

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 540—2023

代替 NY/T 540—2002

鸡病毒性关节炎诊断技术

Diagnostic techniques for avian viral arthritis

2023-02-17 发布

中华人民共和国农业农村部

发布



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 NY/T 540—2002《鸡病毒性关节炎琼脂凝胶免疫扩散试验方法》，与 NY/T 540—2002 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了引言；
- b) 增加了规范性引用文件(见第2章)；
- c) 增加了术语和定义(见第3章)；
- d) 增加了缩略语(见第4章)；
- e) 增加了临床诊断(见第5章)；
- f) 增加了样品采集和处理(见第6章)；
- g) 删除了琼脂凝胶免疫扩散试验(见2002年版的第2章)；
- h) 增加了病毒分离与鉴定(见第7章)；
- i) 增加了 RT-PCR 试验(见第8章)；
- j) 增加了实时荧光 RT-PCR 试验(见第9章)；
- k) 增加了间接 ELISA(见第10章)；
- l) 增加了综合判断(见第11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/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、山东农业大学、青岛易邦生物工程有限公司。

本文件主要起草人：李阳、于晓慧、唐熠、刘东、刘朔、左媛媛、蒋文明、李金平、张富友、苏红、王楷宸、王素春、王一新、王静静、侯广宇、刁有祥、刘华雷。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2002年首次发布为 NY/T 540—2002；

——本次为第一次修订。



引 言

鸡病毒性关节炎,又称病毒性腱鞘炎或滑液囊炎,是由不同血清型及致病型的禽呼肠孤病毒(Avian Reovirus, ARV)感染引起的鸡或火鸡的一种传染病。该病传播速度快、发病范围广,不同日龄、不同品种的鸡均可感染,但对商品肉鸡的危害尤为严重,给我国肉鸡养殖业造成严重经济损失。农业农村部将本病列为三类动物疫病。

该病一年四季均可流行,以冬季多发,呈散发或地方性流行。病鸡和带毒禽是主要的传染源,可通过消化道和呼吸道传播。同时,病鸡在鸡群中既能水平传播,也能经蛋垂直传播。临床上多见于4周龄~16周龄的鸡,尤以4周龄~7周龄多发,以跛行、关节炎、腱鞘炎、腓肠肌肌腱断裂为主要特征。禽呼肠孤病毒在分类地位上属于呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属,病毒粒子呈二十面体对称排列,有双层衣壳结构,无囊膜,直径约75 nm,一般无血凝特性。病毒的基因组为分节段的双股RNA,由大小不同的3个类别的10个节段组成。

鸡病毒性关节炎目前仍是严重威胁养禽业健康发展的重要疫病,近年来呈现新的流行特点,流行毒株也不断变异,存在多种血清型和基因型的病毒同时流行。随着近些年科技的进步,原有的标准已不能满足当前我国鸡病毒性关节炎诊断的技术需求,需要对原标准进一步完善。

鸡病毒性关节炎诊断技术

1 范围

本文件规定了鸡病毒性关节炎的临床诊断、病毒分离与鉴定、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、实时荧光 RT-PCR(Real-time RT-PCR)和间接 ELISA 抗体检测方法的技术要求。

本文件适用于鸡病毒性关节炎的诊断、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/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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鸡病毒性关节炎 **Avian viral arthritis**

由禽呼肠孤病毒感染引起的鸡或火鸡的一种重要传染病。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ARV:禽呼肠孤病毒(Avian Reovirus)

CEF:鸡胚成纤维细胞(Chicken Embryonic Fibroblasts)

CPE:细胞病变效应(Cytopathic Effect)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

MEM:基础 Eagle 培养基(Minimal Eagle's Medium)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

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

Real-time RT-PCR:实时荧光反转录聚合酶链式反应(Real-time Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction)

SPF:无特定病原(Specific Pathogen Free)

TAE:三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸(Trihydroxymethyl Aminomethane-acetic Acid-ethylene diaminetetra Acetic Acid)

TMB:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidine)

