

最新公园动物园动物

科学饲养技术与疾病防疫 及常见疾病诊治应用手册

ZUIXIN GONGYUAN DONGWUYUAN DONGWU KEXUE SIYANG JISHU
YU JIBING FANGYI JI CHANGJIAN JIBING ZHENZHI YINGYONG SHOUC



银声音像出版社

S8-62

2

:4

最新公园动物园动物科学饲养技术与 疾病防疫及常见疾病诊治应用手册

第 四 卷

张杉洲 主编

银声音像出版社

SPF 鸡 血清中和试验

GB/T 17999.2—1999

1 范围

本标准规定了血清中和试验所用试剂、材料,操作程序及结果判定等。

本标准适用于 SPF 鸡感染以下病毒后的中和抗体的监测:禽脑脊髓炎病毒(Avian Encephalomyelitis Virus)、传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus)、传染性喉气管炎病毒(Infectious Laryngotracheitis Virus)、传染性法氏囊病病毒(Infectious Bursal Disease Virus)。

2 原理

中和试验系指有生物活性的病毒与相应的抗体结合后,可失去原有的生物活性的中和反应。中和反应不仅有高度特异性,且具有严格的量的关系。因此可用中和试验鉴定病毒,也可用于相应抗体的定量检测。

3 试剂和器材

3.1 试剂

3.1.1 蛋白胨磷酸肉汤。

3.1.2 青霉素/链霉素(双抗)液。

3.1.3 3%碘溶液。

3.1.4 SPF 蛋。

3.2 器材

3.2.1 蛋钻(打孔器)。

3.2.2 6# 针头。

3.2.3 7# 针头。

3.2.4 混合器。

3.2.5 照蛋器。

3.2.6 常规实验设备。

4 操作程序

4.1 试验准备

4.1.1 血清样品处理

被检血清和阳性对照血清经 56℃30 min ~ 45 min 灭活,保存于 -20℃条件下备用。

4.1.2 SPF蛋准备

4.1.2.1 共需 12 枚蛋。

4.1.2.2 照蛋检查胚体活力,试验只用健康胚。

4.1.2.3 根据病毒种类选择接种方法(见表 1)。用 3% 碘溶液消毒胚蛋接种部位。

表 1 病毒接种胚龄与方法

病毒	胚龄, d	接种方法
禽脑脊髓炎病毒	5 ~ 7	YS
传染性支气管炎病毒	9 ~ 11	CAS
传染性法氏囊病病毒	10	CAM
传染性喉气管炎病毒	9 ~ 11	CAS

注:YS—卵黄囊;CAS—尿囊腔;CAM—绒毛尿囊膜。

4.1.3 稀释病毒

4.1.3.1 取灭菌试管 4 支 ~ 9 支,每管加入稀释液 4 mL,青霉素/链霉素液 0.5 mL。

4.1.3.2 第 1 管加入病毒液 0.5 mL,作连续 10 倍稀释。各种病毒的稀释度参照表 2。

表 2 病毒稀释

病 毒	稀 释 度
禽脑脊髓炎病毒	$10^{-1} \sim 10^{-6}$
传染性支气管炎病毒	$10^{-1} \sim 10^{-9}$

续表

病 毒	稀 释 度
传染性法氏囊病病毒	$10^{-1} \sim 10^{-4}$
传染性喉气管炎病毒	$10^{-1} \sim 10^{-6}$

4.2 中和试验

4.2.1 每份被检血清需 1.5 mL。

4.2.2 病毒稀释度选择

根据具体情况决定,一般选择 3 个连续的病毒稀释度。检测 SPF 鸡血清样品时,病毒稀释度,采用较高稀释度,如 $10^{-6} \sim 10^{-8}$;检测阳性对照血清样品时,病毒采用较低稀释度,如 $10^{-1} \sim 10^{-3}$;检测普通鸡血清样品时,病毒稀释度常采用 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 。

