

《禽流感、新城疫、马立克、传染性法氏囊、鸡传染性贫血、J 亚型禽白血病等六种家禽免疫抑制性疾病液相芯片分子检测方法》编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

《禽流感、新城疫、马立克、传染性法氏囊、鸡传染性贫血、J 亚型禽白血病等六种家禽免疫抑制性疾病液相芯片分子检测方法》国家标准项目由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出，由国家标准化委员会 2008 年下达任务，项目任务编号为 20079724-T-326。其后，项目组经研究，鉴于家禽免疫抑制性疾病包括法氏囊、马立克、网状内皮增生症、球虫、流感、白血病等多种，而本标准的检测对象只包括了其中的 6 种，《家禽免疫抑制病液相芯片检测方法》的名字容易引发歧义。同时，借鉴美国食品及药物管理局（FDA）制订的液相芯片标准“Luminex-based Suspension Array to Identify STEC O serogroups O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O157, eae and aggR”的命名方式，在标准名称中清晰列出检测对象，避免引发歧义，误认为《家禽免疫抑制病液相芯片检测方法》可以检测所有的家禽免疫抑制病。因此，项目组提出申请，将《家禽免疫抑制病液相芯片检测方法》更名为《禽流感、新城疫、马立克、传染性法氏囊、鸡传染性贫血、J 亚型禽白血病等六种家禽免疫抑制性疾病的液相芯片分子检测方法》。这样，可以一目了然知道液相芯片所要检测的对象。并于 2016 年 6 月 20 日获得了标准管理部门全国动物卫生标准化技术委员会的审批同意。

经查，目前我国尚未有涉及家禽免疫抑制性疾病类检测标准，也未有涉及上述 6 种家禽疫病的液相芯片分子检测方法的标准。

（二）背景

家禽免疫抑制病中最主要是传染性法氏囊病毒（IBDV）、马立克氏病毒 1 型（MDV）、鸡传染性贫血病毒（CIAV）、J 亚群禽骨髓性白血病病毒（ALV-J）。此外，禽流感病毒（AIV）和新城疫病毒（NDV）等家禽免疫抑制性病毒也会导致免疫抑制的产生。家禽免疫抑制病导致的直接损失和间接损失巨大。此类家禽免疫抑制相关病传染性强，会引起免疫器官、组织和免疫细胞损害而导致的暂时性或永久性免疫应答功能不全或低于正常水平，常会导致整个禽群生产力下降，死亡率增加。免疫抑制相关病还会使疫苗接种不能达到预期免疫效果，导致免疫失败，家禽对其它感染性疾病的易感性增加，间接损失巨大。因此，关于家禽免疫抑制病的快速检测方法日渐成为研究的重点。

传染性法氏囊病是由传染性法氏囊病毒（Infectious Bursal Disease Virus, IBDV）引起的一种急性、接触传染性疾病，以法氏囊发炎、坏死、萎缩和法氏囊内淋巴细胞严重受损为特征，引起家禽的免疫机能障碍，干扰各种疫苗的免疫效果。发病率高，几乎达 100%，死亡率一般为 5%~15%，是目前养禽业最重

要的疾病之一。

鸡传染性贫血病是由鸡传染性贫血病毒(Avian Infectious Anaemia Virus, CIAV)引起的,以再生障碍性贫血、淋巴器官组织萎缩、皮下和肌肉出血、泛血细胞减少为特征,本病存在于所有主要养禽业国家。1979年首次于日本报道,中国于1992年首次分离到该病病毒随后周文平等在河南、山东、江苏、辽宁、吉林等地的鸡群中也陆续分离到CIAV此病通过垂直与水平传播引起临床与亚临床感染。鸡传染性贫血病及其诱发的疾病每年为养禽业造成巨大的经济损失。

J亚群禽白血病是由J型禽白血病病毒(Aivan Leukosis Virus subgroup J, ALV-J)引起的一种主要发生于肉用型鸡的传染病,主要引起家禽的骨髓细胞瘤。我国也于1999年首次分离到了ALV-J。该病毒的致病性试验表明,其不仅通过髓细胞瘤在肉鸡引起较高死亡率外,还可引起鸡体质量严重下降,雏鸡感染后其生长性能降低。其可通过水平传播和垂直传播迅速地感染整个鸡群,使鸡群在短时间内遭受灭顶之灾。

马立克氏病是由疱疹病毒科鸡疱疹病毒2型(马立克氏病毒1型, Serotype I Marek's Disease Virus)引起的一种传染性肿瘤病。该病于1907年由匈牙利兽医病理学家马立克首次发现,是国外50年代以来最受重视的禽病,呈世界性分布,以淋巴组织增生和肿瘤形成为特征,产生免疫抑制,干扰各种疫苗的免疫效果。病毒经空气传播,传染力强,被感染禽类产生肿瘤和死亡,对养殖业造成了巨大经济损失。

禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV),也是家禽免疫抑制性病毒,属甲型家禽免疫抑制性病毒,属于RNA病毒的正黏病毒科,传染性强,各种日龄禽类均易感,且易导致死亡,目前已经成为威胁动物和人类健康的重要病毒之一。

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒引起禽的一种急性、热性、败血性和高度接触性传染病。以高热、呼吸困难、下痢、神经紊乱、黏膜和浆膜出血为特征。具有很高的发病率和病死率,是危害养禽业的一种主要传染病。

上述疫病的现有检测方法主要有分离培养、电镜检查、琼脂扩散试验、病毒中和试验、酶联免疫吸附试验、PCR等方法,耗时长、操作繁琐,灵敏度和特异性不够,兼容性不强。因此,有必要建立一种高通量、低成本、快速、灵敏、准确针对常见多发的禽免疫性抑制相关病毒的检测方法。近年发展起来的液相芯片检测技术,同时具备通量高、快速、灵敏度高、特异性好、操作简单等优点,实现多种指标的同时检测。本标准针对禽流感病毒、新城疫病毒、传染性法氏囊病毒、鸡传染性贫血病毒、J型禽白血病病毒和马立克氏病毒1型基因组的特异性核酸序列,分别设计了禽流感病毒、新城疫病毒、家禽免疫抑制性病毒传染性法氏囊病毒、鸡传染性贫血病毒、J型禽白血病病毒和马立克氏病毒1型的特异性引物、通用扩增引物,以及荧光编码微球包被用的特异性探针。借助全新的通用扩增技术实现六种病毒核酸同时扩增,再与高通量的液相芯片检测相结合,进而实现六种病毒在4小时内完成快速准确的检测。该方法创新性地将液相芯片技术GMPLex引入到动物检疫行业,突破了DNA病毒、RNA病毒不能在一次核酸扩增中被同时检测的瓶颈,实现了一管一次反应同检六种病毒的检测能力,有效缩短检验检疫周期,节约成本。有关检测方法尽快形成国家标准,有利于方法的快速推广和标准化应用,为进出口检验检疫机构以及畜牧机构等单位应对禽免疫抑制病病毒提供了快速有效的检测手段。

