

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1185—2006

马流行性感冒诊断技术

Diagnostic techniques for equine influenza

2006-07-10 发布

2006-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

马流行性感冒(Equine Influenza)是由正黏病毒科流感病毒属 A 型流感病毒(亚型 1:H7N7,亚型 2:H3N8)引起马的一种急性呼吸道传染病,临床表现为高热、有刺耳的干咳,鼻孔有黏性脓性分泌物。最典型的特点是在易感马群中传播极快,发病率极高,有时可高达 100%。本病无年龄、性别、品种差异。一年四季均可发生。对未受母源抗体保护的幼驹较多地发生致死性感染。病马退热后较长时间带毒和排毒,成为威胁马属动物的传染源。

我国将该病定为二类动物疫病,本标准病毒抗原的 ELISA 检测方法等同采用 OIE《哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册》(2000 版)推荐的方法,其他诊断方法等效采用 OIE 推荐的方法。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:农业部动物检疫所、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:王玉东、相文华、郑增忍、杨建德、刘俊辉、曲志娜、王永玲。

马流行性感冒诊断技术

1 范围

本标准规定了马流行性感冒的临床诊断、病原分离、血凝试验(HA)、病毒抗原的ELISA试验、血凝抑制试验(HI)的技术要求。

本标准适用于马流行性感冒的流行病学调查、临床诊断和实验室诊断。

2 临床诊断

2.1 询问易感马发病状况及免疫情况,当出现发热、刺耳的干咳、鼻流黏性脓性分泌物时,怀疑发生本病。

2.2 轻症型:此种病型常见,主要表现轻度咳嗽,流水样或浆液性鼻汁,体温稍升高或正常,眼结膜潮红,一般约经一周后康复。

2.3 重症型:患马突然发病,表现精神委顿、食欲减退、全身无力、不愿活动。体温升高至 39.5°C ,稽留 $3\text{d}\sim 4\text{d}$,发热的同时出现阵发性咳嗽,初为干咳,后为湿咳,有冷空气或尘埃刺激时会出现剧烈咳嗽。初期流浆液性或黏液性鼻汁,后期为黄白色脓性鼻汁。鼻黏膜潮红、眼结膜充血肿胀,流泪,分泌物增多。呼吸加快、有的出现心率不齐,四肢下端或腹下发生浮肿。多为良性经过,约经一周后恢复正常。

2.4 在临床诊断不能确诊或必须进行确诊试验时,要进行实验室诊断。

3 实验室诊断

3.1 病原鉴定

3.1.1 材料准备

3.1.1.1 器材:酶标仪、96孔V型或U型微量反应板、微量移液器、恒温培养箱、孵化器、恒温水浴锅、普通冰箱、低温冰柜、台式离心机、1 mL注射器和5 mL注射器、棉拭子、青霉素瓶等。

3.1.1.2 试剂:甘油、乙醚、过碘酸钾(KIO_4)、青霉素、链霉素、丁胺卡那霉素。

0.1 mol/L pH为7.2的磷酸盐缓冲液(PBS),配制方法见附录A。

1%鸡红细胞悬液:配制方法见附录B。

马流感抗原(全病毒或吐温80/乙醚处理过的病毒):病毒处理方法见附录D。

马流感标准亚型阳性血清、标准阴性血清。

3.1.1.3 10日龄~11日龄SPF鸡胚。

3.1.2 病原分离

3.1.2.1 样品采集

应在临床症状出现后立即采集样品,包括鼻咽拭子和气管冲洗物。取样时须将棉拭子经前侧鼻道伸入鼻咽部并停留10 s,蘸取呼吸道黏液,取出后立即放入盛有1 mL~2 mL运输培养液(青霉素)瓶中。该运输培养液是含有40%甘油的pH为7.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)。样品在 4°C 时可保存1 d~2 d,若要保存较长时间,则应在 -60°C 以下温度保存,运送样品时应该加冰块冷藏。

3.1.2.2 样品处理

一次只能处理一份样品,从鼻咽拭子中挤出的液体,加入青霉素1 000 IU/mL~2 000 IU/mL,链霉素1 mg/mL~2 mg/mL。如果样品污染严重,应加丁胺卡那霉素等敏感抗生素,加2 000 IU/mL。加完抗生素后,放在冰上静置30 min,然后以1 500 r/min离心15 min,上清液经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,去

除细菌和杂质,经检测无菌后,滤液用于 SPF 鸡胚接种。未用完的样品放回 -60℃ 以下冰箱保存。

3.1.2.3 样品接种

孵化至 10 日龄~11 日龄的 SPF 鸡胚将气室部用碘酊和酒精消毒后,在壳上打一个孔。每份样品接种 3 枚鸡胚,每胚尿囊腔内接种 0.2 mL。用石蜡封孔,鸡胚放置 34℃~35℃ 孵化器内继续孵化 3 d。