4.2.3 病毒与血清混合感作

将血清与不同稀释度的病毒等量混合后,经室温($18^{\circ}\text{C} \sim 22^{\circ}\text{C}$)感作,感作时间见表 3。

表 3 血清与病毒混合感作时间

病 毒	感作时间, min
禽脑脊髓炎病毒	60
传染性支气管炎病毒	30 或 60
传染性法氏囊病病毒	60
传染性喉气管炎病毒	45

4.2.4 接种鸡胚

4.2.4.1 病毒与血清混合感作后接种鸡胚,每个稀释度接种 4 枚鸡胚,每枚鸡胚接种 0.2 mL。

4.2.4.2 病毒对照:将不同稀释度的病毒液,分别接种鸡胚,每个稀释度接种 4 枚鸡胚,每枚鸡胚接种 0.1mL。

4.2.5 孵化

将接种后的鸡胚放入孵化器,继续孵化。根据病毒不同,选定不同的孵化时间(见表 4)。

表 4 接种鸡胚的孵化时间

病 毒	孵化时间,d
禽脑脊髓炎病毒	10~12
传染性支气管炎病毒	3~4 或 8
传染性法氏囊病病毒	8
传染性喉气管炎病毒	8

4.2.6 记录各组死亡鸡胚数,接种禽脑脊髓炎病毒的鸡胚,若胚胎经刺激无反应时,按死亡鸡胚记录。

4.2.7 计算中和指数

结果以中和指数表示,中和指数表示被检血清中有无中和抗体及中和病毒的能力。为求中和指数,应计算出病毒对照和被检血清/病毒的 ELD₅₀,此二者的差数即为中和指数(Reed和Muench法),参见示例。

4.2.7.1 示例:病毒对照组及血清/病毒试验组死亡情况见表 5 和表 6。

表 5 病毒对照组死亡情况

病毒稀释度	死亡比例	死亡	存活	累 计			
				死亡	存活	死亡比例	死亡百分率, %
10 ⁻⁷	3/4	3	1	4	1↓	4/5	80.8
10 ⁻⁸	1/4	1	3	1	4	1/5	20.0
10 ⁻⁹	0/4	0	4	↑0	8	0/8	0

注:分母表示接种鸡胚数,分子表示因病毒感染死亡鸡胚数。

表 6 血清/病毒组死亡情况

病毒稀释度	死亡比例	死亡	存活	累 计			
				死亡	存活	死亡比例	死亡百分率, %
10^{-6}	3/4	3	1	6	1↓	6/7	86.0
10^{-7}	3/4	3	1	3	2	3/5	60.0
10^{-8}	0/4	0	4	↑0	6	0/6	0

4.2.7.2 中和指数计算: 试验组 ELD_{50} 效价等于高于 50% 死亡百分数病毒稀释度倒数的对数加距离比。

4.2.7.2.1 距离比按式(1)计算:

$$\text{距离比} = \frac{\text{高于 50\% 的死亡百分数} - 50}{\text{高于 50\% 的死亡百分数} - \text{低于 50\% 的死亡百分数}} \dots\dots\dots (1)$$

4.2.7.2.2 病毒对照组 ELD_{50} 效价在 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 之间

$$\begin{aligned} \text{病毒对照组 } ELD_{50} \text{ 效价} &= 7 + \frac{80 - 50}{80 - 20} \\ &= 7 + 0.5 \\ &= 7.5 \\ ELD_{50} &= 10^{-7.5} \end{aligned}$$

4.2.7.2.3 血清/病毒组 ELD_{50} 效价在 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 之间

$$\begin{aligned} \text{血清/病毒组 } ELD_{50} \text{ 效价} &= 7 + \frac{60 - 50}{60 - 0} \\ &= 7 + 0.17 (\text{约 } 0.2) \\ &= 7.2 \\ ELD_{50} &= 10^{-7.2} \end{aligned}$$

4.2.7.2.4 被检血清的中和指数 = 病毒对照组 ELD_{50} 效价 - 被检血清/病毒组 ELD_{50} 效价

$$\begin{aligned} \text{被检血清中和指数} &= 7.5 - 7.2 \\ &= 0.3 \end{aligned}$$

5 结果判定

被检血清的中和指数 ≥ 2.0 为阳性。

SPF鸡 血清平板凝集试验

GB/T 17999.3—1999

1 范围

本标准规定了鸡血清平板凝集试验所用试剂、材料,操作程序及结果判定等。

本标准适用于 SPF 鸡感染以下病原菌后的凝集抗体的监测:鸡白痢沙门氏菌(*Salmonella pullorum*)、鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*)、滑液囊支原体(*Mycoplasma synoviae*)、副鸡嗜血杆菌(*Haemophilus paragallinarum*)。

