

GB

中国

国家

标准

汇编

505

GB 27527~27552

(2011年制定)

中国国家标准汇编

505

GB 27527~27552

(2011 年制定)

中国标准出版社 编

中国标准出版社

北 京

图书在版编目(CIP)数据

中国国家标准汇编:2011 年制定. 505:
GB 27527~27552/中国标准出版社编. —北京:中国
标准出版社,2012
ISBN 978-7-5066-6970-2

I. ①中… II. ①中… III. ①国家标准-汇编-中国
-2011 IV. ①T-652.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 197834 号

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100013)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*
开本 880×1230 1/16 印张 29 字数 795 千字
2012 年 9 月第一版 2012 年 9 月第一次印刷

*
定价 220.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

出版说明

1. 《中国国家标准汇编》是一部大型综合性国家标准全集。自 1983 年起,按国家标准顺序号以精装本、平装本两种装帧形式陆续分册汇编出版。它在一定程度上反映了我国建国以来标准化事业发展的基本情况和主要成就,是各级标准化管理机构,工矿企事业单位,农林牧副渔系统,科研、设计、教学等部门必不可少的工具书。

2. 《中国国家标准汇编》收入我国每年正式发布的全部国家标准,分为“制定”卷和“修订”卷两种编辑版本。

“制定”卷收入上一年度我国发布的、新制定的国家标准,顺延前年度标准编号分成若干分册,封面和书脊上注明“20××年制定”字样及分册号,分册号一直连续。各分册中的标准是按照标准编号顺序连续排列的,如有标准顺序号缺号的,除特殊情况注明外,暂为空号。

“修订”卷收入上一年度我国发布的、被修订的国家标准,视篇幅分设若干分册,但与“制定”卷分册号无关联,仅在封面和书脊上注明“20××年修订-1,-2,-3,……”字样。“修订”卷各分册中的标准,仍按标准编号顺序排列(但不连续);如有遗漏的,均在当年最后一分册中补齐。需提请读者注意的是,个别非顺延前年度标准编号的新制定的国家标准没有收入在“制定”卷中,而是收入在“修订”卷中。

