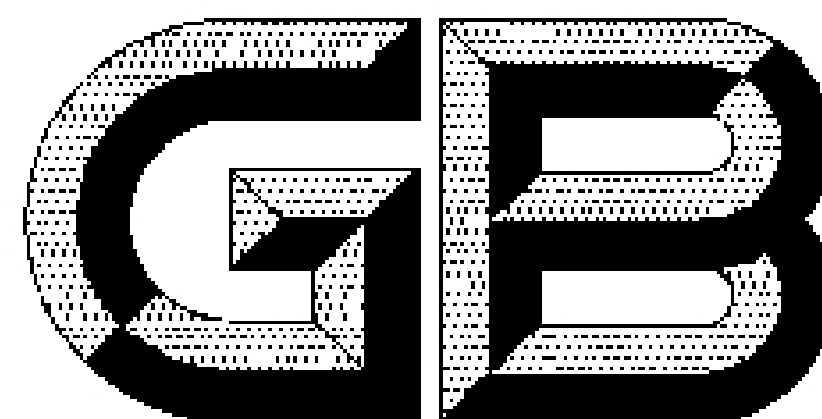




中华人民共和国国家标准

GB/T 17999.10—2008
代替 GB/T 17999.9—1999

SPF 鸡 微生物学监测 第 10 部分:SPF 鸡 间接免疫荧光试验

SPF chicken—Microbiological surveillance—
Part 10: Indirect immunofluorescent assay for SPF chicken

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

GB/T 17999《SPF 鸡 微生物学监测》分为 10 个部分：

- 第 1 部分：SPF 鸡 微生物学监测总则；
- 第 2 部分：SPF 鸡 红细胞凝集抑制试验；
- 第 3 部分：SPF 鸡 血清中和试验；
- 第 4 部分：SPF 鸡 血清平板凝集试验；
- 第 5 部分：SPF 鸡 琼脂扩散试验；
- 第 6 部分：SPF 鸡 酶联免疫吸附试验；
- 第 7 部分：SPF 鸡 胚敏感试验；
- 第 8 部分：SPF 鸡 鸡白痢沙门氏菌检验；
- 第 9 部分：SPF 鸡 试管凝集试验；
- 第 10 部分：SPF 鸡 间接免疫荧光试验。

本部分为 GB/T 17999 的第 10 部分。

本部分代替 GB/T 17999.9—1999《SPF 鸡 间接免疫荧光试验》。

本部分与 GB/T 17999.9—1999 相比主要变化如下：

- 增加了规范性附录 A“试剂的配制”和资料性附录 B“细胞计数方法”；
- 详细界定了试验成立条件和待检样品的判定标准。

本部分的附录 A 为规范性附录，附录 B 为资料性附录。

本部分由中华人民共和国农业部提出。

本部分由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本部分起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心、济南斯帕法斯家禽有限公司。

本部分主要起草人：曲连东、刘家森、韩凌霞、邵卫星、朱果、单忠芳、姜蹇、司昌德、于海波、孟庆文。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 17999.9—1999。

SPF 鸡 微生物学监测

第 10 部分:SPF 鸡 间接免疫荧光试验

1 范围

GB/T 17999 的本部分规定了间接免疫荧光试验的技术要求等。

本部分适用于对 SPF 鸡进行鸡传染性贫血病毒(Chicken Infectious Anaemia Virus, CIAV)抗体的检测。

2 原理

间接免疫荧光试验,以病毒感染细胞作抗原,与待检血清中的特异抗体结合,再与荧光色素标记的抗抗体结合,形成抗原—抗体—抗抗体复合物。荧光色素在紫外光或蓝紫光的作用下,激发出可见的荧光,因此出现荧光就说明标记物的存在,同时也反映了特异性抗体的存在。常采用已知抗原及荧光色素标记的抗抗体检测相应的抗体。

