

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3791—2020

鸡心包积液综合征诊断技术

Diagnostic techniques for chicken hydropericardium syndrome

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。

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、湖北省农业科学院、山东省农业科学院、青岛易邦生物工程有限公司。

本标准起草人：刘华雷、王静静、温国元、李玉峰、李阳、赵云玲、王媛媛、王红、于晓慧、黄兵、罗青平、范根成、王志亮。

引 言

鸡心包积液综合征(Hydropericardium syndrome, HPS), 又称安卡拉病(Angrara disease)或“心包积液-肝炎综合征”(Hepatitis-hydropericardium syndrome, HHS), 主要是由 I 群禽腺病毒 4 型(Fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4)引起的鸡的一种高度接触性传染病。本病多发于 3 周龄~6 周龄的肉鸡, 也可见于肉种鸡和蛋鸡。本病可垂直传播和水平传播。在发病初期无明显症状, 病鸡精神萎靡后 24 h 内死亡, 发病急, 致死率极高。发病鸡群多于 3 周龄开始死亡, 4 周龄~5 周龄达到高峰, 高峰持续 4 d~8 d, 5 周龄~6 周龄死亡减少。病程 8 d~15 d, 死亡率达 20%~80%。剖检以心包积液为典型特征, 肾脏肺脏肿大、肝脏肿大变色坏死, 肝细胞内有嗜碱性包涵体。

禽腺病毒根据其抗原性不同分为 I、II 和 III 3 个群, 其中, I 群可分为 A~E 5 个种共 12 种血清型, 主要引起包涵体肝炎(Inclusion body hepatitis, IBH)和心包积液综合征(HPS)及肌胃糜烂(GE)等。而心包积液综合征主要是由 I 群 C 种血清 4 型的禽腺病毒引起的。自 20 世纪 80 年代以来, 我国就存在 I 群腺病毒的流行, 以包涵体肝炎为主要临床特征, 主要通过垂直传播, 流行的病毒以血清 8a/b 型和血清 11 型为主。病毒致病性相对温和, 单独感染发病率和死亡率不高, 在全国呈普遍流行, 与传染性法氏囊病等发生混合感染时可导致鸡群较高的死亡率。然而, 自 2012 年开始, 在江苏、山东、河南等地则出现了以心包积液和肝脏肿大为主要特征的新型 I 群腺病毒的流行。这种疫病除了可以垂直传播之外, 还出现了可通过粪口途径进行水平传播的流行特点。监测表明, 导致这种疫病发生的病毒属于禽腺病毒 I 群血清 4 型。这种国内新出现的禽腺病毒 4 型 1987 年首次发生于巴基斯坦, 被命名为“安卡拉病”。该病在墨西哥、俄罗斯、印度、智利、伊拉克、秘鲁、日本、韩国、巴基斯坦和孟加拉国等国均有发生和流行的报道。

鸡心包积液综合征诊断技术

1 范围

本标准规定了鸡心包积液综合征的临床诊断、病毒分离、琼脂扩散试验、聚合酶链式反应(PCR)、荧光定量 PCR 和病毒中和试验的技术要求。

本标准适用于鸡心包积液综合征的诊断、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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- 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。

- CPE:致细胞病变(Cytopathic effect)
- DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)
- FAdV-4:禽腺病毒 4 型(Fowl adenovirus serotype 4)
- HPS:鸡心包积液综合征(Hydropericardium syndrome)
- LMH:鸡肝癌细胞(Chicken liver hepatocellular carcinoma)
- PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline)
- PCR:聚合酶链反应(Polymerase chain reaction)
- Real time PCR:荧光定量聚合酶链式反应(Real time polymerase chain reaction)
- SPF:无特定病原体(Specific pathogen free)
- TCID₅₀:组织半数感染量(Tissue culture infective dose 50%)
- VN:病毒中和试验(Virus neutralisation)

4 临床诊断

当鸡出现以下 2 种或 2 种以上情形时,可作为初步诊断的依据之一:

- a) 临床发病急,突然死亡,死亡率快速增加;
- b) 剖检心包腔中有淡黄色清亮的积液;
- c) 肝脏肿大、坏死、有出血点或出血斑。

5 样品采集与处理

5.1 样品采集

从病死鸡采集的组织样品应以肝脏为主。活禽采集泄殖腔拭子。

5.2 样品处理

5.2.1 组织样品处理

将病死禽的肝脏等组织样品 10 g~20 g 剪碎研磨后,加入 5 倍体积含有抗生素(青霉素 2 000 IU/mL、链霉素 2 mg/mL、庆大霉素 50 μg/mL、制霉菌素 1 000 IU/mL)的等渗磷酸盐缓冲液(PBS, pH

