



中华人民共和国国家标准

GB/T 18936—2020
代替 GB/T 18936—2003

高致病性禽流感诊断技术

Diagnostic techniques for highly pathogenic avian influenza

2020-12-14 发布

2020-12-14 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	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 临床诊断	2
5 样品采集、保存与运输	2
6 病毒分离与鉴定	3
7 血凝和血凝抑制试验	3
8 禽流感病毒 RT-PCR 试验	4
9 禽流感病毒实时荧光 RT-PCR 试验	5
10 综合判定	6
附录 A (规范性附录) 试验所用溶液和 1% 鸡红细胞的配制	7
附录 B (资料性附录) 高致病性禽流感病毒 IVPI 测定试验	8
附录 C (资料性附录) 血清非特异性凝集和非特异性抑制因子的处理方法	10
附录 D (资料性附录) 禽流感病毒 RT-PCR 试验用引物	12
附录 E (资料性附录) RT-PCR 反应液配制	13
附录 F (资料性附录) 实时荧光 RT-PCR 引物探针序列及反应液配方	14

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18936—2003《高致病性禽流感诊断技术》，与 GB/T 18936—2003 相比，主要技术变化如下：

- 增加了禽流感病毒 RT-PCR 试验(见第 8 章)；
- 增加了禽流感病毒实时荧光 RT-PCR 试验(见第 9 章)；
- 删除了琼脂凝胶免疫扩散(AGID)试验(见 2003 年版的第 4 章)；
- 删除了间接酶联免疫吸附试验(ELISA)(见 2003 年版的第 5 章)。

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。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中华人民共和国北京海关、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人：王秀荣、田国彬、刘环、邓国华、蒋文明、施建忠、曾显营、李雁冰、谷强、孙晓东、陈化兰。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18936—2003。

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临床诊断,样品采集、保存与运输,病毒分离与鉴定,血凝和血凝抑制试验,禽流感病毒 RT-PCR 试验和禽流感病毒实时荧光 RT-PCR 试验的技术要求。

本标准适用于高致病性禽流感的诊断、检疫、检测、监测和流行病学调查等。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

NY/T 765 高致病性禽流感 样品采集、保存及运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

高致病性禽流感 **highly pathogenic avian influenza; HPAI**

由正黏病毒科流感病毒属 A 型流感病毒引起的以禽类为主的急性传染病。

3.2

血凝 **hemagglutinin; HA**

流感病毒颗粒表面的血凝素蛋白,具有识别红细胞表面受体并使红细胞凝集的特性。

3.3

血凝抑制 **hemagglutinin inhibition; HI**

抗体特异性地附着在 HA 分子的抗原位点上,干扰流感病毒 HA 与红细胞受体之间的结合,抑制了流感病毒 HA 凝集红细胞的能力。

3.4

反转录聚合酶链式反应 **reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR**

一种用于放大扩增特定的 RNA 片段的分子生物学技术。先用 RNA 反转录为 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增的过程。