3 试剂和器材

3.1 试剂

3.1.1 CIAV 病毒 DELROSE 株。

3.1.2 阴性、阳性血清。

3.1.3 被检血清。

3.1.4 磷酸盐缓冲液(PBS)(见附录 A)。

3.1.5 异硫氰荧光素(FITC)标记抗鸡 IgG(按说明稀释使用)。

3.1.6 缓冲甘油或封片剂(见附录 A)。

3.1.7 丙酮。

3.2 器材

3.2.1 抗原片。

3.2.2 湿盒。

3.2.3 37℃培养箱。

3.2.4 荧光显微镜。

4 操作程序

4.1 感染细胞的制备

用含 15%新生牛血清的 DMEM 培养基在 39℃和 5%二氧化碳环境中培养 MDCC-MSB1 细胞。细胞长至每毫升 5×10^6 个时(细胞计数参见附录 B),接种 CIAV,并换成含 5%新生牛血清的 DMEM 培养基,继续培养 36 h~48 h。

4.2 抗原片的制备

4.2.1 细胞病变(细胞体积增大 2 倍~3 倍)约达 50%~75%时,收集细胞培养物,以 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 PBS 洗涤细胞沉淀物 3 次,并细胞计数,用 PBS 重悬细胞浓度。

4.2.2 取 10 μ L 细胞悬液(约含细胞 10^5 个),滴加于抗原片各孔中,同时制备正常细胞对照片。

4.2.3 吹干滴好的抗原片,用 4℃预冷的丙酮固定 10 min,保存于 -20℃,一周内使用。

4.3 间接荧光抗体染色

4.3.1 取出抗原片室温放置 10 min 待用。

4.3.2 用 PBS 将被检血清、阴性血清、阳性血清分别稀释成 1 : 100、1 : 500 两个稀释度,分别取 10 μ L 滴加于抗原片各孔中。

4.3.3 将加样抗原片置于湿盒内,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

4.3.4 用 PBS 浸洗 3 次,每次 10 min。

4.3.5 取 20 μ L FITC 标记抗鸡 IgG 滴加于上述处理过的抗原片各孔中,孵育、洗涤同前。

4.3.6 用缓冲甘油封片,置于荧光显微镜下观察。

5 结果判定

5.1 试验成立条件

CIAV 感染细胞制备的抗原片中,加入阳性血清,细胞核内可见清晰的黄绿色荧光颗粒;加入阴性血清,细胞核内无荧光颗粒。正常细胞制备的抗原片中,加入阳性血清,细胞核内无荧光颗粒。在以上条件成立的基础上,进行待检血清判定。

5.2 待检血清的判定

CIAV 感染细胞制备的抗原片中,加入待检血清,细胞核内可见清晰的荧光颗粒,则待检血清判为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 缓冲甘油

9 份分析纯无荧光的甘油加 1 份 0.2 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.2)配制而成。

A.2 0.2 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.2)

0.17 g 碳酸钠(Na_2CO_3)和 1.545 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)溶于 100 mL 去离子水中,4 ℃ 保存 3 个月。

A.3 PBS(0.01 mol/L PBS,pH7.4)



8 g 氯化钠(NaCl)、0.2 g 氯化钾(KCl)、2.9 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、0.2 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),重蒸水加至 1 000 mL;保存于 4 ℃ 备用。

A.4 DMEM(高糖)培养液

10 g DMEM 粉,3.7 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)溶解于 950 mL 去离子水中,边加边搅拌。用 1 mol/L 的氢氧化钠或盐酸将培养液 pH 值调至 6.9~7.0,加去离子水定容至 1 000 mL,尽快用孔径 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌,4 ℃ 冰箱保存备用。

附 录 B
(资料性附录)
细胞计数方法

- B.1** 对细胞进行系列稀释,滴加到细胞计数板上,初步观察,若细胞密集,进一步稀释后,重新滴加到干净的细胞计数板上计数。
- B.2** 细胞计数板在5×物镜下可见9个大方格,于10×物镜下计数位于4个角的大方格内的细胞数量(若细胞位于大方格边线,仅计数位于上边线和左边线的细胞);并依据式(B.1)计算细胞浓度。

起始细胞浓度(个/mL) = $\frac{4 \text{ 个大方格内细胞总和}}{4} \times \text{稀释倍数} \times 10^4 \dots\dots (B.1)$

示例：
若4个大方格内的细胞总数为25个,细胞稀释度为1:10³,则：
起始细胞浓度 = $\frac{25}{4} \times 10^3 \times 10^4 = 6.25 \times 10^7$ (个/mL)



参 考 文 献

- [1] NY/T 681—2003 鸡传染性贫血诊断技术
-

