



中华人民共和国国家标准

GB/T 17999.3—2008
代替 GB/T 17999.2—1999

SPF 鸡 微生物学监测 第 3 部分:SPF 鸡 血清中和试验

SPF chicken—Microbiological surveillance—
Part 3: Serum neutralization test 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 3 部分。

本部分修订参照 OIE《陆生动物(哺乳动物、禽鸟和蜜蜂)诊断试验和疫苗手册》(第五版)中的有关规定。

本部分代替 GB/T 17999.2—1999《SPF 鸡 血清中和试验》。

本部分与 GB/T 17999.2—1999 相比主要变化如下：

- 增加了规范性附录 A“试剂的配制”、资料性附录 B“病毒接种技术”以及资料性附录 C“鸡胚接种病毒后的病变特征”；
- 在试验内容部分，增加了病毒的稀释梯度；
- 对不同病毒致死鸡胚的时间重新确定。

本部分附录 A 为规范性附录，附录 B、附录 C 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、姜骞、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 17999.2—1999。

SPF 鸡 微生物学监测

第 3 部分:SPF 鸡 血清中和试验

1 范围

GB/T 17999 的本部分规定了血清中和试验的技术要求。

本部分适用于对 SPF 鸡进行以下病毒中和抗体的检测:禽脑脊髓炎病毒(Avian Encephalomyelitis Virus)、传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus)、传染性喉气管炎病毒(Infectious Laryngotracheitis Virus)、传染性法氏囊病病毒(Infectious Bursal Disease Virus)。

2 原理

中和试验系指有生物活性的病毒与相应的抗体结合后,失去原有的生物活性的中和反应。中和反应不仅有高度特异性,且具有严格的量的关系。因此可用中和试验鉴定病毒,也可用于相应抗体的定量检测。

3 试剂和器材

3.1 试剂

3.1.1 病毒:禽脑脊髓炎病毒 Van Roekel 株(CVCC AV35)、传染性支气管炎病毒 H52(CVCC AV1513)、传染性法氏囊病病毒 A80 株(CVCV AV2321)、传染性喉气管炎病毒 A96(CVCC AV200)。

3.1.2 病毒稀释液:胰蛋白胍磷酸盐肉汤(见附录 A)。

3.1.3 青霉素/链霉素(双抗)液(见附录 A)。

3.1.4 3%碘酊溶液。

3.1.5 SPF 胚蛋。

3.2 器材

3.2.1 蛋钻(打孔器)。

3.2.2 6 号针头。

3.2.3 7 号针头。

3.2.4 混合器。

3.2.5 照蛋器。

4 操作程序

4.1 试验准备

4.1.1 血清样品处理

被检血清和阳性对照血清经 56℃、30 min~45 min 灭活补体,保存于-20℃条件下备用。

4.1.2 SPF 胚蛋准备

照胚检查胚体活力,选取血管清晰、胚体规律摆动的健康胚蛋,每个检测项目需胚蛋 24 枚。

4.1.3 稀释病毒

4.1.3.1 取灭菌试管 4 支~9 支,每管加入稀释液 4 mL、青霉素/链霉素液 0.5 mL。

4.1.3.2 第 1 管加入病毒液 0.5 mL,作连续 10 倍稀释。各种病毒的稀释度参见表 1。

表 1 病毒稀释

病 毒	稀 释 度
禽脑脊髓炎病毒	$10^{-1} \sim 10^{-6}$
传染性支气管炎病毒	$10^{-1} \sim 10^{-9}$
传染性法氏囊病病毒	$10^{-1} \sim 10^{-6}$
传染性喉气管炎病毒	$10^{-1} \sim 10^{-6}$

4.2 中和试验

4.2.1 血清准备

每份被检血清需 1.5 mL。

4.2.2 病毒稀释度选择

根据具体情况决定，一般选择 6 个连续的病毒稀释度。检测 SPF 鸡血清样品时，病毒采用较高稀释度，如 $10^{-3} \sim 10^{-8}$ 。检测阳性对照血清样品时，病毒采用较低稀释度，如 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 。检测普通鸡血清样品时，病毒稀释度常采用 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ 。

