



中华人民共和国国家标准

GB/T 19167—2020
代替 GB/T 19167—2003

传染性法氏囊病诊断技术 Diagnostic techniques for infectious bursal 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 19167—2003《传染性囊病诊断技术》，与 GB/T 19167—2003 相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 将“传染性囊病”和“传染性法氏囊病”统一为“传染性法氏囊病”；
- 增加了规范性引用文件（见第 2 章）；
- 增加了缩略语（见第 3 章）；
- 增加了器材和试剂（见第 5 章、第 6 章、第 7 章、第 8 章、第 9 章）；
- 增加了临床诊断（见第 4 章）；
- 增加了实验室诊断样品采集（见第 5 章）；
- 删除了直接免疫荧光法（见 2003 年版的 2.5.2）；
- 删除了酶联免疫吸附试验（见 2003 年版的第 5 章）；
- 增加了 RT-PCR 检测方法（见第 7 章、附录 C、附录 D）；
- 增加了实时荧光 RT-PCR 检测方法（见第 8 章、附录 E）；
- 删除了血清抗体的检测（见 2003 年版的第 4 章）；
- 增加了细胞培养分离病毒检测方法（见 9.4.1、附录 F）；
- 增加了诊断结果的综合判定（见第 10 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。

本标准起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、北京市农林科学院畜牧兽医研究所、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

引 言

传染性法氏囊病(Infectious bursal disease, IBD)又称甘布罗病(Gumboro disease),由双股 RNA 病毒科(Birnaviridae)禽双股 RNA 病毒属(AΨibimavirus)传染性法氏囊病病毒(IBDV)引起。火鸡、鸭、珍珠鸡和鸵鸟均可感染 IBDV。3 周龄~6 周龄的鸡发病急而且重,病死率高,而 1 周龄~3 周龄鸡常呈现亚急性或亚临床症状。该病毒侵害法氏囊可引起严重免疫抑制。已知 IBDV 有两个血清型,即血清 1 型和 2 型,仅 1 型对鸡有致病性,火鸡和鸭为亚临床感染,2 型未发现致病性。

本病具有特征性临床症状和眼观病变,可做出初步诊断,确诊应进行病原检测。

2003 年之后,国内外 IBD 诊断技术发展快速。一些更为简便和准确的诊断新技术已经成为 IBD 诊断和预防的重要手段。本次对 IBD 诊断技术的修订,目的有二:一是与国际标准基本保持一致,改变国家标准显著滞后于国际标准的状况;二是将一些在国内外经过多年实践证明成熟可行的新技术纳入进来,改变原有标准中检测技术偏少且显著滞后于实际应用状况。修订此标准,有利于我国 IBD 诊断和预防,也有利于提升国家标准的权威性和实用性。

本标准参考 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进行修订。

传染性法氏囊病诊断技术

1 范围

本标准规定了传染性法氏囊病临床诊断和实验室诊断的技术要求。

本标准适用于鸡传染性法氏囊病的诊断、检测、监测和流行病学调查。其中琼脂凝胶免疫扩散试验、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、实时荧光反转录聚合酶链式反应(实时荧光 RT-PCR)、病毒分离等诊断方法适用于临床疑似样本的检测与病毒分离,琼脂凝胶免疫扩散试验方法还适用于免疫抗体水平检测。

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。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AGID: 琼脂凝胶免疫扩散试验(Agar gel immunodiffusion test)

CEF: 鸡胚成纤维细胞(Chick embryo fibroblast cell)

CPE: 细胞病变(Cytopathic effect)

IBD: 传染性法氏囊病(Infectious bursal disease)

IBDV: 传染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus)

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

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

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

Real-time RT-PCR: 实时荧光反转录聚合酶链式反应(Real-time reverse transcription-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 自然感染仅发生于鸡，各种品种的鸡都能感染。