5 临床诊断

5.1 流行病学

5.1.1 该病一年四季均可发生。

5.1.2 不同品种的鸡均可感染,但肉用型或肉蛋兼用型等体型较大的鸡多发。

5.1.3 不同日龄的鸡均可感染。

5.1.4 发病率高,死亡率较低,日龄越小越易感。雏鸡感染后,发病率和死亡率显著高于青年鸡和成年

鸡。日龄大的鸡感染后潜伏期较长,有的可耐过。

5.1.5 该病可垂直传播,也可水平传播。

5.2 临床症状

5.2.1 病鸡精神沉郁,食欲减退,卧地倦动。

5.2.2 跗关节肿胀,腿变形,站立困难,跛行或单腿跳跃,严重病例瘫痪。

5.2.3 生长停滞、贫血、消瘦,日龄小的严重病例可逐渐衰竭死亡。

5.3 病理变化

5.3.1 剖检变化

5.3.1.1 跗关节和跖关节的剑鞘水肿,病鸡关节腔内有淡黄或淡红色渗出液,病程后期逐渐形成纤维索性渗出。

5.3.1.2 腿骨质脆,易折断。

5.3.1.3 肌腱断裂。

5.3.2 组织学病变

5.3.2.1 在急性期,出现水肿、凝固性坏死,异嗜细胞集聚血管周围浸润,网状细胞增生,最后引起腱鞘壁层明显增厚,滑膜腔充满异嗜细胞和脱落的滑膜细胞,随着破骨细胞增生而形成骨膜炎。

5.3.2.2 在慢性期,滑膜形成绒毛样突起,并有淋巴样结节,大量纤维组织增生,明显见到网状细胞、淋巴细胞、巨噬细胞和浆细胞的浸润或增生。趾关节和跗关节区也出现相同的一般炎症反应。

5.4 结果判定

当鸡符合 5.1 且符合 5.2、5.3 之一的,可判定为疑似鸡病毒性关节炎。

6 样品采集和处理

6.1 器材

6.1.1 手术剪刀和镊子。

6.1.2 离心管。

6.1.3 样品保存管。

6.1.4 组织匀浆器。

6.1.5 采血器。

6.1.6 滤器(孔径 0.22 μm)。

6.2 试剂

6.2.1 0.01 mol/L pH 7.2 PBS,配方应符合附录 A 中 A.1 的规定。

6.2.2 青霉素(4 000 IU/mL)。

6.2.3 链霉素(4 $\mu\text{g/mL}$)。

6.3 样品采集

6.3.1 生物安全措施

实验室生物安全措施按照 GB 19489 的规定执行。

6.3.2 组织病料采集

6.3.2.1 活禽采样:灭菌棉拭子插入泄殖腔旋转 2 圈~3 圈后,放入含青霉素 4 000 IU/mL 和链霉素 4 $\mu\text{g/mL}$ 的无菌 PBS 样品保存管中。

6.3.2.2 病死禽采样:无菌采取肝脏、脾脏、肾脏等组织样品或者关节腔内容物样品,放入样品保存管中。

6.3.3 血清样品采集

经翅静脉采集鸡血液,每只应不少于 1 mL。无菌分离血清,装入 2 mL 离心管中,密封后 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏或-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

6.4 样品处理

6.4.1 拭子样品:经剧烈振荡后,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,2℃~8℃冷藏或-20℃冷冻保存。

6.4.2 组织样品:无菌条件下将组织剪碎,按 1:4 加入生理盐水(青霉素 4 000 IU/mL 和链霉素 4 μg/mL)后组织研磨器制成匀浆,反复冻融 2 次~3 次,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用直径 0.22 μm 滤器过滤除菌,2℃~8℃冷藏或-20℃冷冻保存。

