

ICS 11.220
CCS B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 18936—2025

代替 GB/T 18936—2020, GB/T 19438.1~19438.4—2004, GB/T 19439—2004, GB/T 19440—2004

禽流感诊断技术

Diagnostic techniques for avian influenza



2025-01-24 发布

2025-08-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 生物安全措施	2
6 临床诊断	2
7 样品采集、保存与运输	3
8 实验室诊断	4
9 综合判定	7
附录 A(规范性) 样品稀释液的配制	9
附录 B(规范性) IVPI 测定试验	10
附录 C(资料性) RT-PCR 引物序列及反应体系配制	12
附录 D(资料性) 实时荧光 RT-PCR 引物探针序列及反应体系配制	14
附录 E(资料性) HA 和 HI 试验所用溶液和 1% 红细胞的配制	16
附录 F(资料性) HI 试验中 4 HAU 抗原配制示例	17
附录 G(资料性) 血清非特异性凝集和非特异性抑制因子的处理方法	18
参考文献	19

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 18936—2020《高致病性禽流感诊断技术》，整合了 GB/T 19438.1—2004《禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法》、GB/T 19438.2—2004《H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》、GB/T 19438.3—2004《H7 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》、GB/T 19438.4—2004《H9 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》、GB/T 19439—2004《H5 亚型禽流感病毒 NASBA 检测方法》、GB/T 19440—2004《禽流感病毒 NASBA 检测方法》的内容。与 GB/T 18936—2020 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了标准适用范围，将高致病禽流感诊断技术扩展为禽流感技术（见第 1 章，2020 年版的第 1 章）；
- b) 删除了术语和定义的具体内容（见 2020 年版的第 3 章）；
- c) 增加了缩略语（见第 4 章）；
- d) 增加了生物安全措施（见第 5 章）；
- e) 更改了临床诊断的部分内容（见第 6 章，2020 年版的第 4 章）；
- f) 增加了样品保存和运输的技术要求，增加了羽绒、羽毛、牛皮样品采集的技术要求（见第 7 章）；
- g) 增加了羽绒、羽毛、牛皮样品处理的技术要求（见 8.1.3）；
- h) 更改了“综合判定”的内容（见第 9 章，2020 年版的第 10 章）；
- i) 更改了样品稀释液的配制（见附录 A，2020 年版的附录 A）；
- j) 将 IVPI 测定试验由资料性附录调整为规范性附录（见附录 B，2020 年版的附录 B）。

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专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会（SAC/TC 181）归口。

本文件起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国海关科学技术研究中心、中国动物卫生与流行病学中心、上海海关动植物与食品检验检疫技术中心。

本文件主要起草人：王秀荣、田国彬、刘环、刘华雷、李健、高志强、蒋文明、史喜菊、邓国华、施建忠、曾显营、李雁冰、武嘉男、谷强、孙晓东、陈化兰。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2003 年首次发布为 GB/T 18936—2003，2020 年第一次修订；

——本次为第二次修订，并入 GB/T 19438.1~19438.4—2004、GB/T 19439—2004、GB/T 19440—2004 的相关技术内容。

引 言

禽流感(Avian influenza, AI)是由禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的一种以禽类为主的感染和/或疫病综合征。

AIV 属于正黏病毒科 A 型流感病毒属,国际病毒分类委员会(ICTV)2019 年修订为 α 流感病毒属。A 型流感病毒是唯一已知感染禽类的正黏病毒,从禽类分离到 16 个 HA 亚型(H1~H16)和 9 个 NA 亚型(N1~N9);另有从蝙蝠中新确认的亚型(H17 和 H18)。AIV 根据病毒致病性不同,分为高致病性禽流感病毒(Highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV)和低致病性禽流感病毒(Low pathogenic avian influenza virus, LPAIV)。至今,导致鸡、火鸡和其他经济禽类发生急性临床症状的 HPAIV 都是 H5 或 H7 亚型,并不是所有的 H5 或 H7 亚型都是高致病性的,有的 H5 和 H7 亚型流感病毒致病性不高,但这类病毒具有通过变异成为高致病性病毒的风险。世界动物卫生组织(WOAH)将 HPAI 以及 LPAIV 在家禽中毒力突然增加或可自然传播给人类并造成严重后果的低致病性禽流感(Low pathogenic avian influenza, LPAI),列为须通报的动物疫病。

AIV 宿主广泛,鸡、火鸡、鸭、鹅、鹌鹑、雉鸡、鹧鸪、鸵鸟、孔雀等多种禽类易感,多种野鸟也可能感染发病甚至死亡;猪、奶牛、犬、猫、水貂、赤狐、狼、海狮、海豹等哺乳动物偶有感染。家禽和野禽是 AIV 的主要宿主,受疫情影响大、与民生和贸易关系密切的是家禽,因此本文件中描述的临床症状和剖检变化以家禽为主。AIV 是单股、负链、分节段的 RNA 病毒,基因容易发生变异,突变成新的流感病毒变异株,因此,针对 RT-PCR 试验方法和实时荧光 RT-PCR 试验方法,在附录中仅给出了部分常见的 HA 和 NA 亚型引物,若进行新变异株或者其他亚型(如 H3)鉴定,需设计出相应引物进行检测。

