**ICS 11.220**

**CCS B 41**

**NY**

中华人民共和国农业行业标准

**NY/T XXX-XXX**

鹦鹉热诊断技术

Diagnostic Specifications for Chlamydia psittaci

（送审稿）

**XXXX发布 XXXX实施**

**中华人民共和国农业农村部 发布**

目 次

[前  言 IV](#_Toc3176)

[1 范围 1](#_Toc11913)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc23053)

[3 术语和定义 1](#_Toc12930)

[4 临床诊断 1](#_Toc18523)

[4.1 流行病学 1](#_Toc13670)

[4.2 临床症状 1](#_Toc15071)

[4.3 病理变化 2](#_Toc20761)

[4.4 临床诊断结果判定 3](#_Toc13607)

[5 样品采集与处理 3](#_Toc1210)

[5.1 总则 3](#_Toc4854)

[5.2 组织样品采集 3](#_Toc24788)

[5.3 拭子样品采集 3](#_Toc32569)

[5.4 血清样品采集 3](#_Toc30463)

[5.5 样品运输 4](#_Toc5627)

[5.6 样品处理 4](#_Toc26767)

[6 病原分离与鉴定 4](#_Toc23279)

[6.1 生物安全措施 4](#_Toc7015)

[6.2 细胞分离培养 4](#_Toc20834)

[6.3 鸡胚分离培养 5](#_Toc20153)

[7 组织化学染色方法 6](#_Toc10379)

[7.1 试剂与材料 6](#_Toc22143)

[7.2 主要仪器设备 6](#_Toc18326)

[7.3 操作步骤 6](#_Toc15335)

[7.4 结果判定 6](#_Toc7908)

[8 荧光PCR方法 6](#_Toc12817)

[8.1 试剂与材料 6](#_Toc4170)

[8.2 主要仪器设备 7](#_Toc2513)

[8.3 样品 7](#_Toc3676)

[8.4 操作步骤 7](#_Toc25673)

[8.5 结果判定 7](#_Toc21257)

[9 补体结合试验 7](#_Toc9117)

[9.1 主要试剂与材料 7](#_Toc20497)

[9.2 主要仪器设备 8](#_Toc21014)

[9.3 血清灭活 8](#_Toc20501)

[9.4 试剂准备 8](#_Toc15201)

[9.5 操作步骤 8](#_Toc13656)

[9.6 结果判定 9](#_Toc4307)

[10 间接血凝试验 9](#_Toc27502)

[10.1 主要试剂与材料 9](#_Toc30947)

[10.2 主要仪器设备 9](#_Toc2919)

[10.3 样品 10](#_Toc11047)

[10.4 操作方法 10](#_Toc28209)

[11 综合判定 11](#_Toc1443)

[附 录 A（资料性附录）溶液的配制 12](#_Toc8293)

[附 录 B（资料性附录）荧光PCR反应体系配制 14](#_Toc26383)

[附 录 C（资料性附录）鹦鹉热衣原体补体结合抗原的制备 15](#_Toc26200)

[附 录 D（资料性附录）致敏绵羊血红细胞的制备 16](#_Toc14559)

[附 录 E（资料性附录）补体效价的测定 17](#_Toc31897)

前  言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会（SAC/TC181）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

鹦鹉热诊断技术

1. 范围

本文件规定了鹦鹉热的临床诊断，鹦鹉热衣原体的分离培养技术、组织化学染色技术、荧光 PCR 方法、补体结合试验、间接血凝试验操作技术要求。

本文件适用于鹦鹉热的检疫、鹦鹉热衣原体的实验室诊断；也适用于海关、边检、动物疫病预防控制机构和疾病预防控制机构等部门对鹦鹉热的流行病学调查和病原学诊断。

1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款，其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用本文件。

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

1. 术语和定义

鹦鹉热 Psittacosis

由鹦鹉热衣原体感染引起的人畜共患传染病。主要在鹦鹉及其他鸟类中传播，感染后多无症状。在特定条件下可由被感染的动物传染给人，人感染后多数表现为非典型病原体肺炎。



鹦鹉热衣原体 Chlamydia psittaci，Cps

鹦鹉热衣原体属于衣原体属，生物学特性介于细菌与病毒之间，是革兰氏染色阴性的专性细胞内寄生菌和非典型生长病原体。

1. 临床诊断
   1. 流行病学

鹦鹉热衣原体可以广泛感染动物，包括禽类、人类、哺乳动物等。鹦鹉热衣原体传播途径广泛，易通过气溶胶由呼吸道途径传播，也可通过排泄物由皮肤、黏膜和消化道传播。鹦鹉热一年四季均可发病，秋冬季发病率升高。秋冬季节是候鸟迁徙的季节，在迁徙过程中，候鸟更容易患病，与家禽混在一起，容易发生交叉感染。

* 1. 临床症状

4.2.1 共同症状

鹦鹉热衣原体感染动物后，临床症状表现差异大，主要与动物的种类、年龄以及流行毒株的致病力有关。临床诊断时要注意观察禽（鸟）的精神状态、呼吸状况、眼部的异常变化以及粪便的状态和颜色。根据鹦鹉热衣原体血清型和禽类宿主的不同，鹦鹉热衣原体可引起心周炎、气囊炎、肺炎、鼻炎、腹膜炎、肝炎和脾炎等病变，全身性感染可导致发热、厌食、呆滞及腹泻，部分会出现惊厥和死亡。