7 病毒分离与鉴定

7.1 器材

7.1.1 冰箱(2℃~8℃、-20℃、-70℃不同温度)。

7.1.2 恒温孵化箱。

7.1.3 离心机。

7.1.4 25 cm²细胞培养瓶。

7.1.5 倒置生物显微镜。

7.2 试剂

7.2.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.2),配方按照 A.1 的规定执行。

7.2.2 细胞培养液,配方按照 A.2 的规定执行。

7.2.3 细胞维持液,配方按照 A.3 的规定执行。

7.2.4 0.25%胰酶,配方按照 A.4 的规定执行。

7.3 试验细胞与动物

7.3.1 5 日龄~7 日龄 SPF 鸡胚或 9 日龄~11 日龄 SPF 鸡胚。

7.3.2 CEF 细胞。

7.4 试验程序

7.4.1 鸡胚分离病毒

7.4.1.1 取处理后的拭子样品或组织样品,经卵黄囊途径无菌接种于 5 枚 5 日龄~7 日龄的 SPF 鸡胚,或者经绒毛尿囊膜途径接种 5 枚 9 日龄~11 日龄的 SPF 鸡胚。具体操作如下:分别在 SPF 鸡胚无血管处和气室顶端打一小孔,用吸球在气室顶端孔处抽吸以制造人工气室,然后用注射器于 SPF 鸡胚无血管处接种(设对照胚 2 枚,以同样方式接种无菌 PBS),0.2 mL/枚,之后将所打孔用石蜡封闭,37℃继续孵化。

7.4.1.2 接种 48 h 内死亡的鸡胚弃去不用。48 h 后每 12 h 照胚一次,记录鸡胚死亡情况。收集 48 h 以后的死胚及 96 h 仍存活鸡胚,置于 2℃~8℃条件下 4 h 或过夜,无菌收取鸡胚进行病毒鉴定。

7.4.1.3 用初代分离的鸡胚参照 6.4.2 的要求进行处理后,参照 7.4.1.1 和 7.4.1.2 的要求于 SPF 鸡胚继续盲传 2 代。

7.4.2 细胞培养分离病毒

7.4.2.1 制备 CEF

见附录 B。

7.4.2.2 接种病毒

7.4.2.2.1 待细胞长成单层后,先倒去细胞培养瓶中的营养液,加入 1 mL 已经处理后的拭子样品或组织样品,37℃孵育 60 min,其间每隔 15 min 轻轻摇动细胞培养瓶,孵育后弃掉样品,用细胞维持液洗细胞 1 次,加入 5 mL 细胞维持液,37℃在 5% CO₂ 培养箱培养。细胞对照瓶不接种样品,弃去细胞培养液后加 5 mL 细胞维持液。

7.4.2.2.2 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 CPE 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。

7.4.2.2.3 盲传:如果接种 6 d 后仍未见 CPE,弃去培养液,将培养物反复冻融 3 次,收集细胞和病毒的冻融液,5 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,按 7.4.2.2.1 所述方法再接种单层细胞进行盲传,如此盲传 3 代。

7.4.3 病毒鉴定

鸡胚和出现 CPE 的细胞培养液,应选用本文件中第 8 章(RT-PCR)或第 9 章(实时荧光 RT-PCR)所述方法进行核酸鉴定。

7.4.4 结果判定

7.4.4.1 细胞盲传 3 代未见 CPE 或鸡胚传代未见病变,且经本文件第 8 章或第 9 章中所述任一方法检测阴性者,判定病毒分离阴性。

7.4.4.2 对出现 CPE 的细胞培养液或出现病变的鸡胚,且经本文件第 8 章或第 9 章中所述任一方法检测阳性者,判为病毒分离阳性。

8 RT-PCR 试验

8.1 器材

8.1.1 II 级生物安全柜。

8.1.2 PCR 仪。

8.1.3 离心机(最大转速为 15 000 r/min)。

8.1.4 电泳仪。

8.1.5 电泳槽。

8.1.6 紫外凝胶成像仪。

8.1.7 冰箱(2℃~8℃、-20℃)。

8.1.8 微量移液器(最大量程分别为 10 μL、20 μL、100 μL、1 000 μL),带滤芯的枪头。

8.1.9 电子天平:精度为 0.001 g。

8.2 试剂

8.2.1 符合 GB/T 6682 规定的一级水。

8.2.2 核酸提取试剂盒。

8.2.3 RT-PCR 相关试剂;可选用商品化试剂盒。

8.2.4 DNA 分子量标准(DL 2 000 bp 或其他等效力分子量标准)。

8.2.5 阳性对照标准品采用已知病毒材料,如鸡呼肠孤病毒感染的 SPF 鸡胚。

8.2.6 阴性对照标准品采用 SPF 鸡胚。

8.2.7 RT-PCR 检测所需引物:

a) 上游引物 F:5'-ATCCATGGGGATTAAGTCAA-3';

