

DB4107

新 乡 市 地 方 标 准

DB 4107/T 431—2019

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

2019 - 10 - 12 发布

2019 - 11 - 01 实施

新乡市市场监督管理局

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），是根据地方流行性牛白血病琼脂凝胶免疫扩散试验实验方法（NY/T 574-2002）和我市实际情况制定的，是国际贸易指定的诊断方法。

本标准由新乡市农业农村局、新乡市质量技术监督局提出。

本标准起草单位：新乡市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：卢晓辉、鲁毅、马健、王玉锋、刘海林。

本标准于2019年10月12日首次发布。

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样品的采集、琼脂凝胶免疫扩散试验。
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 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。

NY/T 574 地方流行性牛白血病琼脂凝胶免疫扩散试验实验方法

3 样品的采集

3.1 防护用品及耗材

采样箱、塑料试管、1 mL兽用采血器、离心管、酒精棉球、干棉球、牛鼻钳子或绳子、不干胶标签、签字笔、记号笔、采样单、乳胶手套、线手套、防护服、防护帽、一次性手套、一次性鞋帽、试管架、自封袋、口罩等物品。

3.2 样品的采集

本实验要求采集的样品为牛全血，用于检测的样品为牛血清。样品采集方法应为牛颈静脉、尾静脉采血以及其他采集方法。

3.2.1 牛颈静脉采血

将牛保定好，稍抬头颈，于颈静脉沟上1/3与中1/3交界部剪毛（不剪也可以）消毒，一手拇指按压采血部位下方颈静脉沟血管，促使颈静脉怒张，如果不剪毛用手触摸，感觉圆滑、有弹性即是血管，另一手执5 mL注射器，与皮肤成45°由下方向上方刺入，血液顺器壁流入容器内，防止气泡产生。待量达到5 mL左右后，拔下注射器，用消毒棉球按压针眼，轻按止血，贴上标签，做好标记。注意将注射器回抽，以便析出血清。

3.2.2 牛尾静脉采血

将牛保定好，使牛尾向上翘。在尾根10 cm左右中点凹陷处，先用酒精棉球消毒，然后用换好的注射器垂直刺入（约1 cm深），针头触及尾骨后再退出1 mm进行抽血。采血结束，消毒并用干棉球按压止血。贴上标签，做好标记。注意将注射器回抽，以便析出血清。

3.3 样品的运输及保存。

在秋冬季节，可以常温运输。在炎热的春夏季节，应当在泡沫箱里，防止冰块，迅速运往实验室进行处理。

3.4 样品的处理

在进行样品处理前，应当注意观察血清是否析出，如若出现淡黄色血清析出，可直接用离心机离心，然后用1 mL移液器将血清移至离心管中，做好标记，冷冻保存；如若血清没有析出，则将样品放置进37 °C温箱中2 h，待血清析出后，再按照上面程序将血清处理、保存。

3.5 注意事项

3.5.1 做好个人防护工作，人员要按照要求穿戴防护用品。在样品采集的过程中要注意采样安全，防止被牛踢伤、咬伤以及被针扎伤等事故发生。

3.5.2 保证被检样品质量。在样品处理过程中，如若发现有样品出现胶冻样、溶血或者其他异常情况应当及时将样品废弃，补采。

3.5.3 保护动物福利，在样品采集过程中应尽量使动物不受伤害或者少受伤害。

4 琼脂凝胶免疫扩散试验

4.1 材料和试剂准备

打孔器(内径 5 mm)，琼脂糖（试剂级），平皿，标准阴性血清，标准阳性血清。

4.2 仪器和设备

微波炉，湿盒，打孔器

4.3 操作方法

4.3.1 琼脂糖凝胶板制备

在磷酸缓冲液（0.05 mol/L PH=7.2）100mL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，每个平皿内加琼脂糖溶液15到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 °C冰箱中保存10 d。

4.3.2 打孔

4.3.2.1 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。

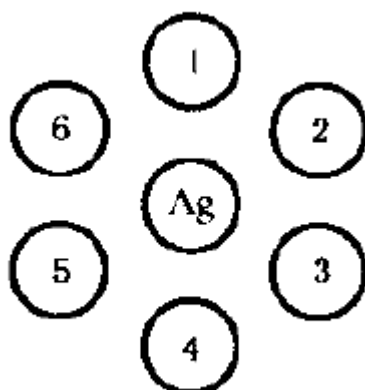


图1：琼脂糖凝胶板打孔示意图

4.3.2.2 打孔和封底

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。

4.3.2.3 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℃）作用，24 h和48 h各检查一次，检查时用斜射强光，背景要暗。

4.4 注意事项

4.4.1 在凝胶的制备过程中，应当缓慢制胶，以防止气泡的产生，影响实验结果。

4.4.2 反应过程中，琼脂板平皿的盖子应盖严，必要时可用交代固定。

4.4.3 在加样过程中，应当注意样品是否按照要求加入相关孔中。

4.5 结果判定

4.5.1 阳性

4.5.1.1 标准阳性血清与抗原孔之间有两条沉淀线。靠抗原孔的是 gp51（对乙醚敏感的囊膜蛋白）

4.5.1.2 抗体沉淀线，靠血清孔为 P24（抗乙醚的核蛋白）抗体沉淀线。

4.5.1.3 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 gp51gp 沉淀线完全融合。少数被检血清在 gp51 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 P24 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 gp51 沉淀线）。

4.5.2 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。

4.5.3 可疑

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。