本文件的修订参考了 WOAH《陆生动物诊断试验和疫苗手册》,并结合了我国相关技术研究新成果。

禽流感诊断技术


1 范围

本文件描述了禽流感病毒(AIV)感染的临床诊断、样品采集、保存与运输,以及病毒分离与鉴定、血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验、RT-PCR方法和实时荧光 RT-PCR方法等实验室诊断方法,规定了生物安全措施的相关要求。

本文件适用于 AIV 的诊断和产品中 AIV 检测,包括但不限于禽肉、羽绒、羽毛、牛肉、牛乳、牛皮。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 19489 实验室  生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AI:禽流感(Avian Influenza)

AIV:禽流感病毒(Avian Influenza Virus)

Ct:循环阈值(Cycle Threshold)

DEPC:焦碳酸二乙酯(Diethyl Pyrocarbonate)

HA:血凝(Haemagglutination)

HI:血凝抑制(Haemagglutination Inhibition)

HPAI:高致病性禽流感(Highly Pathogenic Avian Influenza)

HPAIV:高致病性禽流感病毒(Highly Pathogenic Avian Influenza Virus)

IVPI:静脉内接种致病指数(Intravenous Pathogenicity Index)

LP AI:低致病性禽流感(Low Pathogenic Avian Influenza)

LPAIV:低致病性禽流感病毒(Low Pathogenic Avian Influenza Virus)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

PCR:聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction)

RNA:核糖核酸(RiboNucleic Acid)

RT-PCR:反转录-聚合酶链反应(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

SPF:无特定病原体(Specific Pathogen Free)

5 生物安全措施

进行 AI 诊断和检测时,如动物剖检、样品采集与处理、核酸提取、病毒分离和致病性试验等,按照 GB 19489 的规定执行。

6 临床诊断

6.1 流行病学

6.1.1 易感动物主要包括鸡、火鸡、鸭、鹅、鹌鹑、雉鸡、鹧鸪、鸵鸟、孔雀、野鸟等,猪、奶牛、猫、海狮、海豹、鲸、貂、虎、狐狸、羊等哺乳动物也可偶发感染。

6.1.2 传染源主要为病/死禽和携带禽流感病毒的健康禽类,也可为携带禽流感病毒的奶牛等哺乳动物。

6.1.3 传播途径主要通过直接接触感染禽类、其他动物或其分泌物、排泄物,也可通过接触被病毒污染受污染的环境、饲料、水、生牛奶和设备等物品传播。

6.2 临床症状

6.2.1 发病禽临床症状

6.2.1.1 病禽精神沉郁,嗜睡,头翅下垂,呆立,采食和饮水量下降;有呼吸道症状,鼻内有分泌物,有时咳嗽,严重者呼吸困难;产蛋禽出现产蛋下降,软壳蛋、破蛋、沙壳蛋、畸形蛋等增多;排黄、白、绿色稀便,含未完全消化的饲料。

6.2.1.2 病禽颜面和肉髯水肿;鸡冠和肉垂发绀,一般尖部更明显;眼结膜发红;脚鳞或有出血;口、鼻或有出血。

6.2.1.3 有共济失调等神经症状,特别是水禽发病后期神经症状较明显。

6.2.1.4 发病率高,死淘率突然增加;有的病禽急性经过无明显症状而急性死亡。

6.2.2 奶牛及其他动物的临床症状

6.2.2.1 患病奶牛采食量减少,反刍时间缩短;鼻分泌物增加,产奶量下降,牛奶发黄变稠,有时有凝固。

6.2.2.2 感染猫死前临床表现为精神状态抑郁、肢体动作僵硬、共济失调、失明、打转和大量眼鼻分泌物。

6.2.2.3 其他动物有体温升高、呼吸困难、食欲下降等传染病常见临床症状。

6.3 病理变化

6.3.1 眼观变化

6.3.1.1 病禽喉头和气管黏膜重度充血、出血,个别有黏液,气管内有浆液性或干酪样渗出物,有时可见栓塞;肺充血、出血、水肿;腹腔有浑浊的炎性分泌物;气囊膜上有时可见浆液性和粟米粒大小的黄色干酪样炎性分泌物;产蛋禽卵巢及输卵管水肿、充血、出血及萎缩,卵泡充血、出血、萎缩、破裂,有的可见“卵黄性腹膜炎”。

