

ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 560—2018
代替 NY/T 560—2002

小鹅瘟诊断技术

Diagnostic techniques for gosling plague

2018-05-07 发布

2018-09-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

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 560—2002《小鹅瘟诊断技术》。与 NY/T 560—2002 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

- “范围”部分增述了免疫荧光(IFA)试验和多聚酶链式反应(PCR)检测方法的适用性;
- “病毒分离”部分将“鹅胚接种”与“番鸭胚接种”合并为“鹅胚或番鸭胚接种”(见 3.1.4.3);
- “间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)”修改为“夹心酶联免疫吸附试验(夹心 ELISA)”(见 3.2.2);
- 增加了小鹅瘟病毒抗原和抗体间接免疫荧光方法(见 3.2.3;4.3);
- 增加了小鹅瘟病毒 PCR 检测方法(见 3.2.4)。

本标准由农业农村部兽医局提出。

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:扬州大学、中国动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人:秦爱建、钱琨、叶建强、蒋菲、邵红霞、刘洋。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- NY/T 560—2002。

引 言

小鹅瘟又称鹅细小病毒(Goose parvovirus)病,或称德兹西氏病(Derzsy's disease),是雏鹅的一种急性败血性传染病。世界所有养鹅的国家均有此病的发生。本病主要侵害 1 月龄以内雏鹅和雏番鸭,多呈最急性和急性感染而迅速致死。1 月龄以上的小鹅发病减少,呈慢性过程。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。

本病病原为小鹅瘟病毒,最早由我国方定一先生发现鉴定。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各国分离的毒株具有相同的抗原关系,即目前仅有一种血清型。小鹅瘟病毒与番鸭细小病毒存在抗原相关性,而与哺乳动物和其他禽类的细小病毒没有抗原相关性。本病病毒分离常用鹅胚或番鸭胚。鹅胚或番鸭胚原代细胞感染病毒后,用特异的鹅细小病毒多抗血清或单克隆抗体进行免疫荧光染色,能确定感染细胞内病毒的存在。PCR、双抗体夹心 ELISA 和冰冻切片等方法能快速检测病鹅组织样本中的小鹅瘟病毒。

小鹅瘟诊断技术

1 范围

本标准规定了小鹅瘟诊断技术的要求。

本标准所规定的病毒分离方法适用于小鹅瘟病毒分离；多聚酶链式反应(PCR)、琼脂扩散试验、中和试验、夹心酶联免疫吸附(夹心 ELISA)试验、免疫荧光(IFA)试验等诊断方法适用于病毒分离株的鉴定、鹅群小鹅瘟检疫、流行病学调查和免疫鹅群抗体水平的检测。

2 临床症状与病理变化

2.1 流行病学

主要致 1 月龄内的雏鹅发病，发病率和病死率可达 90%~100%，传播快。3 周龄以内的番鸭也可感染，并发病死亡。随着日龄增大，发病率逐渐降低。成年鹅感染病毒通常不会出现临床症状。病鹅的排泄物含有大量病毒，是重要的传染源。

2.2 临床症状

发病雏鹅精神沉郁、昏睡，缩头垂翅，食欲减退；病鹅出现稀粪，粪便中含有气泡或纤维碎片，甚至有血黏液，肛门附近有稀粪黏附；常伴随着呼吸困难症状，脚发绀；少数病鹅有神经症状，并出现抽搐倒地死亡现象；病程 2 d~3 d，发病急且病死率高。

2.3 病理变化

剖检肉眼可见小肠的中后段肠管肿胀变粗，肠壁紧张，肠道黏膜脱落与内容物形成同心圆栓塞(肠栓)，易剥离，肠壁光滑且变薄，部分肠道卡他性出血。

肝脏肿大淤血呈古铜色，胆囊稍有肿大，充满蓝绿色胆汁。

肾脏肿胀，输尿管可见尿酸盐沉积；个别病死鹅胰腺有出血点；有神经症状的病死鹅脑膜充血或有出血点。

2.4 结果判定

符合上述 2.1、2.2 和 2.3 基本特征的小鹅病例，可以初步判定为小鹅瘟。确诊需要病原学鉴定。

3 病毒的分离、检测和鉴定

3.1 病毒分离

3.1.1 仪器

组织研磨器、恒温孵化箱、手持式照蛋器、无菌巴氏吸管、台式离心机($\geq 10\,000$ r/min)、 -20°C 冰箱、 4°C 冰箱。

3.1.2 耗材

12 日龄无小鹅瘟病毒抗体的鹅胚或番鸭胚、眼科剪、镊子、Eppendorf 管(微量离心管)。

3.1.3 试剂

0.015 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)(见附录 A 中的 A.2)、生理盐水(见 A.9)、青霉素(10 万 IU/mL)、链霉素(10 万 IU/mL)。

