



中华人民共和国国家标准

GB/T 16550—2020
代替 GB/T 16550—2008

新城疫诊断技术 Diagnostic techniques for newcast disease

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 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 GB/T 16550—2008《新城疫诊断技术》，与 GB/T 16550—2008 相比，主要技术变化如下：

- 修改了血凝和血凝抑制试验判定结果（见 7.3 和 7.4，2008 年版的 5.3 和 6.3）；
- 删除了毒力评价指标中 MDT 和 IVPI（见 2008 年版的 4.3 和 4.4）；
- 增加了实时荧光 RT-PCR 检测方法（见第 9 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。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

引 言

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)强毒株感染禽类引起的一种急性、烈性传染病,给世界养禽业造成巨大的经济损失。世界动物卫生组织(OIE)将新城疫列为法定报告的动物疫病,我国农业农村部将其列为一类动物疫病。

新城疫病毒可感染 240 多种禽类,其中家鸡和珠鸡最易感,感染禽(野鸟)及带毒禽(野鸟)系主要的传染源。新城疫病毒主要经消化道和呼吸道传播,被污染的水、饲料、蛋托(箱)、种蛋、鸡胚和带毒的野生飞禽、昆虫及有关人员等均可成为传播媒介。

新城疫病毒属于副黏病毒科(Paramyxoviridae)、正禽腮腺炎病毒属(Orthoavulavirus),目前新城疫病毒只有一种血清型,但可分为多种基因型。OIE 规定,新城疫是由新城疫病毒强毒株引起的禽类感染,因此,对于新城疫的诊断,除了鉴定新城疫病毒之外,还需要对其致病性进行评估。对于致病性评估的方法,可通过 1 日龄 SPF 鸡 ICPI 进行测定,也可通过分子生物学技术,如 RT-PCR 结合序列测定等。根据新城疫病毒 F 基因部分序列(47 nt~420 nt)差异,可将新城疫病毒分为 Class I 和 Class II 两大类,其中 Class I 在国内均系弱毒株,因此,针对 Class I NDV 的检测方法不具有诊断意义,本标准所涉及的诊断方法均针对 Class II 新城疫强毒株。

新城疫诊断技术

1 范围

本标准规定了新城疫的临床诊断、病毒分离与鉴定、血凝和血凝抑制试验、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和实时荧光 RT-PCR(Real-time RT-PCR)的技术要求。

本标准适用于新城疫的诊断、检疫、检测、监测和流行病学调查等。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

C_t值：每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环次数(Cycle threshold)

DEPC：焦碳酸二乙酯 (Diethyl pyrocarbonate)

HA：血凝(Hemagglutinin)

H：血凝抑制 (Haemagglutination inhibition)

ICI：脑内接种致病指数 (Intracerebral pathogenicity index)

ND：新城疫 (Newcastle disease)

NDV：新城疫病毒 (Newcastle disease virus)

PBS：磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline)

RBC: 鸡红细胞悬液 (Red blood cell)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic acid)

RT-PCR: 反转录聚合酶链式反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

Real-time RT-PCR: 实时荧光 RT-PCR (Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction)

SPF: 无特定病原体 (Specific pathogen free)

4 临床诊断

4.1 流行病学

4.1.1 宿主范围广, 鸡、火鸡、鹌鹑、鸽、鹅等多种家禽及野禽均易感, 鸭也可感染。

4.1.2 传染源主要为感染禽 (野鸟) 及带毒禽 (野鸟), 主要经消化道和呼吸道传播, 被污染的水、饲料、蛋托 (箱)、种蛋、鸡胚和带毒的野生飞禽、昆虫及有关人员等均可成为主要的传播媒介。

