

## 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1185—2018  
代替 NY/T 1185—2006

---

### 马流行性感冒诊断技术

*Diagnostic techniques for equine influenza*

2018-03-15 发布

2018-06-01 实施

---



中华人民共和国农业部 发布

## 目 次

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 前言 .....                   | II  |
| 引言 .....                   | III |
| 1 范围 .....                 | 1   |
| 2 规范性引用文件 .....            | 1   |
| 3 生物安全措施 .....             | 1   |
| 4 临床诊断 .....               | 1   |
| 5 实验室诊断 .....              | 1   |
| 6 综合判定 .....               | 5   |
| 附录 A(规范性附录) 溶液的配制 .....    | 6   |
| 附录 B(规范性附录) 抗原和血清的处理 ..... | 8   |

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 NY/T 1185—2006《马流行性感冒诊断技术》。与 NY/T 1185—2006 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

- “引言”部分更正马流行性感冒为三类动物疫病;
- “病毒分离与鉴定”部分增加收获尿囊液的过程描述(见 5.2.5);
- “病原分离”部分对血凝试验结果判定进行修正(见 5.2.7.2);
- 增加了对马流行性感冒病毒核酸鉴定的 RT-PCR 方法(见 5.3);
- 增加了马流行性感冒抗体单放射免疫扩散溶血试验(见 5.5)。

本标准由农业部兽医局提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAT/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、北京市农林科学院畜牧兽医研究所、中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:王晓钧、郭巍、戚亭、林健、毛娅卿、蒋桃珍、杨志远。

## 引 言

马流行性感冒(Equine influenza, EI)是由马 1 型(H7N7 亚型)或马 2 型(H3N8 亚型)流行性感冒病毒(Equine influenza virus, EIV)引起的传染性极强的急性呼吸系统疾病。自然条件下,只有马属动物易感,包括马、驴、骡,其中马最易感,临床症状最明显。本病发病突然,主要经含有病毒的气溶胶或飞沫传播,疫情发展迅速,可在短时间内传染马群。本病的潜伏期为 1 d~3 d,主要症状为发热,流浆液性或脓性鼻汁,眼部见泪痕或分泌物,咳嗽。一般发病马 7 d~15 d 后即可恢复健康。本病死亡率较低,如果继发细菌感染,可引起肺炎等严重症状导致死亡。本病一年四季均可发生。我国《一、二、三类动物疫病病种名录》(中华人民共和国农业部公告 第 1125 号)将该病确定为三类动物疫病,是进出口马检疫必检疫病。



# 马流行性感冒诊断技术

## 1 范围

本标准规定了马流行性感冒的临床诊断、病原分离、血凝试验(HA)、H3N8 亚型马流感病毒核酸的 RT-PCR、血凝抑制试验(HI)、单放射免疫扩散溶血试验(SRH)的技术要求。

本标准适用于马流行性感冒的流行病学调查、临床诊断和实验室诊断。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

## 3 生物安全措施

进行马流行性感冒实验室诊断时,如病毒分离、血清处理等,按照 GB 19489 的规定执行。

## 4 临床诊断

### 4.1 轻症型

此种病型常见,主要表现为轻度咳嗽、流水样或浆液性鼻汁,体温稍升高或正常,眼结膜潮红,一般经 1 周后康复。

### 4.2 重症型

患马突然发病,表现精神委顿、食欲减退、肌肉疼痛、不愿活动。体温升高至 39℃ 以上,稽留 3 d~4 d,发热的同时出现阵发性咳嗽,初为干咳,后可转为湿咳,有冷空气或尘埃刺激时会出现剧烈咳嗽。初期为流浆液性或黏液性鼻汁,后期为黄白色脓性鼻汁。鼻黏膜潮红,眼结膜充血肿胀,流泪,分泌物增多。呼吸加快,有的出现心律不齐,四肢下端或腹下发生浮肿。

## 5 实验室诊断

### 5.1 样品采集与运输

#### 5.1.1 样品的采集

5.1.1.1 每个发病群至少选择 5 匹病畜采集样品,少于 5 匹则全部采集样品。

5.1.1.2 应在临床症状出现后立即采集深部鼻拭子。取样时须将脱脂棉拭子经前侧鼻道伸入鼻腔深部蘸取呼吸道黏液,取出后立即放入盛有 1 mL~2 mL 运输培养液(见附录 A 中的 A.1)的青霉素瓶或带盖塑料管中。