7.0~7.4),充分研磨,然后反复冻融3次,8 000 r/min离心10 min,取上清液经0.22 μL滤膜过滤除菌后接种SPF鸡胚或LMH细胞系。

5.2.2 拭子样品处理

将拭子样品在振荡器上充分混合后,将拭子中的液体挤出,室温(20℃~25℃)静置作用30 min,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。

5.3 样品保存

处理后的样品应尽快进行病毒分离与鉴定。如不能立即进行鉴定,应置于-80℃进行保存,在4℃保存不超过1 d。

6 病毒分离与鉴定

6.1 主要仪器

6.1.1 倒置生物显微镜。

6.1.2 CO₂培养箱。

6.1.3 微量移液器。

6.1.4 4℃离心机。

6.1.5 细胞培养瓶和细胞培养板。

6.2 主要试剂

6.2.1 PBS缓冲液:配方见附录A中的A.1。

6.2.2 细胞培养液:含10%血清的DMEM培养基。

6.2.3 细胞维持液:含1%血清的DMEM培养基。

6.3 试验动物与细胞

6.3.1 SPF鸡胚。

6.3.2 LMH细胞。

6.4 试验程序

6.4.1 鸡胚接种分离病毒

6.4.1.1 用1 mL注射器吸取处理后的上清液按每枚0.1 mL,经卵黄囊接种5枚6日龄SPF鸡胚。

6.4.1.2 接种后,37℃~38℃继续孵育120 h。期间每12 h观察鸡胚死亡情况,弃去24 h内死亡鸡胚。

6.4.1.3 收集接种后24 h~120 h死亡鸡胚和120 h仍存活鸡胚,置于2℃~8℃过夜,分别无菌收集尿囊液进行病毒鉴定。

6.4.2 细胞接种分离病毒

6.4.2.1 制备单层细胞:按照常规方法将LMH细胞分装在细胞培养瓶中,37℃培养至单层备用。

6.4.2.2 样品接种:将处理好的样品上清液接种单层LMH细胞,孵育1 h后吸弃上清液,用PBS缓冲液轻轻洗涤2次,吸弃后加入细胞维持液,37℃培养72 h。

6.4.2.3 观察和记录:70%以上单层细胞出现细胞变大变圆、遮光度增加等典型细胞病变时,将细胞培养物冻融后,离心去掉细胞碎片,取上清液进行病毒鉴定。

6.4.2.4 盲传:如接种细胞第1代72 h后未出现CPE,收获细胞/病毒液按6.4.2.2所述方法再接种LMH单层细胞进行盲传,如此盲传3代。

6.5 病毒鉴定

对鸡胚尿囊液和出现CPE的细胞培养液,可选用第7章、第8章、第9章或第10章的规定进行鉴定。

7 琼脂扩散试验

本方法可用于待检抗原的鉴定或血清抗体的鉴定。其中,待检抗原可为发病禽肝脏组织研磨处理后

的上清液,也可以是病毒培养物。下述方法以待检抗原的鉴定为例。

7.1 主要试剂

- 7.1.1 禽腺病毒 4 型标准抗原。
- 7.1.2 禽腺病毒 4 型标准阳性血清。
- 7.1.3 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)(详见 A.1)。
- 7.1.4 1%硫柳汞溶液(详见 A.2)
- 7.1.5 待检抗原。

7.2 操作程序

- 7.2.1 琼脂板制备:在 100 mL pH 7.4 的 0.01 mol/L PBS 中加入 1.0 g 琼脂糖和 8.0 g 氯化钠,用微波炉加热至琼脂糖完全融解、混匀,加入 1%硫柳汞溶液 1 mL。冷至 45℃~50℃时,取灭菌的直径 90 mm 平皿,每个平皿中加 20 mL。待完全凝固后,平皿加盖并倒置于密封袋中,置于 2℃~8℃冷藏备用(不超过 7 d)。
- 7.2.2 打孔:在已制备的琼脂板上,用直径 4 mm 的梅花形打孔器打孔,中心孔与外周孔距离为 3 mm。将孔中的琼脂用 8 号针头斜面向上从右侧边缘插入,轻轻向左侧方向挑出,勿损坏孔的边缘,避免琼脂层脱离平皿底部。
- 7.2.3 封底:用酒精灯轻烤平皿底部至琼脂刚刚要溶化为止,封闭孔的底部,以防侧漏。
- 7.2.4 加样:用微量移液器在中心孔加满标准阳性血清,周围孔加满待检抗原和标准抗原对照,加液量以不溢出加样孔为宜。
- 7.2.5 感作:加样完毕后,静置 5 min~10 min,待孔内液体吸收完全,将平皿轻轻倒置,放入湿盒内,37℃恒温孵育 24 h~48 h,观察并记录结果。