4.1.2 主要发生于2周龄~15周龄的鸡，3周龄~6周龄的鸡最易感，而1周龄~3周龄鸡常呈现亚急性或亚临床症状。

4.1.3 常呈急性发病，传播迅速，通常在感染后第3天开始死亡，5 d~7 d达到高峰，后快速下降。

4.2 临床症状

4.2.1 潜伏期为 2 d~3 d。

4.2.2 易感鸡群感染后发病突然，病鸡体温突然升高，病鸡出现腹泻，排出白色黏稠或水样稀便，病程一般为 1 周左右。

4.2.3 急性病鸡可在出现症状 1 d~2 d 后死亡，鸡群 3 d~5 d 达死亡高峰，以后逐渐减少。

4.2.4 随着病程的发展，食欲废绝，颈和全身震颤，病鸡步态不稳，羽毛蓬松，精神委顿，卧地不动，呼吸困难，泄殖腔周围的羽毛被粪便污染。

4.2.5 后期病鸡脱水严重，趾爪干燥，最后衰竭死亡。

4.3 剖检变化

4.3.1 严重者腿部和胸部肌肉有条索状或斑块状出血。

4.3.2 法氏囊水肿和出血，体积增大，重量增加，严重者呈紫黑色、葡萄状；部分法氏囊出现萎缩。

4.3.3 有些法氏囊淡黄色水肿。

4.3.4 肾肿大褪色，肾小管有尿酸盐沉积，呈红白相间“花斑肾”。

4.4 结果判定

符合上述流行病学特征、临床症状和剖检变化的病例，可以判为疑似 IB。确诊应采集有临床症状动物的法氏囊等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 0.01 mol/L pH7.2 PBS 配方见附录 A 中 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

按照 GB 19489 的要求进行。

5.3.2 组织病料采集

采集多只病鸡的法氏囊，分别装入样品保存管，密封、冷冻保存。

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 °C~8 °C

冷藏或-20℃冷冻保存。

5.4 样品处理

用剪刀剪碎法氏囊组织,加入含青霉素4 000 IU/mL和链霉素4 000 μg/mL的PBS,用组织匀浆器制成20%匀浆,反复冻融2次~3次,10 000 r/min离心10 min,取上清作为检测材料。

6 琼脂凝胶免疫扩散试验(AGID)

6.1 器材

6.1.1 37℃温箱。

6.1.2 烧杯(200 mL)。

6.1.3 搅拌棒。

6.1.4 电磁炉。

6.1.5 微量可调移液器(10 μL、100 μL、1 000 μL等不同规格)。

6.1.6 灭菌平皿(9 cm~15 cm)。

6.1.7 打孔器(中心1孔,周围6孔,孔径3 mm,孔距4 mm)。

6.2 试剂

6.2.1 标准IBD琼扩阳性抗原(参见附录B的B.1)。

6.2.2 标准IBD琼扩阴性抗原(参见B.2)。

6.2.3 标准IBDV阳性血清(参见B.3)。

6.2.4 标准IBDV阴性血清(参见B.4)。

6.2.5 琼脂糖。

6.2.6 0.01 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.4),配方见A.2。

6.2.7 氯化钠。

6.3 试验程序

6.3.1 琼脂平皿制备

参见B.5。

6.3.2 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。

6.3.3 加样、孵育、观察

6.3.3.1 病原检测

中央孔加入标准 IBV 阳性血清，第 1 孔、第 4 孔分别加入标准 IB 琼扩阳性抗原和标准 IB 琼扩阴性抗原，其他孔分别加入待检样品，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 $^{\circ}$ C 温箱，在 24 h、48 h 观察并记录结果。

6.3.3.2 抗体检测

中央孔加入标准 IB 琼扩阳性抗原，第 1 孔、第 4 孔分别加入标准 IBV 阳性血清和标准 IBV 阴性血清，其他孔分别加入待检样品；或第 1 孔加入标准 IB 阳性血清，其他孔分别加入倍比稀释的待检

血清, 20 μL /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 $^{\circ}\text{C}$ 温箱, 在 24 h、48 h 观察并记录结果。

6.4 试验成立条件

24 h 标准 IBDV 阳性血清与标准 IBD 琼扩阳性抗原孔之间形成清晰沉淀线, 标准 IBDV 阳性血清与标准 IBD 琼扩阴性抗原孔之间未形成清晰沉淀线。

6.5 结果判定

6.5.1 病原检测

24 h 或 48 h 待检样品孔与标准 IBDV 阳性血清孔之间出现沉淀线, 且与标准 IBD 琼扩阳性抗原沉淀线末端相吻合时, 待检样品判为阳性; 标准 IBD 琼扩阴性抗原孔和待检样品孔与标准 IBDV 阳性血清孔之间无沉淀线出现时, 待检样品判为阴性 (参见图 B.1)。