6.3.1.2 病禽心冠脂肪及心内膜、心外膜出血,有时可见心肌白色条纹状坏死。

6.3.1.3 病禽消化道黏膜广泛出血,一般十二指肠黏膜和盲肠扁桃体出血严重;腺胃乳头及腺胃和肌胃交界处出血,有的肌胃也有出血,腺胃黏膜上常有大量脓性分泌物。

6.3.1.4 病禽胰腺常有灰白色坏死点或坏死灶;肾脏肿大,有时有尿酸盐沉积。

6.3.1.5 感染奶牛鼻腔有黏液、患病乳腺萎缩、结构不清,有炎性分泌物。

6.3.1.6 患病猫皮下组织轻度出血,多灶性脑膜出血。

6.3.2 病理组织学变化

6.3.2.1 感染禽组织学检查显示广泛性肺炎,包括间质性肺炎、支气管上皮细胞变性和坏死、肺泡内出血和炎性细胞浸润;心肌可能出现变性、坏死和炎性细胞浸润;肝脏变性、坏死和炎性细胞浸润;胰腺出现坏死性变化;肾脏可能出现肾炎变化,包括肾小管变性和坏死;脾脏可能出现急性脾炎;脑血管充血、胶质细胞增生和神经元变性。

6.3.2.2 感染奶牛组织学检查显示中性粒细胞和淋巴浆细胞性乳腺炎,管状腺结构明显消失,乳腺多个小叶中充满中性粒细胞和细胞碎片;或可见淋巴细胞性肝炎、淋巴浆细胞间质性肾炎和淋巴细胞性皱胃炎。

6.3.2.3 感染猫有轻度至中度多发性淋巴组织细胞性脑膜脑炎,伴有多处实质细胞和神经元坏死。

6.4 鉴别诊断

家禽感染禽流感病毒后临床症状和病理变化与新城疫、传染性支气管炎、支原体等其他病原感染有类似之处,需经实验室开展病原学或血清学鉴别诊断。

6.5 临床判定

出现 6.2 和 6.3 中的一条或多条情况,初步判为 AI 临床可疑病例;可疑病例需采集拭子、脏器组织、血清,或其他可能受污染物,如羽绒、羽毛、牛皮、生牛奶、污水、环境擦拭样品等,进行实验室确诊。

7 样品采集、保存与运输

7.1 总则

样品采集宜选择在发病初期、具有典型临床症状的发病动物,采集样品过程中避免交叉污染。死亡动物采集气管、肺和脑等组织样品,分别进行包装处理;温顺活动物可采集咽喉和/或泄殖腔拭子,猛兽和小珍禽可采集新鲜粪便,奶牛可采集牛奶、深部鼻拭子等。

7.2 拭子样品采集

采样拭子宜选用聚酯、尼龙等非棉质、非藻酸钙材质的拭子。采集咽喉拭子时将拭子深入喉头及上颚裂来回刮 2 次~3 次并旋转,取分泌液。采集泄殖腔拭子时将拭子深入泄殖腔旋转 2 圈~3 圈并蘸取少量粪便。将采样后的拭子分别放入盛有 1.2 mL 样品稀释液(配制方法按附录 A 执行)的 2 mL 采样管中,编号并填写相应采样单。

7.3 组织样品采集

可采集气管、肺、脑、肠(包括内容物)、肝、脾、肾、心、肌肉等组织脏器,各组织脏器分别装入无菌采样袋或其他灭菌容器,编号并填写相应采样单。

7.4 血清样品采集

无菌采集禽类的血液,每只约 2 mL(珍禽采集 1 mL),编号并填写相应采样单。血清析出后,分离血清。可根据需要采集双份血清,急性期采集 1 份,恢复期采集 1 份。

7.5 羽绒、羽毛、牛皮、生牛奶样品采集

分部位、分点各取一小部分羽绒、羽毛或剪碎的牛皮(5 g~10 g)放入均质袋或其他灭菌容器中,编号并填写相应采样单。生牛奶样品采集 5 mL,放入无菌试管中,编号并填写相应采样单。

7.6 样品保存和运输

样品采集后用次容器(密封盒或密封袋)做二次包装,防渗漏。然后将样品置外包装保温箱中,加入预冷的冰袋,密封,尽可能 24 h 内送至实验室,并尽快处理。如 24 h 不能送到实验室,样品从采集到实验室处理阶段,需在 2℃~8℃保存,不可超过 4 d;如要保存更长时间,则需保存在-80℃,已经冻存的样品运输时推荐使用干冰运送。避免反复冻融。

8 实验室诊断

8.1 病毒分离与鉴定

8.1.1 样品处理

8.1.1.1 将拭子充分捻动、挤干后弃去拭子;样品液经 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。

8.1.1.2 粪便、研碎的组织加样品稀释液(配制方法按附录 A)充分研磨,按 1 g 样品加 10 mL 稀释液的比例配成悬液。样品液经 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液。

8.1.1.3 羽绒、羽毛、牛皮样品加入生理盐水约 50 mL,没过样品,充分揉捏,待羽绒、羽毛、牛皮吸足水分后,再放置在均质器中拍打均匀(或采用其他等效研磨方法),样品液经 3 000 r/min 离心 10 min,取上清。生牛奶可适当做除菌处理。

8.1.2 样品接种及收获

取处理好的样品,经尿囊腔途径接种 9 d~11 d 无特定病原体(SPF)鸡胚,各接种 5 枚胚,0.2 mL/胚,37℃孵育,18 h 后每隔 6 h~12 h 照胚。无菌收取 18 h 后死胚及 72 h 仍存活鸡胚的鸡胚尿囊液,检测尿囊液 HA 活性。

