



中华人民共和国国家标准

GB/T 17999.6—2008
代替 GB/T 17999.5—1999

SPF 鸡 微生物学监测 第 6 部分: SPF 鸡 酶联免疫吸附试验

SPF chicken—Microbiological surveillance—
Part 6: Enzyme-linked immunosorbent 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 6 部分。

本部分修订参照了 GB/T 18936—2003《高致病性禽流感诊断技术》、GB/T 19167—2003《传染性囊病诊断技术》、NY/T 538—2002《鸡传染性鼻炎诊断技术》、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 17999.5—1999《SPF 鸡 酶联免疫吸附试验》。

本部分与 GB/T 17999.5—1999 相比主要变化如下：

- 增加了间接酶联免疫吸附试验；
- 增加了附录 A“试剂的配制”。

本部分的附录 A 为规范性附录。

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、姜骞、韩凌霞、邵卫星、朱果、单忠芳、刘家森、司昌德、郭东春、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 17999.5—1999。

SPF 鸡 微生物学监测

第 6 部分:SPF 鸡 酶联免疫吸附试验

1 范围

GB/T 17999 的本部分规定了酶联免疫吸附试验的技术要求。

本部分间接酶联免疫吸附试验适用于对 SPF 鸡进行以下病原微生物的血清抗体检测:副鸡嗜血杆菌(*Haemophilus*)、鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*)、滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*)、禽流感病毒(Avian Influenza Virus)、新城疫病毒(Newcastle Disease Virus)、传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus)、传染性法氏囊病病毒(Infectious Bursal Disease Virus)、网状内皮增生症病毒(Reticuloendotheliosis Virus)、鸡传染性贫血病毒(Chicken Infectious Anaemia Virus)、禽呼肠孤病毒(病毒性关节炎)(Avian Reovirus)、禽脑脊髓炎病毒(Avian Encephalomyelitis Virus)、传染性喉气管炎病毒(Infectious Laryngotracheitis Virus)、禽腺病毒Ⅲ群(EDS)(Avian Adenovirus Group III)、淋巴细胞白血病毒(Lymphoid Leukosis Virus)。

本部分双抗体夹心酶联免疫吸附试验适用于对 SPF 鸡进行淋巴细胞白血病毒 P27 抗原检测。

2 原理

间接酶联免疫吸附试验采用已知微生物抗原检测未知抗体,双抗体夹心酶联免疫吸附试验采用已知抗体检测未知抗原。

3 间接酶联免疫吸附试验

3.1 试剂

3.1.1 包被抗原、阴性、阳性对照血清、羊抗鸡 IgG 酶标抗体,按说明书保存和使用。

3.1.2 包被液、稀释液、底物液、终止液配制方法见附录 A。

3.2 器材

酶标板,移液器,37℃恒温培养箱,酶标仪。

3.3 操作程序

3.3.1 抗原包被:将禽流感病毒、传染性支气管炎病毒、传染性法氏囊病病毒、传染性喉气管炎病毒、新城疫病毒、副鸡嗜血杆菌、禽腺病毒Ⅲ群(EDS)、鸡毒支原体、滑液囊支原体、禽脑脊髓炎病毒、淋巴细胞白血病毒、网状内皮增生症病毒、禽呼肠孤病毒(病毒性关节炎)、鸡传染性贫血病毒抗原用包被液稀释至工作浓度,加入酶标板各孔中,每孔 100 μL,置 4℃冰箱过夜。

3.3.2 洗涤:甩净孔内抗原溶液,用洗涤液加满各孔,放置 5 min,然后甩净,如此重复 3 次。

3.3.3 加被检血清:用稀释液将被检血清以 1:100 稀释,每孔加入 100 μL,每次操作均设置阴性对照孔两个,阳性对照孔、空白对照孔各一个,分别加入同样稀释的阴性血清、阳性血清和稀释液各 100 μL,加不同的血清样品时应换吸头,37℃温箱中作用 30 min。

