

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 681—2003

鸡传染性贫血诊断技术

Diagnostic techniques for chicken infectious anemia

2003-07-30 发布

2003-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

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并归口。

本标准起草单位：农业部兽医诊断中心。

本标准主要起草人：王宏伟、吴清民、田克恭、陈西钊、苏敬良、王传彬。

鸡传染性贫血诊断技术

1 范围

本标准规定了鸡传染性贫血(CIA)的临床诊断、CIA病毒的分离与鉴定、酶联免疫吸附试验和免疫酶试验等诊断技术。

本标准适用于CIA的诊断。

2 临床诊断

2.1 临床症状

2.1.1 CIA的主要临床特征是贫血。病鸡表现精神萎靡、虚弱、聚堆及行动迟缓,羽毛粗乱,喙、肉髯、面部和可视黏膜苍白,羽部有出血病灶,生长不良,排白稀粪。

2.1.2 产蛋种鸡感染无临床症状,产蛋率、受精率和孵化率均不受影响,但可通过种蛋传播病毒。

2.1.3 当有马立克氏病、传染性法氏囊病等免疫抑制性疾病发生时,雏鸡对鸡传染性贫血病毒(CIAV)的易感性增高,发病早且严重。

2.2 病理变化

2.2.1 病鸡表现再生障碍性贫血,消瘦,骨髓发白,肌肉及内脏器官苍白,肝脏、肾脏肿大并褪色,血液稀薄,凝血时间延长。

2.2.2 病鸡表现全身性淋巴组织萎缩,胸腺、法氏囊、脾脏和盲肠、扁桃体以及其他组织内淋巴细胞严重缺失。

3 病毒分离与鉴定

3.1 材料准备

3.1.1 试剂

- a) 改良最低要素营养液(DMEM)培养基,配方见第A.1章;
- b) 马立克氏病病毒转化的淋巴细胞系 MDCC-MSB1 细胞;
- c) 标准阳性血清:用 CIAV 抗原免疫 SPF 鸡获得的血清;
- d) 标准阴性血清:无 CIAV 感染的 SPF 鸡血清;
- e) 新生牛血清、青霉素、链霉素。

3.1.2 器材

- a) 细胞培养瓶;
- b) 吸管;
- c) 二氧化碳培养箱;
- d) 37℃ 恒温水浴箱;
- e) 普通冰箱及低温冰箱;
- f) 离心机及离心管;
- g) 研磨器械;
- h) 普通光学显微镜;
- i) 微量加样器,容量 5 μL ~50 μL , 50 μL ~200 μL ;
- j) 0.45 μm 微孔滤膜。

3.1.3 样品

CIAV 存在于病鸡肝脏、皮肤、脾脏、心脏、胸腺、肺脏、法氏囊、肾脏、骨髓等组织器官中。无菌采集这些器官,用无血清 DMEM 制成 20% 组织悬液,以 3 000 r/min 离心 30 min。取上清 70℃ 下处理 5 min 后加等量 10% 三氯甲烷室温处理 15 min,以 10 000 r/min 离心 20 min,取上清用于 CIAV 分离。

3.2 操作方法

3.2.1 细胞培养

用含 15% 新生牛血清的 DMEM 培养基在 39℃ 和 5% 二氧化碳环境下培养 MDCC-MSB1 细胞。每 2 d~3 d 传代一次,细胞长至 2×10^5 个/mL~ 5×10^5 个/mL 时,用于 CIAV 分离。

3.2.2 病料接种

将 0.1 mL 处理好的组织悬液接种 MDCC-MSB1 细胞,在 39℃ 和 5% 二氧化碳环境下培养 48 h,观察结果。

3.2.3 结果观察

CIAV 感染细胞表现为细胞体积增大,随之溶解。若第一次接种未出现细胞病变,应将细胞培养物冻融后盲传三代。如仍无细胞病变,则判为 CIAV 检测阴性。

3.2.4 CIAV 的鉴定

将出现细胞病变的细胞培养物,按第 5 章的方法制备细胞涂片,用 CIAV 标准阳性血清进行鉴定。

4 酶联免疫吸附试验

4.1 材料准备

4.1.1 试剂

- a) ELISA 抗原: CIAV 抗原包被酶标板;
- b) 阳性血清: 用 CIAV 抗原免疫 SPF 鸡获得的血清;
- c) 阴性血清: 无 CIAV 感染的 SPF 鸡血清;
- d) 酶结合物: 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗 CIAV 单克隆抗体;
- e) 磷酸盐缓冲液(PBS): 配制见第 A.2 章;
- f) 洗涤液: 配制见第 A.3 章;
- g) 样品稀释液: 配制见第 A.4 章;
- h) 底物溶液: 配制见第 A.6 章;
- i) 终止液: 配制见第 A.7 章。