b) 下游引物 R:5'-AGTCGACTGGTATCGATGCC-3',扩增片段长度为 1 088 bp,引物浓度为 10 μmol/L。

8.2.8 TAE 缓冲液:配制方法按照 A.5 的规定执行。

8.2.9 琼脂糖凝胶:配制方法按照 A.6 的规定执行。

8.3 试验程序

8.3.1 RNA 提取

可选市售商品化 RNA 提取试剂盒,按说明书进行。

8.3.2 核酸扩增

8.3.2.1 引物:将引物稀释到工作浓度 10 μmol/L。

8.3.2.2 RT-PCR 反应体系配置:RT-PCR 反应体系配置见表 1。

表 1 RT-PCR 反应体系配置表

组分	体积,μL
2×一步法 RT-PCR 缓冲液	12.5
上游引物 F	1.0
下游引物 R	1.0
RT-PCR 酶	1.0
ddH ₂ O	4.5
RNA	5.0
总体积	25.0

8.3.2.3 RT-PCR 扩增:按照 8.3.2.2 的加样顺序加完后,充分混匀,瞬时离心,使液体都沉降到 PCR 管底。同时,设立阳性对照和阴性对照。按照下列程序进行扩增:50℃反转录 30 min;94℃预变性 2 min;然后进行 35 个循环:95℃变性 30 s、55℃退火 30 s、72℃延伸 45 s;最后 72℃延伸 10 min;4℃保存备用。也可选用其他等效的 RT-PCR 扩增试剂盒。

8.3.3 RT-PCR 扩增产物电泳

8.3.3.1 加样:取 6 μL~8 μL RT-PCR 扩增产物和 2 μL 加样缓冲液混匀,后加入到 1×TAE 缓冲液配制的 1.0%琼脂糖凝胶中,每次电泳同时设标准 DNA Marker、阴性对照、阳性对照。

8.3.3.2 电泳:电压 80 V~100 V 或电流 40 mA~50 mA,电泳 30 min~40 min。最后,由凝胶成像系统观察并拍照记录。

8.3.4 试验成立条件

电泳结束后,取出凝胶置凝胶成像仪(或紫外透射仪)上观察。阳性对照电泳结果应出现约 1 088 bp 扩增条带,同时阴性对照无扩增条带。

8.3.5 结果判定

试验成立的情况下,被检样品扩增产物电泳出现约 1 088 bp 目标条带,判定为 ARV 核酸阳性(见附录 C);被检样品无扩增条带,判为 ARV 核酸阴性。

9 实时荧光 RT-PCR 试验

9.1 器材

9.1.1 荧光 PCR 仪。

9.1.2 其余器材同 8.1.1~8.1.9。

9.2 试剂

9.2.1 符合 GB/T 6682 规定的一级水。

9.2.2 核酸提取试剂。

9.2.3 一步法实时荧光 RT-PCR 试剂盒。

9.2.4 阳性对照标准品采用已知病毒材料,如鸡呼肠孤病毒感染的 SPF 鸡胚尿囊液。

9.2.5 阴性对照标准品采用 SPF 鸡胚尿囊液。

9.2.6 实时荧光 RT-PCR 检测所需引物及探针:

- a) 上游引物 F1:5'-ATGGCCTATCTAGCCACACCTG-3';
- b) 下游引物 R1:5'-CAACGTGATAGCATCAATAGTAC-3';
- c) 探针 P:5'-FAM-TGCTAGGAGTCGGTTCTCGCA-BHQ1-3',扩增片段长度为 93 bp,引物、探针浓度为 10 μmol/L。

9.3 试验程序

9.3.1 核酸提取

同 8.3.1。

9.3.2 核酸扩增

9.3.2.1 实时荧光 RT-PCR 反应混合液配制:按照表 2 的规定配置实时荧光 RT-PCR 反应体系。

表 2 实时荧光 RT-PCR 反应体系配置表

组分	体积, μL
2 \times RT-PCR 缓冲液	10.4
酶混合液	0.8
上游引物 F1	0.4
下游引物 R1	0.4
探针	0.8
无核酶灭菌水	5.2
RNA	2.0
总体积	20.0