(三) 起草单位

略

(四) 主要工作过程

本标准编制已完成了起草阶段及征求意见阶段的各项工作，有关情况如下：

1. 起草阶段

(1) 2012年5月-2013年5月，完成了禽流感、新城疫、马立克、传染性法氏囊、鸡传染性贫血和J亚型禽白血病等六种家禽免疫抑制性疾病病料或标准抗原（已灭活）及8种其他非免疫抑制性疾病病料或标准抗原（已灭活）的样品收集、处理、验证鉴定和保存工作，建立了本标准研制的实验材料资源库。

(2) 2013年6月-2015年8月，分别完成了禽流感、新城疫、马立克、传染性法氏囊、鸡传染性贫血和J亚型禽白血病等六种家禽免疫抑制性疾病液相芯片分子检测方法的建立，优化了各项检测参数，完成了特异性试验和灵敏度比对试验。同时采用已有的检测上述各种疫病的标准方法，完成了临床样品的验证检测。最终确定了标准草稿的各个检测步骤操作的具体内容。

(3) 2015年9月-2016年1月，完成了标准制定相关资料的收集、汇总、整理和分析，形成了标准的征求意见稿。

2. 征求意见阶段

(1) 2016年2月-2016年5月，启动了征求意见程序，向质检系统直属局检测技术中心、检验检疫科学研究院、省级动物卫生研究所和高校等不同行业领域的18个单位发出了征求意见函，广泛收集各界的专业意见和建议。

(2) 2016年6月-2016年7月，收集整理意见和建议，对征求意见稿和编制说明进行修改，形成送审稿，并提交。

征求意见的对象具有广泛代表性，涵盖了系统内开展动物及其产品检验检疫工作的检测技术机构、负责检验检疫科技攻关研发的科研单位，以及有丰富的动物疫病研究理论基础和背景的高等院校，确保了收集的意见和建议具有科学性、实用性。本次征求意见回函单位共有13个，没有回函单位有5个。其中有意见或建议的单位有9个，共提出了29条意见或建议；经认真研讨和考虑，标准起草小组同意采纳有23条，占意见总数的79%，未采纳6条，占意见总数的21%；所有意见或建议的处理情况，均在《征求意见汇总处理表》中逐条对应备注栏中有详细说明。没有回函的单位有5个。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

(一) 标准的编写原则

本标准的编制依据《中华人民共和国标准化法》，按照中华人民共和国国家标准 GB/T1.1—2009《标准化工作导则，第1部分 标准的结构和编写规则》的规定进行。

(二) 提出本标准的依据

2006年，国际学术界推出了一种全新的多重PCR检测技术，开创性地引入了通用超级引物的概念。至2008年，这种技术的应用达到了新的高度，很多临床疾病、多种兽药残留可以通过这种技术进行高效的大通量快速检测。这种通用的超级引物包括一对人工假想序列通用引物，分别为上游超级引物(Forward super primer, FSP)和逆转录超级引物(Rreverse super primer, RSP)，其中

RSP 5'端标记生物素。FSP 和 RSP 与其他任何物种之间无交叉，即超级引物不会扩增任何物种的核酸序列，且可实现对所有多个目标片段的通用扩增。在目标基因中又设计 2 对套式引物，分别为通用多重扩增上游外引物(General multiplex forward out primer, GMFo)和上游内引物(Forward inner primer, Fi)，通用多重扩增逆转录外引物(General multiplex reverse out primer, GMRo)和逆转录内引物(Reverse inner primer, Ri)。通用多重扩增内引物由超级引物和特异性引物组成，即通用多重扩增上游内引物 (General multiplex forward inner primer, GMFi) 由 FSP 连接目的基因上特异性套式内引物 Fi 而成，即 $GMFi=FSP+Fi$ ；通用多重扩增逆转录内引物 GMRI(General multiplex reverse inner primer, GMRI)由逆转录超级引物 RSP 连接目的基因上特异性套式逆转录内引物 Ri 而成，即 $GMRI=RSP+Ri$ 。同时结合荧光编码微球技术，可以实现多重 PCR 产物的实时检测和结果读取，完成快速检测。

本标准分别选定禽流感病毒、新城疫病毒、传染性法氏囊病毒、鸡传染性贫血病毒、J 型禽白血病病毒和马立克氏病毒 1 型的 AIV-M 基因、NDV-F 基因、IBDV-VP2 基因、CAV-VP2 基因、ALV-Env 基因和 MDV-PP33 基因中的特异性核酸序列，分别设计了禽流感病毒、新城疫病毒、家禽免疫抑制性病毒传染性法氏囊病毒、鸡传染性贫血病毒、J 型禽白血病病毒和马立克氏病毒 1 型的特异性引物、通用扩增引物，以及荧光编码微球包被用的特异性探针。借助全新的通用扩增技术实现六种病毒核酸同时扩增，再与高通量的液相芯片检测相结合，进而实现六种病毒在 4 小时内完成快速准确的检测。

本标准采用的方法创新性地将液相芯片技术 GMPLex 引入到动物检疫行业，突破了 DNA 病毒、RNA 病毒不能在一次核酸扩增中被同时检测的瓶颈，实现了一管一次反应同检六种病毒的检测能力，有效缩短检验检疫周期，节约成本。有关检测方法建议尽快形成国家标准，有利于方法的快速推广和标准化应用，为进出口检验检疫机构以及畜牧机构等单位应对禽免疫抑制病病毒提供了快速有效的检测手段。

(三) 制定本标准的基础

本标准主持单位在 2011 年，会同深圳市检验检疫科学研究院、清华大学深圳研究生院和中国检验检疫科学研究院的相关研究人员共同完成了深圳检验检疫局科研项目《六种家禽免疫抑制相关病液相芯片检测试剂盒的研发与应用》(课题编号: SZ2011005) 的研究，制定了《传染性囊病病毒核酸检测方法》国家标准 1 项，发表了 SCI 收录外文 1 篇 (Subtyping Animal Influenza Virus with General Multiplex RT-PCR and Liquichip High Throughput (GMPLex), VIROLOGICA SINICA, 2012,) 和国内核心期刊论文 1 篇，申请了国家发明专利 1 项。该项目当年也顺利通过了专家组验收。鉴于国内尚未有类似的高效快速的检测疫病的标准方法，项目组在接到国标任务下达后，在有关课题取得的研究基础上加紧制订有关国家标准，召开了专题会议，商讨了本标准的制定方案，包括样品采集、标准内容、方法要点、操作步骤和判定标准等，做好了分工部署，尽快开展制标各项工作。

(四) 实验内容

(1) 病毒抗原的初步鉴定。第一，收集禽流感 (AIV) 各型毒株标准抗原 (详见附件 1)，新城疫 (NDV) 3 种基因型 (VIg、VII d 亚型、IX 型) 病毒抗原，

传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 6 个亚型病毒抗原, 马立克病毒 (MDV) 3 个血清型病毒抗原 (包括致癌性的 1 型, 非致癌性的 2 型, 火鸡疱疹病毒又简称 HVT 的 3 型), J 亚型白血病毒 (ALV-J) 抗原, 鸡传染性贫血病毒 (CIAV) 抗原等病原材料, 采用 HA、HI、和 real-time RT-PCR 等标准方法完成材料的验证。第二, 委托华南农业大学兽医学院测定了 A/Chicken/Hongkong/SZ-HI/1997(H5N1) 毒株 ELD50 为 10-7.75/0.2mL, NDV-F48E9 毒株 ELD50 为 10-8.5/0.2mL, 为各个检测方法的灵敏度比较提供了相对参考。

