



中华人民共和国国家标准

GB/T 16550—2008
代替 GB 16550—1996

新城疫诊断技术

Diagnostic techniques for newcastle disease

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

本标准对应于世界动物卫生组织(OIE)《陆生动物卫生法典》(2006 版)2.7.13“新城疫”和《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)》(2006 版)2.1.15“新城疫”,且与该章节的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB 16550—1996《新城疫检疫技术规范》。

本标准与 GB 16550—1996 相比主要变化如下:

- 对标准名称进行了修订,修改为《新城疫诊断技术》;
- 删除了原标准中属于行政执法行为的内容;
- 对血凝和血凝抑制试验进行了修改;
- 增加了脑内接种致病指数(ICPI)、静脉接种致病指数(IVPI);
- 增加了 RT-PCR 检测方法。

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 均为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检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、扬州大学。

本标准主要起草人:刘华雷、吴艳涛、王志亮、刘文博、马洪超、刘秀梵。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB 16550—1996。

新城疫诊断技术

1 范围

本标准规定了新城疫的临床诊断、病毒分离与鉴定、血凝试验、血凝抑制试验、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和综合判定。

本标准适用于新城疫的诊断。

2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

DEPC——焦碳酸二乙酯；

HA——血凝；

HAU——血凝单位，以完全凝集病毒的血清最高稀释倍数为一个血凝单位；

HI——血凝抑制；

ICPI——脑内接种致病指数；

IVPI——静脉接种致病指数；

MDT——致死鸡胚平均死亡时间；

NDV——新城疫病毒；

SPF——无特定病原体。

3 临床诊断

3.1 临床症状

当禽出现以下部分或全部情形时，可作为初步诊断的依据之一：

- a) 发病急，死亡率高；
- b) 体温升高，极度精神沉郁，呼吸困难，食欲下降；
- c) 粪便稀薄，呈黄绿色或黄白色；
- d) 出现扭颈、翅膀麻痹等神经症状；
- e) 免疫禽群出现产蛋下降。

3.2 病理变化

当禽出现下列肉眼可见的病变时，可作为初步诊断定性的依据之一：

- a) 全身黏膜和浆膜出血，以呼吸道和消化道最为严重；
- b) 腺胃黏膜水肿，乳头和乳头间有出血点；
- c) 盲肠扁桃体肿大、出血、坏死；
- d) 十二指肠和直肠黏膜出血，有的可见纤维素性坏死病变；
- e) 脑膜充血和出血，鼻道、喉、气管黏膜充血、偶有出血，肺可见淤血和水肿。

当禽出现上述病变时，应进行实验室确诊。

4 病毒分离与鉴定

4.1 病毒分离

4.1.1 样品采集

从活禽采集的样品应包括气管和泄殖腔拭子，后者需带有可见粪便，对雏禽采集拭子容易造成损

伤,可采用收集新鲜粪便代替。死禽以脑、肺脏、脾脏为主,也可采集其他病变组织。

4.1.2 样品处理

样品置于含抗生素的等渗磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 值 7.0~7.4),抗生素视条件而定,但组织和气管拭子保存液中应含青霉素(2 000 U/mL)、链霉素(2 mg/mL)、卡那霉素(50 μg/mL)和制菌霉素(1 000 U/mL),而粪便和泄殖腔拭子保存液抗生素浓度应提高五倍。加入抗生素后调 pH 值到 7.0~7.4。粪便和搅碎的组织,应用含抗生素的 PBS 溶液制成 10%(g/mL)~20%(g/mL)的悬浮液,在室温下静置 1 h~2 h。将粪便或组织的悬浮液在 4℃下以 3 000g 离心 5 min,取上清液进行鸡胚接种。

4.1.3 鸡胚接种

用 1 mL 注射器吸取上清液按每枚 0.2 mL,经尿囊腔接种至少五枚 9 日龄~11 日龄的 SPF 鸡胚,接种后,35℃~37℃孵育 4 d~7 d。18 h 后每 8 h 观察鸡胚死亡情况。

4.1.4 病毒收获

18 h 以后死亡的和濒死的以及结束孵化时存活的鸡胚置 4℃冰箱 4 h~24 h,无菌采集尿囊液。

4.2 病毒鉴定

4.2.1 血凝试验

对于血凝试验呈阳性的样品采用新城疫标准阳性血清进一步进行血凝抑制试验。如果没有血凝活性或血凝效价很低,则采用 SPF 鸡胚用初代分离的尿囊液继续传两代,若仍为阴性,则认为新城疫病毒分离阴性。方法同第 5 章。