3.1.4 方法及程序

3.1.4.1 无菌取患病雏鹅或死亡雏鹅的肝、脾、肾、肠道等内脏器官，病料放置灭菌的平皿中， -20°C 保存，作为病毒分离材料备用。

3.1.4.2 将组织剪碎、磨细,置于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,用含有青霉素和链霉素各 2 000 IU/mL 的灭菌生理盐水或灭菌 PBS(pH 7.2)进行 1:10 稀释(W/V),37℃作用 30 min 后,8 000 r/min 离心 10 min。取上清液经 0.22 μmol/L 滤膜过滤除菌后,作为病毒分离材料。

3.1.4.3 鹅胚或番鸭胚接种

将 3.1.4.2 病毒分离材料接种 5 枚 12 日龄无小鹅瘟病毒抗体的鹅胚或番鸭胚,每胚尿囊腔接种 0.2 mL,置于 37℃~38℃孵化箱内孵化,每天照胚 2 次,观察 9 d。

接种后 24 h 内死亡的胚胎废弃,24 h 以后死亡的鹅胚或番鸭胚取出,置于 4℃冰箱内过夜冷却收缩血管。翌日无菌收获尿囊液,并观察胚体病变。做无菌检验后封装冻存。无菌的尿囊液于-20℃保存,做传代及检验用。

接种后 9 d 内未见死亡的鹅胚或番鸭胚取出后,置于 4℃冰箱内过夜冷却收缩血管。翌日用无菌操作方法收获尿囊液,盲传一代。

3.1.4.4 结果判定

由本病毒致死的鹅胚或番鸭胚具有相同的肉眼可见病变。绒毛膜增厚,全身皮肤充血,翅尖、趾、胸部毛孔、颈、喙均有较严重的出血点,胚肝边缘出血,心脏和后脑出血,头部皮下及两肋皮下水肿。接种后 7 d 以上死亡的鹅胚或番鸭胚胚体发育停滞,胚体小。出现以上胚体病变可初步判定为病毒分离阳性,但需进一步鉴定是否为小鹅瘟病毒。

3.2 病毒检测及鉴定

3.2.1 琼脂扩散试验

3.2.1.1 仪器

灭菌的二重皿、湿盒、打孔器(中心 1 孔,周围 6 孔,孔径 3 mm,孔距 4 mm)、37℃温箱、烧杯、搅拌棒、电磁炉。

3.2.1.2 试剂

标准小鹅瘟阳性血清、小鹅瘟阴性血清、标准小鹅瘟琼脂扩散抗原、琼脂粉、0.015 mol/L pH 7.2 PB(见 A.1)、生理盐水(见 A.9)、氯化钠。

3.2.1.3 试验方法及程序

3.2.1.3.1 待检小鹅瘟琼脂扩散抗原

制备方法见附录 B。

3.2.1.3.2 琼脂板制备

称取琼脂粉 1 g,量取 100 mL 的 PB(见 A.1)或生理盐水(见 A.9),置于烧杯中加热融解,琼脂粉溶解后再加入氯化钠 8 g,混匀,制成 3 mm 厚的琼脂板。

3.2.1.3.3 打孔

在制备好的琼脂板上用琼扩打孔器进行打孔,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。

3.2.1.3.4 加样

中央孔加标准阳性小鹅瘟琼扩血清或抗小鹅瘟病毒单克隆抗体;周围 1 孔加入标准小鹅瘟琼扩抗原,其他孔加待检抗原。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,置于 20℃~25℃室温或 37℃温箱,24 h 初判,72 h 终判。