4.2.2 鹦鹉

成年鹦鹉通常表现轻微症状，幼龄鹦鹉则可发生急性或致死性传染。不食，精神萎顿；羽毛松乱，沾有黄绿色稀粪；有黏液性鼻液，眼睛被分泌物糊住；死前呈现严重脱水或消瘦。

4.2.3 鸡

鸡对鹦鹉热衣原体有较强的抵抗力，大多数鸡自然感染症状不明显，且为一过性。雏鸡可能发生急性传染和死亡。

4.2.4 鸭

急性型的病鸭发病严重；表现出震颤、步态不稳；食欲废绝，腹泻，排出淡绿色粪便；眼睛和鼻孔流出浆液性或脓性分泌物，眼睛周围羽毛上有分泌物结成的痂块。随后病鸭明显消瘦和肌肉萎缩，末期常发生惊厥而死亡。

4.2.5 鸽

成年鸽表现不安，厌食，眼鼻流液；腹泻，粪便为淡灰色或淡绿色；一侧或两侧结膜炎；呼吸发生水泡音，有时颈和两肢发生瘫痪；雏鸽发病后呈现衰弱和消瘦，常有腹泻。

4.2.6 火鸡

出现厌食、体温升高、结膜炎和呼吸困难；排出黄绿色胶冻样粪便，常带血液；严重消瘦。

* 1. 病理变化

4.3.1 病理变化概述

鹦鹉热衣原体攻击靶器官具有多样性，其组织学病变主要集中在肺脏、气囊、肝脏、气管和肾脏。组织病理学特征主要表现为肺充血、水肿，在二、三级支气管中有蛋白分泌物和透明膜形成；肝细胞变形，肝窦腺有淋巴细胞与单核细胞浸润；肾小管上皮细胞变形，气管黏膜腺分泌旺盛，假复层柱状纤毛上皮细胞脱落，纤毛消失。剖检发病禽（鸟）只，其心肌和法氏囊一般未见异常。鹦鹉热的病理变化在各类禽鸟之间差别较大，但共同特征都可见气囊炎，并出现从轻度云雾状浑浊至干酪样渗出物；严重病例出现肠炎，肝肿大且有坏死灶，纤维蛋白性心包炎。

4.3.2 鹦鹉

剖检可见结膜增厚，有黏性分泌物。鼻腔和气管中有大量黄色黏性分泌物。口腔和咽部充血、有溃疡性坏死灶。气囊壁增厚，胸腔和腹腔上有纤维性渗出物。肝脏暗红色，肿大、质脆，有针尖大小的淡黄色坏死灶。心脏肥大，心包膜充血、出血，心外膜被覆纤维素性渗出物。肺脏出现淤血、变性纤维性渗出、坏死。脾脏暗红色，肿大、质软，被膜下充血、出血。

4.3.3 鸡

肺充血、水肿、单侧或双测肺有纤维性渗出物，肺边缘粘结；单侧或双侧肺气囊浑浊、增厚，气囊表面有点状、散在分布的黄白色纤维性渗出物。肝脏肿大、质脆、色变淡，偶见坏死灶。

4.3.4 鸭

在临床上呈现流泪和流鼻液的病鸭，剖检时可出现结膜炎、鼻炎、眶下窦炎；病鸭的胸肌萎缩和全身性多发性浆膜炎，常有浆液性或浆液纤维蛋白性心包炎；肝脾肿大且表面有灰色或黄色小坏死灶。

4.3.5 鸽

肝肿大并严重充血，肝脏实质表面常散布有针尖大小的坏死灶；脾脏异常肿大，被膜破裂，内有出血。

4.3.6 火鸡

肺脏呈弥漫性允血，有纤维素性渗出物，致死病死病例有黑色漏出液充满胸膜腔；心胞炎、肝肿大，肝周炎；脾肿大变暗，变软，可有灰白色坏死点；腹膜炎，可有泡沫状、白色纤维素性渗出物。

* 1. 临床诊断结果判定

各种动物符合4.2的任2项或4.3的任2项，则判断为疑似鹦鹉热衣原体感染。

1. 样品采集与处理
   1. 总则

样品采集、处理保存和运输应符合 GB 19489 和 NY/T 541 的要求，采样过程无菌操作，注意避免交叉污染。对死亡禽（鸟），采集病变器官内外的炎性或纤维性渗出物、眼和鼻渗出物、全血及肾、肺、脾、心包和肝组织等样品。对活禽（鸟），采集咽和鼻拭子、肠分泌物、泄殖腔拭子、结膜刮取物和腹腔渗出物；对有腹泻症状的禽（鸟），可采集结肠内容物或分泌物进行培养。

* 1. 组织样品采集

采集死亡禽（鸟）病变器官内外的炎性或纤维性渗出物、眼和鼻渗出物、全血及肾、肺、脾、心包和肝组织，装入无菌采样袋或其他灭菌容器并编号，置于冷藏箱中低温保存并尽快送至实验室。用于近期检测的样品置于4℃冰箱暂存，需长期保存的样品，应置于-70℃冰箱，样品应尽量避免反复冻融。

