SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0764—2011
代替 SN/T 0764—1999,SN/T 1109—2002,SN/T 1110—2002,SN/T 1686—2005

新城疫检疫技术规范

Quarantine protocol for newcastle disease

2011-05-20 发布　　2011-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　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 SN/T 0764—1999《出口家禽新城疫病毒检验方法》、SN/T 1686—2005《新城疫病毒中强毒株检测方法荧光 RT-PCR 法》、SN/T 1109—2002《新城疫微量红细胞凝集抑制试验操作规程》和 SN/T 1110—2002《新城疫病毒分离及鉴定方法》。

本标准与 SN/T 0764—1999、SN/T 1109—2002、SN/T 1110—2002 和 SN/T 1686—2005 相比，主要技术变化如下：

——增加了临床诊断；

——增加了反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)；

——删除了毒力测定的鸡胚平均致死时间(MDT)和静脉致病指数(IVPI)。

本标准修改采用 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2009 版)(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals)中第 2.3.14 章。

本标准与 OIE 第 2.3.14 章相比，主要技术差异如下：

——本标准完全采用了 OIE 规定的病原分离与鉴定、血凝和血凝抑制试验方法；

——本标准增加了 OIE 中提及但没有详细操作规程的反转录-聚合酶链反应、荧光反转录-聚合酶链反应的具体试验步骤；

——本标准删除了 OIE 中提及但没有详细操作步骤的酶联免疫吸附试验。

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。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：徐海聂、胡永强、罗宝正、谷强、张常印、薄清如、廖秀云、王云华、沙才华、管恩平、邱阳、朱广勤、王海艳。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——SN/T 0764—1999；

——SN/T 1109—2002；

——SN/T 1110—2002；

——SN/T 1686—2005。

新城疫检疫技术规范

1 范围

本标准规定了禽类新城疫的临床诊断、病毒分离与鉴定、血凝和血凝抑制试验、反转录-聚合酶链反应、荧光反转录-聚合酶链反应的操作规程。

本标准适用于进出口禽类及其产品中新城疫的检疫。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 临床诊断

3.1 发病症状

新城疫简介参见附录A。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

当禽出现以下肉眼可见的病变时，可作为初步诊断定性的依据之一：

a) 全身粘膜和浆膜出血，以呼吸道和消化道最为严重；

b) 腺胃粘膜水肿，乳头和乳头间有出血点；

c) 盲肠扁桃体肿大、出血、坏死；

d) 十二指肠和直肠粘膜出血，有的可见纤维素性坏死病变；

e) 脑膜充血和出血，鼻道、喉、气管粘膜充血、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 实验室诊断

4.1 病毒分离与鉴定

4.1.1 设备、材料和试剂

4.1.1.1 器材：生物安全柜、离心机、V型微量血凝板、微量可调移液器、恒温箱等。

4.1.1.2 抗生素：青霉素、链霉素、卡那霉素和制霉菌素等。

4.1.1.3 9日龄～11日龄SPF鸡胚、1日龄SPF雏鸡。

4.1.1.4 pH 7.0～7.4，0.01 mol/L等渗磷酸盐缓冲液(PBS)：配制方法见附录B。

4.1.1.5 0.2 mol/L磷酸氢二钠：配制方法见附录B。

4.1.1.6 阿氏液：红细胞保存液，配制方法见附录B。

4.1.1.7 1%鸡红细胞(RBCs)：配制方法见附录B。

4.1.1.8 拭子：脱脂棉球直径约0.4 cm，1.034×10^5 Pa高压蒸汽灭菌15 min。

4.1.1.9 新城疫病毒标准阳性血清和标准阴性血清：由指定单位提供。

4.1.2 样品采集和制备

4.1.2.1 活禽采集咽喉拭子和泄殖腔拭子(需带有可见粪便)，雏禽采集新鲜粪便。

4.1.2.2 死禽无菌采集肺、肾、肠(包括内容物)、脾、脑、肝、心组织和骨髓，采集咽喉拭子。这些样品可单独或者混合存放，但肠内容物需单独处理。

4.1.2.3 样品置于含抗生素的pH 7.0～7.4等渗磷酸盐缓冲液(PBS)，组织和咽喉拭子保存液中含青霉素(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、肠内容物和泄殖腔拭子保存液抗生素浓度应提高5倍。加入抗生素后用0.2 mol/L磷酸氢二钠调pH值到7.0～7.4。