读者配套购买《中国国家标准汇编》“制定”卷和“修订”卷则可收齐由我社出版的上一年度我国制定和修订的全部国家标准。

3. 由于读者需求的变化,自 1996 年起,《中国国家标准汇编》仅出版精装本。

4. 2011 年我国制修订国家标准共 1 989 项。本分册为“2011 年制定”卷第 505 分册,收入国家标准 GB 27527~27552 的最新版本。

中国标准出版社

2012 年 8 月

目 录

GB/T 27527—2011	禽脑脊髓炎诊断技术	1
GB/T 27528—2011	口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法	13
GB/T 27529—2011	马接触传染性子宫炎诊断技术	21
GB/T 27530—2011	牛出血性败血病诊断技术	33
GB/T 27531—2011	病毒性脑病和视网膜病病原逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测方法	45
GB/T 27532—2011	犬瘟热诊断技术	55
GB/T 27533—2011	犬细小病毒病诊断技术	65
GB/T 27534.1—2011	畜禽遗传资源调查技术规范 第1部分:总则	73
GB/T 27534.2—2011	畜禽遗传资源调查技术规范 第2部分:猪	81
GB/T 27534.3—2011	畜禽遗传资源调查技术规范 第3部分:牛	97
GB/T 27534.4—2011	畜禽遗传资源调查技术规范 第4部分:绵羊	113
GB/T 27534.5—2011	畜禽遗传资源调查技术规范 第5部分:山羊	127
GB/T 27534.6—2011	畜禽遗传资源调查技术规范 第6部分:马(驴)	141
GB/T 27534.7—2011	畜禽遗传资源调查技术规范 第7部分:骆驼	151
GB/T 27534.8—2011	畜禽遗传资源调查技术规范 第8部分:家兔	161
GB/T 27534.9—2011	畜禽遗传资源调查技术规范 第9部分:家禽	173
GB/T 27535—2011	猪流感 HI 抗体检测方法	191
GB/T 27536—2011	猪流感病毒分离与鉴定方法	197
GB/T 27537—2011	动物流感检测 A 型流感病毒分型基因芯片检测操作规程	205
GB/T 27538—2011	动物流感检测 A 型 H1N1 流感病毒中 HA、NA 的焦磷酸测序检测方法	219
GB/T 27539—2011	动物流感检测 A 型流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法	231
GB/T 27540—2011	猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法	241
GB/T 27541—2011	货运缆车技术规范	249
GB/T 27542—2011	蓄电池托盘搬运车	263
GB/T 27543—2011	手推升降平台搬运车	277
GB/T 27544—2011	工业车辆 电气要求	289
GB/T 27545—2011	水平循环类机械式停车设备	307
GB/T 27546—2011	起重机械 滑轮	321
GB/T 27547—2011	升降工作平台 导架爬升式工作平台	333
GB/T 27548—2011	移动式升降工作平台 安全规则、检查、维护和操作	393
GB/T 27549—2011	移动式升降工作平台 操作人员培训	413
GB 27550—2011	气瓶充装站安全技术条件	427
GB/T 27551—2011	金属材料焊缝破坏性试验 断裂试验	435
GB/T 27552—2011	金属材料焊缝破坏性试验 焊接接头显微硬度试验	449



中华人民共和国国家标准

GB/T 27527—2011



2011-11-21 发布

2012-03-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:内蒙古农业大学、内蒙古动物疫病预防控制中心、中国动物疫病预防控制中心、北京世纪元亨动物防疫技术有限公司、扬州大学、青岛易邦生物工程有限公司。

本标准主要起草人:赵振华、赵心力、陈西钊、孙明、王金玲、秦爱建、范根成、李瑞刚、乌日罕。

禽脑脊髓炎诊断技术

1 范围

本标准规定了禽脑脊髓炎诊断技术,包括流行病学、临床症状、组织病理学变化、病毒分离、琼脂免疫扩散试验、中和试验和间接免疫荧光试验。

本标准适用于禽脑脊髓炎的诊断、检疫和流行病学调查。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AE(V):禽脑脊髓炎(病毒)[avian encephalomyelitis(virus)]

AEV-VR:禽脑脊髓炎病毒 Van Roekel 株(AEV 标准株)(avian encephalomyelitis virus-Van Roekel)

EID₅₀:鸡胚半数感染量(egg infectious dose)

FITC:异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate)

H. E. 染色:苏木素-伊红染色(hematoxylin-eosin staining)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline)

3 流行病学

除鸡易感 AEV 外,雉鸡、鹌鹑、火鸡和山鸡也可自然感染。无本病史和未经免疫的鸡群一旦感染,雏鸡发病率通常为 40%~60%、死亡率为 10%~80%或更高。不同日龄的鸡一年四季均可感染。随日龄的增长,鸡对 AEV 的抵抗力不断增强。感染鸡的种蛋可以引起后代鸡胚和雏鸡发病(垂直传播);同时,病鸡的分泌物和排泄物可污染环境、饲料和饮水,引起与其接触的易感鸡发病(水平传播)。自然情况下 4 周龄以内的雏鸡(幼禽)对 AEV 最易感;实验室情况下,1 日龄雏鸡脑内接种 AEV 强毒 5 d~7 d 后可发病;经胚胎感染的雏鸡出壳后潜伏期 1 d~7 d,口服感染或自然接触一般 9 d~11 d 后发病。

4 临床症状

自然感染和人工感染雏鸡的临床症状基本一致,初期精神沉郁、嗜睡、易惊、斜视、呈半蹲姿势、头颈偏向一侧、饮水困难,双腿紧缩、叉开或爪蜷缩,以后可出现站立不稳、进行性运动失调、头颈快速震颤等症状,甚者常因瘫痪、衰竭而死亡。成年鸡感染后一般不出现明显症状,有时仅见轻微腹泻,产蛋率下降 10%~40%和种蛋孵化率降低。