3.1.2.4 收获尿囊液

将鸡胚转到 4℃ 冰箱中放置 4 h 或过夜,使鸡胚死亡,使在收获时减少出血。先将蛋壳表面消毒,用注射器收获尿囊液,用 1% 的红细胞悬液检测尿囊液的血凝活性(HA)。每胚收获的尿囊液要分开冷冻保存。

3.1.2.5 种毒选择与保存

为避免缺陷型病毒粒子产生干扰,要将接种物先作 10 倍、100 倍、1 000 倍稀释再接种,选择最高稀释度 HA 呈阳性的样品培养物作为种毒,保存在 -70℃ 以下的冰箱中。

3.1.3 血凝试验(HA)

3.1.3.1 在反应板一排各孔中加 25 μ L PBS。

3.1.3.2 第一孔中加 25 μ L 病毒抗原(尿囊液病毒抗原的处理方法,见附录 D),按 1:2 倍比稀释,最后一孔不加抗原作阴性对照。

3.1.3.3 每孔中再加 25 μ L PBS。

3.1.3.4 每孔加 50 μ L 1% 红细胞液,22℃ (\pm 2℃) 作用 30 min。

3.1.3.5 结果判定:当红细胞被凝集时,红细胞均匀分布在反应板底部,反应板倾斜片刻不下滑;红细胞未被凝集时,反应板倾斜片刻,可见沉淀的红细胞向下滑动,形成流线。HA 滴度为 50% 红细胞出现凝集时的最高稀释倍数。

3.1.3.5.1 样品无血凝活性(HA 阴性):红细胞没有出现凝集时,则需将各样品尿囊液收集在一起,再经鸡胚盲传,当传至第 5 代仍未出现血凝活性,判为马流感病毒阴性。

3.1.3.5.2 样品有血凝活性(HA 阳性):将所有血凝试验 HA 阳性的样品作少量等份(每份 1 mL)分装在 5 mL 青霉素瓶内,-70℃ 以下冰箱内保存,并取其一份测定 HA 滴度。

有血凝活性(HA 阳性),但滴度较低时,要继续传代,共盲传 5 代,HA 滴度仍低于 2⁴,判为马流感病毒阴性;HA 滴度大于或等于 2⁴ 时,判为马流感病毒阳性,同时要用马流感病毒亚型 1 和亚型 2 标准阳性血清,进行 HI 试验对病毒样品进行亚型鉴定。

3.1.4 病毒抗原的 ELISA 检测方法

在无分离病毒的实验条件下,可以采用核蛋白单克隆抗体(MAb)进行抗原捕获 ELISA,直接检测鼻腔分泌物中的病毒抗原。该方法能快速提供诊断结果,但不能代替病毒分离。当 ELISA 结果阳性时,有助于在样品数量较多时,为病毒分离初步筛选样品。

3.1.4.1 将 100 μ L 鼻咽拭子的浸出物加到用多克隆兔抗 H3N8 亚型血清包被的微量反应板各孔内,在 22℃ (\pm 2℃) 孵育 90 min,微量反应板用含 0.05% 吐温-20 的 PBS 液(PBST)洗涤 3 次。

3.1.4.2 加 100 μ L 已用缓冲稀释液作 1:50 稀释的辣根过氧化物酶-MAb 结合物,37℃ 温箱孵育 1 h,用 PBST 洗涤微量反应板 6 次。

3.1.4.3 加 100 μ L 四甲基联苯胺溶液于微量反应板各孔中,22℃ (\pm 2℃) 孵育 10 min,然后加 100 μ L 0.18 M 硫酸中止反应。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值。

3.1.4.4 结果判定,按试剂盒说明书,对测定结果进行判定。

3.2 血清学试验-血凝抑制试验(HI)

通过 HI 试验,用于病毒亚型定型。通过马流感双份血清抗体的 HI 检测,判断马是否感染该病。待检血清应进行预处理,稀释浓度为 1:4,处理方法见附录 C。

3.2.1 材料准备

3.2.1.1 器材:96孔V型或U型微量反应板、普通天平、分析天平、台式离心机、微型振荡器、微量移液器、滴头。

3.2.1.2 试剂:吐温-80、乙醚、过碘酸钾、甘油。

0.1 mol/L pH为7.2的磷酸盐缓冲液(PBS):配制方法见附录A。

1%鸡红细胞悬液:配制方法见附录B。

马流感抗原、全病毒或吐温-80/乙醚处理过的病毒:见附录D。

标准亚型阳性血清、标准阴性血清。

3.2.2 操作程序

3.2.2.1 在进行本试验前,先进行抗原的HA滴度检测,方法见3.1.3。

3.2.2.2 加25 μ L PBS于96孔U型或V型微量反应板各孔中。

3.2.2.3 加25 μ L经处理的血清于第1孔中,混匀后取25 μ L加到第2孔中,依次倍比稀释,从第2孔加至第11孔,第11孔混匀后吸取25 μ L弃去,最后1孔不加血清作对照。