4.1.2.4 粪便和搅碎的组织，用含抗生素的PBS制成10%～20%(质量浓度)的悬浮液，拭子浸入2 mL～3 mL含抗生素的PBS中，充分振荡。在4 ℃作用4 h或过夜，或室温(不超过25 ℃)作用1 h～2 h，或37 ℃作用30 min。拭子在反复挤压后弃去。

4.1.2.5 4 ℃ 3 000 r/min离心10 min，取上清液经0.22 μm滤膜过滤除菌。

4.1.2.6 采集或处理的样品在2 ℃～8 ℃条件下保存应不超过4 d，若需长期保存，应放置－70 ℃冰箱，但应避免反复冻融。采集的样品密封后，采用保温壶或保温桶加冰密封，尽快运送到实验室。

4.1.3 病毒分离培养

4.1.3.1 鸡胚接种

吸取除菌液经尿囊腔接种至少5枚9日龄～11日龄的SPF鸡胚，0.2 mL/枚，35 ℃～37 ℃孵育4 d～7 d。接种后每天检查鸡胚生长情况。

4.1.3.2 病毒收获

收集死胚、濒死鸡胚和培养结束时存活的鸡胚，置冰箱4 ℃致冷4 h～24 h，无菌采集尿囊液。

4.1.4 病毒鉴定

4.1.4.1 血凝试验(HA)

用HA检测尿囊液的血凝活性。HA呈阴性反应的尿囊液用另一批9日龄～11日龄的SPF鸡胚至少再传代一次，若HA结果仍为阴性，则判定新城疫病毒分离阴性。试验方法同4.2.3。

4.1.4.2 血凝抑制试验(HI)

HA呈阳性的尿囊液用新城疫病毒标准阳性血清进行HI试验，以确认是否有新城疫病毒的存在。试验方法同4.2.4。

4.1.5 脑内接种致病指数(*ICPI*)测定

4.1.5.1 HA 滴度高于 2^4(大于 1/16)的新鲜感染尿囊液(不超过 24 h～48 h,细菌检验为阴性),用等渗无菌盐水作 10 倍稀释,不加添加剂如抗生素。

4.1.5.2 脑内接种出壳 24 h～40 h 的 SPF 雏鸡,共接种 10 只,每只接种 0.05 mL。

4.1.5.3 每 24 h 观察一次,共观察 8 d。

4.1.5.4 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作 2)。

4.1.5.5 *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(1):

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

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。

ICPI 越大,新城疫病毒致病性越强,最强毒力病毒的 *ICPI* 将接近最大值 2.0,而弱毒株的 *ICPI* 近于 0。使用弱毒疫苗,分离株的 *ICPI* 值在 0.7 以上,可认为强毒力病毒感染。

4.2 血凝(HA)和血凝抑制试验(HI)

4.2.1 材料和试剂

4.2.1.1 器材:V 型微量血凝板、微量可调移液器等。

4.2.1.2 pH 7.0～7.2,0.01 mol/L 等渗磷酸盐缓冲液(PBS)。

4.2.1.3 1%鸡红细胞(RBCs)。

4.2.1.4 标准新城疫病毒抗原、阳性对照血清和阴性对照血清。

4.2.1.5 4 HAU 抗原:配制方法见附录 B。

4.2.2 样品采集和处理

4.2.2.1 新城疫病毒悬液:无菌收取鸡胚尿囊液。

4.2.2.2 鸡血清:无菌采取动物血液,凝固后分离血清,置于 4 ℃或－20 ℃保存备用。

4.2.2.3 除鸡外其他禽种的血清:需排除血清对鸡红细胞的非特异性凝集,处理方法为每 0.5 mL 血清加 25 μL 鸡红细胞泥,轻轻振荡,静置至少 30 min,澄清,2 000 r/min 离心 2 min～5 min,红细胞沉聚,吸出吸附过的血清供检。

