SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1557—2005

禽痘琼脂免疫扩散试验操作规程

Protocol of agar gel immunodiffusion test for fowl pox

2005-02-17 发布　　2005-07-01 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
禽痘琼脂免疫扩散试验操作规程
SN/T 1557—2005
*
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.bzcbs.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 8 千字
2005年5月第一版 2005年5月第一次印刷
*
书号:155066·2-16193 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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张东林、温燕辉、林庆燕。

本标准是首次发布的出入境检验检疫行业标准。

禽痘琼脂免疫扩散试验操作规程

1 范围

本标准规定了禽痘琼脂免疫扩散试验操作方法。

本标准适用于禽痘病毒抗体的检测。

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(eqv ISO 3696:1987)

3 器材与试剂

3.1 器材

3.1.1 平皿：平皿直径为 90 mm。

3.1.2 微量加样器。

3.1.3 塑料吸头。

3.1.4 打孔器：内径 4.0 mm，孔间距 3.0 mm，7 孔梅花样金属打孔器。

3.2 试剂

3.2.1 禽痘琼脂免疫扩散试验抗原和标准阳性血清。

3.2.2 琼脂糖。

3.3 溶液配制

pH 7.2 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液及 1%硫柳汞溶液配制方法详见附录 A，试剂配制用水需满足 GB/T 6682 的要求。

3.4 被检血清

无菌条件下静脉采血 1 mL 左右，将血样进行血清分离后，保存于 4℃待检，若需长期保存，则置于−20℃冰箱。

4 操作步骤

4.1 琼脂板制备

称取琼脂糖 1.0 g，加 pH 7.2 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液至 100 mL。

加热融化后，加入 8.0 g 氯化钠，充分溶解后，加入 1.0 mL 1%硫柳汞溶液(终浓度为 0.01%)。

冷却至 45℃～50℃，将洁净干燥、直径为 90 mm 的灭菌平皿，放置于水平平台上，每个平皿加 18 mL，厚度约为 3.0 mm。

凝固后盖严，把平皿倒置放入 4℃冰箱中保存备用。

4.2 打孔

反应孔现用现打。从冰箱内取出琼脂板，用 7 孔一组的梅花形打孔器进行打孔(中间 1 孔，外周 6 孔)(见图 1)，孔径 4.0 mm，孔距 3.0 mm。将孔中的琼脂糖轻轻挑出或吸出，勿伤及边缘或使琼脂层脱离玻璃。平皿中各孔排列见图 2。

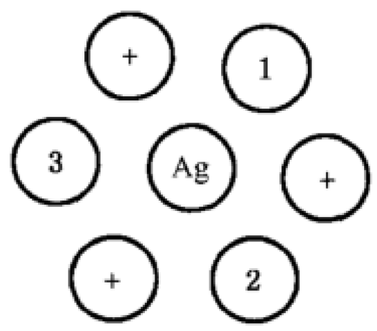


图 1　平皿中梅花形 7 孔一组排列示意图

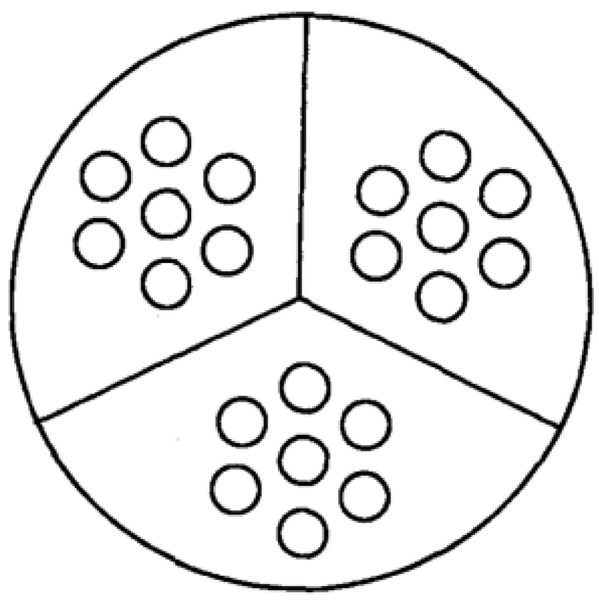


图 2　90 mm 平皿中三组梅花形孔排列示意图

4.3　封底

在酒精灯火焰上通过 4 次～6 次加热平皿背面，使底部琼脂稍微融化。

4.4　加样

结合上列图示，用微量加样器吸取抗原溶液滴入中央孔，标“＋”的三孔加标准阳性血清，1、2、3 孔加被检血清，每孔均需加满，但不能溢出。每加一个被检样品应换一个吸头。

