

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 556—2002

---

## 鸡传染性喉气管炎诊断技术

**Diagnostic techniques for avian infectious laryngotracheitis**

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

---

**中华人民共和国农业部** 发布

## 前 言

鸡传染性喉气管炎是鸡的重要疫病之一,世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizooties(法),OIE]将本病定为 B 类动物疾病,我国定为二类动物疫病。

本标准主要参照 OIE 推荐的鸡传染性喉气管炎(ILT)诊断方法制定。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:农业部动物检疫所。

本标准主要起草人:范根成、王永玲、刘相娥、王红。

## 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病毒分离及琼脂凝胶免疫扩散试验的技术要求。

本标准规定的病毒分离技术,适用于本病的确诊。琼脂凝胶免疫扩散试验,适用于传染性喉气管炎的血清学诊断及用传染性喉气管炎疫苗免疫后的抗体检测。

### 2 病毒分离鉴定技术

#### 2.1 材料准备

##### 2.1.1 病料的准备

2.1.1.1 活体采样:用灭菌棉拭子伸入口咽或气管采集分泌物,放入含青霉素 4 000 IU/mL,链霉素 4 000  $\mu$ g/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。

2.1.1.2 尸体采样:无菌采取病死鸡喉头和气管,放入无菌的平皿或烧杯中,密封。

##### 2.1.2 样品的运送

采集的样品应立即放入 4℃ 冰箱保存,24 h 内送到实验室;不能在 24 h 内送到实验室时,应将所采样品冷冻保存和运输。

##### 2.1.3 样品处理

2.1.3.1 收到棉拭子样品后,先经冻融两次,并充分振动、挤干棉拭子,将样品液经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入青霉素 4 000 IU/mL、链霉素 4 000  $\mu$ g/mL,于 37℃ 作用 30 min,作为接种材料。

2.1.3.2 组织样品:无菌条件下将组织剪碎,按 1:4 加入生理盐水后用研磨器研磨制成 20% 的匀浆悬浮液,再经 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入青霉素 4 000 IU/mL,链霉素 4 000  $\mu$ g/mL,于 37℃ 作用 30 min,作为接种材料。

#### 2.2 操作方法

##### 2.2.1 样品接种

取经处理过的样品,接种 9~12 日龄的鸡胚绒毛尿囊膜。每枚 0.2 mL,接种后的鸡胚在 37℃ 孵育,每天观察鸡胚 2 次,连续观察 7 d,弃去 24 h 内死亡的鸡胚,24 h~120 h 内死亡的鸡胚,放 4℃ 冷却后,观察鸡胚绒毛尿囊膜上无痘斑形成;120 h 仍不死亡的鸡胚,亦取出,置 4℃ 冷却后,观察鸡胚绒毛尿囊膜上无痘斑形成。有痘斑者,取出鸡胚绒毛尿囊膜和尿囊液,无菌研磨后,置 -20℃ 冻存备用;无痘斑者,亦取出鸡胚绒毛尿囊膜和尿囊液,无菌研磨,反复冻融,离心后,接种 9~12 日龄的鸡胚绒毛尿囊膜盲传。如此盲传 3 代以上,如仍无病变,则判为鸡传染性喉气管炎阴性。

##### 2.2.2 病毒鉴定

病毒分离物的鉴定:用鸡传染性喉气管炎标准阳性血清(效价在 1:32 以上)和标准阴性血清与分离物作鸡胚中和试验,固定血清,稀释病毒法中和试验操作方法。

血清处理:将传染性喉气管炎标准阳性血清和标准阴性血清 56℃ 灭活处理 30 min。

病毒稀释:将病毒分离物用含青霉素 1 000 IU/mL、链霉素 1 000  $\mu$ g/mL 的灭菌生理盐水稀释,稀释方法见表 1。

表 1 病毒分离稀释方法

管 号	病毒分离物稀释度	试管中的混合液
1	$2 \times 10^{-1}$	1 mL 病毒分离物原液 + 4 mL 稀释液
2	$2 \times 10^{-2}$	1 mL 2 号管液 + 9 mL 稀释液
3	$2 \times 10^{-3}$	1 mL 3 号管液 + 9 mL 稀释液
4	$2 \times 10^{-4}$	1 mL 4 号管液 + 9 mL 稀释液
5	$2 \times 10^{-5}$	1 mL 5 号管液 + 9 mL 稀释液

病毒-血清混合液:设两排试验管,每排 4 个管,第 1 排每管放 0.6 mL 标准阳性血清,第 2 排每管放 0.6 mL 阴性血清,然后向每排 1~4 号试验管内分别加入( $2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-5}$ )稀释的病毒悬液各 0.6 mL,将病毒-血清悬液混合并置冰箱( $4^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ )4 h。

