



中华人民共和国国家标准

GB/T 19167—2020
代替 GB/T 19167—2003

传染性法氏囊病诊断技术

Diagnostic techniques for infectious bursal disease

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 19167—2003《传染性囊病诊断技术》，与 GB/T 19167—2003 相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 将“传染性囊病”和“传染性法氏囊病”统一为“传染性法氏囊病”；
- 增加了规范性引用文件(见第 2 章)；
- 增加了缩略语(见第 3 章)；
- 增加了器材和试剂(见第 5 章、第 6 章、第 7 章、第 8 章、第 9 章)；
- 增加了临床诊断(见第 4 章)；
- 增加了实验室诊断样品采集(见第 5 章)；
- 删除了直接免疫荧光法(见 2003 年版的 2.5.2)；
- 删除了酶联免疫吸附试验(见 2003 年版的第 5 章)；
- 增加了 RT-PCR 检测方法(见第 7 章、附录 C、附录 D)；
- 增加了实时荧光 RT-PCR 检测方法(见第 8 章、附录 E)；
- 删除了血清抗体的检测(见 2003 年版的第 4 章)；
- 增加了细胞培养分离病毒检测方法(见 9.4.1、附录 F)；
- 增加了诊断结果的综合判定(见第 10 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这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

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、北京市农林科学院畜牧兽医研究所、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人：蒋文明、陈继明、刘月焕、王笑梅、王静静、刘爵、高玉龙、李阳、于晓慧、刘朔、庄青叶、李金平、侯广宇、祁小乐、王素春、刘华雷。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 19167—2003。

引 言

传染性法氏囊病(Infectious bursal disease, IBD)又称甘布罗病(Gumboro disease),由双股 RNA 病毒科(Birnaviridae)禽双股 RNA 病毒属(*Avibirnavirus*)传染性法氏囊病病毒(IBDV)引起。火鸡、鸭、珍珠鸡和鸵鸟均可感染 IBDV。3 周龄~6 周龄的鸡发病急而且重,病死率高,而 1 周龄~3 周龄鸡常呈现亚急性或亚临床症状。该病毒侵害法氏囊可引起严重免疫抑制。已知 IBDV 有两个血清型,即血清 1 型和 2 型,仅 1 型对鸡有致病性,火鸡和鸭为亚临床感染,2 型未发现有致病性。

本病具有特征性临床症状和眼观病变,可做出初步诊断,确诊应进行病原检测。

2003 年之后,国内外 IBD 诊断技术发展快速。一些更为简便和准确的诊断新技术已经成为 IBD 诊断和预防的重要手段。本次对 IBD 诊断技术的修订,目的有二:一是与国际标准基本保持一致,改变国家标准显著滞后于国际标准的状况;二是将一些在国内外经过多年实践证明成熟可行的新技术纳入进来,改变原有标准中检测技术偏少且显著滞后于实际应用状况。修订此标准,有利于我国 IBD 诊断和预防,也有利于提升国家标准的权威性和实用性。

本标准参考 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2016 版),并结合我国相关技术研究新成果进行修订。

传染性法氏囊病诊断技术

1 范围

本标准规定了传染性法氏囊病临床诊断和实验室诊断的技术要求。

本标准适用于鸡传染性法氏囊病的诊断、检测、监测和流行病学调查。其中琼脂凝胶免疫扩散试验、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、实时荧光反转录聚合酶链式反应(实时荧光 RT-PCR)、病毒分离等诊断方法适用于临床疑似样本的检测与病毒分离,琼脂凝胶免疫扩散试验方法还适用于免疫抗体水平检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AGID:琼脂凝胶免疫扩散试验(Agar gel immunodiffusion test)

CEF:鸡胚成纤维细胞(Chick embryo fibroblast cell)

CPE:细胞病变(Cytopathic effect)

IBD:传染性法氏囊病(Infectious bursal disease)

IBDV:传染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

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:无特定病原体(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)