4.5　反应

加样完毕，室温静置 10 min，放入保湿盒内置 22℃～26℃反应，分别在 24 h、48 h 和 72 h 观察并记录结果。

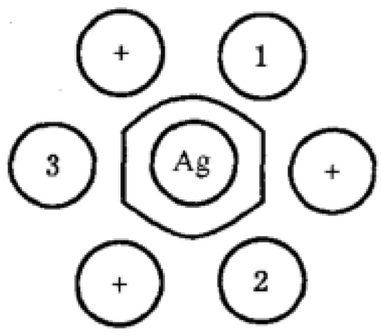
5　结果判定

5.1　判定前提

将琼脂板置日光灯或侧强光下观察，在抗原孔与标准阳性血清孔之间出现一条清晰、致密的沉淀线，抗原孔与阴性血清孔之间不出现沉淀线，说明对照成立，可进行结果判定。

5.2　阳性

抗原孔与被检血清孔之间形成的沉淀线与阳性对照血清形成的沉淀线弯曲环联，判为阳性(见图 3)。

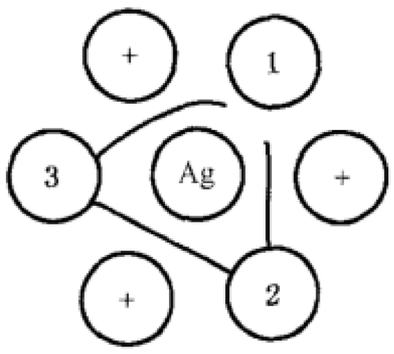


注：标“＋”孔为标准阳性血清，1、2、3 孔被检血清呈阳性。

图 3　被检血清呈阳性示意图

5.3 可疑

若抗原孔与被检血清孔间虽不出现沉淀线，但抗原与标准阳性血清孔间的沉淀线在被检血清孔位置微向内侧弯曲者（见图 4 中的 1 号孔），则被检血清判为可疑反应。对该份血清应复检，仍为可疑则判为阳性反应。

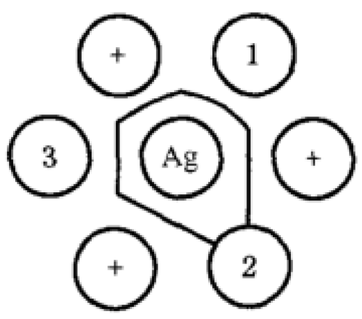


注：标“＋”孔为标准阳性血清，1 孔被检血清可疑，2、3 孔被检血清阴性。

图 4　被检血清呈可疑反应示意图

5.4 非特异性反应

若抗原孔、被检血清孔之间的沉淀线与抗原孔、标准阳性血清孔之间的沉淀线交叉，则判为非特异性反应，应重做。若仍出现非特异性反应则判为阴性（如图 5 所示第 3 孔）。

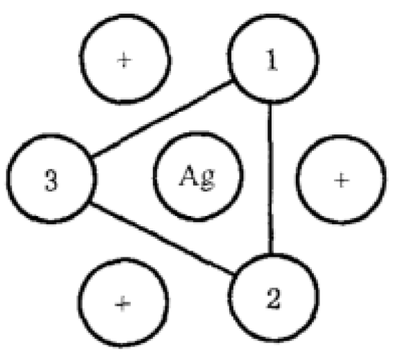


注：标“＋”孔为标准阳性血清，1 孔被检血清阳性，2 孔被检血清阴性，3 孔被检血清为非特异性反应。

图 5　被检血清呈非特异性反应示意图

5.5 阴性

抗原孔与被检血清孔之间无沉淀线，抗原孔与标准阳性血清孔间沉淀线直伸延到被检血清孔边缘无弯曲者，则判为阴性（见图 6）。



注：标“＋”孔为标准阳性血清，1、2、3 孔被检血清阴性。

图 6　被检血清呈非特异性反应示意图

附 录 A
（规范性附录）
试剂配制

A.1 pH 7.4 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液

磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	2.89 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.20 g
加双蒸水至	1 000 mL

A.2 1%硫柳汞溶液

硫柳汞	1.00 g
加双蒸水至	100 mL

SN/T 1557-2005

版权专有 侵权必究

*
书号:155066·2-16193
定价: 6.00 元