

前 言

传染性囊病(IBM)又名鸡传染性法氏囊病、腔上囊炎、甘布罗病,是由双 RNA 病毒科禽双 RNA 病毒属的传染性囊病病毒(IBMV)引起的鸡和火鸡的一种急性、高度接触传染性疫病。

本标准参考了世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizooties(法),OIE]的《哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册》所推荐的方法。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准由北京市农林科学院畜牧兽医研究所负责起草,由广西兽医研究所协作起草。

本标准主要起草人:刘有昌、刘爵、周蛟、姚炜光、张方亮、贺荣莲、吴健敏、兰美益、黄红梅、蒋冬福、韦志锋。

传染性囊病诊断技术

1 范围

本标准规定了传染性囊病病毒的病原分离、抗原的检测和检测特异性抗体的琼脂凝胶免疫扩散试验、病毒血清微量中和试验、酶联免疫吸附试验的技术要求。

本标准适用于传染性囊病的诊断与检疫。

2 病毒的分离及其鉴定

2.1 材料准备

灭菌组织研磨器、离心机、37℃温箱、孵化器、灭菌吸管、橡胶吸头、灭菌小瓶、灭菌6#针头、灭菌注射器、石蜡。

2.2 病料的采集和处理

采集具有病变的新鲜法氏囊，用加有抗生素(3 000 IU/mL青霉素和3 000 μg/mL链霉素)的胰蛋白酶磷酸缓冲液或生理盐水制成20%的组织匀浆液，在37℃作用30 min~60 min, 1 500 r/min离心20 min, 收集上清液。经菌检培养为阴性后作为接种材料。

2.3 鸡胚接种

2.3.1 接种

将收集的上清液以每只0.2 mL的量经绒毛尿囊膜接种9日龄~11日龄无传染性囊病母源抗体鸡胚或SPF鸡胚(无特定病原体鸡胚)，接种后用石蜡封住接种孔。37℃孵育，每天照蛋检查，弃去24 h内死亡的鸡胚。

2.3.2 鸡胚剖检结果判定

2.3.2.1 标准IBDV分离物接种后判定：标准的IBDV分离物接种鸡胚后3 d~5 d可致鸡胚死亡。死亡鸡胚充血，在羽毛囊、趾关节和大脑有血斑性出血。肝脏多可见坏死，也可见色淡似熟肉样。

2.3.2.2 IBDV变异株分离物接种后判定：IBDV变异株经绒毛尿囊膜接种鸡胚，一般不致死鸡胚，接种后5 d~6 d剖检，可见鸡胚大脑和腹部皮下水肿、发育迟缓、呈灰白色或奶油色，肝脏常有胆汁着色或坏死，脾脏通常肿大2倍~3倍，但颜色无明显变化。

2.4 易感雏鸡接种试验

2.4.1 接种

取2.2述及的病料上清液0.5 mL，经点眼、口服感染5只14日龄~21日龄无IBDV母源抗体鸡或SPF鸡。同时设健康对照组。接种3 d后将鸡剖杀，检查法氏囊及脾脏。

2.4.2 剖检接种结果

2.4.2.1 标准IBDV接种结果：接种后偶见鸡死亡，剖检可见接种鸡法氏囊水肿、色黄，有时可见出血。脾脏有时可见轻度肿大，表面有灰色点状病变。健康鸡则正常。

2.4.2.2 IBDV变异株接种结果：接种后不出现死亡，3 d剖检可见法氏囊萎缩、质度硬，脾脏可见肿大1倍~2倍。健康鸡则正常。

2.5 IBD病毒的鉴定

2.5.1 琼脂凝胶免疫扩散(AGID)试验

用已知的特异性的鸡传染性囊病标准阳性血清，用分离株的法氏囊匀浆制备待检抗原，同时制备正常法氏囊匀浆作对照抗原，按AGID常规法滴加抗原和血清进行扩散，如在抗原孔和血清孔之间出现白色沉淀线者判分离物为阳性。