5 组织病理学变化

5.1 材料准备

5.1.1 器材

石蜡切片机、染色缸、载玻片、盖玻片、水浴锅、温箱、显微镜等。

5.1.2 试剂

10%中性福尔马林溶液、酒精、二甲苯、切片石蜡、H. E. 染色液、中性树胶等。

5.1.3 样品

临床可疑 AE 病例的大脑、中脑、小脑、延脑和腰荐部脊髓样品。

5.2 操作方法

分别切取小块($0.5\text{ cm}^3\sim 1\text{ cm}^3$)大脑、中脑、小脑、延脑和腰荐部脊髓样品置 10%中性福尔马林溶液中固定 24 h~48 h。常规制片、H. E. 染色、中性树胶封片、光镜观察。

5.3 病理变化

5.3.1 中枢神经系统典型的组织病理学变化为非化脓性脑脊髓炎,主要包括大脑、中脑、小脑、延脑和脊髓的变质性变化、血管反应和胶质细胞增生。

5.3.2 变质性变化表现为神经细胞变性和神经组织出现小软化灶。变性的神经细胞肿大、淡染或浓缩,有的呈现中央染色质溶解现象。变性严重的神经细胞和局部神经组织可发生坏死、液化,形成小软化灶。

5.3.3 血管反应表现为血管出现以淋巴细胞为主的围管性细胞浸润,浸润的细胞在血管周围散在或呈多层围绕,形成管套。

5.3.4 胶质细胞增生表现为增生的胶质细胞可出现在变性神经细胞周围形成卫星现象,或进入坏死的神经细胞中吞噬坏死物形成噬神经原现象。在软化灶处有数量不等的胶质细胞增生和聚集形成胶质小结。

5.4 结果判定

若 5.3.2~5.3.4 同时出现时则为非化脓性脑脊髓炎的典型病变,若主要出现 5.3.3,而 5.3.2 不明显时,可能与免疫反应有关,常见于免疫鸡群。

通过流行病学、临床症状和组织病理学变化可对 AE 做出初步诊断,在初步诊断的基础上,进行病毒分离(见第 6 章)。

6 病毒分离

6.1 材料准备

6.1.1 器材

无菌剪刀、镊子、平皿、烧杯、玻璃瓶、组织研磨器、注射器、孵化器、离心机、高压灭菌器、冰柜、生物安全柜等。

6.1.2 试剂

生理盐水、青霉素、链霉素。

6.1.3 材料

SPF 种蛋、SPF 雏鸡。

6.1.4 病料

(可疑)AE 病雏脑组织(以发病早期为好)。

6.2 操作方法

6.2.1 病料的采集与保存

无菌取病雏鸡脑组织后应立即处理(见 6.2.2),若暂时不能处理,可于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜中保存。

6.2.2 病料处理

将病料无菌称量、研磨,反复冻融 3 次,用无菌生理盐水溶液作 1:5 稀释制成悬液,并加双抗(双抗终浓度为 1 000 IU/mL 青霉素,100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)。样品经 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为自然病雏脑组织病毒液,冻存、备用。

6.2.3 雏鸡接种

取 6.2.2 处理好的病毒液,以 0.05 mL/羽脑内接种 1 日龄 SPF 雏鸡,待出现 AE 症状后采血致死,同上述方法取脑研磨、制备,获得接种病雏脑组织病毒液,冻存、备用。