2 原理

血清平板凝集试验是细菌性抗原与相应的抗体结合后,在适量的电解质参与下,经过一段时间出现肉眼可见的凝集现象。常采用已知的标准细菌性抗原液检测相应的凝集抗体。

3 试剂和材料

3.1 试剂

3.1.1 凝集抗原。

3.1.2 阴性、阳性血清。

3.1.3 被检血清。

3.2 材料

3.2.1 玻璃板。

3.2.2 移液器(TD 10 μ L ~ 200 μ L)及吸头。

4 操作程序

4.1 使用前 10 min ~ 20 min 自冰箱取出抗原、阴性或阳性血清与被检血清,使其达到室温。

4.2 用移液器吸取充分混匀的诊断抗原一滴(0.025 mL ~ 0.05 mL),垂直滴于玻璃板上,然后迅速在抗原旁边滴加同量的被检血清一滴(0.025 mL ~ 0.05 mL)。

4.3 用牙签使血清与抗原混合均匀,涂布成直径为 1cm ~ 2 cm 的片状,不断摇动玻璃板,2 min 内观察结果。

4.4 试验应在 20℃ ~ 25℃ 条件下进行。

4.5 每批试验应设阳性血清与阴性血清对照。

5 结果判定

在 2 min 内出现 50%(++)以上凝集者为阳性,2 min 内不凝集(-)者为阴性,介于上述两者之间为可疑,凝集判读标准见表 1。

表 1 血清平板凝集试验判读标准

类 别	平 板 所 见	结 果	判 定
1	出现大的凝集块,底质清亮, 即 100%凝集	++++	阳性
2	出现明显凝集块,底质稍有混 浊,即 75%凝集	+++	
3	出现可见的凝集颗粒,底质混 浊,即 50%凝集	++	
4	底质极混浊,出现轻微可见的 微细颗粒,即 25%凝集	+	可疑
5	底质均匀一致极混浊,无凝集 现象,即不凝集	-	阴性

SPF鸡 琼脂扩散试验

GB/T 17999.4—1999

1 范围

本标准规定了琼脂扩散试验所用试剂、材料、操作程序及结果判定等。

本标准适用于 SPF 鸡感染以下病毒后的沉淀抗体的监测:禽流感病毒 A 型(Avian Influeza Virus Type A)、传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus)、传染性法氏囊病病毒(Infectious Bursal Disease Virus)、传染性喉气管炎病毒(Infectious Larvnsotracheitis Virus)、禽痘病毒(Fowl Pox Virus)、马立克氏病病毒(Marek's Disease Virus)、禽脑脊髓炎病毒(Avian Encephalomyelitis Virus)、网状内皮增生症病毒(Reticuloendotheliosis Virus)、禽呼肠孤病毒(病毒性关节炎)(Avian Reovirus)、禽腺病毒 I 群(Avian Adenovirus Group I)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)。

2 原理

琼脂扩散试验是一种沉淀反应。抗原、抗体在含有电解质的琼脂凝胶中,可以向四周自由扩散,二者互相结合,在最适比例处出现沉淀线。常采用已知抗原检测相应的沉淀抗体。

3 试剂和材料

3.1 试剂

- 3.1.1 琼扩抗原。
- 3.1.2 阳性血清。
- 3.1.3 被检血清。
- 3.1.4 0.01 M、pH7.2、8%氯化钠磷酸缓冲液。
- 3.1.5 优质琼脂粉或琼脂糖。

3.2 材料

- 3.2.1 琼扩板。
- 3.2.2 打孔器。
- 3.2.3 移液器。

4 操作程序

4.1 琼脂板制备

1 g 优质琼脂粉或 0.8 g ~ 1 g 琼脂糖加入 100 mL 0.01M、pH7.2、8% 氯化钠磷酸缓冲液中(检测禽流感病毒感染时,同 0.01 mol/L、pH6.4 的 8% 氯化钠磷酸缓冲液配制琼脂),水浴加热融化,稍凉(60℃ ~ 65℃),倒入琼扩板内(厚度为 3 mm),待琼脂凝固后,4℃ 冰箱保存备用。

