ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 538—2015
代替 NY/T 538—2002

鸡传染性鼻炎诊断技术

Diagnostic techniques for infectious coryza of chickens

2015-10-09 发布 2015-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准提供了几种诊断鸡传染性鼻炎的方法以及抗体检测方法，应根据使用单位的具体情况选择使用。

本标准代替 NY/T 538—2002《鸡传染性鼻炎诊断技术》。与 NY/T 538—2002 相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

——删除了琼脂双向双扩散试验和阻断酶联免疫吸附试验(B-ELISA)两种方法(见 2002 年版的 6 和 8)；

——增加了临床诊断(见 2)；

——增加了血凝抑制试验(鉴定副鸡禽杆菌的血清型)(见 5)；

——增加了 B 型副鸡禽杆菌的血凝抑制抗体的检测(见 7.2.1)。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

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：北京市农林科学院畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人：孙惠玲、陈小玲、张培君、苗得园。

本标准的历次版本发布情况为：

——NY/T 538—2002。

学兔兔 www.xuetutu.com

引　言

鸡传染性鼻炎是由副鸡禽杆菌(*Avibacterium paragallinarum*，*A. paragallinarum*)引起的一种鸡急性上呼吸道传染病。本病在世界许多地方都有发生和流行，引起蛋鸡产蛋量下降，育成鸡生长发育受阻和淘汰率增加，肉鸡肉质下降，造成很大的经济损失。

Page 分型方法将副鸡禽杆菌分为 A、B、C 3 种血清型，我国从 1980 年起就有许多疑似本病的病例出现。到目前为止，3 种血清型引起的发病都有报道，它们具有共同抗原和各自的型特异性抗原，可以通过检测型特异性抗原来鉴定副鸡禽杆菌的血清型。另外，鸡传染性鼻炎商品化灭活疫苗的免疫接种十分广泛，应用血清学试验可以检出各型特异性抗体，用来评价疫苗的免疫效果。

近 10 年来，我国的鸡传染性鼻炎疫情又有了新的变化，主要表现在两个方面：一是目前我国鸡传染性鼻炎的流行特点发生了变化，除了前些年报道的 A 型、C 型副鸡禽杆菌之外，出现了 B 型副鸡禽杆菌的流行。二是原有标准在抗体的检测上提供了几种方法，但是在鉴定抗原方面提供的方法很局限，基本上没有提供能够鉴定血清型的诊断方法。为了适应我国标准化工作发展的需要，为鸡传染性鼻炎的诊断和防控提供技术依据和保障，有必要对 NY/T 538—2002 进行修订。

学兔兔 www.xuetutu.com

鸡传染性鼻炎诊断技术

1 范围

本标准规定了引起鸡传染性鼻炎的副鸡禽杆菌的诊断技术要求。

本标准中规定的临床诊断、细菌分离鉴定、聚合酶链式反应(PCR)技术适用于鸡传染性鼻炎的诊断，血凝抑制试验(鉴定副鸡禽杆菌的血清型)适用于鉴定菌株的血清型。血清平板凝集试验、血凝抑制试验(检测副鸡禽杆菌抗体)、间接酶联免疫吸附(ELISA)试验适用于流行病学调查和免疫鸡群抗体的检测。

2 临床诊断

鸡传染性鼻炎的一个特征是潜伏期短、发病迅速。最明显的症状是鼻腔有黏液性分泌物流出、面部水肿、结膜炎以及泪液分泌增多。公鸡有时可见肉垂肿胀。病鸡可出现腹泻、采食和饮水下降，蛋鸡产蛋下降。发病率高但死亡率低，死亡率可因其他病原继发感染或者混合感染而升高。

如果症状全部符合或者有部分符合，则可判为可疑，再进行如下的细菌分离鉴定。

3 细菌的分离鉴定

3.1 材料准备

3.1.1 无菌棉拭子、鲜血琼脂平板培养基、无菌鸡血清或牛血清、TSA(胰蛋白胨大豆琼脂，Tryptic Soya Agar)和 TSB(胰蛋白胨大豆肉汤，Tryptic Soya Broth)培养基。

