



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1224—2003

## 鸡败血支原体感染抗体检测方法 快速血清凝集试验

The detection of antibodies against *Mycoplasma gallisepticum* in infected  
chickens—Protocol of a rapid serum agglutination test

2003-05-28 发布

2003-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

版权所有 · 禁止翻制、电子传阅、发售

中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
鸡败血支原体感染抗体检测方法  
快速血清凝集试验

SN/T 1224—2003

\*

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 1/2 字数 10 千字

2003 年 9 月第一版 2003 年 9 月第一次印刷

印数 1—2 000

\*

书号: 155066 · 2-15296 定价 6.00 元

网址 [www.bzecs.com](http://www.bzecs.com)

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533

## 前 言

本标准的附录 A 是规范性附录。

本标准由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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈书琨、叶奕优、骆德海。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

## 鸡败血支原体感染抗体检测方法 快速血清凝集试验

### 1 范围

本标准规定了鸡败血支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)感染快速血清凝集试验的操作方法。本标准同时也规定了火鸡 MG 感染快速血清凝集试验的操作方法。

本标准适用于鸡、火鸡 MG 感染血清抗体的检测。

### 2 原理

MG 感染鸡或者火鸡后,感染动物即可产生特异性的免疫球蛋白 M(IgM)抗体。IgM 与细胞膜抗原结合的活性较强,并能对细胞起调理作用。因此,IgM 在体外与抗原结合后主要表现为凝集反应。一般在感染七天后,受染动物的血清中就可检测到快速血清凝集(RSA)试验抗体。由于 RSA 试验具有操作简便、快速、灵敏等优点,所以它是目前血清学检测禽支原体感染的最常用的方法。

### 3 试剂与器材

#### 3.1 试剂

3.1.1 RSA 抗原:可以从成都药械厂或中国兽药监察所等单位购买,于 2℃~8℃保存,避免冻融。

3.1.2 MG 阳性血清:向 RSA 抗原提供单位购买。

3.1.3 MG 阴性血清:向 RSA 抗原提供单位购买。

#### 3.2 器材

3.2.1 一次性使用塑料注射器(规格 1 mL 用于小鸡,或者 2.5 mL 用于中鸡或成年鸡)。

3.2.2 灭菌的 1.5 mL 微量离心管和 0.5 mL 微量离心管。

3.2.3 200  $\mu$ L 可调移液器。

3.2.4 200  $\mu$ L 灭菌的滴头。

3.2.5 干燥灭菌白瓷反应板或者载玻片。

3.2.6 75%的酒精棉球。

### 4 操作方法

#### 4.1 采血

4.1.1 用 75%的酒精棉球对欲采血的鸡或者火鸡的一侧翅静脉所在部位的皮肤进行消毒,然后用 1 mL 注射器(小鸡)或 2.5 mL 注射器(中鸡或成年鸡)从翅静脉中抽取 0.5 mL~1.0 mL 血液,置 1.5 mL 微量离心管中,盖上管盖,于环境温度下尽快带回实验室。

4.1.2 分离血清:待血清析出后(若环境温度过低,可将血液样品置 37℃培养箱 30 min,以便血纤维蛋白收缩从而使血清析出),将盛有血液样品的微量离心管置微量台式离心机中,以 3 500 r/min 离心 10 min,然后用 200  $\mu$ L 微量移液器把血清转移至 0.5 mL 微量离心管中,置 4℃冰箱保存(但不得超过 72 h)。

#### 4.2 快速血清凝集(RSA)试验

4.2.1 该试验必须在血清采集后的 72 h 内于室温下进行。

4.2.2 在干燥灭菌的白瓷反应板上或者载玻片上滴上 20  $\mu$ L 待检血清,接着滴加 20  $\mu$ L 的染色抗原,

SN/T 1224—2003

转动白瓷反应板或者载玻片以使之混合均匀。鸡血清或者火鸡血清在 2 min 内出现凝集。

4.2.3 用已知的阳性血清和阴性血清作对照试验,方法与 4.2.2 相同。

4.2.4 把在 2 min 内发生凝集反应的血清置 56℃水浴中加热 30 min,然后用灭菌的 PBS(见附录 A)将其稀释成 1:2、1:4 和 1:8,并重新进行试验,方法与 4.2.2 相同。

## 5 结果判断

### 5.1 阳性结果

当血清被稀释成 1:4 或以上仍发生凝集反应,则判为阳性。

### 5.2 可疑结果

当血清被稀释成 1:2 发生凝集反应,但 1:4 稀释不再发生凝集反应时,则判为可疑。

### 5.3 阴性结果

当血清经 56℃加热处理后不再发生凝集反应,或者未经 56℃加热处理的血清也不发生凝集反应,则判为阴性。

### 5.4 MG 感染阳性禽群

当一个禽群中出现高比例的阳性(10%或以上)时,说明该禽群中存在 MG 感染,特别是在经 HI 试验(见附录 A)或者 ELISA 试验证实后更加证明该禽群为 MG 感染阳性群。

### 5.5 确证试验

为了确证 MG 感染,应在一个月內采血重新进行检测。可疑结果应用关节液支原体(*Mycoplasma synoviae*, MS)抗原进行试验予以证实,因为 MS 感染有时引起交叉反应。

## 6 替代方法

本试验还可以用卵黄液代替血清进行[即首先用 PBS(见附录 A)将卵黄液稀释成 1:2、1:4、1:8],其结果与用血清做 RSA 试验时一致。

## 附 录 A

(规范性附录)