5.1.1.3 血清应采集双份,间隔 10 d~14 d。

#### 5.1.2 样品的运输与储存

鼻拭子样品在 2℃~8℃ 时可保存 1 d~2 d,若要长期保存,则应放置于 -70℃ 以下。运送样品时应加冰块或冰袋冷藏运输。

血清储存应置于 -20℃ 以下。

### 5.2 病毒分离与鉴定

### 5.2.1 仪器设备

恒温培养箱、孵化器、恒温水浴锅、普通冰箱、超低温冰柜、台式离心机。

### 5.2.2 试验材料

96孔V型或U型微量反应板、微量移液器、1 mL注射器和5 mL注射器、长柄棉拭子(20 cm以上)、青霉素瓶等。除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂。实验用水应符合GB/T 6682的规定。甘油、青霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、0.01 mol/L pH为7.2的磷酸盐缓冲液(PBS)(见A.2)、1%鸡红细胞悬液(见A.4)、马流感病毒参考阳性血清和阴性血清、10 d~11 d SPF鸡胚。

### 5.2.3 样品处理

一次仅处理1份样品,从鼻咽拭子中挤出的液体,加入青霉素1 000 IU/mL~2 000 IU/mL,链霉素1 mg/mL~2 mg/mL。以1 500 g 4℃离心10 min,取上清液,经0.22 μm滤器过滤后用于SPF鸡胚接种。未用完的样品放回-70℃以下冰箱保存。

### 5.2.4 样品接种

将孵化至10 d~11 d的SPF鸡胚气室部位用碘酊和酒精消毒后,在壳上打一个孔。每份样品接种3枚鸡胚,每胚尿囊腔接种0.2 mL。用石蜡封孔,鸡胚放置34℃~35℃孵化器内孵化,丢弃24 h内死亡的死胚,继续孵化至72 h。

### 5.2.5 收获尿囊液

接种后第3 d,将鸡胚转到2℃~8℃冰箱中放置4 h或过夜。取出后,先将蛋壳表面消毒,用镊子敲碎并剥离气室蛋壳,然后挑破壳膜和绒尿膜,用注射器收获尿囊液,用1%的红细胞悬液检测尿囊液是否具有血凝活性(见5.2.7)。每胚收获的尿囊液要分开冷冻保存。

### 5.2.6 种毒选择与保存

为避免缺陷型的病毒粒子产生干扰,要将接种物先作10倍、100倍、1 000倍稀释再接种,选择最高稀释度HA(见5.2.7)呈阳性的样品培养物作为种毒,保存在-70℃以下的冰箱中。

### 5.2.7 血凝试验(HA)

#### 5.2.7.1 操作程序

5.2.7.1.1 在反应板每行各孔中加25 μL PBS。

5.2.7.1.2 第一孔中加25 μL病毒分离液,按照1:2稀释,最后一孔不加抗原作阴性对照。

5.2.7.1.3 每孔中再加25 μL PBS。

5.2.7.1.4 每孔加50 μL 1%红细胞液,(22±2)℃条件下作用30 min。

#### 5.2.7.2 结果判定

##### 5.2.7.2.1 HA效价判定标准

当红细胞发生凝集反应时,其均匀分布在反应板底部,将血凝板倾斜45°保持20 s~30 s,红细胞不下滑;红细胞未出现凝集时,反应板倾斜后,可见沉淀的红细胞向下滑动,形成流线或泪滴状。HA效价为全部红细胞出现凝集时的最高稀释倍数。

##### 5.2.7.2.2 样品无血凝活性(HA阴性)

红细胞没有出现凝集时,则需将各样品尿囊液收集在一起,再经鸡胚盲传,当传至第3代仍未出现血凝活性,判定为马流感病毒阴性。

##### 5.2.7.2.3 样品有血凝活性(HA阳性)

将所有血凝试验HA阳性样品作小量等份(每份1 mL)分装在5 mL青霉素瓶内,并取其中1份测定HA效价,-70℃以下冰箱内保存。有血凝活性(HA阳性),但效价较低时,要继续传代,共盲传3代。

