



中华人民共和国国家标准

GB/T 23197—2022

代替 GB/T 23197—2008

鸡传染性支气管炎诊断技术

Diagnostic techniques for avian infectious bronchitis

2022-12-30 发布

2023-07-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 临床诊断	2
6 样品采集、保存与运输	2
7 病毒分离与鉴定	3
8 病毒 RT-PCR	4
9 病毒实时荧光 RT-PCR	5
10 病毒基因型鉴定	6
11 血凝及血凝抑制试验	7
12 气管环组织培养血清中和试验	9
13 综合判定	10
附录 A (规范性) 常用试剂溶液配制	12
附录 B (资料性) RT-PCR 溶液的配制	14
附录 C (资料性) 鸡传染性支气管炎病毒 RT-PCR 检测结果参照图	16
附录 D (资料性) 鸡传染性支气管炎病毒实时荧光 RT-PCR 检测结果参照图	17
附录 E (资料性) Reed-Muench 法计算 $TOC-ID_{50}$ 和血清中和效价	18



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。

本文件代替 GB/T 23197—2008《鸡传染性支气管炎诊断技术》，与 GB/T 23197—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了“临床诊断”(见第 5 章,2008 年版的第 2 章)；
- 增加了“样品采集”和“样品处理”(见 6.3 和 6.5)；
- 更改了“病毒分离与鉴定”(见第 7 章,2008 年版的第 3 章)；
- 更改了“病毒 RT-PCR”，更新了检测引物(见 8.3,2008 年版的第 4 章)；
- 增加了“病毒实时荧光 RT-PCR”(见第 9 章)；
- 增加了“病毒基因型鉴定”(见第 10 章)；
- 更改了“血凝及血凝抑制试验”(见第 11 章,2008 年版的第 5 章)；
- 更改了“气管环组织培养血清中和试验”(见第 12 章,2008 年版的第 6 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专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、青岛农业大学、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、临朐县畜牧业发展中心。

本文件主要起草人：龚振华、王建琳、王凯、王楷宸、牟瑞营、王艳波、张云香、王晓颖、王丽萍、王素春、苏红、庞素芬、刘坤、谭刘刚、韩宗玺、吴延功、刘胜旺。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2008 年首次发布为 GB/T 23197—2008；
- 本次为第一次修订。

引 言

鸡传染性支气管炎(infectious bronchitis, IB)由鸡传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)引起,是鸡的一种急性、高度接触性传染病。IB可以发生于各种日龄的鸡,5周龄以内的鸡尤其易感,且症状较明显。IB的临床特征主要表现为病鸡呼吸困难、有啰音、咳嗽、打喷嚏;产蛋量降低、蛋的品质下降;雏鸡出现死亡。IB广泛流行于世界各地,严重危害养鸡业生产。

IBV在分类上属于冠状病毒科、冠状病毒亚科、 γ 病毒属,是一种单股正链RNA病毒,其RNA易于变异,IBV具有多样性。多数IBV毒株能使气管产生特异性病变,但有些毒株能引起肾脏病变和生殖道病变。目前国内外已经分离出的IBV毒株分属30多个血清型,各血清型IBV毒株间的交叉免疫保护力低。

IB的诊断主要通过病原学和血清学试验进行。因生产上广泛采用IBV活毒株疫苗预防本病,这在临床上增加了诊断IB的难度。

本文件规范了IB的临床诊断技术;规范了IB的病原学诊断技术,包括病毒分离与鉴定、病毒RT-PCR、病毒实时荧光RT-PCR、病毒基因型鉴定;规范了IB的血清学诊断技术,包括血凝及血凝抑制试验、气管环组织培养血清中和试验。这些诊断技术也是《OIE陆生动物诊断试验与疫苗手册》推荐的诊断IB的技术,本次修订过程中,对于该手册所推荐的相关诊断技术均有借鉴。

鸡传染性支气管炎诊断技术

1 范围

本文件规定了鸡传染性支气管炎(IB)的临床诊断、病毒分离与鉴定、病毒 RT-PCR、病毒实时荧光 RT-PCR、病毒基因型鉴定、血凝及血凝抑制试验、气管环组织培养血清中和试验的技术要求。

本文件适用于 IB 的诊断、检疫、监测和流行病学调查。

2 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)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鸡传染性支气管炎 infectious bronchitis

由隶属于冠状病毒科、冠状病毒亚科、 γ 病毒属的鸡传染性支气管炎病毒引起的主要感染鸡的疾病。

3.2

血凝 hemagglutinin

IBV 毒株的培养液经胰酶消化处理后得到的抗原凝集鸡红细胞的过程。

注:通过选用适当 IBV 毒株,制备 IBV 血凝抗原,进行 IB 的血清学诊断。

3.3

血凝抑制 hemagglutinin inhibition

IB 抗体特异性地附着在 IBV 血凝抗原的特异位点上,干扰 IBV 血凝抗原与红细胞受体之间的结合,抑制 IBV 血凝抗原凝集鸡红细胞的能力。

3.4

Ct 值 cycle threshold

每个实时荧光 RT-PCR 反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环次数。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HI:血凝抑制(Hemagglutinin Inhibition)

IB:鸡传染性支气管炎(Infectious Bronchitis)



PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

RNA:核糖核酸(Ribonucleic Acid)

RT-PCR:反转录-聚合酶链式反应(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

SPF :无特定病原体(Specific Pathogen Free)

TOC:气管环组织培养(Tracheal Organ Cultures)

