

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 560—2002

小 鹅 瘟 诊 断 技 术

Diagnostic techniques for gosling plague

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

小鹅瘟又称鹅细小病毒(*goose parvovirus*)病,或又称德兹西氏病(*Derzsy's*病),是雏鹅的一种急性败血性传染病。我国和世界上所有养鹅的国家均有此病的流行发生。本病主要侵害三周龄以内雏鹅,多呈最急性和急性病病程而迅速致死。三周龄以上的雏鹅仅部分发病,并呈亚急性病程。本病一旦发生流行常引起大批雏鹅死亡,造成重大经济损失。

本病的病原称为小鹅瘟病毒,根据其病毒分类地位,又称鹅细小病毒。应用中和试验、琼脂扩散试验等方法证明全国各地分离的毒株具有相同的抗原关系,即仅有一个抗原型。与匈牙利的 *Derzsy's* 病毒株和番鸭细小病毒有密切抗原关系,而与哺乳动物和其他禽类的细小病毒没有抗原关系。据国内外有关报道,本病病毒分离常用鹅胚和番鸭胚。鹅胚和番鸭胚原代细胞感染病毒后,用伊红-苏木素染色,可见有 Cowdrey A 型核类包涵体和合胞体的形成。用电镜或特异的鹅细小病毒抗血清中和试验能确定感染细胞内病毒的存在。

本标准的附录 A、附录 B 均为规范性附录。

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:扬州大学畜牧兽医学院。

本标准主要起草人:王永坤、严维巍、朱国强、周继宏、庄国宏。

小 鹅 瘟 诊 断 技 术

1 范 围

本标准规定了小鹅瘟诊断技术要求。

本标准所规定的病毒分离方法适用于小鹅瘟病毒分离；琼脂扩散试验、中和试验和酶联免疫吸附(ELISA)试验等血清学诊断方法适用于病毒分离株的鉴定、鹅群检疫、流行病学调查和免疫鹅群抗体水平的检测。

2 病 毒 分 离 鉴 定

2.1 材 料 准 备

2.1.1 以无菌手术取患病雏鹅或死亡雏鹅的肝、胰、脾、肾、脑等内脏器官病料放置灭菌的玻璃瓶冻结保存,作为病毒分离材料。

2.1.2 先将病料组织剪碎、磨细,用灭菌生理盐水,或灭菌 pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)作(1:5)~(1:10)稀释,经 3 000 r/min 离心 30 min,取上清液加入抗生素,使每毫升组织液含有 2 000 IU 青霉素和 2 000 μ g 链霉素,于 37℃ 温箱作用 30 min,作为病毒分离材料。

2.1.3 将上述离心的上清液按 4:1 加入分析纯三氯甲烷充分混匀后放置 37℃ 温箱作用 60 min,或 4℃ 冰箱过液,经 3 000 r/min 离心 30 min,取上清液加入抗生素,使之每毫升含有 2 000 IU 青霉素和 2 000 μ g 链霉素,于 37℃ 温箱作用 30 min,作为病毒分离材料。

2.2 病 毒 分 离

2.2.1 鹅 胚 接 种

将上述病毒分离材料接种 5 枚 12 日龄无小鹅瘟抗体的鹅胚,每胚尿囊腔接种 0.2 mL,置 37℃~38℃ 孵化箱内继续孵化,每天照胚 2~4 次,观察 9 d,一般经 5 d~7 d 大部分胚胎死亡。72 h 以前死亡的胚胎废弃,72 h 以后死亡的鹅胚取出放置 4℃~8℃ 冰箱内过夜冷却收缩血管。用无菌手续吸取尿囊液保存和作无菌检验,并观察胚胎病变。无菌的尿囊液冻结保存作传代及检验用。

2.2.2 番 鸭 胚 接 种

将上述病毒分离材料接种 5 枚 12 日龄无小鹅瘟抗体的番鸭胚,每胚尿囊腔接种 0.2 mL,置 37℃~38℃ 孵化箱内继续孵化,每天照胚 2~4 次,观察 9 d,一般经 5 d~7 d 大部分胚胎死亡。在 72 h 以前死亡的胚胎废弃,72 h 以后死亡的番鸭胚取出放置 4℃~8℃ 冰箱内过夜冷却收缩血管。用无菌手续吸取尿囊液保存和作无菌检验,并观察胚胎病变。无菌的尿囊液冻结保存作传代和检验用。

接种后 7 d 内未见死亡的鹅胚或番鸭胚取出后入 4℃~8℃ 冰箱内过夜冷却收缩血管。用灭菌手续吸取尿囊液盲传一次。

2.2.3 病 变

由本病毒致死的鹅胚和番鸭胚具有相同的大体肉眼病变。绒毛膜增厚,全身皮肤充血,翅尖、趾、胸部毛孔、颈、喙旁均有较严重出血点,胚肝充血及边缘出血,心脏和后脑出血,头部皮下及两肋皮下水肿。接种后 7 d 以上死亡的鹅胚和番鸭胚胚体发育停顿,胚体小。