3.1.2 产烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD，或还原型 NAD)表皮葡萄球菌。

3.2 操作程序

3.2.1 无菌打开可疑鸡的眶下窦，用灭菌棉拭子蘸取其中黏液或浆液。

3.2.2 用棉拭子在鲜血琼脂平板培养基上横向划线 5 条～7 条，然后用接种环取表皮葡萄球菌从横线中间划一纵线。

3.2.3 将划好的平皿置于 5%的 CO_2 培养箱中(37±1)℃培养 24 h～40 h。

3.2.4 观察菌落特点。

3.2.5 取菌落做过氧化氢酶试验，必要时通过进一步的生化反应做详细的特征鉴定。副鸡禽杆菌的生化反应特点、培养特性及过氧化氢酶试验方法见附录 A。

3.2.6 应用 PCR 方法鉴定可疑菌落，经 PCR 鉴定正确后，取可疑菌落纯培养物作为攻毒样品进行动物试验，方法见附录 B。

3.3 结果判定与表示方法

若鲜血琼脂培养基上出现"卫星样"生长的露珠状、针尖大小的小菌落，即靠近产 NAD 表皮葡萄球菌处菌落较大，直径可达 0.3 mm，离产 NAD 表皮葡萄球菌菌落越远，菌落越小，过氧化氢酶阴性，结果判为阳性，记为"+"；若无卫星现象，但有露珠状、针头大小的小菌落且过氧化氢酶阴性，则需要采用进一步 PCR 或者动物试验鉴定，以避免漏检不需要 NAD 的副鸡禽杆菌。若无上述现象，则判为阴性，记为"－"。

4 聚合酶链式反应(PCR)技术

4.1 材料准备

4.1.1 试验材料

生理盐水、去离子水、琼脂糖、TAE 电泳缓冲液、Goldview DNA 染料。阴性对照为灭菌去离子水、

学兔兔 www.xuetutu.com

阳性对照为副鸡禽杆菌菌株。

4.1.2 仪器及耗材

PCR 仪、微量加样器、小型高速离心机、电泳仪、水平电泳槽、紫外检测仪;1.5 mL 及 0.2 mL 小离心管、吸头。

4.2 操作程序

4.2.1 PCR 临床样品的采集

无菌打开可疑病鸡的眶下窦,用灭菌棉拭子蘸取其中黏液或者浆液,浸入含 0.8 mL～1.0 mL 生理盐水的 1.5 mL 离心管内,室温放置 0.5 h 后,将棉拭子在管壁上尽量挤干,然后弃至消毒液缸中。

4.2.2 PCR 临床样品的处理

将浸过棉拭子的离心管以 6 000×*g* 离心 10 min,小心弃去大部分上清液,保留 20 μL 左右液体(若样品中混有血液,可 800×*g* 离心 5 min,将红细胞沉淀至管底部,将上清液转至新管中,再 6 000×*g* 离心 10 min)。然后加入 20 μL 灭菌去离子水,压紧管盖,煮沸 10 min,再冰浴 10 min,6 000×*g* 离心 2 min,取出上清作为 PCR 样品,或者保存于－20℃。

4.2.3 PCR 菌落样品的制备

挑取平皿上的可疑菌落,加到含 20 μL 灭菌去离子水的 PCR 离心管中,压紧管盖,煮沸 10 min,再冰浴 10 min 后离心取上清作为 PCR 样品,或者保存于－20℃。

4.2.4 引物

上游引物:5′- TgA ggg TAg TCT TgC ACg CgA AT -3′;