* 1. 拭子样品采集

可采集禽鸟眼鼻周、口咽和泄殖腔拭子。采集眼鼻周拭子时，用拭子在眼周和鼻周旋转擦拭，沾取分泌物。采集咽喉拭子时将拭子探入喉头来回刮2~3次并旋转，取分泌物。采集泄殖腔拭子时将拭子深入泄殖腔至少旋转3圈并沾取少量粪便。采集的样品装入有SPG溶液（配制详见附录A）的采样管并编号，置于冷藏箱中低温保存并尽快送至实验室。用于近期检测的样品置于4℃冰箱暂存，需长期保存的样品，应置于-70℃冰箱，样品应尽量避免反复冻融。

* 1. 血清样品采集

每份样品采集全血2 mL，分离血清后装入2 mL离心管中，冷藏或冷冻保存。

* 1. 样品运输

样品采集后应置于低温冷藏箱，密封，宜24h内送至实验室。

* 1. 样品处理
     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。

* + 1. 组织样品处理

对采集的组织样品，按1 g组织加10 mL含链霉素（1 mg/mL）、万古霉素（1 mg/mL）、卡那霉素（1 mg/mL）、庆大霉素（200 μg/mL）的 PBS（配制方法见附录A）的比例将病料样品制成匀浆，5℃放置24 h后，取上清液备用。为防止酵母和真菌的生长，可在PBS加入两性霉素B（50 μg/mL）。禁用青霉素、四环素和氯霉素等抗生素。

* + 1. 拭子样品处理

对有一定污染的样品（如粪便、分泌物等），用含链霉素（1 mg/mL）、万古霉素（1 mg/mL）、卡那霉素（1 mg/mL）、庆大霉素（200 μg/mL）的 PBS（配制方法见附录A）进行均质化，500 g离心20 min，除去表层和底层，离心后取上清液备用。

对污染较为严重的样品，经过上述处理后，用孔径为450~800 μm的过滤器过滤，收集滤液备用。

1. 病原分离与鉴定
   1. 生物安全措施

病毒分离与鉴定应在二级及以上的生物安全实验室中进行操作，并按照 GB 19489 的规定执行。

* 1. 细胞分离培养
     1. 试剂与材料

Vero细胞（或BGM、McCOy、HeLa、L929细胞）、DMEM 培养基、胎牛血清（无Cps抗体）、抗生素（万古霉素、链霉素、庆大霉素及两性霉素B）、放线菌酮、各种细胞培养用常规试剂、细胞瓶及细胞培养板。

* + 1. 主要仪器设备

生物安全柜、台式水平离心机、二氧化碳培养箱、荧光倒置显微镜和高压灭菌锅。

* + 1. 样品

按5.6处理的样品。

* + 1. 细胞准备

用含5%~10%胎牛血清和抗生素（抗生素种类和浓度参照5.6.3）的DMEM培养液，将细胞培养成单层。

* + 1. 细胞感染与增殖

吸去细胞单层表面的培养液。以24孔板为例，可将样品进行适当稀释后分别接种，每孔接种0.1 mL预先处理好的病料样品，并设置空白对照。接种量可依据使用的细胞板和细胞瓶进行调整。

在细胞培养分离鹦鹉热衣原体过程中，为提高鹦鹉热衣原体的感染性，将接种物室温条件下500 g离心30 min~90 min，接种到单层细胞上，在37℃、5% CO2孵育2 h~3 h，孵育期间每30 min左右进行轻微摇晃，促使鹦鹉热衣原体吸附于细胞。

吸去细胞表面的接种物。24孔板中，每孔加入0.2 mL含有放线菌酮（0.5 μg/mL~2.0 μg/mL）的细胞培养液，置5% CO2的培养箱，在37~39℃温度下连续培养5 d~6 d。期间应观察细胞生长状态，适时更换细胞培养液。鹦鹉热衣原体的染色检查过程中，应尽量避免细胞冻融破碎。细胞培养物染色之前，先吸弃培养液，用PBS洗涤后，用丙酮和甲醇1:1（体积比）混合液固定5 min。

* + 1. 结果判定

细胞培养2 d~3 d或4 d~5 d后，对培养物按7进行染色镜检或按8进行荧光PCR检测。显微镜下观察有衣原体染色颗粒或荧光PCR呈阳性，可判定为Cps感染。第5d后染色检查或荧光PCR仍为阴性的，收集培养物再盲传一次，细胞培养2 d~3 d或4 d~5 d后，对培养物按上述方法再进行鉴定，显微镜检查未发现衣原体颗粒或荧光PCR结果为阴性，可判为鹦鹉热衣原体感染阴性。

* 1. 鸡胚分离培养
     1. 试剂与材料

鸡胚、鸡胚气室开孔器、蛋托、注射器、碘酊、镊子、剪刀、封蜡（固体石蜡加1/4凡士林，溶化）、灭菌培养皿和灭菌盖玻片。

* + 1. 主要仪器设备

倒置显微镜、生物安全柜、孵化箱（孵卵器）、照蛋设备。

* + 1. 样品

按5.6处理的样品。

* + 1. 鸡胚要求

分离培养鹦鹉热衣原体需使用6日龄~7日龄SPF鸡胚，或者6日龄~7日龄鸡胚（来自无衣原体抗体且不使用氨苄类抗生素、四环素类抗生素、广谱抗菌抗病毒类药物的健康鸡群）进行孵育。

