

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 556—2020

代替 NY/T 556—2002

鸡传染性喉气管炎诊断技术

Diagnostic techniques for avian infectious laryngotracheitis

2020-11-12 发布

2021-04-01 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 556—2002《鸡传染性喉气管炎诊断技术》。与 NY/T 556—2002 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

- “范围”部分增述了聚合酶链式反应(PCR)、荧光定量 PCR 和琼脂免疫扩散试验方法的适用性;
- 增加了规范性引用文件(见第 2 章);
- 增加了缩略语(见第 3 章);
- 增加了流行病学、临床症状、剖检变化(见第 4 章);
- 增加了实验室诊断样品采集(见第 5 章);
- 增加了鸡传染性喉气管炎病毒 PCR 检测方法(见第 9 章);
- 增加了鸡传染性喉气管炎病毒荧光定量 PCR 检测方法(见第 10 章);
- 增加了诊断结果的判定(见第 11 章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

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:中国动物卫生与流行病学中心。

本标准起草人:蒋文明、刘朔、王素春、于晓慧、李阳、李金平、王静静、彭程、盖文燕、侯广宇、庄青叶、王楷宸、孙淑芳、刘华雷。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- NY/T 556—2002。

引 言

鸡传染性喉气管炎(Avian infectious laryngotracheitis, AILT)是一种由 α 疱疹病毒亚科禽疱疹病毒 1 型引起的鸡呼吸道疾病,也可感染野鸡、山鸡和孔雀。该病传播快,死亡率较高,其特征为呼吸困难,咳嗽,咳出含有血液的渗出物,喉部和气管黏膜肿胀、出血并形成糜烂。目前国内主要使用活疫苗进行免疫,这些活疫苗毒力普遍偏强,接种后反应大,而且这些疫苗与强毒株一样也能导致持续感染。

由于本病临床症状和观察到的病理变化差异很大,免疫鸡群可排毒或者病毒潜伏感染而不表现临床症状,激活后可造成发病,难以与其他呼吸道疾病区别。确诊应进行实验室检测,通常检测病原。

近年来,国内外鸡传染性喉气管炎诊断技术发展迅速。一些更为简便和准确的诊断新技术已经成为鸡传染性喉气管炎诊断和预防的重要依据。本标准的修订参考了 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2016 版),并结合我国相关技术研究新成果修订,在技术上与国际先进技术保持一致。

鸡传染性喉气管炎诊断技术

1 范围

本标准规定了鸡传染性喉气管炎的临床症状、病毒分离、血清中和试验、琼脂免疫扩散试验、聚合酶链式反应(PCR)和荧光定量 PCR 的技术要求。

本标准适用于传染性喉气管炎的诊断、检疫、检测、监测和流行病学调查监测。

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 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EID₅₀:鸡胚半数感染量(50% egg infections dose)

ILT:传染性喉气管炎(Infectious laryngotracheitis)

ILTV:传染性喉气管炎病毒(Infectious laryngotracheitis virus)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

SPF:无特定病原体(Specific pathogen free)

TAE:三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸(Trihydroxymethyl aminomethane-acetic acid-ethylene diaminetetra acetic acid)