4.2.3 血凝试验(HA)

4.2.3.1 在 V 型微量血凝板中每孔加 25 μL PBS。见表 1。

表 1　血凝试验操作术式　　单位为微升

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	对照
PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
抗原(倍比稀释)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	弃去25
PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1%鸡红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
作用时间及温度	室温(约20 ℃)下静置40 min左右											
判定举例	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	−	−

4.2.3.2　第 1 孔加入 25 μL 病毒悬液(如尿囊液),为精确计算血凝单位,病毒悬液开始可以作一系列密集稀释,如 1/3,1/5,1/7 等。

4.2.3.3　将病毒悬液或抗原在反应板上作 25 μL 的系列倍比稀释。第 12 孔不加病毒悬液或抗原,设立为红细胞对照孔。

4.2.3.4　每孔再加 25 μL PBS。

4.2.3.5　每孔加入 25 μL 1%RBCs。

4.2.3.6　轻叩微量血凝板混合反应物,室温(约 20 ℃)静置 40 min,或 4 ℃静置 60 min(若周围环境温度太高),在对照孔的 RBCs 显著呈钮扣状时判定结果。

4.2.3.7　HA 判定时,应将反应板倾斜,观察 RBCs 有无呈泪珠样流淌,完全凝集(无泪珠样流淌)的病毒最大稀释倍数为该抗原的血凝滴度,表示 1 个血凝单位(HAU),再根据开始的稀释倍数精确计算血凝滴度。

4.2.4　血凝抑制试验(HI)

4.2.4.1　在 V 型微量血凝板中每孔加入 25 μL PBS。见表 2。

表 2　血凝抑制试验操作术式　　单位为微升

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
血清稀释度(log_2)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
被检血清倍比稀释	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	弃去25
4HAU抗原	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
作用时间及温度	室温(约20 ℃)下静置至少30 min											
1%鸡红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
作用时间及温度	室温(约20 ℃)下静置至少40 min											
判定举例	−	−	−	−	−	−	+	++	+++	++++	++++	++++

4.2.4.2　第一孔加 25 μL 血清。

4.2.4.3　在血凝板上将血清作横向的 25 μL 的倍比稀释。

4.2.4.4　每孔加入 25 μL 4 HAU 抗原,室温下(20 ℃)静置不少于 30 min,4 ℃不少于 60 min。

4.2.4.5　每孔加入 25 μL 1%(体积分数)的 RBCs,轻晃混匀后,室温(约 20 ℃)静置约 40 min,如环境温度太高时,4 ℃放置约 60 min,当对照孔 RBCs 呈显著钮扣状时判定结果。

4.2.4.6 每次测定应设已知滴度的阳性血清、阴性血清和红细胞对照。

4.2.4.7 结果判定如下：

a) 红细胞均匀分散在孔底周围、倾斜血凝板时不流淌判为完全凝集，记作＋＋＋＋；75％凝集记作＋＋＋；50％凝集记作＋＋；25％凝集记作＋；红细胞集中在孔底中央呈圆点、倾斜血凝板时与对照孔(仅含 25 μL RBCs 和 50 μL PBS)RBCs 流淌相同的孔判定为不凝集或血凝抑制，记作－；

b) 完全抑制 4 HAU 抗原的最高血清稀释倍数为 HI 滴度；

c) 检查各种对照。阴性对照血清 HI 滴度不高于 1∶4(2^2 或 2 log2)，阳性对照血清 HI 滴度应在已知滴度的一个稀释度以内，红细胞对照无自凝现象，结果有效，试验成立；

