

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 551—2017  
代替 NY/T 551—2002

---

## 鸡产蛋下降综合征诊断技术

**Diagnostic techniques for egg drop syndrome**

2017-06-12 发布

2017-10-01 实施

---

中华人民共和国农业部 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 551—2002《产蛋下降综合征诊断技术》。与 NY/T 551—2002 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- “范围”部分增述了产蛋下降综合征病毒 PCR 检测方法的适用性;
- 对血凝和血凝抑制试验进行了修改;
- 删除了原标准中血清学诊断内容;
- 增加产蛋下降综合征病毒 PCR 检测方法。

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(SAC/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。

本标准主要起草人:刘胜旺、李慧昕、韩宗玺、王娟、邵昱昊。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- NY/T 551—2002。

# 鸡产蛋下降综合征诊断技术

## 1 范围

本标准规定了产蛋下降综合征的临床诊断和实验室诊断(病毒分离、血凝和血凝抑制试验及 PCR 检测方法)的技术方法和实验程序。

本标准适用于鸡产蛋下降综合征的诊断、监测和检疫。

## 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/T 16550 新城疫诊断技术

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**产蛋下降综合征 egg drop syndrome, EDS**

又名减蛋综合征,是由产蛋下降综合征病毒引起的一种无明显症状、仅表现产蛋母鸡产蛋量明显下降的疾病。

### 3.2

**产蛋下降综合征病毒 egg drop syndrome virus, EDSV**

产蛋下降综合征病毒为腺病毒科、腺胸腺病毒属成员,为 20 面体对称、无囊膜双链 DNA 病毒。

## 4 临床诊断

### 4.1 临床症状

4.1.1 鸡群在产蛋高峰期(27 周龄~49 周龄)产蛋下降 15%~50%,一般持续 4 周~10 周产蛋逐渐恢复到正常水平。

4.1.2 鸡蛋破损率 5%~20%。

4.1.3 鸡蛋中有较多的畸形蛋、软壳蛋、无壳蛋、薄壳蛋、砂壳蛋,时有水样蛋清,褐壳蛋鸡产浅壳蛋、白壳蛋。

4.1.4 不同品种鸡感染时,产褐壳蛋的品种减蛋甚于白壳蛋的品种。

### 4.2 病理变化

本病一般没有明显的特征性病理变化,可见输卵管卡他性炎症,偶见输卵管黏膜水肿和/或腔内有白色渗出物。

### 4.3 结果判定

鸡群出现 4.1 中任何一种临床症状和/或剖检出现 4.2 中的病理变化,可判定为疑似产蛋下降综合征,应进行实验室确诊。

## 5 实验室确诊

### 5.1 病毒分离

### 5.1.1 试剂

磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2), 配制方法见附录 A 的 A.1。

### 5.1.2 样品的采集和处理

按照 NY/T 541 的规定进行样品采集, 选择下列 1 种或 2 种样品:

- a) 扑杀疑似 EDSV 感染鸡, 取适量输卵管和卵泡膜样品, 研磨。加 PBS 制成 1:5 混悬液后冻融 3 次, 3 000 g 离心 10 min, 取上清, 加入青霉素(终浓度为 1 000 IU/mL)和链霉素(终浓度为 1 000  $\mu$ g/mL), 37℃作用 1 h。
- b) 采集劣质蛋清, 加等量 PBS, 并加入青霉素(终浓度为 1 000 IU/mL)和链霉素(终浓度为 1 000  $\mu$ g/mL), 37℃作用 1 h。

### 5.1.3 鸭胚接种及尿囊液收获

取孵育 10 日龄~12 日龄 SPF 鸭胚或来自产蛋下降综合征病毒抗体阴性鸭场的非免疫鸭胚, 将 0.2 mL 样品(5.1.2)经尿囊腔接种鸭胚, 另设接种 PBS 的鸭胚做对照, 37℃孵育。弃掉 48 h 内死亡的鸭胚, 收获 48 h~120 h 死亡和存活的鸭胚尿囊液。