TOC-ID₅₀:气管环组织培养半数感染量(Tracheal Organ Cultures Median Infective Dose)

5 临床诊断

5.1 流行病学

5.1.1 主要感染鸡,很少感染其他家禽。所有日龄的鸡都可能感染,但主要侵害 5 周龄以内的鸡。

5.1.2 传染源为病鸡和健康带毒鸡。主要通过接触传播和气溶胶传播,也可通过粪便、养禽设备、流动机械、有关人员等传播。

5.2 临床症状

5.2.1 呼吸困难、有啰音或喘鸣音、咳嗽、打喷嚏、流鼻涕。

5.2.2 产蛋率下降、停产或产畸形蛋。畸形蛋包括软壳蛋、砂壳蛋或蛋清稀薄如水等。

5.2.3 排白色稀粪、脱水。

5.2.4 感染鸡死亡。

5.3 病理变化

5.3.1 鼻道或窦中有浆液性、卡他性或干酪样的渗出物。

5.3.2 气管后段或支气管中可见到干酪样的栓子。

5.3.3 肺脏支气管周围可见到小的肺炎区。

5.3.4 气囊呈现混浊或含有黄色干酪样渗出物。

5.3.5 肾脏苍白、肿大,肾小管和输尿管尿酸盐沉积。

5.3.6 产蛋鸡腹腔中有卵黄液。

5.3.7 成年鸡因早期感染,导致输卵管呈永久性退行病变。

5.4 结果判定

符合上述流行病学特征、临床症状和病理变化的病例,判定为疑似 IB。确诊应进一步进行实验室诊断。

6 样品采集、保存与运输

6.1 总则

宜选择 IB 发病初期、具有典型临床症状的鸡,进行样品采集。采样过程中,避免交叉污染。样品采集、保存及运输按照 GB 19489 的规定执行。

6.2 试剂

6.2.1 pH 7.4 的 PBS,按照附录 A 中的 A.1 配制。

6.2.2 含青霉素、链霉素的 PBS 溶液,将一定量的青霉素、链霉素贮存溶液(按照 A.2 配制)加入一定量的 pH 7.4 的 PBS 中,使青霉素、链霉素含量分别为 2 000 IU/mL、2 mg/mL。

6.3 样品采集

6.3.1 咽喉拭子

将灭菌的棉拭子插入鸡咽喉部位,旋转棉拭子擦拭 3 次~5 次。待棉拭子沾有黏液后,将其放入装有 2 mL 含青霉素、链霉素 PBS 溶液的采样管中,加盖密封保存。

6.3.2 组织器官

无菌采集鸡气管、肺脏、肾脏、输卵管等组织器官约 4 g,置于无菌采样袋或其他灭菌容器中,密封保存。

6.3.3 血清

无菌采集鸡翅下静脉血约 1.5 mL,分离血清。将血清置于 1.5 mL 无菌离心管中,加盖密封保存。

6.4 样品保存和运输

样品采集后,应尽快置保温箱中,加入预冷的冰袋,密封,宜 24 h 内送实验室检测。待检样品应尽快处理,在 4 °C 存放不超过 24 h;在 -20 °C 冷冻保存时间可稍长;若需长期保存,应放置于 -70 °C 以下条件。尽量避免反复冻融。

6.5 样品处理

6.5.1 拭子样品处理

拭子样品于旋涡振荡器上振荡混匀,于 4 °C 以 6 000 r/min 离心 15 min,取上清液待检。

6.5.2 血清样品处理

血清样品以 6 000 r/min 离心 5 min,取上清液待检。

6.5.3 组织器官样品处理

取待检组织器官样品约 2 g,加入 4 mL 含青霉素、链霉素 PBS 溶液,充分研磨,混匀,于 4 °C 以 6 000 r/min 离心 15 min,取上清液待检。

7 病毒分离与鉴定

7.1 仪器设备

7.1.1 照蛋器。

7.1.2 孵化器。

7.1.3 注射器(1 mL、5 mL)。

7.1.4 II 级生物安全柜。

7.2 试剂

同 6.2。

7.3 分离培养

7.3.1 被检样品前处理按照 6.5 进行。

7.3.2 按 0.2 mL/枚的接种量,将被检样品上清液无菌接种于 5 枚或以上 9 日龄~12 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔,37 °C 孵育。每天照胚观察,接种后 24 h 内死亡的鸡胚弃去。收集死鸡胚和接种 6 d 后仍存活鸡胚尿囊液,并观察记录鸡胚病变。

7.4 病毒鉴定

7.4.1 若接种被检样品的鸡胚出现特征性矮小病变,胚蜷成球形,脚趾变形压在头上,肾小管出现尿酸盐沉积,可初步判定为 IBV 病毒分离疑似阳性,但需要进一步按照第 8 章、第 9 章、第 10 章的方法对疑似阳性的病毒尿囊液进行鉴定。若任一方法鉴定其为 IBV 阳性,则判定被检样品为 IBV 病毒分离阳性;若 3 种方法均鉴定其为 IBV 阴性,则判定被检样品为 IBV 病毒分离阴性。

7.4.2 若接种被检样品的鸡胚未出现病变,应收集其尿囊液,继续连续接种鸡胚 5 代。收集培养 5 代后的尿囊液按照第 8 章、第 9 章、第 10 章的方法进行鉴定。若任一方法鉴定其为 IBV 阳性,则判定被检样品为 IBV 病毒分离阳性;若 3 种方法均鉴定其为 IBV 阴性,则判定被检样品为 IBV 病毒分离阴性。