4.2 打孔

用六角形打孔器在琼脂板上按 7 孔梅花图案打孔,孔径 3 mm ~ 4 mm,孔距 3 mm。用 8# 针头挑出孔内琼脂,挑出时从孔一侧边缘插入针头,轻轻移动,等空气进入孔底后,再向上挑出。

4.3 封底

打孔完毕,封闭孔底。将板底部在酒精灯上烘烤,使底部琼脂微溶化即可,也可在琼脂孔底部与板接触处加少量溶化的 1% 琼脂或琼脂糖。

4.4 加样

用移液器滴加抗原于中间孔,周围 1、4 孔加阳性血清,其余孔加被检血清。加样时应将孔加满,不应出现凹形面,也不应溢出。

4.5 感作

将琼扩板加盖保温,放于 37℃ 温箱内作用 24 h ~ 72 h,观察沉淀线。

5 结果判定

5.1 阳性

阳性血清与抗原孔之间有明显沉淀线时,被检血清与抗原孔之间也形成沉淀线,并与阳性血清的沉淀线末端吻合,则被检血清判为阳性。

5.2 弱阳性

被检血清与抗原孔之间没有沉淀线,但阳性血清的沉淀线末端向被检血清孔偏弯,此被检血清判为弱阳性(需重复试验)。

5.3 阴性

被检血清与抗原孔之间不形成沉淀线,且阳性血清沉淀线直向被检血清孔,则被检血清判为阴性。

SPF 鸡 酶联免疫吸附试验

GB/T 17999.5—1999

1 范围

本标准规定了酶联免疫吸附试验所用试剂、材料,操作程序及结果判定等。

本标准适用于SPF鸡感染淋巴白血病病毒后的群特异性抗原的监测。

2 原理

检测 SPF 鸡蛋清中禽白血病病毒主要群特异性抗原 P27 的方法为双抗体夹心酶联免疫吸附试验。先用抗 P27 抗体包被酶标板,然后与蛋清作用,蛋清中的 P27 与包被抗体结合,洗去未结合的物质。再加入 HRP - 兔抗 P27 抗体,作用后洗去未结合的酶标物。加入底物溶液,出现颜色变化。颜色变化的速度及程度与样品中 P27 的含量有关。

3 试剂和器材

3.1 试剂

3.1.1 包被抗体(兔抗 P27 IgG)。

3.1.2 阳性抗原(P27)。

3.1.3 阴性抗原。

3.1.4 被检蛋清。

3.1.5 HRP - 兔抗 P27。

3.1.6 包被液:

0.05 mol/L、pH9.6 碳酸盐缓冲液配制:碳酸钠 1.59 g,碳酸氢钠 2.93 g,蒸馏水加至 1 000 mL。

3.1.7 洗涤液:

pH7.4、PBS - Tween20 配制:0.01mol/L、pH7.4 PBS 1 000 mL,吐温 - 20 0.5 mL。

3.1.8 底物溶液:

pH5.0 磷酸盐 - 柠檬酸缓冲液 - OPD - H₂O₂ 配制:0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液 25.7 ml,0.1mol/L 柠檬酸溶液 24.3 mL,蒸馏水 50 mL,邻苯二胺(OPD)40 mg,30% H₂O₂ 0.15 mL。

3.1.9 终止液:2 mol/L 硫酸。

3.2 器材

3.2.1 酶标板。

3.2.2 移液器。

3.2.3 恒温培养箱。

3.2.4 ELISA读数仪。

4 操作程序

4.1 抗体包被:用包被液将免抗 P27 IgG 作适当稀释,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜。

4.2 洗涤:甩去包被液,每孔加满洗涤液(约 300 μ L),静置 3 min,甩干,如此重复 3 次。

4.3 加样:每孔加 100 μ L 被检蛋清,设阳性、阴性对照孔,每个样品加两孔,37 $^{\circ}$ C 作用 60 min。甩去样品,洗涤同上。

4.4 每孔加 HRP-免抗 P27(工作浓度)100 μ L,37 $^{\circ}$ C 作用 45 min~60 min,甩去 HRP-免抗 P27 液,洗涤同上。