4 临床诊断

4.1 流行病学

4.1.1 各种年龄和品种的鸡都易感,多发于 12 月龄以下的鸡,一年四季均可发生。

4.1.2 潜伏期随流行病毒的毒力而有所差别,通常为 2 d~6 d。易感集群发生强毒株流行时,潜伏期可缩短至 1 d~2 d。

4.1.3 死亡率为 5%~70%。

4.2 临床症状

4.2.1 最急性型

4.2.1.1 发病突然,呼吸困难,伸颈呼吸,伴随咯咯声或咳嗽声。

4.2.1.2 在鸡舍墙壁、地面可见咳出的血凝块。

4.2.1.3 传播迅速,发病率高,死亡率可超过 50%。

4.2.2 亚急性型

4.2.2.1 发病较慢,呼吸道症状持续数天。

4.2.2.2 与急性型相比,发病率高,但死亡率较低,为 10%~30%。

4.2.3 慢性型或温和型

4.2.3.1 突发咳嗽和气喘,伴有口鼻流液和产蛋下降。

4.2.3.2 发病率仅为 1%~2%,但大部分的感染发病鸡最终会因窒息而死。

4.3 剖检变化

4.3.1 最急性型

带有血凝块的出血性气管炎,黏液性鼻炎,沿着气管分布带血黏液。

4.3.2 亚急性型

气管中有带血或不带血的黏液性渗出物,在喉和气管上部黏膜上附着有黄白色纤维素性干酪样假膜。

4.3.3 慢性型或温和型

4.3.3.1 可见气管、喉和口腔内有白喉样和干酪样的坏死斑和阻塞物。

4.3.3.2 有时可仅有结膜炎、窦炎和黏液性气管炎。

4.4 结果判定

符合上述流行病学、临床症状和剖检变化的病例,可判为疑似鸡传染性喉气管炎。确诊应采集有临床症状鸡的组织或血清进行实验室诊断。

5 实验室诊断样品采集

5.1 器材

5.1.1 手术剪刀和镊子。

5.1.2 离心管。

5.1.3 样品保存管。

5.1.4 组织匀浆器。

5.1.5 采血器。

5.2 试剂

5.2.1 生理盐水,配方见附录 A 中的 A.1。

5.2.2 青霉素。

5.2.3 链霉素。

5.3 样品采集

5.3.1 生物安全措施

样品采集、保存与运输按照 NY/T 541 的规定执行。

5.3.2 组织病料采集

5.3.2.1 活禽采样:用灭菌棉拭子深入口咽或气管采集分泌物(以气管为佳),放入含青霉素 4 000 IU/mL 和链霉素 4 mg/mL 的无菌生理盐水中。也可用棉拭子刮取眼分泌物,处理方法同上。

5.3.2.2 病死禽采样:无菌采取病死鸡喉头和气管,放入无菌的平皿中,密封保存。

5.3.3 血清样品采集

经翅静脉采集鸡血液,每只应不少于 1 mL。无菌分离血清,装入 2 mL 离心管中,密封后 2℃~8℃冷藏或-20℃冷冻保存。

5.4 样品处理

5.4.1 棉拭子样品:经剧烈振荡后,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为接种材料。

5.4.2 组织样品:无菌条件下将组织剪碎,按 1:4 加入生理盐水(青霉素 4 000 IU/mL 和链霉素 4 mg/mL)后组织研磨器制成匀浆,反复冻融 2 次~3 次,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为接种和检测材料。

6 病毒分离

6.1 器材

6.1.1 组织研磨器。

6.1.2 恒温孵化箱。

- 6.1.3 手持式照蛋器。
- 6.1.4 台式高速离心机。
- 6.1.5 冰箱(2℃~8℃和-20℃)。
- 6.1.6 SPF 鸡胚。
- 6.1.7 眼科剪。
- 6.1.8 镊子。
- 6.1.9 离心管。

6.2 试剂

- 6.2.1 生理盐水(见 A.1)。
- 6.2.2 0.015 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)(见 A.2)。
- 6.2.3 青霉素。
- 6.2.4 链霉素。

6.3 鸡胚接种

- 6.3.1 取上清液接种 10 日龄~12 日龄的鸡胚绒毛尿囊膜上,0.2 mL/枚,至少接种 5 枚鸡胚。置于 37℃ 孵育。
- 6.3.2 每日照胚,连续观察 7 d。弃 24 h 内死亡的鸡胚,每 12 h 观察鸡胚死亡情况,收集 24 h~168 h 内死亡的鸡胚和 168 h 后仍存活的鸡胚,观察绒毛尿囊膜是否有痘斑出现。
- 6.3.3 有痘斑者,取出鸡胚绒毛尿囊膜和尿囊液,无菌研磨后,置于-18℃ 保存备用。
- 6.3.4 无痘斑者,取出鸡胚绒毛尿囊膜和尿囊液,无菌研磨,冻融 3 次后,离心,接种 10 日龄~12 日龄的鸡胚绒毛尿囊膜盲传。盲传 3 代,如仍无病变,则判为鸡传染性喉气管炎阴性。