8 病毒 RT-PCR

8.1 仪器设备

8.1.1 PCR 扩增仪。

8.1.2 微量移液器(10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L 等),离心管、PCR 管与吸头均无核酸酶。

8.1.3 台式高速冷冻离心机(最大离心力 12 000 g 以上)。

8.1.4 PCR 电泳仪。

8.1.5 电泳槽。

8.1.6 凝胶成像仪。

8.1.7 II 级生物安全柜。

8.2 试剂

8.2.1 Trizol 溶液。

8.2.2 三氯甲烷。

8.2.3 异丙醇。

8.2.4 75%乙醇。

8.2.5 RT-PCR 一步法试剂盒。

8.2.6 无 RNA 酶灭菌双蒸水,配制方法参见附录 B 中的 B.1。

8.2.7 DL2 000 marker。

8.2.8 电泳缓冲液,配制方法参见 B.2。

8.2.9 1.5%琼脂糖凝胶,配制方法参见 B.3。

8.2.10 IBV 阳性对照,灭活的 IBV 鸡胚培养尿囊液。

8.2.11 IBV 阴性对照,SPF 鸡胚尿囊液。

8.3 引物

根据 IBV 的 S 基因设计引物。上游引物 IBV-SF 序列为:5'- AAGCAGAGCCTTGTCCCG-3',下

引物 IBV-SR 序列为:5'-CATTTCCCTGGCGATAGAG-3'。

8.4 病毒 RNA 提取

8.4.1 被检样品前处理按照 6.5 进行。

8.4.2 取被检样品上清液 400 μL ,置于灭菌的 1.5 mL 离心管中,加入 800 μL Trizol 溶液,振匀,室温静置 5 min。加入 200 μL 三氯甲烷,振荡 15 s,室温静置 3 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 12 000 g 离心 15 min。

8.4.3 取离心后的上清液 400 μL ,置于灭菌的 1.5 mL 离心管,加入 400 μL 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的异丙醇,颠倒混匀,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 12 000 g 离心 15 min,弃上清液。离心管中加入 600 μL 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 75% 乙醇,洗涤,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 12 000 g 离心 10 min,弃上清液。重复洗涤 2 次后,将离心管在吸水纸上控干。

8.4.4 在控干的离心管中加入 20 μL 无 RNA 酶的水,溶解 RNA,冰上保存待检。

注:若采用商品化试剂盒提取病毒 RNA,其使用方法参见商品试剂盒说明书。

8.5 RT-PCR 反应

参见 B.4,配置 RT-PCR 一步法反应体系。同时设立 IBV 阳性对照和阴性对照。反应条件为:42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 60 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,共进行 35 次循环;最后,72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。反应结束后,RT-PCR 产物置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

8.6 电泳

将 RT-PCR 产物加入 1.5% 琼脂糖凝胶孔中,加 DL2 000 marker 作为电泳参照物。调节电压 80 V~100 V,电泳时间约 25 min。电泳结束后,用凝胶成像仪观察结果。

8.7 结果判定

8.7.1 试验成立条件:IBV 阳性对照出现 1 600 bp 目的条带,且 IBV 阴性对照无相应条带(见附录 C),实验成立。

8.7.2 被检样品出现 1 600 bp 目的条带,判定为 IBV 核酸阳性;被检样品无 1 600 bp 目的条带,判定为 IBV 核酸阴性。

9 病毒实时荧光 RT-PCR

9.1 主要仪器设备

9.1.1 荧光 PCR 扩增仪。

9.1.2 其余仪器设备与 8.1.2、8.1.3、8.1.7 给出的设备相同。

9.2 试剂

9.2.1 常规化学试剂与 8.2.1、8.2.2、8.2.3、8.2.4 给出的试剂相同。

9.2.2 荧光 RT-PCR 一步法试剂盒。

9.2.3 IBV 对照样品:阳性对照(8.2.10);阴性对照(8.2.11)。

9.3 引物和探针

根据 IBV 的 N 基因设计引物和探针。上游引物 IBV-NF 序列为:5'-TTGAAGGTAGYGGYGT-TCCTGA-3';下游引物 IBV-NR 序列为:5'-CAGMAACCCACACTATACCATC-3';探针 IBV-NP 序列

为:5'-ACWGG AACAGGACCDGCCGCTGACCT-3',探针 5'端连接 VIC 荧光基团,3'端连接 BHQ-1 淬灭基团。D 简并 G/A/T;M 简并 A/C;W 简并 A/T;Y 简并 C/T。

9.4 病毒 RNA 提取

按照 8.4 的规定进行。

9.5 实时荧光 RT-PCR 反应

参见 B.5,配制实时荧光 RT-PCR 反应体系。同时设立 IBV 阳性对照和阴性对照。将 PCR 管置于 荧光定量 PCR 仪上进行 RT-PCR 扩增,反应条件为:42 °C 反转录 5 min;95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,共进行 40 次循环。每次循环在 60 °C 退火 30 s 时搜集荧光信号。

9.6 质控标准

9.6.1 IBV 阳性对照 Ct 值小于或等于 30,且出现特征性扩增曲线(见附录 D)。

9.6.2 IBV 阴性对照无 Ct 值,且无特征性扩增曲线。

9.7 结果判定

9.7.1 被检样品 Ct 值 ≤ 35,且出现特征性扩增曲线,判定为 IBV 核酸阳性。

9.7.2 被检样品无 Ct 值或 Ct 值 > 38,且无特征性扩增曲线,判定为 IBV 核酸阴性。

9.7.3 被检样品 35 < Ct 值 ≤ 38 且出现特征性扩增曲线,判定为可疑,需重复检测。如重复检测结果为 IBV 核酸阳性或仍为可疑,判定被检样品为 IBV 核酸阳性;否则判定为 IBV 核酸阴性。