4.5 加底物溶液:每孔加 100 μ L 新配制的底物溶液,避光作用 15 min。

4.6 终止反应:每孔加终止液 100 μ L。

4.7 读 OD 值:终止反应后,迅速置 ELISA 读数仪上于 490 nm 处读出各孔的 OD 值。

5 结果判定

5.1 当阳性对照 OD 值与阴性对照 OD 值之差大于或等于 0.3 时,试验结果可靠。

5.2 按式(1)计算被检样品的 S/P 比值:

$$S/P = \frac{\text{样品 OD 值均数} - \text{阴性对照 OD 值均数}}{\text{阳性对照 OD 值均数} - \text{阴性对照 OD 值均数}} \quad (1)$$

式中: S——样品 OD 值;

P——阳性对照 OD 值。

5.3 判定: $S/P \geq 0.2$, 判为阳性; $S/P < 0.2$, 判为阴性。

SPF鸡 胚敏感试验

GB/T 17999.6—1999

1 范围

本标准规定了胚敏感试验所用试剂、材料,操作程序及结果判定等。

本标准适用于 SPF 鸡感染禽脑脊髓炎病毒后的抗体监测。

2 原理

Van Roekel毒株是禽脑脊髓炎病毒的一株胚适应毒株,具有高度嗜神经性。对非免疫鸡群的鸡胚有致病性,引起肌肉营养不良、运动性降低、足趾卷曲等特征性病变。免疫鸡群的鸡胚对经卵黄囊接种的病毒有抵抗力。

3 试剂和器材

3.1 试剂

3.1.1 AE - Van Roekel病毒(0.2 mL 含 100 EID₅₀)。

3.1.2 SPF蛋。

3.1.3 被检蛋。

3.2 器材

3.2.1 1 mL 注射器。

3.2.2 7# 针头。

3.2.3 恒温培养箱。

3.2.4 超净工作台。

3.2.5 小型孵化器。

4 操作程序

4.1 取被检蛋及SPF蛋孵至6日龄。

4.2 取6日龄被检鸡胚,每胚经卵黄囊接种0.2 mL 含100 EID₅₀的AE - Van Roekel病毒液,接种完毕用蜡封孔,同时取6日龄SPF鸡胚接种与不接种病毒作为对照。

4.3 接种后的鸡胚,置37℃~37.5℃孵化器中孵化,每天照蛋一次,取出死亡鸡胚,接种后第12 d取出全部鸡胚待检。

4.4 观察病变;非免疫鸡的鸡胚感染Van Roekel后出现特征性病变,早期为胸腹部肌肉、皮下水肿,当接种后10 d~12 d解剖活胚时,见腿肌萎缩、足趾卷曲,注意与接种、不接种

SPF 对照鸡胚对比观察。

5 结果判定

5.1 当接种SPF对照鸡胚均呈禽脑脊髓炎病毒所致的特异病变,不接种SPF对照鸡胚无特异病变时,试验结果可靠。

5.2 判定

阴性;100%鸡胚有特征性病变,表明此鸡群无禽脑脊髓炎病毒抗体,属非感染鸡群。

阳性:50%以下的鸡胚有特征性病变,表明此鸡群有禽脑脊髓炎病毒抗体,属感染鸡群。

SPF鸡 鸡白痢沙门氏菌检验

GB/T 17999.7—1999

1 范围

本标准规定了鸡白痢沙门氏菌检验所用试剂、材料,检验程序及结果判定等。
本标准适用于 SPF 鸡感染鸡白痢—鸡伤寒沙门氏菌后的细菌分离和鉴定。

2 原理

取待检样品(肠内容物、有关脏器匀浆)接种于增菌培养基中进行增菌,然后将培养物转移到选择、鉴别培养基上培养,挑选可疑菌落接种于营养琼脂培养基上,取培养物进行生化试验与血清学试验,以确定鸡白痢沙门氏菌与鸡沙门氏菌。

3 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 14926.1—1994 实验动物 沙门氏菌检验方法