下游引物:5′- CAA ggT ATC gAT CgT CTC TCT ACT -3′。

4.2.5 PCR 扩增

反应体系:2×buffer 12.5 μL,Taq(5 U/μL)0.5 μL,dNTP(2.5 mmol/L)2 μL,N1(10 μmol/L)0.5 μL,R1(10 μmol/L)0.5 μL,样品 4 μL,灭菌去离子水 5 μL,总体积为 25 μL。PCR 反应程序:第一阶段,94℃ 5 min;第二阶段,94℃ 45 s,56℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环;第三阶段,72℃ 延伸 10 min。

反应结束后 1% 琼脂糖凝胶检测,在凝胶成像系统上观察是否有目的条带出现。也可使用商品化的 PCR 混合试剂,按说明书操作,只需在 PCR 试剂中加入引物和被检样品。

4.3 结果判定

阳性对照样品出现一条 0.5 kb 的 DNA 条带,若阴性对照样品无此条带,被检样品出现与阳性对照同样大小的条带,则判为阳性。否则为阴性。如果阴、阳性对照结果不成立,则全部样品应该重做。结果判定参见附录 C。

5 血凝抑制试验(鉴定副鸡禽杆菌的血清型)

5.1 材料准备

5.1.1 副鸡禽杆菌标准 A 型、B 型、C 型分型血清及血凝抑制试验 A 型、B 型、C 型标准抗原。

5.1.2 KSCN/NaCl 溶液,PBS 和 PBSS 稀释液,制备方法见附录 D。

5.1.3 新鲜红细胞悬液及醛化红细胞(GA - RBC)悬液,制备方法见附录 E。

5.1.4 96 孔微量血凝板(V 型)、微量振荡器、微量加样器及吸头。

5.2 操作程序

5.2.1 被检抗原制备

从纯培养的平板上挑取菌落,接种 100 mL TSB 培养基,37℃ 培养 10 h～16 h,将 100 mL 培养物 8 000×*g* 离心 10 min,其沉淀用 PBS 离心洗涤 3 次,再用 20 mL～30 mL KSCN/NaCl 溶液悬浮,于 4℃ 持续搅拌 2 h,再 8 000×*g* 离心 10 min,其沉淀用 PBS 离心洗涤 3 次,然后用 5 mL PBS 悬浮,冰浴中超

学兔兔 www.xuetutu.com

声波 300 W 裂解 5 s,间隔 5 s,共裂解 15 min,再 8 000×g 离心 10 min,其沉淀用 2 mL PBS(含有 0.01% 硫柳汞)悬浮,即为血凝抑制试验所需抗原。用于血凝试验、血凝抑制试验或者−20℃保存备用。

5.2.2 本操作最好在室温 20℃~25℃范围内进行,如室温不在此范围内也可以置于 37℃温箱中。注意加盖盖子或者封口膜以防止液体蒸发。同时用 A 型、B 型、C 型分型血清对被检抗原进行以下操作,以全面检出各型菌的感染。

5.2.3 取洁净血凝板,将抗原用 PBSS 从 2 倍开始做 2 倍梯度稀释加入 1 列~11 列孔中(即第 1 列孔为 1∶2,第 2 列孔为 1∶4,依次类推至第 11 列孔),每孔最终液体量为 25 μL,第 12 列孔只加 25 μL PBSS作为醛化红细胞对照孔。

5.2.4 每孔再加 25 μL PBSS。

5.2.5 每孔加 PBSS 配置的 1%醛化红细胞悬液 25 μL。

5.2.6 充分振荡混合后,在室温(20℃~25℃)静置 40 min~60 min 或者 37℃静置 40 min,至对照孔(第 12 孔)红细胞完全下沉为准。

5.2.7 判定抗原的血凝价(HA 效价),即为使红细胞发生完全凝集的抗原最大稀释倍数。检测步骤及抗原的检测结果如表 1 所示(表中,用"−"表示完全不凝集或者部分红细胞凝集,指红细胞集中在孔底中央呈圆点状或者在孔底中央有红细胞集中呈圆点状,周围有红细胞平铺于孔底;用"+"表示红细胞完全凝集,指红细胞平铺于孔底)。