(2) 设计了分别针对 AIV-M 基因、NDV-F 基因、IBDV-VP2 基因、MDV-PP33 基因、ALV-Env 基因和 CAV-VP2 基因的鉴别诊断引物和探针 (见表 1), 开创性地引入了通用超级引物。

参考 Bao Y. 等家禽免疫抑制性病毒序列分析方法对家禽免疫抑制性病毒 (Influenza virus, IV) 序列进行分析。登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/select.cgi?go=1> 网站, 选取不同年代但以 2004 年后的序列为主、不同国家地区但以亚洲地区为主、不同宿主但以禽类尤其是鸡鸭为主的各个亚型禽流感的 M 基因 926 条进行序列在线排列分析。再将各个相应序列下载, 用 DNASTar(V.5.06) 中的 Seqman 和 Megalign 再次进行序列排序分析。找出所有亚型 HA 基因最保守的 20 个寡核苷酸 (oligo nucleotide, nt) 作为液相芯片检测探针, 探针的 Tm 值尽量保持在 56°C~58°C, 探针在序列中的位点见图 1。探针的 5' 端标记-NH2。

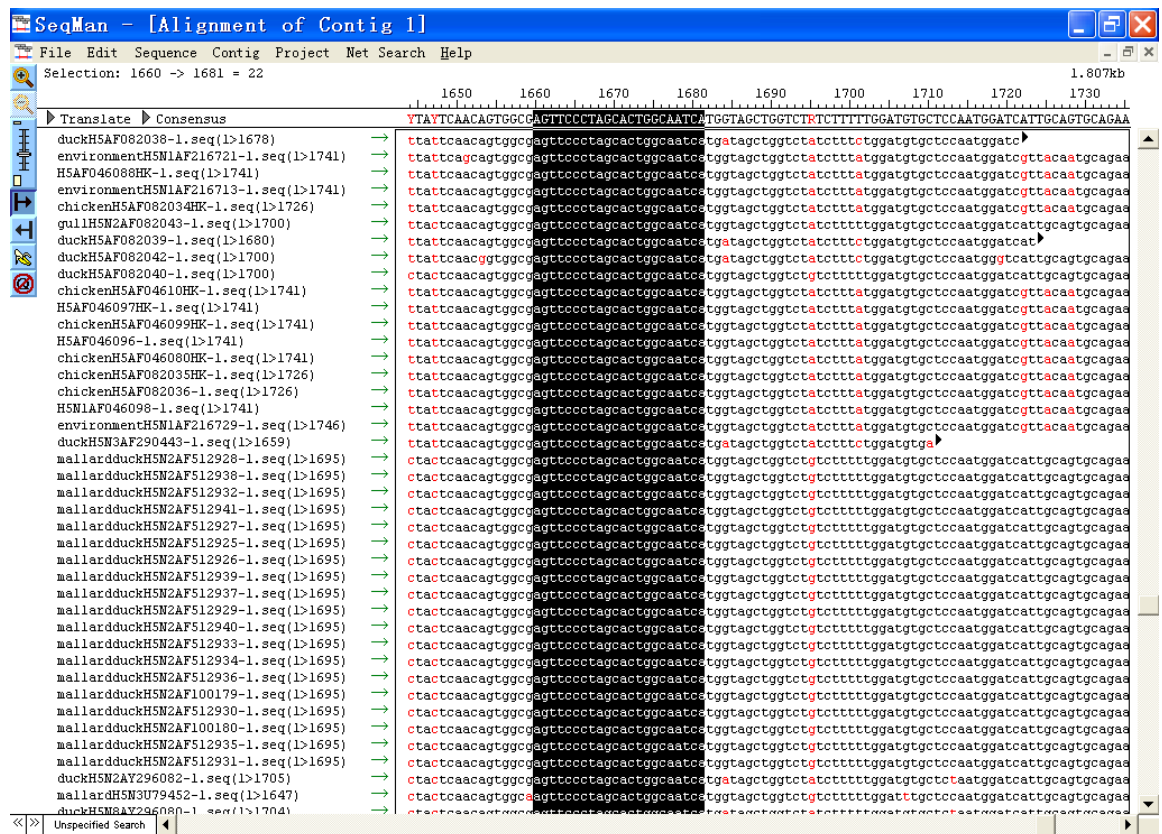


图 1 针对禽流感病毒所有亚型检测探针在 M 基因序列中的位置
在探针前后分别设计套式简并引物。各个引物和探针的设计和位置见图 2。

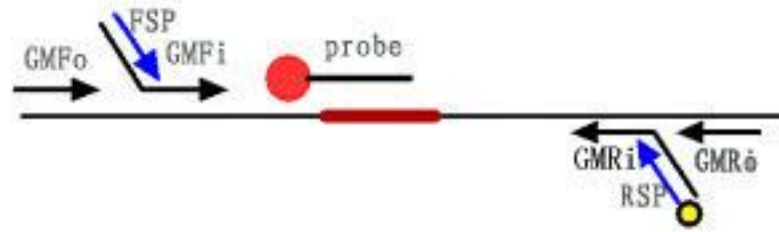


图 2 引物与探针设计和位置图

所设计的引物包括一对人工假想序列通用引物，分别为上游超级引物 (Forward super primer, FSP) 和逆转录超级引物 (Reverse super primer, RSP)，其中 RSP 5' 端标记生物素。FSP 和 RSP 与其他任何物种之间无交叉，即超级引物不会扩增任何物种的核酸序列，且可实现对所有多个目标片段的通用扩增。在目标基因中又设计 2 对套式引物，分别为通用多重扩增上游外引物 (General multiplex forward out primer, GMFo) 和上游内引物 (Forward inner primer, Fi)，通用多重扩增逆转录外引物 (General multiplex reverse out primer, GMRo) 和逆转录内引物 (Reverse inner primer, Ri)。通用多重扩增内引物由超级引物和特异性引物组成，即通用多重扩增上游内引物 (General multiplex forward inner primer, GMFi) 由 FSP 连接目的基因上特异性套式内引物 Fi 而成，即 $GMFi = FSP + Fi$ ；通用多重扩增逆转录内引物 GMRi (General multiplex reverse inner primer, GMRi) 由逆转录超级引物 RSP 连接目的基因上特异性套式逆转录内引物 Ri 而成，即 $GMRi = RSP + Ri$ 。

在禽流感的 M 基因中，每个引物的 3' 端至少必须有 5 个碱基非常保守。选取的探针和引物均经过 PrimerExpress3.0 进行评估后，再进行 Blast 分析确定各个引物和探针的特异性。

按照相同的序列分析和引物设计方法，对新城疫病毒 (NDV) 的 F 基因 (NDV-F)、传染性法氏囊病毒 (IBDV) 的 VP2 基因 (IBDV-VP2)、马立克氏病毒 (MDV) 的 PP38 基因 (MDV-PP38)、J 型禽白血病病毒 (ALV-J) 的 ENV 基因 (ALV-J-ENV) 和鸡传染性贫血病毒 (CIAV) 的 VP1 基因 (CIAV-VP1) 设计相应的套式简并引物和探针。