* + 1. 鸡胚接种传代

气室部位开孔接种，接种深度为1.5 cm~2.0 cm。每个鸡胚接种0.4 mL样品于卵黄囊内，置于39℃湿润环境中培养，接种时要求无菌操作。

继续传代时，将收集的鸡胚卵黄囊膜研磨破碎，加入生理盐水稀释（1个卵黄囊膜加入4 mL 生理盐水）后3 000 r/min离心20 min，在4℃冰箱中稳定4 h左右后，接种7日龄鸡胚进行传代。

* + 1. 鸡胚卵黄囊膜收集

弃去接种后72 h内死亡的鸡胚，收集接种后4d~10d内死亡鸡胚的卵黄囊膜，继续接种传代，直至接种鸡胚发生规律性死亡（即接种后4 d~7 d内死亡）。初次接种分离时，对接种后10 d内未死亡的鸡胚，收集其卵黄囊膜，按7进行染色镜检。镜检有疑似衣原体染色颗粒，应继续传3~4代次，直至出现规律性死亡为止。

* + 1. 结果判定

初次分离时，传代鸡胚在接种后4 d~7 d内出现规律性死亡，可初步判定为Cps感染，显微镜下观察有衣原体染色颗粒或荧光PCR呈阳性，判定为Cps感染。初次接种分离时，接种后10 d内未死亡鸡胚，显微镜下观察有疑似衣原体染色颗粒的，继续使用鸡胚传3~4代次，仍然不死亡且显微镜检查未发现疑似衣原体颗粒或荧光PCR呈阴性的，判为鹦鹉热衣原体感染阴性。

1. 组织化学染色方法
   1. 试剂与材料

Na2HPO4、NaH2PO4·H2O、亮绿、碱性品红、有机溶剂（柠檬酸、冰乙酸、苯酚、无水乙醇、甲醇）、染色溶液1~6（配制见附录A）。

* 1. 主要仪器设备

显微镜。

* 1. 操作步骤
     1. 压痕涂片染色

将病料（细胞培养物或卵黄囊膜）在洁净的载玻片上压痕涂片→甲醇固定5 min→溶液3染色10 min→净水冲洗→溶液6复染2 min→净水冲洗→自然晾干→显微镜检。

* + 1. 石蜡切片染色

病料组织的石蜡切片脱腊，与双蒸水水合→溶液3染色10 min，净水冲洗→浸泡在溶液4至红色染料完全脱出，洁净水冲洗→将其在溶液6复染（将切片置复染液内浸染20次）→95%乙醇处理（选取两个乙醇缸，分别在每个乙醇缸内各浸沾5次）→脱水、晾干、固片→显微镜检。

* 1. 结果判定

如果在绿色背景下镜检观察涂片或切片，结果呈现红色，可初步判定样品中含有鹦鹉热衣原体。

1. 荧光PCR方法
   1. 试剂与材料
      1. PCR反应预混液

Animal Detection U+ Probe qPCR Super PreMix（可用其他等效商品化试剂代替）。

* + 1. 引物探针

根据鹦鹉热衣原体编码外膜蛋白的ompA基因片段，设计针对Cps的特异引物及特异TaqMan探针，覆盖所有基因型。上、下游引物和荧光探针序列如下：

上游引物 Cps F：5'-GGCATTATTGTTTGCCGCTAC-3'

下游引物 Cps R：5'-TGAAGCACCTTCCCACATAGTG-3'

探针 Cps Pb：5'-FAM-AAGCCTTGCCTGTAGGGAACCCAGCT-BHQ1-3'

* + 1. 阴阳性对照

阳性对照：用灭活的感染鹦鹉热衣原体的卵黄囊膜或细胞培养物制备。

阴性对照：用SPF鸡胚的卵黄囊膜或鹦鹉热衣原体阴性细胞培养物制备。

* 1. 主要仪器设备

核酸提取仪、高速冷冻离心机、台式离心机、生物安全柜、各种量程移液器、PCR反应管、荧光PCR仪。

* 1. 样品

咽拭子、血清、组织渗出液等样品，或者经细胞培养或鸡胚分离的待分析样品。

* 1. 操作步骤
     1. 样品DNA提取

可采用常规碱裂解法提取，也可采用商品化试剂盒提取样品DNA。

* + 1. 荧光PCR检测
       1. 反应组分配制

根据不同的荧光PCR仪选择反应管，反应总体积为25 μL，每个测试反应体系配制见附录B。

* + - 1. 反应参数

预变性 95℃/3 min；变性95℃/5 sec，退火/延伸55℃/40 sec，45个循环。荧光信号采集设定在退火/延伸时。对于多通道荧光PCR仪，鹦鹉热衣原体选择荧光素FAM为信号采集通道，淬灭基团选None，染料校正选None。

