

3309 禽腺病毒 I 群检验法

1 样品的处理及接种

1.1 样品的处理 同附录 3302 禽白血病病毒检验法。

1.2 接种与培养 处理好的样品接种于 1 个长至 80% 以上鸡肝癌细胞 (LMH) 单层的 25 cm² 细胞瓶中, 置 37℃ 吸附 60 分钟, 弃去接种液, 用含 2% 牛血清的 DMEM 培养液洗 LMH 单层 2 次, 2.0 ml/次, 每瓶细胞加 7.0~8.0 ml 含 2% 牛血清的 DMEM 培养液, 37℃ 培养 5~7 天。同时设立正常细胞作为阴性对照。

2 细胞培养的传代 上述细胞培养 5~7 日后, 按常规方法消化、收获细胞, 将其中 1/10 的细胞用 2.0ml 含 3% 牛血清的 DMEM 细胞培养液重悬, 接种 4 孔 48 孔板, 每孔接种 0.5ml。剩余培养物置 -15℃ 以下保存备用。同时, 将禽腺病毒 I 群 (FAdV- I) 稀释至 10~100 TCID₅₀/0.1ml, 接种 4 孔 48 孔板, 每孔 0.1ml, 并补加 0.5ml LMH 正常细胞悬液作为阳性对照。接种细胞的 48 孔板置 5%CO₂, 37℃ 培养 5 日, 然后进行荧光染色。

3 荧光染色

3.1 固定 弃去 48 孔板的细胞培养液, 每孔约加 0.5ml PBS (pH7.2, 下同) 轻洗细胞表面 1 次, 尽量弃尽 PBS, 然后每孔加入 0.3ml 冷甲醇, 置室温固定 10~15 分钟, 弃去甲醇, 自然晾干 2~5 分钟。

3.2 加 FAdV- I 单克隆抗体 自然晾干后, 用 PBS 洗细胞面 1 次, 然后每孔加入 0.1ml 用 PBS 进行适当稀释的 FAdV- I 单克隆抗体, 置 37℃ 作用 1 小时。

3.3 洗涤 弃去 FAdV- I 单克隆抗体, 先用含 0.05% 吐温-20 的 PBS 洗 1~2 次, 每次每孔加 0.5ml。然后用 PBS 以同样的方法洗 2~3 次。

3.4 荧光二抗染色 尽量弃尽洗液, 每孔加入 0.1ml 用 PBS 进行适当稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 置 37℃ 作用 1 小时。

3.5 洗涤 方法同 3.3。

4 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光 (波长 490nm) 观察。被 FAdV- I 感染的 LMH 细胞呈现绿色荧光, 有完整的细胞形态; 未被感染的细胞不着色, 视野发暗。

5 结果判定

5.1 当阳性对照接种的 4 个孔中全部出现特异性绿色荧光, 阴性对照接种孔均未出现特异性绿色荧光时, 试验成立。

5.2 被检样品接种的 4 个孔中, 只要有 1 孔出现特异性绿色荧光, 即判定该样品 FAdV- I 阳性。

备注: 本标准为新增标准。