6.4 结果判定

鸡胚绒毛尿囊膜出现痘斑,可初步判定为病毒分离阳性,但需要进一步鉴定是否为传染性喉气管炎病毒。

7 血清中和试验

7.1 器材

- 7.1.1 移液器(10 μ L、100 μ L、1 000 μ L 等规格)。
- 7.1.2 37℃ 温箱。
- 7.1.3 灭菌试管。
- 7.1.4 无菌注射器(1 mL)。

7.2 试剂

- 7.2.1 10 日龄~12 日龄 SPF 鸡胚。
- 7.2.2 灭活的标准阳性血清(中和效价在 1:32 以上)。
- 7.2.3 标准阴性血清。
- 7.2.4 生理盐水。

7.3 试验步骤

- 7.3.1 将病毒分离物用含青霉素 1 000 IU/mL 和链霉素 1 000 μ g/mL 的灭菌生理盐水进行 10 倍比系列稀释,分装到 2 列灭菌试管中。第 1 列分别加等量的标准阳性血清,第 2 列分别加等量的标准阴性血清,将病毒-血清悬液混合并置于冰箱(2℃~8℃)4 h。
- 7.3.2 每个稀释度分别接种 5 枚 10 日龄~12 日龄的鸡胚绒毛尿囊膜,0.2 mL/枚,置于 37℃ 孵育。每日照胚,连续观察 7 d。收集 24 h~168 h 内死亡的鸡胚和 168 h 后仍存活的鸡胚,观察绒毛尿囊膜是否有痘斑出现。

7.3.3 记录观察结果,按半数感染量(Reed-Muench)方法计算 EID_{50} ,计算方法见附录 B。

7.4 结果判定

如分离物能引起鸡胚绒毛尿囊膜出现典型的痘斑,并且经鸡胚中和试验,其阴性血清组和阳性血清组的 EID_{50} 的对数之差大于或等于 2.0 时,则判定分离物为鸡传染性喉气管炎病毒。

8 琼脂免疫扩散试验

8.1 器材

- 8.1.1 37℃温箱。
- 8.1.2 烧杯。
- 8.1.3 搅拌棒。
- 8.1.4 电磁炉。
- 8.1.5 单道移液器(10 μ L、100 μ L、1 000 μ L 等规格)。
- 8.1.6 灭菌平皿。
- 8.1.7 湿盒。
- 8.1.8 打孔器(中心 1 孔,周围 6 孔,孔径 3 mm,孔距 4 mm)。

8.2 试剂

- 8.2.1 标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清。
- 8.2.2 标准鸡传染性喉气管炎病毒阴性血清。
- 8.2.3 标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阳性抗原。
- 8.2.4 标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阴性抗原。
- 8.2.5 琼脂糖。
- 8.2.6 0.015 mmol/L pH 7.2 PB(见 A.3)。
- 8.2.7 生理盐水(见 A.1)。
- 8.2.8 氯化钠。

8.3 试验程序

8.3.1 琼脂板制备

见附录 C 中的 C.1。

8.3.2 打孔、封底

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,在火焰上封底。

8.3.3 加样

8.3.3.1 病原检测

中心孔加入标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清,第 1 孔、第 4 孔加入标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阳性抗原和标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阴性抗原,其他孔分别加入待检样品(见附录 C),20 μ L/孔。静置 5 min~10 min,将加样后的平皿轻轻倒置放入填有湿纱布的盒内,置于 37℃温箱,分别在 24 h~48 h 观察并记录结果。

8.3.3.2 抗体检测

中心孔加入标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阳性抗原,第 1 孔、第 4 孔加入标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清和标准鸡传染性喉气管炎病毒阴性血清,其他孔分别加入待检血清;或第 1 孔加入标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清,其他孔分别加入倍比稀释的待检血清(见附录 C),20 μ L/孔。将加样后的琼脂板放入填有湿纱布的盒内,置于 37℃温箱,分别在 24 h~48 h 观察并记录结果。

8.4 结果判定

8.4.1 试验成立条件

标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清与鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阳性抗原孔之间形成清晰沉淀线,标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清与鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阴性抗原孔之间未形成清晰沉淀线。