### MG 感染微量红细胞凝集抑制(HI)试验

#### A.1 试剂与器材

##### A.1.1 稀释液:pH7.0~7.2 磷酸缓冲液(PBS)

氯化钠(NaCl) 17.00 g

磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1.36 g

氢氧化钠(NaOH) 0.30 g

溶于约 80 mL 蒸馏水中,移入 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。然后转移至试剂瓶中,高压灭菌(121℃,20 min),4℃保存,使用时作 20 倍稀释。

A.1.2 抗原:应该选择生长好而且血凝活性可靠的菌株。该抗原既可以是新鲜的肉汤培养物,也可以是浓缩的洗涤过的 MG 的 PBS 悬浮液。

A.1.3 新鲜的 0.5%红细胞(RBC)悬液:采成年鸡血或火鸡血(鸡血清用鸡红细胞,火鸡血清用火鸡红细胞),用 20 倍量 PBS 洗涤四次,每次以 2 000 r/min 离心 5 min,用 PBS 配成 0.5%悬液。

A.1.4 标准阳性血清、阴性血清:与 RSA 试验相同。

A.1.5 被检血清:RSA 试验呈阳性反应的血清。

A.1.6 微量 V 型血凝板:96 孔。

A.1.7 50 μL 单头移液器,50 μL 八通道或 12 通道移液器及灭菌过的滴头。

#### A.2 试验步骤

##### A.2.1 HA 滴度测定

A.2.1.1 于微量血凝板(A1~A12 孔、B1~B12 孔、C1~C12 孔、D1~D12 孔)的每孔中滴加 50 μL PBS,共四排。

A.2.1.2 吸取 MG 抗原滴加于第一列孔,每孔 50 μL,共四孔(A1、B1、C1、D1),然后由左至右顺序倍比稀释至 11 孔,再从第 11 列孔中各吸取 50 μL 弃之。最后一列不加抗原作对照。

A.2.1.3 于上述各孔中加入 0.5%红细胞悬液 50 μL。

A.2.1.4 轻轻摇动微量板,以使孔内容物完全混合,于室温下(18℃~25℃)放置大约 50 min,根据血凝图像判定结果。以出现完全凝集的抗原最大稀释度为该抗原的血凝滴度。每次四排重复,以几何均值表示结果。

A.2.1.5 计算出含 8 个 HA 单位、4 个 HA 单位的抗原浓度。按式(A.1)、式(A.2)计算:

8 个 HA 单位=HA 滴度/8(抗原应稀释的倍数) .....(A.1)

4 个 HA 单位=HA 滴度/4(抗原应稀释的倍数) .....(A.2)

##### A.2.2 HI 试验

A.2.2.1 每一被检血清需要一列八孔,向每一列的第一孔加入 50 μL PBS。

A.2.2.2 向每一列的第二孔加入 50 μL 8 个 HA 单位的抗原。

A.2.2.3 向每一列的第三孔至第八孔各加入 50 μL 4 个 HA 单位的抗原。

A.2.2.4 将 50 μL 已经制备好的 1:5 稀释的被检血清加入到第一孔,混匀。转移 50 μL 到第二孔,依次类推。从最后一孔中移去 50 μL,弃之。第一孔为血清对照孔。

A.2.2.5 每次试验都应使用标准阳性血清和阴性血清作对照。

A.2.2.6 抗原对照需要六孔。向第二孔至第六孔各加入 50 μL PBS,向第一孔和第二孔各加入 50 μL

SN/T 1224—2003

8 个 HA 单位的抗原。混合第二孔中的内容物,并转移 50  $\mu$ L 到第三孔,混合,重复操作至第六孔。最后从第六孔中移去 50  $\mu$ L,弃之。

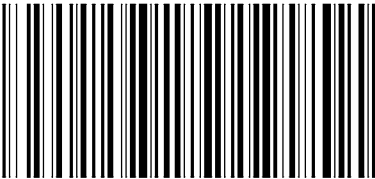
A.2.2.7 RBC 对照需要两孔。向每一孔中加入 50  $\mu$ L PBS。

A.2.2.8 向上述每一孔中加入 50  $\mu$ L 0.5% RBCs 悬液(鸡血清用鸡 RBCs,火鸡血清用火鸡 RBCs)。

A.2.2.9 轻轻摇动微量板,以使孔内容物混合。于室温下放置大约 50 min 后进行判读,或者当抗原滴度判读为 4 个 HA 单位时进行判读。

A.2.2.10 判读结果时,应将微量板倾斜,只有那些孔中的 RBCs 流动与仅含 RBCs 和稀释液(PBS)的孔(即 RBC 对照孔)以相同速度流动的,才被认为是血凝被抑制。血清对照孔应显示一清晰的 RBCs 扣状物(a clear button),而其他对照孔应出现预期的反应。HI 滴度为显示 HA 完全抑制的血清的最高稀释倍数。

A.2.2.11 出现非特异性 HA 活性的血清,必须进行吸附处理,以除去所有的非特异性血凝素,使没有 HA 抗原的对照孔出现清晰的 RBCs 扣状物。吸附处理:1 mL 血清,滴加 6 滴~8 滴洗涤过的鸡或者火鸡 RBCs,于 37℃下温育 10 min 后离心除去细胞,对上清液进行 HA 活性测定。



SN/T 1224-2003

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066 · 2-15296

定价: 6.00 元