7.3 结果判定

- 7.3.1 标准阳性血清与标准抗原对照孔之间出现一条清晰的白色沉淀线时,试验成立,否则无效,需要重复试验(见图 1)。



图 1 琼脂扩散试验结果判定示意图

- 7.3.2 待检抗原与标准阳性血清孔之间出现一条明显清晰的白色沉淀线,并与标准抗原对照孔的沉淀线吻合,判为阳性(见图 1)。
- 7.3.3 待检抗原与标准阳性血清之间不形成完整的沉淀线,但标准抗原对照孔与标准阳性血清孔之间的沉淀线端部向待检抗原孔的内侧弯曲,判为弱阳性。出现弱阳性反应时,应进行重复检验。若重检仍为弱阳性反应,判为阳性(见图 1)。
- 7.3.4 待检抗原与标准阳性血清孔之间无沉淀线,标准抗原对照孔与标准阳性血清孔之间沉淀线直伸延到待检抗原孔边缘,无弯曲,判为阴性(见图 1)。

8 聚合酶链式反应(PCR)

8.1 主要仪器

- 8.1.1 PCR 仪。

- 8.1.2 高速台式冷冻离心机。
- 8.1.3 生物安全柜。
- 8.1.4 微量移液器。
- 8.1.5 电泳仪。
- 8.1.6 电泳槽。
- 8.1.7 紫外凝胶成像仪。

8.2 主要试剂

- 8.2.1 DNA 裂解液(详见 A. 3)。DNA 制备也可用商品化试剂盒。
- 8.2.2 引物:详见表 1。

表 1 PCR 检测引物

引物名称	引物序列	产物大小
4-1S	5'-TCTCCGTCTGTGCCTAAACT-3'	452 bp
4-1A	5'-GAGGACATCGCTTCACTACC-3'	

- 8.2.3 阳性对照和阴性对照:阳性对照采用鉴定为阳性的含毒尿囊液,阴性对照采用 SPF 鸡胚尿囊液。
- 8.2.4 PCR 反应试剂盒。
- 8.2.5 70%乙醇。
- 8.2.6 TAE 电泳缓冲液:详见 A. 4。
- 8.2.7 TE 缓冲液:详见 A. 5。

8.3 操作程序

8.3.1 DNA 提取

取 200 μ L 处理后的病料上清液或者病毒的培养物提取 DNA。应设立阳性对照和阴性对照。本程序系采用异硫氰酸胍一步法提取样品总 DNA。

- 8.3.1.1 取灭菌的 1.5 mL 离心管进行编号,分别吸取 0.2 mL 处理好的样品上清液至 1.5 mL 离心管中。
- 8.3.1.2 每个离心管中加入 400 μ L DNA 裂解液,充分混匀后置室温 10 min。
- 8.3.1.3 加入 600 μ L 预冷的异丙醇沉淀 DNA, -20°C 静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀 DNA, 弃上清液。
- 8.3.1.4 加入 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀一次, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 待干燥后溶于 20 μ L pH 8.0 TE 缓冲液中, -20°C 冻存备用。

8.3.2 配置 PCR 反应体系

在试剂准备区打开和配制试剂,配制完毕后应及时将剩余试剂放回储存区域。取 0.2 mL PCR 反应管,在冰浴条件下配制 25 μ L PCR 反应体系,按照表 2 依次加入以下成分,加完后盖紧盖子并做好标记。

表 2 PCR 反应体系组成

次 序	组 分	反应体系
1	10 \times PCR Buffer	2.5 μ L
2	dNTP(各 2.5 mmol/L)	2.0 μ L
3	上游引物(20.0 μ mol/L)	1.0 μ L
4	下游引物(20.0 μ mol/L)	1.0 μ L
5	rTaq 酶(5 U/ μ L)	0.5 μ L
6	模板 DNA	3 μ L
7	灭菌水	15 μ L

8.3.3 PCR 反应条件

94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

8.3.4 扩增产物电泳检测

- 8.3.4.1 制备 1.5% 琼脂糖凝胶板。
- 8.3.4.2 取 5 μL PCR 产物与 0.5 μL 加样缓冲液混合,加入琼脂糖凝胶板的加样孔中。
- 8.3.4.3 加入 DNA 分子量标准。
- 8.3.4.4 接通电源,120 V 恒压电泳 30 min~40 min。
- 8.3.4.5 利用凝胶成像系统观察并记录结果。