8.4.2 结果判定

8.4.2.1 病原检测

待检样品孔与标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清孔之间出现沉淀线,且与标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阳性抗原沉淀线末端相吻合,即待检样品判为阳性;待检样品孔与标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清孔之间无沉淀线出现时,即待检样品判为阴性。

8.4.2.2 抗体检测

待检血清孔与标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阳性抗原孔之间出现沉淀线,且与标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清沉淀线末端相吻合,即待检血清判为阳性;待检血清孔与标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阳性抗原孔之间无沉淀线出现时,即待检血清判为阴性。

标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阳性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。

9 聚合酶链式反应(PCR)

9.1 器材

- 9.1.1 PCR 扩增仪。
- 9.1.2 台式低温高速离心机。
- 9.1.3 电泳仪和水平电泳槽。
- 9.1.4 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。
- 9.1.5 微量可调移液器(10 μ L、100 μ L、1 000 μ L 等规格)。
- 9.1.6 离心管(1.5 mL)与吸头。
- 9.1.7 PCR 扩增管(0.2 mL)。

9.2 试剂

9.2.1 PCR 试剂

- 9.2.1.1 PCR 试剂盒。
- 9.2.1.2 灭菌去离子水。
- 9.2.1.3 引物:

ICP4-1F:5'-ACTGATAGCTTTTCGTACAGCACG-3';

ICP4-1R:5'-CATCGGGACATTCTCCAGGTAGCA-3'。

9.2.2 电泳试剂

- 9.2.2.1 电泳缓冲液:50 $\times$ TAE 储存液配方见 A.4,临用时加蒸馏水配成 1 $\times$ TAE 缓冲液配方见 A.5。
- 9.2.2.2 琼脂糖:国产或进口的低熔点琼脂糖。
- 9.2.2.3 电泳加样缓冲液:配方见 A.6。
- 9.2.2.4 DNA Marker(标准分子量):分子大小范围为 100 bp~2 000 bp。

9.3 样品准备

- 9.3.1 阳性对照:已知病毒材料,如 ILTV 感染的鸡胚。
- 9.3.2 阴性对照:未感染的鸡胚。

9.4 试验程序

9.4.1 核酸提取

9.4.1.1 病毒 DNA 抽提

见附录 D 中的 D.1。

9.4.1.2 核酸提取等效方法

可采用等效 DNA 提取试剂和方法,如采用自动化核酸提取仪和配套核酸抽提试剂进行核酸提取。

9.4.2 核酸扩增

9.4.2.1 引物:将引物(ICP4-1F/1R)稀释到工作浓度 10 pmol/ μ L。

9.4.2.2 PCR 反应混合液配制:按照 PCR 试剂盒说明书配制反应体系,每个 PCR 管中加入各 1 μ L 上下游引物(ICP4-1F/1R)。

9.4.2.3 PCR 扩增:在其中一个 PCR 管中加入 5 μ L 鸡传染性喉气管炎病毒 DNA,设为阳性对照;在另一个 PCR 管中加入 5 μ L 超纯水,作为阴性空白对照;在其他 PCR 管中分别加入 5 μ L 待检样品 DNA 模板。盖紧管盖,放入扩增仪中按照设定程序扩增:95℃预变性 5 min;然后进行 35 个循环:94℃变性 30 s、55℃退火 30 s、72℃延伸 45 s;最后 72℃延伸 5 min;4℃保存备用。

9.4.3 扩增产物电泳检测

9.4.3.1 1.0%琼脂糖凝胶板的制备:见附录 E。

9.4.3.2 加样:取 6 μ L~8 μ L PCR 扩增产物和 2 μ L 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳同时设标准 DNA Marker、阴性对照、阳性对照。