4 临床诊断

4.1 流行病学

4.1.1 自然感染仅发生于鸡,各种品种的鸡都能感染。

4.1.2 主要发生于2周龄~15周龄的鸡,3周龄~6周龄的鸡最易感,而1周龄~3周龄鸡常呈现亚急性或亚临床症状。

4.1.3 常呈急性发病,传播迅速,通常在感染后第3天开始死亡,5 d~7 d达到高峰,后快速下降。

4.2 临床症状

4.2.1 潜伏期为 2 d~3 d。

4.2.2 易感鸡群感染后发病突然,病鸡体温突然升高,病鸡出现腹泻,排出白色黏稠或水样稀便,病程一般为 1 周左右。

4.2.3 急性病鸡可在出现症状 1 d~2 d 后死亡,鸡群 3 d~5 d 达死亡高峰,以后逐渐减少。

4.2.4 随着病程的发展,食欲废绝,颈和全身震颤,病鸡步态不稳,羽毛蓬松,精神委顿,卧地不动,呼吸困难,泄殖腔周围的羽毛被粪便污染。

4.2.5 后期病鸡脱水严重,趾爪干燥,最后衰竭死亡。

4.3 剖检变化

4.3.1 严重者腿部和胸部肌肉有条索状或斑块状出血。

4.3.2 法氏囊水肿和出血,体积增大,重量增加,严重者呈紫黑色、葡萄状;部分法氏囊出现萎缩。

4.3.3 有些法氏囊淡黄色水肿。

4.3.4 肾肿大褪色,肾小管有尿酸盐沉积,呈红白相间“花斑肾”。

4.4 结果判定

符合上述流行病学特征、临床症状和剖检变化的病例,可以判为疑似 IBD。确诊应采集有临床症状动物的法氏囊等组织或血清进行实验室诊断。

5 实验室诊断样品采集

5.1 器材

5.1.1 手术剪刀和镊子。

5.1.2 离心管。

5.1.3 样品保存管。

5.1.4 组织匀浆器。

5.1.5 采血器。

5.2 试剂

5.2.1 0.01 mol/L pH7.2 PBS,配方见附录 A 中 A.1。

5.2.2 青霉素。

5.2.3 链霉素。

5.3 样品采集

5.3.1 生物安全措施

按照 GB 19489 的要求进行。

5.3.2 组织病料采集

采集多只病鸡的法氏囊,分别装入样品保存管,密封、冷冻保存。

5.3.3 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℃~8℃

冷藏或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

5.4 样品处理

用剪刀剪碎法氏囊组织,加入含青霉素 $4\,000\text{ IU/mL}$ 和链霉素 $4\,000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的PBS,用组织匀浆器制成20%匀浆,反复冻融2次~3次, $10\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,取上清作为检测材料。

6 琼脂凝胶免疫扩散试验(AGID)

6.1 器材

6.1.1 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱。

6.1.2 烧杯(200 mL)。

6.1.3 搅拌棒。

6.1.4 电磁炉。

6.1.5 微量可调移液器($10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $1\,000\text{ }\mu\text{L}$ 等不同规格)。

6.1.6 灭菌平皿($9\text{ cm}\sim 15\text{ cm}$)。

6.1.7 打孔器(中心1孔,周围6孔,孔径 3 mm ,孔距 4 mm)。

6.2 试剂

6.2.1 标准IBD琼扩阳性抗原(参见附录B的B.1)。

6.2.2 标准IBD琼扩阴性抗原(参见B.2)。

6.2.3 标准IBDV阳性血清(参见B.3)。

6.2.4 标准IBDV阴性血清(参见B.4)。

6.2.5 琼脂糖。

6.2.6 0.01 mmol/L 磷酸缓冲液($\text{pH } 7.4$),配方见A.2。

6.2.7 氯化钠。

6.3 试验程序

6.3.1 琼脂平皿制备

参见B.5。

6.3.2 打孔、封底

在制备好的琼脂板上用打孔器打孔,并挑出孔中的琼脂。中心1孔,周围6孔,孔径 3 mm ,孔距 4 mm ,在火焰上封底。

6.3.3 加样、孵育、观察

6.3.3.1 病原检测

中央孔加入标准IBDV阳性血清,第1孔、第4孔分别加入标准IBD琼扩阳性抗原和标准IBD琼扩阴性抗原,其他孔分别加入待检样品, $20\text{ }\mu\text{L/孔}$ 。静置 $5\text{ min}\sim 10\text{ min}$,将加样后的平皿轻轻倒置放入填有湿纱布的盒内,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱,在 24 h 、 48 h 观察并记录结果。

6.3.3.2 抗体检测

中央孔加入标准IBD琼扩阳性抗原,第1孔、第4孔分别加入标准IBDV阳性血清和标准IBDV阴性血清,其他孔分别加入待检样品;或第1孔加入标准IBD阳性血清,其他孔分别加入倍比稀释的待检

