



中华人民共和国国家标准

GB/T 18936—2003

高致病性禽流感诊断技术

Diagnostic techniques for highly pathogenic avian influenza

2003-01-10 发布

2003-05-01 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

高致病性禽流感(highly pathogenic avian influenza,简称 HPAI)是由正黏病毒科流感病毒属中的 A 型流感病毒引起的,被世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health (英),Office International des Epizooties (法),OIE]列为 A 类疾病,我国将其列为一类动物疫病。

本标准是参考 OIE《诊断试验和疫苗标准手册》(2000 年版),并结合我国现有动物卫生法规及农业部对禽流感的相关政策和措施制定的。

本标准的附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F 为规范性附录,附录 A 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归口。

本标准起草单位:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准起草人:唐秀英、李海燕、田国斌。

高致病性禽流感诊断技术

1 范围

本标准规定了高致病性禽流感(HPAI)病毒分离与鉴定技术、血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验、琼脂凝胶免疫扩散(AGID)试验、酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)的技术要求。

本标准所规定的高致病性禽流感病毒分离与鉴定技术适用于各种禽类高致病性禽流感的病原分离和鉴定;AGID 和间接 ELISA 适用于 A 型禽流感病毒的型特异性检验;HA-HI 试验适用于禽流感病毒的血凝素亚型鉴定。

2 病毒分离和鉴定技术

2.1 材料准备

2.1.1 病料的采集:死禽采集气管、脾、肺、肝、肾和脑等组织样品,进行分别处理或者同时处理;活禽病料应包括气管或泄殖腔拭子,尤其是以采集气管拭子更好;小珍禽用拭子取样易造成损伤,可采集新鲜粪便。

2.1.2 病料的保存:病料应放在含有抗菌素的 pH 值 7.0~7.4 的等渗磷酸盐缓冲液(PBS)内(无 PBS 可用 25%~50%的甘油盐水)。抗生素的选择视当地情况而定,组织和气管拭子悬液中应含有青霉素(2 000 IU/mL)、链霉素(2 mg/mL)、庆大霉素(50 μ g/mL)和制霉菌素(1 000 IU/mL),但粪便和泄殖腔拭子所有的抗生素浓度应提高 5 倍,加入抗生素后 pH 值应调至 7.0~7.4。在室温放置 1 h~2 h 后样品应尽快处理,没有条件的可在 4℃存放几天,也可于低温条件下保存(-70℃贮存最好)。

2.1.3 病料的处理:将棉拭子充分捻动、拧干后弃去拭子;粪便、研碎的组织用含抗生素的 pH 值 7.0~7.4 的等渗 PBS 溶液配成 10%~20%(g/mL)的悬液。样品液经 1 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为接种材料。

2.2 病毒分离

2.2.1 样品接种:取处理好的样品,以 0.2 mL/胚的量经尿囊腔途径接种 9 日龄~11 日龄 SPF 鸡胚,每个样品接种 5 个胚,于 35℃~37℃孵化箱内孵育,18 h 后每 8 h 观察鸡胚死亡情况。

2.2.2 病毒收获:无菌收取 18 h 以后的死胚及 96 h 仍存活鸡胚的鸡胚尿囊液,测血凝活性,阳性反应说明可能有正黏病毒科的流感病毒;若无血凝活性或血凝价很低,则用尿囊液继续传 2 代,若仍阴性,则认为病毒分离阴性。

2.3 病毒鉴定

2.3.1 A 型流感病毒的型特异性鉴定:样品接种鸡胚后,若鸡胚尿囊液具有血凝活性,可用具有血凝活性鸡胚的绒毛尿囊膜(CAM)制成抗原,与 A 型禽流感病毒标准阳性血清进行 AGID 试验,检测样品中是否含有 A 型流感病毒。

2.3.1.1 抗原制备:从具有血凝活性的鸡胚中取出绒毛尿囊膜,用 pH7.2 的 PBS 冲洗后,将 CAM 用研磨器磨碎。磨碎的抗原反复冻融 3 次~4 次,以 1 000 r/min 离心 10 min 后取上清,按终浓度为 0.1%的量加入甲醛溶液。置 37℃温箱灭活 36 h 做灭活检验后即可作为 AGID 试验用抗原,用禽流感标准阳性血清进行型特异性鉴定,若被检样品与标准阳性血清之间出现清晰的沉淀线即可判定样品中含有 A 型禽流感病毒。

