



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1468—2004

鸡产蛋下降综合征血凝抑制试验操作规程

Protocol of haemagglutination-inhibition test
for egg drop syndrome

2004-11-17 发布

2005-04-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
鸡产蛋下降综合征血凝抑制试验操作规程
SN/T 1468—2004

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.bzcb.com

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 0.5 字数 7 千字
2005 年 2 月第一版 2005 年 2 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-16067 定价 6.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

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：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：邓娟仙、柯家法、张敬友、张常印、张扬。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

鸡产蛋下降综合征血凝抑制试验操作规程

1 范围

本标准规定了产蛋下降综合征血凝抑制试验方法。

本标准适用于鸡感染产蛋下降综合征病毒或注射疫苗后的血清抗体检测,其他禽类检疫亦可参照。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 材料和试剂

3.1 器材

3.1.1 微量反应板:96孔,V形底,底角为 90° 。

3.1.2 塑料采血管:内径2 mm,长10 cm。

3.1.3 注射器2 mL。

3.1.4 平皿:直径为90 mm。

3.2 试剂

3.2.1 试剂配用水需符合GB/T 6682的要求。

3.2.2 抗原:由指定单位供应。

3.2.3 标准阳性血清:由指定单位供应。

3.2.4 磷酸盐缓冲生理盐水(PBS):pH7.2 0.01 mol/L,配制方法见附录A。

3.2.5 Alsever氏液:配制方法见附录A。

3.2.6 1%鸡红细胞悬液:采健康成年鸡血液,以1:2的比例与Alsever氏液混匀,用20倍量生理盐水洗涤3次~4次,每次以2 000 r/min离心5 min,最后一次10 min,用生理盐水配成1%悬液。4℃保存悬液,在72 h内使用完。

3.3 被检血清

刺破鸡翼下静脉,用塑料采血管引进血流6 cm~8 cm长,烧融一端,镊夹封口。血清凝固析出血清后以2 000 r/min离心5 min,剪取血清段,封口备用。雏鸡用注射器进行心脏采血。

4 血凝抑制试验

4.1 抗原凝集效价测定

4.1.1 抗原凝集效价的测定方法见表1。

表 1 抗原凝集效价测定试验操作术式 单位为微升

孔 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原稀释度	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
PBS	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
抗原	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
1%鸡红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

- 4.1.2 微量反应板的每孔加 PBS 50 μL ，共加两排。
- 4.1.3 吸取抗原加入第一列孔，每孔 50 μL ，混匀后依次倍比稀释至第 11 列孔，弃去 50 μL 。第 12 列孔为红细胞对照。
- 4.1.4 每孔加 1%红细胞悬液 50 μL 。
- 4.1.5 置微量板振荡器上振荡 1 min。
- 4.1.6 置室温 30 min 后，将微量反应板作 45°竖立，待第 12 列孔内红细胞流成塔状时即判定结果。以凝集 100%红细胞的抗原最高稀释度为该抗原的凝集效价，亦即 1 个红细胞凝集单位。若两排结果不一，取其均值。
- 4.1.7 配制抗原工作液

按式(1)、式(2)进行计算，并用生理盐水配制：

8 个红细胞凝集单位抗原稀释度(8HAV) = 抗原效价 \div 8 (1)

4 个红细胞凝集单位抗原稀释度(4HAV) = 抗原效价 \div 4 (2)

4.2 红细胞凝集抑制试验的操作方法

4.2.1 红细胞凝集抑制试验的操作方法见表 2。

表 2 红细胞凝集抑制试验操作术式 单位为微升

孔 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血清稀释度	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
4HAV 抗原	0	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
8HAV 抗原	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
PBS	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
被检血清	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
1%鸡红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

- 4.2.2 微量反应板的一排测一份血清样品。第一孔加被检血清和 PBS 各 50 μL ，第二孔加 8 个红细胞凝集单位抗原 50 μL ，第三孔至第 12 孔各加入 4 个红细胞凝集单位抗原 50 μL 。将第一孔中液体混匀后吸出 50 μL 加入第二孔，如此依次倍比稀释至第 12 孔，弃去 50 μL 。
- 4.2.3 阳性血清对照：设置方法同 4.2.1。
- 4.2.4 抗原对照：在微量反应板的第八排第二至第六孔，每孔加入 50 μL PBS。第一孔和第二孔各加 4 个红细胞凝集单位抗原 50 μL ，从第二孔起依次作倍比稀释至第六孔，弃去 50 μL 。这样，抗原对照孔的抗原含量依次为 4、2、1、 $\frac{1}{2}$红细胞凝集单位。
- 4.2.5 红细胞对照：在微量反应板的第八排第七至第 12 孔，每孔加入 PBS 各 50 μL 。
- 4.2.6 被检血清对照：血清样品每排第一孔为被检血清对照。
- 4.2.7 37℃，感作 10 min。
- 4.2.8 在微量反应板的每孔各加 1%红细胞悬液 50 μL ，振荡 1 min，室温下静置 30 min 后，判定结果。

4.3 结果判定

4.3.1 当对照出现下列结果时,以完全抑制红细胞凝集的最大稀释度为被检血清的红细胞凝集抑制抗体滴度:

- a) 阳性血清滴度与已知滴度相符,若有差异,不应超过 1 个滴度;
- b) 抗原对照,第一、二孔红细胞完全凝集,第三孔完全凝集或 75%凝集,第四、五、六孔不完全凝集或渐至不凝集;
- c) 红细胞对照,完全不凝集;
- d) 被检血清对照,完全不凝集。

4.3.2 判定时将微量反应板作 45°竖立,当红细胞对照孔和被检血清对照孔中红细胞流成塔形时立即判定被检血清滴度。

4.3.3 被检血清滴度大于等于 1:16 为阳性;被检血清滴度等于 1:8 为可疑,一周后重复采血检测,大于等于 1:8 判定阳性;被检血清滴度小于等于 1:4 为阴性。

附 录 A
(规范性附录)

磷酸盐缓冲生理盐水及 Alsever 氏液的配制

A.1 pH 7.2 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)的配制

磷酸氢二钠	2.62 g
磷酸二氢钾	0.37 g
氯化钠	8.5 g

将上述试剂逐一加入少量蒸馏水中充分溶解后,加蒸馏水至 1 000 mL,分装,112 kPa 高压灭菌 20 min,4℃保存备用。

A.2 Alsever 氏液的配制

葡萄糖	2.25 g
柠檬酸三钠	0.91 g
柠檬酸	0.06 g
氯化钠	0.42 g

将上述试剂逐一加入少量蒸馏水中充分溶解后,加蒸馏水至 100 mL,分装,106.44 kPa 高压灭菌 20 min,4℃保存备用。



SN/T 1468-2004

版权专有 侵权必究

*

书号:155066 • 2-16067

定价: 6.00 元