4.2.3 病毒与血清混合感作

将血清与不同稀释度的病毒等体积混合后，经 37℃感作，感作时间见表 2。

表 2 血清与病毒混合感作时间

病 毒	感作时间/min
禽脑脊髓炎病毒	60
传染性支气管炎病毒	30 或 60
传染性法氏囊病病毒	60
传染性喉气管炎病毒	45

4.2.4 接种鸡胚

4.2.4.1 病毒与血清混合感作后接种鸡胚，每个稀释度接种 4 枚鸡胚，每枚鸡胚接种 0.2 mL。

4.2.4.2 病毒对照：将不同稀释度的病毒液，分别接种鸡胚，每个稀释度接种 4 枚鸡胚，每枚鸡胚接 0.1 mL。

4.2.4.3 接种：根据病毒种类选择接种方法（见表 3）。

表 3 病毒接种胚龄与方法

病毒种类	胚龄/d	接种方法
禽脑脊髓炎病毒	5~7	YS
传染性支气管炎病毒	9~10	CAS
传染性法氏囊病病毒	10	CAM
传染性喉气管炎病毒	9~10	CAS
注：YS——卵黄囊；CAS——尿囊腔；CAM——绒毛尿囊膜（接种方法参见附录 B）。		

4.2.5 孵化

将接种后的鸡胚放入孵化器，继续孵化。根据病毒不同，选定不同的孵化时间（见表 4）。

表 4 接种鸡胚的孵化时间

病 毒	孵化时间/d
禽脑脊髓炎病毒	10~12
传染性支气管炎病毒	8
传染性法氏囊病病毒	7
传染性喉气管炎病毒	7

4.2.6 观察和记录

每日照胚,记录各组鸡胚的死亡数(24 h 内死亡的鸡胚忽略不计);孵化期满,记录各组鸡胚的感染数(参照附录 C 中的描述进行判定)。

4.2.7 计算中和指数

4.2.7.1 统计原理

结果以中和指数表示,中和指数表示被检血清中有无中和抗体及中和病毒的能力。为求中和指数,应计算出病毒对照和被检血清/病毒的 ELD₅₀,此二者的差数即为中和指数(Reed 和 Muench 法),参见示例。

示例:
病毒对照组及血清/病毒试验组死亡情况见表 5 和表 6。

表 5 病毒对照组死亡情况

病毒稀释度	死亡比例	死亡	存活	累 计			
				死亡	存活	死亡比例	死亡百分率/%
10 ⁻⁵	4/4	4	0	13 ↑	0	13/13	100.0
10 ⁻⁶	4/4	4	0	9	0	9/9	100.0
10 ⁻⁷	2/4	2	2	5	2	5/7	71.4
10 ⁻⁸	2/4	2	2	3	4	3/7	42.8
10 ⁻⁹	1/4	1	3	1	7	1/8	12.5
10 ⁻¹⁰	0/4	0	4	0	11 ↓	0/11	0
注:分母表示接种鸡胚数,分子表示因病毒感染死亡鸡胚数(表 6 同)。							

表 6 血清/病毒组死亡情况

病毒稀释度	死亡比例	死亡	存活	累 计			
				死亡	存活	死亡比例	死亡百分率/%
10 ⁻⁴	4/4	4	0	17 ↑	0	17/17	100
10 ⁻⁵	4/4	4	0	13	0	13/13	100
10 ⁻⁶	4/4	4	0	9	0	9/9	100
10 ⁻⁷	3/4	3	1	5	1	5/6	83.3
10 ⁻⁸	2/4	2	2	2	3	2/5	40
10 ⁻⁹	0/4	0	0	0	3 ↓	0/5	0

4.2.7.2 中和指数计算

被检血清的中和指数为病毒对照组 ELD₅₀效价与血清/病毒组 ELD₅₀效价的差值。
ELD₅₀效价为高于 50%死亡的病毒稀释度倒数的对数与距离比之和,其中距离比按式(1)计算。

距离比 = $\frac{\text{高于 } 50\% \text{ 的死亡百分数} - 50\%}{\text{高于 } 50\% \text{ 的死亡百分数} - \text{低于 } 50\% \text{ 的死亡百分数}}$ (1)

示例：
表 5 中，病毒对照组 ELD₅₀效价在 10⁻⁷~10⁻⁸之间，则：
病毒组对照组 ELD₅₀效价 = $7 + \frac{71.4 - 50}{71.4 - 42.8} = 7 + 0.75 = 7.75$
表 6 中，血清/病毒组 ELD₅₀效价在 10⁻⁷~10⁻⁸之间，则：
血清/病毒组对照组 ELD₅₀效价 = $7 + \frac{83.3 - 50}{83.3 - 40} = 7 + 0.76 = 7.76$
被检血清的中和指数 = 7.75 - 7.76 = -0.01