表 1 副鸡禽杆菌的血凝(HA)试验

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抗原滴度(log_2)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
PBSS,μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
抗原,μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/
												弃去 25
PBSS,μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1%醛化红细胞,μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
混合,20℃~25℃静置 40 min~60 min 或 37 ℃静置 40 min												
被检抗原[a]	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—

[a] 被检抗原血凝试验结果判定举例,该抗原的 HA 效价为 2^8(1∶256)。

5.2.8 根据被检抗原数量,加上 A 型、B 型、C 型对照抗原,用 PBSS 将 A 型、B 型、C 型分型血清做 1∶100 稀释,每个抗原样品需要 1∶100 稀释的各型血清 25 μL。(例如,有 3 个被检抗原,加上 A 型、B 型、C 型对照抗原,则需要 1∶100 稀释的各型血清 150 μL)。

5.2.9 取洁净血凝板,在第 1 列~第 10 列孔中加入 25 μL PBSS。第 11 列孔中加入 50 μL PBSS。

5.2.10 在第 1 列、第 4 列、第 7 列孔分别加入 1∶100 稀释的 A 型、B 型、C 型分型血清 25 μL,依次向后两孔做 2 倍梯度稀释(即第 1 列、第 4 列、第 7 列孔为 1∶200,第 2 列、第 5 列、第 8 列孔为 1∶400,第 3 列、第 6 列、第 9 列孔为 1∶800),每孔最终液体量为 25 μL。第 10 列加 PBSS、抗原作为抗原对照孔,第 11 列只加 PBSS 作为红细胞对照孔。

5.2.11 将抗原用 PBSS 稀释至 4 个 HA 效价单位(如 HA 效价为 1∶256,则抗原稀释至 1∶64 倍),每孔(除了第 11 列)中加入 25 μL。

5.2.12 充分振荡混合后,在室温静置 20 min~30 min 或 37℃静置 20 min。

5.2.13 每孔加 PBSS 配置的 1%醛化红细胞 25 μL。

5.2.14 充分振荡混合后,在室温静置 40 min~60 min 或者 37℃静置 40 min(至红细胞对照孔中红细胞完全下沉为准)。

5.3 HI 结果判定

能使红细胞发生完全凝集抑制的血清最高稀释度即为该型血清的 HI 效价,如果被检抗原与一个

学兔兔 www.xuetutu.com

以上型的阳性血清有凝集抑制，其与哪个型阳性血清的 HI 效价最高，则判定该抗原为这个血清型。检测步骤及 A 型、B 型、C 型抗原的检测结果如表 2 所示（表中，用“－”表示完全凝集抑制，指红细胞集中在孔底中央呈圆点状；用“＋”表示红细胞完全凝集或者部分红细胞凝集，指红细胞平铺于孔底或者在孔底中央有红细胞集中呈圆点状，周围有红细胞平铺于孔底）。

表 2　血凝抑制试验（鉴定副鸡禽杆菌的血清型）

孔号	Page A 型血清			Page B 型血清			Page C 型血清			抗原对照	醛化红细胞对照
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
血清稀释×	200	400	800	200	400	800	200	400	800		
PBSS，μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50
1∶100 血清，μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/
			弃去 25			弃去 25			弃去 25		
抗原[a]，μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/
混合，20℃～25℃ 静置 20 min～30 min 或 37℃静置 20 min											
1%醛化红细胞，μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
混合，20℃～25℃静置 60 min 或 37℃静置 40 min											
A 型抗原[b]	－	－	－	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	－
B 型抗原[c]	＋	＋	＋	－	－	－	＋	＋	＋	＋	－
C 型抗原[d]	－	＋	＋	－	－	＋	－	－	－	＋	－