6.2.4 鸡胚接种

取 6.2.3 病毒样本,以 0.2 mL/胚,经卵黄囊无菌接种 6 日龄 SPF 鸡胚,每份样本至少接种 5 枚胚,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵化箱内孵育至 16 日龄收毒、观察鸡胚病变(同时设未接种病料的健康对照组)。收毒时,首先无菌吸取胚液(尿囊液和羊水),然后观察胚体发育情况;检查胚体、胚脑病变;取胚脑、胃、肠、胰腺称量、研磨、以胚液作 1:5 稀释,同 6.2.2 加入双抗、离心,制成鸡胚组织病毒液,即为 AE 自然发病雏鸡第 1 代胚病毒液(AEV E₁)。取 AEV E₁ 按照本条上述方法再接种 6 日龄 SPF 鸡胚卵黄囊、孵化、收毒、检查鸡胚病变、制备第 2 代胚病毒液(AEV E₂)。这样连续传代直至传代鸡胚出现病变时,该代鸡胚病毒液即可作为病毒鉴定用的 AE 分离毒病毒液。同时可进行病毒某些特性的检测。

与健康对照组鸡胚相比,发病鸡胚病变为:胚体活力减弱、发育不良和肌肉萎缩(胚体重减轻)、腿细爪曲或强直,脑萎缩,皮下、脑、胃肠水肿、出血等。病毒分离后,可通过琼脂免疫扩散试验、中和试验和间接免疫荧光试验中的任一种方法进行病毒鉴定(见第 7 章)。

7 AE 的确诊和病毒鉴定

7.1 琼脂免疫扩散试验

7.1.1 器材准备

7.1.1.1 器材

冰箱、天平、90 mm 直径的平皿、微量加样器、塑料吸头和打孔器(内径 4.0 mm、孔间距 3.0 mm 的 7 孔梅花样金属打孔器)。

7.1.1.2 试剂

禽脑脊髓炎琼脂免疫扩散试验冻干抗原(1 mL/安瓶)、标准阳性血清和阴性血清、氯化钠、优质琼脂粉、pH7.2 0.01 mol/L PBS(或生理盐水)、蒸馏水和 1% 硫柳汞溶液(见附录 A)。

7.1.1.3 待检血清

无菌翅下静脉采血 1 mL 左右,分离血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

7.1.1.4 待检抗原

6.2.4 AE 分离毒抗原和其他待检抗原。

7.1.2 操作步骤

7.1.2.1 琼脂板制备

琼脂板的制备按如下步骤进行：

- a) 琼脂液配制：称取优质琼脂粉 1.0 g，加蒸馏水至 100 mL。加热溶化后，加入氯化钠 18 g，充分溶解后，加入 1% 硫柳汞溶液（终浓度为 0.01%），摇匀。
- b) 制板：将琼脂液冷却至 47℃～70℃，取洁净、干燥、直径为 90 mm 的灭菌平皿，放置于无菌工作台内，每个平皿加琼脂液 18 mL，厚度约为 3.0 mm。凝固后盖严，把平皿倒置放入 4℃ 冰箱中保存备用（保存期 2 周）。

7.1.2.2 打孔

从冰箱内取出琼脂板，用 7 孔一组的梅花形打孔器打孔（中间 1 孔，外周 6 孔，见图 1），孔径 4.0 mm，孔距 3.0 mm。将孔中的琼脂轻轻挑出或吸出，勿伤及孔边缘或使琼脂层脱离平皿底。

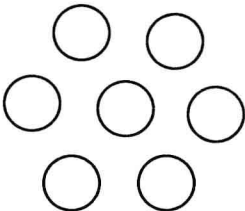


图 1 平皿中梅花形 7 孔一组排列示意图

7.1.2.3 封底

在酒精灯火焰上通过 4 次～6 次加热平皿底面，使底部琼脂稍微融化即可。

7.1.2.4 抗原稀释

向 1 安瓶抗原内加入 PBS（或生理盐水）1 mL，待溶解呈均匀混悬液时即为可使用的 AE 琼扩抗原液。

7.1.2.5 加样

根据需求和具体条件，可分别应用血清样品或抗原样品按以下处理方式加样：

- a) 检验血清加样：结合图 2，用微量加样器吸取抗原液加入中央孔，标“+”的三孔加标准阳性血清，1、2、3 孔加被检血清，每孔均应加满，但不能溢出。每加一个被检样品应换一个吸头。