4.1.3 该病无明显季节性，一年四季均可发生，春秋季节多发。

4.2 临床症状

4.2.1 临床致病型

根据临床表现不同，临床致病型分为：

- a) 嗜内脏速发型：以消化道出血性病变为主要特征，死亡率高；
- b) 嗜神经速发型：以呼吸道和神经症状为主要特征，死亡率高；
- c) 中发型：以呼吸道和神经症状为主要特征，死亡率低；
- d) 缓发型：以轻度或亚临床性呼吸道感染为主要特征；
- e) 无症状肠道型：以亚临床性肠道感染为主要特征。

4.2.2 典型症状

当病鸡出现下列之__或全部临床症状时，可作为初步诊断的依据之__：

- a) 发病急、病死率高；
- b) 体温升高、精神沉郁、呼吸困难、食欲下降；
- c) 粪便稀薄，呈黄绿色或黄白色；
- d) 发病后期出现扭颈、翅膀麻痹、瘫痪等神经症状；
- e) 免疫禽群出现产蛋下降，蛋壳质量变差，产畸形蛋或异色蛋。

4.3 剖检变化

当病鸡出现下列之一或全部剖检变化时，可作为初步诊断的依据之一：

- a) 全身黏膜和浆膜出血，以呼吸道和消化道最为严重，气管环状出血；
- b) 腺胃黏膜水肿，乳头和乳头间有出血点；
- c) 盲肠扁桃体肿大、出血、坏死；
- d) 十二指肠和直肠黏膜出血，泄殖腔黏膜出血，有的可见纤维素性坏死病变；
- e) 脑膜充血和出血；
- f) 鼻窦、喉头、气管黏膜充血，偶有出血，肺可见淤血和水肿。

4.4 鉴别诊断

家禽感染高致病性禽流感病毒后，临床表现和死亡率与新城疫(ND)类似。与ND相比，高致病性禽流感以全身器官出血为特征，包括：肿头，眼睑周围浮肿，鸡冠和肉垂肿胀、发紫、出血和坏死，腿及爪鳞片出血等。在临床实践中，很难依据临床症状和剖检变化进行区分，应依靠实验室诊断进行鉴别。

4.5 结果判定

当禽类符合4.1,且符合4.2、4.3之一的，可判定为疑似新城疫。

5 样品采集与处理

5.1 总则

样品采集宜在发病初期、选择具有典型临床症状的家禽，可采集脑、肺脏、脾脏、肾、肠（包括内容物）、肝和心脏等组织脏器，也可采集未见明显临床症状禽类的泄殖腔和口咽拭子样品进行实验室诊断。采样过程中不得交叉污染，在田间采样应勤换一次性手套，每采集一个样品宜更换或消毒一次灭菌采样

器具，尽量做到无菌采集。样品采集、处理、保存和运输应符合 GB 19489 和 NY/T 541 的要求。

5.2 组织样品采集

典型临床发病禽可无菌采集脑、肺、脾、肾、肠（包括内容物）、气管、肝、心等组织脏器，装入无菌采样袋或其他灭菌容器并编号，在 -20 °C 冷冻保存。

5.3 拭子样品采集

采集活禽样品时可采集口咽和泄殖腔拭子。取口咽拭子时应将拭子深入喉头及上腭裂来回旋转 2 次~3 次，要求可见明显黏液。采集泄殖腔拭子时应将拭子深入泄殖腔旋转一圈并沾取少量粪便。对于鸽、珍禽等体型较小的禽鸟，采样时需用适合的拭子，避免因拭子取样给禽类造成损伤。将采集后的拭子放入盛有 20 mL 的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.0~7.4, 含青霉素 2 000 U/mL, 链霉素 2 mg/mL, 10% 甘油) 的采样管中，编号。用于病毒分离的拭子样品于 -20 °C 冷冻保存，尽量避免反复冻融。

5.4 血清样品采集

无菌采集禽类的血液，每只 2.0 mL，用于新城疫抗体检测。无菌分离血清，装入 2.0 mL 离心管中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