4.2.2 血凝抑制试验

采用新城疫标准阳性血清进行血凝抑制试验,确认是否有新城疫病毒繁殖。方法同第 6 章。

4.3 致病指数测定

经确定存在新城疫病毒繁殖的情况下,应根据下列指标之一进行毒力判定:

a) 病毒致死量致死鸡胚平均死亡时间(MDT)的测定:

- 1) 将新鲜的感染尿囊液用灭菌的生理盐水连续 10 倍稀释成 10^{-6} ~ 10^{-9} ;
- 2) 每个稀释度经尿囊腔接种五枚 9 日龄~10 日龄的 SPF 鸡胚,每枚鸡胚接种 0.1 mL,置于 37℃培养;
- 3) 余下的病毒稀释液于 4℃保存,8 h 后,每个稀释度接种另外五枚鸡胚,每枚鸡胚接种 0.1 mL,置于 37℃培养;
- 4) 每日照蛋两次,连续观察 7 d,记录各鸡胚的死亡时间;
- 5) 最小致死量是指能引起所有用此稀释度接种的鸡胚死亡的最大稀释度;
- 6) MDT 是指最小致死量引起所有鸡胚死亡的平均时间(h),计算方法见式(1)。

$$MDT = \frac{N_x \times X + N_y \times Y + \dots}{T} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

N_x ——X 小时死亡的胚数;

N_y ——Y 小时死亡的胚数;

X, Y——胚死亡时间,单位为小时(h);

T——死亡的总胚数。

b) 接种致病指数(ICPI)测定:

- 1) HA 滴度高于 $4\log_2$ (大于 1/16)以上新鲜感染尿囊液(不超过 24 h~48 h,细菌检验为阴性),用无菌等渗盐水作 10 倍稀释;
- 2) 脑内接种出壳 24 h~40 h 之间的 SPF 雏鸡,共接种 10 只,每只接种 0.05 mL;
- 3) 每 24 h 观察一次,共观察 8 d;
- 4) 每天观察应给鸡打分,正常鸡记作 0,病鸡记作 1,死鸡记作 2,(每只死鸡在其死后的每日

观察中仍记 2)；

- 5) ICPI 是每只鸡 8 d 内所有每次观察数值的平均数,计算方法见式(2)。

$$ICPI = \frac{\sum_s \times 1 + \sum_d \times 2}{T} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

\sum_s ——8 d 累计发病数;

\sum_d ——8 d 累计死亡数;

T ——8 d 累计观察鸡的总数。

- c) 接种致病指数(IVPI)测定:

- 1) HA 滴度高于 $4\log_2$ (大于 1/16)的新鲜尿囊液(不超过 24 h~48 h,细菌检验为阴性),用无菌等渗盐水作 10 倍稀释;
- 2) 静脉接种六周龄的 SPF 小鸡,接种 10 只,每只鸡接种 0.1 mL;
- 3) 每天观察 1 次,共 10 d,每次观察要记分,正常鸡记作 0,病鸡记作 1,瘫痪鸡或出现其他神经症状记作 2,死亡鸡记作 3(每只死鸡在其死后的每日观察中仍记作 3);
- 4) IVPI 是指每只鸡 10 d 内所有每次观察数值的平均值,计算方法见式(3)。

$$IVPI = \frac{\sum_s \times 1 + \sum_p \times 2 + \sum_d \times 3}{T} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

\sum_s ——10 d 累计发病数;

\sum_p ——10 d 累计瘫痪数;

\sum_d ——10 d 累计死亡数;

T ——10 d 累计观察鸡的总数。

4.4 结果判定

结果判定细则如下:

- a) MDT 低于 60 h 为强毒型 NDV,MDT 在 60 h~90 h 为中等毒力型 NDV,MDT 大于 90 h 为低毒力 NDV;
- b) ICPI 越大,NDV 致病性越强,最强毒力病毒的 ICPI 接近 2.0,而弱毒株毒力的 ICPI 为 0;
- c) IVPI 越大,NDV 致病性越强,最强毒力病毒的 IVPI 可达 3.0,而弱毒株的 IVPI 为 0。