3.2.1.4 质控标准

当标准琼扩抗原孔与阳性血清孔之间形成清晰沉淀线时,说明质控合格。

3.2.1.5 结果判定

待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,即待检抗原判为阳性。

待检抗原孔与阳性血清孔或单克隆抗体孔之间无沉淀线出现,即待检抗原判为阴性。

3.2.2 夹心酶联免疫吸附试验(夹心 ELISA)

3.2.2.1 仪器

96孔酶标板、多孔道移液器(50 μL ~300 μL)、单孔道移液器(10 μL 、200 μL 、1 000 μL)、吸水纸、稀释加样槽、37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温箱、酶标仪。

3.2.2.2 试剂

纯化的抗小鹅瘟病毒单克隆抗体、HRP 酶标记的不同表位抗小鹅瘟病毒单克隆抗体、标准小鹅瘟病毒(SYG61株)尿囊液、阴性鹅胚或番鸭胚尿囊液、待检鹅胚或番鸭胚尿囊液(见 3.1.4.3)、待检病料(见附录 C)、生理盐水(见 A.9)、5%脱脂乳(见 A.6)、PBS(见 A.2)、PBST(见 A.3)、碳酸盐包被缓冲液(见 A.4)、TMB 显色液(见 A.5)、2 mol/L H_2SO_4 (见 A.10)。

3.2.2.3 试验方法及程序

3.2.2.3.1 将小鹅瘟单克隆抗体用碳酸盐包被液稀释为 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在 96 孔酶标板中每孔加入 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 12 h~14 h。

3.2.2.3.2 用 PBST 洗涤 1 次,5 min。

3.2.2.3.3 加入 5%脱脂乳至满孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴封闭 2 h。

3.2.2.3.4 用 PBST 洗涤 2 次,5 min/次;拍干,可加干燥剂并进行密封,4 $^{\circ}\text{C}$ 或室温保存。

3.2.2.3.5 将阴性鹅胚或番鸭胚尿囊液加入 A1、A2 孔中,将标准小鹅瘟病毒阳性尿囊液加入 A3、A4 孔中,其他待检鹅胚、番鸭胚尿囊液或待检病料样本分别加入 A5、A6 等各孔中,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴作用 1.5 h。

3.2.2.3.6 用 PBST 洗涤 3 次,5 min/次。

3.2.2.3.7 用 PBST 稀释酶标单克隆抗体至工作浓度,加入上述各孔中,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴作用 1 h。

3.2.2.3.8 用 PBST 洗涤 5 次,5 min/次。

3.2.2.3.9 加入新鲜配置的 TMB 底物显色液,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴作用 15 min。

3.2.2.3.10 终止:加入 2 mol/L H_2SO_4 ,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,在酶标仪上读取 OD_{450} 值。

3.2.2.4 质控标准

小鹅瘟病毒标准株(SYG61)尿囊液应 $\text{OD}_{450} \geq 0.5$,阴性鹅胚尿囊液应 $\text{OD}_{450} \leq 0.2$,则试验成立。

3.2.2.5 结果判定

待检尿囊液或待检病料样品的 $\text{OD}_{450} \geq 0.298$ 时为阳性, $\text{OD}_{450} \leq 0.2$ 时为阴性,当 $0.2 < \text{OD}_{450} < 0.298$ 时判为可疑。

3.2.3 冰冻切片免疫荧光方法

3.2.3.1 仪器

阳离子载玻片、手术刀片、组织包埋器、冰冻切片机、37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴培养箱、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱、荧光显微镜。

3.2.3.2 试剂

已处理的发病鹅或病死鹅肝脏、肠和脾脏冰冻切片(见附录 D)、正常鹅肝脏、脾脏或肠冰冻切片(见附录 D)、已知阳性发病鹅测肝脏冰冻切片、组织包埋剂、抗小鹅瘟病毒单克隆抗体、FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体、50%甘油(见 A.7)、丙酮、乙醇、PBS(见 A.2)。

3.2.3.3 方法及程序

3.2.3.3.1 将 3.2.3.2 中的冰冻切片组织先用 PBS 湿润。

3.2.3.3.2 将小鹅瘟单克隆抗体用 PBS 稀释至工作浓度,加在冰冻切片上,覆盖所有组织面;37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。

3.2.3.3.3 用 PBS 洗涤 3 次,5 min/次。

3.2.3.3.4 加入工作浓度 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 荧光抗体,加在冰冻切片上,覆盖所有组织面;37℃ 水浴孵育 30 min。