8.1.3 病毒鉴定

若无 HA 活性,则收取尿囊液进行盲传,至少盲传 1 代,最多盲传 3 代。若仍无 HA 活性,则认为病毒分离阴性;若有 HA 活性,可进一步采用 RT-PCR 方法(见 8.2)或实时荧光 RT-PCR 方法(见 8.3)、HA 和 HI 试验(见 8.4)等方法进行病毒鉴定。病毒致病性可通过 IVPI 测定试验(按照附录 B 进行)和 HA 裂解位点序列测定结果进行判定。

8.2 RT-PCR 方法

8.2.1 仪器设备

8.2.1.1 PCR 扩增仪及配套反应管。

8.2.1.2 高速台式冷冻离心机(离心速度不低于 12 000 r/min)。

8.2.1.3 II 级生物安全柜。

8.2.1.4 微量移液器(5 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL)及配套吸头与 1.5 mL 离心管。

8.2.1.5 电泳仪。

8.2.1.6 电泳槽。

8.2.1.7 紫外凝胶成像仪。

8.2.1.8 核酸自动提取仪。

8.2.2 试剂材料

8.2.2.1 RT-PCR 引物序列,见附录 C 中 C.1。

8.2.2.2 RT-PCR 反应体系,配制方法见 C.2。

8.2.2.3 阴性对照为 SPF 鸡胚尿囊液。

8.2.2.4 阳性对照为经 β -丙内酯灭活且 Ct 值 \leq 30 的相应亚型 AIV 鸡胚培养物,或核酸质控品。

8.2.3 RNA 提取

经 8.1.1 处理的样品,取 100 μ L~300 μ L 提取 RNA。核酸提取可选常用柱式法或磁珠法商品化 RNA 提取试剂盒,按说明书进行。

8.2.4 RT-PCR 操作

取 2.5 μ L(约 250 ng)提取的 RNA 加入 RT-PCR 反应体系中,置于 PCR 仪中,记录反应管对应的样品编号。循环参数为:45 $^{\circ}$ C 逆转录 45 min;94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s、52 $^{\circ}$ C 45 s、68 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环;最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

8.2.5 电泳

PCR 产物按比例加上样缓冲液,取 10 μ L 转移至 1.5% 琼脂糖凝胶梳孔中,120 V 电泳约 20 min,直至染料移动至凝胶前沿后,停止电泳。取出凝胶在紫外观测仪上观察结果,进行分析。

8.2.6 结果判定

8.2.6.1 在阳性对照出现相应扩增带、阴性对照无此扩增带时实验结果成立。依据扩增时使用通用或亚型特异性引物进行判定。

8.2.6.2 用 M-U/M-L 引物扩增,出现预期大小约 229 bp 的扩增片段时判定为 AIV 核酸检测阳性,否则判定为 AIV 核酸检测阴性。

8.2.6.3 用 H5-U/H5-L 引物扩增,出现预期大小约 392 bp 的扩增片段时判定为 H5 亚型 AIV 核酸检测阳性,否则判定为 H5 亚型 AIV 核酸检测阴性;使用其他引物扩增,出现预期大小的扩增片段时,判定为该引物代表的亚型 AIV 核酸检测阳性,否则判定为该引物代表的亚型 AIV 核酸检测阴性。RT-PCR 阳性的样品需要进一步测序和序列比对。

8.3 实时荧光 RT-PCR 方法

8.3.1 仪器设备

8.3.1.1 荧光定量 PCR 仪。

8.3.1.2 其余器材同 8.2.1.2~8.2.1.4。

8.3.2 试剂及引物探针序列

推荐的实时荧光 RT-PCR 引物探针序列见附录 D 中 D.1。阴性和阳性对照同 8.2.2.3、8.2.2.4。

8.3.3 样品核酸的提取

同 8.2.3。

8.3.4 实时荧光 RT-PCR 操作

8.3.4.1 扩增试剂的准备与配制

根据需要检测的样品数量,按推荐的实时荧光 RT-PCR 反应体系配制方法(见 D.2)配制反应体系,充分混匀后分装,每个反应管 15 μL 。转移反应管至样品制备区。

8.3.4.2 加样

在 8.3.4.1 的反应管中分别加入 8.3.3 中制备的 RNA 溶液 5 μL (约 500 ng 总 RNA),使每管总体积达到 20 μL ,记录反应管对应的样品编号。

应注意操作过程中,严防不同样品间的交叉污染。反应液分装时避免产生气泡,上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄漏污染仪器。

8.3.4.3 反应参数设定

将 8.3.4.2 中加样后的反应管放入荧光定量 PCR 仪内,编辑样品表后,选定与探针标记荧光基团相符合的检测通道读取荧光信号值。推荐的实时荧光 RT-PCR 反应参数设定见 D.3。