#### 5.2.7.3 病原分离结果判定

HA 效价阴性,判定为马流感病毒分离阴性;HA 效价阳性,判定为马流感病毒分离阳性,同时要用马流感病毒 H3N8 亚型和 H7N7 亚型作为参考阳性血清,通过 HI 试验(见 5.4)对病毒样品进行亚型鉴定。

### 5.3 H3N8 亚型马流感病毒 RT-PCR

#### 5.3.1 仪器设备

PCR 仪、微量移液器、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像系统。

#### 5.3.2 试剂与材料

市售病毒 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和 PCR 试剂盒;TRIzol 试剂、三氯甲烷、异丙醇、DEPC 处理水、琼脂糖。

可以采用引物 HF/HR+MF/MR 用于 H3N8 亚型马流感病毒核酸的检测,详见表 1。

表 1 用于 H3N8 亚型马流感病毒 RT-PCR 检测的引物

| 引物 | 目的   | 靶基因   | 序列(5'~3')                     | 产物, bp |
|----|------|-------|-------------------------------|--------|
| HF | 正向引物 | HA 基因 | AAT TCA TCA CCC GAG TTC AA    | 595    |
| HR | 反向引物 | HA 基因 | TTT CAT TAA TCT GGT CGA TGG C |        |
| MF | 正向引物 | M 基因  | ACT GTG ACA ACC GAA GTG       | 227    |
| MR | 反向引物 | M 基因  | TGC CTG GCC TTA CTA GC        |        |

#### 5.3.3 样品处理

将拭子充分捻动、挤干后,取 100  $\mu$ L 样品液至一新的离心管中,进行 RNA 提取。

#### 5.3.4 病毒 RNA 的提取

使用市售病毒 RNA 提取试剂盒提取病毒 RNA。

也可使用 1 mL TRIzol 试剂处理的样品液,10 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清液,静置 5 min。加 200  $\mu$ L 三氯甲烷,振荡混匀 15 s,静置 2 min~3 min。10 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上层水相至新的离心管中,加 400  $\mu$ L 异丙醇,混匀,静置 10 min,10 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清液。加入 75%乙醇 1 mL,混匀,10 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,去上清液。再加入 75%乙醇 1 mL,混匀,10 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,去上清液。干燥 RNA 沉淀后,加入 100  $\mu$ L DEPC 处理过的水溶解。

提取的 RNA 立即进行 RT-PCR 反应或-70 $^{\circ}$ C 保存。

#### 5.3.5 RT-PCR 反应

使用市售合格反转录试剂盒进行反转录。使用市售合格 PCR 试剂盒进行 PCR。将 4 种引物配制成 10  $\mu$ mol/L 的使用液,按照 PCR 试剂盒的要求添加到反应体系中。

PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,之后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,53.6 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 后,反应结束。

取 PCR 产物 5  $\mu$ L,在 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,在凝胶成像系统中观察结果。

#### 5.3.6 结果判定

参考阳性病毒扩增出 595 bp 和 227 bp 大小的两条片段,待检样品若得到相同条带,则判定为 H3N8 亚型马流感病毒核酸阳性,只有一条 227 bp 片段则判定为疑似马流感病毒核酸阳性。

在无法分离病毒的实验条件下,可以采用该方法直接检测鼻腔分泌物中的病毒核酸。该方法能快速提供诊断结果,但不能替代病毒分离鉴定。在样品数量较多时,有助于为病毒分离初步筛选样品。

### 5.4 血清学试验-血凝抑制试验(HI)

#### 5.4.1 仪器设备

离心机、水浴锅、微量移液器、振荡器等。

#### 5.4.2 试验材料

96 孔 V 型或 U 型微量反应板、吐温-80、乙醚、过碘酸钾、甘油、0.01 mol/L pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)(见 A.2)、1%鸡红细胞悬液(见 A.4)、马流感灭活抗原(见附录 B 中的 B.1)、马流感病毒参