2.3.1.2 AGID 试验方法:按本标准第 4 章中的方法进行。

2.3.2 血凝素亚型鉴定:当鸡胚尿囊液具有血凝活性时,首先应排除血凝活性是否由新城疫、减蛋综合征等病毒引起,同时要注意是否有禽流感病毒与其他病毒混合感染。鸡胚尿囊液具有血凝活性或证明

含有 A 型流感病毒存在后,采用 HA-HI 试验方法(按本标第 3 章中的方法进行),用禽流感病毒 15 种血凝素(H1~H15)亚型分型血清对样品进行病毒亚型鉴定。血凝素亚型鉴定要求有全套的禽流感病毒血凝素分型血清,一般在国家指定的实验室进行。

2.4 致病性测定

禽流感病毒致病性测定应在具有高度生物安全性的实验室中进行,有以下两种方法,任选其一。

2.4.1 静脉接种致病指数(IVPI)测定法

2.4.1.1 试验鸡:6 周龄 SPF 鸡,10 只。

2.4.1.2 接种材料:感染鸡胚的尿囊液,血凝价在 $4 \log_2$ 以上,未混有任何细菌和其他病毒。

2.4.1.3 接种方法:将感染鸡胚尿囊液用生理盐水 1:10 稀释,以 0.1 mL/羽的剂量翅静脉接种。

2.4.1.4 每日观察每只鸡的发病及死亡情况,连续观察 10 d,计算 IVPI 值。计算方法参见附录 A。

2.4.1.5 判定标准:当 IVPI 值大于 1.2 时,判定此分离株为高致病性禽流感(HPAI)病毒株。

2.4.2 致死比例测定法

2.4.2.1 试验鸡

4 周龄~8 周龄 SPF 鸡,8 只。

2.4.2.2 接种材料

感染鸡胚的尿囊液,血凝价在 $4 \log_2$ 以上,未混有任何细菌和其他病毒。

2.4.2.3 接种方法

将感染鸡胚尿囊液用生理盐水 1:10 稀释,以 0.2 mL/羽的剂量翅静脉接种。每日观察鸡的死亡情况,连续观察 10 d。

2.4.2.4 判定方法

2.4.2.4.1 接种 10 d 内,能导致 6 只~7 只或 8 只鸡死亡,判定该毒株为高致病性禽流感病毒株。

2.4.2.4.2 分离物能使 1 只~5 只鸡致死,但病毒不是 H5 或 H7 亚型,则应进行下列试验:将病毒接种于细胞培养物上,观察其在胰蛋白酶缺乏时是否引起细胞病变或形成蚀斑。如果病毒不能在细胞上生长,则分离物应被考虑为非高致病性禽流感病毒。

2.4.2.4.3 对低致病性的所有 H5 或 H7 毒株和其他病毒,在缺乏胰蛋白酶的细胞上能够生长时,则应进行与血凝素有关的肽链的氨基酸序列分析,如果分析结果同其他高致病性流感病毒相似,这种被检验的分离物应被考虑为高致病性禽流感病毒。

3 血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验技术

3.1 材料准备

3.1.1 96 孔 V 型微量反应板,微量移液器(配有滴头)。

3.1.2 阿氏(Alsevers)液、鸡红细胞悬液,配制方法见附录 B。

3.1.3 pH7.2、0.01 mol/L PBS。

3.1.4 高致病性禽流感病毒血凝素分型抗原和标准分型血清以及阴性血清。

3.2 操作方法

3.2.1 血凝(HA)试验(微量法)

3.2.1.1 在微量反应板的 1 孔~12 孔均加入 0.025 mL PBS,换滴头。

3.2.1.2 吸取 0.025 mL 病毒悬液(如感染性鸡胚尿囊液)加入第 1 孔,混匀。

3.2.1.3 从第 1 孔吸取 0.025 mL 病毒液加入第 2 孔,混匀后吸取 0.025 mL 加入第 3 孔,如此进行对倍稀释至第 11 孔,从第 11 孔吸取 0.025 mL 弃之,换滴头。

3.2.1.4 每孔再加入 0.025 mL PBS。

3.2.1.5 每孔均加入 0.025 mL 体积分数为 1% 鸡红细胞悬液(将鸡红细胞悬液充分摇匀后加入)见附录 B。

3.2.1.6 振荡混匀,在室温(20℃~25℃)下静置 40 min 后观察结果(如果环境温度太高,可置 4℃ 环境下)。对照孔红细胞将成明显的钮扣状沉到孔底。