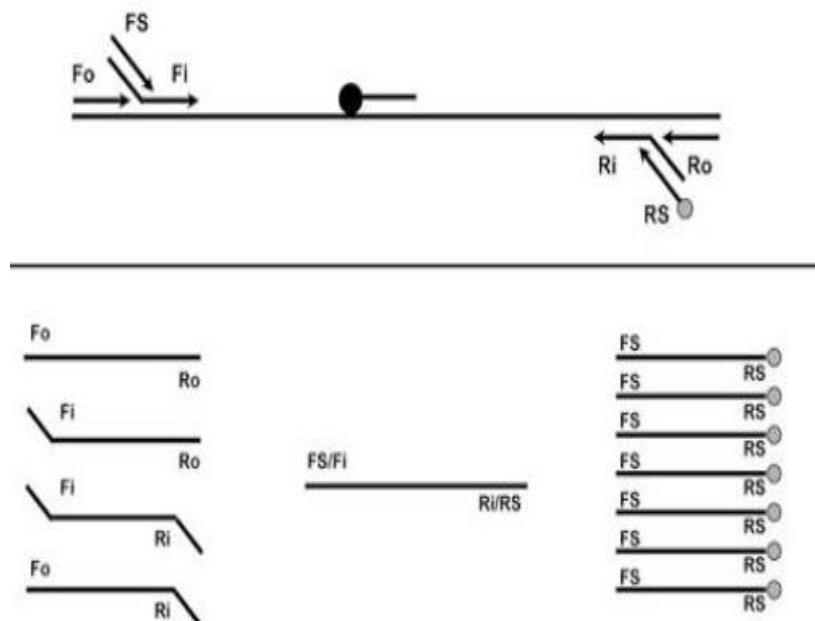


图 3 采用超级引物进行特定产物的扩增原理图

表 1 多个亚型家禽免疫抑制性病毒在 GMPLex 中的引物与探针

名称	目的	位置	引物名称	序列	引物	Tm	GC%	目的	
super primer		人工序列	FSP	CAGGCCACGTTTTGTCATGC	2	61	55%		
			RSP	TTCTTTGCGTTATGTCTCTG	2	50.	40%		
Avian influenza virus (AIV)	M	807-8 877-8 901-9 765-7 747-7	AIVMprobe	ATCATTGGGATCTTGCACCTGA	2	58.	41%	17 4	
			Ri	CCCTCTTTTCAAACCGTATTTAA	2	55.	35%		
			IVMRi	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGCCCTCTTTTCAAACCGTAT	4				
			IVMRo	AGGCACTCCTTCCGTAGAAG	2	54.	55%		
			Fi	AAATGCAGCGATTCAAGTGA	2	55.	40%		
			IVMFi	CAGGCCACGTTTTGTCATGCAAATGCAGCGATTCAAGTG	4				
			IVMFo	AGAAACGGATGGGAGTGC	1	54.	56%		
Newcastle Diseases	F		NDV-F-pro	TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC	1	50.		14 5	
			NDV-F- Ri	TTGGCGTTATGTCGCTG AGTGATGTGCTCGGACCTTC	4	59.			
			NDV-F-Fi	CAGGCCACGTATTGTCATGC	4	49.			
Infectious bursal	VP2	1660- 1729-	IBD-VP2-P	CAC CAC CAG AAC CTG TCA CCT C	2	55.	50%	18 5	
			IBD-VP2-R	TTCTTGGCGTTATGTCGCTGATCCATTGGAGCACATCCA	3				
			IBD-VP2-F	CAGGCCACGTATTGTCATGCCAAGRCTAAACAGRGAGGA	4				
Marek's diseases	PP38	175-1	MDV-PP38-	CTCCACACAGAGCACAAATGG	2	56.	55%	21 8	
			MDV-PP38-	TTCTTTGCGTTATGTCTCTGTGCGACGATGTAGGACCATT					
			MDV-PP38-	CAGGCCACGTTTTGTCATGCMCAATGTTCTGTGACACA					
J-Avian Leucosis	En v	1626- 1644	J-ALV-Env -Probe	ATT TCC GTT GTC CCA GGG GTG G	1 9	58. 80	53%	12 2	
			J-ALV-Env	CAGGCCACGTTTTGTCAT GCC GAT TTT ACG CCT TCA	4				
			J-ALV-Env	TTCTTTGCGTTATGTCT TAC CGC TGT CTC CTC CG	3				
Chicken anemia	VP2	1243-	CAV-VP2-P	CAC CTC AAG CGA CTT CGA CGA A	2	57.	42%	16 0	
			CAV-VP2-F	CAGGCCACGTTTTGTCATGC GCC GAT TTT ACG CCT	4				
			CAV-VP2Ri	TTCTTTGCGTTATGTCTCTG TAC CGC TGT CTC CTC	3				

(3) 搭建了全新的通用多重PCR (GM RT-PCR) 检测方法, 解决了芯片检测过程中需要单独多次PCR扩增的“瓶颈”。

针对6种禽免疫抑制性疾病病毒, 建立了单毒株GM RT-PCR检测方法。反应体系和反应条件分别见表2和表3。各个毒株抽提病毒核酸后进行单亚型GM RT-PCR检测, 取10 μL于1.5%的琼脂糖凝胶上电泳检测, 均能特异性地扩增出所需要的目的条带, 与理论结果相符。各个亚型的扩增见图4。

表 2 GM RT-PCR 反应体系

组份	量/反应(μL)	终浓度
RNase-free water	21.5	
5× Qiagen one step RT-PCR buffer	10	1 ×
dNTP mix((10mM/each)	2	0.4mM
Mg ²⁺ (12.5mM)	10.00	2.5mM

super primer mixture (20 μ M~80 μ M)	1.5	0.6 μ M~2.4 μ M
RNase inhibitor(40U/ μ L)	0.25(10U/反应)	0.2U/ μ L
Qiagn one step RT-PCR enzyme mix(HotStarTaq DNA Polymerase)	2	
template(virual RNA)	2	
Single primer* (2 μ M~8 μ M)	0.75 μ M	0.05 μ M~0.2 μ M
Total	50	

*备注：在 GM RT-PCR 反应体积不同时，各引物和水应按比例调整

表3 GM RT-PCR 反应程序表

反应阶段	反应温度	反应时间	循环次数
逆转录	50 $^{\circ}$ C	35min	1
逆转录酶的灭活及热启动	95 $^{\circ}$ C	15min	1
富集阶段	变性	94 $^{\circ}$ C	30s
	褪火	52 $^{\circ}$ C	1min30s
	延伸	72 $^{\circ}$ C	1min
选择性扩增阶段	变性	94 $^{\circ}$ C	30s
	褪火和延伸	70 $^{\circ}$ C	1min30s
目标扩增阶段	变性	94 $^{\circ}$ C	30s
	褪火	55 $^{\circ}$ C	30s
	延伸	72 $^{\circ}$ C	30s
后延伸	72 $^{\circ}$ C	10min	1

