

## 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 905—2004

---

### 鸡马立克氏病强毒感染诊断技术

Diagnostic technique for virulent marek's disease virus  
infection of chickens

2005-01-04 发布

2005-02-01 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准的附录 A 和附录 B 都是规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

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：安徽技术师范学院。

本标准主要起草人：张训海、朱鸿飞、吴延功、张忠诚、陈溥言。

## 鸡马立克氏病强毒感染诊断技术

### 1 范围

本标准规定了马立克氏病病毒(Marek's disease virus, MDV)琼扩抗原和 MDV 琼扩抗体同时检测进行鸡 MDV 强毒感染诊断的两种操作方法。

本标准适用于鸡马立克氏病(Marek's disease, MD)临诊鉴别诊断、MD 流行病学调查、MDV 强毒感染的诊断、鸡群 MDV 强毒污染监测、产地和口岸检疫。

### 2 MD 琼脂免疫扩散试验检测技术与方法

该技术与方法适用于 14 日龄以上鸡的羽毛囊(含髓羽毛根或羽液)MDV 抗原和 30 日龄以上鸡的血清或羽髓液中 MDV 特异抗体的检测。

#### 2.1 材料准备

2.1.1 器材:1 mL 注射器及 9 号针头;1.5 mL 离心管;微量移液器及移液器吸头;尖头眼科镊和手术剪;孔径 3 mm 的打孔器。

2.1.2 MDV 特异琼扩阳性抗原和琼扩阳性抗体:按说明书保存与使用。

2.1.3 琼脂凝胶平板的制备:见附录 B。

#### 2.2 操作方法

##### 2.2.1 羽液 MDV 抗原和抗体的同时检测法

###### 2.2.1.1 羽液样品的制备

从被检鸡股胫外侧、胸部和背颈交界处羽区及翅羽,采集较粗大的富含羽髓的羽毛根 3 根~10 根。挤压出羽髓于 1.5 mL 离心管中,离心分离出羽液,作为试样直接检测或置于 -20℃ 下待检。

###### 2.2.1.2 打孔

将已制备的琼脂凝胶平板放在预先画好的如图 1 所示的 7 孔梅花型图案上,用打孔器垂直打孔,相邻孔孔边距均为 3 mm。用 9 号针头小心剔除孔内凝胶,勿损坏孔的边缘,避免凝胶层脱离平板底部。视琼脂凝胶平板面积可同时做多个梅花型孔。

###### 2.2.1.3 封底

用酒精灯火焰烧烤该处平板底至约 70℃(可以用手腕皮肤感受至不能承受为止),以防样品溶液从孔底侧漏。

###### 2.2.1.4 加样

用微量移液器分别在外周中的 2 号、3 号、5 号、6 号孔,分别加注 4 份被检样品;向 1 号、4 号孔加注 MDV 特异琼扩阳性抗体/抗原。向中心孔内加注与 1 号、4 号孔相对应的 MDV 特异琼扩阳性抗原/抗体。以上孔均以加满不溢出为度。每加一个样品,应更换一个吸头。

###### 2.2.1.5 感作

将加样完毕的琼脂板加盖后,随即进行标识与记录,而后将琼脂板轻轻倒置平放在湿盒内,置于 37℃ 温箱中感作,24 h 内观察并记录结果。

##### 2.2.2 羽毛根及血清 MDV 抗原和血清 MDV 抗体的同时检测法

###### 2.2.2.1 样品的制备

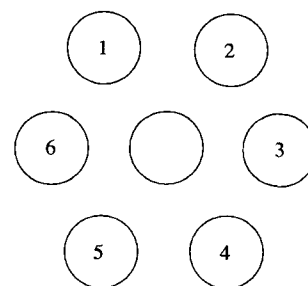


图 1 7 孔梅花型图案

被检鸡的羽毛根样品和血清样品应同步采集。

2.2.2.1.1 羽毛根样品:从被检鸡股胫外侧、胸部和背颈交界处羽区或翅羽拔取较细小的富含羽髓的羽毛根,剪下 0.5 mm 长的羽毛根尖,每个试样 2 根~3 根即可,直接用于 MDV 抗原的检测或置于 -20℃ 下待检。