3.2.1.7 结果判定:将板倾斜,观察红细胞有无呈泪滴状流淌。完全血凝(不流淌)的抗原或病毒最高稀释倍数代表一个血凝单位(HAU)。

3.2.2 血凝抑制(HI)试验(微量法)

3.2.2.1 根据 3.2.1 试验结果配制 4HAU 的病毒抗原。以完全血凝的病毒最高稀释倍数作为终点,终点稀释倍数除以 4 即为含 4HAU 的抗原的稀释倍数。例如,如果血凝的终点滴度为 1:256,则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1:64(256 除以 4)。

3.2.2.2 在微量反应板的 1 孔~11 孔加入 0.025 mL PBS,第 12 孔加入 0.05 mL PBS。

3.2.2.3 吸取 0.025 mL 血清加入第 1 孔内,充分混匀后吸 0.025 mL 于第 2 孔,依次对倍稀释至第 10 孔,从第 10 孔吸取 0.025 mL 弃去。

3.2.2.4 1 孔~11 孔均加入含 4HAU 混匀的病毒抗原液 0.025 mL,室温(约 20℃)静置至少 30 min。

3.2.2.5 每孔加入 0.025 mL 体积分数为 1% 的鸡红细胞悬液混匀,轻轻混匀,静置约 40 min(室温约 20℃,若环境温度太高可置 4℃ 条件下进行),对照红细胞将呈显钮扣状沉于孔底。

3.3 结果判定

以完全抑制 4 个 HAU 抗原的血清最高稀释倍数作为 HI 滴度。

只有阴性对照孔血清滴度不大于 $2 \log_2$,阳性对照孔血清误差不超过 1 个滴度,试验结果才有效。HI 价小于或等于 $3 \log_2$ 判定 HI 试验阴性;HI 价等于 $4 \log_2$ 为可疑,需重复试验;HI 价大于或等于 $5 \log_2$ 为阳性。

4 琼脂凝胶免疫扩散(AGID)试验

4.1 材料准备

4.1.1 硫柳汞溶液、pH7.2、0.01 mol/L PBS 溶液,配制方法见附录 C。

4.1.2 琼脂板:制备方法见附录 D。

4.1.3 禽流感琼脂凝胶免疫扩散抗原、标准阴性和阳性血清。

4.2 操作方法

4.2.1 打孔:在制备的琼脂板上按 7 孔一组的梅花形打孔(中间 1 孔,周围 6 孔),孔径约 5 mm,孔距 2 mm~5 mm,将孔中的琼脂用 8 号针头斜面向上从右侧边缘插入,轻轻向左侧方向将琼脂挑出,勿伤边缘或使琼脂层脱离皿底。

4.2.2 封底:用酒精灯轻烤平皿底部至琼脂刚刚要溶化为止,封闭孔的底部,以防侧漏。

4.2.3 加样:用微量移液器或带有 6~7 号针头的 0.25 mL 注射器,吸取抗原悬液滴入中间孔(图 1 的⑦号),标准阳性血清分别加入外周的①和④孔中,被检血清按编号顺序分别加入另外 4 个外周孔(图 1 的②,③,⑤,⑥号孔)。每孔均以加满不溢出为度,每加一个样品应换一个滴头。

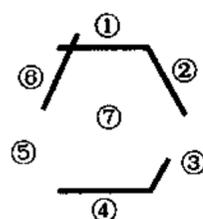


图 1 AGP 试验结果

4.2.4 作用:加样完毕后,静止 5 min~10 min,然后将平皿轻轻倒置放入湿盒内,37℃温箱中作用,分别在 24 h、48 h 和 72 h 观察并记录结果。

4.3 结果判定

4.3.1 判定方法

将琼脂板置日光灯或侧强光下观察,若标准阳性血清(图 1 的①和④号孔)与抗原孔之间出现一条清晰的白色沉淀线,则试验成立。

4.3.2 判定标准

4.3.2.1 若被检血清(如图 1 中的②号)孔与中心抗原孔之间出现清晰致密的沉淀线,且该线与抗原与标准阳性血清之间沉淀线的末端相吻合,则被检血清判为阳性。

4.3.2.2 被检血清(如图 1 中的③号)与中心孔之间虽不出现沉淀线,但标准阳性血清(如图 1 中④)的沉淀线一端向被检血清孔内侧弯曲,则此孔的被检样品判为弱阳性(凡弱阳性者应重复试验,仍为弱阳性者,判为阳性)。