3.5

实时荧光 RT-PCR **real-time RT-PCR**

利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程的一种扩增核酸方法。

3.6

Ct 值 **cycle threshold**

每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环次数。

4 临床诊断

4.1 易感动物

鸡、火鸡、鸭、鹅、鹌鹑、雉鸡、鹧鸪、鸵鸟、孔雀等多种禽类易感,多种野鸟也可感染发病。

4.2 临床症状

4.2.1 精神沉郁,嗜睡,头翅下垂,呆立;食欲不振;呼吸困难,有呼吸道症状。

4.2.2 鸡冠发绀、发紫;眼结膜发红;排黄、白、绿色稀便,并有未完全消化的饲料;脚鳞或有出血。

4.2.3 产蛋下降,软壳蛋、畸形蛋增多;有歪脖子等神经症状。

4.2.4 鸭、鹅等水禽可见神经和腹泻症状;有时可见角膜发红、充血、有分泌物,甚至失明。

4.3 剖检变化

4.3.1 气管弥漫性充血、出血,有少量黏液;肺部有炎性症状。

4.3.2 腹腔有浑浊的炎性分泌物;肠道可见卡他性炎症;输卵管内有浑浊的炎性分泌物,卵泡充血、出血、萎缩、破裂,有的可见“卵黄性腹膜炎”;胰腺边缘有出血、坏死。

4.3.3 心冠及腹部脂肪出血;腺胃乳头可见出血;盲肠扁桃体肿大出血;直肠黏膜及泄殖腔出血。

4.4 结果判定

出现 4.2、4.3 中的情况,初步判为高致病性禽流感临床疑似病例,需要进一步开展实验室诊断。

5 样品采集、保存与运输

5.1 总则

样品采集、保存及运输应按照 NY/T 765 进行。样品采集宜在发病初期、选择具有典型临床症状的禽进行,采样过程中应避免交叉污染。死禽或其他动物采集气管、肺和脑等组织样品,进行分别处理;活禽样品应包括咽喉和/或泄殖腔拭子;小珍禽用拭子取样易造成损伤,可采集新鲜粪便。

5.2 拭子样品

5.2.1 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。

5.2.2 采集泄殖腔拭子时将拭子深入泄殖腔至少旋转 3 圈并沾取少量粪便。

5.2.3 将采样后的拭子分别放入盛有 1.2 mL 样品稀释液(配制方法见附录 A 中的 A.1)的 2 mL 采样管中,编号并填写相应采样单。

5.3 组织样品

发病禽鸟可无菌采集气管、肺、脑、肠(包括内容物)、肝、脾、肾、心等组织脏器,装入 15 mL 或 50 mL 带螺口的有机材料保存管中,编号并填写相应采样单。

5.4 血清样品采集

无菌采集禽类的血液,每只约 2 mL,编号并填写相应采样单。待血液凝固,血清析出后,收集血清用于 HI 检测。

5.5 样品保存和运输

样品采集后置保温箱中,加入预冷的冰袋,密封,宜 24 h 内送实验室。样品应尽快处理,没有条件的可在 4 ℃ 存放不超过 4 d,也可在低温条件下保存(−70 ℃ 贮存为宜)。

6 病毒分离与鉴定

6.1 适用范围

病毒分离与鉴定方法适用于对 HPAI 的病原学诊断,应在有资质的高等级生物安全实验室操作,按照 GB 19489 的规定执行。

6.2 样品处理



将棉拭子充分捻动、挤干后弃去拭子;粪便、研碎的组织加样品稀释液充分研磨,按照 1 g 组织加 10 mL PBS 的比例配成悬液。样品液经 3 000 r/min 离心 10 min,取上清作为接种或者核酸检测材料。

6.3 样品接种及收获

取处理好的样品,以 0.2 mL/胚的量经尿囊腔途径接种 9 d~11 d 无特定病原体鸡胚,每个样品接种 3~5 枚鸡胚,在 37 ℃ 孵化箱内孵育,每天上午和下午定点观察鸡胚死亡情况。无菌收取死胚及 96 h 仍存活鸡胚的鸡胚尿囊液,测 HA 活性。

6.4 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,若仍阴性,则认为病毒分离阴性;若有 HA 活性说明可能有正黏病毒科的流感病毒,可进一步采用血凝和血凝抑制试验(见第 7 章)、高致病性禽流感病毒 IVPI(静脉内接种致病指数)测定试验(参见附录 B)、禽流感病毒 RT-PCR 试验(见第 8 章)、禽流感病毒实时荧光 RT-PCR 试验(见第 9 章)等方法进行验证。