4.1.2 器材

- a) 酶联检测仪;
- b) 微量加样器,容量 50 μ L~200 μ L;
- c) 37℃ 恒温培养箱。

4.1.3 样品

采集被检鸡血液,分离血清,血清应新鲜、透明、不溶血、无污染,密装于灭菌小瓶内,4℃ 或 -30℃ 保存或立即送检。试验前将被检血清统一编号,并用样品稀释液作 10 倍稀释。

4.2 操作方法

4.2.1 取出包被板,并将样品位置准确记录在记录单上。

4.2.2 向 A₁、A₂ 孔中分别加入 100 μ L 未经稀释的阴性对照血清,A₃、A₄ 孔中分别加入 100 μ L 未经稀释的阳性对照血清,其他各孔加入 100 μ L 稀释好的待检样品,每一样品加两孔。

4.2.3 置室温 1 h。

4.2.4 用洗涤液将反应板洗涤(3~5)次。

4.2.5 每孔加入 100 μ L 酶结合物。

4.2.6 置室温 30 min。

4.2.7 重复 4.2.4。

4.2.8 各孔加入 100 μL 底物液。

4.2.9 室温放置 15 min。

4.2.10 各孔加入 100 μL 终止液,立即用酶标仪于波长 650 nm 测定各孔 OD 值。

4.3 结果判定

4.3.1 标准阴性血清 OD 值大于等于 0.6,标准阳性血清 OD 值 \div 标准阴性血清 OD 值小于等于 0.50,试验成立。

4.3.2 计算待检血清 S/N 值:S/N 等于待检血清 OD 值 \div 阴性血清 OD 值。

4.3.3 S/N 小于等于 0.6 为 CIAV 抗体阳性,S/N 大于 0.6 为 CIAV 抗体阴性。

5 免疫酶试验

5.1 材料准备

5.1.1 试剂

5.1.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见第 A.2 章。

5.1.1.2 抗原涂片的制备:MDCC-MSB1 细胞用含 15%胎牛血清 DMEM 培养基培养,细胞长至 5×10^5 个/mL,接种 CIAV,并换成含 5%新生牛血清的 DMEM 培养基,培养 36 h~48 h,病变达 50%~75%时,离心收集感染细胞,PBS 洗涤三次后,稀释至细胞为 1×10^6 个/mL。取印有 10 个~40 个小孔的室玻片,每孔滴加 10 μL 。室温自然干燥后,冷丙酮(4 $^{\circ}\text{C}$)固定 10 min。密封包装,置-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

5.1.1.3 标准阳性血清:用 CIAV 抗原免疫 SPF 鸡获得的血清。

5.1.1.4 标准阴性血清:无 CIAV 感染的 SPF 鸡血清。

5.1.1.5 酶结合物:HRP 标记抗 CIAV 单克隆抗体。

5.1.1.6 底物溶液:配制见第 A.8 章。

5.1.2 器材

- a) 普通光学显微镜;
- b) 印有 10 个~40 个小孔的室玻片;
- c) 微量加样器,容量 5 μL ~50 μL ;
- d) 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱或水浴箱。

5.1.3 样品

采集被检鸡血液,分离血清,血清应新鲜、透明、不溶血、无污染,密装于灭菌小瓶内,4 $^{\circ}\text{C}$ 或-30 $^{\circ}\text{C}$ 保存或立即送检。试验前将被检血清统一编号,并用 PBS 作 10 倍稀释。

5.2 操作方法

5.2.1 取出抗原涂片,室温干燥后,滴加 10 倍稀释的待检血清和标准阴性血清、标准阳性血清,每份血清加两个病毒细胞孔和一个正常细胞孔,置湿盒内,37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。

5.2.2 PBS 漂洗三次,每次 5 min,室温干燥。

5.2.3 滴加适当稀释的酶结合物,置湿盒内,37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。

5.2.4 PBS 漂洗三次,每次 5 min。

5.2.5 将室玻片放入底物溶液中,室温下显色 5 min~10 min。PBS 漂洗两次,再用蒸馏水漂洗一次。

5.2.6 吹干后,在普通光学显微镜下观察,判定结果。

5.3 结果判定

5.3.1 在阴性血清对照、阳性血清对照成立的情况下:即阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均无色;阳性血清与正常细胞反应无色,与病毒感染细胞反应呈棕黄色至棕褐色,即可判定结果;否则应重试。