鸡胚接种及结果判定:取经处理过的病毒-血清混合液,分别接种 9~12 日龄的鸡胚绒毛尿囊膜,0.2 mL/枚,每管接种 5 枚,接种后的鸡胚在  $37^{\circ}\text{C}$  孵育,每天观察鸡胚 2 次,连续观察 7 d,弃去 24 h 内死亡的鸡胚,24 h~120 h 内死亡的鸡胚,放  $4^{\circ}\text{C}$  冷却后,观察鸡胚绒毛尿囊膜上是否有痘斑形成;120 h 仍不死亡的鸡胚,亦取出,置  $4^{\circ}\text{C}$  冷却后,观察鸡胚绒毛尿囊膜上是否有痘斑形成。记录观察结果,按半数致死量(Reed-Muench)方法计算  $\text{EID}_{50}$ ,计算方法见附录 A(规范性附录)。

2.3 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  $\text{EID}_{50}$  的对数之差大于或等于 2.5 时,则判定分离物为鸡传染性喉气管炎病毒。

3 琼脂凝胶免疫扩散试验

3.1 材料准备

- 3.1.1 器材:烧杯,直径 85 mm 培养皿,孔径 4 mm 的打孔器,6~9 号针头,微量移液器及针头。
- 3.1.2 琼脂扩散抗原。
- 3.1.3 标准阳性血清。
- 3.1.4 被检血清:无菌采血,分离血清, $4^{\circ}\text{C}$  或  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。
- 3.1.5 琼脂平板:配制方法见附录 B(规范性附录)。

3.2 操作方法

3.2.1 琼脂板打孔

在琼脂糖平皿上,按坐标纸上画好的梅花型(见图 1)打孔,孔径 4 mm,孔间距 3 mm。挑出孔内琼脂,在火焰上封底。

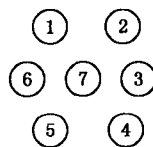


图 1 打孔样式

### 3.2.2 加样

用微量移液器加样,中央孔(7孔)加抗原,1、3、5孔加标准阳性血清,2、4、6孔加待检血清,每孔均以加满不溢出为度。

### 3.2.3 反应

加样完毕后,静置 10 min,放入 37℃带盖的湿盒中反应,分别在 12 h、24 h、36 h 观察并记录结果。

## 3.3 结果判定

### 3.3.1 判定方法

将琼脂板置暗背景或强光照射下观察。标准阳性血清孔与抗原孔之间出现一条清晰的沉淀线,则试验成立;若无沉淀线或沉淀线不明显,则试验不成立,应重做。

### 3.3.2 判定标准

3.3.2.1 被检样品孔与中央孔之间形成清晰的沉淀线,并与标准阳性血清孔的沉淀线相融合者,为阳性。

3.3.2.2 被检血清孔与抗原之间不形成完整的沉淀线,但标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线末端向被检血清孔的内侧弯曲者,为弱阳性。

3.3.2.3 被检血清孔与抗原之间无沉淀线,标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线直伸向被检血清孔的边沿无弯曲者,判为阴性。

3.3.2.4 有的被检血清与抗原之间可能出现两条以上沉淀线,其中一条与标准阳性血清-抗原间沉淀线融合者判为阳性;均不融合者为阴性,此沉淀线为非特异性沉淀线。

附录 A

(规范性附录)

鸡胚半数感染量(EID<sub>50</sub>)测定方法(Reed-Muench 法)

B.1 定义

鸡胚半数感染量(EID<sub>50</sub>)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

按式(A.1)、式(A.2)计算:

$$\lg \text{EID}_{50} = \text{高于 } 50\% \text{ 死亡率的病毒稀释度的对数} + \text{距离比例值} \times \text{稀释倍数的对数} \quad \dots\dots\dots(\text{A.1})$$

$$\text{距离比例值} = \frac{\text{高于 } 50\% \text{ 死亡率} - 50\%}{\text{高于 } 50\% \text{ 死亡率} - \text{低于 } 50\% \text{ 的死亡率}} \quad \dots\dots\dots(\text{A.2})$$

B.3 举例

病毒毒价测定(接种数量 0.1 mL/枚)见表 A.1。

表 A.1

接种病毒稀释	鸡 胚		累 计 数		死亡数/总数比例	死亡百分数/%
	死亡数	健活数	死	活		
10 <sup>-4</sup>	5	0	12	0	12/12	100
10 <sup>-5</sup>	4	1	7	1	7/8	88
10 <sup>-6</sup>	2	3	3	4	3/7	43
10 <sup>-7</sup>	1	4	1	8	1/9	11

表中第 1 列为接种的稀释度,第 2 列为死亡鸡胚数,第 3 列为活鸡胚数,后面的两列分别是第 2 列和第 3 列的累计数。

$$\text{距离比值} = \frac{88\% - 50\%}{88\% - 43\%} = \frac{38}{45} = 0.84$$

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

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

**附 录 B**  
**(规范性附录)**  
**琼脂平板制备方法**

用含 8%氯化钠的蒸馏水加万分之一叠氮化钠配制成 1%琼脂糖,103 kPa 高压蒸汽灭菌或水浴加热使琼脂充分溶化,加入直径为 85 mm 的培养皿中,每皿 16 mL,平置,室温下凝固后,置 4℃备用。

---