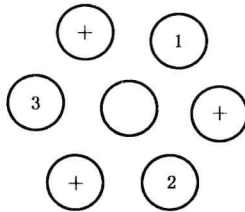


图 2 加样示意图

b) 检验抗原加样:结合图 2,用微量加样器吸取标准抗体溶液(AE 标准阳性血清)加入中央孔,标“+”的三孔加标准抗原液,1、2、3 孔加待检抗原液,每孔均应加满,但不能溢出。每加一个被检样品应换一个吸头。

7.1.2.6 反应

加样完毕,室温静置 10 min,放入 22℃~26℃保湿盒内反应,分别在 24 h、48 h 和 72 h 观察并记录结果。

7.1.3 结果判定

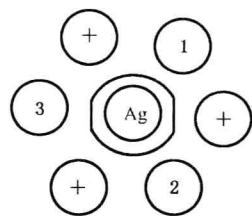
7.1.3.1 检验血清结果判定

7.1.3.1.1 判定前提

将琼脂板置日光灯或侧强光下观察,在抗原与标准阳性血清孔之间出现一条清晰、致密的沉淀线,抗原与阴性血清孔之间不出现沉淀线,说明对照成立,可进行结果判定。

7.1.3.1.2 阳性

标准抗原孔与被检血清孔之间形成的沉淀线与阳性对照血清形成的沉淀线弯曲环联,判为阳性(见图 3)。

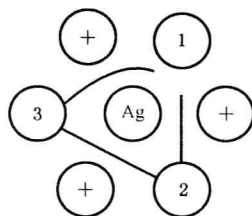


注: 标“+”孔为标准阳性血清,1、2、3 孔被检血清呈阳性。

图 3 被检血清呈阳性示意图

7.1.3.1.3 可疑

若标准抗原与被检血清孔间不出现沉淀线,而抗原与标准阳性血清孔间的沉淀线在被检血清孔位置微向内侧弯曲者(见图 4 中的 1 号孔),则被检血清判为可疑反应。对该份血清复检,仍为可疑则判为阳性反应。

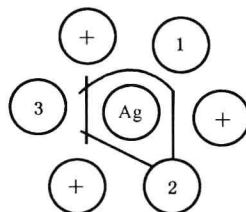


注: 标“+”孔为标准阳性血清,1 孔被检血清可疑,2、3 孔被检血清阴性。

图 4 被检血清呈可疑示意图

7.1.3.1.4 非特异性反应

若标准抗原孔和被检血清孔间的沉淀线粗且浑浊或与抗原孔和标准阳性血清孔之间的沉淀线交叉并直伸待检血清边缘者,则判为非特异性反应,应重做。若仍出现非特异性反应则判为阴性(如图 5 所示第 3 孔)。

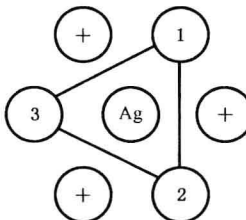


注: 标“+”孔为标准阳性血清,1、2、3 孔被检血清分别为阳性、阴性和非特异性反应。

图 5 被检血清呈非特异性反应示意图

7.1.3.1.5 阴性

标准抗原孔与被检血清孔之间无沉淀线,抗原孔与标准阳性血清孔间沉淀线直伸延到被检血清孔边缘无弯曲者,则判为阴性(见图 6)。



注: 标“+”孔为标准阳性血清,1、2、3 孔被检血清为阴性血清。

图 6 被检血清呈阴性示意图

7.1.3.2 检验抗原结果判定

7.1.3.2.1 判定前提

将琼脂板置日光灯或侧强光下观察,在标准抗原与标准阳性血清孔之间出现一条清晰、致密的沉淀线,标准阳性血清孔与阴性抗原孔之间不出现沉淀线,说明对照成立,可进行结果判定。

