



中华人民共和国国家标准

GB/T 23197—2008

鸡传染性支气管炎诊断技术

Diagnostic techniques for avian infectious bronchitis

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准对应于 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2004)2.7.6 鸡传染性支气管炎(avian infectious bronchitis),其一致性程度为非等效。在此基础上,根据国内科研成果增加了反转录-聚合酶链反应和气管环组织培养血清中和试验,用于病原的鉴定和抗体检测。

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(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、华南农业大学。

本标准主要起草人:吴延功、廖明、王志亮、郭霄峰、刘佩兰、王永玲、孙承英。

鸡传染性支气管炎诊断技术

1 范围

本标准规定了鸡传染性支气管炎病毒分离、反转录-聚合酶链反应、微量血凝抑制试验以及气管环组织培养血清中和试验等四种诊断方法的技术要求。

本标准适用于鸡传染性支气管炎的诊断和检疫。

2 临床诊断

- 2.1 鸡传染性支气管炎是鸡的一种急性、接触性传染病,临床上有多种表现形式,根据病变类型,可将其分为:呼吸道型、肾型等,但以经典的呼吸道型发生的最为普遍。
- 2.2 呼吸道型表现为呼吸困难,有罗音或喘鸣音,雏鸡感染可引起死亡。
- 2.3 青年鸡和产蛋鸡感染后,可引起产蛋鸡停产或产蛋下降。表现为产蛋鸡产蛋下降,产软皮蛋、砂壳蛋或畸形蛋,蛋清稀薄如水。
- 2.4 肾型表现为病鸡排白色稀粪,脱水,死亡率高。
- 2.5 符合上述临床症状之一者,可以怀疑鸡群感染鸡传染性支气管炎病毒,确诊需经实验室检验。

3 病原的分离

3.1 样品的采集

- 3.1.1 对于急性呼吸道型的病鸡,应采取气管渗出物;对于刚扑杀的病鸡则采取支气管和肺组织。
- 3.1.2 对于肾型和产蛋下降型的病鸡,应采取发病鸡的肾脏或输卵卵管。也可从大肠,尤其是盲肠扁桃体或粪便分离病毒,但从消化道分离到的病毒未必与现流行或发生的病毒有直接关系。

3.2 样品的处理

- 3.2.1 将病料放在含有 10 000 IU/mL 青霉素和 10 mg/mL 链霉素的 pH 值为 7.4 的磷酸缓冲盐水 (PBS) 内,置冰盒内送往实验室。pH 值为 7.4 的 PBS 的配方见附录 A。
- 3.2.2 将病料磨碎,加含抗菌素的 PBS 制成体积分数为 20% 的组织悬液,冻融 3 次,以 3 000 g 离心 20 min,取上清液,加入终浓度为 1 000 IU/mL 的青霉素和终浓度为 1 mg/mL 的链霉素,37 °C 下作用 1 h 后用于鸡胚接种。

3.3 分离培养

- 3.3.1 取病料上清液,接种于 5 枚 9 日龄~11 日龄的 SPF 鸡胚尿囊腔内,另 5 枚接种 PBS,接种量均为 0.2 mL/枚。37 °C 孵育。每天照蛋,24 h 内死亡的鸡胚弃去。收集接种后 3 d~7 d 的鸡胚尿囊液,将所有尿囊液混合,用含 1 000 IU/mL 青霉素和 1 mg/mL 链霉素的 PBS 稀释 5 倍~10 倍,继续在鸡胚内传代。典型的野毒株通常在鸡胚中传至第 2 代或第 3 代时,可见侏儒胚,传至第 3 代,某些鸡胚可出现死亡。含毒尿囊液置 -60 °C 以下可长期保存,也可以冻干 4 °C 保存。
- 3.3.2 将分离物经鸡胚传至 3 代或 3 代以上,收获接种后 7 d 仍存活的鸡胚,取胎儿,用剪刀剪除胎儿体外的附属物,并用吸水纸吸干胎儿表面的液体。如接种胎儿重量比对照胚最轻胎儿重量少 2 g 以上者,可初步判定为有病毒感染。
- 3.3.3 对病毒的进一步鉴定可通过反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 进行(见第 4 章)。

4 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)

4.1 核酸抽提

4.1.1 材料准备

- 4.1.1.1 被检样品:所采集的病料(肺或肾等组织样品、棉拭子、尿囊液和细胞培养物)应新鲜,或者置