8.4 结果判定

8.4.1 质控标准

- 8.4.1.1 阳性对照出现 452 bp 左右的特异性扩增条带(参见附录 B)。
- 8.4.1.2 阴性对照没有预期的目的条带;否则,试验无效。

8.4.2 结果描述及判定

符合 8.4.1,待检样品 PCR 扩增产物出现 452 bp 目的条带,则判定为禽腺病毒 4 型核酸阳性;否则,判定为禽腺病毒 4 型核酸检测阴性。若进一步验证,可对 PCR 扩增产物进行测序。

9 荧光定量聚合酶链式反应(Real time PCR)

9.1 主要仪器

- 9.1.1 荧光定量 PCR 检测仪。
- 9.1.2 高速台式冷冻离心机。
- 9.1.3 微量可调移液器。

9.2 主要试剂

- 9.2.1 DNA 裂解液(见 A.3)。
- 9.2.2 引物和探针

上游引物 P1:GGCACCCGGGCAGAAC,下游引物 P2:TCTTTGGAGGTGCTCGTGTTG,荧光探针(5'-3'):FAM-TGTCCGCCTCCGGTCAGCTGTC-TAMRA。

- 9.2.3 阳性对照和阴性对照:阳性对照采用鉴定为阳性的含毒尿囊液,阴性对照采用 SPF 鸡胚尿囊液。
- 9.2.4 荧光 PCR 试剂盒。
- 9.2.5 75%乙醇。

9.3 操作程序

9.3.1 DNA 的提取

同 8.3.1。

9.3.2 反应体系

将荧光 PCR 相关的试剂取出于冰上融化,取 $n+2$ 个 PCR 管(n 为待检样品数,外加阳性对照和阴性对照),每个样品的荧光定量 PCR 反应体系见表 3。

表 3 荧光定量 PCR 反应体系

次序	组分	20 μL 反应体系
1	灭菌水	13.4 μL
2	10 \times PCR 缓冲液(Mg^{2+})	2 μL
3	10 mmol/L dNTPs	0.4 μL
4	上游引物 P1(20.0 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
5	下游引物 P2(20.0 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
6	荧光探针(20.0 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
7	<i>Taq</i> 酶(5 U/ μL)	0.2 μL
8	样品 DNA	2 μL

9.3.3 反应条件设置

将加样后的 PCR 管放入荧光定量 PCR 仪中,记录样本摆放顺序。设定反应程序:第一阶段,95℃预变性 5 min;

第二阶段,95℃变性 10 s;60℃退火、延伸 35 s,40 个循环;荧光收集设置在 60℃进行。

9.4 结果判定

9.4.1 质控标准

9.4.1.1 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。

9.4.1.2 阳性对照的 Ct 值应 ≤ 30 ,并出现典型的扩增曲线;否则,此次实验视为无效。

9.4.2 结果描述及判定

9.4.2.1 样品无 Ct 值或 Ct 值 > 38 且无标准扩增曲线,判为阴性。

9.4.2.2 样品 Ct 值 ≤ 35 ,且出现标准的 S 形扩增曲线,判为阳性。

9.4.2.3 样品 $35 < Ct \text{ 值} \leq 38$ 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。

10 病毒中和试验(VN)

10.1 器材

10.1.1 恒温 CO₂ 培养箱。

10.1.2 倒置生物显微镜。

10.1.3 96 孔培养板。

10.1.4 微量可调移液器及配套吸头。

10.2 主要试剂

10.2.1 禽腺病毒 4 型阳性血清。

10.2.2 阴性血清:SPF 鸡血清。

10.2.3 禽腺病毒 4 型病毒:禽腺病毒 4 型中和试验用种毒适应于 LMH 单层细胞,收获的病毒液测定 TCID₅₀后,分成 1 mL 装的小管,-80℃保存备用。

10.2.4 LMH 细胞。

10.2.5 细胞维持液:含 1% 血清的 DMEM 培养基。

10.2.6 细胞培养液:含 10% 血清的 DMEM 培养基。

10.3 试验程序

10.3.1 稀释病毒:将病毒用 DMEM 培养液稀释至 200 TCID₅₀/0.1 mL。

10.3.2 病毒中和:取稀释的病毒液与等量的 2 倍系列稀释的禽腺病毒 4 型阳性血清混合,同时设立病毒对照,37℃作用 1 h;病毒中和组和病毒对照组各接种 5 孔 LMH 细胞,每孔接种 0.2 mL。同时设立 LMH 细胞对照 5 孔,每孔加入 0.2 mL 细胞维持液。