9.3.2.2 实时荧光 RT-PCR 反应

按照 9.3.2.1 的加样顺序加完后,充分混匀,瞬时离心,使液体都沉降到 PCR 管底。同时,设立阳性对照和阴性对照。将 PCR 管放在荧光 PCR 仪上进行扩增,反应条件为:42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,进行 1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s(收集荧光信号),进行 40 个循环。反应结束后,根据收集的荧光曲线和 C_t 值判定结果。也可选用其他等效的实时荧光 RT-PCR 扩增试剂盒。

9.3.3 试验成立条件

阳性对照品扩增曲线有明显对数增长期,且 C_t 值 ≤ 35 ;同时,阴性对照品扩增曲线无对数增长期。

9.3.4 结果判定

试验成立,被检样品 C_t 值 ≤ 35 ,且出现标准的 S 形扩增曲线,则判为阳性;当 $35 < C_t$ 值 ≤ 38 ,则判定为可疑,重复测定后仍在可疑区间的样本判为阳性;当无 C_t 值或 C_t 值 > 38 ,则判为阴性(见附录 D)。

10 间接 ELISA

10.1 器材

10.1.1 台式高速离心机(最大转速为 15 000 r/min)。

10.1.2 酶标仪。

10.1.3 微量移液器:最大量程分别为 10 μL 、20 μL 、100 μL 、1 000 μL 。

10.1.4 聚苯乙烯板。

10.1.5 水平振荡器。

10.1.6 恒温培养箱。

10.2 试剂

10.2.1 阳性血清:SPF 鸡接种 ARV 参考毒株 21 d,经 RT-PCR 检测为阳性后制备的血清。

10.2.2 阴性血清:SPF 鸡血清。

10.2.3 ARV 抗原:ARV 参考毒株制备的抗原。

10.2.4 酶标二抗:兔抗鸡辣根过氧化物酶标记的 IgG,效价应在 1 : 32 以上。

10.2.5 PBS:配制方法按照 A.1 的规定执行。

10.2.6 包被液:配制方法按照 A.7 的规定执行。

10.2.7 洗涤液:配制方法按照 A.8 的规定执行。

10.2.8 样品稀释液(封闭液):配制方法按照 A.9 的规定执行。

10.2.9 底物溶液:TMB 底物显色液。

10.2.10 终止液(浓度为 2 mol/L):配制方法按照 A.10 的规定执行。

10.3 样品

10.3.1 取 6.3.3 中处理的待检鸡血清样品,每份宜不少于 200 μL ,应无溶血。

10.3.2 用样品稀释液将被检血清样品稀释 10 倍(1:10,如 10 μL 血清加入 90 μL 稀释液中)。

10.3.3 每稀释一个样品应更换一个吸头,做好样品的标记。稀释的样品血清充分混匀后,加入包被孔。

10.4 操作步骤

10.4.1 将试验试剂预温到 20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 。

10.4.2 将全病毒抗原用包被液稀释 400 倍,每孔 100 μL 加入到 96 孔聚苯乙烯板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后,继续 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。孵育后应用洗涤液洗 5 次,在吸水纸上拍干板上残余液体。

10.4.3 每孔加入 200 μL 封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 1 h,用 10.4.2 方法洗板。

10.4.4 在 A1、A2 孔各加 100 μL 阴性血清对照,A3、A4 孔各加 100 μL 阳性血清对照。

10.4.5 将稀释好的待检血清加入其他各孔,100 μL /孔,混匀后,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,用 10.4.2 方法洗板。

10.4.6 酶标二抗应用样品稀释液按 1:1 000 倍稀释,每孔加入 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,用 10.4.2 方法洗板。

10.4.7 每孔加入 100 μL TMB 显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 15 min。

10.4.8 每孔加入 50 μL 终止液,轻轻振荡,终止反应。

10.4.9 将酶标板置于酶标仪中,于 450 nm 测定各孔样品的吸光值(OD),该操作应在 30 min 内完成。

10.5 试验成立条件

阳性对照平均值减去阴性对照平均值之差必须大于 0.071 5,阴性对照平均值必须小于或等于 0.067 5,试验条件成立;否则,试验不成立,应重新测定。

10.6 结果判定

10.6.1 样品 $\text{OD}_{450} \geq 0.071 5$,判为 ARV 抗体阳性。

10.6.2 样品 $\text{OD}_{450} \leq 0.067 5$,判为 ARV 抗体阴性。

10.6.3 样品 $0.067 5 < \text{OD}_{450} < 0.071 5$,判为可疑,重复测定后仍在可疑区间的样本判为阳性。

10.7 也可采用等效 ELISA 抗体检测试剂盒进行检测。

11 综合判断

11.1 临床判定为疑似的鸡,按照病毒分离与鉴定(第 7 章)、RT-PCR 试验(第 8 章)和实时荧光 RT-PCR 试验(第 9 章)中规定的任一方法检测为阳性的,判定为鸡病毒性关节炎。