6.5.2 抗体检测

待检血清孔与标准 IBD 琼扩阳性抗原孔之间出现沉淀线, 且与标准 IBDV 阳性血清沉淀线末端相吻合时, 待检血清判为阳性; 待检血清孔与标准 IBD 琼扩阳性抗原孔之间无沉淀线出现时, 待检血清判为阴性 (参见图 B.2)。

标准 IBD 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。

7 反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)

7.1 器材

7.1.1 PCR 扩增仪。

7.1.2 台式低温高速离心机。

7.1.3 电泳仪和水平电泳槽。

7.1.4 凝胶成像仪 (或紫外透射仪)。

7.1.5 微量可调移液器 (10 μL 、100 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

7.1.6 去核酸酶水处理的离心管与吸头。

7.1.7 PCR 扩增管。

7.2 试剂

7.2.1 RT-PCR 试剂

721.1 2 x 一步法 RT-PCR 缓冲液。

72.1.2 Taq DNA 聚合酶-反转录酶-RNA 酶抑制剂混合物。

7.2.1.3 灭菌去离子水。

7.2.1.4 引物

7.2.1.4.1 上游引物 +290 : 5'-AGATTCTGCAGCCACGGTCTCT-3'。

7.2.1.4.2 下游引物 -861 : 5'-TTGATGACTTGAGGTTGATTTT-3'。

7.2.2 电泳试剂

7.2.2.1 电泳缓冲液 : 50×TAE 贮存液 (配方见 A.5), 临用时加蒸馏水配成 1×TAE 缓冲液 (配方见 A.6)。

7.2.2.2 琼脂糖：低熔点琼脂糖。

7.2.2.3 电泳加样缓冲液：配方见 A.7。

7.2.3 DNA marker (标准分子量)

分子大小范围 100 bp~2 000 bp。

7.3 样品准备

7.3.1 本方法适用所有的 IBD 病原样品种类，包括法氏囊组织、鸡胚接种物、细胞培养物等。

7.3.2 阳性对照：已知病毒材料，如 IBDV 感染的鸡胚或细胞。

7.3.3 阴性对照：IBDV 阴性的鸡胚或细胞。

7.4 试验程序

7.4.1 核酸提取

7.4.1.1 异硫氰酸胍法抽提核酸

见附录 C。

7.4.1.2 核酸提取等效方法

可采用等效病毒 RNA 提取试剂或试剂盒进行核酸提取。

7.4.2 核酸扩增

7.4.2.1 引物：将引物 (+290/-861) 稀释到工作浓度 10 pmol/μL。

7.4.2.2 PCR 反应混合液配制：每个 PCR 管中依次加入 4.5 μL ddH₂O、125 μL 2×一步法 RT-PCR 缓冲液、各 1 μL 上下游引物 (+290/-861)、1 μL Taq DNA 聚合酶-反转录酶-RNA 酶抑制剂混合物。

7.4.2.3 RT-PCR 扩增：其中 2 个 PCR 管中分别加入 5 μL 阳性对照 RNA 提取物和 5 μL 阴性对照 RNA 提取物；在其他 PCR 管中分别加入 5 μL 待检样品 RNA 模板。盖紧管盖，放入扩增仪中按照设定程序扩增：50 °C 30 min；94 °C 预变性 2 min；然后进行 35 个循环：95 °C 变性 30 s、57 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 45 s；最后 72 °C 延伸 5 min；4 °C 保存备用。

7.4.3 电泳

7.4.3.1 10% 琼脂糖凝胶板的制备：称取 1 g 琼脂糖，加入 100 mL 1×TAE 缓冲液中。加热融化后加 1 μL 核酸染料（如 Gelred）混匀后倒入放置在水平台面上的凝胶盘中，胶板厚 5 mm 左右。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。

7.4.3.2 加样：取 6 μL~8 μL PCR 扩增产物和 2 μL 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。

7.4.3.3 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。

7.5 试验成立条件

电泳结束后,取出凝胶置凝胶成像仪(或紫外透射仪)上观察。阳性对照电泳结果应出现 594 bp 扩增条带,同时阴性对照无扩增条带。

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/977034042134006135>