2.3 病 毒 鉴 定

用鹅胚尿液分离病毒与已知抗小鹅瘟病毒标准血清,或抗小鹅瘟病毒单克隆抗体,在无小鹅瘟抗体的鹅胚中作中和试验;用已知抗小鹅瘟病毒标准血清在易感雏鹅作保护试验;也可应用琼脂扩散试验

和 ELISA 等方法鉴定病毒。方法见本标准的第 3 章和第 5 章。

3 琼脂扩散试验

3.1 材料准备

3.1.1 标准阳性血清、抗小鹅瘟病毒单克隆抗体、标准阴性血清。

3.1.2 标准琼扩抗原。

3.1.3 被检血清, 无菌手续采取血液, 分离血清, 按 0.01% 量加入硫柳汞防腐, 冻结保存待检。

3.1.4 被检抗原: 制备方法见附录 A。

3.1.5 琼脂板: 取 1.0 g 优质琼脂或琼脂粉加 100 mL pH7.8 的 8% 氯化钠溶液, 加热使其完全溶解后加入 1 mL 1% 的硫柳汞溶液混匀制成 3 mm 厚的平板。

3.2 操作方法

3.2.1 检测抗体

3.2.1.1 打孔: 将制备好的琼脂板按模板用打孔器打孔, 并挑出孔中的琼脂。中心 1 孔, 周围 6 孔, 孔径 3 mm, 孔距 4 mm, 用融化琼脂补孔底。

3.2.1.2 加样: 中央孔加入标准琼扩抗原, 1、4 孔加入标准阳性血清, 其他孔分别加入被检血清, 或 1 孔加入标准阳性血清, 其他孔分别加入倍增稀释被检血清。各孔均以加满不溢出为度。将加样后的琼脂板放入填有湿纱布的盒内, 置 20℃~25℃ 室温或 37℃ 温箱, 24 h 初判, 72 h 终判。

3.2.1.3 结果判定:

- a) 当标准阳性血清孔与抗原孔之间形成清晰沉淀线时, 被检血清孔与抗原孔之间也出现沉淀线, 且与标准阳性血清沉淀线末端相吻合, 即被检血清判为阳性。
- b) 当标准阳性血清孔与抗原孔之间形成清晰沉淀线时, 而被检血清孔与抗原孔之间无沉淀线出现时, 即被检血清判为阴性。
- c) 当被检血清最高稀释度孔与抗原孔之间形成清晰沉淀线时, 即判为被检血清琼扩效价。

3.2.2 检测抗原

3.2.2.1 打孔: 同 3.2.1.1。

3.2.2.2 加样: 中央孔加标准阳性琼扩血清, 1、4 孔加入标准琼扩抗原, 其他孔加被检抗原(见附录 A)。各孔均以加满不溢出为度。将加样后的琼脂板放入填有湿纱布的盒内, 置 20℃~25℃ 室温或 37℃ 温箱, 24 h 初判, 72 h 终判。

3.2.2.3 结果判定: 当标准抗原孔与阳性血清孔之间形成清晰沉淀线时, 被检抗原孔与阳性血清孔之间也出现沉淀线, 且与标准抗原沉淀线末端相吻合, 即被检抗原判为阳性。

当标准抗原孔与阳性血清孔之间形成清晰沉淀时, 被检抗原孔与阳性血清孔之间无沉淀线出现, 即被检抗原判为阴性。

4 中和试验(鹅胚中和试验)

4.1 材料准备

4.1.1 标准阴性血清。

4.1.2 标准小鹅瘟病毒株(SYG61 株)。

4.1.3 被检血清, 无菌手续采取血液, 分离血清, 经 56℃ 30 min 灭活, -20℃ 保存备用。

4.1.4 稀释液, 可采用灭菌汉克氏(Hanks)液或灭菌生理盐水。

4.2 固定血清稀释病毒法

先将标准小鹅瘟病毒用灭菌稀释液作 10 倍递增系列稀释, 分装到两列灭菌试管中。第一列分别加等量阴性血清混合作为对照组, 第二列分别加等量被检血清混合, 置 37℃ 温箱作用 1 h。每个稀释度接种 5 枚 12 日龄无小鹅瘟抗体鹅胚, 每胚绒尿腔 0.2 mL。置 37℃~38℃ 孵化箱继续孵化, 观察 9 d, 记

录每组鹅胚的存活数,计算半数鸡胚致死量(ELD₅₀)和中和指数。

4.3 结果判定

中和指数为对照组与被检组 ELD₅₀ 的差数的反对数。中和指数小于 10 为阴性,10~49 为可疑,50 以上为阳性。

5 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)