2.2.2.1.2 血清样品:从被检鸡翅静脉/心脏抽取不少于 0.2 mL 血液,注入 1.5 mL 离心管,待血液凝结后使之自然析出或离心分离出血清,直接用于检测或置于 -20℃ 下待检。

#### 2.2.2.2 羽毛根 MDV 抗原检测

将已制备的琼脂凝胶平板放在预先画好的 7 孔梅花型图案上,用打孔器垂直打出中心孔。在中心孔周围 6 个孔的中心,用尖头眼科镊的摄尖或牙签分别垂直插 2 个~3 个紧密的孔眼。每号孔依次插入同一被检鸡 2 个~3 个羽毛根样品。如此,每个中心孔周围可检测 6 份样。酒精灯火焰封底后,冷却至室温。向中心孔内加注 MDV 特异琼扩阳性抗体,以加满不溢出为度。加盖与标记后,将平板倒置平放在湿盒内,置于 37℃ 温箱中感作,24 h 内观察并记录结果。

#### 2.2.2.3 血清 MDV 抗体的检测

操作方法同 2.2.1,其区别是在加样时,2 号、3 号、5 号、6 号外周孔中依此加注 4 份被检血清,1 号、4 号孔加注 MDV 特异琼扩阳性抗体,向中心孔加注 MDV 特异琼扩阳性抗原。

### 2.3 结果判定及判定标准

被检样品 MDV 抗原和 MDV 抗体的检测,任何一种出现阳性结果或 2 种都出现阳性结果,则判被检样品鸡为 MDV 强毒感染阳性;都呈阴性者,则判为被检样品鸡无 MDV 强毒感染。

2.3.1 被检样品孔或羽毛根与相邻的已知阳性抗体孔或阳性抗原孔之间形成一条清晰的沉淀线,并与已知阳性抗原孔和阳性抗体孔的沉淀线末端相互融合者,则判被检样品为阳性。

2.3.2 被检样品孔或羽毛根与相邻的已知阳性抗原孔或阳性抗体孔之间都不出现沉淀线,而未知阳性抗原孔和阳性抗体孔之间有明显的沉淀线,则判被检样品为阴性。

2.3.3 介于阴性、阳性之间者判为可疑,应重新采样复检。若仍为可疑,则判为阳性。

附录 A  
(规范性附录)  
溶液的配制

A.1 pH 7.0~7.4 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液的配制

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 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.3 g
氯化钠 ( $\text{NaCl}$ )	8.0 g

将上述试剂依次加入容器,用去离子水或蒸馏水溶解后定容至 1 000 mL。

A.2 2%叠氮钠溶液的配制

叠氮钠 ( $\text{NaN}_3$ )	2.0 g
蒸馏水	100 mL

溶解后置 100 mL 瓶中盖塞存放备用。

**附 录 B**  
**(规范性附录)**  
**琼脂凝胶平板的制备**

量取 pH 7.0~7.4 的 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(附录 A 中 A.1)100 mL,加入氯化钠 8.0 g、琼脂糖或优质琼脂粉 1.0 g,配制成含 8% 氯化钠的 1% 琼脂糖或琼脂溶液,8 磅 10 min 高压或水浴加热使其充分融化,加入 2% 叠氮钠(附录 A 中 A.2)1.0 mL,混和均匀,冷却至 60℃~65℃时,倾注于洁净干燥灭菌的培养皿中,使平置后的液面高约 3 mm,加盖待室温下冷却凝固后,倒置放入湿盒(湿盒用含消毒液的纱布铺底),密封后置于 4℃ 条件下保存备用(时间可达 2 个月以上)。

---