8.3.5 结果判定

8.3.5.1 结果分析条件设定

综合分析仪器读取的各项数据及扩增曲线,设定合理的阈值(Threshold)和基线(Baseline),使仪器显示正确的结果。

8.3.5.2 质控标准

8.3.5.2.1 阴性对照检测通道读取数据无 Ct 值,并且无特征性扩增曲线。

8.3.5.2.2 阳性对照检测通道读取数据出现特征性扩增曲线,且 Ct 值 ≤ 30 。

8.3.5.2.3 如阴性和阳性对照不满足以上条件,此次试验视为无效。

8.3.5.3 结果描述及判定

8.3.5.3.1 若测定样品 Ct 值 ≤ 30 ,依据所用引物探针判为相对应 AIV 型或亚型核酸检测阳性。

8.3.5.3.2 若测定样品 $30 < \text{Ct 值} \leq 35$,有典型扩增曲线,判为相对应 AIV 型或亚型核酸检测可疑。可疑样品需重新提取核酸进行重复测定后仍在可疑区间的样品判为阳性。

8.3.5.3.3 若测定样品无 Ct 值或 Ct 值 > 35 ,判为相对应 AIV 型或亚型核酸检测阴性。

8.4 HA 和 HI 试验

8.4.1 试剂材料

8.4.1.1 阿氏(Alsevers)液,配制方法见附录 E 中 E.1。

8.4.1.2 1%(体积分数)鸡红细胞悬液,配制方法见 E.2。

8.4.1.3 pH 7.2、0.01 mol/L PBS。

8.4.1.4 AIV HA 分型参考抗原、参考阳性血清、阴性血清。

8.4.2 HA 试验(微量法)步骤

8.4.2.1 在 96 孔 V 形微量反应板中,每孔加 25 μL PBS。

8.4.2.2 第 1 孔加 25 μL 抗原或病毒液,反复吹吸混匀。

8.4.2.3 从第 1 孔吸取 25 μL 抗原或病毒液加入第 2 孔,混匀后吸取 25 μL 加入第 3 孔,进行 2 倍系列稀释至第 11 孔,从第 11 孔吸取 25 μL 弃去。第 12 孔为 PBS 对照孔。

8.4.2.4 每孔加 25 μL PBS。

8.4.2.5 每孔加入 25 μL 1%(体积分数)鸡红细胞悬液。

8.4.2.6 轻扣反应板混合反应物,室温(约 20 $^{\circ}\text{C}$)静置 40 min,环境温度过高时可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 60 min,当对照孔的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。判定时,将反应板倾斜 60 $^{\circ}$ 角,观察红细胞有无泪珠状流淌,完全无泪珠样流淌(100%凝集)的最高稀释倍数判为 HA 效价。

8.4.3 HI 试验(微量法)步骤

8.4.3.1 根据 HA 试验测定的效价配制 4 个血凝单位(即 4 HAU)的抗原/病毒,配制方法见附录 F。

8.4.3.2 鸡血清不需要处理,可直接进行检测;若为水禽或奶牛等血清,建议将血清进行预处理,处理方法见附录 G。

8.4.3.3 在 96 孔 V 形微量反应板中,第 1 孔~第 11 孔加入 25 μL PBS 第 12 孔加入 50 μL PBS 作为空白对照。第 1 孔加入 25 μL 血清,与 PBS 充分混匀后吸 25 μL 于第 2 孔;若血清经过预处理,第 1 孔不加 PBS,直接加处理过的血清 25 μL ,第 2 孔加入处理过的血清 25 μL ,与 PBS 充分混匀后吸 25 μL 于第 3 孔。依次 2 倍稀释至第 10 孔,从第 10 孔吸取 25 μL 弃去。第 11 孔作为抗原对照。单独设立两行对照,一行加阳性血清,一行加阴性血清。

8.4.3.4 第 1 孔~第 11 孔均加入 25 μL 4 HAU 抗原,在室温(约 20 $^{\circ}\text{C}$)下静置 30 min 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 60 min。

8.4.3.5 每孔加入 25 μL 1%(体积分数)鸡红细胞悬液,轻轻混匀,在室温(约 20 $^{\circ}\text{C}$)下静置 40 min 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 60 min,空白对照孔(12 孔)红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

8.4.4 结果判定

8.4.4.1 当抗原/病毒对照孔(第 11 孔)完全凝集,且阴性对照血清抗体效价不高于 1:4,阳性对照血清抗体效价与已知效价误差不超过 1 个滴度时,试验结果方可成立。以完全抑制 4 HAU 抗原/病毒的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 抗体效价。

8.4.4.2 用于检测抗原/病毒时,能够被某亚型 AIV 参考阳性血清特异性抑制,HI 抗体效价 \geq 1:16 时判定为该亚型 AIV 阳性;1:2 \leq HI 抗体效价 \leq 1:8 判为该亚型 AIV 疑似,应结合其他病毒检测方法进行鉴定;无 HI 抗体效价判为该亚型 AIV 阴性。

