

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 540—2002

鸡病毒性关节炎琼脂凝胶免疫 扩散试验方法

Agar gel immunodiffusion test for viral arthritis

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

为了更好地适应我国动物卫生工作发展的需求,为基层兽医、科研单位、口岸检疫部门、无特定病原(SPF)鸡场和大、中型鸡场提供一种可操作性强的标准,特制定鸡病毒性关节炎琼脂凝胶免疫扩散试验技术标准。

本标准是根据实验室多年来在鸡病毒性关节炎琼脂凝胶免疫扩散试验方法研究和应用的基础上制定的。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:农业部动物检疫所。

本标准主要起草人:吴晓东、吴延功、朱万光、杜元钊、范根成、刘佩兰。

鸡病毒性关节炎琼脂凝胶免疫扩散试验方法

1 范围

本标准规定了检测鸡血清中鸡病毒性关节炎群特异性抗体的琼脂凝胶免疫扩散方法。

本标准适用于未免疫鸡群鸡病毒性关节炎的血清学诊断及用鸡病毒性关节炎疫苗免疫后的抗体检测。

2 琼脂凝胶免疫扩散试验

2.1 材料准备

2.1.1 器材:烧杯,直径 85 mm 培养皿,孔径 3 mm 打孔器,6 号~9 号针头,微量移液器及针头。

2.1.2 抗原:按说明书使用。

2.1.3 标准阳性血清:按说明书使用。

2.1.4 被检血清:从鸡翅膀静脉或心脏无菌采血,分离血清,4℃或-20℃保存备用。

2.1.5 琼脂板:制作方法见附录 A。

2.2 操作方法

2.2.1 琼脂板打孔

用打孔器在琼脂板上如图 1 所示打梅花型孔,大批检疫时,亦可按图 2 所示打孔,孔径 3 mm,孔距 3 mm,打孔后挑出孔内琼脂块。然后放在酒精灯火焰上方加热封底。

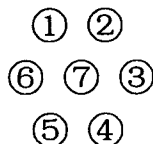


图 1 琼脂板打孔示意图

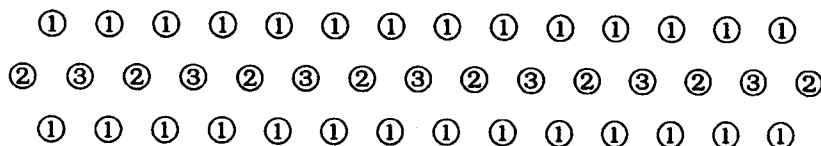


图 2 琼脂板打孔示意图

2.2.2 加样

用微量移液器加样。

2.2.2.1 在图 1 中加样方法如下:

- a) 7 号孔加抗原;
- b) 1、3、5 号孔加被检血清;
- c) 2、4、6 号孔加标准阳性血清。

每孔均以加满不溢为度。

2.2.2.2 在图 2 中加样方法如下:

- a) 1号孔加被检血清；
- b) 2号孔加标准阳性血清；
- c) 3号孔加抗原。

每孔均以加满不溢为度。

2.2.3 反应

加样完毕,将琼脂板放入湿盒内,置于37℃温箱内反应。分别在12 h、24 h、48 h观察并记录结果。

2.3 结果判定

将琼脂板置暗背景或强光照射下观察。标准阳性血清孔与抗原孔之间出现一条清晰的沉淀线,则试验成立;如没有沉淀线或沉淀线不明显,则试验不成立,应重作。

2.3.1 被检样品孔与抗原孔之间出现清晰的沉淀线,并与抗原和标准阳性血清孔的沉淀线末端相互融合者,判为阳性。

2.3.2 被检血清孔与抗原孔之间不形成完整的沉淀线,但抗原与阳性血清间的沉淀线在被检血清孔处向抗原孔弯曲,则为弱阳性。弱阳性者应重复试验,仍为弱阳性者,判为阳性。

2.3.3 被检血清与抗原孔之间无沉淀线,标准阳性血清与抗原之间的沉淀线直延伸到被检血清孔边缘且无弯曲者,判为阴性。

2.3.4 被检血清与抗原孔之间出现粗且浑浊的沉淀线,且与标准阳性血清的沉淀线不相吻合,则为非特异反应。应重新试验。若仍出现非特异性反应,则判为阴性。

2.3.5 有的被检血清与抗原之间可能出现两条以上沉淀线,如果其中有一条与标准阳性血清与抗原孔间的沉淀线相吻合者判为阳性;均不吻合者为阴性。

附 录 A
(规范性附录)
琼脂平板的制备

称取琼脂糖 1.0 g,加入 100 mL 8.5%的盐水中,再加入 1%的叠氮钠或硫柳汞 1 mL,调整 pH 至 7.4~7.5,68.94 kPa 灭菌 10 min,待冷却至 50℃时倒入平皿,琼脂厚度为 2.5 mm,凝固后置 4℃保存备用。