## 5.2 分离物血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验鉴定

### 5.2.1 血凝试验

#### 5.2.1.1 材料

5.2.1.1.1 96 孔 V 型微量反应板。

5.2.1.1.2 微量移液器。

#### 5.2.1.2 试剂

5.2.1.2.1 EDSV 标准抗原。

5.2.1.2.2 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2), 配制方法见 A.2。

5.2.1.2.3 1%鸡红细胞悬液, 配制方法见附录 B。

#### 5.2.1.3 血凝试验操作步骤

按照 GB/T 16550 的规定执行。

5.2.1.3.1 取 96 孔 V 型微量反应板, 用微量移液器在 1 孔~12 孔每孔加 PBS 25  $\mu$ L。

5.2.1.3.2 吸取 25  $\mu$ L 标准抗原或者待检尿囊液的混悬液加入第 1 孔中, 吹打 3 次~5 次, 充分混匀。

5.2.1.3.3 从第 1 孔中吸取 25  $\mu$ L 混匀后的标准抗原或者待检尿囊液加到第 2 孔, 混匀后吸取 25  $\mu$ L 加入到第 3 孔, 依次进行系列倍比稀释到第 11 孔, 最后从第 11 孔吸取 25  $\mu$ L 弃之, 设第 12 孔为 PBS 对照。

5.2.1.3.4 每孔再加 25  $\mu$ L PBS。

5.2.1.3.5 每孔加入 25  $\mu$ L 1%的鸡红细胞悬液。

5.2.1.3.6 振荡混匀反应混合液, 20℃~25℃下静置 40 min 后观察结果, 或 4℃静置 60 min, PBS 对照孔的红细胞呈明显的纽扣状沉到孔底时判定结果。

#### 5.2.1.4 结果判定

结果判定细则如下:

- a) 在 PBS 对照孔出现红细胞完全沉淀的情况下, 将反应板倾斜, 观察各检测孔红细胞的凝集情况。以红细胞完全凝集的病毒尿囊液最大稀释倍数为该抗原的血凝滴度, 以使红细胞完全凝集的病毒尿囊液的最高稀释倍数为 1 个血凝单位(HAU)。
- b) 如果尿囊液没有血凝活性或血凝效价小于 4log<sub>2</sub>, 则用初代分离的尿囊液在 SPF 鸭胚或非免疫鸭胚中继续传代两代。若血凝试验检测仍为阴性, 则判定产蛋下降综合征病毒分离结果为阴性。
- c) 对于血凝试验呈阳性的样品, 应采用 EDSV 标准阳性血清进一步做血凝抑制试验, 并与 NDV

和 AIV 阳性血清(H7 亚型和 H9 亚型 AIV 阳性血清)进行鉴别诊断。

## 5.2.2 血凝抑制试验

### 5.2.2.1 材料

5.2.2.1.1 96 孔 V 型微量反应板。

5.2.2.1.2 微量移液器。

### 5.2.2.2 试剂

5.2.2.2.1 标准抗原:EDSV 抗原。

5.2.2.2.2 标准阳性血清:EDSV 标准阳性血清。

5.2.2.2.3 其他阳性血清:新城疫病毒(NDV)阳性血清,禽流感病毒(AIV)阳性血清(H7 亚型和 H9 亚型 AIV 阳性血清)。

5.2.2.2.4 阴性血清:SPF 鸡血清。

5.2.2.2.5 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L,pH 7.2),配制方法见 A.1。

5.2.2.2.6 1%鸡红细胞悬液,配制方法见附录 B。

### 5.2.2.3 4 个血凝单位(4HAU)的 EDSV 抗原制备

根据 5.2.1 测定的病毒尿囊液的 HA 效价,推定 4HAU 抗原的稀释倍数,配制抗原工作浓度。按下列方法计算:如尿囊液中病毒抗原的 HA 效价为  $9\log_2$ ,其 4HAU 为  $7\log_2$ ,则将尿囊液稀释 128 倍即可。稀释后,应将制备的 4HAU 进行 HA 效价测定以复核验证(见 5.2.1)。

### 5.2.2.4 血凝抑制试验操作步骤

5.2.2.4.1 按照 GB/T 16550 的规定执行。

5.2.2.4.2 根据血凝试验结果配制 4HAU 抗原(见 5.2.2.3)。

5.2.2.4.3 取 96 孔 V 型微量反应板,用移液器在第 1 孔~第 11 孔各加入 25  $\mu$ L PBS,第 12 孔加入 50  $\mu$ L PBS。

5.2.2.4.4 在第 1 孔加入 25  $\mu$ L EDSV 标准阳性血清,充分混匀后移出 25  $\mu$ L 至第 2 孔,倍比稀释至第 10 孔,第 10 孔弃去 25  $\mu$ L,第 11 孔为阳性对照,第 12 孔为 PBS 对照。

5.2.2.4.5 在第 1 孔~第 11 孔各加入 25  $\mu$ L 含 4HAU EDSV 抗原,轻晃反应板,使反应物混合均匀,室温下(20℃~25℃)静置不少于 30 min,4℃不少于 60 min。

5.2.2.4.6 每孔加入 25  $\mu$ L 的 1%鸡红细胞悬液,轻晃混匀后,室温(20℃~25℃)静置 40 min,或 4℃静置 60 min。当 PBS 对照孔红细胞呈明显纽扣状沉到孔底时判定结果。