10 病毒基因型鉴定

10.1 仪器设备

与 8.1 给出的仪器设备相同。

10.2 试剂

IBV 阳性对照为已知基因型 IBV 毒株、电泳参照物为 DL 1 000 marker。其余相应试剂均同 8.2。

10.3 引物序列

7 种 IBV 的基因型、鉴定相关基因型的引物序列及相应的 RT-PCR 产物长度见表 1。

表 1 鉴定 IBV 基因型的引物序列及其 RT-PCR 产物长度

IBV 基因型	引物序列 方向 5'-3'	RT-PCR 产物长度 bp
Mass	上游引物: GATGGGTGTCCTATAACTGGCATGC	355
	下游引物: CTCGAATTCNGTRTTRTAYTGRCA	
Ark	上游引物: GATGGGTGTCCTATAACTGGCATGC	308
	下游引物: CTCGAATTCNGTRTTRTAYTGRCA	

表 1 鉴定 IBV 基因型的引物序列及其 RT-PCR 产物长度 (续)

IBV 基因型	引物序列 方向 5'-3'	RT-PCR 产物长度 bp
JMK	上游引物:GCACCTGGCAATTCT	550
	下游引物:CTCGAATTCNGTRTRTRTAYTGRCA	
Ca/633/85	上游引物:CAGAAGCAGGTTCTGCTAAC	555
	下游引物:CTCGAATTCNGTRTRTRTAYTGRCA	
Coon	上游引物:TCAAAGCTTCANGGNGGNCNTA	261
	下游引物:GTATAGACTGTGGAATGGA	
De/072/92	上游引物:TCAAAGCTTCANGGNGGNCNTA	492
	下游引物:TATGCCATAACAGGTGTA	
4/91	上游引物:AGTAGTTTTGTGTATAAACCA	153
	下游引物:CAGATTGCTTACAACCACC	
注: N 简并 A/T/G/C; R 简并 A/G; Y 简并 A/G。		

10.4 病毒 RNA 提取

按照 8.4 的规定进行。

10.5 鉴定 IBV 基因型的 RT-PCR 反应

按照 8.5 的规定进行。

10.6 电泳

按照 8.6 的规定进行。

10.7 结果判定

10.7.1 试验成立条件: IBV 阳性对照出现相应目的条带(条带长度见表 1), IBV 阴性对照样品无目的条带, 试验成立。

10.7.2 被检样品出现与基因型鉴定引物对应目的条带, 判定 IBV 为该基因型; 被检样品无引物对应目的条带, 则不判定 IBV 的基因型。

10.7.3 对于用表 1 中 7 种引物不能识别 IBV 基因型的被检样品, 按照第 8 章描述的方法, 将该样品的 IBV 核酸进行 RT-PCR, 对扩增的目的 DNA 产物进行测序, 与 NCBI 数据库公布的 IBV 基因序列比对, 确定被检样品的 IBV 基因型。

11 血凝及血凝抑制试验

11.1 仪器设备

11.1.1 96 孔 V 形微量反应板。

11.1.2 振荡器。

11.1.3 微量移液器(10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等)。

11.2 试剂

11.2.1 pH 7.4 的 PBS。

11.2.2 IB 标准抗原。

11.2.3 IB 标准阳性血清。

11.2.4 IB 阴性血清,为 SPF 鸡血清。

11.2.5 1%鸡红细胞悬液,按照 A.3 的方法进行配制。

11.3 血凝试验

11.3.1 按 V 形微量反应板由左到右的顺序,在第 1 孔至第 12 孔中均滴加 25 μL 的 PBS。

11.3.2 取 IB 抗原 25 μL ,加于 V 形微量反应板的第 1 孔,倍比稀释至第 11 孔,第 11 孔吸 25 μL 弃去。第 12 孔中仅为 25 μL PBS,作为对照。

11.3.3 每孔中加入 25 μL 1%鸡红细胞悬液,振荡混匀。将 V 形微量反应板于室温静置约 40 min,当对照孔(第 12 孔)红细胞呈显著纽扣状时,判定结果。将 V 形微量反应板倾斜 45°,以红细胞无流淌视为完全凝集,完全凝集的抗原最高稀释倍数为抗原血凝效价。

11.3.4 计算出含 4 个血凝单位抗原的稀释倍数。将血凝效价除以 4,即为含 4 个血凝单位抗原稀释液应予的稀释倍数。

11.4 血凝抑制试验

11.4.1 被检血清样品前处理按照 6.5 进行。

11.4.2 按 V 形微量反应板由左到右的顺序,在第 1 孔至第 12 孔中均滴加 25 μL PBS。

11.4.3 取 25 μL 被检血清于第 1 孔中,混匀后取 25 μL 于第 2 孔,依次倍比稀释至第 11 孔,最后 25 μL 弃去。第 12 孔仅为 25 μL PBS。

11.4.4 根据 11.3.4,用 PBS 稀释制备含 4 个血凝单位的 IB 抗原液。除第 1 孔不加抗原外,第 2 至第 12 孔加入 25 μL 4 个血凝单位的 IBV 抗原液。V 形微量反应板室温下静置约 30 min。