[a] 为 4 个 HA 效价单位的抗原；[b,c,d]分别为 A 型、B 型、C 型标准抗原血凝抑制结果判定举例。

6　血清平板凝集试验

6.1　材料准备

6.1.1　鸡传染性鼻炎平板凝集试验抗原、阴、阳性对照血清，使用前与待检血清一起恢复至室温。

6.1.2　试验用玻板（也可用载玻片）、可调微量加样器一个、灭菌吸头若干、记号笔。

6.2　操作程序

6.2.1　本试验在室温（20℃～25℃）进行。

6.2.2　先在玻板背面写好编号，每个样品间至少留 20 mm 空隙，再在每个序号边加抗原 15 μL。

6.2.3　按玻板上的序号加对照或被检血清 15 μL，每个血清样品换一个吸头，将血清与抗原混匀，反应持续 3 min～5 min，在此时间内观察结果。每次试验均设阴、阳性对照。

6.2.4　在黑色背景或在灯下明亮处观察并记录结果。

6.3　结果判定

血清平板凝集试验判定标准如表 3 所示。

表 3　血清平板凝集试验判定标准

编号	反应表现	判定	记录符号	定性区分
1	有明显絮状或片状凝集片、液体清亮	强阳性	＋＋＋	＋
2	有大量针头样颗粒，量多，液体较清亮	阳性	＋＋	
3	针头样颗粒状，量较少，稍浑浊	弱阳性	＋	
4	液体无颗粒，均匀而混浊	阴性	－	－
注：出现 1 号、2 号、3 号反应者为阳性，出现 4 号反应者为阴性。				

7　血凝抑制试验（检测副鸡禽杆菌抗体）

7.1　材料准备

7.1.1　鸡传染性鼻炎血凝抑制试验抗原、阴、阳性对照血清，待检血清及生理盐水。

学兔兔 www.xuetutu.com

7.1.2 新鲜红细胞悬液及醛化红细胞(GA-RBC)悬液制备方法见附录 E。

7.1.3 96 孔微量血凝板(V 型)、微量振荡器、微量加样器及吸头若干。

7.2 操作程序

7.2.1 本操作最好在 20℃～25℃范围内进行，如室温不在此范围内也可以置于 37℃温箱中。注意加盖盖子或者封口膜以防止液体蒸发。同时用 A 型、B 型、C 型抗原分别对待检血清进行以下操作，以全面检出各型菌的感染(非免疫鸡群)或者根据需要选择型特异性抗原来评价免疫抗体水平(免疫鸡群)。

7.2.2 取洁净血凝板，将抗原用生理盐水从 2 倍开始做 2 倍梯度稀释加入 1 列～11 列孔中(即第一列孔为 1：2，第 2 列孔为 1：4，依次类推至第 11 列孔)，每孔最终液体量为 25 μL，第 12 列孔只加 25 μL 生理盐水作为醛化红细胞对照孔。

7.2.3 每孔再加 25 μL PBSS。

7.2.4 每孔加生理盐水配置的 1%醛化红细胞(A 型抗原可用新鲜红细胞)25 μL。

7.2.5 充分振荡混合后，在室温(20℃～25℃)静置 40 min～60 min 或者 37℃静置 40 min(至红细胞对照孔中红细胞完全下沉为准)。

7.2.6 判定抗原的血凝价(HA 效价)，即为使红细胞发生完全凝集的抗原最大稀释倍数。

7.2.7 待检血清及阴、阳性血清的吸收：将待检血清用 10%醛化红细胞做 1：5 稀释，室温下作用 4 h 然后 4℃过夜，中间充分振荡不少于 5 次，然后 1 500×g 离心 5 min，取上清即为 5 倍稀释的待检血清。

7.2.8 取洁净血凝板，从第 2 列孔开始，用生理盐水将每份被检血清及阴、阳性对照血清从 5 倍开始做 2 倍梯度稀释，每行测定一份血清，每孔最终液体量为 25 μL。