7 血凝和血凝抑制试验

7.1 适用范围

血凝和血凝抑制试验适用于血凝素亚型的诊断和抗体效价测定。

7.2 试剂

7.2.1 阿氏(Alsevers)液,配方参见 A.2。

7.2.2 1%鸡红细胞悬液,配方参见 A.3。

7.2.3 pH7.2、0.01 mol/L PBS,配方参见 A.4。

7.2.4 禽流感病毒血凝素分型标准抗原、标准阳性血清、阴性血清。

7.3 HA 试验(微量法)试验步骤

7.3.1 在 96 孔 V 型微量反应板中,每孔加 0.025 mL PBS。

7.3.2 第 1 孔加 0.025 mL 抗原或病毒液,反复吹吸 3 次~5 次混匀。

7.3.3 从第 1 孔吸取 0.025 mL 抗原或病毒液加入第 2 孔,混匀后吸取 0.025 mL 加入第 3 孔,进行 2 倍系列稀释至第 11 孔,从第 11 孔吸取 0.025 mL 弃去。第 12 孔为 PBS 对照孔。

7.3.4 每孔加 0.025 mL PBS。

7.3.5 每孔加入 0.025 mL 1% (体积分数) 鸡红细胞悬液。

7.3.6 结果判定。轻扣反应板混合反应物, 室温 (约 20 °C) 静置 40 min, 环境温度过高时可在 4 °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°, 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血凝效价。

7.4 HI 试验 (微量法) 试验步骤

7.4.1 根据 HA 试验测定的效价配制 4 个血凝单位 (即 4 HAU) 的病毒抗原。4 HAU 抗原应根据检验结果调整准确。

示例: 如果血凝的终点滴度为 1 : 256 (2^8 或 $8 \log_2$), 则 4 HAU = $256/4 = 64$ (即 1 : 64); 取 PBS 6.3 mL, 加抗原 0.1 mL, 即通过 1 : 64 稀释获得 4 HAU。配制的 4 HAU 抗原需检查血凝价是否准确, 将配制的 4 HAU 抗原进行系列稀释, 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 0.025 mL, 加入 PBS 0.025 mL, 再加入 1% 鸡红细胞悬液 0.025 mL, 混匀。将血凝板在室温 (约 20 °C) 条件下静置 40 min 或 4 °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; 如果高于 4 HAU, 可能 1 : 5 或 1 : 6 为终点; 如果低于 4 HAU, 可能 1 : 2 或 1 : 3 为终点。

7.4.2 第 1 孔 ~ 第 11 孔加入 0.025 mL PBS, 第 12 孔加入 0.05 mL PBS 作为空白对照。

7.4.3 第 1 孔加入 0.025 mL 血清 (鸭、鹅血清在检测时建议进行预处理, 参见附录 C); 第 1 孔血清与 PBS 充分混匀后吸取 0.025 mL 于第 2 孔, 依次 2 倍稀释至第 10 孔, 从第 10 孔吸取 0.025 mL 弃去。第 11 孔作为抗原对照。

7.4.4 第 1 孔 ~ 第 11 孔均加入 0.025 mL 4 HAU 抗原, 在室温 (约 20 °C) 下静置 30 min 或 4 °C 60 min。

7.4.5 每孔加入 0.025 mL 1% (体积分数) 鸡红细胞悬液, 震荡混匀, 在室温 (约 20 °C) 下静置 40 min 或 4 °C 60 min, 空白对照孔 (12 孔) 红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

7.4.6 结果判定。当抗原对照孔 (第 11 孔) 完全凝集, 且阴性对照血清抗体效价不高于 1 : 4 (2^2 或 $2 \log_2$), 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, 试验方可成立。以完全抑制 4 HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 抗体效价。用于检测抗体, 检测鸡血清时, HI 抗体效价不高于 1 : 8 (2^3 或 $3 \log_2$) 判为阴性, 不低于 1 : 16 (2^4 或 $4 \log_2$) 判为阳性。用于检测抗原, 能够被某亚型禽流感标准血清抗体抑制, HI 效价不低于 1 : 16 (2^4 或 $4 \log_2$) 时判定为该亚型阳性; HI 抗体效价不高于 1 : 8 (2^3 或 $3 \log_2$) 判为阴性。对于疑似 H5 亚型等抗原性可能存在较大差别的病毒, 应结合其他病毒检测方法进行鉴定。