* 1. 结果判定
     1. 结果分析条件设定

直接读取检测结果。基线和阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

* + 1. 实验成立条件

阳性对照：扩增曲线呈标准的S形曲线，且Ct值≤30。

阴性对照：无Ct值，且无扩增曲线。

* + 1. 结果描述及判定

阴性：无Ct值或Ct值≥40.0，表示样品Cps核酸阴性。

阳性：Ct值≤37.0，且出现明显的指数增长期，表示样品Cps核酸阳性。

可疑：检测样品Ct值为37.0<Ct<40.0时，重复检测一次。如果Ct值仍小于40，且曲线有明显的指数增长期，可报告样品Cps核酸阳性；否则为阴性。

1. 补体结合试验
   1. 主要试剂与材料

巴比妥缓冲液（VBS，配制方法见附录A）、补体、待检血清样品、补反抗原、对照血清（阴阳性对照血清由指定单位提供）。

制备CF抗原的方法是用细胞培养繁殖衣原体。制备CF抗原的方法参见附录C。在试验中，常使用4~8单位抗原。

鹦鹉热衣原体阳性血清、阴性血清。

* 1. 主要仪器设备

冷冻离心机、恒温水浴锅、微量移液器、96孔U型微量板。

* 1. 血清灭活

补体结合试验前，将待检血清样品和对照阴阳性血清置60℃水浴灭活30 min。

* 1. 试剂准备
     1. 制备致敏绵羊血红细胞

采集健康绵羊血，脱纤，与等体积阿氏液混合后，在4℃可保存4周。致敏的绵羊血红细胞的制备方法参见附录D。

* + 1. 测定溶血素效价

用VBS制备1:100溶血素贮存液，各取适量将其分别稀释为1:300、1:400、1:500 等不同稀释度。然后对每个稀释度用VBS液进行2倍系列稀释，用于溶血素效价的测定。将0.5 mL补体（1:30），0.5 mL未致敏的绵羊血红细胞（光密OD为0.25），1.5 mL VBS 液加入到0.5 mL上述不同稀释度的溶血素溶液中并混合均匀，37℃孵育1 h，然后以600g离心5min后观察结果，能使红细胞完全溶血的最高稀释度为1个溶血单位。试验时，溶血素溶液用VBS配置为2个溶血单位，然后加到等体积适宜浓度SRBC中。

* + 1. 测定补体效价

参照附录E的方法配制2单位/0.05 mL的补体溶液。补体不稳定，一般情况下要置-70℃等量分装保存，随用随取，避免反复冻融。

* + 1. 测定标准抗原及阳性对照血清效价

为了标化CF试验，应对抗原和阳性对照血清进行标定。如果阳性血清或抗原滴度有一个是已知的，则另外一个成分可通过CF试验进行测定；如阳性血清和抗原都是未知的，可用方正滴定法确定标准抗原和阳性血清的效价。

* 1. 操作步骤
     1. 主要试剂及血清样品稀释

溶血素、抗原、补体根据以上标定的效价用VBS液稀释至工作浓度。标准阳性血清、标准阴性血清和被检血清按照表1进行稀释。在A行和E行的所有检测孔里分别加100 μL的VBS液，然后在设置的每三个为一组的检测孔和对照孔分别加25 μL未稀释的待检血清，阳性对照血清和阴性对照血清在A行和E行各孔中的血清稀释度为起始1:5。在B行至D行和F行至H行里分别加25 μL VBS液，依次从A行吸取25 μL稀释后的血清到B行做倍比稀释，一直到D行。这样A至D、E至H血清的稀释度依次为1:5，1:10，1:20，1;40。在A行和E行吸弃75 μL血清样品，D行和H行吸弃25 μL血清样品，使每孔稀释血清均为25 μL。

表1 96孔板补体结合试验操作示意表

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 血清稀释度 | | 血 清１  +Ag VBS -Ag  1 2 3 | | | 血 清2  +Ag VBS -Ag  4 5 6 | | | 血 清3  +Ag VBS -Ag  7 8 9 | | | 血 清4  +Ag VBS -Ag  10 11 12 | | |
| 1:5 | A |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1:10 | B |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1:20 | C |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1:40 | D |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1:5 | E |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1:10 | F |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1:20 | G |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1:40 | H |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | | 血清5 | | | 血清6 | | | 阳性血清对照 | | | 阴性血清对照 | | |
| 注：+Ag表示鹦鹉热阳性抗原，-Ag表示鹦鹉热阴性抗原。 | | | | | | | | | | | | | |

* + 1. 添加抗原

在96孔"U"型微量板的1、4、7、10列的各稀释血清中添加25 μL鹦鹉热阳性抗原：在2、5、8、11列的各稀释血清中分别加25 μL的VBS液体（抗补体对照）；在3、6、9、12列的各稀释度血清中加25 μL鹦鹉热阴性抗原（配制方法见附录C）。

* + 1. 添加补体

对补体进行工作浓度的稀释前，补体里要预先加新鲜鸡血清（不含衣原体抗体），使其终浓度为5%，然后按照预先滴定的补体效价稀释至工作浓度。在各孔中添加补体前，要把补体置冰浴稳定15 min。制备好的补体应在 4℃保存，需在 2 h内使用完。按 8.5.2 步骤加完抗原后，要立刻添加50 μL补体，混匀后将 96 孔板置 37℃水浴感作 2 h。