5 血凝试验

5.1 材料与试剂

5.1.1 器材:普通天平、分析天平、普通离心机、微型振荡器、煮沸消毒器、冰箱、高压灭菌器、微量移液器、滴头、96 孔 V 形血凝反应板。

5.1.2 pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)配制方法参见附录 A。

5.1.3 1%鸡红细胞悬液配制方法参见附录 B。

5.1.4 标准新城疫病毒抗原、购入的标准新城疫病毒应检测其血凝效价并进行无菌检验,以检查与所标 HA 效价是否相符。若不符,应重复检测并到相关实验室验证。

5.2 血凝试验操作程序

血凝试验操作程序如下:

- a) 取 96 孔 V 形微量反应板,用微量移液器在 1 孔~12 孔每孔加 0.025 mL PBS;
- b) 吸取 0.025mL 病毒悬液加入第 1 孔中,吹打 3 次~5 次充分混匀;
- c) 从第 1 孔中吸取 0.025 mL 混匀后的病毒液加到第 2 孔,混匀后吸取 0.025 mL 加入到第 3 孔,依次进行系列倍比稀释到第 11 孔,最后从第 11 孔吸取 0.025 mL 弃之,设第 12 孔为 PBS

对照；

- d) 每孔再加 0.025 mL PBS；
- e) 每孔加入 0.025 mL 体积分数为 1% 的鸡红细胞悬液；
- f) 振荡混匀反应混合液，室温 20℃～25℃ 下静置 40 min 后观察结果，若环境温度太高，放 4℃ 静置 60 min，PBS 对照孔的红细胞成明显的钮扣状沉到孔底时判定结果。

5.3 结果判定

结果判定细则如下：

- a) 在 PBS 对照孔出现正确结果的情况下，将反应板倾斜，观察红细胞是否完全凝集。以完全凝集的病毒最大稀释度为该抗原的血凝滴度。完全凝集的病毒的最高稀释倍数为 1 个血凝单位 (HAU)。
- b) 如果没有血凝活性或血凝效价很低，则采用 SPF 鸡胚用初代分离的尿囊液继续传两代，若仍为阴性，则认为新城疫病毒分离阴性。
- c) 对于血凝试验呈阳性的样品应采用新城疫标准阳性血清进一步进行血凝抑制试验。

6 血凝抑制试验

6.1 材料与试剂

- 6.1.1 器材同 5.1.1。
- 6.1.2 试剂同 5.1.2。
- 6.1.3 标准抗 NDV 血凝抑制抗体(血清)。
- 6.1.4 4 个血凝单位的病毒液制备：根据 4.2 测定的病毒的血凝效价，判定 4 个血凝单位的稀释倍数。方法举例为：如病毒 HI 效价为 $9\log_2$ ，其 4 个血凝单位为 $7\log_2$ ，则将病毒稀释 128 倍即可。
- 6.1.5 HI 效价高于 $10\log_2$ 时可继续增加稀释的孔数。

6.2 HI 试验程序

HI 试验操作程序如下：

- a) 根据血凝试验结果配制 4 个血凝单位(4HAU)抗原。以能引起 100% 血凝的病毒最高稀释倍数代表 1 个血凝单位，4HAU 的配制方法如下：假设抗原的血凝滴度为 1:256，则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1:64(256 除以 4)。稀释时，将 1 mL 抗原加入到 63 mL PBS 中即为 4HAU 抗原。
- b) 取 96 孔 V 形微量反应板，用移液器在第 1 孔～第 11 孔各加入 0.025 mL PBS，第 12 孔加入 0.05 mL PBS。
- c) 在第 1 孔加入 0.025 mL 新城疫标准阳性血清，充分混匀后移出 0.025 mL 至第 2 孔，依次类推，倍比稀释至第 10 孔，第 10 孔弃去 0.025 mL，第 11 孔为阳性对照，第 12 孔为 PBS 对照。
- d) 在第 1 孔～第 11 孔各加入 0.025 mL 含 4HAU 抗原，轻叩反应板，使反应物混合均匀，室温下(约 20℃～25℃)静置不少于 30 min，4℃ 不少于 60 min。
- e) 每孔加入 0.025 mL 体积分数为 1% 的红细胞悬液，轻晃混匀后，室温(约 20℃～25℃)静置约 40 min，若环境温度太高，放 4℃ 静置 60 min。当 PBS 对照孔红细胞呈明显钮扣状沉到孔底时判定结果。

