SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1087—2002

牛Q热微量补体结合试验操作规程

Procedure of micro-complement fixation test for bovine Q fever

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

需要全本请访问 www.bzfxw.com

前　　言

本标准按照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，对原《中华人民共和国进出境动物检疫规程手册》(1997年12月)中的“牛Q热微量补体结合试验”进行修订。

本标准的附录A是标准的附录。

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、广州出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：柯忠哲、朱世强、林志雄、张立怀、范华炜。

本标准系首次发表的检验检疫行业标准。

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

牛 Q 热微量补体结合试验操作规程

SN/T 1087—2002

Procedure of micro-complement fixation test for bovine Q fever

1 范围

本标准规定了牛 Q 热微量补体结合试验的操作技术要求。

本标准适用于牛、羊 Q 热微量补体结合试验抗体的检测，其他哺乳动物可以参照本标准。

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 器材及试剂

3.1 器材

3.1.1 微量板：U 型底 96 孔板。

3.1.2 加样器：8 道 5 μL～50 μL 可调式移液器，10 μL～750 μL 可调式移液器。

3.1.3 各种规格塑料滴头、刻度玻璃吸管、试管、试管架。

3.1.4 离心机：低速，使用水平转子。

3.1.5 水浴锅：可调节温度。

3.2 试剂

3.2.1 抗原：按说明保存和使用。

3.2.2 标准抗原：按说明保存和使用。

3.2.3 标准阳性血清：按说明保存和使用。

3.2.4 标准阴性血清：按说明保存和使用。

3.2.5 被检血清：从被检动物静脉采血，分离血清，4 ℃保存。

3.2.6 补体：按说明保存和使用。

3.2.7 溶血素：按说明保存和使用。

3.2.8 试验用蒸馏水为 GB/T 6682 中的三级水。

4 预备试验

4.1 2%绵羊红细胞悬液：采成年绵羊血，一份血加 1.2 倍量的阿氏液，混匀，4 ℃保存，5 d 后备用。使用前摇匀，取出 10 mL，用离心机以 2 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，将下沉的红细胞泥用 20 倍量巴比妥缓冲液(VBD)洗涤，以 2 000 r/min 离心 5 min，重复洗涤三次，最后一次离心 10 min。取下沉的红细胞泥用 VBD 配制成 2%(*V*/*V*)悬液。

4.2 溶血素效价的测定

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 2002-03-15 批准　　2002-09-01 实施

4.2.1 溶血素的稀释：取溶血素 0.1 mL 加 VBD 9.9 mL 混匀（如果是等量甘油保存的溶液，取溶血素 0.2 mL 加 VBD 9.8 mL），制成 100 倍稀释的溶血素，再按表 1 稀释成不同倍数。

表 1 溶血素的稀释表

试管号 / 稀释倍数 / 成分	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	500	1 000	1 500	2 000	2 500	3 000	4 000	5 000	6 000
1∶100 溶血素/mL	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
VBD/mL	0.8	0.9	1.4	1.9	2.4	2.9	3.9	4.9	5.9
总量/mL	1.0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	6.0

4.2.2 补体的稀释：按表 2 对补体做不同倍数的稀释。

表 2 补体的稀释表

试管号 / 稀释倍数 / 成分	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	20	30	40	50	60	70	80	90	100
补体/mL	0.1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
VBD/mL	1.9	1.45	1.95	2.45	2.95	3.45	3.95	4.45	4.95
总量/mL	2.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0

4.2.3 致敏红细胞悬液的制备：将不同稀释度（1∶500～1∶6 000）的溶血素与等量的 2%红细胞悬液混合，置 37 ℃水浴 15 min，为致敏红细胞。

4.2.4 溶血素效价的滴定：采用方阵法在微量板上滴定。如表 3 所示，1～9 列为溶血素稀释度（1∶500～1∶6 000），A～H 行为补体稀释度（1∶30～1∶100）。吸取不同稀释度的致敏红细胞悬液 50 μL，分别滴加于 1～9 列的各孔中。吸取不同稀释度的补体 50 μL，分别滴于 A～H 行各孔中，每孔再加 25 μL VBD，滴加完毕后，置微量振荡器上混匀，随后置 37 ℃温箱中感作 30 min 后进行初判，置室温 2 h、水平转子离心机 2 000 r/min 离心 5 min 或置 4 ℃冰箱中过夜后进行终判。