10.3.3 观察记录:将培养板置于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 5 d~7 d,观察 CPE。

10.4 结果判定

10.4.1 质控标准:当病毒对照组出现典型 CPE,且细胞对照孔中细胞形态正常,试验有效。

10.4.2 病毒中和阳性:病毒培养物与禽腺病毒 4 型标准阳性血清中和后接种细胞,不产生典型 CPE,说明分离株可被相应的阳性血清中和,证明病毒培养物为禽腺病毒 4 型。

10.4.3 病毒中和阴性:病毒培养物与禽腺病毒 4 型标准阳性血清中和后接种细胞,仍产生典型 CPE,说明分离株不能被相应的阳性血清中和,证明病毒培养物不含禽腺病毒 4 型。

11 综合判定

11.1 临床诊断符合第 4 章,经第 6 章分离出禽腺病毒 4 型,或经第 7 章鉴定为禽腺病毒 4 型,或经第 8

章、第 9 章任一项检出禽腺病毒 4 型核酸,或经第 10 章确定为禽腺病毒 4 型阳性的,诊断为鸡心包积液综合征。

11.2 临床无明显特征症状,经第 6 章、第 7 章、第 8 章、第 9 章或第 10 章任一项检测出阳性的,诊断为禽腺病毒 4 型感染。

附 录 A
(规范性附录)
常用试剂的配制

A.1 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L、pH 7.4, PBS)配制

氯化钠(NaCl)	8.0 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.44 g
磷酸二氢钠(KH_2PO_4)	0.24 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

将上述成分依次溶解,用 HCl 调 pH 至 7.4,分装,121℃、15 min 高压灭菌。

A.2 1% 硫柳汞溶液

硫柳汞	1.0 g
加蒸馏水至	100 mL

溶解后,置于 100 mL 瓶中盖塞存放备用。

A.3 DNA 裂解液

DNA 裂解液的成分为 4 mol/L 异硫氰酸胍、0.5% 十二烷基氨酸钠、0.1 mol/L β -巯基乙醇、25 mmol/L 柠檬酸钠。称取 23.6 g 异硫氰酸胍、0.25 g 十二烷基氨酸钠、0.35 mL β -巯基乙醇、0.32 g 柠檬酸钠,定容至 50 mL,混匀后,4℃ 保存备用。

A.4 TAE 电泳缓冲液

A.4.1 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)溶液(pH 8.0)

乙二胺四乙酸二钠	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100 mL

A.4.2 TAE 电泳缓冲液(50 倍)配置

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH 8.0)	100 mL
灭菌双蒸水	加至 1 000 mL

A.5 pH 8.0 TE 缓冲液(溶解 DNA)

将 0.5 mL 的 10 mmol Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 mL 的 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 加入 50 mL 的容量瓶中,调 pH 8.0 定容至 50 mL 摇匀后,转到准备好的瓶中,贴上标签,高压灭菌后,降至室温,4℃ 保存备用。

附录 B
(资料性附录)
禽腺病毒 4 型 PCR 检测阳性参照图

B.1 禽腺病毒 4 型 PCR 检测阳性参照图

见图 B.1。

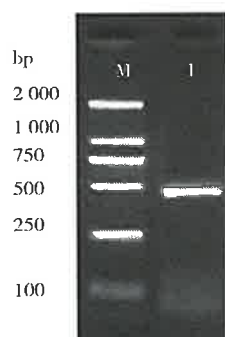


图 B.1 禽腺病毒 4 型 PCR 检测阳性参照图

B.2 说明

B.2.1 琼脂糖凝胶的浓度为 1.5%。

B.2.2 泳道 M 为 DNA 分子量标准 Marker DL 2 000 条带,泳道 1 为 PCR 检测目的条带。

中华人民共和国
农业行业标准
鸡心包积液综合征诊断技术
NY/T 3791—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 字数 20千字

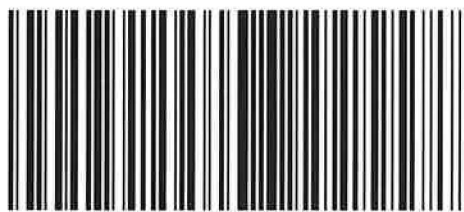
2021年3月第1版 2021年3月北京第1次印刷

书号: 16109·8475

定价: 32.00元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 3791—2020