11.4.5 加 25 μL 1%红细胞悬液于各孔中,振荡混匀,V 形微量反应板室温下静置约 40 min。将 V 形微量反应板倾斜 45°,观察有无红细胞凝集。以完全抑制红细胞凝集的血清最大稀释倍数为被检血清样品的血凝抑制(HI)滴度。

11.4.6 试验成立条件:第 1 列血清对照孔呈显著纽扣状,第 12 列抗原对照孔完全凝集,同步进行的 IB 阳性血清对照的结果与已知效价不超过 2 个滴度,IB 阴性血清对照的结果不高于 $2\log_2$ 。条件全部成立时,判定试验结果。

11.4.7 结果判定:被检样品 $\text{HI} \geq 4\log_2$,判定为 IB 抗体阳性;被检样品 $\text{HI} \leq 3\log_2$,判定为 IB 抗体阴性。若 $4\log_2 > \text{被检样品 HI} > 3\log_2$,需要对被检样品重复试验;重复试验结果为该被检样品 $\text{HI} > 3\log_2$,判定为 IB 抗体阳性;否则判定为 IB 抗体阴性。

注:血凝抑制试验主要针对与 IBV 抗原血清型一致的疫苗免疫抗体。若采用有注册资质的 IB 商用 ELISA 试剂盒检测鸡群 IBV 免疫抗体,考虑到一些商品化 ELISA 试剂盒检测 IB 抗体的方法和条件不同,试验操作时,依照与商品化 ELISA 试剂盒配套的说明书进行。

12 气管环组织培养血清中和试验

12.1 仪器设备

- 12.1.1 眼科剪。
- 12.1.2 眼科镊子。
- 12.1.3 平皿。
- 12.1.4 细胞培养板(48孔)。
- 12.1.5 吸管。
- 12.1.6 注射器(1 mL、5 mL)。
- 12.1.7 离心管。
- 12.1.8 倒置显微镜。
- 12.1.9 37℃培养箱。
- 12.1.10 II级生物安全柜。

12.2 试剂

- 12.2.1 Hank's液,按照A.4的方法配制
- 12.2.2 含青霉素、链霉素Hank'液,将一定量的青霉素、链霉素贮存溶液加入一定量的Hank's液中,使青霉素、链霉素的含量分别为2000 IU/mL、2 mg/mL。
- 12.2.3 0.4%酚红溶液,按照A.5配制。
- 12.2.4 7%碳酸氢钠(NaHCO_3)溶液,按照A.6配制。
- 12.2.5 DMEM培养液。
- 12.2.6 犊牛血清。
- 12.2.7 IBV病毒。
- 12.2.8 IB阳性血清。
- 12.2.9 IB阴性血清。

12.3 气管环组织培养(TOC)

- 12.3.1 取18日龄~20日龄的SPF鸡胚,无菌打开蛋壳,取出鸡胚,置于灭菌的平皿内。
- 12.3.2 无菌剪开鸡胚颈部皮肤,剥离气管周围组织,取出气管,用含青霉素、链霉素Hank's液冲洗两次。
- 12.3.3 无菌将剪成1 mm厚的气管环组织置于细胞培养板孔中,每孔放置1个气管环组织,加入1 mL含2%犊牛血清的DMEM培养液,调节pH值7.2~7.4(用0.4%酚红溶液指示酸碱度,7% NaHCO_3 溶液调节酸碱度)。37℃培养24 h后,在倒置显微镜下进行观察。
- 12.3.4 待气管环组织培养物上皮完整、纤毛运动活泼,即可进一步用作IBV抗体中和试验。

12.4 IBV对气管环组织培养半数感染量(TOC-ID₅₀)的测定

- 12.4.1 用含2%犊牛血清的DMEM培养液(pH 7.2~7.4)将IBV按 10^{-1} 至 10^{-9} 稀释,每个稀释度各取1 mL,分别接种5个培养好的气管环组织培养物的板孔中。另取5个气管环组织培养物,仅加入1 mL含2%犊牛血清的DMEM培养液,作为对照。37℃培养6 d。
- 12.4.2 对照气管环组织培养物于37℃培养6 d应无病变,即上皮细胞不脱落,且50%以上纤毛正常

运动。记录接种 IBV 后培养 6 d 内的气管环组织培养物的病变结果,气管环组织培养物发生病变时,表现为细胞脱落,正常运动的纤毛少于 25%。

12.4.3 统计试验数据,按 Reed-Muench 法计算 TOC-ID₅₀,见附录 E。

12.5 气管环组织培养血清中和试验

12.5.1 样品前处理

被检血清样品前处理首先按照 6.5 进行;进行中和试验前,还需要 56 °C 水浴灭活 30 min。

12.5.2 试验方法

采用固定病毒-稀释血清的方法。用含 2% 犊牛血清的 DMEM 培养液(pH 7.2~7.4)将被检样品作倍比稀释,如 1:2,1:4,⋯,1:256 等。取每个滴度的稀释被检样品 2.5 mL,加入 2.5 mL 含 200 个 TOC-ID₅₀的稀释 IBV(用含 2% 犊牛血清的 DMEM 培养液稀释,pH 7.2~7.4),充分混匀后置 37 °C 温箱内反应 1 h。将稀释被检样品和 IBV 的反应混合液接种 5 孔气管环组织培养物,每孔接种液量为 1 mL。37 °C 培养 6 d 后,判定结果。