7.1.3.2.2 阳性、可疑、非特异性反应和阴性

结果的判定原理和方法同 7.1.3.1。

7.2 中和试验

7.2.1 材料准备

7.2.1.1 仪器

孵化器等。

7.2.1.2 材料

SPF 鸡胚、AE 标准阳性血清、AE 阴性血清、PBS(见附录 A)。

7.2.1.3 病毒样品

6.2.4 收获的待检 AE 分离毒病毒液。

7.2.2 操作方法

7.2.2.1 病毒滴度(EID₅₀)测定

将待检病毒液作 10 倍系列稀释至 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ ，分装到两列无菌试管中，第一列 8 管各加入等量 AE 阴性血清(对照组)，第二列 8 管各加入等量 AE 标准阳性血清(试验组)，混匀后置 37 °C 1 h，然后每管分别卵黄囊接种 6 日龄 SPF 鸡胚各 5 枚(0.2 mL/胚)，继续孵化至 16 日龄，剖检、记录各组病变鸡胚数(感染发病胚病变判定标准见 6.2.4)，分别计算两组的 EID₅₀。

7.2.2.2 中和指数计算

待检病毒液的中和指数按式(1)计算：

$$X = W/Y \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 中和指数；

W —— 试验组 EID₅₀；

Y —— 对照组 EID₅₀。

7.2.3 结果判定

中和指数小于 10 判为阴性，10~50 为可疑，大于 50 判为阳性。

7.3 间接免疫荧光试验

7.3.1 材料准备

7.3.1.1 器材

荧光显微镜和冰冻切片机。

7.3.1.2 试剂

FITC 标记兔抗鸡 IgG 抗体、标准阳性血清、阴性血清(SPF 鸡血清)、无水乙醇和丙酮。

7.3.1.3 组织样品

AE 雏鸡脑组织样品、健康对照雏鸡(阴性)脑组织样品和待检脑组织样品。

7.3.2 操作方法

7.3.2.1 冰冻组织切片制备

取 AE 脑组织样品、阴性脑组织样品和待检禽脑组织样品或十二指肠样品，分别覆以冷冻固定剂，-70 °C 固定过夜。次日，取出，经冰冻切片机切片，将组织切片置载玻片上，用 -20 °C 预冷的丙酮乙醇(3 : 2)固定液室温固定 5 min~10 min。

7.3.2.2 间接免疫荧光检测

将固定好的组织切片,PBS洗3次,加上标准阳性血清,SPF鸡血清各100 μL /块组织,于37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min后用PBS洗涤3次,加入FITC标记兔抗鸡IgG抗体,置37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min,经PBS洗涤3次后在荧光显微镜下观察。

7.3.3 结果判定

7.3.3.1 判定前提

AE脑组织切片与阳性血清作用,出现明亮绿色荧光,而AE脑组织切片与阴性血清作用以及阴性脑组织切片与阳性血清作用均无亮绿色荧光,则对照成立,结果可以判定。

7.3.3.2 判定标准

被检组织的细胞浆中出现亮绿色荧光者,判为阳性,否则判为阴性。

附 录 A
(规范性附录)

琼脂免疫扩散试验用溶液的配制

A.1 pH7.2 0.01mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS)的配制

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)	0.3 g
氯化钠(NaCl)	8.0 g
加蒸馏水至	1 000 mL

用氢氧化钠(NaOH)或盐酸(HCl)调 pH 至 7.2,灭菌或过滤。

注: PBS 一经使用,于 4 ℃ 保存不超过 3 周。

A.2 1%硫柳汞溶液的配制

硫柳汞	1.0 g
加蒸馏水至	100 mL

溶解、过滤后,置 100 mL 瓶中盖塞,4 ℃ 存放备用。