6.3 结果判定

结果判定细则如下：

- a) 在 PBS 对照孔出现正确结果的情况下，将反应板倾斜，从背侧观察，看红细胞是否呈泪珠状流下。滴度是指产生完全不凝集(红细胞完全流下)的最高稀释度。只有当阴性血清与标准抗原对照的 HI 滴度不大于 $2\log_2$ ，阳性血清与标准抗原对照的 HI 滴度与已知滴度相差在 1 个稀释度范围内，并且所用阴、阳性血清都不发生自凝的情况下，HI 试验结果方判定有效。

- b) 尿囊液 HA 效价大于等于 $4\log_2$, 且标准新城疫阳性血清对其 HI 效价大于等于 $4\log_2$, 判为新城疫病毒。
- c) 对确定存在新城疫病毒繁殖的尿囊液应进一步测定其毒力, 方法见 4.3。

7 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

7.1 仪器设备

所用仪器设备如下:

- a) PCR 仪;
- b) 高速台式冷冻离心机: 最大离心力 $12\ 000g$ 以上;
- c) 生物安全柜;
- d) 冰箱;
- e) 水浴锅;
- f) 微量移液器;
- g) 组织匀浆器;
- h) 电泳仪;
- i) 电泳槽;
- j) 紫外凝胶成像仪。

7.2 试剂

所用试剂如下:

- a) RNA 提取试剂 Trizol;
- b) 三氯甲烷;
- c) 异丙醇;
- d) 75%乙醇: 用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制, $-20\ ^\circ\text{C}$ 预冷。

7.3 操作程序

7.3.1 样品的采集和处理

取 $200\ \mu\text{L}$ 离心后的上清提取 RNA。也可选择含病毒的鸡胚尿囊液进行 RT-PCR 鉴定。

7.3.2 病毒核酸 RNA 的提取

RNA 提取应在样品制备区。应保证无细菌及核酸污染, 实验材料和容器应经过消毒处理并一次性使用。提取 RNA 时应避免 RNA 酶污染。同时设立阳性对照和阴性对照。

用 Trizol 提取核酸 RNA 的操作步骤如下(样品以鸡胚尿囊液为例):

- a) 在无 RNA 酶的 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中加入 $200\ \mu\text{L}$ 尿囊液后, 加入 $1\ \text{mL}$ Trizol, 振荡 $20\ \text{s}$, 室温静置 $10\ \text{min}$;
- b) 加入 $200\ \mu\text{L}$ 三氯甲烷, 颠倒混匀, 室温静置 $10\ \text{min}$, 以 $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $15\ \text{min}$;
- c) 管内液体分为三层, 取 $500\ \mu\text{L}$ 上清液于离心管中, 加入 $500\ \mu\text{L}$ 预冷 ($-20\ ^\circ\text{C}$) 的异丙醇, 颠倒混匀, 静置 $10\ \text{min}$, 以 $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $15\ \text{min}$ 沉淀 RNA, 弃去所有液体(离心管在吸水纸上控干);
- d) 加入 $700\ \mu\text{L}$ 预冷 ($-20\ ^\circ\text{C}$) 的 75% 乙醇洗涤, 颠倒混匀 2 次~3 次, 以 $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 $10\ \text{min}$;
- e) 调水浴至 $60\ ^\circ\text{C}$, 室温下干燥 $10\ \text{min}$;
- f) 加入 $40\ \mu\text{L}$ DEPC 水, $60\ ^\circ\text{C}$ 金属浴中作用 $10\ \text{min}$, 充分融解 RNA, $-70\ ^\circ\text{C}$ 保存或立即使用。

7.3.3 配置 RT-PCR 反应体系

在样品处理区内由专人按表 1 给出的程序分步进行。注意只能在试剂准备区打开和配制试剂, 配制完毕后应及时将剩余试剂放回贮存区域。将适量的核酸样品小心加入装有反应液体的反应管内, 盖

紧盖子并做好标记。参照表 1 中反应体系配置 RT-PCR 扩增。

表 1 RT-PCR 反应体系配置表

试剂	体积/ μL
无 RNA 酶灭菌超纯水	13.6
10×缓冲液	2.5
dNTPs	2
RNA 酶抑制剂	0.5
AMV 反转录酶	0.7
Taq 酶	0.7
上游引物 P1	1
下游引物 P2	1
模板 RNA	3
总计	25
注：上游引物 P1 的序列为 5'-ATGGGCYCCAGAYCTTCTAC-3'，下游引物 P2 的序列为 5'-CTGCCACT-GCTAGTTGTGATAATCC-3'，Y 为兼并碱基。	