5.1 材料准备

5.1.1 病料采集及处理:按 2.1 进行。

5.1.2 鹅胚接种:按 2.2.1 进行。

5.1.3 被检病料:将疑似小鹅瘟病例的肝、脾、肠等病料加 1 倍无菌生理盐水研磨成匀浆,反复冻融 3~4 次,5 000 r/min 离心 30min,取上清液,按 4:1 加入分析纯三氯甲烷充分混匀后,放置 37℃ 温箱作用 60 min,经 3 000 r/min 离心 30 min。如此反复抽提 2~3 次,以此水相作被检样品。

5.1.4 其他材料:抗小鹅瘟病毒单克隆抗体;抗 BALB/C 小鼠 IgG 酶标抗体;标准小鹅瘟病毒株(SYG61 株);正常鹅胚绒尿液。

5.1.5 试验溶液:配制方法见附录 B。

5.2 操作方法

5.2.1 抗原包被:将 5.1.1.2 所获鹅胚初次分离尿囊液毒或被检病料样品包被酶标板 4 孔,每孔 50 μL,另用等量正常鹅胚绒尿液包被 4 孔,已知小鹅瘟病毒鹅胚绒尿液包被一孔,留 1 孔不包以作空白对照,37℃ 作用 2 h~3 h,或 4℃ 过夜。

5.2.2 封闭:倾去包被液,1%牛血清白蛋白的 0.05 mol/L,PBS pH7.4 0.05%吐温-20(Tween-20)溶液(见第 B.2 章)封闭各个包被孔,37℃ 3 h 或 4℃ 过夜。

5.2.3 洗涤:倾去酶标板孔内的封闭液,加入冲洗液(见第 B.1 章),洗涤 2 min~3 min,甩去冲洗液,用吸水纸吸干并驱除孔内气泡。重复 3 次。

5.2.4 加入抗血清:先将抗小鹅瘟病毒单克隆抗体(小鼠腹水)1:100~1:1 000 倍稀释后加入各包被抗原孔内,每孔 50 μL,37℃ 水浴作用 2 h。洗涤同 5.1.2.3。

5.2.5 加酶标记的抗 BALB/C 小鼠 IgG 抗体:加入抗 BALB/C 小鼠 IgG 酶标抗体工作液,每孔 50 μL。置 37℃ 水浴 1.5 h,冲洗方法同 5.1.2.3。

5.2.6 加底物:每孔加入新配制的邻苯二胺(OPD)底物显色液(见第 B.3 章)100 μL,置 37℃ 避光反应约 10 min~20 min,待标准阳性孔呈淡黄色时终止反应。

5.2.7 终止反应:每孔加入终止液(见第 B.4 章)50 μL。

5.2.8 判定:在酶标仪 490 nm 波长处测定酶标板的每孔光吸收值。求出每份被检病毒尿囊液 4 孔平均吸光(OD)值(S),正常鹅胚尿囊液 4 孔平均值(N),若 $S/N > 0.5$ 则判为阳性, $S/N \leq 0.5$ 则判阴性。标准病毒液孔应呈阳性。

附 录 A
(规范性附录)
被检琼扩抗原制备

将分离毒株鹅胚尿囊液,经 3 000 r/min 离心 30 min,取上清液加入等量三氯甲烷(氯仿)振摇 30 min后,经 3 000 r/min 离心 30 min。吸取上清液装入透析袋,置于有干燥硅胶的密闭玻璃缸(或玻璃瓶)内数小时,或至完全干燥为止,也可置 40%聚乙醇中浓缩(约 12 h)。加适量灭菌无离子水于透析袋内,使之达到 1/40~1/50 原绒尿液量,待完全溶解后吸出置无菌小瓶内加入 0.01%硫柳汞防腐,冻结保存,即为被检琼扩抗原。

附 录 B
(规范性附录)
溶液配制(试剂要求分析纯)

B.1 冲洗液

0.05 mol/L pH7.4 PBS 0.05% Tween-20; 0.2 mol/L 磷酸氢二钠 210 mL, 0.2 mol/L 磷酸二氢钠 40 mL, 加无离子水至 1 000 mL, 再加入 30 g 氯化钠和 5 mL Tween-20。

B.2 封闭液

冲洗液内加入 1%牛血清白蛋白。

B.3 底物液

在 pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液 100 mL 内加入 40 mg 邻苯二胺(OPD),临用前加入 80 μ L 30%过氧化氢(H₂O₂)。

pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液

0.1 mol/L 柠檬酸溶液	25 mL
0.2 mol/L 磷酸氢钠	25 mL
双蒸水	50 mL

以上三种溶液混匀即成。

B.4 反应终止液

2 mol/mL 硫酸溶液:取浓硫酸(纯度 98%)1 mL 加入 8 mL 去离子水即可。