血清, 20 μL /孔。静置 5 min~10 min, 将加样后的平皿轻轻倒置放入填有湿纱布的盒内, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱, 在 24 h、48 h 观察并记录结果。

6.4 试验成立条件

24 h, 标准 IBDV 阳性血清与标准 IBD 琼扩阳性抗原孔之间形成清晰沉淀线, 标准 IBDV 阳性血清与标准 IBD 琼扩阴性抗原孔之间未形成清晰沉淀线。

6.5 结果判定

6.5.1 病原检测

24 h 或 48 h, 待检样品孔与标准 IBDV 阳性血清孔之间出现沉淀线, 且与标准 IBD 琼扩阳性抗原沉淀线末端相吻合时, 待检样品判为阳性; 标准 IBD 琼扩阴性抗原孔和待检样品孔与标准 IBDV 阳性血清孔之间无沉淀线出现时, 待检样品判为阴性(参见图 B.1)。

6.5.2 抗体检测

待检血清孔与标准 IBD 琼扩阳性抗原孔之间出现沉淀线, 且与标准 IBDV 阳性血清沉淀线末端相吻合时, 待检血清判为阳性; 待检血清孔与标准 IBD 琼扩阳性抗原孔之间无沉淀线出现时, 待检血清判为阴性(参见图 B.2)。

标准 IBD 琼扩阳性抗原孔与待检血清之间形成清晰沉淀线的血清最高稀释倍数, 即判为待检血清琼扩效价。

7 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

7.1 器材

7.1.1 PCR 扩增仪。

7.1.2 台式低温高速离心机。

7.1.3 电泳仪和水平电泳槽。

7.1.4 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。

7.1.5 微量可调移液器(10 μL 、100 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

7.1.6 去核酸酶水处理的离心管与吸头。

7.1.7 PCR 扩增管。

7.2 试剂

7.2.1 RT-PCR 试剂

7.2.1.1 $2 \times$ 一步法 RT-PCR 缓冲液。

7.2.1.2 Taq DNA 聚合酶-反转录酶-RNA 酶抑制剂混合物。

7.2.1.3 灭菌去离子水。

7.2.1.4 引物

7.2.1.4.1 上游引物+290: 5'-AGATTCTGCAGCCACGGTCTCT-3'。

7.2.1.4.2 下游引物-861: 5'-TTGATGACTTGAGGTTGATTTT-3'。

7.2.2 电泳试剂

7.2.2.1 电泳缓冲液: 50 \times TAE 贮存液(配方见 A.5), 临用时加蒸馏水配成 1 \times TAE 缓冲液(配方见 A.6)。

7.2.2.2 琼脂糖:低熔点琼脂糖。

7.2.2.3 电泳加样缓冲液:配方见 A.7。

7.2.3 DNA Marker(标准分子量)

分子大小范围 100 bp~2 000 bp。

7.3 样品准备

7.3.1 本方法适用所有的 IBD 病原样品种类,包括法氏囊组织、鸡胚接种物、细胞培养物等。

7.3.2 阳性对照:已知病毒材料,如 IBDV 感染的鸡胚或细胞。

7.3.3 阴性对照:IBDV 阴性的鸡胚或细胞。

7.4 试验程序

7.4.1 核酸提取

7.4.1.1 异硫氰酸胍法抽提核酸

见附录 C。

7.4.1.2 核酸提取等效方法

可采用等效病毒 RNA 提取试剂或试剂盒进行核酸提取。

7.4.2 核酸扩增

7.4.2.1 引物:将引物(+290/-861)稀释到工作浓度 10 pmol/ μ L。

7.4.2.2 PCR 反应混合液配制:每个 PCR 管中依次加入 4.5 μ L ddH₂O、12.5 μ L 2 \times 一步法 RT-PCR 缓冲液、各 1 μ L 上下游引物(+290/-861)、1 μ L Taq DNA 聚合酶-反转录酶-RNA 酶抑制剂混合物。

7.4.2.3 RT-PCR 扩增:其中 2 个 PCR 管中分别加入 5 μ L 阳性对照 RNA 提取物和 5 μ L 阴性对照 RNA 提取物;在其他 PCR 管中分别加入 5 μ L 待检样品 RNA 模板。盖紧管盖,放入扩增仪中按照设定程序扩增:50 $^{\circ}$ C 30 min;94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;然后进行 35 个循环:95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、57 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min;4 $^{\circ}$ C 保存备用。

