



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 5×10^6 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 μ 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。