考阳性血清和阴性血清。

待检血清应进行预处理,稀释浓度为1:4,处理方法见附录B.2。

#### 5.4.3 操作程序

5.4.3.1 在进行本试验前,先进行抗原(见B.1)的HA效价检测,方法见5.2.7。

5.4.3.2 稀释抗原,使含量为4个HA单位( $4 \times$ HA最小凝集量)。

5.4.3.3 加25  $\mu$ L PBS于96孔U型或V型微量反应板各孔中。

5.4.3.4 加25  $\mu$ L经处理的血清于第1孔中,混匀后取25  $\mu$ L加到第2孔中,依次倍比稀释,从第2孔加至第11孔,第11孔混匀后吸取25  $\mu$ L弃去,最后1孔不加血清作对照。

5.4.3.5 每孔中加25  $\mu$ L 4HA单位抗原,置于 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下30 min。

5.4.3.6 每孔加50  $\mu$ L 1%鸡红细胞液,置于 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下30 min。

5.4.3.7 将反应板倾斜 $45^\circ$ ,无凝集反应,则沉淀的红细胞向下滑动,呈流线状,记录为抗体阳性。完全抑制凝集的抗体最高稀释倍数为血清的血凝抑制抗体(HI)效价。

#### 5.4.4 结果判定

缺少试验成立的条件:当参考阳性血清的HI效价与已知效价相差不超过1个滴度,参考阴性血清为阴性时,判试验成立。

HI效价不低于1:8时,判定为马流感抗体血清学阳性。HI效价小于1:8时,判定为马流感抗体血清学阴性。

判断病毒是否近期感染需检测双份血清,第一份血清应在临床症状出现后立即采集,第二份血清在10 d~14 d后采集。如第二份血清的抗体效价比第一份血清的抗体效价上升4倍或4倍以上时,表明近期该马被马流感病毒感染。

#### 5.5 血清学试验-单放射免疫扩散溶血试验(SRH)

##### 5.5.1 试验材料

###### 5.5.1.1 试剂

盐水/HEPES(见A.5)、盐水/HEPES/BSA(见A.6)、氯化铬原液(见A.7)、PBS“A”(见A.8)、1%琼脂糖(见附录A.9)。

###### 5.5.1.2 抗原

马流感病毒,SPF鸡胚增殖毒液灭活后备用。

###### 5.5.1.3 绵羊红细胞

采集3只绵羊血混合加入到等体积的阿氏液中, $4^\circ\text{C}$ 存放2 d后使用。使用前,用盐水/HEPES洗涤3次,每次洗涤后500 g离心5 min,最后一次离心10 min。洗涤后,用盐水/HEPES配制成8%红细胞(V/V压积细胞)。

###### 5.5.1.4 补体

豚鼠新鲜血清或冻干血清。

###### 5.5.1.5 血清

马流感H3亚型阴、阳性参考血清,待检血清采自马属动物。

###### 5.5.1.6 SRH反应板

##### 5.5.2 操作程序

###### 5.5.2.1 血清处理

血清 $56^\circ\text{C}$ 灭活30 min,避免反复冻融。

###### 5.5.2.2 绵羊红细胞洗涤

5.5.2.2.1 用盐水/HEPES洗涤绵羊红细胞,至少3次。第1次500 g,离心5 min;第2次、第3次洗



涤后离心 500 g, 离心 10 min。

5.5.2.2.2 根据血清检测数量, 计算需要反应板的数量。准备合适体积的 8% 红细胞(V/V 压积细胞), 用盐水/HEPES 配制。每块免疫板需要 0.3 mL 红细胞, 另外余出 1 mL~2 mL。

#### 5.5.2.3 病毒/抗原的预测定

准备 3 块板, 分别加 0.6 mL、1.2 mL、1.8 mL 的病毒至 2 mL 的红细胞中, 分别加入 1.3 mL、1.6 mL、1.9 mL 的  $\text{CrCl}_3$ , 用 PBS“A”重悬至 2 mL。按步骤 5.5.2.4、5.5.2.5 进行。抗原的最适用量是与参考阳性血清作用出现最大、最清晰溶血圈的抗原量。