7.4.3 电泳

7.4.3.1 1.0%琼脂糖凝胶板的制备:称取 1 g 琼脂糖,加入 100 mL 1 \times TAE 缓冲液中。加热融化后加 1 μ L 核酸染料(如 Gelred),混匀后倒入放置在水平台面上的凝胶盘中,胶板厚 5 mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔),放入电泳槽中,加 1 \times TAE 缓冲液淹没胶面。

7.4.3.2 加样:取 6 μ L~8 μ L PCR 扩增产物和 2 μ L 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳同时设标准 DNA Marker、阴性对照、阳性对照。

7.4.3.3 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。

7.5 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 594 bp 扩增条带,同时阴性对照无扩增条带。

7.6 结果判定

符合 7.5 的条件,被检样品扩增产物电泳出现 594 bp 目标条带,符合阳性序列的特征,判为 IBDV 核酸阳性(参见附录 D);被检样品无扩增条带,判为 IBDV 核酸阴性。

8 实时荧光反转录聚合酶链式反应(Real-time RT-PCR)

8.1 器材

- 8.1.1 荧光定量 PCR 扩增仪。
- 8.1.2 台式低温高速离心机。
- 8.1.3 微量可调移液器(10 μ L、100 μ L、1 000 μ L 等不同规格)。
- 8.1.4 离心管与吸头。
- 8.1.5 PCR 扩增管(0.2 mL)。

8.2 试剂



8.2.1 RT-PCR 试剂

- 8.2.1.1 荧光定量 RT-PCR 试剂盒。
- 8.2.1.2 灭菌去离子水。
- 8.2.1.3 引物和探针。
 - 8.2.1.3.1 IBDVP5F:5'-GAGCCTTCTGATGCCAACAAC-3'。
 - 8.2.1.3.2 IBDVP5R:5'-CAAATTGTAGGTCGAGGTCTCTGA-3'。
 - 8.2.1.3.3 IBDVprobe:FAM-CGGCGTCCATTCCGGACGAC-BHQ1。

8.3 样品准备

见 7.3。

8.4 核酸提取

见 7.4.1。

8.5 核酸检测

- 8.5.1 将引物(IBDVP5F/IBDVP5R)和探针(IBDVprobe)稀释到工作浓度 10 pmol/ μ L。
- 8.5.2 按照荧光定量 RT-PCR 试剂盒说明书配置反应体系,每个 PCR 管中加入各 1 μ L 上下游引物、0.5 μ L 探针。
- 8.5.3 在其中一个 PCR 管中加入 5 μ L IBDV RNA,设为阳性对照;在另一个 PCR 管中加入 5 μ L 超纯水,作为阴性空白对照;在其他 PCR 管中分别加入 5 μ L 待检样品 RNA 模板。
- 8.5.4 实时荧光 RT-PCR 反应程序为:50 $^{\circ}$ C 反转录 10 min;95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后进行 40 个循环:95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 30 s(检测荧光信号)。

8.6 试验成立条件

阳性对照品扩增曲线有明显对数增长期,且 Ct 值 \leq 32;同时阴性对照品扩增曲线无对数增长期(参见附录 E)。

8.7 结果判定

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

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

8.7.3 样品 $35 < \text{Ct 值} \leq 38$,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。

9 病毒分离

9.1 器材

9.1.1 倒置生物显微镜。

9.1.2 冰箱($2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 不同温度)。

9.1.3 CO_2 恒温培养箱。

9.1.4 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心机。

9.1.5 微量可调移液器($10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 等不同规格)。

9.1.6 1 mL 注射器。

9.1.7 25 cm^2 细胞培养瓶。

9.1.8 烧杯(100 mL)。

9.1.9 水浴锅。

9.2 试剂

9.2.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.2),配方见 A.1。

9.2.2 细胞培养液与细胞维持液,配方见 A.4.2 和 A.4.3。

9.2.3 0.25% 胰酶,配方见 A.4.4。

9.3 试验细胞与动物

9.3.1 CEF。

9.3.2 6 日龄~8 日龄 SPF 鸡胚。

9.3.3 SPF 鸡和 IBD 免疫鸡。

9.4 试验程序

9.4.1 细胞培养分离病毒

9.4.1.1 制备 CEF

参见附录 F。

9.4.1.2 接种病毒

9.4.1.2.1 待细胞长成单层后,先倒去细胞培养瓶(T25)中的营养液,加入 1 mL 已经处理好的病料液,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 60 min ,中间每隔 15 min 晃动一下细胞培养瓶,然后弃掉病料液,用维持液洗涤细胞面 1 次,再加 5 mL 细胞维持液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱培养。细胞对照瓶不接种样品,弃去营养液后加 5 mL 细胞维持液。