12.5.3 试验对照

气管环组织培养物空白对照为取 5 孔气管环组织培养物,各加入 1 mL 含 2% 犊牛血清的 DMEM 培养液。

病毒对照为将 IBV 用 Hank's 液稀释成每个接种剂量含 10⁻²个~10²个 TOC-ID₅₀,每个滴度接种于 5 孔气管环组织培养物,每孔接种量为 1 mL。

血清毒性对照为将低倍稀释的被检血清样品加入 5 孔气管环组织培养物,每孔加入 1 mL。

IB 阳性血清对照和 IB 阴性血清对照则与被检血清样品进行同步平行试验。

12.5.4 试验成立条件

试验成立条件如下:

——气管环组织培养空白对照应无病变;

——10⁻¹个和 10⁻²个 TOC-ID₅₀病毒对照应无病变,10⁰个 TOC-ID₅₀病毒对照出现部分病变,10¹个和 10²个 TOC-ID₅₀病毒对照出现全部病变;

——血清毒性对照应无病变;

——阳性对照血清中和效价试验结果与其已知的中和效价应不超过 2log₂ 的滴度,阴性血清中和效价应≤4。

当所有条件成立时,统计被检样品试验数据,按 Reed-Muench 法(见附录 E)计算血清的中和效价。

12.5.5 结果判定

被检样品中和效价大于或等于 16,判定为 IB 抗体阳性;被检样品中和效价小于或等于 4,判定为 IB 抗体阴性。

若被检样品中和效价大于 4 且小于 16,需要对被检样品重复试验。重复试验结果为该被检样品中和效价大于 4,判定为 IB 抗体阳性;否则判定为 IB 抗体阴性。

13 综合判定

13.1 对于未接种过 IB 疫苗的鸡群,按照第 7 章、第 8 章、第 9 章、第 10 章的方法检测其样品 IBV,若任

一种试验方法的检测结果为 IBV 阳性,则判定被检鸡感染了 IBV。

13.2 对于未接种过 IB 疫苗的鸡群,按照第 7 章、第 8 章、第 9 章的方法检测其样品 IBV,且 3 种试验方法的检测结果均为 IBV 阴性时,可用第 11 章、第 12 章的方法检测其样品 IB 抗体,若任一种试验方法的检测结果为 IB 抗体阳性,则判定被检鸡感染过 IBV。

13.3 对于接种过 IB 疫苗的鸡群,按照第 7 章、第 8 章、第 9 章、第 10 章的方法检测其样品 IBV,若任一种试验方法的检测结果为 IBV 阳性,且证明该 IBV 阳性非疫苗株引起,判定被检鸡感染了 IBV。

13.4 对于接种过 IB 疫苗的鸡群,按照第 7 章、第 8 章、第 9 章的方法检测其样品 IBV,且 3 种试验方法的检测结果均为 IBV 阴性时,可用第 12 章的方法检测其样品 IB 抗体,若 IB 抗体结果呈阳性,且该抗体血清型不同于接种疫苗株,判定被检鸡感染过 IBV。

附 录 A
(规范性)
常用试剂溶液配制

A.1 pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)

称取 1.44 g 的磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.24 g 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、8.0 g 的氯化钠(NaCl)及 0.2 g 的氯化钾(KCl)，溶于去离子水中，定容至 1 000 mL，121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min，4 °C 保存。

A.2 青霉素、链霉素贮存溶液

取青霉素 1 000 000 IU、链霉素 1 000 000 μg ，用灭菌去离子水配成 10 mL 的上述两种抗生素的贮存液(浓度分别为：青霉素 100 000 IU/ mL、链霉素 100 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。分装小瓶，于 -20 °C 保存。

使用时根据需要，将青霉素、链霉素贮存溶液加入 PBS、Hank's 液或培养液至工作浓度，调溶液 pH 至 7.0~7.4。

A.3 1%鸡红细胞悬液

A.3.1 阿氏液的配制

称取 20.5 g 葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)、8.0 g 柠檬酸三钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)、0.55 g 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)、4.2 g 氯化钠(NaCl)，加蒸馏水至 1 000 mL，溶解，分装，120 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，4 °C 保存。

A.3.2 1%鸡红细胞悬液配制

采集至少 3 只健康成年公鸡静脉血液，以 1 : 2 的比例与阿氏液混匀，用 20 倍量 PBS 洗涤 3 次~4 次，将血浆、白细胞充分洗去、吸出，至上清液清亮。每次以 1 500 r/min 离心 5 min，最后一次 10 min。将洗涤后沉淀的红细胞用 PBS 配成体积比为 1% 的悬液。

A.4 Hank's 液

A.4.1 母液 A 配制

溶液 1：称取 160 g 氯化钠(NaCl)、8 g 氯化钾(KCl)、2 g 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、2 g 氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，将上述各成分溶于 800 mL 去离子水中。

溶液 2：取氯化钙(CaCl_2)2.8 g，溶于 100 mL 去离子水中。

将溶液 1 和溶液 2 两种溶液混合后，加无离子水至 1 000 mL，即母液 A，4 °C 保存。

A.4.2 母液 B 配制

称取 1.2 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、3.04 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、20.0 g 葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)，将上述三种成分溶于 800 mL 去离子水中，最后加入 100 mL 0.4% 酚红溶液。加无离子水至 1 000 mL，即母液 B，4 °C 保存。

