附录 A
(标准的附录)
标准溶血管配制

取沉淀红细胞 0.15 mL,加入 8.85 mL 蒸馏水,混匀,使红细胞完全溶血后,再加入 8.5%氯化钠溶液 1 mL,即成 1.5%生理盐水溶血液。

取沉淀红细胞 0.15 mL,加入 9.85 mL 生理盐水,混匀,即成 1.5%细胞悬液。

按表 A1 配制不同溶血度的标准溶血管。

表 A1 标准溶血管配制表

溶血度/% 成分	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
生理盐水/mL	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
1.5%生理盐水溶血液/mL	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5
1.5%红细胞悬液/mL	0.5	0.45	0.4	0.35	0.3	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05	0

轻摇混匀后静置,待红细胞部分或全部沉淀于管底或 2 000 r/min 离心 5 min 后使用。

附录 B
(标准的附录)
几种动物血清的灭能温度

牛	56℃~57℃
绵羊、山羊	58℃~59℃
骆驼	54℃
鹿	63℃

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
副结核病补体结合试验操作规程

SN/T 1085—2002

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 15 千字

2002年5月第一版 2002年5月第一次印刷

印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-14478 定价 10.00 元

网址 www.bzcs.com

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



SN/T 1085-2002