9.4.1.2.2 观察和记录:每天观察有无 CPE,CPE 特征是细胞缩小,变圆,折光性增强。

9.4.1.2.3 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,收集细胞和病毒的冻融

液,按 9.4.1.2.1 所述方法再接种生长 48 h 的单层细胞进行盲传,即 1 mL 第 1 代细胞/病毒液加 4 mL 细胞维持液,37℃培养。如此盲传 3 代。

9.4.2 鸡胚分离病毒

9.4.2.1 接种病毒

9.4.2.1.1 将样品经绒毛尿囊膜接种于 5 枚 9 日龄~11 日龄的 SPF 鸡胚。具体操作如下:分别在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,然后用注射器于鸡胚无血管处接毒,0.2 mL/枚,之后将所打孔用蜡封闭,继续孵化。

9.4.2.1.2 每日照胚,接种 48 h 内死亡的鸡胚弃去不用。收集接种 48 h 后死亡鸡胚,检查鸡胚病变。血清 I 型 IBDV 的初次分离物就可引起部分鸡胚死亡。病变表现为萎缩、皮下水肿、充血,皮下或颅内出血,肝脏肿大、不均匀地充血、呈致斑驳病变。晚死的鸡胚肝肿大、变绿、有坏死灶;脾肿大,肾水肿、充血,呈斑纹状。血清 II 型 IBDV 不能引起感染鸡胚的皮下水肿和出血,但表现胚体小,呈灰黄色。

9.4.3 鸡接种试验

取 3 周龄~6 周龄的 SPF 鸡 5 只,每只滴眼 0.05 mL 样品。接种后 72 h~96 h 将鸡处死,检查法氏囊、肾脏和胸肌有无病变。

9.5 病毒鉴定

对出现 CPE 的细胞培养液、出现病变的鸡胚和病死鸡,选用第 7 章或第 8 章进行核酸鉴定,也可选用第 6 章进行病原鉴定。

9.6 结果判定

9.6.1 细胞盲传 3 代未见细胞病变或鸡胚传代未见病变,且经第 6 章、第 7 章或第 8 章中规定的任一方法检测阴性者,判定病毒分离阴性。

9.6.2 对出现 CPE 的细胞培养液或出现病变的鸡胚,经第 6 章、第 7 章或第 8 章中规定的任一方法检测阳性者,判为病毒分离阳性。

10 综合判断

10.1 符合第 4 章的流行病学特点、临床症状和剖检变化的病鸡,初步判断为 IBD 疑似病鸡。

10.2 IBD 疑似病鸡按照第 6 章、第 7 章、第 8 章或第 9 章中规定的任一方法,检测为病原学阳性的,判断为 IBD 确诊病鸡。

10.3 不符合第 4 章的流行病学特点、临床症状和剖检变化的鸡,临床无明显特异症状的动物(结合疫苗免疫状况)但是按照第 6 章、第 7 章、第 8 章或第 9 章中规定的任一方法,检测为病原学阳性的,判断为 IBDV 感染鸡。



附 录 A
(规范性附录)
溶液配制(试剂要求分析纯)

A.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)

氯化钠(NaCl)	8.0 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
去离子水	800 mL
调节 pH	7.2
加去离子水至	1 000 mL
121 ℃ 高压灭菌 30 min, 置于 4 ℃ 冰箱备用。	

A.2 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4)

氯化钾 (KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
去离子水	800 mL
调节 pH	7.4
加去离子水至	1 000 mL
121 ℃ 高压灭菌 30 min, 置于 4 ℃ 冰箱备用。	

A.3 PBST[含 0.05%(体积分数)吐温-20 的 0.01 mol/L PBS,pH 7.2~7.4]

