

# 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。

## 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  $5 \times 10^6$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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)

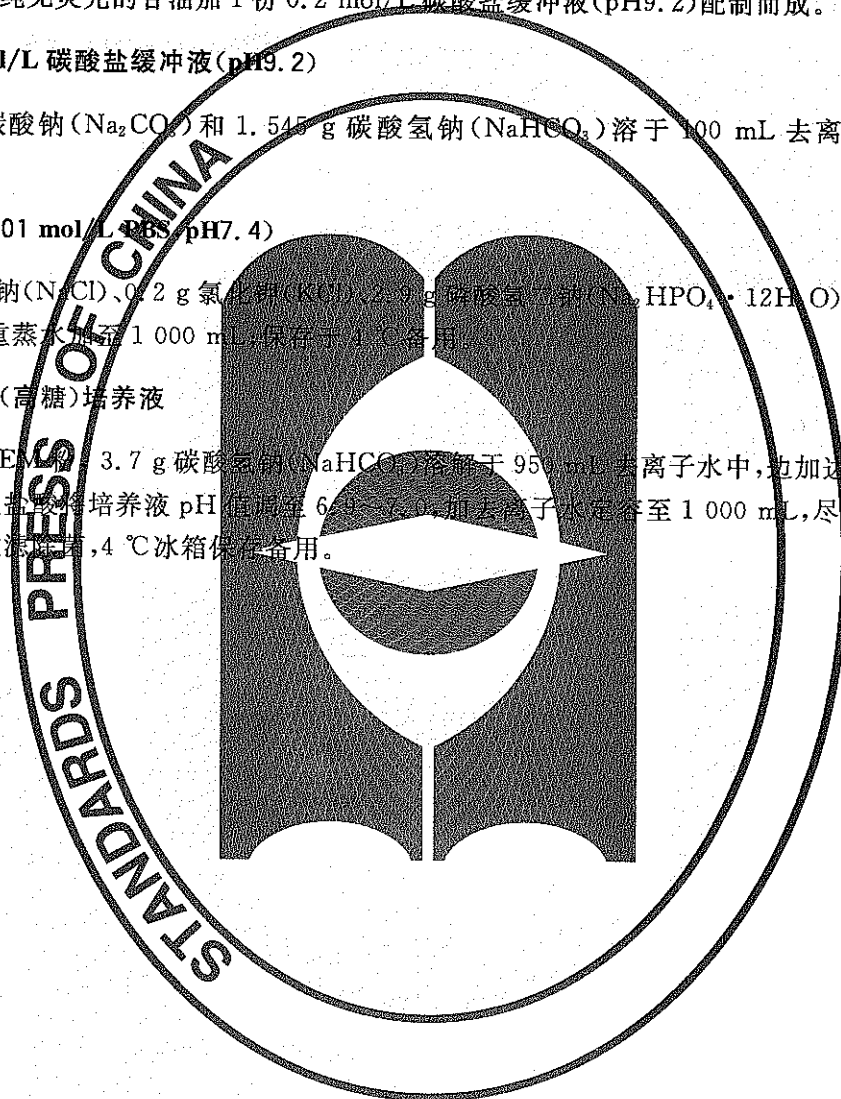
0.17 g 碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )和 1.545 g 碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )溶于 100 mL 去离子水中,4℃保存 3 个月。

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

8 g 氯化钠( $\text{NaCl}$ )、0.2 g 氯化钾( $\text{KCl}$ )、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( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),重蒸水补足至 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( $\text{NaHCO}_3$ )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,加入去离子水定容至 1 000 mL,尽快用孔径 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤灭菌,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。

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

示例:

若4个大方格内的细胞总数为25个,细胞稀释度为1:10<sup>3</sup>,则:

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

参 考 文 献

- [1] NY/T 681—2003 鸡传染性贫血诊断技术
-