A.4.3 配制 Hank's 应用液

取母液 A、B 各 1 份，去离子水 18 份，混匀后分装，120 °C 高压蒸汽灭菌 20 min，4 °C 保存。使用

前,用无菌 7%碳酸氢钠溶液调 Hank's 液 pH 值至 7.2~7.6。

A.5 0.4%酚红溶液

称取酚红 0.4 g 置研钵中,逐渐滴入 0.1 mol/L 氢氧化钠(NaOH),不断研磨至颗粒完全溶解,再加入去离子水至 100 mL。

A.6 7%碳酸氢钠(NaHCO₃)溶液

称取 7 g 碳酸氢钠溶于 100 mL 去离子水中,121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min,4 °C 保存。

附 录 B
(资料性)
RT-PCR 溶液的配制

B.1 无 RNA 酶灭菌双蒸水

灭菌双蒸水 100 mL,加入 DEPC 50 μ L,室温过夜,121 $^{\circ}$ C 高压 15 min,分装到 1.5 mL 的无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中。

B.2 50 \times TAE 电泳缓冲液

称取 18.61 g 无水乙二铵四乙酸二钠(EDTA),加入 80 mL 灭菌双蒸水,用固体氢氧化钠调 pH 至 8.0,灭菌双蒸水定容至 100 mL,得到 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)溶液(pH 8.0),室温保存。

称取 24.2 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),加入 10 mL 冰乙酸(CH_3COOH)、10 mL 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠(EDTA)(pH 8.0),加双蒸水至 100 mL,室温保存。使用时用双蒸水稀释为 1 \times TAE。

B.3 1.5%琼脂糖凝胶

称取 1.5 g 琼脂糖于 100 mL 1 \times TAE 缓冲液中,加热融化后充分摇匀,待冷至 50 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 时,加入 5 μ L 10 mg/mL 的溴化乙锭(EB)贮存液或其他商品化可用于琼脂糖凝胶电泳的 DNA 染料。摇匀,倒入插好梳子的电泳板上,凝固后取下梳子,备用。

B.4 RT-PCR 一步法反应体系

RT-PCR 一步法反应体系见表 B.1。

表 B.1 RT-PCR 一步法反应体系

组分	体积 μ L
无 RNA 酶灭菌双蒸水	23
10 \times One step RNA PCR 缓冲液	5
MgCl_2 (25 mmol/L)	10
dNTP Mixture(各 10 mmol/L)	5
上游引物(20 μ mol/mL)	1
下游引物(20 μ mol/mL)	1
RNase Inhibitor(40 U/ μ L)	1
AMV RTase XL(5 U/ μ L)	1
AMV-Optimized Taq(5 U/ μ L)	1
模板 RNA	2
总体积	50

注：不同公司生产的一步法 RT-PCR 试剂盒反应成分不同,体系不同,根据相应的说明书进行修正使用。

B.5 实时荧光 RT-PCR 反应体系

实时荧光 RT-PCR 反应体系见表 B.2。

表 B.2 实时荧光 RT-PCR 反应体系

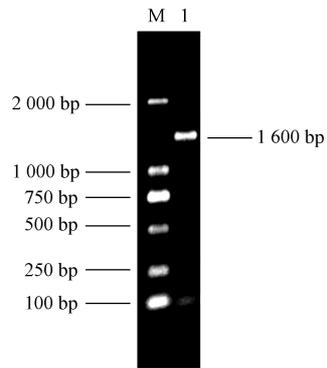
组分	体积 μL
无 RNA 酶灭菌双蒸水	8
2×反应混合液	12.5
上游引物 IBV-NF(10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	0.5
下游引物 IBV-NR(10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	0.5
探针 IBV-NP(40 U/ μL)	0.5
Pro Taq HS DNA Polymerase	0.5
RTase Enzyme Mix	0.5
模板 RNA	2
总体积	25
注：不同公司生产的实时荧光 RT-PCR 试剂盒反应成分不同，体系不同，根据相应的说明书进行修正使用。	

附 录 C

(资料性)