11.2 临床非免疫鸡,经间接 ELISA(第 10 章)检测出抗体阳性的,可判定为鸡病毒性关节炎。

附 录 A

(规范性)

溶液配制(试剂要求分析纯及以上)

A.1 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2)

配制 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液所需试剂如下:

- a) 8 g 的氯化钠(NaCl);
- b) 0.2 g 的氯化钾(KCl);
- c) 2.9 g 的磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$);
- d) 0.2 g 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

试剂加水溶解至 1 L,调整 pH 为 7.2,高压灭菌,4 ℃ 保存。

A.2 细胞营养液

准确量取 MEM 营养液 90 mL、犊牛血清 10 mL,充分混匀,使用 5%碳酸氢钠(NaHCO_3)调整 pH 至 7.2~7.4,4 ℃ 保存。

A.3 细胞维持液

准确称取 MEM 营养液 98 mL、犊牛血清 2 mL,充分混匀,使用 5%碳酸氢钠(NaHCO_3)调整 pH 至 7.6~7.8,4 ℃ 保存。

A.4 0.25%胰酶

准确称取 MEM 营养液 100 mL、胰酶 0.25 g,充分混匀,溶解后过滤除菌,-20 ℃ 保存。

A.5 1×TAE 缓冲液

准确称取 50×TAE 缓冲液 20 mL,加入 980 mL 去离子水,充分混匀,室温保存。

A.6 1.0%琼脂糖凝胶

加热完全融化,待冷却至 50 ℃~60 ℃,加入适量核酸染料,混匀,倒入凝胶板中,冷却备用。

A.7 包被液(0.05 mol/L,pH 9.6)

准确称取碳酸钠(Na_2CO_3)2.756 g、碳酸氢钠(NaHCO_3)6.216 g,加入 1 000 mL 去离子水,充分混匀,调整 pH 为 9.6,室温保存。

A.8 洗涤液

准确量取 PBS 1 000 mL,加入 0.5 mL Tween-20,充分混匀,室温保存。

A.9 样品稀释液(封闭液)

准确称取脱脂奶粉 5.0 g,加入 100 mL 洗涤液,充分混匀后,室温保存。

A.10 终止液(2 mol/L)

准确量取浓硫酸(98%)58 mL,加入 442 mL 去离子水,充分混匀后,室温保存。

附 录 B
(资料性)
CEF 细胞制备方法

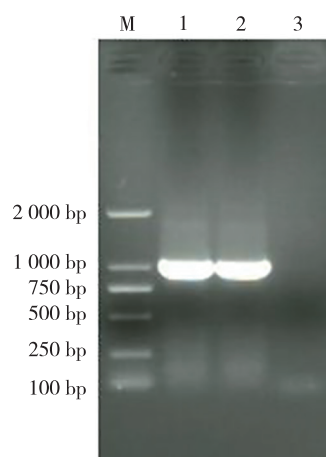
- B.1** 将选好的 9 d~10 d 的发育良好的 SPF 鸡胚用 5% 的碘酒棉球消毒蛋壳气室部位,再用酒精棉球脱碘。
- B.2** 无菌取出鸡胚,放入灭菌的玻璃皿内,用 pH 7.2 的 PBS 冲洗 1 次,去头、四肢和内脏;再用 pH 7.2 的 PBS 冲洗 2 次。
- B.3** 用剪刀剪成小块($2\text{ mm}^3 \sim 3\text{ mm}^3$),用 pH 7.2 的 PBS 冲洗 2 次。
- B.4** 加约 4 mL 0.25% 胰酶溶液,37 °C 消化 30 min,其间 15 min 轻摇 1 次。
- B.5** 消化结束,弃掉胰酶消化液,用 pH 7.2 的 PBS 冲洗 2 次,再用细胞培养液冲洗 1 次。
- B.6** 加入适量的细胞培养液,用刻度吸管反复吹打(使细胞充分分散)。
- B.7** 将细胞分散液倒入带 6 层~8 层纱布的 100 mL 灭菌烧杯中(过滤之前先用少许细胞培养液润湿纱布),加入适量培养液(40 mL/胚),过滤。按上述操作重滤一遍。
- B.8** 计数,滤液中活细胞浓度应为 1×10^6 个/mL~ 1.5×10^6 个/mL。
- B.9** 分装到培养瓶中(4 mL/瓶~5 mL/瓶),置于 37 °C 培养箱培养。状态良好(细胞透明度大,轮廓清晰)的细胞适宜病毒接种。