4.2.5 溶血素效价的判读：对比标准溶血孔（见附录 A）进行，在最小量的补体存在下，能使 90%红细胞发生溶血的最高稀释倍数为一个单位溶血素，测定补体效价和做本试验时用两个单位溶血素。如表 3 的测定结果为，补体在 1∶70 稀释时，发生 90%溶血的最少溶血素为 1∶4 000，该 1∶4 000 为一个单位溶血素。两个单位溶血素为 1∶2 000。

表 3 溶血素效价滴定判定举例表

列号 / 溶血素 / 补体	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	1∶500	1∶1 000	1∶1 500	1∶2 000	1∶2 500	1∶3 000	1∶4 000	1∶5 000	1∶6 000
1∶30	—	—	—	—	—	—	—	+	+
1∶40	—	—	—	—	—	—	—	+	+
1∶50	—	—	—	—	—	—	—	+	+
1∶60	—	—	—	—	—	—	—	+	+
1∶70	—	—	—	—	—	—	90%	+	++
1∶80	—	—	—	—	—	—	+	+	++
1∶90	—	—	—	+	+	+	+	++	++
1∶100	—	—	—	+	+	+	++	++	++

注：++为 50%溶血；+为 75%溶血；—为 100%溶血

4.3 补体效价的测定：

4.3.1 按照表2配制1∶30～1∶100的补体；

4.3.2 使用两个单位溶血素，制备致敏红细胞悬液；

4.3.3 按照表4在微量板上滴定补体效价。1～8列为1∶30～1∶100稀释的补体，各稀释度按表中定量添加，再以VBD补充至每孔50 μL；每孔滴加25 μL的抗原后，再滴加50 μL 2%致敏红细胞悬液，充分振荡混匀后，置37℃温箱中感作30 min后进行初判，然后置室温2 h、水平转子离心机2 000 r/min离心5 min或置4℃冰箱中过夜后进行终判。4.3.4 补体效价的判读：对比标准溶血孔（见附录A）进行，取30 μL补体呈现90%溶血，20 μL补体呈现75%～90%溶血时补体的最高稀释度作为补体的效价。在正式试验时补体用量为25 μL，如表5的测定结果，1∶70的补体25 μL为一个单位补体，试验时用两个单位补体，则1∶35补体25 μL为两个单位补体。

表4 补体效价滴定

列号	1	2	3	4	5	6	7	8
补体稀释度	1∶30	1∶40	1∶50	1∶60	1∶70	1∶80	1∶90	1∶100
A/μL	50	50	50	50	50	50	50	50
B/μL	40	40	40	40	40	40	40	40
C/μL	30	30	30	30	30	30	30	30
D/μL	20	20	20	20	20	20	20	20
E/μL	10	10	10	10	10	10	10	10
F/μL	0	0	0	0	0	0	0	0
G/μL								
H/μL								

表5 补体效价判定举例表

列号	1	2	3	4	5	6	7	8
补体稀释度	1∶30	1∶40	1∶50	1∶60	1∶70	1∶80	1∶90	1∶100
50	—	—	—	—	—	—	+	+
40	—	—	—	—	—	—	+	++
30	—	—	—	—	90%	+	++	++
20	—	—	—	—	+	+	+++	+++
10	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

注：+++为0%溶血；+++为25%溶血；++为50%溶血；+为75%溶血；—为100%溶血。

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进行抗原效价的测定。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VBD将抗原依次作1∶50、1∶100、1∶200、1∶400稀释。

4.4.2 用VBD将阳性血清依次作1∶20、1∶40、1∶80稀释。

4.4.3 标准阴性血清不作稀释。

4.4.4 按表6建立试验。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

4.4.5 按原效价的判读：对比标准溶血孔（见附录 A）进行，当血清对照孔、抗原对照孔、补体对照孔出现 100%溶血，而红细胞对照孔不出现溶血且红细胞全部沉于孔底时判定抗原效价。以与阳性血清各稀释度发生完全抑制溶血的最高稀释度为一个单位抗原，正式试验使用 2 单位抗原，如表 7 所示，抗原效价为 1∶200，正式试验时用 2 单位抗原，即将抗原作 1∶100 稀释。