鸡传染性支气管炎病毒 RT-PCR 检测结果参照图

鸡传染性支气管炎病毒 RT-PCR 检测结果见图 C.1。



标引序号说明：

M ——DNA 分子量标准(DL2000 marker)；

1 ——鸡传染性支气管炎病毒阳性对照。

图 C.1 鸡传染性支气管炎病毒 RT-PCR 检测结果参照图

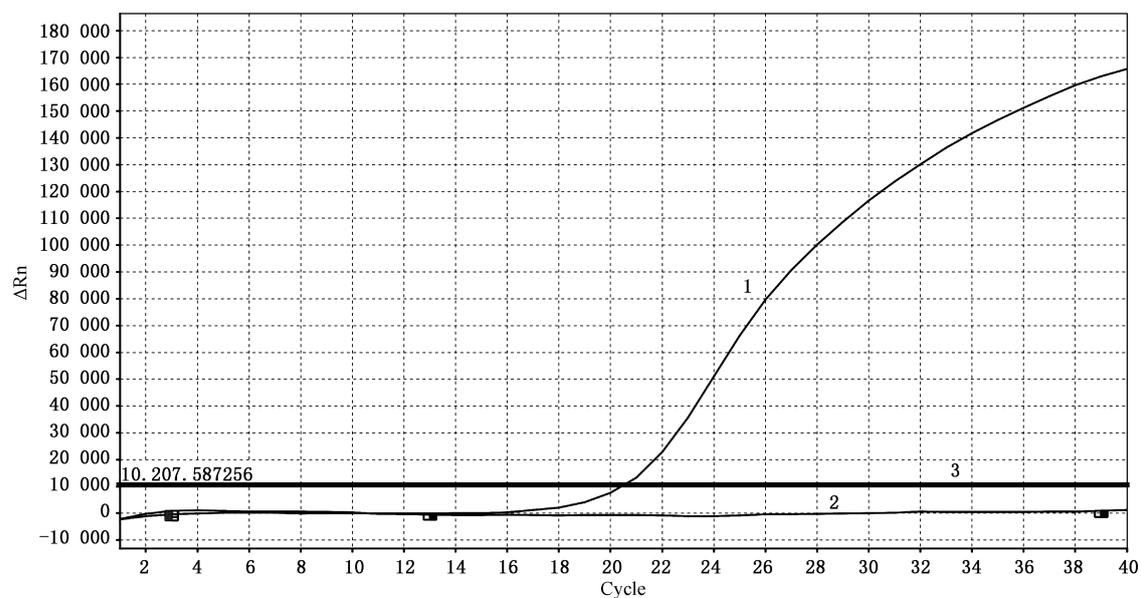


附录 D

(资料性)

鸡传染性支气管炎病毒实时荧光 RT-PCR 检测结果参照图

鸡传染性支气管炎病毒实时荧光 RT-PCR 检测结果见图 D.1。



标引序号说明：

1 —— 阳性对照；

2 —— 阴性对照；

3 —— 阈值线；

 ΔRn —— 相对荧光强度；

Cycle —— 循环数。

图 D.1 鸡传染性支气管炎病毒实时荧光 RT-PCR 检测结果参照图

附录 E

(资料性)

Reed-Muench 法计算 TOC-ID₅₀ 和血清中和效价

E.1 Reed-Muench 法计算 TOC-ID₅₀

依照 12.4 的方法对需要测定 TOC-ID₅₀ 的 IBV 进行连续 10 倍系列稀释,接种气管环组织培养物,37 °C 培养 6 d,记录气管环组织培养病变结果。计算 TOC-ID₅₀ 的示例见表 E.1。

表 E.1 TOC-ID₅₀ 的测定和计算(Reed-Muench 法)

病毒液稀释度	观察结果		累计结果		TOC 总数	出现病变的孔数 占总数的百分比 %
	病变 TOC 数	正常 TOC 数	病变 TOC 数	正常 TOC 数		
10 ⁻¹	↑ 5	↓ 0	28	0	28	100
10 ⁻²	↑ 5	↓ 0	23	0	23	100
10 ⁻³	↑ 5	↓ 0	18	0	18	100
10 ⁻⁴	↑ 5	↓ 0	13	0	13	100
10 ⁻⁵	↑ 4	↓ 1	8	1	9	88.9
10 ⁻⁶	↑ 3	↓ 2	4	3	7	57.1
10 ⁻⁷	↑ 1	↓ 4	1	7	8	12.5
10 ⁻⁸	↑ 0	↓ 5	0	12	12	0
10 ⁻⁹	↑ 0	↓ 5	0	17	17	0

出现病变的 TOC 数和正常 TOC 数分别列于表 E.1 的第 2 列和第 3 列,它们的累计数分别于第 4 列和第 5 列(根据箭头所示方向),第 6 列为 TOC 总数,第 7 列为出现病变的 TOC 数占 TOC 总数的百分率。可见该病毒株的 TOC-ID₅₀ 在 10⁻⁶ (57.1%) 和 10⁻⁷ (12.5%) 之间,其确切稀释倍数通过计算为 0.16,因此该病毒的 TOC-ID₅₀ 应是 10^{-6.16} /mL。查反对数,得 1 445 000,即该病毒 1 445 000 倍稀释可引起 50% 的气管环组织培养物出现病变。

E.2 Reed-Muench 法计算血清中和效价

依照 12.5 的方法,将被检血清稀释、中和、接种气管环组织培养物,37 °C 培养 6 d,记录气管环组织培养病变结果。计算血清中和效价的示例见表 E.2。

表 E.2 中和效价的测定和计算(Reed-Muench 法)

血清稀释度 (病毒量固定)	观察结果		累计结果		TOC 总数	出现病变的孔数 所占百分率 %	保护率 %
	病变 TOC 数	正常 TOC 数	病变 TOC 数	正常 TOC 数			
1 : 2(10 ^{-0.3})	0 ↓	5 ↑	0	12	12	0	100

表 E.2 中和效价的测定和计算(Reed-Muench 法)(续)

血清稀释度 (病毒量固定)	观察结果		累计结果		TOC 总数	出现病变的孔数 所占百分率 %	保护率 %
	病变 TOC 数	正常 TOC 数	病变 TOC 数	正常 TOC 数			
1 : 4($10^{-0.6}$)	1 ↓	4 ↑	1	6	7	14.3	85.7
1 : 8($10^{-0.9}$)	3 ↓	2 ↑	4	2	6	66.7	33.3
1 : 16($10^{-1.2}$)	5 ↓	0 ↑	5	0	5	100	0
1 : 32($10^{-1.5}$)	5 ↓	0 ↑	14	0	14	100	0

按 Reed-Muench 法计算,血清稀释度介于 $10^{-0.6}$ 和 $10^{-0.9}$ 之间时,能保护 50% TOC 免受感染。距离比例 = $(85.7 - 50) / (85.7 - 33.3) = 0.68$

低于 50% 病变率的血清稀释的对数 + 距离比 × 稀释系数的对数

$$= -0.6 + 0.68 \times (-0.3) = -0.804$$

-0.804 的反对数 = 1 : 6

由此可得该血清样品的中和效价为 6。