* + 1. 添加致敏的绵羊血红细胞

在补体反应结束后，在各孔中分别添加50 μL致敏的绵羊血红细胞。置37℃水浴1 h， 反应板以600 g离心5 min 后判定结果。也可在判定结果前置4℃过夜保存。

* 1. 结果判定

根据抑制溶血的25%、50%、75%、100%的不同程度，将其对应的各检测血清孔分别记为+、++、+++、++++。阳性反应一般记为++或更高，也就是说当检测血清产生50%或更低程度的溶血时，该检测血清为鹦鹉热阳性血清。

通常禽（鸟）在感染鹦鹉热7 d~10 d后出现CF抗体。当CF抗体升高4倍，则可确定为阳性。结合临床诊断，如果出现鹦鹉热典型临床症状，大多数鸟禽类抗体滴度>1:64，利用血清学试验就可以推断禽（鸟）群发病。

如果检测血清出现抗补体现象或出现非特异性血清反应（阳性对照孔和阴性对照孔均显示阳性反应），那么该试验视为无效。

1. 间接血凝试验
   1. 主要试剂与材料

敏化红细胞：为鹦鹉热衣原体纯化灭活抗原致敏的雄性绵羊红细胞。

对照血清：标准阳性血清的血凝效价为1:2048~l:4096，标准阴性血清的血凝效价≤l:4。

稀释液：为含1%灭能健康兔血清的0.15mol/L pH7.2磷酸盐缓冲液（PBS），制备方法见附录A。

* 1. 主要仪器设备

96孔（8×12）V型（110°）聚苯乙烯滴定板、移液器（10 μL~100 μL）、微量振荡器、水浴箱。

* 1. 样品

无溶血、无腐败，试验前灭能（60℃水浴30min）。

* 1. 操作方法
     1. 稀释被检血清

每份被检血清用8孔，每孔滴加稀释液50 μL；用移液器吸取被检血清50 μL加入第1孔，充分混匀后再吸取50 μL加入第2孔……依次做倍比连续稀释至第8孔（1:2，1:4，1:8，……，1:256），混匀后从第8孔弃去50 μL。

* + 1. 加抗原

将抗原摇匀后，每孔滴加1%抗原敏化红细胞悬液25 μL。

* + 1. 设对照

在每块V型滴定板上做试验，要同时设立对照，即敏化红细胞空白对照1孔；阳性血清（1:64）加敏化红细胞对照1孔；阴性血清（1:4）加敏化红细胞对照1孔。所有对照样的稀释与被检血清相同。

* + 1. 振荡

加致敏红细胞后将V型滴定板放在微量振荡器上振荡1 min，置于室温（冬季置于35℃温箱）2 h，判定结果。操作程序见表2。

表2 间接血凝试验程序及判定结果举例

单位：μL

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 成份 | 被检血清稀释度 | | | | | | | | 各项对照 | | |
| 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 敏化红细胞 | 阳性血清 | 阴性血清 |
| 1:64 | 1:4 |
| 稀释液 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |  |  |
| 被检血清 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50（弃50） | 50 | 50 |
| 敏化红细胞 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| 放在微量振荡器上震荡1min，置于室温（冬季放于35℃温箱）2 h | | | | | | | | | | | |
| 判定结果 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | ++ | + | - | ++++ | - |
| 注：表中所示被检血清的血凝效价为1:128 | | | | | | | | | | | |

* + 1. 结果判定

10.4.5.1 凝集程度标准

++++ ：红细胞100%凝集，呈一均匀的膜布满整个孔底；

+++：红细胞75%凝集，形成的膜均匀地分布在孔底，但在孔底中心有红细胞形成的一个针尖大小点；

++：红细胞50%凝集，在孔底形成的薄膜边缘呈锯齿状，孔底为一红细胞圆点；

+ ：红细胞25%凝集，孔底红细胞形成的圆点较大；

±：红细胞沉于孔底，但周围不光滑或圆点中心有空斑；

- ：红细胞完全沉于孔底，呈光滑的大圆点。

10.4.5.2 试验成立条件

抗原敏化红细胞应无自凝（-）；

阳性血清对照应100%凝集（++++）；

阴性血清对照应无凝集（-）。

10.4.5.3 结果判定

哺乳动物：血凝效价≥l:64（++）判为阳性；血凝效价≤1:16（++）判为阴性；血凝效价介于两者之间判为可疑；可疑者复检，仍为可疑判为阳性，或用CF试验复检。

禽类：血凝效价≥1:16（++）判为阳性；血凝效价≤1:4（++）判为阴性；血凝效价介于两者之间判为可疑；可疑者复检，仍为可疑判为阳性，或用CF试验复检。

1. 综合判定

临床症状与病理变化判定为疑似感染动物，按细胞培养（6.2）或鸡胚培养（6.3）分离出Cps，或按组织化学染色方法（7）检测为阳性，或按荧光PCR方法（8）检测出Cps核酸，或按补体结合试验（9）、间接血凝试验（10）任一项检测出Cps抗体，均可判定为鹦鹉热阳性病例。