3.2.3.3.5 用 PBS 洗涤 5 次,5 min/次,加 50% 的甘油 PB 封片,荧光显微镜下观察结果。

3.2.3.4 质控标准

正常鹅肝脏、脾脏或肠冰冻切片未见亮绿色荧光,已知阳性肝脏冰冻切片出现亮绿色荧光,则试验成立。

3.2.3.5 结果判定

待检样品冰冻切片在荧光显微镜下见到亮绿色核内荧光,判为阳性;未见明显亮绿色荧光,判为阴性。

3.2.4 PCR 方法

3.2.4.1 仪器

单孔道微量移液器(10 μ L、200 μ L、1 000 μ L)、台式高速离心机($\geq 10\ 000$ r/min)、核酸扩增仪、核酸电泳仪、涡旋振荡器、胶槽、紫外凝胶成像系统。

3.2.4.2 耗材

0.2 mL PCR 管、Eppendorf 管(微量离心管)。

3.2.4.3 试剂

10 \times PCR Buffer、25 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L dNTP、引物 F 和 R(见附录 E)、Taq DNA 聚合酶、灭菌去离子水、DL2 000 标准 DNA、待检样品基因组 DNA、小鹅瘟阳性基因组 DNA、琼脂粉、TAE 缓冲液(见 A. 8)、溴化乙锭、6 \times 核酸电泳缓冲液、10%SDS、蛋白酶 K、核酸提取试剂盒、无水乙醇、70%乙醇。

3.2.4.4 试验方法及程序

3.2.4.4.1 待检样品基因组 DNA 提取

3.2.4.4.1.1 分别取标准小鹅瘟病毒阳性尿囊液、小鹅瘟病毒阴性尿囊液、待检鹅胚或番鸭胚尿囊液、待检病料(见附录 C)各 437.5 μ L 于 1.5 mL Eppendorf 管内,在 90℃ 水浴 10 min。

3.2.4.4.1.2 在 Eppendorf 管中加入 12.5 μ L 蛋白酶 K(终浓度为 500 μ g/mL)和 50 μ L 的 10%SDS。

3.2.4.4.1.3 将 Eppendorf 管置于 56℃ 水浴作用 40 min。

3.2.4.4.1.4 取出后,按核酸提取说明书提取组织 DNA。

3.2.4.4.1.5 最终用 30 μ L 超纯水重悬沉淀,并置于-20℃ 保存备用。

3.2.4.5 PCR 扩增体系及其参数

3.2.4.5.1 将引物 F 和 R 稀释到工作浓度为 10 pmol/ μ L。

3.2.4.5.2 每个 PCR 管中分别依次加入 33.5 μ L 的超纯水、5 μ L 的 10 \times PCR Buffer、5 μ L 的 25 mmol/L MgCl₂、2 μ L 的 10 mmol/L dNTP、各 1 μ L 的引物 F 和 R、0.5 μ L 的 Taq DNA 聚合酶。

3.2.4.5.3 在其中一支 PCR 管里加入 2 μ L 小鹅瘟阳性基因组 DNA,设为阳性对照;在另一支 PCR 管中加入 2 μ L 超纯水,设为阴性空白对照;在其他 PCR 管中分别加入 2 μ L 待检样品基因组 DNA 模板。

3.2.4.5.4 PCR 反应程序为:95℃ 预变性 5 min;随即进行 30 个循环:94℃ 变性 1 min、50℃ 退火 1 min、72℃ 延伸 2 min;最后 72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存备用。

3.2.4.6 琼脂糖凝胶电泳

3.2.4.6.1 配制 1% 的琼脂糖凝胶:称取 1 g 琼脂糖加入 100 mL 的 TAE 缓冲液,用微波炉煮沸。待琼脂溶解并适当冷却后,加入 2 μ L 溴化乙锭。随即将凝胶倒入准备好的胶槽,完全凝固后即可加样。

3.2.4.6.2 将 PCR 产物从 4℃ 取出后,加入 1/6 体积的 6×核酸电泳缓冲液,用微量移液器分别加入 Marker 和 PCR 产物,每孔 20 μL,进行电泳分析。最后,由紫外凝胶成像系统观察结果并拍照记录。