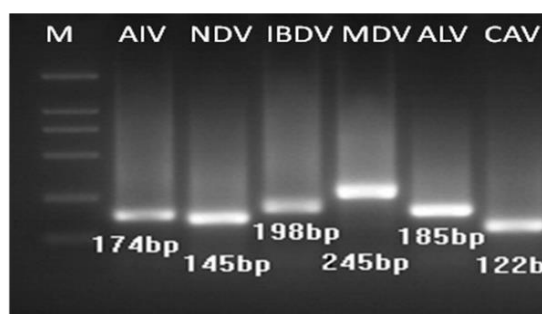


图4 各种家禽免疫抑制性病毒单亚型 GM RT-PCR 扩增后电泳检测结果

1. AIV, 2. NDV, 3. IBDV, 4. MDV, 5. ALV, 6. CAV

针对6种禽免疫抑制性疾病病毒，建立了双毒株GM RT-PCR检测方法。将A/Chicken/Hongkong/SZ-HI/1997(H5N1)、NDV-F48E9、IBDV-CJ801-BKF、CAV、ALV-J、MDV-1毒株两两混合后，进行GM RT-PCR检测，取10 μ L于1.5%的琼脂糖凝胶上电泳检测，均能特异性地扩增出所需要的目的条带，与理论结果相符（见表4）。各个毒株的扩增结果见图5。

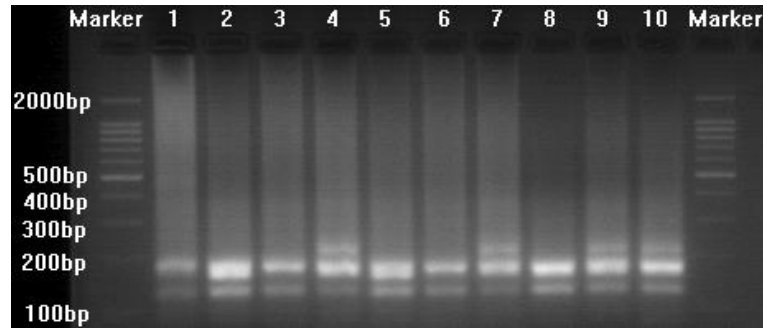


图 5 各种两两混合双毒株 GM RT-PCR 扩增后电泳检测结果
 1- AIV+NDV, 2- AIV +IBDV, 3- AIV +MDV, 4- AIV +ALV, 5- AIV + CAV,
 6- NDV+IBDV, 7- NDV+MDV, 8- NDV+ ALV, 9- NDV+ CAV

表 4 各种两两混合双毒株 GM RT-PCR 扩增结果

组合	AIV-M	NDV-F	IBDV-VP 2	MDV-PP38	J-ALV-En v	CAV-VP2	条带 总数	电泳 产物 条带 数
	174	145	185	218	122	160		
AIV+NDV	+	+					2	2
AIV+IBDV	+		+				2	2
AIV+MDV	+			+			2	2
AIV+J-ALV	+				+		2	2
AIV+CAV	+					+	2	2
NDV+IBDV		+	+				2	2
NDV+MDV		+		+			2	2
NDV+J-ALV		+			+		2	2
NDV+CAV		+				+	2	2
IBDV+MDV			+	+			2	2
IBDV+J-ALV			+		+		2	2
IBDV+CAV			+			+	2	2
IMDV+J-ALV				+	+		2	2
IMDV+CAV				+			2	2
J-ALV+CAV					+	+	2	2

针对家禽免疫抑制性病毒六种毒株 A/Chicken/Hongkong/SZ-HI/1997 (H5N1), NDV-F48E9, IBDV-CJ801-BKF, CAV、ALV-J、MDV-1 等建立了多重 GM RT-PCR 检测。能特异性地扩增出所需要的目的条带, 与理论结果相符。六毒株混合的 GM RT-PCR 检测结果见表 5, 各个亚型的扩增见图 6。

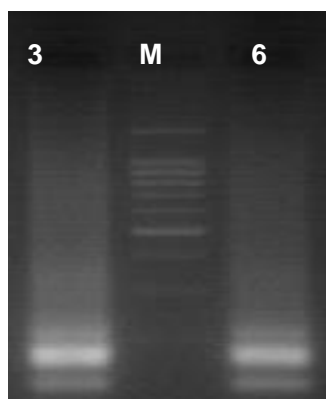


图 6 多个亚型家禽免疫抑制性病毒毒株混合后 GM RT-PCR 扩增后电泳检测结果

M -100bp DNA Ladder Marker, 3- AIV+NDV+IBDV, 6- AIV+NDV+IBDV+MDV+J-ALV+CAV

表 5 多毒株 GM RT-PCR 扩增结果

组合	AIV-M	NDV-F	IBDV-VP2	MDV-PP38	J-ALV-Env	CAV-VP2	条带总数	电泳产物条带数
	174	145	185	218	122	160		
AIV+NDV+IBD	+	+	+				3	2
AIV+NDV+IBDV+MDV+J-ALV+CAV	+	+	+	+	+	+	6	3

(4) 将家禽免疫抑制性病毒鉴别诊断GM RT-PCR检测方法与LiquiChip检测方法结合，建立了家禽免疫抑制性病毒GMPLex快速高通量鉴别诊断检测方法。

首先，建立了单毒株GMPLex检测体系。将各个毒株的探针与相应荧光编码的荧光编码微球偶联，分别只与各个毒株相应的GM RT-PCR反应扩增产物直接杂交后，进行单毒株GMPLex检测。结果各个参与计数的荧光编码微球在83个~356个之间，均 ≥ 20 个，表明用于计数的荧光编码微球数量有效，所产生的MFI值可信；各个荧光编码微球的空白对照MFI介于26~694之间，均 < 3000 ，表明结果有效，试验可以进行结果判定；GM RT-PCR反应扩增产物的MFI介于81~18826。通过计算LQRR_{CAV}值为1，表明CAV探针偶联的38号荧光编码微球与其他的GM RT-PCR扩增的阳性产物之间没有特异性的杂交，结果判定为阴性。其他探针与相应的GM RT-PCR扩增的阳性产物之间均有特异性的杂交，LQRR值介于3~27之间，表明均为阳性。各个单毒株GMPLex检测的MFI值和相应的LQRR结果见表6。

表 6 单毒株 GMPLex 检测 MFI 值

编码微球	33	34	35	36	37	38
探针	AIV	NDV	IBDV	MDV	ALV	CAV
MFI _B	180	621	80	38	149	73
MFI _S	976	2003	608	599	608	81
Cutoff	540	1863	240	114	447	219
LQRR	5	3	8	16	4	1
结果	+	+	+	+	+	-

将单毒株 GM RT-PCR 扩增产物纯化后，直接与混合探针进行杂交，结果各个参与计数的荧光编码微球在 30 个~243 个之间，均 ≥ 20 个，表明用于计数的荧光编码微球数量有效，所产生的 MFI 值可信；各个荧光编码微球的空白对照 MFI 介于 124~2839 之间，均 < 3000 ，表明结果有效，试验可以进行判定；GM RT-PCR 反应扩增产物的 MFI 值介于 9704~19047。混合探针与各个毒株的 GM RT-PCR 与扩增的阳性产物之间均有特异性的杂交，LQRR 值介于 7~109.7 之间，表明均为