9.4.3.3 电泳:电压 80 V~100 V 或电流 40 mA~50 mA,电泳 30 min~40 min。最后,由凝胶成像系统观察并拍照记录。

9.5 试验成立条件

阳性对照品出现 689 bp 扩增条带,同时阴性对照品无扩增条带(参见附录 F)。

9.6 结果判定

符合 9.5 的条件,待检样品扩增产物电泳出现 689 bp 目标条带,判为 PCR 扩增阳性,表明样品中存在鸡传染性喉气管炎病毒核酸;被检样品无扩增条带,判为 PCR 扩增阴性,表明样品中无鸡传染性喉气管炎病毒核酸。对于 PCR 结果阳性的样品,可以进一步通过测序以区分野毒与疫苗毒。

10 荧光定量 PCR

10.1 器材

10.1.1 荧光定量 PCR 扩增仪。

10.1.2 台式低温高速离心机。

10.1.3 微量可调移液器(10 μ L、100 μ L、1 000 μ L 等规格)。

10.1.4 离心管与吸头。

10.1.5 PCR 扩增管(0.2 mL)。

10.2 试剂

10.2.1 荧光定量 PCR 试剂盒。

10.2.2 灭菌去离子水。

10.2.3 引物和探针:

ILTVgCU771:5'-CCTTGCGTTTGAATTTTCTGT-3';

ILTVgCL873:5'-TTCGTGGGTTAGAGGTCTGT-3';

ILTVprobe817:FAM-CAGCTCGGTGACCCCATCTA-BHQ1。

10.3 样品准备

同 9.3。

10.4 核酸提取

同 9.4.1。

10.5 核酸检测

10.5.1 将引物(ILTVgCU771/ ILTVgCL873)和探针(ILTV probe817)稀释到工作浓度 10 pmol/ μ L。

10.5.2 按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书配制反应体系,每个 PCR 管中各加入 1 μ L 上下游引物、0.5 μ L 探针。

10.5.3 在其中一个 PCR 管中加入 5 μ L 鸡传染性喉气管炎病毒 DNA,设为阳性对照;在另一个 PCR 管中加入 5 μ L 超纯水,作为阴性空白对照;在其他 PCR 管中分别加入 5 μ L 待检样品 DNA 模板。

10.5.4 定量 PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min;然后进行 40 个循环:95℃ 10 s、60℃ 30 s(检测荧光信号)。

10.6 结果判定

10.6.1 成立条件

参见附录 G 荧光定量 PCR 图示,阳性对照品扩增曲线有明显对数增长期,且 C_t 值 $\leq$ 35;同时,阴性对照品扩增曲线无对数增长期。

10.6.2 结果判定

试验成立时,按如下方式判定:

- a) 样品 C_t 值 $\leq$ 35,且出现标准的 S 形扩增曲线,判为阳性;
- b) 样品无 C_t 值或 C_t 值 $>$ 38,且无标准扩增曲线,判为阴性;
- c) 样品 $35 < C_t$ 值 $\leq$ 38,且扩增曲线均呈标准的 S 形曲线,判为可疑,需重新检测。如重复后仍然为上述结果,判为阳性,否则判为阴性。

11 诊断结果

11.1 凡符合 4.4,并且 7.4、8.4.2.1、9.6 或 10.6 中任何一项阳性者,均诊断为鸡传染性喉气管炎。

11.2 被检鸡虽然没有明显的临床症状和病理变化,但病原检测符合 11.1 的病原检测判定标准,可判定为鸡传染性喉气管炎病毒感染。

附 录 A
(规范性附录)
溶液配制(试剂要求分析纯)

A.1 生理盐水

氯化钠(NaCl)	9.0 g
加去离子水至	1 000 mL
121℃高压灭菌 30 min,置于4℃冰箱备用。	

A.2 0.015 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2)

氯化钠(NaCl)	8.5 g
氯化钾(KCl)	0.02 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.289 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.02 g
去离子水	800 mL
调节 pH	7.2
加去离子水至	1 000 mL
121℃高压灭菌 30 min,置于4℃冰箱备用。	

A.3 0.015 mol/L PB (pH 7.2)

氯化钾(KCl)	0.02 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.289 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.02 g
去离子水	800 mL
调节 pH	7.2
加去离子水至	1 000 mL
121℃高压灭菌 30 min,置于4℃冰箱备用。	

A.4 50×TAE 储存液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242.0 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH 8.0)	100.0 mL
加双蒸水至	1 000 mL