5.2.2.4.7 若血凝抑制效价高于  $10\log_2$  时,可继续增加稀释的孔数。

### 5.2.2.5 与新城疫和禽流感鉴别诊断

应以 NDV 和 AIV 阳性血清对分离物做鉴别诊断,用 NDV 阳性血清和/或 AIV 阳性血清代替 EDSV 标准阳性血清,进行血凝抑制试验(见 5.2.2.4)。NDV 阳性血清和 AIV 阳性血清应不能对分离物产生血凝抑制,表 1 中示例结果表示 EDSV 分离结果阳性。

表 1 应用血凝抑制试验鉴定分离物

| 抗 原              | 血 清       |          |                |                |
|------------------|-----------|----------|----------------|----------------|
|                  | EDSV 阳性血清 | NDV 阳性血清 | H7 亚型 AIV 阳性血清 | H9 亚型 AIV 阳性血清 |
| 分离毒株             | +         | —        | —              | —              |
| EDSV 标准抗原        | +         | —        | —              | —              |
| 应进行新城疫、禽流感的鉴别诊断。 |           |          |                |                |

### 5.2.2.6 结果判定

结果判定细则如下：

- a) 在 PBS 对照孔出现正确结果的情况下，将反应板倾斜，判定 HI 滴度。HI 滴度是使红细胞完全不凝集（红细胞完全流下）的阳性血清最高稀释倍数。当阴性血清对标准抗原的 HI 滴度不大于  $2\log_2$ ，阳性血清对标准抗原的 HI 滴度与已知滴度相差在 1 个稀释度范围内，并且所用阴、阳性血清都不自凝的情况下，HI 试验结果方判定有效。
- b) 尿囊液血凝效价  $\geq 4\log_2$ ，且 EDSV 标准阳性血清对其血凝抑制效价  $\geq 4\log_2$  时判产蛋下降综合征病毒分离结果为阳性。
- c) NDV 阳性血清和 AIV 阳性血清应不能对分离物产生血凝抑制。

5.3 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测

5.3.1 试剂和材料

5.3.1.1 去离子水 (dH<sub>2</sub>O) 按照 GB/T 6682 的规定制备。

5.3.1.2 PCR 扩增用 DNA 聚合酶 (商品化试剂)。

5.3.1.3 琼脂糖凝胶 (配制方法见 A.3)。

5.3.1.4 病毒基因组 DNA 提取试剂盒 (商品化试剂盒)。

5.3.2 仪器

5.3.2.1 PCR 仪。

5.3.2.2 微量移液器。

5.3.2.3 小型离心机。

5.3.2.4 凝胶成像仪。

5.3.3 病毒基因组 DNA 提取

样品的采集和处理选择下列 1 种或 2 种：

- a) 取接种样品后 48 h~120 h 死亡或存活的鸭胚尿囊液于微量离心管中，3 000 g 离心 5 min，取上清 200  $\mu$ L，备用。
- b) 采集鸡输卵管组织，匀浆，将混悬液冻融 3 次，3 000 g 离心 5 min，取上清 200  $\mu$ L，备用。

阳性对照为含有 EDSV 的尿囊液，阴性对照为 SPF 鸭胚尿囊液或非免疫鸭胚尿囊液。应用商品化 DNA 提取试剂盒，按试剂盒说明书方法提取上述 a) 和/或 b) 样品病毒基因组以及阳性对照和阴性对照样品基因组 DNA。

5.3.4 PCR 检测

5.3.4.1 PCR 检测用引物序列如下：

EPF: 5'-TAATTTTCTCGGGACTTTTCG-3' (上游引物)；

EPR: 5'-ACAGATGAGGTTTGGAAGGA-3' (下游引物)。

5.3.4.2 在样品准备区内，按表 2 提供体系 (25  $\mu$ L) 配制 PCR 反应体系于 PCR 反应管中。

表 2 PCR 反应体系配置表

| 试 剂                      | 体积, $\mu$ L |
|--------------------------|-------------|
| dH <sub>2</sub> O        | 5.5         |
| 2 $\times$ Ex Taq premix | 12.5        |
| EPF                      | 1.0         |
| EPR                      | 1.0         |
| 模板 DNA                   | 5.0         |