3.2.4.7 质控标准

阳性对照样品出现 776 bp 扩增条带,同时阴性对照样品无扩增目标条带,说明质控合格。

3.2.4.8 结果判定

待检样品扩增产物电泳出现 776 bp 目标条带,判为 PCR 扩增阳性,表明样品中存在小鹅瘟病毒核酸,送公司测序进一步确证。被检样品无扩增条带,判为 PCR 扩增阴性,表明样品中无小鹅瘟病毒核酸(参见附录 F)。

4 小鹅瘟血清特异性抗体的检测

4.1 琼脂扩散试验

4.1.1 仪器

灭菌的二重皿、湿盒、打孔器(中心 1 孔,周围 6 孔,孔径 3 mm,孔距 4 mm)、37℃ 温箱、烧杯、搅拌棒、电磁炉、单孔道移液器(10 μL、200 μL、1 000 μL)。

4.1.2 试剂

标准小鹅瘟阳性血清、标准阴性血清、标准小鹅瘟琼扩抗原、待检血清(见附录 G)、琼脂粉、0.015 mol/L pH 7.2 PB(见 A.1)、生理盐水(见 A.9)、氯化钠。

4.1.3 试验方法及程序

4.1.3.1 琼脂板制备

称取琼脂粉 1 g,量取 100 mL 的 PB(见 A.1),置烧杯容器中加热溶解,再加入氯化钠 8 g,溶解后混匀,制成 3 mm 厚的琼脂板。

4.1.3.2 打孔

在制备好的琼脂板上用打孔器打孔,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。

4.1.3.3 加样

中央孔加入标准小鹅瘟琼扩抗原,1 孔、4 孔加入标准小鹅瘟阳性血清和小鹅瘟阴性血清,其他孔分别加入待检血清;或 1 孔加入标准小鹅瘟阳性血清,其他孔分别加入倍增稀释的待检血清。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,置于 20℃~25℃ 室温或 37℃ 温箱,24 h 后初判,72 h 终判。

4.1.4 质控标准

当标准小鹅瘟阳性血清孔与标准琼扩抗原孔之间形成清晰沉淀线,小鹅瘟阴性血清与标准琼扩抗原孔之间未形成沉淀线时,说明质控合格。

4.1.5 结果判定

待检血清孔与抗原孔之间出现沉淀线,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;阴性血清孔和待检血清孔与抗原孔之间无沉淀线出现时,即待检血清判为阴性。

标准小鹅瘟琼扩抗原孔与待检血清之间形成清晰沉淀线的血清最高稀释倍数,即判为待检血清琼扩效价。

4.2 中和试验(鹅胚中和试验)

4.2.1 仪器

单孔道移液器(10 μL、200 μL、1 000 μL)、37℃ 温箱、37℃~38℃ 孵化箱。

4.2.2 耗材

灭菌试管(5 mL 或 10 mL)、1 mL 无菌注射器。

4.2.3 试剂

12 日龄无小鹅瘟病毒抗体的鹅胚、灭活的标准阴性血清、灭活并除菌的待检血清(见附录 G)、标准小鹅瘟病毒(SYG61 株)、生理盐水(见 A.9)。

4.2.4 试验方法及程序

先将标准小鹅瘟病毒用灭菌生理盐水做 10 倍递增系列稀释,分装到两列灭菌试管中。第一列分别加等量标准阴性血清混合作为对照组,第二列分别加等量待检血清混合,置于 37℃ 温箱作用 1 h。每个稀释度病毒液接种 5 枚 12 日龄无小鹅瘟病毒抗体的鹅胚,每胚尿囊腔接种 0.2 mL。置于 37℃~38℃ 孵化箱继续孵化,观察 9 d,记录每组鹅胚的存活数,计算半数鹅胚致死量(ELD₅₀)和中和指数。