0.01 mol/L PBS	1 000 mL
吐温-20	0.5 mL

A.4 细胞培养液与细胞维持液

A.4.1 Eagle's-MEM

Eagle's-MEM 营养液:Eagle's-MEM 营养剂 95 g,加超纯水 1 000 mL。溶解后过滤除菌,4 ℃ 保存备用。

A.4.2 细胞营养液

Eagle's -MEM 营养液	90 mL
犊牛血清	10 mL

5%碳酸氢钠 (NaHCO_3) 调整 pH 至 7.2~7.4。

A.4.3 细胞维持液

Eagle's -MEM 营养液	98 mL
犊牛血清	2 mL

5%碳酸氢钠 (NaHCO_3) 调整 pH 至 7.6~7.8。

A.4.4 0.25%胰酶

Eagle's -MEM 营养液	100 mL
胰酶	0.25 g

溶解后过滤除菌, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.5 $50\times$ TAE 贮存液

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	242.0 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) (pH8.0)	100.0 mL

加双蒸水至 1 000 mL。

A.6 $1\times$ TAE 缓冲液

使用前将 $50\times$ TAE 做 50 倍稀释即可。

A.7 电泳加样缓冲液

溴酚蓝	0.25 g
甘油	30.0 mL
双蒸水	70.0 mL

A.8 裂解液

称取柠檬酸钠 0.64 g、十二烷基肌氨酸钠 0.415 g, 吸取 β -巯基乙醇 0.7 mL, 用无核酸酶的蒸馏水溶解, 定容至 50 mL。然后取以上配制的溶液 33 mL, 异硫氰酸胍 25 g, 混合, 完全溶解后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.9 2 mol/L 乙酸钠 (pH4.0)

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	19 g
无核酸酶水	40.0 mL

将醋酸钠完全溶解于 dd H_2O 中, 用冰醋酸调 pH 值至 4.5, 加 dd H_2O 至 70 mL, 搅拌过夜, 高温高压灭菌。

A.10 酚：三氯甲烷：异戊醇(25：24：1)

将水饱和酚(pH 5.0)、三氯甲烷、异戊醇按照体积比 25：24：1 配置混匀,装入棕色瓶,最后加入 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 保护液,4 ℃冰箱保存备用。



附 录 B
(资料性附录)

琼脂凝胶免疫扩散试验材料制备方法

B.1 标准 IBD 琼扩阳性抗原制备

将血清 I 型标准 IBDV 毒株用 PBS 稀释后滴眼接种约 3 周龄的 SPF 鸡。接种 3 d 后将鸡处死,无菌采集法氏囊。称重后分别加入等体积的低温蒸馏水(或适宜的缓冲液如 PBS 或胰蛋白磷酸盐肉汤)和等体积三氯甲烷(注意:三氯甲烷有毒并可能致癌,因此要安全地操作和处理;可以用毒性较小的三氯三氟乙烷代替三氯甲烷)。再用组织搅拌器充分搅碎,2 000 g 离心 30 min,收集上清液,用 2 mL 冻存管分装(每管 100 μ L),置-80 $^{\circ}$ C 备用。该上清液用 PBS 稀释成 10%(体积分数)后,可用于上述 SPF 鸡的接种。用作抗体检测时,可在分装前灭活病毒:于收获的上清液中加 0.3%(体积分数) β -丙内酯,在振荡器上作用 2 h,作用温度为 37 $^{\circ}$ C。在 SPF 鸡胚中传代三次进行病毒分离,以核检灭活效果。

B.2 标准 IBD 琼扩阴性抗原制备

使用正常 SPF 鸡的法氏囊组织制备,方法同 B.1。

B.3 标准 IBDV 阳性血清制备

来自专业实验室,并经过质量检验,通常是用 IBDV 标准毒株点眼接种于 4 周龄~5 周龄的 SPF 鸡,接种后 28 d 采血制备的血清。

取已知含有 IBD 活毒的法氏囊组织(10%)匀浆上清液 0.05 mL,点眼接种于 4 周龄~5 周龄的 SPF 鸡,接种后 28 d 采血制备血清,小量分装,置-20 $^{\circ}$ C 备用。

B.4 标准 IBDV 阴性血清制备

采集 SPF 鸡血,制备血清,小量分装,置-20 $^{\circ}$ C 备用。

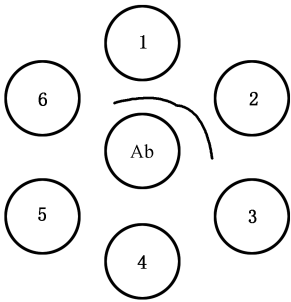
B.5 琼脂平皿制备

取 NaCl 80 g、 KH_2PO_4 0.2 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g、琼脂糖 10 g,加蒸馏水至 1 L(25 $^{\circ}$ C 时 pH 7.1),115 $^{\circ}$ C 15 min 灭菌,置 4 $^{\circ}$ C 备用。