4.3.2.3 若被检血清(如图 1 中的⑤号孔)孔与中心孔之间不出现沉淀线,且标准阳性血清沉淀线直向被检血清孔,则被检血清判为阴性。

4.3.2.4 被检血清孔(图 1 中的⑥号孔)与中心抗原孔之间沉淀线粗而混浊或标准阳性血清与抗原孔之间的沉淀线交叉并直伸,被检血清孔为非特异反应,应重做,若仍出现非特异反应则判为阴性。

5 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)

5.1 材料准备

5.1.1 酶标板、加样品(带滴头),酶标测定仪。

5.1.2 使用溶液的配制:方法见附录 E。

5.1.3 间接 ELISA 抗原,间接 ELISA 酶标抗体。

5.1.4 抗原包被板制备:方法见附录 F。

5.2 操作步骤

5.2.1 样品准备:将被检血清用稀释液(见附录 E.5)做 1:400 稀释。

5.2.2 加样:取出抗原包被板,倒掉孔内包被液,用洗液洗 3 次。除 A1、B1、C1 和 D1 孔不加样品,留做空白调零,阴性血清和阳性血清做对照各占 1 孔外,其余孔加 1:400 稀释的被检血清,每孔 100 μ L,将加样位置做好记录,将反应板盖好盖子后置 37 $^{\circ}$ C 环境下作用 30 min。

5.2.3 洗涤:倒掉孔内液体,在吸水纸上空干,每孔加满洗液,静置 1 min~2 min 后倒掉,空干,再重复洗 2 次。

5.2.4 加酶标抗体:除 A1、B1、C1 和 D1 孔外,其他每孔加酶标抗体液 100 μ L,盖好盖子后置 37 $^{\circ}$ C 环境下作用 30 min。

5.2.5 洗涤:洗涤方法同 5.2.3。

5.2.6 加底物:加底物使用液(见附录 E.6),每孔 90 μ L,置室温避光显色 2 min~3 min。

5.2.7 终止:加中止液(见附录 E.8),每孔 90 μ L,使其终止反应。

5.3 结果判定

用酶标仪测定每个孔在 490 nm 波长的光密度值(即 OD 值), $OD \geq 0.2$ 者判为阳性, $0.18 \leq OD < 0.2$ 需重复测试 1 次,若仍在此范围则判为阳性, $OD < 0.18$ 者判定为阴性。

附录 A
(资料性附录)

高致病性禽流感病毒 IVPI 测定计算方法

A.1 记录方法

根据每只鸡的症状用数字方法每天进行记录:正常鸡记为 0,病鸡记为 1,重病鸡记为 2,死鸡记为 3 (病鸡和重病鸡的判断主要依据临床症状表现。一般而言,“病鸡”表现有下述一种症状,而“重病鸡”则表现下述多个症状,如呼吸症状、沉郁、腹泻、鸡冠和/或肉髯发绀、脸和/或头部肿胀、神经症状。死亡鸡在其死后的每次观察都记为 3)。

A.2 IVPI 值计算

IVPI 值计算见式(A.1)。

$$\text{IVPI 值} = \frac{\text{每只鸡在 10 d 内所有数字之和}}{10 \text{ 只鸡} \times 10 \text{ d}} \dots\dots\dots(\text{A.1})$$

如指数为 3.00,说明所有鸡 24 h 内死亡;指数为 0.00,说明 10 d 观察期内没有鸡表现临床症状。列举一个假设试验来说明 IVPI 的计算方法见表 A.1。

表 A.1 假设高致病性禽流感病毒致病性试验记录结果

鸡 号	天 数										合计
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	11
2	0	0	0	0	0	2	3	3	3	3	14
3	0	0	0	0	2	3	3	3	3	3	17
4	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3	23
5	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3	23
6	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	26
7	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	26
8	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	26
9	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	26
10	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	26
合计	0	10	19	21	23	26	29	30	30	30	218

注:标准中规定当 IVPI 值大于 1.2 时,判定分离株为高致病性禽流感病毒(HPAIV)。
本试验中 $\text{IVPI} = 218 / (10 \times 10) = 2.18 > 1.2$,因此,本试验中的分离株为 HPAIV。

附 录 B

(规范性附录)