8.4.4.3 用于检测抗体/血清时,免疫禽 HI 抗体效价 \leq 1:8 判为阴性,HI 抗体效价 \geq 1:16 判为阳性。

8.4.4.4 若血清进行了预处理,当抗原/病毒对照孔(第 11 孔)完全凝集,且阴性对照血清抗体效价 $<$ 1:10,阳性对照血清抗体效价与已知效价误差不超过 1 个滴度时,试验结果方可成立。以完全抑制 4 HAU 抗原/病毒的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 抗体效价。用于检测抗原/病毒,能够被某亚型 AIV 参考阳性血清特异性抑制,HI 抗体效价 \geq 1:20 时判定为阳性;血清抗体效价 $<$ 1:10 判为阴性;用于检测免疫水禽抗体/血清时,血清 HI 抗体效价 $<$ 1:10 判为阴性,血清 HI 抗体效价 \geq 1:10 判为阳性;用于未免疫水禽或哺乳动物感染病毒诊断依据时,HI 抗体效价 \geq 1:20 判为阳性。

9 综合判定

9.1 临床上判为可疑病例,且 M 基因的 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 核酸检测阳性,可判为 AI 病例;经 H5 或 H7 HA 基因的 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 核酸检测阳性,可判为 H5 或 H7 亚型 AI。

9.2 病毒分离物经 HA 和 HI 试验确定为 AIV,如果其 IVPI 值大于 1.2,判定为 HPAI;若 IVPI 值小于 1.2,经测序分析,HA 裂解位点处具有与 HPAIV 相似的 3 个或以上连续碱性氨基酸序列,判定为 HPAI。

9.3 不符合 HPAI 判定标准的 AI 病例,判定为 LPAI。

9.4 临床上判为可疑病例,若禽流感病毒抗体由阴性转为阳性或恢复期血清抗体滴度比急性期升高 4 倍及以上,可判为 AI 病例。

附 录 A
(规范性)
样品稀释液的配制

A.1 A液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液： $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g，溶于蒸馏水中，最后定容至 1 000 mL。

A.2 B液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.6 g，或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.6 g 或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.6 g)加蒸馏水溶解，最后定容至 1 000 mL。

A.3 pH 7.2 0.01 mol/L PBS

取 A 液 14 mL、B 液 36 mL，加 NaCl 8.5 g，用蒸馏水定容至 1 000 mL。经 $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 、15 min 高压灭菌。

A.4 样品稀释液

1 000 mL 无菌 PBS，无菌条件下分别加入青霉素 2 000 U/mL、链霉素 (2 mg/mL)、庆大霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、霉菌抑制素 (1 000 U/mL) 和牛血清白蛋白 (5 mg/mL) 或 10% 终体积的甘油。如果用作粪便和泄殖腔拭子的缓冲液，抗生素可提高 10 倍。

附 录 B
(规范性)
IVPI测定试验

B.1 试验鸡

6 周龄 SPF 鸡,10 只。

B.2 接种材料

新鲜有感染性的鸡胚尿囊液,HA 价在 1:16(2⁴)以上,未混有任何细菌、霉菌、支原体或其他病毒。

B.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。每日观察每只鸡的发病及死亡情况,连续观察 10 d。

B.4 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。列举 1 个假设试验来说明 IVPI 的计算方法,试验记录结果如表 B.1,按照公式(B.1)进行计算。

表 B.1 假设 HPAIV 致病性试验记录结果

临床症状	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8	D 9	D 10	分类总计	得分
正常(a=0)	10	5	3	3	2	1	0	0	0	0	24	0
病鸡(b=1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
重病鸡(c=2)	0	5	2	0	1	1	1	0	0	0	10	20
死亡(d=3)	0	0	5	7	7	8	9	10	10	10	66	198
总计	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100	218

注 1: 当 IVPI 值大于 1.2 时,判定分离株为 HPAIV。
注 2: 本试验中 IVPI=(0+0+20+198)/100=2.18>1.2,因此,本试验中的分离株为 HPAIV。

B.5 IVPI 值计算

IVPI 值计算按公式(B.1)。

$$IVPI = \frac{\sum_a \times 0 + \sum_b \times 1 + \sum_c \times 2 + \sum_d \times 3}{T} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

\sum_a —— 10 d 累计正常鸡计数之和;

\sum_b —— 10 d 累计病鸡计数之和;

\sum_c —— 10 d 累计重病鸡计数之和;



Σ_d ——10 d 累计死鸡计数之和；

T ——10 d 累计记录 10 只鸡的总次数，即 100。

B.6 判定标准

B.6.1 当 IVPI 值大于 1.2 时，判定此分离株为 HPAIV 毒株。

B.6.2 当 IVPI 值小于 1.2 时，H5 和 H7 亚型的 AIV 应进行血凝素裂解位点的序列分析，如果氨基酸序列同其他 HPAIV 相似，即 HA 裂解位点处具备多个碱性氨基酸，被检测的分离物应被视为 HPAIV。

附录 C

(资料性)