在试验前的 24 h 到 7 d 内将琼脂平皿准备好,先在微波炉等加热装置中融化琼脂糖(注意:不要让水等其他外源物质进到琼脂糖瓶内,然后将平皿水平放置,再把融化的琼脂糖倒入一个 9 cm 的平皿内,琼脂糖厚约 3 mm)。

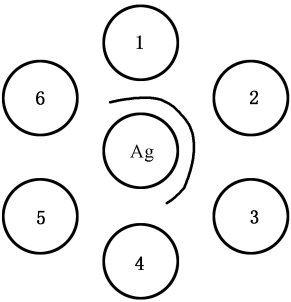
将平皿盖好,待琼脂糖凝固后储存在 4 $^{\circ}$ C 可以放 7 d。如果需当天使用,则需将平皿盖打开,在 37 $^{\circ}$ C 温箱中倒置干燥 30 min~1 h。

检测结果示意图如图 B.1 和图 B.2 所示。



说明：
Ab —— 标准传染性法氏囊病毒阳性血清；
1 —— 标准传染性法氏囊病毒琼扩阳性抗原；
4 —— 标准传染性法氏囊病毒阴性抗原；
2、3、5、6 —— 待检样品。

图 B.1 抗原检测示意图



说明：
Ag —— 标准传染性法氏囊病毒琼扩阳性抗原；
1 —— 标准传染性法氏囊病毒阳性血清；
4 —— 标准传染性法氏囊病毒阴性抗原；
2、3、5、6 —— 待检血清。

或者
1 —— 标准传染性法氏囊病毒阳性血清；
2~6 —— 倍比稀释的待检血清。

图 B.2 抗体检测示意图

附 录 C
(规范性附录)
异硫氰酸胍法提取总 RNA

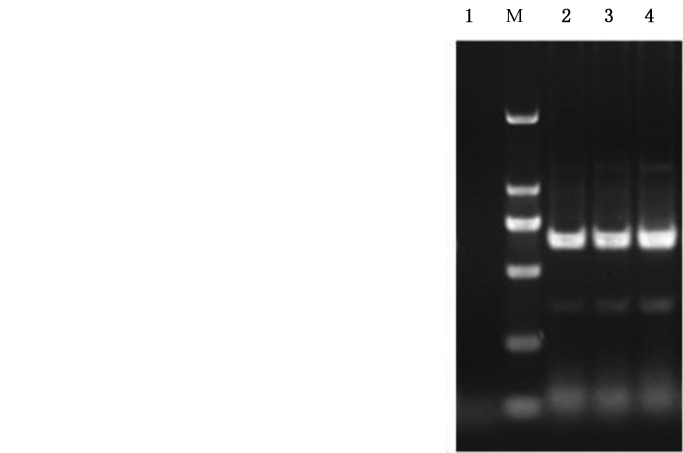
总 RNA 提取方法如下：

- a) 取待检样品、阴性对照、阳性对照各 200 μL 分别置于 1.5 mL 离心管中,每管加入 400 μL 裂解液(见 A.8),反复混匀,冰水浴 5 min。
- b) 每管分别加入 60 μL 2 mol/L 乙酸钠(pH 4.0),混匀。
- c) 每管加 600 μL 酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)混合液,混匀,冰水浴 5 min。
- d) 4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 10 min。将上清液转入另一洁净离心管。
- e) 加入等体积异丙醇,混匀,室温放置 15 min。
- f) 4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min,离心 10 min,小心地倒掉上清。尽量倒干液体,留下 RNA 沉淀。
- g) 加 1 000 μL 75%乙醇颠倒洗涤沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 5 min,小心倒干液体,室温干燥 5 min~10 min。
- h) 每管加 20 μL 无核酸酶水,用于溶解 RNA。总 RNA 提取液可立即用于 PCR 扩增,也可-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

