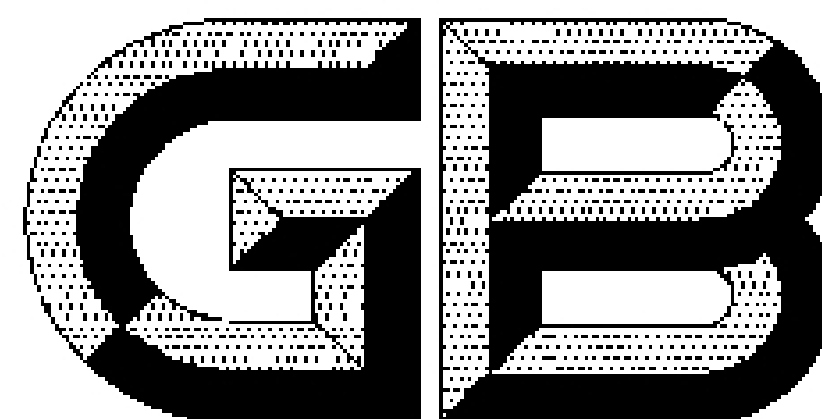




中华人民共和国国家标准

GB/T 17999.7—2008
代替 GB/T 17999.6—1999

SPF 鸡 微生物学监测 第 7 部分: SPF 鸡 胚敏感试验

SPF chicken—Microbiological surveillance—
Part 7: Embryo susceptibility 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 7 部分。

本部分代替 GB/T 17999.6—1999《SPF 鸡 胚敏感试验》。

本部分与 GB/T 17999.6—1999 相比主要变化如下：

- 增加了资料性附录 A“卵黄囊接种技术和 EID₅₀测定方法”；
- 重新制定了试验成立条件和结果判定标准。

本部分的附录 A 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 17999.6—1999。



SPF 鸡 微生物学监测
第 7 部分:SPF 鸡 胚敏感试验

1 范围

GB/T 17999 的本部分规定了胚敏感试验的技术要求。
本部分适用于对 SPF 鸡进行禽脑脊髓炎病毒抗体的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 17999 的本部分的引用而成为本部分的条款。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部分,然而,鼓励根据本部分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部分。

GB/T 17999.1—2008 SPF 鸡 微生物学监测 第 1 部分:SPF 鸡 微生物学监测总则

3 原理

Van Roekel(CVCC AV35)毒株是禽脑脊髓炎病毒的一株胚适应毒株,具有高度嗜神经性。对无抗体鸡群的鸡胚有致病性,引起肌肉营养不良、运动性降低、足趾卷曲等特征性病变。免疫或感染鸡群的鸡胚对经卵黄囊接种的病毒有抵抗力。

4 试剂和器材

4.1 试剂

4.1.1 AE-Van Roekel 病毒(EID₅₀的测定参见附录 A)。



4.1.2 SPF 鸡蛋。

4.1.3 被检蛋(取样比例见 GB/T 17999.1—2008)。

4.2 器材

4.2.1 1 mL 注射器。

4.2.2 7 号针头。

4.2.3 恒温培养箱。

4.2.4 超净工作台。

4.2.5 小型孵化器。

5 操作程序

5.1 取被检蛋、标准 SPF 蛋孵至 6 日龄。

5.2 取 6 日龄被检鸡胚,每胚经卵黄囊接种(接种方法参见附录 A)0.2 mL 含 100 EID₅₀ 的 AE-Van Roekel 病毒液,接种完毕用蜡封孔,同时设 6 日龄 SPF 鸡胚接种病毒与不接种病毒分别作为标准阳性、阴性对照。

5.3 接种后的鸡胚,置于 37℃~37.5℃孵化器中孵化,每天照胚一次,取出死亡鸡胚,接种后第 12 d 取出全部鸡胚待检。

6 结果判定

6.1 阴性、阳性对照

当接种 SPF 对照鸡胚均呈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),不接种 SPF 对照鸡胚无特异病变时,试验成立。

6.2 被检结果判定

100%鸡胚有特征性病变,表明此鸡群未感染禽脑脊髓炎病毒;鸡胚无特征性病变,表明此鸡群已感染禽脑脊髓炎病毒。



附 录 A
(资料性附录)

卵黄囊接种技术和 EID₅₀ 测定方法

A.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。

A.2 EID₅₀ 的测定

A.2.1 将 AE-Van Roekel 病毒悬液作 10 倍系列稀释,取适宜稀释度的病毒 0.2 mL 接种 6 日龄 SPF 鸡胚,由最高稀释度开始,每一稀释度接种 4 枚~6 枚。接种后的鸡胚,置 37 ℃~37.5 ℃孵化器中孵化,每天照蛋一次,取出死亡鸡胚,至接种后第 12 d,统计鸡胚的死亡和感染数量。

A.2.2 对于接种后 24 h 内死亡的鸡胚忽略不计。与正常 SPF 鸡胚对比,感染 AE-Van Roekel 病毒的鸡胚出现特征性病变(早期为胸腹部肌肉皮下水肿,晚期表现为腿肌萎缩、足趾卷曲)的判为感染。

A.2.3 计算各稀释度接种鸡胚后死亡及感染个体的百分率。按 Reed 和 Muench 法计算病毒胚半数感染量(EID₅₀)。

A.2.4 试验举例:病毒稀释及鸡胚死亡情况见表 A.1。

表 A.1

病毒稀释度	观察结果			累计结果		
	感染及死亡数	未感染数	百分率/%	感染及死亡数	未感染数	百分率/%
10 ⁻¹	6	0	100	13	0	100
10 ⁻⁵	5	1	83	7	1	88
10 ⁻⁶	2	4	33	2	5	29
10 ⁻⁷	0	6	0	0	11	0

距离比例= $\frac{88\%-50\%}{88\%-29\%}=0.64$

LgEID₅₀ = 高于 50% 的病毒稀释度的对数 + 距离比例 × 稀释系数的对数

= -5 + 0.64 × (-1) = -5.64

则: EID₅₀ = 10^{-5.64} / 0.2 mL。

即: 将病毒悬液作 10^{-5.64} 稀释后, 接种鸡胚 0.2 mL, 可以造成 50% 的鸡胚感染。将病毒悬液作 10^{-3.64} 稀释后, 即为 100EID₅₀ / 0.2 mL。