2.5.2 直接免疫荧光法

2.5.2.1 材料及方法

2.5.2.1.1 高免血清

采用 CJ801 株毒制备的高免血清,经 AGID 测定效价为 1:128 以上,经中和试验测定在 2^{12} (1:2084) 以上。

2.5.2.1.2 直接荧光抗体的制备

采用 33% 饱和硫酸铵盐析,沉淀免疫球蛋白,经透析并通过 Sephadex G50 柱去铵离子,用紫外分光光度计测定球蛋白浓度在 20 mg/mL~25 mg/mL 左右,以异硫氢酸荧光素(FITC)按 1% 量采用热标记方法标记,再经透析和 Sephadex G50 柱层析,收集荧光抗体,保存于 -20°C 冰箱备用。

2.5.2.1.3 标本的制备及染色

取分离株法氏囊制成冰冻切片或用其组织制成压片。待自然干燥,以 4°C 保存的冷丙酮溶液固定 10 min,0.1 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液冲洗两次,蒸馏水冲洗一次,风干后用 1:8~1:16 荧光稀释液为工作液,滴加在切片上置湿盒中,在 37°C 温箱中静置 30 min,再经磷酸盐缓冲液、蒸馏水冲洗,风干,滴加甘油缓冲液封固、镜检。

2.5.2.2 镜检及判定标准

用荧光显微镜检查。采用法氏囊冰冻切片为荧光诊断标本,法氏囊病毒侵害法氏囊后主要表现在淋巴小叶的髓质部。首先在淋巴滤胞胞浆中发出黄绿色荧光颗粒,胞核位于中间为暗色不发光。感染初期常见到“光轮”样结构的淋巴滤胞,感染最严重时由于大量病毒在泡浆中复制发出强荧光的亮斑。皮质不发光。具有上述淋巴图像称为特异性荧光,判为阳性。根据荧光强弱,荧光细胞的数量及荧光结构的清晰度可判为“++++、+++、++、+”。淋巴小叶结构完整而清晰,又不发荧光者判为阴性。

3 琼脂凝胶免疫扩散

3.1 材料准备

3.1.1 鸡传染性囊病诊断抗原和标准阳性血清。

3.1.2 琼脂板制备方法见附录 A。

3.1.3 被检血清样品:被检鸡血清应新鲜,分离后 56°C 灭活 30 min,采血后分离的血清可以当天使用,也可置 -20°C 保存备用。

3.2 操作程序

3.2.1 打孔

反应孔按画好的七孔图案打孔,将画好的七孔图案放在有琼脂板的平皿下,按照图案在固定位置用不锈钢小管打孔,中心孔径 3 mm,外周孔径 3 mm,外周孔与中间孔间距 3 mm,打孔时切下的琼脂可以吸出也可以用针头挑出。打好后,在酒精灯上适当加热平皿底部,使琼脂与玻璃平皿贴紧,避免由于打孔时导致的琼脂与平皿脱离。

3.2.2 加样

3.2.2.1 抗体的定性与定量测定

若是做定性试验,不需要稀释血清,只将血清样品直接加入琼脂板孔中;但若定量测定血清沉淀抗体的滴度,可以在 24 孔或 96 孔 V 形培养板上稀释血清,各孔预先加入 50 μL 的 PBS,然后倍比稀释血清,最后更换吸头由高稀释度开始加样。

3.2.2.2 抗原及血清在孔内的添加

如图 1 所示,中央孔 7 加抗原,1、4 孔加阳性血清,2、3、5、6 孔加被检血清,各孔加到孔满为止。如果定量检测血清的沉淀抗体,采用中央孔 7 加抗原,周围 1~6 孔依次加入各不同稀释度的血清样品。在琼脂板上另做二孔,打法及间距同前,分别加入阳性血清和抗原,设立阳性对照。加盖将平皿置于湿盒或容器中,在 37°C 条件下反应,逐日观察,72 h 终判。