7.2.9 将抗原用生理盐水稀释至浓度为 4 个 HA 效价单位(如 HA 效价为 1：256，则抗原稀释至 1：64 倍)，每血清孔中加入 25 μL。

7.2.10 充分振荡，于室温下作用 20 min～30 min 或者 37℃静置 20 min。

7.2.11 每孔加入 1%醛化红细胞 25 μL(A 型抗原可用新鲜红细胞)。

7.2.12 充分振荡，于室温下作用 40 min～60 min 或者 37℃静置 40 min。

7.2.13 分别判定被检血清样品血凝抑制(HI)效价，即使红细胞发生完全凝集抑制的血清最高稀释度。

7.3 结果的判定

阴、阳性对照血清的结果应分别为阴性和阳性，阳性血清误差不超过 1 个滴度，试验有效。HI 效价≥5 的血清判为阳性。检测步骤及被检血清抗体的判定结果如表 4 所示(表中，用“－”表示完全凝集抑制，指红细胞集中在孔底中央呈圆点状；用“＋”表示红细胞完全凝集或者部分红细胞凝集，指红细胞平铺于孔底或者在孔底中央有红细胞集中呈圆点状，周围有红细胞平铺于孔底)。

表 4 血凝抑制试验(检测副鸡禽杆菌抗体)

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
抗体滴度	5	10	20	40	80	160	320	640	1 280	抗原对照	红细胞或醛化红细胞对照
生理盐水，μL		25	25	25	25	25	25	25	25	25	50
被检血清，μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/	/
									弃去 25		
抗原[a]，μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	/
1%红细胞或醛化红细胞，μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
混合，20℃～25℃静置 60 min 或 37℃静置 40 min											
被检血清[b]	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋	＋	－

[a] 4 个 HA 效价单位的抗原。
[b] 被检血清血凝抑制结果判定举例，该血清的 HI 效价为 1：320。

学兔兔 www.xuetutu.com

8 间接酶联免疫吸附试验(I-ELISA)

8.1 材料准备

8.1.1 鸡传染性鼻炎 ELISA 抗原,阴、阳性对照血清,羊抗鸡 IgG 辣根过氧化物酶标抗体。

8.1.2 洗涤液、包被液、底物液及终止液配方见附录 F。

8.1.3 稀释液:成分及配制方法同 8.1.2 中洗涤液。

8.1.4 ELISA 读数仪、微量加样器(单道及多道)、37℃恒温培养箱、酶标板、吸头。

8.2 操作程序

8.2.1 抗原包被:将抗原用包被液稀释至工作浓度,加入酶标板各孔中,每孔 100 μL,置 4℃冰箱过夜。

8.2.2 洗涤:甩净孔内抗原溶液,用洗涤液加满各孔,放置 5 min,然后甩净,重复 3 次。

8.2.3 加被检血清:用稀释液将被检血清做 1∶100 稀释,每孔加入 100 μL,每次操作均设置阴性对照孔 2 个,阳性对照、空白对照孔各 1 个。分别加入同样的阴、阳血清和稀释液各 100 μL,不同的血清样品要更换吸头,37℃温箱中作用 30 min。

8.2.4 洗涤:同 8.2.2。

8.2.5 加羊抗鸡 IgG 辣根过氧化物酶标抗体:用稀释液将羊抗鸡 IgG 辣根过氧化物酶标抗体稀释至工作浓度,每孔中加入 100 μL,37℃温箱中作用 30 min。