8 禽流感病毒 RT-PCR 试验

8.1 适用范围

适用于检测禽组织、分泌物、排泄物、鸡胚培养物等物质中禽流感病毒核酸。

8.2 仪器设备

8.2.1 PCR 扩增仪及配套反应管。

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

8.2.3 II 级生物安全柜。

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

8.2.5 电泳仪。

8.2.6 电泳槽。

8.2.7 紫外凝胶成像仪。

8.3 试剂

8.3.1 推荐的禽流感病毒 RT-PCR 引物序列, 参见附录 D。

8.3.2 RT-PCR 反应液, 配方参见附录 E 的 E.1。

8.3.3 无核酸酶水, 配方参见 E.2。

8.3.4 无水乙醇。

8.3.5 阴性对照为 SPF 鸡胚尿囊液。

8.3.6 阳性对照为灭活的相应亚型禽流感病毒胚培养物。

8.4 RNA 提取

可选市售商品化 RNA 提取试剂盒, 按说明书进行。

8.5 RT-PCR 操作

取 2.5 μ L (约 250 ng) 提取的 RNA 加入 RT-PCR 反应液中, 置于 PCR 仪中, 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。

8.6 电泳

PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析。

8.7 结果判定

在阳性对照出现相应扩增带、阴性对照无此扩增带时判定结果。出现预期大小的扩增片段时, 判定为核酸检测阳性, 否则判定为阴性。

9 禽流感病毒实时荧光 RT-PCR 试验

9.1 适用范围

 实时荧光 RT-PCR 适用于检测禽组织、分泌物、排泄物、鸡胚尿囊液等物质中禽流感病毒核酸。

9.2 仪器设备

9.2.1 荧光 PCR 仪。

9.2.2 其余器材同 8.2.2~8.2.4。

9.3 试剂及引物探针序列

推荐的实时荧光 RT-PCR 引物探针序列参见附录 F 的 F.1。

9.4 样本核酸的提取

可选市售商品化 RNA 提取试剂盒, 按说明书进行。

9.5 实时荧光 RT-PCR 操作

9.5.1 实时荧光 RT-PCR 扩增试剂的准备与配制

宜在专门的反应混合物配制区配制实时荧光 RT-PCR 扩增试剂。根据需要检测的样品数, 按推荐

的实时荧光 RT-PCR 反应液配方(参见 F.2)配制反应液,充分混匀后分装,每个反应管 15 μL 。转移反应管至样本制备区。

9.5.2 加样

宜在专门的样本制备区进行。在 9.5.1 配好的反应管中分别加入 9.4 中制备的 RNA 溶液 5 μL (约 500 ng),使每管总体积达到 20 μL ,记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后,500 r/min 离心 30 s。

9.5.3 实时荧光 RT-PCR 反应设定

宜在专门的检测区进行实时荧光 RT-PCR 反应。将 9.5.2 中加样后的反应管放入实时荧光 RT-PCR 检测仪内,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,淬灭基团选择 none。推荐的实时荧光 RT-PCR 反应参数设定参见 F.3。

9.6 结果判定

9.6.1 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。

9.6.2 质控标准

9.6.2.1 阴性对照检测通道读取数据无 Ct 值或 Ct 值 >35 并且无特征性扩增曲线。

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

9.6.2.3 如阴性和阳性对照不满足以上条件,此次试验视为无效。

9.6.3 结果描述及判定

9.6.3.1 若测定样品 Ct 值 ≤ 30 ,判为所用引物探针禽流感病毒特定型或亚型核酸阳性。

9.6.3.2 若测定样品 $30 < \text{Ct 值} \leq 35$,判为可疑。重复测定后仍在可疑区间的样本判为阳性。

9.6.3.3 若测定样品无 Ct 值或 Ct 值 >35 ,判为阴性。

10 综合判定

10.1 疑似

出现 4.2、4.3 中的情况,初步判为高致病性禽流感临床疑似病例,若其 H5 或 H7 亚型的 RT-PCR 或实时荧光 RT-PCR 检测阳性,可判为高致病性禽流感疑似病例。