5.3.4.3 同时设检测样品的模板空白对照，平行加样，体系同 5.3.4.1，模板用 dH<sub>2</sub>O 5.0  $\mu$ L 代替。

5.3.4.4 设 EDSV 基因组为阳性对照，阴性尿囊液提取的 DNA 为阴性对照，平行加样，体系同

5.3.4.2,模板用已知 EDSV 基因组 DNA 或阴性尿囊液提取的基因组 DNA 5.0  $\mu$ L。

5.3.4.5 将 PCR 反应管放入热循环仪(PCR 仪),按下列程序设置,进行 PCR 反应。

1 个循环: 94 $^{\circ}$ C 5 min

40 个循环: 94 $^{\circ}$ C 50 s

55 $^{\circ}$ C 45 s

72 $^{\circ}$ C 30 s

1 个循环: 72 $^{\circ}$ C 7 min

12 $^{\circ}$ C 保存 PCR 产物

5.3.4.6 PCR 反应结束后,PCR 反应管在电泳鉴定前可置 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

### 5.3.5 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物

5.3.5.1 配制 1 $\times$ TAE 缓冲液(见 A.3.2),制备 2%琼脂糖凝胶(见 A.3)。

5.3.5.2 取 10  $\mu$ L PCR 产物,根据加样缓冲液浓度标识按比例与加样缓冲液混合,进行电泳,加入 DNA Marker 作为分子标准。

5.3.5.3 连接电源,进行电泳,80 V~100 V(按电泳槽装置设定,电压 3 V/cm~5 V/cm)恒压电泳 20 min~30 min(Loading Buffer 指示电泳至大约凝胶的一半时),使用凝胶成像仪进行凝胶成像,拍照,记录结果。

### 5.3.6 结果判定

#### 5.3.6.1 实验成立的条件

EDSV 阳性对照应有大小约 0.43 kb(431 bp)扩增条带,阴性对照和模板空白对照应无扩增条带,说明 PCR 反应体系成立。

#### 5.3.6.2 阴阳性判定

符合 5.3.6.1 条件:

a) 检测样品中若有大小约 0.43 kb 扩增条带,说明样品中有 EDSV 基因组 DNA 存在,判定为阳性;

b) 检测样品中若无 0.43 kb 扩增条带,说明样品中没有 EDSV 基因组 DNA 存在,判定为阴性。

## 6 诊断结果判定

临床诊断符合第 4 章中规定的临床症状和病理变化,5.2 和/或 5.3 试验为阳性结果,可判定为产蛋下降综合征。

附 录 A  
(规范性附录)  
试 剂 配 制

A.1 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.2)的配制

A.1.1 成分

|                                                               |        |
|---------------------------------------------------------------|--------|
| 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) | 2.62 g |
| 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                             | 0.37 g |
| 氯化钠( $\text{NaCl}$ )                                          | 8.5 g  |

A.1.2 配制

将 A.1.1 成分加入定量容器内,加 800 mL 去离子水,充分搅拌溶解,用 NaOH 或 HCl 调 pH 至 7.2,定容至 1 000 mL,分装,112 kPa 灭菌 20 min,2℃~8℃保存备用。

A.2 50×TAE 缓冲液的配制(pH 8.0)

A.2.1 成分

|                                                    |        |
|----------------------------------------------------|--------|
| Tris                                               | 242 g  |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 37.2 g |

A.2.2 配制

将 A.2.1 成分加入定量容器内,加入 800 mL 去离子水,充分搅拌溶解,加入 57.1 mL 的冰醋酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ),充分混匀,用 NaOH 或 HCl 调 pH 至 8.0,加去离子水定容至 1 000 mL,室温保存。

A.3 2%琼脂糖凝胶的配制

A.3.1 成分

|           |        |
|-----------|--------|
| 琼脂糖       | 2 g    |
| 1×TAE 缓冲液 | 100 mL |

A.3.2 配制

取 50×TAE 缓冲液 2 mL,加入 98 mL 去离子水,配成 100 mL 1×TAE 缓冲液,加入三角烧瓶。将 A.3.1 成分加入三角烧瓶,加热充分溶解,当温度降低至约 50℃,加入 3 μL~5 μL EB 或 EB 替代物,混匀后倒入制胶模具内,插入齿梳,等待凝胶凝固。

**附 录 B**  
**(规范性附录)**  
**1%鸡红细胞悬液制备**

采集至少 3 只 SPF 公鸡或无产蛋下降综合征病毒、禽流感病毒和新城疫病毒抗体的非免疫鸡的抗凝血液,放入离心管中,加入 3 倍~4 倍体积的 PBS 混匀,以 2 000 r/min 离心 5 min~10 min。去掉血浆和白细胞层,重复以上过程,反复洗涤 3 次(洗净血浆和白细胞)。最后,吸取压积红细胞,用 PBS 配成体积分数为 1%的悬液,于 4℃保存备用。

---