8.2.6 洗涤:同 8.2.2。

8.2.7 显色:加入底物液 100 μL,室温避光反应 10 min~15 min(至阴性对照孔开始产生颜色时)。

8.2.8 终止及读数:每孔加入终止液 50 μL 终止显色,然后用 ELISA 读数仪读取 OD492 的吸光值。

8.3 结果判定

将样品的 OD 值代入式(1)计算。

$$S/N = \text{被检血清样品 OD 值} / \text{阴性对照平均 OD 值} \quad \cdots\cdots (1)$$

若 S/N≥2 则结果为阳性,否则为阴性。

学兔兔 www.xuetutu.com

附　录　A
（规范性附录）
副鸡禽杆菌的过氧化氢酶试验及生化和培养特性

A.1　过氧化氢酶试验

A.1.1　原理

过氧化氢酶可把过氧化氢分解为水和氧：

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2\uparrow$$

A.1.2　方法

取 1 滴 3%过氧化氢，放在载玻片上，然后用接种环由固体培养基上取菌落 1 环，与玻片上过氧化氢混合，如有大量气泡者为阳性反应。

A.2　禽杆菌属生化和培养特性鉴定

表 A.1　禽杆菌属生化和培养特性鉴定表

特　性	副鸡禽杆菌 *A. paragallinarum*	鸡禽杆菌 *A. gallinarum*	沃尔安禽杆菌 *A. volantium*	禽禽杆菌 *A. avium*	A 种禽杆菌 *A.* sp. *A*
过氧化氢酶	−	+	+	+	+
空气中生长	V	−	+	+	+
ONPG	−	V	+	−	V
L-阿拉伯胶糖	−	−	−	−	+
D-半乳糖	−	+	+	+	+
麦芽糖	+	V	+	−	V
海藻糖	−	+	+	+	+
甘露醇	+	−	+	−	V
山梨醇	+	−	V	−	−
α-葡萄糖苷酶	−	+	+	+	+

注 1：所有菌为革兰氏阴性，副鸡禽杆菌、沃尔安禽杆菌、禽禽杆菌、A 种禽杆菌对 V 因子要求不定，鸡禽杆菌需要 X、V 因子。

注 2：V 为可变。

学兔兔 www.xuetutu.com

附 录 B
(规范性附录)
动 物 试 验

B.1 材料

生理盐水、1 mL 无菌注射器、离心管、棉拭子,以上材料均需灭菌处理。4 只 4 周龄以上的非免疫健康鸡或者无特定病原体(SPF)鸡。

B.2 操作程序

B.2.1 无菌打开可疑病鸡的眶下窦,用灭菌棉拭子尽量多蘸取其中黏液或者分泌物,然后将拭子浸入盛有 1 mL 生理盐水的离心管中,搅动挤压棉拭子,使其中的液体释放至盐水中,弃去棉拭子(消毒处理以避免污染),即获得临床病料液,将病料接种于培养皿中培养,挑取可疑菌落做成细菌悬液或者将菌落转接至 TSB 液体培养基培养后作为攻毒样品。

B.2.2 将上述攻毒样品经活菌计数后,用 1×10^{6} CFU/(0.2 mL·只)接种健康易感鸡或者 SPF 鸡眶下窦,并于接种后每日观察临床症状,直至一周。

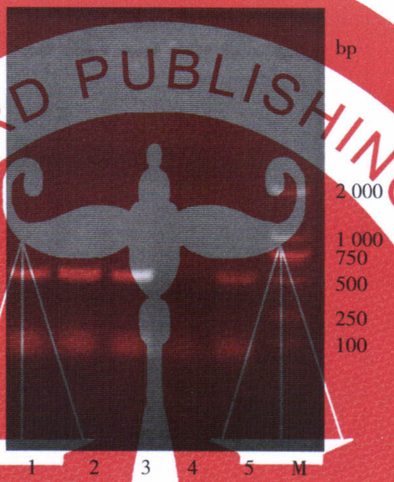
B.3 结果判定

若接种鸡出现典型的传染性鼻炎症状,判为阳性。若无传染性鼻炎症状,则判为阴性。一般阳性病料在接种 24 h~48 h 后可出现典型的传染性鼻炎症状,有时会延长至 72 h。