附 录 D
(资料性附录)
RT-PCR 电泳及阳性序列

D.1 RT-PCR 电泳示意图

RT-PCR 电泳示意图见图 D.1。



说明：
M ——DNA Marker DL2000；
泳道 1 ——阴性对照；
泳道 2 ——阳性对照；
泳道 3、泳道 4 ——检测样品。

图 D.1 RT-PCR 电泳示意图

D.2 阳性序列

AGATTCTGCAGCCACGGTCTCTACCTGAAAATGAGGAGTATGAGACCGATCAAATACTCC
CTGACCTAGCTTGGATGAGGCAGATAGAGGGAGCTGTGTTGAAGCCAACCCTATCTCTCCC
CATTGGAGACCAGGAGTACTTCCCTAAATATTATCCAACACACCCGCCCCGAGCAAGGAGAAG
CCCAATGCGTACCCGCCCCGATATCGCACTACTCAAGCAGATGATCTACTTATTTCTCCAGGT
TCCCGAGGCTACAGACAACCTCAAAGATGAGGTCACCCTACTAACCCTAAAATATTAGAGAT
AAAGCCTACGGGAGTGGGACCTACATGGGACAGGCCACCAGACTTGTTGCTATGAAAGAG
GTTGCCACTGGGAGAAACCCGAACAAAGATCCTCTAAAGCTTGGGTACACCTTTGAGAGCA
TCGCCCAGCTGCTCGACATCACTTTACCGGTAGGCCACCCGGTGAGGATGACAAGCCCTGG
GTACCACTCACAAGGGTGCCGTCAAGGATGTTGGTTCTGACGGGCGACGTAGATGGGGAAT
TTGAGGTTGAGGACTACCTTCCC**AAAATCAACCTCAAGTCATCAA**

注：黑体为引物序列。

附 录 E
(资料性附录)
实时荧光 RT-PCR 扩增示意图

实时荧光 RT-PCR 扩增示意图见图 E.1。

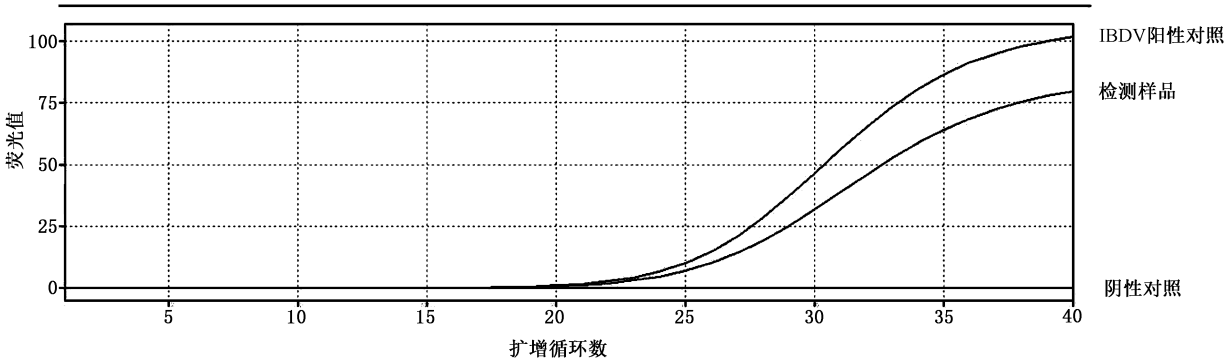


图 E.1 IBDV 实时荧光 RT-PCR 扩增示意图



附 录 F
(资料性附录)
CEF 细胞制备方法

CEF 细胞制备方法如下:

- a) 将选好的 9 d~10 d 发育良好的 SPF 胚用 5% 的碘棉消毒蛋壳气室部位,再用酒精棉脱碘。
 - b) 无菌取出鸡胚,放入灭菌的玻璃皿内,用 pH 7.2 的 PBS 冲洗一次,去头、四肢和内脏。再用 pH 7.2 的 PBS 冲洗两次。
 - c) 用剪刀剪成小块($2\text{ mm}^3 \sim 3\text{ mm}^3$),用 pH 7.2 的 PBS 冲洗两次。
 - d) 约加 4 mL 0.25% 胰酶溶液,38 °C 消化 30 min,期间 15 min 轻摇一次。
 - e) 消化结束,弃掉胰酶消化液,用 pH 7.2 的 PBS 冲洗两次,再用细胞培养液冲洗一次。
 - f) 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)。
 - g) 将细胞分散液倒入带 6 层~8 层纱布的 100 mL 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。重复上述操作重虑一遍。
 - h) 计数,要求滤液中活细胞浓度应为 1×10^6 个/mL~ 1.5×10^6 个/mL。
 - i) 分装培养瓶中(4 mL/瓶~5 mL/瓶),置 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。
-