3.3.4 洗涤:同 3.3.2。

3.3.5 加羊抗鸡 IgG 酶标抗体:用稀释液将酶标抗体稀释至工作浓度,每孔加入 100 μL,37℃温箱中作用 30 min。

3.3.6 洗涤:同 3.3.2。

3.3.7 显色:加入底物液 100 μL,室温避光反应 5 min 左右(至阴性对照孔开始产生颜色时)。

3.3.8 终止及读数:每孔加 50 μL 终止液终止显色,然后用酶标仪读取每孔在 490 nm 处的吸光度 (OD)值。

3.4 结果判定与表示方法

将样品的 OD 值代入式(1)计算。

$$S/N = \frac{\text{被检血清样品 OD 值}}{\text{阴性对照平均 OD 值}} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

S——被检血清样品 OD 值;

N——阴性对照平均 OD 值。

若 S/N≥2 则结果判为阳性,记为“+”,否则判为阴性,记为“-”。

4 双抗体夹心酶联免疫吸附试验

4.1 试剂

4.1.1 包被抗体(兔抗 P27 IgG)、阳性抗原(P27)、阴性抗原、被检血清、被检蛋清、HRP-兔抗 P27、羊抗鸡 IgG 酶标抗体按说明书保存和使用。

4.1.2 包被液、稀释液、底物液、终止液配制方法见附录 A。

4.2 器材

见 3.2。

4.3 操作程序

4.3.1 抗体包被:用包被液将兔抗 P27 IgG 作适当稀释,每孔 100 μL,4 ℃过夜。

4.3.2 洗涤:甩去包被液,每孔加满洗涤液(约 300 μL),静置 3 min,甩干,如此重复 3 次。

4.3.3 加样:每孔加 100 μL 被检蛋清,设阳性、阴性对照孔,每个样品加两孔,37 ℃作用 60 min 甩去样品,洗涤同 4.3.2。

4.3.4 每孔加 HRP-兔抗 P27 液(工作浓度)100 μL,37 ℃作用 45 min~60 min,甩去 HRP-兔抗 P27 液,洗涤同 4.3.2。

4.3.5 加底物溶液:每孔加 100 μL 新配制的底物溶液,避光作用 15 min。

4.3.6 终止及读数:每孔加 50 μL 终止液终止显色,然后用酶标仪读取每孔在 490 nm 处的吸光度 (OD)值。

5 结果判定

5.1 当阳性对照 OD 值与阴性对照 OD 值之差大于或等于 0.3 时,试验结果可靠。

5.2 按式(2)计算被检样品的 S/P 比值。

$$S/P = \frac{\text{样品 OD 值均数} - \text{阴性对照 OD 值均数}}{\text{阳性对照 OD 值均数} - \text{阴性对照 OD 值均数}} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

S——样品 OD 值;

P——阳性对照 OD 值。

5.3 判定:S/P≥0.2,判为阳性;S/P<0.2,判为阴性。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 包被液

碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L、pH9.6,CBS):

碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g

用双蒸水溶解至 1 000 mL,于 4 ℃保存,不超过 1 个月。

A.2 稀释液

磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L、pH7.4,PBS):

氯化钠	8 g
磷酸二氢钠	0.2 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
氯化钾	0.2 g
加蒸馏水至	1 000 mL

A.3 洗涤液

含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L、pH7.4 的 PBS:

Tween-20	50 mL
加 0.01 mol/L、pH7.4 的 PBS 至	1 000 mL

A.4 底物溶液

pH5.0,磷酸盐-柠檬酸缓冲液-OPD- H_2O_2 :

磷酸氢二钠溶液($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1.84 g
柠檬酸	0.51 g
蒸馏水	100 mL

106.4 Pa、30 min 灭菌,4 ℃保存备用。

使用时每 100 mL 中加入 40 mg 邻苯二胺(OPD),溶解后加 30% H_2O_2 0.15 mL,混匀后使用。本试剂现用现配。

A.5 终止液

2 mol/L 硫酸:

硫酸(95%~98%)	11.1 mL
蒸馏水	88.9 mL

GB/T 17999.6—2008

参 考 文 献

- [1] GB/T 18936—2003 高致病性禽流感诊断技术
- [2] GB/T 19167—2003 传染性囊病诊断技术
- [3] NY/T 538—2002 鸡传染性鼻炎诊断技术