附 录 C

(资料性)

禽呼肠孤病毒 RT-PCR 检测阳性参照图

图 C.1 为禽呼肠孤病毒 RT-PCR 检测阳性参照图。



标引序号说明：

M —— DNA 分子量标准(DL 2 000 Marker)；

1 —— 禽呼肠孤病毒阳性对照；

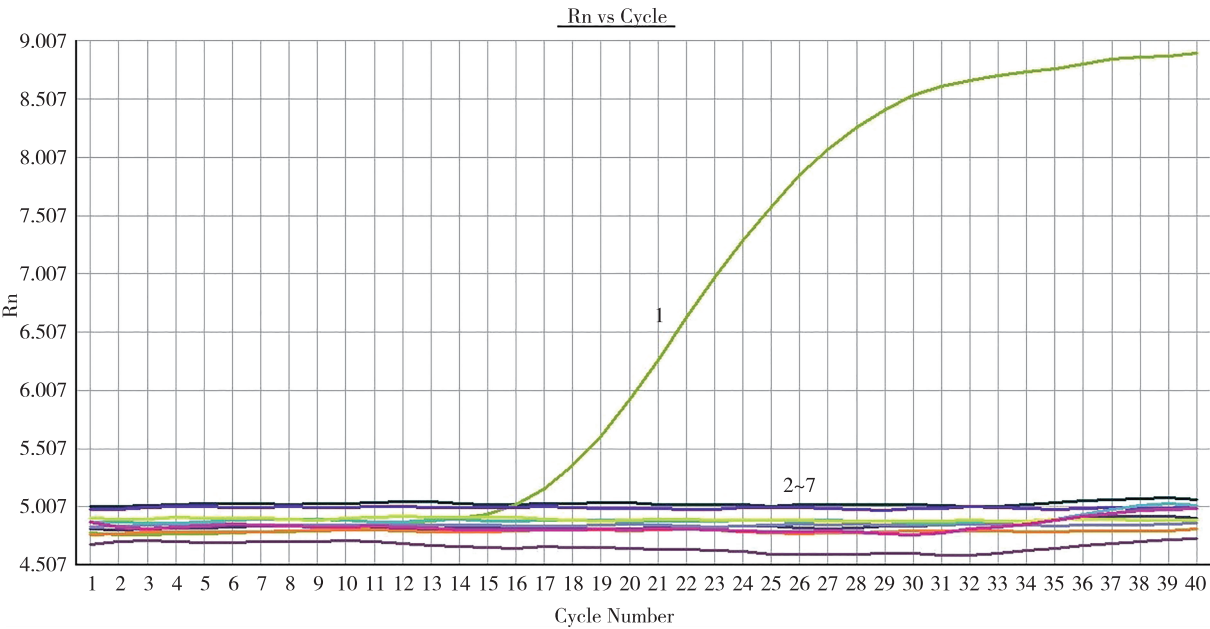
2 —— 禽呼肠孤病毒阳性样品；

3 —— 阴性对照。

图 C.1 禽呼肠孤病毒 RT-PCR 检测阳性参照图

附 录 D
(资料性)
禽呼肠孤病毒实时荧光 RT-PCR 检测阳性参照图

图 D.1 为禽呼肠孤病毒实时荧光 RT-PCR 检测阳性参照图。



标引序号说明：
1 —— 阳性对照；
2~7 —— 阴性样品。

图 D.1 禽呼肠孤病毒实时荧光 RT-PCR 检测阳性参照图