阳性。各个 GMPLex 检测单毒株的 MFI 值和相应的 LQRR 结果见表 7。

表 7 单毒株 GMPLex 检测单毒株的 MFI 值

编码微球	33	34	35	36	37	38
探针	AIV	NDV	IBDV	MDV	ALV	CAV
MFI _B	1835	2839	143	233	647	216
MFI _{AIV}	12776					
LQRR _{AIV}	7					
MFI _{NDV}	14445					
LQRR _{NDV}	7.9					
MFI _{IBDV}	15689					
LQRR _{IBDV}	109.7					
MFI _{MDV}	15840					
LQRR _{MDV}	24.5					
MFI _{ALV}	14918					
LQRR _{ALV}	8.1					
MFI _{CAV}	15686					
LQRR _{CAV}	7.2					

接着，建立双毒株 GMPLex 检测方法。将双毒株 GM RT-PCR 扩增产物纯化后，直接与混合液中荧光编码微球上的探针进行杂交，结果各个参与计数的荧光编码微球在 27 个~246 个之间，均 ≥ 20 个，表明用于计数的荧光编码微球数量有效，所产生的 MFI 值可信；各个荧光编码微球的空白对照 MFI 同 3.3.2.1，均 < 3000 ，表明结果有效，试验可以进行判定；GM RT-PCR 反应扩增产物的 MFI 介于 6752~19233。混合探针与各个毒株的 GM RT-PCR 扩增的阳性产物之间均有特异性的杂交，LQRR 值介于 4~103 之间，表明均为阳性。各个 GMPLex 检测两两混合的双毒株的 MFI 值和相应的 LQRR 结果见表 8。

表 8 各个两两混合双毒株 GMPLex 检测 MFI 值

编码微球	33	34	35	36	37	38
探针	AIV	NDV	IBDV	MDV	ALV	CAV
MFI _B	1835	2839	143		647	216
MFI _{AIV+NDV}	12248	17824				
LQRR _{AIV+NDV}	6.7	14.3				
MFI _{AIV+IBDV}	14603		11380			
LQRR _{AIV+IBDV}	8		4			
MFI _{AIV+MDV}	13828			17377		

LQRR _{AIV+MDV}	7.5		14
MFI _{AIV+J-ALV}	13890		17467
LQRR _{AIV+J-ALV}	7.6		54.2
MFI _{AIV+CAV}	14142		12080
LQRR _{AIV+CAV}	7.7		4.3
MFI _{NDV+IBDV}	13937	14574	
LQRR _{NDV+IBDV}	7.6	22.5	
MFI _{NDV+MDV}	14124		17820
LQRR _{NDV+MDV}	7.7		55.3
MFI _{NDV+J-ALV}	12176		14871
LQRR _{NDV+J-ALV}	4.3		23
MFI _{NDV+CAV}	10562		13309
LQRR _{NDV+CAV}	3.7		93.1
MFI _{IBDV+MDV}		13893	14316
LQRR _{IBDV+MDV}		7.6	22.1
MFI _{IBDV+J-ALV}		10963	7892
LQRR _{IBDV+J-ALV}		88.4	45.9
MFI _{IBDV+CAV}		9193	7747
LQRR _{IBDV+CAV}		53.4	45

再者，建立多毒株 LiquiChip 检测方法。将三毒株 GM RT-PCR 扩增产物和六毒株 GM RT-PCR 扩增产物纯化后，直接与混合探针进行杂交，结果各个参与计数的荧光编码微球在 28 个~215 个之间，均 ≥ 20 个，表明用于计数的荧光编码微球足够，所产生的 MFI 值可信；各个荧光编码微球的空白对照 MFI 介于 26~694 之间，均 < 3000 ，表明各个荧光编码微球的背景信噪值不太高，试验可以进行判定；GM RT-PCR 反应扩增产物的 MFI 介于 6848~16400。混合探针与各个毒株的 GM RT-PCR 与扩增的阳性产物之间均有特异性的杂交，LQRR 值介于 3~99.9 之间，表明均为阳性。各个 GMPLex 检测多毒株的 MFI 值和相应的 LQRR 结果略。

(5) GMPLex 快速高通量检测方法的灵敏性试验

GMPLex 快速高通量检测方法检测单毒株的灵敏性试验。将禽流感病毒株 A/Chicken/Hongkong/SZ-HI/1997 (H5N1) 和 NDV-F48E9 抽提病毒 RNA 10 倍梯度稀释后，进行 GM RT-PCR 扩增、纯化，混合探针后进行 GMPLex 快速高通量检测。结果表明：GMPLex 快速高通量检测方法检测 M 基因的检测灵敏度为 10^{-5} ，LQRR 值约为 2.08，通过计算相当于 280 ELD₅₀；检测 NDV-F 基因的检测灵敏度为 10^{-5} ，LQRR 值约为 2.18，通过计算相当于 280 ELD₅₀。各个检测详细情况见表 9。

表9 GMPLex 检测单亚型和单毒株灵敏度比较

		单毒株检测灵敏度				
编码微球		33	34		编码微球	
样品/探针		RAIVH5	IVN1		样品/探针	
1	LQRR ₁₀ ⁻¹	7.1	9.81	LQRR ₁₀ ⁻¹	1	
2	LQRR ₁₀ ⁻²	6.38	8.16	LQRR ₁₀ ⁻²	2	
3	LQRR ₁₀ ⁻³	3.13	4.06	LQRR ₁₀ ⁻³	3	
4	LQRR ₁₀ ⁻⁴	2.09	2.11	LQRR ₁₀ ⁻⁴	4	
5	LQRR ₁₀ ⁻⁵	1.9	1.93	LQRR ₁₀ ⁻⁵	5	
6	LQRR ₁₀ ⁻⁶	<2	<2	LQRR ₁₀ ⁻⁶	6	
7	LQRR ₁₀ ⁻⁷	<2	<2	LQRR ₁₀ ⁻⁷	7	
8	LQRR ₁₀ ⁻⁸	<2	<2	LQRR ₁₀ ⁻⁸	8	
9	LQRR ₁₀ ⁻⁹	<2	<2	LQRR ₁₀ ⁻⁹	9	

采用 GMPLex 检测方法同时检测三毒株的灵敏度试验。将 A/Chicken/Hongkong/SZ-HI/1997 (H5N1), NDV-F48E9 和 IBV-CJ801-BKF 三株毒株抽提 RNA, 等量混合 10 倍梯度稀释, 连续稀释至 10⁻⁹。按照所建立的家禽免疫抑制性病毒 GMPLex 快速高通量鉴别诊断检测方法对各个梯度进行灵敏性检测。结果表明家禽免疫抑制性病毒 GMPLex 快速高通量鉴别诊断检测方法同时检测 A/Chicken/Hongkong/SZ-HI/1997 (H5N1), NDV-F48E9 和 IBV-CJ801-BKF 三株毒株灵敏度分别为 10⁻⁴、10⁻³和 10⁻⁵。

