

GB/T 14926.46—2008

7 结果判定

7.1 基础级犬

如接种疫苗后,经 ELISA 检测抗体效价大于等于 1:160,或显微镜凝集检测抗体效价大于等于 1:20 判为合格。被检动物免疫抗体合格率大于等于 70%可判为该犬群免疫合格。

免疫抗体合格率=(被检动物抗体阳性数/被检动物总数)×100%

7.2 SPF 级犬

不应进行疫苗接种,或未进行免疫的基础级犬,对阳性检测结果,选用同一种方法或另一种方法重试。如仍为阳性则判为阳性。

8 结果报告

根据判定结果,作出报告。

GB/T 14926.46—2008

ICS 65.020.30
B 44

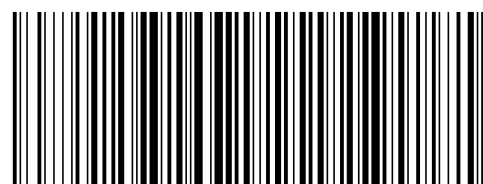


中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.46—2008
代替 GB/T 14926.46—2001

实验动物 钩端螺旋体检测方法

Laboratory animal—Method for examination of *Leptospira* spp.



GB/T 14926.46—2008

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-35767

定价: 10.00 元

2008-12-03 发布

2009-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

中华人民共和国
国家标准
实验动物 钩端螺旋体检测方法
GB/T 14926.46—2008

*
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.spc.net.cn
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*
开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 9 千字
2009年2月第一版 2009年2月第一次印刷
*
书号: 155066·1-35767 定价 10.00 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

6.1.2.2.1 待检血清灭活: 将待检血清以 56 °C 水浴灭活 30 min 后备用。

6.1.2.2.2 取 96 孔板, 第 1 孔加入生理盐水 0.16 mL, 以后每孔加入生理盐水 0.1 mL, 一直加到第 9 孔。

6.1.2.2.3 在第 1 孔中加入血清 0.04 mL, 混匀后, 吸取 0.1 mL 到第 2 孔, 如此类推, 直到第 9 孔, 弃去 0.1 mL。

6.1.2.3 对照

另标明 10、11、12 孔, 第 10 孔加入阴性血清 0.1 mL, 第 11 孔加入阳性血清 0.1 mL, 第 12 孔加入生理盐水 0.1 mL。

6.1.2.4 加入抗原

将各孔加入标准抗原 0.1 mL, 混匀, 此时各孔血清稀释度为 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560。具体操作见表 1。置 37 °C 温箱 2 h, 取出后摇匀, 用接种环挑取各孔中的反应物置于载玻片上, 在暗视野下观察结果。

6.1.2.5 结果判定

结果判定如下:

- a) ++++: 几乎全部钩端螺旋体呈蝌蚪状或折光率高的团块, 或有大小不等的点状或块状残片, 仅有少数游离的钩端螺旋体;
- b) +++: 75% 的钩端螺旋体被凝集, 大部分呈块状或蜘蛛状, 尚有 25% 菌体游离;
- c) ++: 50% 左右的钩端螺旋体被凝集, 尚有 50% 菌体游离;
- d) +: 25% 左右的钩端螺旋体被凝集, 尚有 75% 菌体游离;
- e) -: 全部菌体正常, 分散, 无凝集块, 菌数与对照相同。

待检血清凝集效价在 1:20 达到“++”或以上时, 均判为阳性反应。

6.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)

6.2.1 包被抗原

根据滴定的最适工作浓度, 将抗原用包被液稀释。每孔 100 μ L, 置 37 °C 1 h 后再 4 °C 过夜。

6.2.2 用洗涤液洗 3 次, 每次 5 min, 叩干。

6.2.3 加样

待检血清和阴性、阳性血清分别用稀释液做 1:160 稀释, 每孔 100 μ L, 37 °C 1 h, 洗涤同上。

6.2.4 加酶结合物

用稀释液将酶结合物稀释至适当浓度, 每孔加入 100 μ L, 37 °C 1 h, 洗涤同上。

6.2.5 加底物溶液

每孔加入新配制的底物溶液 100 μ L, 置 37 °C, 避光显色 10 min~15 min。

6.2.6 终止反应

每孔加入终止液 50 μ L。

6.2.7 测 A 值

在酶标仪上, 于 490 nm 处读出各孔 A 值。

6.2.8 结果判定

在阴性和阳性血清对照成立的条件下, 进行结果判定。

6.2.8.1 同时符合下列 2 个条件者, 判为阳性:

- a) 待检血清的 A 值大于等于 0.2;
- b) 待检血清的 A 值/阴性对照血清的 A 值大于等于 2.1。

6.2.8.2 均不符合上述 2 个条件者, 判为阴性。

6.2.8.3 仅有 1 条符合者, 判为可疑, 需重试。如仍为阳性则判为阳性。

6.2.8.4 对阳性结果需重试, 如仍为阳性则判为阳性。

- 5.6.2 生长良好的培养物用 10 000 r/min 离心 30 min,沉淀用 PBS 在相同条件下洗 2 次。
- 5.6.3 上述沉淀用 PBS 悬浮,超声波打碎后,10 000 r/min 离心 20 min,上清即为 ELISA 抗原。
- 5.7 酶结合物:辣根过氧化物酶标记羊或兔抗犬 IgG 抗体,辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白 A(SPA)。
- 5.8 阳性血清:钩端螺旋体免疫 SPF 犬所获得的血清,或自然感染犬后所获得的血清。
- 5.9 阴性血清:无钩端螺旋体感染犬血清。
- 5.10 培养基和试剂溶液的配制:参照 GB/T 14926.43 和 GB/T 14926.50 执行。

6 检测方法

6.1 显微镜凝集实验

6.1.1 检测程序

检测程序见图 1。

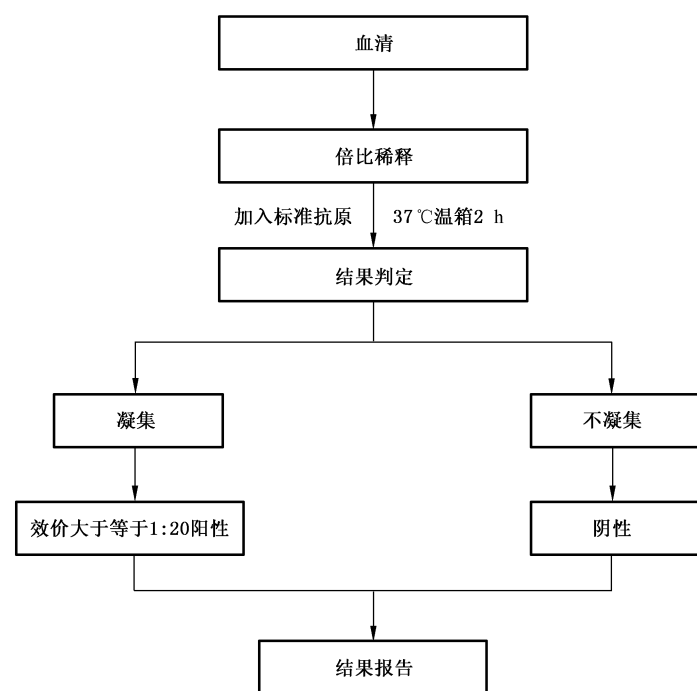


图 1 检测程序

6.1.2 操作步骤

6.1.2.1 采样

采血、分离血清。采样方法参照 GB/T 14926.42 执行。

6.1.2.2 血清稀释

参照表 1 进行。

表 1 钩端螺旋体定量显微镜凝集试验操作方法

凹孔板编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
生理盐水/mL	0.16	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			0.1
待检血清/mL	0.04 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	弃去	0.1	
阴性血清/mL										0.1		
阳性血清/mL											0.1	
标准抗原/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
血清最终稀释度	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280	1/2 560			

前 言

GB/T 14926《实验动物》共 54 个部分,为不同微生物和病毒检测技术方法。

本部分自实施之日起代替 GB/T 14926.46—2001《实验动物 钩端螺旋体检测方法》。

本部分与 GB/T 14926.46—2001 相比主要技术差异如下:

- a) 原理部分增加显微镜凝集试验原理;
- b) 原标准中“6.1 试管凝集实验”修改为“显微镜凝集实验”;“6.1.2.2 表 1 钩端螺旋体定量显凝试验操作方法”修改为“钩端螺旋体定量显微镜凝集试验操作方法”;
- c) 修改原标准中所有关于酶联免疫吸附试验的内容;
- d) 在原标准中增加了“7 结果判定”。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会提出并归口。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会负责起草。

本部分主要起草人:范薇、田克恭、贺争鸣。

本部分所代替标准历次版本发布情况为:

——GB/T 14926.46—2001。