RT-PCR 引物序列及反应体系配制

C.1 RT-PCR 引物序列

采用普通 RT-PCR 方法开展 AIV 检测,可根据检测目的基因不同选择表 C.1 中的引物。

表 C.1 AIV RT-PCR 试验引物序列

引物名称	引物序列 5'-3'	长度 bp	扩增目的基因
M-U	TTCTAACCGAGGTCGAAAC	229	M
M-L	AAGCGTCTACGCTGCAGTCC		
H5-U	GGAATATGGTAACTGCAACACCA	392	H5
H5-L	ACGGCCTCAAATTGAGTGTTTCATTTT		
H7-U	AATGCACARGGAGGAGGAACT	501	H7
H7-L	TGAYGCCCCGAAGCTAAACCA		
H9-U	TGTGTCTTACGATGGGACAAGCA	273	H9
H9-L	TTGACAAGAGGCCTTGGTCCTAT		
N1-U	ATTRAATAACAAYGGYATAATAAC	358	N1
N1-L	GTCWCCGAAAACYCCACTGCA		
N2-U	GTGTGYATAGCATGGTCCAGCTCAAG	377	N2
N2-L	GAGCCYTTCCARTTGTCTCTGCA		
N9-U	ATAATGAAACAAACATCACCAA	203	N9
N9-L	AGCATAGAACCTGCATTCATCT		

注: W=(AT);Y=(CT);R=(AG)。

C.2 RT-PCR 反应体系配制

每个 RT-PCR 反应体系包括的组分参见表 C.2。

表 C.2 RT-PCR 反应体系组分

组分	1个检测体系的加入量/ μ L
5 \times 反应缓冲液	5.0
10 mmol/L d NTP	0.5
15 mmol/L 氯化镁	1.0
20 pmol 上游引物	0.5
20 pmol 下游引物	0.5

表 C.2 RT-PCR 反应体系组分 (续)

组分	1个检测体系的加入量/ μL
AMV 反转录酶(200 U/ μL)	0.5
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.5
无核酶灭菌水	14.0



附 录 D

(资料性)

实时荧光 RT-PCR 引物探针序列及反应体系配制

D.1 引物和探针序列

采用实时荧光 RT-PCR 方法开展 AIV 检测,可根据检测目的基因表 D.1 提供的序列合成引物和探针,纯度为 HPLC 级,用无核酶灭菌水溶解并稀释至终浓度 10 $\mu\text{mol/L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

表 D.1 荧光 RT-PCR 引物和探针

引物和探针名称	序列 (5'-3')
M 上游引物	CACCTCTGACTAAGGGGATTTTAGG
M 下游引物	GACAAACCGTCTACGCTGCAGTC
M 探针	FAM-TCGCTCACTGGGCACGGTGAGC-BHQ1
H5 上游引物	AGGGAGGATGGCAGGGAATG
H5 下游引物	TCTTTGTCTGCAGCGTACCCACT
H5 探针	FAM-ATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATG-BHQ1
H7 上游引物	CTAATTGATGGTTGGTATGGTTTCA
H7 下游引物	AATTGCCGATTGAGTGCTTTT
H7 探针	FAM-CAGAATGCACAGGGAGAGGGAAGCTGCT-BHQ1
N1 上游引物	AAGRTTTGAGTCTGTTGCTTGGTC
N1 下游引物	CYCCATTGTCTGGACCAGAAAT
N1 探针	FAM-CAAGTGCTTGTCATGATGGCATCAGTTGGTT-BHQ1
N6 上游引物	TGCAGGATGTTTGCTCTGAGTC
N6 下游引物	CGAAATGGGCTCCTATCATGTAT
N6 探针	FAM-ACAACACTCAGAGGGCAACATGCGAAT-BHQ1
N8 上游引物	TCCATGYTTTTGGGTTGARATGAT
N8 下游引物	GCTCCATCRTGCCAYGACCA
N8 探针	FAM-TCHAGYAGCTCCATTGTRATGTGTGGAGT-BHQ1
N9 上游引物	CAGAAGGCCTGTTGCAGAAATT
N9 下游引物	CCGTTGTGGCATAACACATTCAG
N9 探针	FAM-CACATGGGCCCGAAACATACTAAGAACACA-BHQ1
H9 上游引物	GCTGGAATCTGAAGGAACTTACAAA

表 D.1 荧光 RT-PCR 引物和探针 (续)

引物和探针名称	序列 (5'-3')
H9下游引物	AGGCAGCAAACCCCATTTG
H9探针	FAM-TCCTCACCATTATTTCGACTGTCGCCTC-BHQ1
注1: N8引物探针引自 WAOH。 注2: R=(AG);Y=(CT);K=(GT);H=(ATC)。	

D.2 实时荧光 RT-PCR 反应体系配制

每个反应体系包括的组分见表 D.2。

表 D.2 实时荧光 RT-PCR 反应体系组分

组分	1个检测体系的加入量/ μL
2 \times RT 缓冲液	10.0
Enzyme Mix	0.5
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8
探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
无核酶灭菌水	2.5

D.3 实时荧光 RT-PCR 反应参数

推荐的实时荧光 RT-PCR 反应参数:第一阶段,反转录 45 $^{\circ}\text{C}$ 15 min;第二阶段,预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;第三阶段,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,40 个循环,在第三阶段每次循环的退火延伸时收集荧光信号。试验结束后,根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

附 录 E

(资料性)