d) 如果 1∶16(2^4 或 4 log2)稀释的血清或者高于这个稀释度的血清能抑制 4 HAU 的抗原，这种 HI 滴度被判为阳性。

4.2.4.8 在所有的确诊试验当中针对试验采用的 HAU 应设抗原滴度的追溯性测定。

4.3 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

4.3.1 主要仪器设备

4.3.1.1 PCR 仪。

4.3.1.2 凝胶电泳仪。

4.3.1.3 电泳仪。

4.3.1.4 紫外凝胶成像管理系统。

4.3.1.5 高速冷冻离心机。

4.3.1.6 微量可调移液器。

4.3.1.7 生物安全柜。

4.3.2 试剂

4.3.2.1 DEPC 水：配制方法见附录 B。

4.3.2.2 裂解液 Trizol：4 ℃保存。

4.3.2.3 三氯甲烷：－20 ℃预冷。

4.3.2.4 异丙醇：－20 ℃预冷。

4.3.2.5 75％乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制，－20 ℃预冷。

4.3.2.6 0.01 mol/L(pH 7.2)PBS：1.034×10^5 Pa，15 min 高压灭菌冷却后，无菌条件下加入青霉素、链霉素各 10 000 IU/mL。

4.3.2.7 反转录和 PCR 10×缓冲液。

4.3.2.8 AMV 反转录酶(5 U/μL)：－20 ℃保存，不要反复冻融或温度剧烈变化。

4.3.2.9 RNA 酶抑制剂(40 U/μL)：－20 ℃保存，不要反复冻融或温度剧烈变化。

4.3.2.10 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)：－20 ℃保存，不要反复冻融或温度剧烈变化。

4.3.2.11 dNTPs：含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmoL/L。

4.3.2.12 氯化镁(25 mmol/L)。

4.3.2.13 电泳缓冲液(5×TBE 贮存液)：配制方法见附录 B。

4.3.2.14 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)：配制方法见附录 B。

4.3.2.15 1.5％琼脂糖凝胶：配制方法见附录 B。

4.3.2.16 DNA 相对分子质量标准物 Marker：DL 2 000。

4.3.2.17 上样缓冲液。

4.3.2.18 引物(Primer):10 μmoL/L。根据F基因序列设计,扩增产物长度为535 bp。

上游引物P1 5'-ATGGGCYCCAGAYCTTCTAC-3'

下游引物P2 5'-CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC-3'

4.3.3 样品的采集与前处理

4.3.3.1 活禽和内脏组织:见4.1.2。

4.3.3.2 血清或血浆:用无菌注射器直接吸取至无菌离心管中。

4.3.4 试验步骤

4.3.4.1 样品核酸的提取

4.3.4.1.1 在样品处理区,取 n 个1.5 mL灭菌离心管,其中 n 为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和,对每个管进行编号标记。

4.3.4.1.2 每管加入600 μL裂解液,然后分别加入待测样品、阴性对照和阳性对照各200 μL,一份样品换用一个吸头。再加入200 μL三氯甲烷,混匀器上振荡混匀20 s,室温静置10 min。于4 ℃条件下,12 000 r/min离心15 min。

4.3.4.1.3 取与4.3.4.1.1中相同数量的1.5 mL灭菌离心管,加入500 μL异丙醇(−20 ℃预冷),对每个管进行编号。吸取4.3.4.1.2离心后各管中的上清液转移至相应的管中,上清液至少吸取500 μL,注意不要吸出中间层,颠倒混匀。

4.3.4.1.4 于4 ℃条件下,12 000 r/min离心15 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干。加入600 μL 75%乙醇,颠倒洗涤。

4.3.4.1.5 于4 ℃条件下,12 000 r/min离心10 min(离心管开口保持朝离心机转轴方向放置)。轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干。

4.3.4.1.6 4 000 r/min离心10 s,将管壁上的残余液体甩到管底部,用微量加样器尽量将其吸干,一份样品换用一个吸头,吸头不要碰到有沉淀一面,室温干燥约3 min。不宜过于干燥,以免RNA不溶。

4.3.4.1.7 加入20 μL DEPC水,轻轻混匀,溶解管壁上的RNA,2 000 r/min离心5 s,冰上保存备用。提取的RNA应在2 h内进行RT-PCR扩增或保存于−70 ℃冰箱,将核酸转移至反应混合物配制区。

4.3.4.2 RT-PCR扩增

以下操作应在反应混合物配制区的冰盒上进行,按表3配制RT-PCR反应体系。试验过程中要设立阳性对照、阴性对照和空白对照。建议配制检测样品总数所需反应液,可以多配一个样品使用量。