临床无明显症状的动物，按细胞培养（6.2）或鸡胚培养（6.3）分离出Cps，且按组织化学染色方法（7）检测为阳性，或按荧光PCR方法（8）同时检测出Cps核酸，可判定为鹦鹉热病原阳性，否则为鹦鹉热病原阴性。

临床无明显特征的动物，按补体结合试验（9）或间接血凝试验（10）检测为阳性，可判定为鹦鹉热抗体阳性，否则为鹦鹉热衣原体抗体阴性。

附 录 A

（规范性附录）

溶液的配制

A.1 SPG液

蔗糖（C₁₂H₂₂O₁₁） 74.6 g

磷酸二氢钾（KH2PO4） 0.512 g

磷酸氢二钠（Na2HPO4） 1.237 g

L-谷氨酸（C₅H₉NO₄） 0.721 g

加蒸馏水至 1 000 mL

将上述成分依次溶解，调节至pH 7.4~7.6，分装，进行高压灭菌（115℃，20 min）或过滤除菌后置于4℃冰箱保存。使用前，在SPG液中可加入10%胎牛血清，100 mg/L万古霉素和100 mg/L链霉素，以及25 U/ml制霉菌素和庆大霉素（10 mg/L），作为采集样品的运输保存液。

SPG 液体也可作为的衣原体样品的稀释剂和冷冻剂。

A.2 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）

氯化钠（NaCl） 8.50 g

氯化钾（KCI） 0.20 g

磷酸氢二钠（Na2HPO4 ·12H2O ） 2.90 g

磷酸二氢钾（KH2PO4） 0.20 g

加蒸馏水至 1 000 mL

将上述成分依次溶解，分装，121℃，20 min高压灭菌，置于4℃冰箱保存。

A.3 组织化学染色溶液

溶液1 将蒸馏水450 mL和苯酚5 mL加入含2.5g碱性品红的95%乙醇50 mL中，置37℃ 48 h，

过滤后室温保存于暗处。

溶液2 取Na2HPO4 11.65 g，NaH2PO4·H2O 2.47g，加蒸馏水至1 000 mL，调pH值为7.5。

溶液3 取溶液1（20 mL）、溶液2（25 mL），混合后静置10 min，用普通滤纸过滤后使用。

溶液4 0.5%柠檬酸。

溶液5 亮绿0.2 g，冰乙酸（CH₃COOH）0.2 mL，蒸馏水100 mL。

溶液6 溶液5（20 mL），蒸馏水50 mL。

A.4 含1%灭能健康兔血清的0.15 mol/L pH 7.2磷酸盐缓冲液（PBS）稀释液

1. 0.15 mol/L pH 7.2 PBS配制

|  |  |
| --- | --- |
| 磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O） | 19.34 g |
| 磷酸二氢钾（KH2PO4） | 2.86 g |
| 氯化钠（NaCl） | 4.25 g |
| 蒸馏水 | 加至500 mL |
| 103.41 kPa 30 min灭菌 | |

1. 健康兔血清

灭能。

1. 含1%灭能健康兔血清0.15 mol/L pH 7.2 PBS稀释液的配制

|  |  |
| --- | --- |
| 0.15 mol/L pH 7.2 PBS | 99 mL |
| 灭能健康兔血清 | 1 mL |
| 二者混合，即为含1%灭能健康血清0.15 mol/L pH 7.2 PBS稀释液。 | |

A.5 巴比妥缓冲液（VBS 储存液）

|  |  |
| --- | --- |
| 5，5-二乙基巴比妥酸（C8H12N2O3） | 5.75 g |
| 5，5-二乙基巴比妥酸钠（C8H11N2NaO3） | 3.75 g |
| 氯化钠（NaCl） | 85.00 g |
| 六水合氯化镁（MgCl₂·6H₂O） | 1.68 g |
| 氯化钙（CaCl） | 0.28 g |
| 蒸馏水 | 2 000 mL |

首先用1 000 mL蒸馏水将各种盐溶解，再用500 mL热蒸馏水溶解巴比妥酸，待巴比妥酸冷却后加入1 000 mL 盐溶液中，用蒸馏水补至2 000 mL，混匀，以0.104 MPa~0.112 MPa 灭菌 20 min，分装储存置4℃保存备用。用前将所配液体用蒸馏水做 1:5 稀释，调节pH值至 7.2。

附 录 B

（资料性附录）

荧光PCR反应体系配制

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 1个反应的加入量 |
| 2x Animal Detection U+ Probe qPCR Super PreMix | 12.5 μL |
| Cps F（10 µM） | 1.0 μL |
| Cps R（10 µM） | 1.0 μL |
| Cps Pb（10 µM） | 0.5 μL |
| DEPC水 | 补体积至20 μL |
| 模板 | 5 μL |
| 合计 | 25 μL |

附 录 C

（资料性附录）

鹦鹉热衣原体补体结合抗原的制备

制备补体结合试验用标准抗原，最简单而又常用的方法是用细胞培养体外增殖鹦鹉热衣原体。目前大多使用的有三种方法，其中方法 1 与方法 2 很相似：两者均包括鹦鹉热衣原体在细胞中的生长，鹦鹉热衣原体的灭活、抗原的提纯、机械裂解和适当缓冲液稀释。所用方法的选择取决于各自实验室现有的设备。

