

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

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

GB/T 17999.10—2008

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

中华人民共和国
国家标准
SPF 鸡 微生物学监测
第 10 部分:SPF 鸡 间接免疫荧光试验
GB/T 17999.10—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 0.75 字数 8 千字
2009 年 4 月第一版 2009 年 4 月第一次印刷

*
书号: 155066·1-36494 定价 14.00 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



GB/T 17999.10—2008

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
中国国家标准化管理委员会 发布

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 17999.9—1999。

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。

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

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:

$$\text{起始细胞浓度} = \frac{25}{4} \times 10^3 \times 10^4 = 6.25 \times 10^7 \text{ (个/mL)}$$

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5×10⁶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36h~48h。

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1500 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 μL细胞悬液(约含细胞10⁵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。