表3 PT-PCR反应体系配置表

组　　分	用量 μL
10×缓冲液	2.5
dNTPs	2
AMV反转录酶	0.7
RNA酶抑制剂	0.5
Taq DNA聚合酶	0.7
上游引物P1	1

表 3（续）

组　　分	用量 μL
下游引物 P2	1
模板 RNA	3
DEPC 水	13.6
总体积	25

将以上反应体系瞬时离心充分混匀后，置 PCR 仪内运行下列程序：

——42 ℃ 45 min，1 个循环；

——95 ℃ 3 min，1 个循环；

——94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，30 个循环；

——72 ℃ 7 min，1 个循环；

——PCR 产物置 4 ℃保存。

4.3.4.3 PCR 产物电泳

制备 1.5％琼脂糖凝胶板，取 5 μL PCR 产物和 0.5 μL 上样缓冲液混匀，加入凝胶板加样孔，同时加 Marker、阴性对照和阳性对照。5 V/cm 电压电泳 30 min～40 min。紫外凝胶成像管理系统内观察结果、照像。

4.3.5 结果及判定

4.3.5.1 阳性对照出现 535 bp 目的条带，阴性对照和空白对照均未出现目的条带，试验成立。

4.3.5.2 被检样品出现 535 bp 目的条带，判为阳性。

4.3.5.3 被检样品未出现 535 bp 目的条带，判为阴性。

4.3.5.4 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。

4.4 实时荧光反转录-聚合酶链反应（荧光 RT-PCR）

4.4.1 试剂和仪器

4.4.1.1 试剂

4.4.1.1.1 新城疫病毒荧光 RT-PCR 检测试剂盒：试剂盒的组成、说明及使用注意事项参见附录 C。

4.4.1.1.2 其他试剂见 4.3.2.1～4.3.2.6。

4.4.1.2 主要仪器设备

4.4.1.2.1 荧光 PCR 仪。

4.4.1.2.2 其他仪器设备见 4.3.1.5～4.3.1.7。

4.4.2 样品的采集与前处理

见 4.3.3。

4.4.3 试验步骤

4.4.3.1 样品核酸的提取

见 4.3.4.1。

4.4.3.2 扩增试剂准备与配制

在反应混合物配制区进行。

从试剂盒中取出 NDVRT-PCR 反应液，在室温下融化后，2 000 r/min 离心 5 s。设所需 PCR 反应数为 n，其中 n 为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和。每个测试反应体系需使用15 μL RT-PCR 反应液及 0.25 μL *Taq* DNA 聚合酶。计算各试剂的使用量，加入一适当体系试管中，向其中加入 $1/4\times n$ 颗 RT-PCR 酶颗粒，充分混合均匀，向每个反应管中各分装 15 μL，转移至样品处理区。

4.4.3.3 加样

在样品处理区进行。在各反应管中分别加入 4.3.4.1.7 中制备的 RNA 溶液 10 μL，使总体积达 25 μL。盖紧管盖后，500 r/min 离心 30 s。

4.4.3.4 荧光 RT-PCR 反应

在检测区进行。将 4.4.3.3 中加样后的反应管放入荧光 PCR 仪内，记录样品摆放顺序。反应参数设置：

——反转录 42 ℃ 30 min；

——预变性 92 ℃ 3 min；

——92 ℃ 10 s，45 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，5 个循环；

——92 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，40 个循环，荧光收集设置在第四阶段每次循环的退火延伸时进行。

注：不同的荧光 PT-PCR 检测试剂可以选择不同的反应条件。

4.4.4 结果判定

4.4.4.1 结果分析条件设定

读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点，不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

4.4.4.2 质控标准

4.4.4.2.1 阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线。

4.4.4.2.2 阳性对照的 Ct 值应≤30.0，并出现特定的扩增曲线。

4.4.4.2.3 如阴性对照和阳性对照不同时满足以上条件，此次实验视为无效。

4.4.4.3 结果描述及判定

4.4.4.3.1 阴性

无 Ct 值并且无扩增曲线，表明样品中无中强毒株新城疫病毒。

4.4.4.3.2 阳性

Ct 值≤30.0，且出现特定的扩增曲线，表示样品中存在中强毒株新城疫病毒。

5 综合判定

5.1 临床诊断符合第3章规定的临床症状和病理变化，按4.1进行病毒分离与鉴定结果为新城疫病毒阳性且 $ICPI \geqslant 0.7$，诊断为新城疫。

5.2 临床诊断符合第3章规定的临床症状和病理变化，按4.3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。

