



中华人民共和国国家标准

GB/T 18089—2008
代替 GB/T 18089—2000

蓝舌病病毒分离、鉴定及血清中和 抗体检测技术

Isolation, identification and serum neutralization antibody
test in Bluetongue virus

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
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 18089—2000《蓝舌病微量血清中和试验及病毒分离和鉴定方法》。

本标准与 GB/T 18089—2000 相比主要变化如下：

- 对标准名称进行了修改；
- 删除了蓝舌病病毒鉴定中的病毒中和试验部分；
- 增加了病毒鉴定中 RT-PCR 方法的鉴定。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中华人民共和国云南出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：周晓黎、杨建明、艾军、花群义、杨晓花、张其艳、严树发、董俊、叶玲玲、徐维加。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18089—2000。

蓝舌病病毒分离、鉴定及血清中和 抗体检测技术

1 范围

本标准规定了蓝舌病病毒分离、鉴定及血清中和抗体检测的技术。

本标准适用于蓝舌病病毒的分离、鉴定及动物感染蓝舌病病毒后血清中和抗体的检测。

2 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本标准。

BHK₂₁——幼仓鼠肾细胞株；

BLP——乳糖蛋白胨缓冲肉汤；

BT——蓝舌病；

bp——碱基对；

CPE——致细胞病变作用；

C6/36——蚊子细胞株；

DEPC——焦碳酸二乙酯；

SPF——无特定病原体；

TCID₅₀——半数组织培养感染量；

Vero——非洲绿猴肾细胞株。

3 蓝舌病病毒分离

3.1 材料

10日龄~11日龄 SPF 鸡胚。

3.2 设备与器材

鸡胚开孔器、照蛋灯或照蛋箱、乳钵或组织捣碎器、倒置显微镜。

3.3 试验程序

3.3.1 样品

肝素抗凝血(每 5 mL 血液用 10IU 肝素)、脏器(脾、肝、肾、淋巴结)、精液、库蠓。用于病毒分离的样品应置冷藏容器中保存,在 24 h 内送到实验室,并立即进行处理。

3.3.2 血液样品制备

取肝素抗凝血 5 mL,用磷酸盐缓冲液(PBS,配方见附录 A)洗涤血样 3 次~4 次,每次 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液后加入倍量 BLP(配方见附录 A),置冰浴中用超声波处理(40 μ A,1 min)。经处理的样品当天使用,使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存,剩余样品置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.3.3 组织样品制备

无菌采集动物脾、淋巴结、肝、肾各 5 g,剪碎后加入 BLP 10 mL(含青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 000 μ g/mL),置乳钵中研磨,4 $^{\circ}$ C 冰箱中浸提 4 h,取上清液 5 mL 用超声波裂解处理(100 μ A,1 min~2 min)或冻融三次,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液使用,使用前置 4 $^{\circ}$ C 保存,剩余样品置 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.3.4 精液样品制备

取精液样品 0.5 mL,用 BLP 作 1 : 5 稀释后,3 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,再用 BLP 作