#### 5.5.2.4 红细胞致敏

5.5.2.4.1 使用 15 mL 离心管处理红细胞, 根据红细胞用量, 每管加入 2 mL 8% 的红细胞, 加入预先确定好的病毒抗原量, 摇匀, 4°C 孵育 10 min, 应可以看到凝集。设置不致敏红细胞, 即不加病毒的红细胞用于制备空白对照板(其余处理方法均相同)。

5.5.2.4.2 缓慢加入病毒/红细胞悬液半数体积的  $\text{CrCl}_3$  溶液, (22±2)°C 条件下孵育 5 min, 不时摇动。

5.5.2.4.3 1 500 r/min 离心 5 min, 沉淀致敏的红细胞, 弃上清液。

5.5.2.4.5 尽量吸干上清液体, 注意不要吸出红细胞, 重悬红细胞于 2 mL PBS“A”中, 此时红细胞浓度为 8%。

#### 5.5.2.5 制板及加样测定

5.5.2.5.1 致敏过程中, 微波炉熔解琼脂糖, 中高火加热至沸腾, 反复沸腾 2 次充分溶解琼脂糖。放置于 42°C 水浴锅中保持温度。用前检查琼脂的温度是否已经降到 42°C。此过程操作人员应仔细观察, 防止沸腾后溢出。

5.5.2.5.2 冻干补体用无菌 0.85% NaCl 复原。

5.5.2.5.3 吸取 7.8 mL 琼脂糖于合适容器中, 加入 0.9 mL 致敏的红细胞, 0.3 mL 补体, 迅速搅拌均匀。注意: 动作要轻柔, 不要产生气泡。快速倒入免疫板(置于水平桌上), 不加盖在空气中干燥降温 5 min, 至琼脂糖完全凝固。

5.5.2.5.4 反应板加盖, 置于湿盒中, 4°C 存放, 直至使用。准备的板可存放数周, 但保存时间越长, 溶血圈清晰度越差。

5.5.2.5.5 空白对照板: 使用不加病毒致敏的红细胞制备的反应板。

5.5.2.5.6 在凝胶上打 3 mm 直径的孔。

5.5.2.5.7 吸取 10  $\mu\text{L}$  热灭活的待检血清和参考阳性、阴性血清加入到合适的孔中, 每块反应板上均应有参考阳性血清和阴性血清, 34°C, 湿盒中孵育 20 h。

5.5.2.5.8 测量溶血圈直径。

#### 5.5.3 结果判定

5.5.3.1 有效结果: 参考阳性血清的结果和预期结果一致, 即参考阳性血清的溶血圈清晰, 直径参考值相差不超过 5%。阴性对照血清无溶血圈, 空白对照板上血清无溶血圈。空白对照板上呈现溶血圈的血清应该用绵羊红细胞吸附处理后重新检测。

5.5.3.2 符合 5.5.3.1 时, 可测量溶血圈直径, 直径大于等于 5 mm 时判血清为阳性。

5.5.3.3 用于诊断目的时, 急性发作期和恢复期的血清应在同一板上测定双份。恢复期血清的溶血圈直径与急性发作期相比有明显的升高, 可判定马感染马流感病毒或有近期感染。

### 6 综合判定

符合“4 临床诊断”所述, 可初步判定为马流行性感冒。符合 5.2.7.3 或 5.3.6 病原检测阳性, 则判定为马流行性感冒; 或符合 5.4.4 或 5.5.3 血清学阳性, 也判定为马流行性感冒。

附 录 A  
(规范性附录)  
溶液的配制

### A.1 运输培养液

含有 40%甘油的 pH 为 7.2 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS), 高压消毒灭菌, 保存于 4℃~8℃ 保存备用。

### A.2 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)

|   |             |
|---|-------------|
| 氯化钠(NaCl)   | 8.00 g      |
| 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) | 1.15 g      |
| 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                             | 0.20 g      |
| 氯化钾(KCl)  | 0.20 g      |
| 双蒸馏水  | 加至 1 000 mL |

将上列试剂按次序加入定量容器中, 混匀后, 充分溶解, 用 HCl 调溶液的 pH 至 7.2, 121℃ 高压灭菌 15 min, 冷却后保存于 4℃~8℃ 备用。