4.2.5 质控标准

标准阴性血清混合对照组接种的鹅胚出现正常死亡,并且鹅胚死亡数随着病毒稀释倍数增加而逐渐减少,说明质控合格。

4.2.6 结果判定

中和指数为对照组与待检组 ELD₅₀ 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。

4.3 免疫荧光试验

4.3.1 仪器

单孔道微量移液器(10 μL、200 μL、1 000 μL)、多孔道微量移液器(50 μL~300 μL)、37℃ 水浴培养箱、荧光显微镜。

4.3.2 耗材

小鹅瘟病毒抗体检测板(见附录 H)。

4.3.3 试剂

待检血清(见附录 G)、标准小鹅瘟阳性血清、标准阴性血清、抗鹅 IgG 单克隆抗体、FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体、0.015 mol/L pH 7.2 PBS(见 A.2)、50% 甘油(见 A.7)。

4.3.4 试验方法及程序

4.3.4.1 将待检血清、已知标准阳性血清、已知标准阴性血清分别用 PBS 做 1:10 稀释,将稀释后的血清分别加入小鹅瘟病毒抗体检测板,100 μL/孔,37℃ 水浴 30 min。

4.3.4.2 用 PBS 洗涤 3 次,5 min/次。

4.3.4.3 加入工作浓度的抗鹅 IgG 单克隆抗体,100 μL/孔,37℃ 水浴 30 min。

4.3.4.4 用 PBS 洗涤 3 次,5 min/次。

4.3.4.5 加入工作浓度的 FITC 标记的抗小鼠 IgG 抗体,100 μL/孔,37℃ 水浴 30 min。

4.3.4.6 用 PBS 洗涤 5 次,5 min/次;加 50% 的甘油 PB 覆盖,100 μL/孔,荧光显微镜下观察结果。

4.3.5 质控标准

标准阳性血清应出现细胞核中亮绿色核内荧光,同时标准阴性血清应无亮绿色荧光,则试验成立。

4.3.6 结果判定

待检血清孔荧光显微镜下见到亮绿色核内荧光,判为阳性,阳性荧光主要表现为细胞核荧光;未见明显亮绿色荧光,判为阴性。

5 诊断结果

凡符合 2.4,并且 3.2.1、3.2.2、3.2.3、3.2.4 和 4.2 中任何一项阳性者,均诊断为小鹅瘟。

附录 A
(规范性附录)
溶液配制(试剂要求分析纯)

A.1 0.015 mol/L pH 7.2 PB

KCl 0.02 g, Na_2HPO_4 0.115 g(如为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 则为 0.289 g), KH_2PO_4 0.02 g, 将上述试剂依次溶于 1 000 mL 去离子水中。完全溶解后, 121℃ 高压灭菌 30 min, 置于 4℃ 冰箱中备用。

A.2 0.015 mol/L pH 7.2 PBS

在 100 mL PB(见 A.1)中加入 0.85 g 氯化钠。

A.3 PBST

在 100 mL PBS(见 A.2)中加入 0.05 mL 的 Tween 20。

A.4 0.05 mol/L 碳酸盐包被缓冲液

Na_2CO_3 0.32 g, NaHCO_3 0.58 g, 去离子水搅拌溶解后, 定容至 200 mL。

A.5 TMB 显色液配方(避光, 显色液现配现用)

10 mL TMB 底物显色母液、42 μL 0.75% 的 H_2O_2 、100 μL 10 mg/mL TMB, 混匀即可使用。

TMB 底物显色母液: 25.7 mL A 液, 24.3 mL B 液, 混匀后用去离子水定容至 100 mL。

A 液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mol/L, 即用 1 L 去离子水溶解 71.7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 。

B 液: 柠檬酸 0.1 mol/L, 即用 1 L 去离子水溶解 21.8 g 柠檬酸。

A.6 5% 脱脂乳

5 g 全脱脂奶粉溶于 100 mL PBS(见 A.2)中。

A.7 50% 甘油

100% 甘油与 PBS(见 A.2)1:1 充分混匀。

A.8 TAE 缓冲液**A.8.1 50×TAE 缓冲液**

A.8.1.1 称量 242 g Tris 以及 37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 于 1 L 烧杯中。