(6) GMPLex 快速高通量检测方法特异性试验

单毒株检测方法的特异性试验。将家禽免疫抑制性病毒 A/Chicken/Hongkong/SZ-HI/1997 (H5N1), NDV-F48E9, IBV-CJ801-BKF, MDV-1、ALV-J 和 CAV 各个毒株抽提核酸后, 分别按照所建立的单毒株 GM RT-PCR 进行扩增, 取 10 μL 于 3%的琼脂糖凝胶上电泳检测, 结果各个毒株只能扩增出相应的目的片段。

混合探针与单毒株 GM RT-PCR 特异性扩增产物之间的特异性试验。6 种编码的荧光编码微球混合液与 6 株单毒株 GM RT-PCR 阳性产物进行杂交, 计算相应的 LQRR 值。结果表明各个探针基本上只与相应的 GM RT-PCR 阳性产物产物特异性的强杂交信号。其中 IBV-VP2 探针、MDV-PP33 探针、CAV-VP2 探针非常特异, 与其他单毒株的 GM RT-PCR 阳性产物之间无交叉反应。AIV-M 探针与 NDV-F 基因的 GM RT-PCR 阳性产物之间、MDV-PP33 探针与 J-ALV-Env 基因的 GM RT-PCR 阳性产物之间均有少量的非特异性杂交信号。

(四) 与国内外相关标准及技术应用的对比情况

目前, 国内外均有 GMPLex 快速高通量检测方法的报道, 国外主要集中在临床医学疾病病原检测和兽药残留检测等方面的应用, 国内也有少量应用报道。但是国内外尚未有采用 GMPLex 快速高通量检测技术针对禽免疫性抑制病检测的内容报道, 因此本标准制定的检测方法是首创的。其主要优势和特点如下:

第一, 所建立的家禽免疫抑制性病毒 GMPLex 快速高通量鉴别诊断检测方法检测通量高, 可一次对 6 个目的基因的 6 种家禽免疫抑制性病毒进行鉴别诊断鉴定。

第二，所建方法快速，可在6 h内完成。

第三，所建方法灵敏度高，GMPLex快速高通量检测方法检测AIV-M基因的检测灵敏度为 10^{-5} ，LQRR值约为2.08，通过计算相当于280 ELD₅₀；检测NDV-F基因的检测灵敏度为 10^{-5} ，LQRR值约为2.18，通过计算相当于280 ELD₅₀。

第四，所建方法特异性强，通过两个引物和一个探针来确保各个亚型的特异性，家禽免疫抑制性病毒各个毒株之间交叉反应性低，该方法与其他病原体之间也无非特异性反应。

（五）实际应用效果

本标准方法经12家单位复检验证和应用，均表示检测效果良好，可以同时检测上述6种家禽免疫抑制性病毒，而且快速、准确，高通量。

三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

（一）主要试验或验证的分析

本标准研制过程中，收集的禽流感（AIV）各型毒株标准抗原（详见附件1），新城疫（NDV）3种基因型（VIg、VII d亚型、IX型）病毒抗原，传染性法氏囊病病毒（IBDV）6个亚型病毒抗原，马立克病毒（MDV）3个血清型病毒抗原（包括致癌性的1型，非致癌性的2型，火鸡疱疹病毒又简称HVT的3型），J亚型白血病病毒（ALV-J）抗原，鸡传染性贫血病毒（CIAV）抗原等病原材料，均采用HA、HI、和real-time RT-PCR等标准方法完成材料的验证，方才用于研制方法的特异性试验。方法的各项主要技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法操作规定等均是建立在大量实验室数据上的归纳和总结，也交给了8家单位进行了方法的复检验证。

（二）预期的经济效果

本标准采用了全新的高新检测技术，以6种禽病免疫抑制病为切入点，展开了动物疫病快速准确同检的领域，期望通过形成国标文本，更快地推进我国标准的技术水平，有利于与国际接轨，在提高检测时效和降低检测成本方面迈出重要一步，应用前景良好。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度

当前，尚未有类似疫病检测的国际标准，而本标准是借鉴了美国食品及药物管理局（FDA）制订的可同时检测多种血清型的大肠杆菌的液相芯片检测标准——“Luminex-based Suspension Array to Identify STEC O serogroups O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O157, eae and aggR”，同时将超级引物技术、荧光微球标记技术和液相芯片检测技术有机融合，建立了6种禽病免疫抑制病的液相芯片分子检测方法，并形成标准文本送审稿。

五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准符合当前相应法律法规的规定，相关疾病检测的标准没有强制性标准，因此本标准不存在与强制性标准的衔接、协调问题。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

在征求意见过程中，存在重大分歧的意见是专家提出“探针和微球的偶联效率确认很重要，建议给出验证的操作程序”的意见，制标小组经慎重考虑和深入研讨，只是部分采纳了此意见。原因是，当前探针合成，以及探针和微球偶联均可以交付专业公司完成，这些产品已经商品化生产，有严格的产品生产执行标准，因此未在标准中作为主要部分列出。但是针对探针和微球偶联效率确认的问题，在标准方法中是规定“所有试验均需设置阳性对照、阴性对照和空白对照，在三种对照都成立的情况下，检测结果才有效”。因此，当三种对照的检测结果显示正常时，可相应认为偶联达到有效比例，也能作为探针和微球偶联效率的一种确认方式。

七、标准性质（强制性，推荐性）的建议，特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

该项标准的性质建议为推荐性，标准中涉及的多种免疫抑制性疾病均有其他可以作为验证比对的检测方法标准，但是本标准作为这6种免疫抑制性疾病同时快速检测的标准文本，是上述已发布的多个标准的有益补充，也是对国际认可的高新检测技术应用到我国国标领域的一次有益探索和开拓。

八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）

该项技术标准的制定，试验数据充分，科学性强，并经过了长期大量实际应用，适用于禽流感、新城疫、马立克、传染性法氏囊、鸡传染性贫血和J亚型禽白血病等六种家禽免疫抑制性疾病的快速鉴定检测，可作为国家推荐性标准，在全国对这6种禽免疫抑制病的诊断、检测、检疫工作中进一步推广应用。

建议本标准尽快颁布实施。本标准发布实施后，建议组织标准应用部门或单位以举办国家标准培训班的形式推广本标准。

九、废止现行有关标准的建议

当前，关于禽流感、新城疫、马立克、传染性法氏囊、鸡传染性贫血、J亚型禽白血病等六种家禽免疫抑制性疾病检测的国家标准和行业标准，均未有涉及采用液相芯片技术进行检测的方法，因此没有关于废止现行有关标准的建议。

十、其他应予说明的事项。

根据国家标准化管理委员会2008年下达的国家标准制订计划和要求进行编制，项目任务编号为20079724-T-326。其后，制标小组经研究，鉴于家禽免疫抑制性疾病包括法氏囊、马力克、网状内皮增生症、球虫、流感、白血病等多种，而本标准的检测对象只包括了其中的6种，《家禽免疫抑制病液相芯片检测方法》的名字容易引发歧义。同时，借鉴美国食品及药物管理局（FDA）制订的液相芯片标准“Luminex-based Suspension Array to Identify STEC O serogroups O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, O157, eae and aggR”的命名方式，在标准名称中清晰列出检测对象，避免引发歧义，误认为《家禽免疫抑制病液相芯片检测方法》可以检测所有的家禽免疫抑制病。因此，项目组提