5.3 临床诊断符合第3章规定的临床症状和病理变化，按4.4进行荧光RT-PCR检测结果呈阳性，诊断为新城疫。

5.4 患禽没有明显的临床症状和病理变化，但病原检测符合5.1或5.2或5.3，可判定为新城疫病毒感染。

附 录 A
（资料性附录）
新城疫简介

A.1 新城疫（ND）是由副黏病毒科禽腮腺炎病毒属的禽副黏病毒Ⅰ型（APMV-1）引起的一种急性、热性、败血性和高度接触性传染疾病，主要侵害鸡和火鸡，其他禽类和人亦可受到病毒感染。新城疫一年四季均可发生，但以春秋季较多。鸡场内的鸡一旦发生本病，可于 4 d～5 d 内波及全群。本病特征是高热、呼吸困难、下痢和出现神经症状。新城疫病毒粒子呈圆形，大小为 120 nm～300 nm，多数在180 nm左右，大部分呈蝌蚪状，有囊膜和纤突。核衣壳呈螺旋对称，基因组为不分节段的单股负链 RNA。

A.2 病禽是本病主要传染源，鸡在感染后的 24 h，口、鼻分泌物和粪便中开始排出病毒，在流行间歇期的带毒鸡，也是本病的传染源。鸟类也是重要的传播者。NDV 可经消化道或呼吸道，也可经眼结膜、受伤的皮肤和泄殖腔黏膜侵入机体，24 h 内很快在侵入部位繁殖，随后进入血液扩散道全身，引起病毒血症。新城疫的潜伏期为 2 d～15 d 或更长，平均为 5 d～6 d。临床症状受病毒毒株的致病型的影响，OIE根据在感染鸡所引起的临床症状将 NDV 的毒株分 5 个致病型，它们是：

——嗜内脏速发型：高致病型，常见肠出血性病变；

——嗜神经速发型：高死亡率，常有呼吸和神经症状；

——中等速发型：有呼吸症状，偶有神经症状，但死亡率低；

——温和型或呼吸型：症状温和或呈亚临床呼吸道感染；

——无症状肠型：常为亚临床性肠感染。

A.3 病型界限很难划分，甚至在感染的无特定病原（SPF）鸡上也可以看到若干型的症状。此外，当其他的病原微生物混合感染或环境恶化时，温和株也可引起明显的临床症状。由于鸡的临床症状差别很大，不同宿主对感染的反应也不一样，因此根据流行病学、临床症状和剖检变化进行综合分析判断只能作出初步诊断，确诊需要通过实验室方法。

附 录 B
（规范性附录）
试剂配制

B.1 pH 7.0～7.4，0.01 mol/L PBS

甲液（0.2 mol/L 磷酸氢二钠）：磷酸氢二钠（$12H_2O$）71.64 g，氯化钠 8.5 g，加蒸馏水至 1 000 mL。

乙液（0.2 mol/L 磷酸二氢钠）：磷酸二氢钠（$2H_2O$）31.21 g，氯化钠 8.5 g，加蒸馏水至 1 000 mL。

按表 B.1 混合甲液和乙液，用 0.85%氯化钠溶液 20 倍稀释，1.034×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 15 min，置室温或 4 ℃保存。

表 B.1 pH 7.0～7.4，0.01 mol/L PBS 配制

pH	甲液 mL	乙液 mL
7.0	61.0	39.0
7.2	72.0	28.0
7.4	81.0	19.0

B.2 阿氏液

葡萄糖	2.05 g
柠檬酸钠（$2H_2O$）	0.80 g
氯化钠	0.42 g
蒸馏水	加至 100 mL

溶解后，以 10%柠檬酸调节 pH 至 6.1，分装，1.034×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 10 min，4 ℃保存。