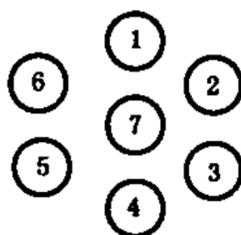


图 1 琼脂扩散反应孔的布局

3.3 结果判定

3.3.1 定性检测

被检血清孔与抗原孔之间形成致密沉淀线者,或者阳性血清的沉淀线向毗邻的被检血清孔内侧弯者,此被检孔血清判为阳性。

被检血清孔与抗原孔之间不形成沉淀线,此被检血清判为阴性。

3.3.2 定量检测

当标准阳性血清孔与抗原孔产生致密沉淀线后,被检血清能与抗原产生沉淀线的最高稀释度即为该被检血清的沉淀抗体效价。

4 病毒血清微量中和试验

4.1 材料

4.1.1 器材:40孔或96孔有盖的聚苯乙烯微量细胞培养板洗净后烘干,采用紫外线距离30cm照射盖内侧、培养板孔1h或 γ 射线辐射消毒。多道、单道固定或可调式微量取样器,规格为 $5\mu\text{L}\sim 50\mu\text{L}$ 、 $50\mu\text{L}\sim 200\mu\text{L}$,并配以相应规格经高压消毒的塑料吸头,2cm宽的涤纶透明胶带。

4.1.2 细胞:鸡胚成纤维细胞。

4.1.3 血清:IBDV阳性血清和阴性血清均由SPF鸡制备。被检血清为采自受检鸡的不腐败、不溶血、不加抗凝剂和防腐剂的血清,在试验前 56°C 水浴灭活30min。

4.2 操作程序

本试验采用两板法,即“板1”作血清-病毒感作,“板2”用作正式试验。

4.2.1 取 $75\mu\text{L}$ Earles液加到“板1”各孔,第10列加 $75\mu\text{L}$ Earles液作细胞对照。

4.2.2 取 $25\mu\text{L}$ 被检血清分别加到A、B、C行的第1孔,分别作1:4倍系列稀释至第8孔。

4.2.3 取 $25\mu\text{L}$ 阳性血清加到D行的第1孔,取 $25\mu\text{L}$ 阴性血清加到D行的第5孔,分别按上法稀释(即1~4孔为阳性对照,5~8孔为阴性对照)。

4.2.4 除第10列外,取 $25\mu\text{L}$ 含 $200\text{TCID}_{50}/25\mu\text{L}$ 的CJ801病毒,然后置微量振荡器上振荡混匀, 37°C 感作45min~60min。

4.2.5 用取样器以 $200\mu\text{L}$ 含100万/mL鸡胚成纤维细胞加到“板2”各孔内。

4.2.6 用取样器分别吸取病毒血清混合物转移到“板2”相应各孔内,每份血清接种4孔,每孔 $25\mu\text{L}$ 。

4.2.7 用2cm宽的涤纶透明胶带封盖,振荡混匀,置 37°C 温箱培养72h~96h后,显微镜下观察细胞病变情况。

4.3 结果判定

1:8以下为阴性;

1:32以上判为阳性;

1:16判为可疑,隔周后采血测定抗体价仍为1:16或更低则为阴性。

5 酶联免疫吸附试验

5.1 鸡传染性法氏囊病病毒抗原的检测

5.1.1 材料准备

5.1.1.1 被检样品:送检的病、死鸡法氏囊。

5.1.1.2 标准阴性样品:标准阴性样品为健康鸡法氏囊组织浸液。

5.1.1.3 MR5000 酶标仪。

5.1.2 操作环境

10℃~30℃。

5.1.3 操作程序

5.1.3.1 被检样品的处理:将送检的病、死鸡法氏囊剪碎研磨,按 1:5 量加自来水,制成组织浸液,静置 5 min,取上清液进行检测。

5.1.3.2 加样:用小塑料管(中 5 mm,长 500 mm)吸取上述被检法氏囊的组织浸液,加到聚苯乙烯酶标板的小孔内 1 滴(50 μL,以下同),每 1 个样品用 1 个孔,同时设 1 个孔作对照,用小塑料管吸取标准阴性样品,向对照孔内滴入 1 滴,静置 2 min。