方法1：细胞增殖鹦鹉热衣原体。将标准鹦鹉热衣原体接种敏感细胞，当细胞出现病变时，收集细胞内增殖的鹦鹉热衣原体。加入苯酚溶液（终浓度为 1.0%），37℃灭活 24 h。以 10 000 g 离心1 h 浓缩，弃去上清液。沉淀物用 VBS 重悬浮为原体积的 10%（pH 7.2），其中VBS 含 1%苯酚和 1%甘油。沉淀物冰浴后用匀浆器匀浆 3 次，每次 1min。最后，将匀浆液以 100 g 离心15 min，收集上清液备用。

方法2：用鹦鹉热衣原体接种 L 细胞株制备抗原，待细胞发生病变达 70%以上。弃去细胞培养液。56℃热激 40 min，细胞在蒸馏水中溶解，然后用超声波法裂解鹦鹉热衣原体，并以 VBS 配成等渗液。检测抗原用康复期绵羊标准阳性血清标定。微量法补体结合试验时，配成 2 单位抗原备用。

方法3：制备鹦鹉热衣原体阴性抗原。按6.1或6.2制备鹦鹉热衣原体阳性的卵黄囊或细胞培养物，用PBS液或细胞培养液以1:3稀释，高压灭菌20 min。待悬液冷却后，用组织匀浆器充分匀浆 3 min~5 min，然后加终浓度为 0.5%的苯酚溶液。使用前以1 000 g离心20 min，取上清液备用。该抗原4℃保存可长期使用。

方法4：制备鹦鹉热衣原体阴性抗原。收集10 d~14 d 的SPF鸡胚卵黄囊或无病原体感染的细胞培养物，用PBS液或细胞培养液以1:3稀释，高压灭菌20 min。待悬液冷却后，用组织匀浆器充分匀浆 3 min~5 min，然后加终浓度为0.5%的苯酚溶液。使用前以1 000 g离心20 min，取上清液备用。该抗原4℃保存可长期使用。

附 录 D

（资料性附录）

致敏绵羊血红细胞的制备

采集健康绵羊血，脱纤血与等体积阿氏液混合后可在4℃下保存4周。取25 mL VBS 液洗涤25 mL 绵羊血红细胞（sheep red blood cells，SRBC），400 g 离心10 min，弃上清液，将沉淀悬浮于50 mL VBS中，反复洗涤3次。最后一次洗涤后，取2.2 mL压积SRBC加98 mL VBS液。然后用光密度标定SRBC：1 mL洗涤后的SRBC稀释加14 mL蒸馏水，用分光光度计以波长为550 nm测定吸收值。通过稀释可将该溶液标定为吸收值为0.25的标准液，可利用式（E.1）确定稀释度。

……………………………（E.1）

例如：在某次试验中，1 mL洗涤后的 SRBC 稀释液加 14 mL蒸馏水充分混匀后，以波长为550 nm测定吸收值为0.5。那么根据式（E1）制备吸光值为0.25的标准液，最终SRBC稀释倍数为（0.5x15 mL）/0.25，只要在2.2 mL压积 SRBC加入98 mL VBS液稀释的基础上做30倍稀释（1 mL洗涤后的SRBC稀释液加29 mL蒸馏水充分混匀即可）。

使用前，向SRBC中快速加入等体积含适度稀释溶血素的VBS，置37℃水浴15 min，致敏红细胞。

附 录 E

（资料性附录）

补体效价的测定

鹦鹉热补体结合试验中，要提高试验的敏感性，首先要在补体中添加终浓度为5%正常鸡血清，然后进行补体效价的测定。加鸡血清后，补体溶液建议以1:30首次稀释，配制一系列不同补体含量的 VBS液。VBS 应含有试验用的抗原（观察该抗原是否有抗补体特性）。测定补体效价时，通常用的方法是按：0.1 mL补体+0.9 mL VBS；0.12 mL 补体+0.88 mL VBS等依次往下作第二次稀释，一直到0.25 mL 补体+0.75 mL VBS液。37℃水浴中孵2 h后，向每管加入0.5 mL致敏SRBC，37℃再孵育1 h，能使红细胞完全溶血的最高稀释度为一个补体单位。根据该方法，可用式（F.1）计算2单位/0.05 mL的补体溶液稀释度。

X=（*di*）V/2*dh*…………………………………………（F.1）

式中：

X——配制2单位补体稀释度的倒数；

*di*——滴定试验中补体起始稀释度的倒数（1/30）；

V——滴定试验中补体2次稀释后所加稀释液的体积；

*dh*——在滴定试验中使完全溶血所加起始补体稀释液的2倍体积数。

例如：在某次补体效价的测定中，补体起始稀释度为1/30，能使红细胞完全溶血时，补体最高稀释度是以0.1 mL补体+0.9 mL VBS配制。那么，在式（F.1）中，*di*值为30，V值为1 mL，即（0.1 mL补体+0.9 mL VBS）。*dh*值为0.2。即（2 x 0.1 mL），因此，在该次配制2单位补体时，补体的稀释度的倒数就为75，[（30 x 1）/2 x 0.2]，即只要将含5%正常鸡血清的补体进行75倍稀释就可得到2单位/0.05 mL 的补体溶液。