B.3 1%鸡红细胞

采集 SPF 鸡或无禽流感、新城疫等血凝抑制抗体的成年鸡抗凝血，放入等量阿氏液中摇匀，置 4 ℃冰箱中保存备用。临用前用 PBS 洗涤 3 次～5 次，每次以 2 000 r/min 离心 5 min，将血浆、白细胞充分洗去至上清液清亮，用 PBS 配成体积分数为 1%的悬液。4 ℃保存备用。

B.4 4HAU 标准新城疫病毒抗原

根据抗原的血凝滴度，计算 4HAU 抗原的稀释倍数。例如表 1 抗原 HA 滴度为 2^7（1∶128），其 4 个单位抗原 HA 滴度为 2^5（1∶32），则将抗原稀释 32 倍。

将 25 μL 4HAU 的抗原用 PBS 做等量倍比稀释，使各孔（25 μL）依次含有 2、1、1/2、1/4HAU，每孔补加 PBS 25 μL，再加入 1%鸡红细胞 25 μL，反应约 40 min，检查血凝图像与预期结果是否相符。2HAU、1HAU 孔红细胞应出现完全凝集，1/2HAU 孔红细胞应出现 50%凝集，1/4HAU 孔红细胞应

不凝集。若与此不符，应重新配制抗原，测定 HA 滴度。

B.5 电泳缓冲液(5×TBE 贮存液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	20 mL
二蒸水定容至	1 000 mL

充分溶解，4 ℃保存。

B.6 1×TBE 使用液

用三蒸水 5 倍稀释 5×TBE 贮存液。

B.7 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)

溴化乙锭	1 g
三蒸水	100 mL

置棕色瓶中，磁力搅拌数小时以确保其完全溶解，然后用铝箔包裹容器，保存于室温。

本品为强致癌物，使用时需小心！

B.8 DEPC 水

于三蒸水按 0.1%加入 DEPC，室温静置过夜，1.034×10^5 Pa 高压 20 min，冷却备用。

B.9 1.5%琼脂糖凝胶

在 250 mL 三角烧瓶中加入电泳级琼脂糖 1.5 g 和 1×TBE 缓冲液 100 mL。加热使之完全溶解后，加入 10 mg/mL 溴化乙锭溶液 5 μL，充分摇匀，备用。待琼脂糖冷却到 60 ℃左右，倒入制胶板并防止气泡产生，使琼脂糖厚度达 3 mm～5 mm，待凝胶完全凝固后去掉梳子和两端封口物，将凝胶托盘放入电泳槽，加入 1×TBE 电泳缓冲液使之高出凝胶 2 mm～3 mm。

附 录 C
（资料性附录）
中强毒株新城疫病毒荧光 RT-PCR 试剂盒组成、说明及使用时的注意事项

C.1 试剂盒的组成

表 C.1 试剂盒组成

组成(48 tests/盒)	数量
裂解液	30 mL×1 盒
中强毒株新城疫病毒荧光 RT-PCR 反应液	750 μL×1 管
RT-PCR 酶颗粒(带盖 PCR 反应管装)	1 颗/管×12 管
Taq 酶(5 U/ul)	12 μL×1 管
DEPC 水	1 mL×1 管
阴性对照	1 mL×1 管
阳性对照(非感染体外转录 RNA)	1 mL×1 管

C.2 说明

C.2.1 裂解液的主要成分为异硫氰酸胍和酚，为 RNA 提取试剂，外观为红色，于 4 ℃保存。

C.2.2 DEPC 水，是用 1%DEPC 处理后的去离子水，用于溶解 RNA。

C.2.3 RT-PCR 反应液中含有特异性引物、探针及各种离子。

C.3 使用时的注意事项

C.3.1 由于阳性样品中模板浓度相对较高，检测过程中不得交叉污染。

C.3.2 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。

C.3.3 RT-PCR 酶颗粒极易吸潮失活，RT-PCR 酶在室温条件下应置于干燥器内保存，使用时取出所需数量，剩余部分立即放回干燥器中。

C.3.4 除裂解液外，其他试剂－20 ℃保存。有效期为 6 个月。

C.4 其他

通过验证的其他商品化试剂盒，可以按照其相应使用说明书进行操作。