GB 4789.4—1994 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验

4 材料和试剂

- 4.1 营养肉汤培养基按 GB 4789.4 执行。
- 4.2 改良亚硒酸氢钠增菌液(SF)按 GB/T 14926.1—1994 中 3.1 的规定执行。
- 4.3 DHL琼脂按 GB 4789.4—1994 中 3.19 的规定执行。
- 4.4 SS 琼脂按 GB 4789.4—1994 中 3.21 的规定执行。
- 4.5 亚硫酸铋琼脂(BS)按 GB 4789.4—1994 中 3.18 的规定执行。
- 4.6 三糖铁培养基(TSI)按 GB 4789.4—1994 中 3.24、3.25 的规定执行。
- 4.7 营养琼脂按 GB4789.4—1994 中 3.7 的规定执行。
- 4.8 半固体琼脂按 GB4789.4—1994 中 3.28 的规定执行。
- 4.9 糖发酵管按 GB4789.4—1994 中 2.2 的规定执行。
- 4.10 蛋白胨水按 GB4789.4—1994 中 2.13 的规定执行。
- 4.11 硝酸盐培养基按 GB4789.4—1994 中 2.17 的规定执行。
- 4.12 氧化酶试剂按 GB4789.4—1994 中 2.18 的规定执行。

4.13 氨基酸脱羧酶试验培养基按 GB4789.4—1994 中 2.21 的规定执行。

4.14 尿素培养基按 GB/T14926.1—1994 中 3.7.1 的规定执行。

4.15 革兰氏染色法按 GB4789.4—1994 中 1.2 的规定执行。

4.16 沙门氏菌诊断血清。

5 检验程序

检验程序见图 1。

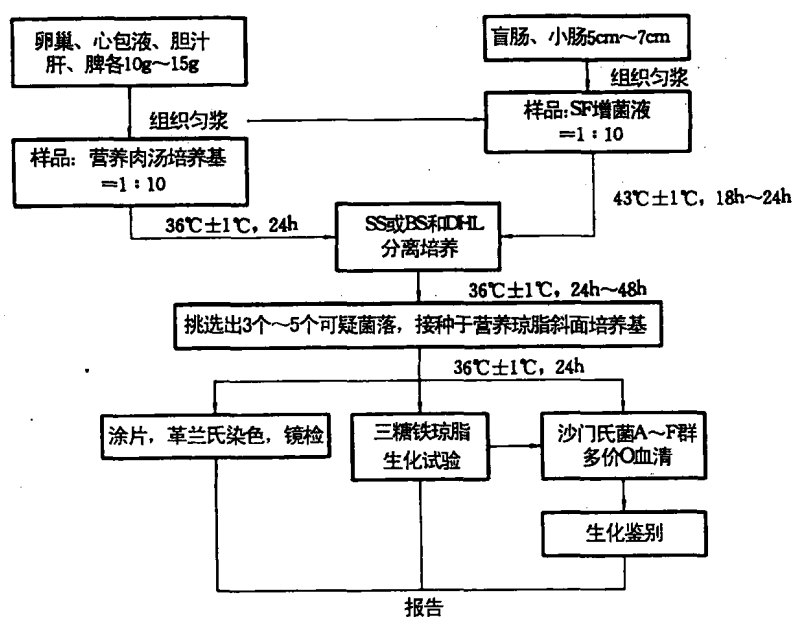


图 1 沙门氏菌检验程序

6 操作步骤

6.1 采样: 无菌采取有病变的卵巢、输卵管、睾丸、心包膜与心包液、胆汁、肝、脾以及小肠和盲肠。

6.2 将肝、脾、胆汁、心包膜、心包液、输卵管、睾丸混合样品, 放入灭菌乳钵或均浆器中研磨成匀浆, 加入少量营养肉汤稀释。取此匀浆 10 mL 接种到 100 mL SF 增菌液中, 另取匀浆 10 mL 接种到 100 mL 营养肉汤培养基中。采取的小肠与盲肠样品, 按上述方法制成匀浆, 取 10 mL 接种到 100 mL SF 增菌液中。分别将营养肉汤培养瓶置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, SF 增菌液培养瓶置 $43^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

6.3 分离培养: 用接种环取 6.2 培养物分别在 SS 或 BS 和 DHL 琼脂平板培养基上划线接种, 置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h。如果经 24 h~48 h 培养后未发现可疑菌落, 再取增菌培