HA 和 HI 试验用溶液的配制

B.1 阿氏(Alsevers)液配制

葡萄糖	2.05 g
柠檬酸钠	0.8 g
柠檬酸	0.055 g
氯化钠	0.42 g

加蒸馏水至 100 mL, 散热溶解后调 pH 值至 6.1, 69 kPa 15 min 高压灭菌, 4℃ 保存备用。

B.2 1%鸡红细胞悬液制备

采集至少 3 只 SPF 公鸡或无禽流感和新城疫等抗体的健康公鸡的血液与等体积阿氏液混合, 用 pH7.2、0.01 mol/L PBS 液洗涤 3 次, 每次均以 1 000 r/min 离心 10 min, 洗涤后用 PBS 配成体积分数为 1% 红细胞悬液, 4℃ 保存备用。

附 录 C
(规范性附录)
AGP 试验用溶液的配制

C.1 1%硫柳汞溶液的配制

硫柳汞	1.0 g
加蒸馏水至	100 mL

溶解后,置 100 mL 瓶中盖塞存放备用。

C.2 pH 7.2、0.01 mol/L PBS 的配制

- a) 配制 25×PB:称量 2.74 g 磷酸氢二钠和 0.79 g 磷酸二氢钠加蒸馏水至 100 mL。
- b) 配制 1×PBS:量取 40 mL 25×PB,加入 8.5 g 氯化钠,加蒸馏水至 1 000 mL。
- c) 用氢氧化钠或盐酸调 pH 至 7.2。
- d) 灭菌或过滤。
- e) PBS 一经使用,于 4℃保存不超过 3 周。

附 录 D
(规范性附录)
琼脂板的制备

称量琼脂糖 1.0 g,加入 100 mL 的 pH 7.2、0.01 mol/L PBS 液中在水浴中煮沸充分融化,加入 8 g 氯化钠,充分溶解后加入 1% 硫柳汞溶液 1 mL。冷至 45℃~50℃时,将洁净干热灭菌直径为 90 mm 的平皿置于平台上,每个平皿加入 18 mL~20 mL,加盖待凝固后,把平皿倒置以防水分蒸发,放普通冰箱中保存备用(时间不超过 2 周)。

附 录 E
(规范性附录)

高致病性禽流感间接 ELISA 使用溶液的配制

E. 1 碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L、pH9.6, CBS)

碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g
用双蒸水溶解至 1 000 mL, 于 4℃ 保存, 不超过 1 个月。	

E. 2 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L、pH 7.4, PBS)

氯化钠	8 g
磷酸二氢钠	0.2 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
氯化钾	0.2 g
加蒸馏水至	1 000 mL

E. 3 洗液(含 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L、pH7.4 的 PBS, 即 PBST)

Tween-20	0.5 mL
加 0.01 mol/L、pH7.4 的 PBS 至	1 000 mL

E. 4 封闭液(含 0.5% BSA 的 PBST)

牛血清白蛋白(BSA)	0.5 g
加洗液至	100 mL
4℃ 存放, 避光。	

E. 5 稀释液(含 0.1% BSA 的 PBST)

牛血清白蛋白(BSA)	0.1 g
加洗液至	100 mL
4℃ 存放, 避光。	

E. 6 间接 ELISA 底物缓冲液(磷酸氢二钠-柠檬酸, pH5.4)

0.2 mol/L 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	26.7 mL
0.1 mol/L 柠檬酸	24.3 mL
双蒸水	49 mL
准确称量 40 mg 邻苯二胺(OPD), 溶解后置暗处保存, 临用前加入 30% 过氧化氢 150 μL 。	
用时现配, 避光。	

E. 7 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液(0.05 mol/L pH7.6)

0.1 mol/L Tris	250 mL
0.1 mol/L 盐酸	192.5 mL
双蒸水	57.5 mL

E.8 间接 ELISA 终止液

浓硫酸	11.1 mL
蒸馏水	88.9 mL

附录 F
(规范性附录)

高致病性禽流感间接 ELISA 抗原包被板制备

抗原包被板也称诊断板,将高致病性禽流感抗原用 0.05 mol/L, pH9.6 碳酸盐缓冲液(见附录第 E.1 章)稀释成 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (全病毒抗原)或 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (重组核蛋白抗原),包被 40 孔聚苯乙烯微量板,每孔 100 μL ,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,用洗液洗涤(见附录第 E.3 章)3 次,用封闭液(见附录第 E.4 章)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内封闭 60 min,用洗涤液洗涤 3 次,干燥后即成为诊断板,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。