学兔兔 www.xuetutu.com

附 录 C
（资料性附录）
副鸡禽杆菌 PCR 检测结果电泳图

副鸡禽杆菌 PCR 检测结果电泳图见图 C.1。



说明：

1、2 ——临床样品；

3 ——阳性对照；

4 ——阴性对照；

5 ——菌落样品；

M——DL 2 000 DNA 分子量标准。

图 C.1 副鸡禽杆菌 PCR 检测结果电泳图

AGRICULTURAL STANDARD PUBLISHING RESEARCH CENTER

学兔兔 www.xuetutu.com

附 录 D
（规范性附录）
血凝抑制试验中所需溶液的制备

D.1 KSCN/NaCl 溶液

硫氰酸钾	48.59 g
氯化钠	24.84 g

加灭菌去离子水 900 mL 溶解，调 pH 至(6.3±0.1)，然后将溶液的体积用灭菌去离子水补足 1 000 mL。

D.2 PBS 0.01 mmol/L(pH 7.2)

氯化钠	8.00 g
氯化钾	0.20 g
磷酸二氢钾	0.20 g
磷酸氢二钠	2.89 g
硫柳汞	0.10 g

去离子水加至 1 000 mL，121℃ 20 min 灭菌，置 4℃冰箱保存备用。

D.3 明胶储存液(1 mg/mL)

明胶	10 mg
PBS	10 mL

D.4 PBSS 稀释液(含 0.1%BSA 和 0.001%明胶)

99 mL PBS 中加入 0.1 g BSA 和 1 mL 明胶储存液。

学兔兔 www.xuetutu.com

附 录 E
(规范性附录)
新鲜红细胞和醛化红细胞的制备

E.1 阿氏液

葡萄糖	20.50 g
柠檬酸钠	8.00 g
柠檬酸	0.55 g
氯化钠	4.20 g

去离子水加至 1 000 mL，115℃ 30 min 灭菌，置 4℃冰箱保存备用。

E.2 1%新鲜红细胞的制备

采健康非免疫鸡的红细胞与阿氏液 1∶1 混合，用生理盐水离心洗涤 5 次，每次 500×g，离心 10 min，取沉淀的红细胞，加入生理盐水配成 1%新鲜红细胞悬液。

E.3 10%醛化红细胞的制备

采健康非免疫鸡的红细胞与阿氏液 1∶1 混合，用生理盐水离心洗涤 5 次，每次 500×g，离心 10 min，将沉淀的红细胞吸起，用 0.2 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)配成红细胞悬液。按照 24∶1 加入戊二醛储存液(25%)迅速混合，置于 4℃持续搅拌 30 min～45 min，再用生理盐水离心洗涤 5 次，去离子水洗涤 5 次，每次 500×g，离心 10 min。最后一次将沉淀的红细胞用 PBS 配成 10%悬液，加入 0.01%硫柳汞置 4℃冰箱保存备用，一个月以内使用。

学兔兔 www.xuetutu.com

附 录 F
(规范性附录)
ELISA 常用溶液的配制

F.1 包被缓冲液(0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液)

无水碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g

去离子水加至 1 000 mL,调 pH 至(9.6±0.1),置 4℃冰箱保存备用。

F.2 洗涤缓冲液

氯化钠	8.00 g
磷酸二氢钾	0.20 g
磷酸氢二钠	2.90 g
氯化钾	0.20 g
吐温-20	0.5 mL

去离子水加至 1 000 mL,121℃ 20 min 灭菌,置 4℃冰箱保存备用。

F.3 底物缓冲液

磷酸氢二钠	18.40 g
柠檬酸	5.10 g

去离子水加至 1 000 mL,115℃ 30 min 灭菌,4℃保存备用。

用前每 100 mL 中加入 40 mg 邻苯二胺,溶解后加入 30%的双氧水 150 μL,混匀使用。

F.4 终止液(2 mol/L 硫酸溶液)

硫酸(95%~98%)	11.2 mL
去离子水	88.8 mL