



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1699.2—2006

猪流行性腹泻病毒直接免疫 荧光试验操作规程

Protocol of direct immunofluorescent test for porcine epidemic diarrhea

2006-01-26 发布

2006-08-16 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

SN/T 1699 分为三部分：

- 猪流行性腹泻微量血清中和试验操作规程；
- 猪流行性腹泻病毒直接免疫荧光试验操作规程；
- 猪流行性腹泻间接斑点酶联免疫吸附试验操作规程。

本部分为 SN/T 1699 的第 2 部分。

本部分的附录 A 为规范性附录。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：罗琼、梁刚、林志雄、李力施。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

猪流行性腹泻病毒直接免疫荧光试验操作规程

1 范围

SN/T 1699 的本部分规定了猪流行性腹泻病毒直接免疫荧光试验的操作方法。
本部分适用于猪流行性腹泻的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 1699 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 6822 分析实验室用水规格和试验用法

3 缩略语

下列缩略语适用于 SN/T 1699 的本部分。

3.1

PED

猪流行性腹泻。

4 仪器设备

荧光显微镜、冰冻切片机、眼科镊子、载玻片、盖玻片、染色缸。

5 试验材料

5.1 0.01 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)

配制方法见 A.1.1,或按诊断试剂说明书配制。

5.2 甘油缓冲盐水

配制方法见 A.1.2,或按诊断试剂说明书配制。

5.3 0.2‰伊文思蓝溶液

配制方法见 A.1.3,或按诊断试剂说明书配制。

5.4 荧光抗体

经结合了异硫氰酸荧光黄(FITC)的兔抗 PED 病毒抗体。由指定单位提供,按说明书要求,保存使用。

5.5 水

本部分使用水符合 GB/T 6822 中二级水的规格。

5.6 被检样品

采取一段长约 10 cm 病死猪的空肠,样品应无菌采取,且无腐败。

5.7 阳性样本

指定单位提供。

5.8 阴性样本

指定单位提供。

6 操作方法

6.1 标本的制作

将取得的病死猪的空肠样本,放于洁净培养皿中,加入少量 PBS 液,用眼科剪子剖开肠管在 PBS 液中轻轻漂洗,除去肠腔内容物,取洁净的肠管为样本。

6.1.1 肠上皮细胞洗脱物涂片

取一段洁净样本,放入离心管或反应管,加 3 mL~5 mL PBS 液,以细玻璃棒搅拌 1 min~3 min,待 PBS 液混浊后,取出肠管,以 1 000 r/min 离心沉淀 5 min,弃去上清液。用铂耳钩取肠上皮洗脱物,于洁净的载玻片上涂片,每个肠管样本涂两张以上玻片。自然风干后,浸于丙酮缸内,室温条件下固定 15 min,取出自然风干,制成肠上皮细胞洗脱物涂片标本。

6.1.2 肠组织冰冻切片

另取一段洁净样本,剪成 0.2 cm~0.8 cm 长的肠段,立即用眼科镊子将肠段直立在冰冻台上,待肠管冻结后,将肠管切片,贴于洁净的载玻片上,风干,浸于丙酮缸内,室温条件下固定 15 min,制成肠管切片标本。

6.2 染色

按荧光抗体说明书标定的工作效价,用 0.2%伊文思蓝稀释荧光抗体。将稀释后的荧光抗体直接滴加到固定的肠上皮细胞洗脱物涂片标本及肠管切片标本上,以覆盖满为宜。放湿盒中于 37℃温箱感作 30 min。

6.3 漂洗

从温箱中取出后,将染片用 PBS 液漂洗三次,每次 3 min,随后用蒸馏水浸泡三次,每次 3 min。

6.4 封固

标本漂洗后,风干,滴加甘油缓冲盐水,加盖玻片封固。

6.5 镜检

置荧光显微镜下,用 520 nm~530 nm 绿色滤光片,在 490 nm~495 nm 紫外光下,观察各个已染色的标本,必要时进行显微照相。

7 结果判定

镜检判定时,应注意荧光物质的部位及颜色,观察标本细胞浆,细胞浆外或胞核内的荧光不能判为阳性。用异硫氰酸荧光黄标记的荧光抗体,在荧光显微镜下发出亮绿色荧光,凡呈暗绿色或黄色的荧光,为非特异性荧光。

7.1 阳性

细胞浆内见有弥漫性或颗粒性亮绿色的荧光时,判定为阳性。

7.2 阴性

细胞浆内未见有弥漫性或颗粒性亮绿色的荧光时,判为阴性。

附 录 A
(规范性附录)
试剂配制与器材处理

A.1 试剂配制

A.1.1 0.01 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 8.70 g

磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.89 g

氯化钠(NaCl) 22.80 g

以上试剂应选用分析纯,将上述成分溶解于适量蒸馏水中,最后定容至 3 000 mL,103 kPa 20 min 高压灭菌,4℃保存,30 d 内使用。

A.1.2 甘油缓冲盐水

取纯甘油 9 份,PBS 液 1 份,混合即成。

A.1.3 0.2‰伊文思蓝溶液

称取 0.2 g 伊文思蓝溶解于 1 000 mL 蒸馏水或 PBS 液。

A.2 载玻片与盖玻片的处理

先用中性洗涤剂充分洗净,浸于 3%盐酸中 12 h~24 h,冲洗后贮于无水乙醇中备用。用过的玻片可用水浸泡,对感染性标本应及时灭菌,用中性洗涤剂擦洗后,浸于浓硫酸中 18 h,冲洗晒干备用。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
猪流行性腹泻病毒直接免疫
荧光试验操作规程
SN/T 1699.2—2006

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.bzcbs.com

电话:68523946 68517548

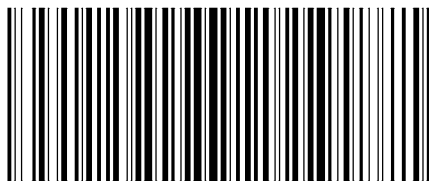
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 7 千字
2006年4月第一版 2006年4月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号:155066·2-16754 定价 6.00 元



SN/T 1699.2-2006