双蒸水均应符合 GB/T 6682 的要求。

### A.3 阿氏(Alsever)液

|   |           |
|---|-----------|
| 葡萄糖( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )           | 2.05 g    |
| 柠檬酸钠( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) | 0.80 g    |
| 柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )              | 0.055 g   |
| 氯化钠(NaCl)   | 0.42 g    |
| 双蒸馏水  | 加至 100 mL |

将上列试剂按次序加入定量容器中, 混匀后, 充分溶解, 121℃ 高压灭菌 15 min, 冷却后保存于 4℃~8℃ 备用。

### A.4 1%鸡红细胞悬液

无菌 SPF 公鸡血液与 1 倍~2 倍量阿氏液混合, 4℃ 保存, 红细胞在阿氏液中可保存 1 周~2 周。使用前吸取红细胞悬液置于离心管中, 加入 PBS 洗涤 3 次, 每次约以 3 000 r/min 离心 5 min, 将血浆、白细胞等充分洗去, 沉积的红细胞用 PBS 稀释成 1% 的悬液, 保存于 4℃~8℃ 冰箱中备用。

### A.5 盐水/HEPES

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| 氯化钠(NaCl)              | 4.25 g    |
| 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)      | 5.95 g    |
| 叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ ) | 0.1 g     |
| 双蒸馏水                   | 加至 500 mL |

将上列试剂按次序加入定量容器中, 混匀后, 充分溶解, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 6.5, 室温保存。

**A.6 盐水/HEPES/BSA**

用盐水/HEPES(A.5)制备含0.2%(W/V)牛血清白蛋白(BSA)的溶液。

**A.7 氯化铬母液(2.2 mol/L)**

6 g 氯化铬( $\text{CrCl}_3$ )溶解于10 mL 蒸馏水中;每次使用时,用0.85%的NaCl(4.25 g/500 mL)配制成1/400的工作液,现用现配。

**A.8 PBS“A”**

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| 氯化钠( $\text{NaCl}$ )               | 0.25 g |
| 磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) | 1.45 g |
| 叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )             | 0.20 g |
| 双蒸馏水                               | 加至1 L  |

将上列试剂按次序加入定量容器中,混匀后,充分溶解,室温保存。

**A.9 1%琼脂糖**

1 g 琼脂糖加至100 mL PBS“A”(A.8)中,加热溶解。

**附 录 B**  
(规范性附录)  
**抗原和血清的处理**

**B.1 吐温-80/乙醚处理马流感病毒抗原**

**B.1.1** 对于全病毒要进行灭活处理,向40 mL病毒液中加0.5 mL含10%(V/V)吐温-80的PBS,使吐温-80终浓度为0.125%(V/V)。

**B.1.2** 室温下轻轻摇动混合5 min后,加20 mL乙醚使终浓度为33.3%(V/V),充分混匀后置于4℃中作用15 min。

**B.1.3** 静置分层,将液相层(含裂解的病毒粒子)移入玻璃瓶中,松开盖子,过夜,在通风橱中挥发残留乙醚。

**B.2 待检血清样品预处理**

**B.2.1** 在1体积(150 μL)血清中加2体积(300 μL)新配制的0.016 mol/L过碘酸钾(380 mg/100 mL PBS,需加热溶解,出现沉淀则不能继续使用),混匀,置于(22±2)℃中作用15 min。

**B.2.2** 再加1体积(150 μL)的3%甘油PBS中和过剩的过碘酸钾液,混合后置于(22±2)℃中作用15 min。

**B.2.3** 在56℃水浴中灭活30 min。血清稀释度为1:4。

---

中华人民共和国  
农业行业标准  
马流行性感冒诊断技术

NY/T 1185—2018

\* \* \*

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街18号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

\* \* \*

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

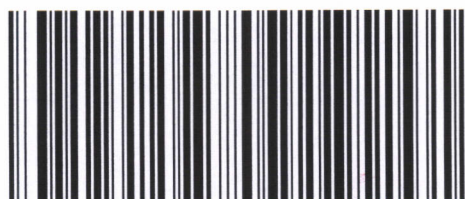
2018年5月第1版 2018年5月北京第1次印刷

书号: 16109·4499

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 1185—2018