出申请，将《家禽免疫抑制病液相芯片检测方法》更名为《禽流感、新城疫、马立克、传染性法氏囊、鸡传染性贫血、J亚型禽白血病等六种家禽免疫抑制性疾病液相芯片分子检测方法》。这样，可以一目了然知道液相芯片所要检测的对象。并于2016年6月20日获得了标准管理部门全国动物卫生标准化技术委员会的审批同意。

附件 1

流感毒株标准抗原（已灭活）清单

毒株名称	血清型		宿主	来源
	H型	N型		
A/szciq-1/2001 (H1N1)	H1	N1	porcine	深圳局动植中心保存
A/szcdc0621/2009 (pdmH1N1)	H1 pdm	N1	human	深圳CDC
A/Singapore/1/1957 (H2N2)	H2	N2	human	深圳CDC
A/Mallard/Germany/SR517/2007 (H2N3)	H2	N3	avian	华南农大
A/mallard/Germany/R2711/07 (H2N9)	H2	N9	avian	上海巴氏德研究所
A/HongKong/1/1968 (H3N2)	H3	N2	Human	深圳局保健中心
A/ szciq-32/42/2002 (H3N2)	H3	N2	porcine	深圳局动植中心
A/mallard/Germany/R2619/2007 (H3N6)	H3	N6	avian	上海巴氏德研究所
A/mallard/Germany/Wv1303-04/2003 (H3N8)	H3	N8	avian	上海巴氏德研究所
A/mallard/China/Wv51/2005 (H4N2)	H4	N2	avian	华南农大
A/mallard/Germany/Wv1754-57/2003 (H4N6)	H4	N6	avian	华南农大
A/HongKong/156/1997 (H5N1; HP)	H5	N1	human	香港大龙化验室
H5N1(Re-4)HI, A/chicken/Shanxi/2/2006 (Clade 7)	H5	N1	avian	哈兽研
H5N1(Re-5)HI, A/duck/Anhui/1/2006 (Clade 2.3.4)	H5	N1	avian	哈兽研
H5N1(Re-6)HI , A/duck/Guangdong/S1322/2010 (Clade 2.3.2.1)	H5	N1	avian	哈兽研
H5N1(Re-7)HI A/chicken/Liaoning/S4092/2011(Clade7.2.4)	H5	N1	avian	哈兽研
H5N1(Re-8)HI, A/Chicken/GuiZhou/4/2013 (Clade 2.3.4.4)	H5	N1	avian	哈兽研
Re-1灭活疫苗	H5	N1	avian	哈药集团生物疫苗有限公司
Re-4灭活疫苗	H5	N1	avian	
Re-5灭活疫苗	H5	N1	avian	
Re-6灭活疫苗	H5	N1	avian	
Re-7灭活疫苗	H5	N1	avian	
Re-8灭活疫苗	H5	N1	avian	
新流腺三联灭活疫苗	H5	N1	avian	

禽流感二价苗(Re-6+Re-4)	H5	N1	avian	广东永顺
H5N2(D7)灭活疫苗	H5	N2	avian	华大生物
禽流感二价灭活疫苗	H5	N1	avian	青岛易邦
禽流感二价灭活疫苗 H5+H9	H5	N1	avian	哈兽研
重组禽流感病毒H5亚型二价灭活疫苗(Re-6株+Re-8株)	H5	N1	avian	哈尔滨维科生物技术开发总公司
重组禽流感病毒H5亚型三价灭活疫苗(Re-6株+Re-7株+Re-8株),	H5	N1	avian	
重组禽流感病毒H5亚型二价灭活疫苗(Re-6株+Re-10株)	H5	N1	avian	
重组禽流感病毒H5亚型三价灭活疫苗(Re-7株+Re-8株+Re-10株)	H5	N1	avian	
A/Chicken/China/R11/2006 (H5N6; HP)	H5	N6	avian	华南农大
A/Chicken/China/R23/2012 (H5N8)	H5	N8	avian	华南农大
A/Human/China/2015 (H5N6)	H5	N6	Human	深圳CDC
A/ostrich/Germany/R5-10/2006 (H5N3, LP)	H5	N3	avian	上海巴氏德研究所
A/mallard/British Columbia/544/2005 (H5N9)	H5	N9	avian	上海巴氏德研究所
A/turkey/Germany/R30/1999 (H6N1)	H6	N1	avian	佛山科技大学
A/avian/Israel/289/2001 (H6N2)	H6	N2	avian	深圳局
H7 HI	H7	N2	avian	哈兽研
H7N9 HI	H7	N9	avian	哈兽研
A/chicken/China/412/2015(H7N9)	H7	N9	avian	华南农大
A/chicken/China/306/2016(H7N9,HP)	H7	N9	avian	华南农大
A/Human/China/2014 (H7N9)	H7	N9	avian	深圳CDC
A/duck/Potsdam/15/1980 (H7N7; LP)	H7	N7	avian	上海巴氏德研究所
H9 HI 1999	H9	N2	avian	哈兽研
H9 HI2002	H9	N2	avian	
H9 HI 2006	H9	N2	avian	
H9 HI 2010	H9	N2	avian	
H9 HI 2015	H9	N2	avian	
H9 HI 2017	H9	N2	avian	
H9N2疫苗(SS株)	H9	N2	avian	广东CIQ提供
H9N2疫苗(F株)	H9	N2	avian	上海CIQ提供
H9N2疫苗(SD696株)	H9	N2	avian	山东CIQ提供
H9N2疫苗(LG1株)	H9	N2	avian	齐鲁动保
H9N2疫苗(RE-2株)	H9	N2	avian	哈兽研
H9N2疫苗(HL株)	H9	N2	avian	河南普莱柯
H9N2疫苗(HP株)	H9	N2	avian	河北保定瑞普

H9N2疫苗(JY株)	H9	N2	avian	哈药集团
H9N2疫苗(HY106株)	H9	N2	avian	北京兽医生物
H9N2疫苗(WD株)	H9	N2	avian	乾元浩
H9N2疫苗(NJ02株)	H9	N2	avian	南京天邦
H9N2疫苗(YBF003株)	H9	N2	avian	青岛易邦
H9N2疫苗(SS株)	H9	N2	avian	青岛奥兰百特
A/Chicken/Shenzhen/922/2002(H9N2)	H9	N2	avian	深圳局动植中心保存
A/Chicken/Shenzhen/923/2006(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/924/2002(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/925/2002(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/926/2004(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/927/2002(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/928/2002(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/929/2001(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9210/2000(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/jiling/9211/2004(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9212/2003(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9213/2000(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9214/2000(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9215/2005(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9216/2000(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9217/2001(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9218/2002(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9219/2002(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9220/2002(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9221/2002(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9222/2003(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9223/2005(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Duck//Shenzhen/9224/2006(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9225/2007(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9226/2007(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9227/2008(H9N2)	H9	N2	avian	
A/avian/Israel/232/2001 (H10N7)	H10	N7	avian	