HA 和 HI 试验所用溶液和 1% 红细胞的配制

E.1 阿氏(Alsevers)液

称取葡萄糖 2.05 g、柠檬酸钠 0.8 g、柠檬酸 0.055 g 和氯化钠 0.42 g,加蒸馏水至 100 mL,散热溶解后调节 pH 至 6.1,69 kPa 15 min 高压灭菌,4℃保存备用。

E.2 1% (体积分数)鸡红细胞悬液

采集至少 3 只 SPF 鸡或无 AI 和新城疫等抗体的健康公鸡血液与等体积阿氏液混合,用 pH 7.2 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 1%(体积分数)红细胞悬液,2℃~8℃保存备用,保存时间一般不超过 1 周。

为延长保存期,可考虑使用醛化红细胞。采集至少 3 只 SPF 鸡或无 AI 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 pH 7.2 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 2%(体积分数)红细胞悬液,向 2% 红细胞悬液滴加等体积的 5% 戊二醛 PBS 液,5 min 内滴加完毕,4℃条件下磁力搅拌 45 min,醛化后的红细胞用纯水洗涤 3 次,最后用 PBS 配成 1%(体积分数)醛化红细胞悬液,置 2℃~8℃保存备用,保存时间可达 3 个月。



附 录 F

(资料性)

HI 试验中 4 HAU 抗原配制示例

如果血凝的终点滴度为 1:256(2^8),则 4 HAU=256/4=64(即 1:64);取 PBS 6.3 mL,加抗原 0.1 mL,即成 1:64 稀释 4 HAU。配制的 4 HAU 抗原需检查 HA 价是否准确,将配制的 1:64 稀释液进行系列稀释,使最终稀释度为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 和 1:7。从每一稀释度中取 25 μ L,加入 PBS 25 μ L,再加入 1%(体积分数)鸡红细胞悬液 25 μ L,混匀。将血凝板在室温(约 20 $^{\circ}$ C)条件下静置 40 min 或 4 $^{\circ}$ C 60 min,如果配制的抗原液为 4 HAU,则 1:4 稀释度将出现凝集终点;如果凝集终点高于 4 HAU(例如 1:5 或 1:6),或者较低(例如 1:2 或 1:3),根据检验结果将抗原稀释度做适当调整,使工作液确实为 4 HAU。

附 录 G

(资料性)

血清非特异性凝集和非特异性抑制因子的处理方法

G.1 非特异性凝集因子的处理

有些禽类(如水禽)或奶牛等动物血清可能对鸡红细胞产生非特异性凝集,可先用待检血清做 HA 试验,如果待检血清出现红细胞凝集现象,则说明有非特异凝集因子存在,宜用鸡红细胞对待检血清进行吸附,具体方法为:每 0.5 mL 血清中加入 25 μ L 50% 鸡红细胞,轻摇后静置至少 30 min,800 g 离心 2 min~5 min,收集上清液(处理后的血清)。用上清液进行 HI 试验时,需设处理阳性血清对照。

G.2 非特异性抑制因子的处理

G.2.1 胰酶-加热-高碘酸盐法

胰酶-加热-高碘盐法步骤如下:

- a) 取 0.3 mL 血清,加 0.15 mL 胰酶溶液(8 mg/mL:200 mg 的 P-250 胰酶溶解于 25 mL 的 0.01 mol/L、pH 7.0~7.2 的 PBS 中,混匀,过滤除菌,分装并在 -15°C 以下保存,保存期 6 个月),混匀后,在 56°C 水浴灭活 30 min 后冷却至室温;
- b) 再加入 0.9 mL 高碘酸钾(将 230 mg 的 KIO_4 用 0.01 mol/L、pH 7.0~7.2 的 PBS,定容至 100 mL,过滤除菌后避光室温保存,保存期 1 周),混合,室温孵育 15 min;
- c) 再加入 0.9 mL 的丙三醇盐溶液(1 mL 的丙三醇加入 99 mL 的 0.01 mol/L、pH 7.0~7.2 的 PBS 中,混匀,过滤除菌,室温保存),混合,室温孵育 15 min;
- d) 最后加入 0.75 mL 生理盐水,混匀,置 4°C 保存备用。处理后的血清最终为 10 倍稀释的血清。

G.2.2 受体破坏酶(RDE)处理法

受体破坏酶(RDF)处理法步骤如下:

- a) 取 1 体积血清(50 μ L),加 4 体积 RDE(200 μ L), 37°C 水浴 18 h(过夜);
- b) 再加入 5 体积(250 μ L)的 1.5 g/100 mL 的柠檬酸钠,混匀,置 56°C 水浴 30 min(以破坏残余的 RDE 活性);
- c) 将 1 体积的 50% 红细胞加入 10 体积 RDE 处理的血清中(50 μ L 红细胞+500 μ L 血清),振荡混匀后 4°C 放置 1 h,期间可轻轻摇匀悬浮红细胞数次;
- d) 1 000 g 离心 10 min,小心吸取上层上清液,用于检测。处理后的血清最终为 10 倍稀释的血清。

参 考 文 献

- [1] Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (WOAH)
-

