



中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.10—2008
代替 GB/T 14926.10—2001

实验动物 泰泽病原体检测方法

Laboratory animal—Method for examination of Tyzzer's organism

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 发布
中国国家标准化管理委员会

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 14926.10—2001《实验动物 泰泽病原体检测方法》。

本部分与 GB/T 14926.10—2001 相比主要技术差异如下:

- a) 删除了可的松激发试验;
- b) 修改了两种血清学方法。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会提出并归口。

本部分起草单位:全国实验动物标准化技术委员会。

本部分主要起草人:李红。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 14926.10—1994,GB/T 14926.10—2001。

实验动物 泰泽病原体检测方法

1 范围

GB/T 14926 的本部分规定了实验动物泰泽病原体的检测方法。

本部分适用于小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠和兔泰泽病原体的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 14926 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 14926.50 实验动物 酶联免疫吸附试验

GB/T 14926.52 实验动物 免疫荧光试验

3 原理

动物感染泰泽病原体后血清中可产生相应的抗体。依据免疫学原理,采用泰泽病原体抗原检测小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠和兔血清中相应的抗体。

4 主要设备和材料

- 4.1 普通恒温培养箱。
- 4.2 荧光显微镜。
- 4.3 生物显微镜。
- 4.4 酶标仪。
- 4.5 组织研磨器。
- 4.6 聚苯乙烯板,40孔、55孔或96孔(可拆或不可拆),用前洗净晾干,紫外光照射1h。
- 4.7 微量加样器,容量5 μ L~50 μ L、50 μ L~200 μ L。
- 4.8 印有10个~40个小孔的载玻片。
- 4.9 盖玻片。
- 4.10 超低温冰箱或液氮罐。

5 培养基和试剂

5.1 ELISA 抗原

5.1.1 泰泽病原体抗原

受泰泽病原体感染的、带有严重坏死灶的动物肝脏按1:10加入PBS后在冰浴中用组织研磨器制成匀浆,3600 r/min离心,取上清液作抗原。

5.1.2 阴性对照抗原

未受泰泽病原体感染的动物肝脏,按5.1.1的方法制成。

5.2 抗原片

5.2.1 抗原

受泰泽病原体感染的、带有严重坏死灶的动物肝组织用PBS按1:10在冰浴中制成匀浆,调整浓

度至每个显微镜油镜视野有适当的菌量,即细菌、肝细胞、细胞碎片完全铺开,不重叠。泰泽病原体自溶现象严重,应尽快完成该过程。

5.2.2 抗原片制备

将上述抗原液适量滴于玻片孔中,室温干燥后,冷丙酮(4℃)固定 10 min。PBS 漂洗后充分干燥,置于一20℃备用。

5.3 酶结合物

辣根过氧化物酶标记的羊或兔抗小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠 IgG 抗体,用于检测相应动物的抗体;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体,用于检测兔血清抗体;辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌蛋白 A (SPA),用于检测大鼠血清以外的动物血清抗体。

5.4 荧光结合物

荧光标记的羊或兔抗小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠 IgG 抗体用于检测相应动物的血清抗体;荧光标记的羊抗兔 IgG 抗体,用于检测兔血清抗体。

5.5 阳性血清

上述抗原免疫清洁级或 SPF 级小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠或无泰泽病原体感染的兔获得的抗血清。

5.6 阴性血清

清洁级或 SPF 级小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠血清;或无泰泽病原体感染的兔血清。

5.7 50%甘油 PBS。

5.8 其他试剂溶液的配制见 GB/T 14926.50 和 GB/T 14926.52。

6 检测方法

6.1 酶联免疫吸附试验(ELISA)

6.1.1 包被抗原

根据滴定的最适工作浓度,将两种抗原分别用包被液稀释,两种抗原隔行包被,每孔包被抗原 100 μL,置 37℃ 1 h 后在 4℃ 过夜。

6.1.2 用洗涤液洗 3 次,每次 5 min,叩干。

6.1.3 加样

待检血清用稀释液做 1:40 稀释,分别加入两孔(泰泽病原体抗原孔和阴性对照抗原孔),每一抗原板至少设置两份阳性血清和阴性血清对照。每孔加入稀释后的待检血清、对照血清 100 μL,37℃ 1 h,洗涤同上。

6.1.4 加酶结合物

用稀释液将酶结合物稀释成适当浓度,每孔 100 μL,37℃ 1 h,洗涤同上。

6.1.5 加底物溶液

每孔加入新配制的底物溶液 100 μL,置 37℃,避光显色 10 min~15 min。

6.1.6 终止反应

每孔加入终止液 100 μL。

6.1.7 测 A 值

在酶标仪上,于 490 nm 处读出各孔 A 值。

6.1.8 结果判定

在阴性和阳性对照成立的情况下,进行结果判定。

6.1.8.1 同时符合下列 3 个条件者,判为阳性。对阳性结果需重试,如仍为阳性则判为阳性:

- 待检血清与阴性对照抗原和泰泽病原体抗原反应有明显的颜色区别;
- 待检血清与泰泽病原体抗原反应的 A 值大于等于 0.2;
- 待检血清与泰泽病原体抗原反应的 A 值/阴性对照血清与泰泽病原体抗原反应的 A 值大于等于 2.1。

6.1.8.2 均不符合上述3个条件者,判为阴性。

6.1.8.3 仅有1条~2条符合者,判为可疑,需重试。

6.2 免疫荧光试验(IFA)

6.2.1 取出抗原片,室温干燥后,将适当稀释的待检血清(推荐1:10)和阴性、阳性血清分别滴于抗原片上,每张玻片上应分别有阳性和阴性血清各1孔,置湿盒内,37℃ 30 min~45 min。

6.2.2 PBS洗3次,每次5 min,室温干燥。

6.2.3 取适当的荧光结合物,滴加于抗原片上,置湿盒内,37℃ 30 min~45 min。

6.2.4 PBS洗3次,每次5 min。

6.2.5 玻片用蒸馏水漂洗1次。

6.2.6 50%甘油 PBS封片,荧光显微镜下观察结果。

6.2.7 结果判定:阳性血清孔菌体呈强的荧光着色,而阴性对照无荧光或仅有微弱非特异荧光时进行结果判定。待检血清孔较阴性血清孔菌体荧光着色强,即可判断为阳性反应。

7 结果报告

对血清抗体阳性者作血清抗体检测阳性报告,否则作阴性报告。