3.2.2.4 稀释抗原,含量为4个HA单位($4 \times$ HA最小凝集量)。

3.2.2.5 每孔中加25 μ L 4HA单位抗原,置 $22^{\circ}\text{C}(\pm 2^{\circ}\text{C})$ 30 min。

3.2.2.6 每孔加50 μ L 1%鸡红细胞液,置 $22^{\circ}\text{C}(\pm 2^{\circ}\text{C})$ 30 min。

3.2.2.7 将反应板倾斜70度角,无凝集反应,沉淀的红细胞向下滑动,呈流线状,记录为抗体阳性。完全抑制凝集的抗体最高稀释倍数为血清的血凝抑制抗体(HI)滴度。

3.2.3 结果判定

在进行病毒亚型鉴定时,当某标准亚型的阳性血清对病毒阳性样品产生血凝抑制作用,而且与原抗体HI水平一致,则病毒为该亚型病毒。抗体检测时,血凝抑制试验(HI)检测双份血清,第一份血清应在临床症状出现后立即采集,第二份血清约在两周后采集,如第二份血清的抗体滴度比第一份血清的抗体滴度上升4倍或4倍以上时,表明马被感染或有近期感染。

4 综合判定

根据临床诊断和实验室诊断进行综合判断,当马流感病毒分离阳性时判为马流感阳性;当病毒分离阴性时判为马流感阴性。当病毒抗原的ELISA检测试验阳性时判为病毒抗原为阳性,可为病毒分离选择样品或为其他试验提供依据,但不能代替病毒分离。检测双份血清抗体HI滴度,第二份比第一份血清HI滴度上升4倍或4倍以上时,若有临床症状时,表明有近期感染;若无临床症状,表明发病后恢复健康或出现隐性感染。单纯检测一份血清,对该病的实时监测没有意义。

附 录 A

(规范性附录)

0.1 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)的配制

A.1 成分

氯化钠(NaCl)	80.06 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	11.5 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	2.01 g
氯化钾(KCl)	2.00 g
双蒸馏水	加至 1 000 mL

A.2 配制方法

将上列试剂按次序加入定量容器中,混匀后,充分溶解,调 pH 至 7.2,高压消毒灭菌 112 kPa 30 min,保存于 4℃ 冰箱中备用。

附 录 B
(规范性附录)
1% 鸡红细胞悬液的制备

B.1 阿氏(Alsever)液配制方法

葡萄糖($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	2.05 g
柠檬酸三钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	0.80 g
柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	0.055 g
氯化钠(NaCl)	0.42 g

蒸馏水加至 100 mL, 高压灭菌 70 kPa 20 min, 冷却后保存于 4℃~8℃ 冰箱中备用。

B.2 1% 鸡红细胞悬液制备

无菌采集 3 只或 3 只以上 SPF 公鸡血液与 1~2 倍量阿氏液混合, 4℃ 保存, 红细胞在阿氏液中可保存 1 周~2 周。使用前吸取红细胞悬液至离心管中, 加入 PBS 洗涤 3 次, 每次均以 3 000 r/min 离心 5 min, 将血浆、白细胞等充分洗去, 沉积的红细胞用 PBS 稀释成 1% 的悬液, 保存于 4℃ 冰箱中备用。

附 录 C
(规范性附录)
待检血清样品预处理

- C.1 在 1 体积(150 μ L)血清中加 2 体积(300 μ L)新配制的 0.016 mol/L 过碘酸钾(380 mg/100 mL PBS),混匀,置 22 $^{\circ}$ C (\pm 2 $^{\circ}$ C)作用 15 min。
- C.2 再加 1 体积的 3%甘油 PBS 中和过剩的过碘酸钾液,混合后置 22 $^{\circ}$ C (\pm 2 $^{\circ}$ C)15 min。
- C.3 在 56 $^{\circ}$ C 水浴中灭活 30 min。血清稀释度为 1:4。

附 录 D

(规范性附录)

吐温-80/乙醚处理马流感病毒抗原

- D.1 对于全病毒要进行处理,往 40 mL 病毒尿囊液中加 0.5 mL 10% (V/V) 吐温-80 的 PBS,使吐温-80 终浓度为 0.125% (V/V)。
- D.2 室温下轻轻摇动混合 5 min 后,加 20 mL 乙醚使终浓度为 33.3% (V/V),充分混匀后置 4℃, 15 min。
- D.3 静置分层,将液相层(含裂解的病毒粒子)移入玻璃瓶中,松开盖子,过夜,挥发残留乙醚。
-