表 6 抗原测定表

列号 / 抗原稀释度 / 成分		1	2	3	4	血清对照	抗原对照	补体对照	红细胞对照
		1∶50	1∶100	1∶200	1∶400				
抗原/μL		25	25	25	25	0	25	0	0
阳性血清	1∶10/μL	25	25	25	25	25	0	0	0
	1∶20/μL	25	25	25	25	25	0	0	0
	1∶40/μL	25	25	25	25	25	0	0	0
	1∶80/μL	25	25	25	25	25	0	0	0
1∶10 阴性血清/μL		25	25	25	25	25	0	0	0
2 单位补体/μL		25	25	25	25	25	25	25	0
VBD/μL		0	0	0	0	0	25	50	75
4℃感作 12 h～18 h 后再置室温 10 min									
致敏红细胞/μL		50	50	50	50	50	50	50	50
37℃感作 30 min 后进行初判，然后置室温 2 h、水平转子离心机 2 000 r/min 离心 5 min 或置 4℃冰箱中过夜后进行终判									

表 7 抗原效价判读举例表

试管号 / 血清	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	卌	卌	卌	卌	—	—	—	卌
1∶20	卌	卌	卌	卌	—	—	—	卌
1∶40	卌	卌	卌	++	—	—	—	卌
1∶80	卌	卌	卌	++	—	—	—	卌
1∶10 阴性血清	—	—	—	—	—	—	—	卌
注：卌为 0%溶血；卌为 25%溶血；++为 50%溶血；+为 75%溶血；—为 100%溶血								

5 正式试验

5.1 标准阳性血清和标准阴性血清使用前用 VBD 作 1∶10 稀释，56℃水浴灭能 30 min；被检血清使用前用 VBD 作 1∶10 稀释，灭能 30 min（牛：56℃～57℃；绵羊、山羊：63℃）。按表 8 建立正式试验。

表 8 补体结合试验正式试验操作表

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					
1∶10 被检血清/μL	25	25	0	0	0	0	0
1∶10 阳性血清/μL	0	0	25	0	0	0	0

表 8(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					
1∶10 阴性血清/μL	0	0	0	25	0	0	0
2 单位抗原/μL	25		25	25	25	0	0
2 单位补体/μL	25	25	25	25	25	25	0
VBD/μL	0	25	0	0	25	50	75
4 C 感作 12 h～18 h 后再置室温 10 min							
致敏红细胞/μL	50	50	50	50	50	50	50
37 C 感作 30 min 后进行初判,然后置室温 2 h、水平转子离心机 2 000 r/min 离心 5 min 或置 4 C 冰箱中过夜后进行终判							

5.2 判定

5.2.1 先观察对照管结果。当阳性血清孔和红细胞对照孔出现 100%抑制溶血,阴性血清对照孔、抗原对照孔、补体对照孔及被检血清对照孔均出现 100%溶血时判定被检血清结果。

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

卌 表示 90%以上抑制溶血;

卅 表示 75%以上抑制溶血;

++ 表示 50%以上抑制溶血;

+ 表示 25%以上抑制溶血;

— 表示 100%溶血。

5.2.3 判定标准:被检血清 1∶10 稀释时小于 50%抑制溶血为阴性。在进出境动物的检疫中,对判定标准有规定的按规定执行。

附 录 A
（标准的附录）
标准溶血孔配制

A1 血红蛋白溶液的制备：取 2%绵羊红细胞悬液 1.0 mL，加入装有 7.0 mL 蒸馏水的试管内，充分振荡，使红细胞全部裂解，再加入 2.0 mL VBD，充分混合；

A2 0.2%绵羊红细胞悬液的制备：取 2%绵羊红细胞悬液 1.0 mL，加入 VBD 9.0 mL；

A3 按表 A1 配制不同溶血度的标准溶血管，并充分振荡均匀。

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
血红蛋白溶液/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
0.2%绵羊红细胞悬液/mL	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0

A4 从标准溶血管配制表的各管中，分别取 125 μL 加入微量板的对应孔，轻摇混匀后静置，待红细胞全部沉淀于孔底后用于试验判读的对照。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
牛Q热微量补体结合试验操作规程
SN/T 1087—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 10千字
2002年5月第一版 2002年5月第一次印刷
印数 1—2 000
*
书号:155066·2-14479 定价 10.00元
网址 www.bzcbs.com

版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

SN/T 1087-2002

需要全本请访问 www.ertongbook.com