A.5 1×TAE 缓冲液

使用前将 50×TAE 做 50 倍稀释即可。

A.6 电泳加样缓冲液

溴酚蓝	0.25 g
甘油	30.0 mL
双蒸水	70.0 mL

A.7 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)

EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	186.1 g
去离子水	800 mL
用 NaOH 调节 pH	8.0
加去离子水至	1 000 mL
121℃ 高压灭菌 30 min, 置于 4℃ 冰箱备用。	

A.8 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)

Tris-Base	121 g
去离子水	800 mL
用 HCl 调节 pH	8.0
加去离子水至	1 000 mL
121℃ 高压灭菌 30 min, 置于 4℃ 冰箱备用。	

A.9 5 mol/L NaCl

NaCl	300 g
去离子水	800 mL
加去离子水至	1 000 mL
121℃ 高压灭菌 30 min, 置于 4℃ 冰箱备用。	

A.10 酚：氯仿：异戊醇(25：24：1)

将 Tris 饱和酚(pH 8.0)、氯仿、异戊醇按照体积比 25：24：1 配置混匀, 装入棕色瓶, 最后加入 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 保护液, 4℃ 冰箱保存备用。

A.11 DNA 提取裂解液

1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)	100 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	100 mL
5 mol/L NaCl	300 mL
去离子水	500 mL

121℃ 高压灭菌 30 min, 用时加入 CTAB(W/V=1.5%), 加热溶解, 用前在通风橱内加入 1% 的巯基乙醇(现用现配)。

附录 B
(规范性附录)

鸡胚半数感染量(EID₅₀)测定方法(Reed-Muench 法)

B.1 定义

鸡胚半数感染量(EID₅₀)指能使 50% 鸡胚感染的病毒量,常用 Reed-Muench 法计算。

B.2 计算公式

$\lg \text{EID}_{50} = \text{高于 } 50\% \text{ 感染率的病毒稀释度的对数} + \text{距离比} \times \text{稀释系数的对数}$

$\text{距离比} = \frac{\text{高于 } 50\% \text{ 的百分数} - 50\%}{\text{高于 } 50\% \text{ 的百分数} - \text{低于 } 50\% \text{ 的百分数}}$

B.3 举例

病毒鸡胚半数感染量测定(接种量 0.1 mL/枚),见表 B.1。

表 B.1 病毒各稀释度的感染数

病毒稀释度	鸡 胚		累计数		感染数/总数	感染百分数, %
	感染数	未感染数	感染数	未感染数		
10 ⁻⁴	5	0	12	0	12/12	100
10 ⁻⁵	4	1	7	1	7/8	88
10 ⁻⁶	2	3	3	4	3/7	43
10 ⁻⁷	1	4	0	8	1/9	11

$$\text{距离比} = \frac{88\% - 50\%}{88\% - 43\%}$$
$$= 0.84$$

$$\lg \text{EID}_{50} = -5 + 0.84 \times (-1)$$
$$= -5.84$$

$$\text{EID}_{50} = 10^{-5.84} / 0.1 \text{ mL}$$

最终以平均值±标准误表示 EID₅₀。

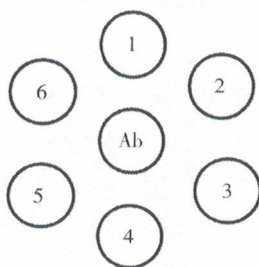
附 录 C
(规范性附录)
琼脂平板的制备

C.1 琼脂平板的制备

称取琼脂糖 1 g,量取 100 mL 的 PB,置于烧杯中加热溶解,再加入氯化钠 8 g,溶解后混匀,制成 3 mm 厚的琼脂板。

C.2 琼脂免疫扩散试验(抗原检测)示意图

见图 C.1。



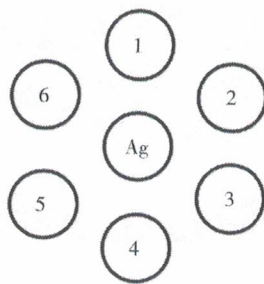
说明:

- Ab——标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清;
- 1——标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阳性抗原;
- 4——标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阴性抗原;
- 2、3、5、6——待检样品。

图 C.1 抗原检测图

C.3 琼脂免疫扩散试验(抗体检测)示意图

见图 C.2。



说明:

- Ag——标准鸡传染性喉气管炎病毒琼扩阳性抗原;
 - 1——标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性抗原;
 - 4——标准鸡传染性喉气管炎病毒阴性抗原;
 - 2、3、5、6——待检血清;
- 或者
- 1——标准鸡传染性喉气管炎病毒阳性血清;
 - 2~6——倍比稀释的待检血清。

图 C.2 抗体检测图

附录 D
(规范性附录)
经典病毒提取 DNA 方法

D.1 取待检样品、阴性对照、阳性对照各 100 μL 分别置于 1.5 mL 离心管中,每管加入 500 μL DNA 提取裂解液(见附录 A.11),反复混匀。

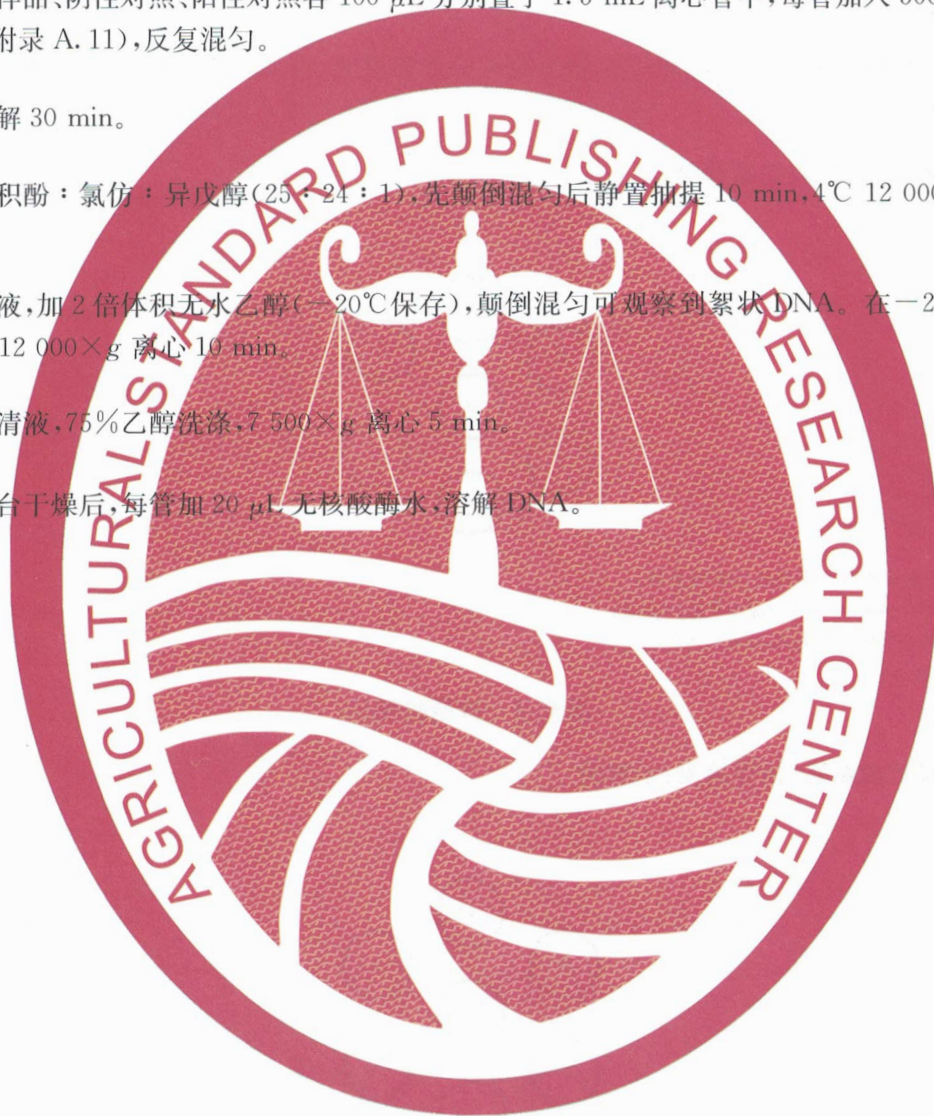
D.2 55℃裂解 30 min。

D.3 加等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),先颠倒混匀后静置抽提 10 min,4℃ 12 000 $\times g$ 离心 10 min。