5 结果判定

被检血清的中和指数≥2.0 为阳性。



附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 胰蛋白胨磷酸盐肉汤(tryptone phosphate broth)

胰蛋白胨	20.0 g
葡萄糖	2.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
pH	7.3±0.2

加 1 L 双蒸水,完全溶解后分装,121 ℃灭菌 15 min,4 ℃保存备用,可放置 6 个月。

A.2 青霉素/链霉素(双抗)液

青霉素	100 000 U
链霉素	0.1 g

加双蒸水至 10 mL,经无菌 0.22 μm 滤器过滤除菌后,－20 ℃保存备用,可放置 12 个月。



附 录 B
(资料性附录)
病毒接种技术

B.1 卵黄囊(YS)接种

选 5 日龄~7 日龄鸡胚经照蛋检查后,画出气室和胎位,对应气室中央的蛋壳先用 2.5% 碘酒消毒,再用 75% 酒精脱碘。用打孔器打一小孔,勿损伤壳膜。接种时针头迅速稳定地通过小孔,沿胚的纵轴深入约 3 cm,此时注射器轻轻往回抽一下,如针头在卵黄囊中,可见卵黄被抽出,此时就可将注射物注入,用融化的石蜡封闭壳孔,置 37 ℃ 培养。

B.2 尿囊腔(CAS)接种

选 9 日龄~11 日龄鸡胚,照检后画出气室边界,在气室交界边缘以上约 1 mm 处并避开血管作一标记,此即为注射点。在点周围先用 2.5% 碘酒消毒,再用 75% 酒精脱碘。用打孔器在注射点处打一小孔,勿损伤壳膜。用注射器注入样品 0.2 mL,然后用融化的石蜡封口,置 37 ℃ 培养。

B.3 绒毛尿囊膜(CAM)接种

选 10 日龄鸡胚,在胚胎附近略近气室处,选择血管较少的部位,用记号笔在卵壳上标记出一个直径约 3 mm~4 mm 的圈,用 2.5% 碘酒消毒,再用 75% 酒精脱碘,小心用刀尖将圈内的卵壳撬起,造成卵窗,但不可损伤壳膜。在气室端也钻一个小孔。随后用针尖轻轻挑破卵窗中心的壳膜,切勿损伤其下的绒毛尿囊膜。滴加 1 滴灭菌生理盐水于刺破处。用橡皮乳头紧贴于气室中央小孔上吸气,造成气室内负压,使卵窗部位的绒毛尿囊膜下陷而形成人工气室,此时可见滴加于壳膜上的生理盐水迅速渗入。用 14 号针头器滴入 2 滴~3 滴接种物于绒毛尿囊膜上。最后用透明胶纸封住卵窗,周围涂以融化的石蜡密封之。气室中央的小孔可用石蜡密封住。鸡胚在接种后,横卧于孵卵箱中,不许翻动,保持卵窗向上。置 37 ℃ 培养。

附 录 C
(资料性附录)
鸡胚病变特征

C.1 禽脑脊髓炎病毒所致的特异病变

早期为胸腹部肌肉皮下水肿,当接种后 10 d~12 d,解剖活胚时,见腿肌萎缩、足趾卷曲。如出现此类特征,判为感染。

C.2 传染性支气管炎病毒所致的特异病变

鸡胚卷曲、矮小,脚变形压在头上,羊膜增厚、卵黄囊收缩、易破裂。如出现此类特征,判为感染。

C.3 传染性喉气管炎病毒所致的特异病变

感染传染性喉气管炎病毒的鸡胚,可在绒毛尿囊膜上形成痘斑。如出现痘斑,判为感染。

C.4 传染性法氏囊病毒所致的特异病变

鸡胚充血,在羽毛囊、趾关节和大脑有血斑性出血,肝脏多可见坏死,可见灰质肝体似熟肉样。如出现此类特征,判为感染。



参 考 文 献

[1] GB/T 19167—2003 传染性囊病诊断技术
[2] NY/T 556—2002 鸡传染性喉气管炎诊断技术