5.5 样品运输

样品采集后置保温箱中，加入预冷的冰袋，密封，宜 24 h 内送实验室。

5.6 样品处理

5.6.1 生物安全措施

样品处理的生物安全措施按照 GB 19489 和 NY/T 1948 进行。

5.6.2 组织样品处理

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品，置组织匀浆器充分研磨，置于含抗生素的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.0~7.4) 中，制成浓度为 10%~20% 的悬浮液，冻融 2 次~3 次，室温 (20 °C~25 °C) 静置 1 h~2 h，3 000 r/min 离心 5 min，取上清液转入无菌的 1.5 mL 离心管中，编号备用。

5.6.3 拭子样品处理

将采集的拭子样品在振荡器上充分混合后，将拭子中的液体充分挤压后弃去拭子，室温静置作用

30 min，3 000 r/min 离心 5 min，取上清液转入无菌的 15 mL 离心管中，编号备用。

5.6.4 样品保存

处理好的样品在 2 °C~8 °C 条件下保存应不超过 24 h。若需长期保存，应放置于 -70 °C 冰箱中，反复冻融不超过 3 次。

6 病毒分离与鉴定

6.1 主要仪器设备

6.1.1 孵化器。

6.12 冰箱(2 °C~8 °C、-20 °C、-70 °C不同温度)。

6.1.3 台式高速冷冻离心机(最大离心力 12 000 g 以上)。

6.1.4 微量可调移液器(10 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L等不同规格)。

6.1.5 10 mL注射器(灭菌)。

6.1.6 II级生物安全柜。

6.2 试剂

6.2.1 0.01 mol/L pH 7.2 PBS, 见附录 A。

6.2.2 1%鸡红细胞悬液(RBC), 见附录 B。

6.3 操作程序

6.3.1 鸡胚接种

用 1.0 mL注射器吸取上清液, 按 0.2 mL/枚的剂量经尿囊腔接种 9 日龄~11 日龄的 SPF鸡胚, 每个样品至少接种 5 枚。接种后, 37 $^{\circ}$ C~38 $^{\circ}$ C继续孵育。18 h后每 12 h 照胚, 观察鸡胚死亡情况。

6.3.2 病毒收获

收集 18 h 以后的死胚及 96 h 仍存活鸡胚, 置 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C、4 h 或过夜, 无菌收取鸡胚尿囊液。

6.3.3 病毒鉴定

6.3.3.1 血凝(HA)试验: 收获感染鸡胚尿囊液, 测定其血凝活性。如果没有血凝活性或血凝效价 $\leq 3\log_2$, 则用初代分离的尿囊液于 SPF鸡胚继续盲传两代, 若仍为阴性, 则认为新城疫病毒分离阴性。试验方法按 7.3 执行。

6.3.3.2 血凝抑制(HI)试验: 对于 HA效价高于或等于 $4\log_2$ 的尿囊液, 应采用新城疫病毒标准阳性血清进行血凝抑制试验以确认是否含有新城疫病毒。试验方法按 7.4 执行。

6.3.4 毒力测定

6.3.4.1 测定方法

经确定仅为新城疫病毒的情况下, 应根据 1 日龄 SPF鸡脑内接种致病指数(ICPI)测定病毒毒力。

6.3.4.2 操作程序

6.3.4.2.1 HA效价高于或等于 $4\log_2$ 的新鲜感染尿囊液(不超过 24 h~48 h, 细菌检验为阴性), 用无菌等渗盐水作 10 倍稀释。

6.3.4.2.2 脑内接种出壳后 24 h~40 h 之间的 SPF雏鸡, 共接种 10 只, 每只接种 0.05 mL。

6.3.4.2.3 每 24 h 观察一次, 共观察 8 d。

6.3.4.2.4 每天观察应给鸡打分, 正常鸡记作 0, 病鸡记作 1, 死鸡记作 2(每只死鸡在其死后的每日观察中仍记作 2)。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/158010056112006113>