7.3.4 RT-PCR

按照表 1 中的加样顺序全部加完后，充分混匀，瞬时离心，使液体都沉降到 PCR 管底。在每个 PCR 管中加入一滴液体石蜡（约 20 μL ）。同时设立阳性对照和阴性对照。

循环条件为：

- 第一阶段，反转录 42 $^{\circ}\text{C}$ /45 min；
- 第二阶段，预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ /3 min；
- 第三阶段，94 $^{\circ}\text{C}$ /30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ /30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ /45 s, 30 个循环；
- 第四阶段，72 $^{\circ}\text{C}$ /7 min。

最后的 RT-PCR 产物置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7.3.5 电泳

操作程序如下：

- 制备 1.5% 琼脂糖凝胶板；
- 取 5 μL PCR 产物与 0.5 μL 加样缓冲液混合，加入琼脂糖凝胶板的加样孔中；
- 加入 DNA 分子质量标准物；
- 盖好电泳仪，插好电极，5 V/cm 电压电泳，30 min~40 min；
- 紫外线灯下观察结果，凝胶成像仪扫描图片存档，打印；
- 用分子质量标准物比较判断 PCR 片段大小。

7.4 结果判定

结果判定细则如下：

- 出现 0.5 kb 大小左右的片段（与阳性对照大小相符，参见附录 C），而阴性对照无目的片段出现方可判为新城疫病毒阳性。
- 对于扩增到的目的片段，需进一步进行序列测定，从分子水平确定其致病性强弱。
- 根据序列测定结果，对毒株 F 基因编码的氨基酸序列进行分析，如果毒株 F2 蛋白的 C 端有“多个碱性氨基酸残基”，F1 蛋白的 N 端即 117 位为苯丙氨酸，可确定为新城疫强毒感染。“多个碱性氨基酸”指在 113 位到 116 位残基之间至少有三个精氨酸或赖氨酸。

8 综合判定

8.1 临床诊断符合第3章规定的临床症状和病理变化,按第4章进行病毒分离与鉴定结果为新城疫病毒阳性且 $ICPI \geq 0.7$, 诊断为新城疫。

8.2 临床诊断符合第3章规定的临床症状和病理变化,按第7章进行 RT-PCR 检测结果呈阳性且经序列分析证明 F 蛋白裂解位点具有强毒特征,诊断为新城疫。

8.3 患禽没有明显的临床症状和病理变化,但病原检测符合 8.1 或 8.2,可判定为新城疫病毒强毒感染。



附 录 A

(资料性附录)

pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)配制

pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)配制:

氯化钠(NaCl)	8.0 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.44 g
磷酸二氢钠(KH_2PO_4)	0.24 g
加蒸馏水至	1 000 mL

将上述成分依次溶解,用盐酸(HCl)调 pH 至 7.2,分装,121 °C、15 min 高压灭菌。

附 录 B

(资料性附录)

1%鸡红细胞悬液(RBC)制备

采集至少三只 SPF 公鸡或无禽流感和新城疫抗体的非免疫鸡的抗凝血液,放入离心管中,加入三倍~四倍体积的 PBS 混匀,以 2 000 r/min 离心 5 min~10 min,去掉血浆和白细胞层,重复以上过程,反复洗涤三次(洗净血浆和白细胞),最后吸取压积红细胞用 PBS 配成体积分数为 1%的悬液,于 4 ℃保存备用。

附 录 C

(资料性附录)

新城疫病毒 RT-PCR 检测阳性参照图

C.1 新城疫病毒 RT-PCR 检测阳性参照图

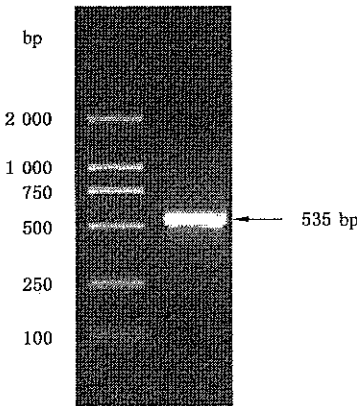


图 C.1

C.2 说明

C.2.1 琼脂糖凝胶的浓度为 1.5%。

C.2.2 DNA 相对分子质量标准物(Marker)为 DL2000。