5.3.2 待检血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均呈无色,即可判为 CIAV 抗体阴性。

f) 国家质量监督机构或主管部站提出型式检验要求时。

6.1.2 出厂检验

每组批产品出厂前应由生产厂的技术检验部门按本标准对感官、水分、微生物、净含量及负偏差等项目进行检验,检验合格,签发合格证,方可出厂。

6.2 组批

以同一原料品种、同一班次生产的同一规格产品为一组批次。

6.3 抽样

在每一批号产品中随机抽取 10 次共 2 kg 作样品,混匀后用四分法平均分成两份,一份用于感官、理化指标和卫生指标的检验,另一份样品留备用。

净含量的抽样按 JJF 1070 执行。

6.4 判定

检验结果中卫生指标有一项达不到本标准的要求,且经过复检后仍达不到要求时,则判定被检批为不合格产品;所有指标都达到本标准的要求时判定该批产品为合格产品。

6.5 复验

对检验结果有争议时,可在同批产品中加倍抽样进行复验一次,复验结果为最终结果。

7 标签、标识、包装、运输和贮存

7.1 标签

按 GB 7718 执行。

7.2 标识

按 GB 191 执行。

7.3 包装、运输、贮存

包装材料必须符合国家食品卫生要求。

运输工具应清洁、干燥,具有防雨、防晒、防尘设施,严禁与有毒、有害、有异味的物品混运。

产品贮藏库应通风良好,干燥清洁,堆放时要离开地面 10 cm 以上,距墙壁 20 cm 以上,要注意防鼠、防潮。

8 保质期

在本标准规定贮存条件下榨汁食品椰干保质期不低于 8 个月,不榨汁食品椰干保质期不低于 6 个月。

5.3.3 待检血清与正常细胞反应呈无色,而与病毒感染细胞反应呈棕黄色至棕褐色,即可判为 CIAV 抗体阳性。

6 综合判定

当在临床上怀疑有 CIAV 感染时,可根据实际情况在上述方法中选一种或两种方法进行确诊。对于未接种过 CIA 疫苗的鸡,采用任何一种方法检测呈现阳性结果时,都可最终判定为 CIAV 感染鸡。对于接种过 CIA 疫苗的鸡,当病毒分离鉴定试验为阳性结果时,可最终判定为 CIAV 感染鸡;若仅血清学试验呈现阳性结果,应结合病史和疫苗接种史进行综合判定,不可一律视为 CIAV 感染鸡。

附录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 DMEM(高糖)培养液

A.1.1 量取去离子水 950 mL,置于适宜的容器中。

A.1.2 将 DMEM 粉剂 10 g 加于 30℃ 的去离子水中,边加边搅拌。

A.1.3 每 1 000 mL 培养液加 3.7 g 碳酸氢钠。

A.1.4 加去离子水至 1 000 mL,用 1 mol/L 氢氧化钠或盐酸将培养液 pH 值调至 pH6.9~7.0。在过滤之前应盖紧容器瓶塞。

A.1.5 立即用孔径 0.45 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌,4℃ 冰箱保存备用。

A.2 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L pH7.4)

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
磷酸二氢钾	0.2 g
十二水磷酸氢二钠	2.83 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

A.3 洗涤液

PBS	1 000 mL
吐温-20	0.5 mL

A.4 样品稀释液

含体积分数为 10% 新生牛血清的洗涤液。

A.5 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH5.0)

柠檬酸	3.26 g
十二水磷酸氢二钠	12.9 g
蒸馏水	700 mL

A.6 ELISA 底物溶液

用二甲基亚砜将 3'3'5'5'-四甲基联苯胺(TMB)配成 1% 质量浓度,4℃ 保存。使用时按下列配方配制底物溶液。

磷酸盐-柠檬酸缓冲液	9.9 mL
1%3'3'5'5'-四甲基联苯胺	0.1 mL
30% 双氧水	1 μL

A.7 终止液

氢氟酸	0.31 mL
蒸馏水	100 mL

A.8 免疫酶试验底物溶液

3,3-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)	40 mg
PBS	100 mL
丙酮	5 mL
30%过氧化氢	0.1 mL

滤纸过滤后使用,现用现配。
