

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 569—2002

马传染性贫血病琼脂凝胶免疫扩散 试验方法

Agar gel immunodiffusion test for equine infectious anemia

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

马传染性贫血病(equine infectious anemia,简称EIA)是马属动物以反复发作、贫血和持续病毒血症为特征的传染性疾病,被世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizooties(法),OIE]列为B类疫病,我国农业部列为二类动物疫病。

本病是由反转录病毒科、慢病毒属的马传贫病毒(ELAV)引起的,经吸血昆虫传播。

本标准规定的琼脂凝胶免疫扩散试验(AGID)诊断方法,是根据OIE《诊断试验和疫苗标准手册》(2000年版)和我国实际情况制定的,技术上一致。该法简便特异,在国际贸易中为指定的诊断方法。

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:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:相文华、沈荣显。

马传染性贫血病琼脂凝胶免疫扩散 试验方法

1 范围

本标准规定了马传染性贫血病的琼脂凝胶免疫扩散技术要求。

本标准适用于马传染性贫血病的诊断和检疫。

2 琼脂凝胶免疫扩散试验

2.1 材料准备

2.1.1 抗原:检测用抗原按说明书使用。

2.1.2 血清:

a) 检验用标准阳性血清:能与合格抗原在 12 h 内产生明显致密沉淀线的传贫马血清,做 8 倍以上的稀释仍保持阳性反应者为宜。小量分装,冻结保存。

b) 被检血清:不含防腐剂和抗凝剂的被检马血清。

2.1.3 pH 7.2 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS),配制方法见附录 A(规范性附录)。

2.2 操作方法

2.2.1 制备琼脂板

2.2.1.1 取优质琼脂 1.0 g,直接放入含有万分之一硫柳汞的 100 mL 的 PBS 中,用热水浴溶化混匀。

2.2.1.2 将直径 90 mm 的平皿放在水平台上,每平皿倒入热溶化琼脂液 15 mL ~18 mL,厚度约 2.5 mm 左右,注意不要产生气泡,冷凝后加盖,把平皿倒置,防止水分蒸发,放在普通冰箱中可保存两周左右。

根据受检血清样品多少亦可采用大、中、小三种不同规格的玻璃板。10 cm×16 cm 的玻璃板加注热琼脂液 40 mL;6 cm×7 cm 的加注 11 mL;3.2 cm×7.6 cm 的加注 6 mL。

配成的琼脂液,可装瓶中用胶塞盖好,以防水分蒸发,待使用时,现溶化现制板。

2.2.2 打孔

反应孔现用现打。在坐标纸上画好七孔型图案。把坐标纸放在带有琼脂板的平皿或玻璃板下面,照图案在固定位置上用金属管打孔,将切下的琼脂片取出,勿使琼脂膜与玻璃面离动。抗原孔及外周孔孔径均为 5 mm,孔间距 3 mm(见图 1)。

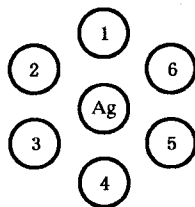


图 1 七孔型

2.2.3 滴加抗原和血清

在琼脂板上端写上日期及编号。在图 1 七孔型的中央孔加抗原,外周 2、4、6 孔加检验用标准阳性血

清,其余 1、3、5 孔分别加入被检血清。加至孔满为止,平皿加盖。待孔中液体吸干后,将平皿倒置,以防水分蒸发;琼脂板则放入湿盒中。置 15℃~30℃ 条件下进行反应,逐日观察 3 d 并记录结果。

2.3 结果判定

2.3.1 阳性

当检验用标准阳性血清孔与抗原孔之间只有一条明显致密的沉淀线时,受检血清孔与抗原孔之间形成一条沉淀线;或者阳性血清的沉淀线末端在毗邻的被检血清孔处向抗原孔侧偏弯者,此种受检血清判定为阳性。

2.3.2 阴性

被检血清与抗原孔之间不形成沉淀线,或者标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线向毗邻的受检血清孔直伸或向受检血清孔侧偏弯者,此种受检血清为阴性。

2.3.3 疑似

标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线末端,似乎向毗邻受检血清孔内侧偏弯,但不易判断时应重检,仍为可疑,判为阳性。

在观察结果时,最好从不同折光角度仔细观察平皿上抗原孔与受检血清孔之间有无沉淀线。为了观察方便,可在与平皿有适当距离的下方,置一黑色纸等,有助于观察。

附 录 A
(规范性附录)

pH7.4 的 0.01 mol/L PBS 溶液的配制

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钾	0.3 g
氯化钠	8.0 g
无离子水和蒸馏水加至	1 000 mL