A.8.1.2 向烧杯中加入约 800 mL 去离子水, 充分搅拌均匀。

A.8.1.3 加入 57.1 mL 的冰乙酸, 充分溶解。

A.8.1.4 加去离子水定容至 1 L 后, 室温保存。

A.8.2 1×TAE 缓冲液

10 mL 50×TAE 加入 490 mL 去离子水, 充分混匀。

A.9 生理盐水

0.9 g 氯化钠溶于 100 mL 去离子水中,完全溶解后,121℃高压灭菌 30 min,置于 4℃冰箱中备用。

A.10 2 mol/L H₂SO₄

98%的浓硫酸与水 1 : 9 充分混匀。



附 录 B
(规范性附录)
待检琼扩抗原制备

待检琼扩抗原制备:分离病毒的鹅胚或番鸭胚尿囊液中加入等量三氯甲烷(氯仿),强烈振摇 10 min,6 000 r/min 离心 15 min。收集上层水相,装入已处理过的透析袋中。PEG6000 包埋,置于 4℃ 浓缩至原尿囊液的 1/50 体积,吸出置于无菌 1.5 mL Eppendorf 管内,加入 0.01% 硫柳汞防腐,-20℃ 保存,即为待检琼扩抗原。

附 录 C
(规范性附录)
待 检 病 料

待检病料:将疑似小鹅瘟病例的肝、脾、肠等病料加1倍体积的无菌生理盐水研磨成匀浆,反复冻融3次,转入Eppendorf管中,8 000 r/min离心10 min,取上清液,做待检样本。



附 录 D
(规范性附录)
病料采集及冰冻切片制备

病料采集及冰冻切片制备:发病鹅或病死鹅以及正常鹅肝脏、肠、脾脏,割成 $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}\times 0.4\text{ cm}$ 的小块,包埋剂覆盖,置于冰冻切片机冷冻台上速冻后进行切片。切成 $<5\text{ }\mu\text{m}$ 的薄片,并置于载玻片上,用 -20°C 预冷的丙酮:乙醇(3:2)固定5 min, PBS 洗涤一遍后晾干,备用。

附录 E
(规范性附录)
检测小鹅瘟病毒 PCR 引物

引物 F 和 R 序列见表 E.1。

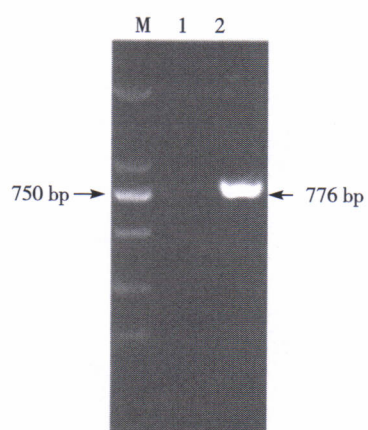
表 E.1 引物 F 和 R 序列

引物	目的	靶基因	序列(5'-3')	产物大小, bp
F	PCR	VP3	5'-GGAGTGGGTAAAGCCTCG-3'	776
R	PCR	VP3	5'-GGTCCTGGCAGCCAATTG-3'	



附录 F
(资料性附录)
小鹅瘟 PCR 扩增图

小鹅瘟 PCR 扩增图见图 F.1。



说明：

M——Marker；

1——阴性样品；

2——阳性样品。

图 F.1 小鹅瘟 PCR 扩增图

附 录 G
(规范性附录)
待 检 血 清 制 备

待检血清:无菌操作方法采取血液,分离血清,按 0.01%量加入硫柳汞防腐, -20℃保存待检。

附 录 H

(规范性附录)

小鹅瘟病毒抗体检测板的制备

用 96 孔细胞培养板培养 GEF 细胞,12 h~16 h 后,将 GPV 细胞适应毒(ZM 株)以 MOI 为 5.0 感染 GEF 细胞。感染 GPV 的 GEF 细胞培养 5 d 后弃去上清液,PBS(pH 7.2)洗一遍后,用-20℃预冷的丙酮:乙醇(3:2),室温固定 5 min;PBS(pH 7.2)洗一遍,吹干,-20℃保存,备用。

中华人民共和国
农业行业标准
小鹅瘟诊断技术
NY/T 560—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 1.25 字数 25千字

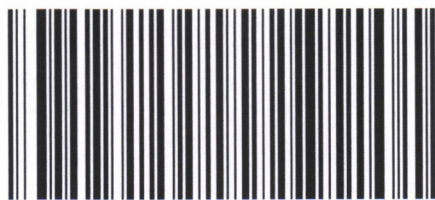
2018年8月第1版 2018年8月北京第1次印刷

书号: 16109·4524

定价: 30.00元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 560—2018