5.1.3.3 洗涤:再向加样的小孔内滴入洗液 1 滴之后,接着用自来水滴满小孔,洗 2 次,每次均充分甩干。

5.1.3.4 加酶结合物:向加样的小孔内滴入酶标记结合物 1 滴,静置 2 min。

5.1.3.5 洗涤:同 5.1.3.3 的方法,用自来水洗 5 次。

5.1.3.6 显色:向加样的小孔内滴入底物 1 滴,紧接着滴入显色液 1 滴,在 5 min 内判定结果。

5.1.4 结果判定

5.1.4.1 观察颜色的判定

孔内的液体显蓝色者,判为阳性。

孔内的液体呈无色者,判为阴性。

5.1.4.2 酶标仪检测的判定

5.1.4.2.1 加终止液,加显色液后 5 min,用小塑料管吸取终止液,向加样的小孔内滴入 1 滴。用酶标仪测定 OD₄₅₀ 的数值。

5.1.4.2.2 判定:

OD₄₅₀ = 0.105 定为临界值。

OD₄₅₀ > 0.105 判为阳性。

OD₄₅₀ < 0.105 判为阴性。

5.2 鸡传染性法氏囊病病毒抗体的检测

5.2.1 材料准备

5.2.1.1 被检样品:送检的鸡血清。

5.2.1.2 标准抗原:标准抗原为鸡传染性法氏囊病囊毒抗原。

5.2.2 操作环境

同 5.1.2。

5.2.3 操作程序

5.2.3.1 被检样品的处理:用吸管吸取被检血清 0.1 mL,置于小瓶内,再用 1 支吸管吸取标准抗原 0.1 mL,加入同一小瓶内,使二者充分混合,静置 5 min。

5.2.3.2 对照样品的处理:用吸管吸取生理盐水 0.1 mL,置于小瓶内,再用另 1 支吸管吸取标准抗原 0.1 mL,加入同一小瓶内,使二者充分混合,静置 5 min。

5.2.3.3 加样:用小塑料管分别吸取上述处理好的被检样品和对照样品,分别加到聚苯乙烯酶标板的小孔内滴入 1 滴,每个样品用 1 个孔,静置 2 min。

5.2.3.4 洗涤:同 5.1.3.3。

5.2.3.5 加酶结合物:同 5.1.3.4。

5.2.3.6 洗涤:同 5.1.3.3。

5.2.3.7 显色:同 5.1.3.6。

5.2.4 结果判定

5.2.4.1 观察颜色的判定

孔内的液体呈无色者,判为阳性。

孔内的液体显蓝色者,判为阴性。

5.2.4.2 酶标仪检测的判定

5.2.4.2.1 加终止液,加显色液后 5 min,用小塑料管吸取终止液,向加样的小孔内滴入 1 滴,用酶标仪测定 OD_{450} 的数值。

5.2.4.2.2 判定:

$OD_{450} < 0.105$ 判为阳性。

$0.4 > OD_{450} > 0.105$ 判为弱阳性。

$OD_{450} > 0.4$ 判为阴性。

附 录 A
(规范性附录)
琼脂凝胶的制备

试验中琼脂制备方法为琼脂糖 1 g,氯化钠 8 g,苯酚 0.1 mL,蒸馏水 100 mL。先将琼脂糖加到蒸馏水中,加热熔化后再加入氯化钠、苯酚,最后用 5.6%碳酸氢钠调 pH 值为 6.8~7.2,将溶化并混匀的琼脂缓慢倒入平放的洁净的玻璃平皿中,平皿中琼脂厚度要求 3 mm,冷却凝固后备用。