D.4 取上清液,加 2 倍体积无水乙醇(−20℃保存),颠倒混匀可观察到絮状 DNA。在 −20℃冰箱沉淀 30 min。4℃ 12 000 $\times g$ 离心 10 min。

D.5 弃去上清液,75%乙醇洗涤,7 500 $\times g$ 离心 5 min。

D.6 在无菌台干燥后,每管加 20 μL 无核酸酶水,溶解 DNA。



附录 E
(规范性附录)

1.0%琼脂糖凝胶板的制备

- E.1 称取 1 g 琼脂糖,加入 100 mL 1×TAE 缓冲液中。
- E.2 加热融化后加 1 μ L Gelred,混匀后倒入放置于水平台面上的凝胶盘中,胶板厚 5 mm 左右。
- E.3 依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔),放入电泳槽中,加 1×TAE 缓冲液淹没胶面。

附 录 F
(资料性附录)
PCR 电泳图示

F.1 PCR 电泳图示

见图 F.1。

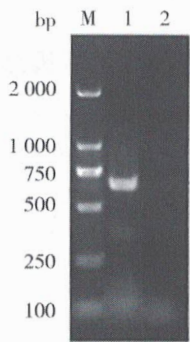


图 F.1 PCR 扩增结果

F.2 说明

F.2.1 DNA Marker(标准分子量)为 DL 2 000。

F.2.2 泳道 1 为阳性样品,泳道 2 为阴性对照。

附录 G
(资料性附录)
荧光定量 PCR 图示

荧光定量 PCR 图示见图 G.1。

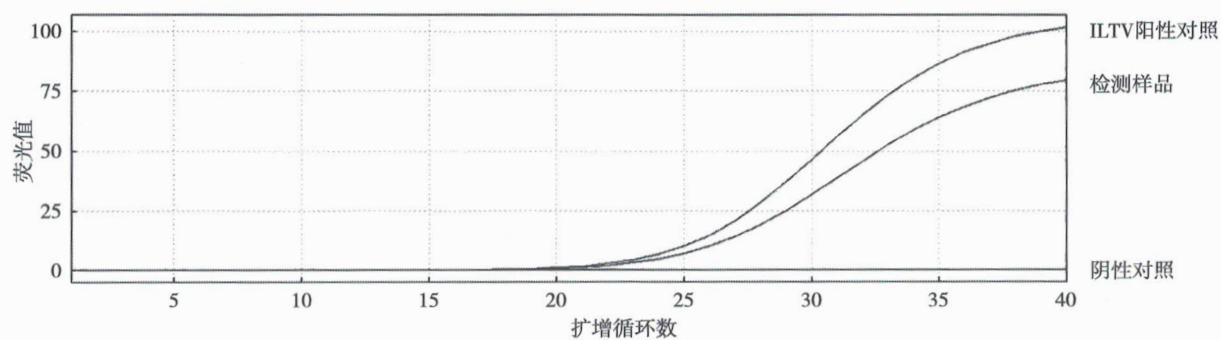


图 G.1 鸡传染性喉气管炎病毒荧光定量 PCR 扩增图

中华人民共和国
农业行业标准
鸡传染性喉气管炎诊断技术

NY/T 556—2020

* * *

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

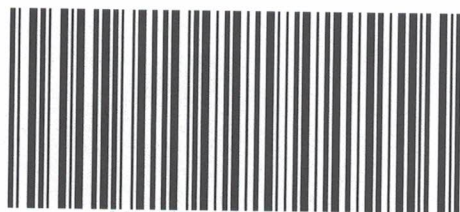
2021 年 3 月第 1 版 2021 年 3 月北京第 1 次印刷

书号: 16109 · 8473

定价: 40.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 556—2020