

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 574—2002

**地方流行性牛白血病琼脂凝胶
免疫扩散试验方法**

Agar gel immunodiffusion test for enzootic bovine leukosis

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

地方流行性牛白血病(enzootic bovine leukosis,简称 EBL)是由牛白血病病毒引起牛的淋巴样细胞恶性增生,进行性恶病质变化和全身淋巴结肿大为特征的一种慢性、进行性、接触传染性肿瘤病。被世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizooties(法),OIE]列为 B 类疾病,我国农业部把该病列为二类动物疫病。

本标准规定的琼脂凝胶免疫扩散(AGID),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,是国际贸易指定的诊断方法。

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。

本标准起草人:刘焕章、辛九庆。

地方流行性牛白血病琼脂凝胶 免疫扩散试验方法

1 范围

本标准规定了地方流行性牛白血病琼脂凝胶免疫扩散试验诊断技术要求。

本标准适用于地方流行性牛白血病的诊断、检疫和流行病学调查。

2 琼脂凝胶免疫扩散试验

2.1 材料准备

2.1.1 打孔器(内径 5 mm),琼脂糖(试剂级)。

2.1.2 抗原:标准阳性血清、阴性血清。

2.2 操作方法

2.2.1 琼脂糖凝胶板制备

在磷酸缓冲液(0.05 mol/L pH7.2)100 mL 中加入琼脂糖(试剂级)1.0 g,加氯化钠分析试剂 8.5 g,10%硫柳汞(试剂级)1 mL。将上述各种成分混合,加热充分溶解,趁热加到平皿中,注意不要产生气泡。每个平皿内加琼脂糖溶液 15 mL~17 mL(直径 9 cm),凝胶板厚度为 2 mm。待凝固后把平皿倒置,放在 4℃冰箱中保存 10 d。

2.2.2 打孔

2.2.2.1 孔型图案的准备:在坐标纸上画好 7 孔型(见图 1),孔径 5 mm,孔距 3 mm。

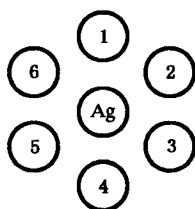


图 1 琼脂糖凝胶板打孔示意图

2.2.2.2 把图案放在琼脂板平皿下,用打孔器按图型准确位置打孔。孔内琼脂用针头小心挑出,勿破坏周围琼脂,将平皿底部在酒精灯上略烤封底。

2.2.3 滴加抗原和血清

七孔型中央孔加抗原(Ag),1、3、5 孔加标准阳性血清,2、4、6 孔分别加三份被检血清。

各孔一次加满,以不溢出为准,平皿加盖后放在湿盒中,于室温(20℃以上)作用,24 h 和 48 h 各检查一次,检查时用斜射强光,背景要暗。

2.3 结果判定

2.3.1 阳性:标准阳性血清与抗原孔之间有两条沉淀线。靠抗原孔的是 gP_{51} (对乙醚敏感的囊膜蛋白)抗体沉淀线,靠血清孔为 P_{24} (抗乙醚的核蛋白)抗体沉淀线。

抗原孔和被检血清孔之间出现一条清晰的沉淀线,并与标准阳性的 gP_{51} 沉淀线完全融合。少数被检血清在 gP_{51} 沉淀线的外侧(靠被检血清孔)还出现第二条沉淀线并与标准阳性血清的 P_{24} 沉淀线完全融

合。抗原孔和被检血清孔之间虽无明显的沉淀线,但使两侧标准阳性血清形成的沉淀线末端向毗邻的被检血清孔内侧弯曲(主要是 gP_{51} 沉淀线)。

2.3.2 阴性被检血清孔与抗原孔之间无沉淀线,标准阳性血清形成的沉淀线直伸到被检血清孔的边缘。

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被检血清孔内侧弯曲,但不易判定时需重检,仍为疑似判为阳性。