10.2 确诊

病毒分离物经 HA 和 HI 试验确定为流感病毒,且分离物的 IVPI 值大于 1.2,判定为高致病性禽流感病毒;如果 IVPI 值小于 1.2 的 H5 或 H7 亚型禽流感病毒,在 HA 裂解位点处具有与 HPAI 病毒相似的氨基酸序列,亦判定为高致病性禽流感病毒。分离到高致病性禽流感病毒的病例判定为高致病性禽流感确诊病例。

附录 A

(规范性附录)

试验所用溶液和 1%鸡红细胞的配制

A.1 样品稀释液

样品稀释液的配制方法如下:

- a) A 液: 0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液。NaH₂PO₄ · H₂O 27.6 g, 溶于蒸馏水中, 最后定容至 1 000 mL。
- b) B 液: 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液。Na₂HPO₄ · 7H₂O 53.6 g, 或 Na₂HPO₄ · 12H₂O 71.6 g 或 Na₂HPO₄ · 2H₂O 35.6 g, 加蒸馏水溶解, 最后定容至 1 000 mL。
- c) 0.01 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)(含抗生素和稳定剂)的配制。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 °C ± 2 °C、15 min 高压灭菌, 冷却后, 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 µg/mL)、霉菌抑制素(1 000 U/mL)和牛血清白蛋白(5 mg/mL)。

上述抗生素浓度宜用于组织和咽喉拭子, 如果用作粪便和泄殖腔拭子的缓冲液, 抗生素浓度可提高 5 倍。



A.2 阿氏(Alsevers)液配制

称取葡萄糖 2.05 g、柠檬酸钠 0.8 g、柠檬酸 0.055 g、氯化钠 0.420 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 °C 保存备用。

A.3 1%鸡红细胞悬液

采集至少三只 SPF 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 pH 7.2 的 0.01 mol/L PBS 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, 4 °C 保存备用。

A.4 pH7.2, 0.01 mol/L PBS 的配制

pH7.2, 0.01 mol/L PBS 的配制方法如下:

- 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 °C 保存不超过 3 周。

附录 B
(资料性附录)
高致病性禽流感病毒 IVPI 测定试验

B.1 试验鸡

6 周龄 SPF 鸡,10 只。

B.2 接种材料

感染鸡胚的尿囊液,血凝价在 1 : 16 (2⁴ 或 4 log2) 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 PBS 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,参见表 B.1 和公式(B.1)。

表 B.1 假设高致病性禽流感病毒致病性试验记录结果

临床症状	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天	第 9 天	第 10 天	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,判定分离株为高致病性禽流感病毒(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 值计算参见公式(B.1):

$$\text{IVPI} = \frac{\Sigma_a \times 0 + \Sigma_b \times 1 + \Sigma_c \times 2 + \Sigma_d \times 3}{T} \dots\dots\dots (\text{B.1})$$

- 式中：
- Σ_a ——10 d 累计正常鸡数；
 - Σ_b ——10 d 累计病鸡数；
 - Σ_c ——10 d 累计重病鸡数；
 - Σ_d ——10 d 累计死鸡数；
 - 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，判定此分离株为高致病性禽流感(HPAI)病毒株。
- B.6.2** 当 IVPI 值小于 1.2 时，H5 和 H7 亚型的禽流感病毒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高致病性流感病毒相似，被检测的分离物应被视为高致病性禽流感病毒。

附录 C

(资料性附录)

血清非特异性凝集和非特异性抑制因子的处理方法

C.1 非特异性凝集因子的处理

有些禽类血清(如水禽、鸽)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 0.025 mL 50% 鸡红细胞,轻摇后静置至少 30 min,800g 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。或者可用与待检血清宿主来源相同的 1% 红细胞悬液进行 HA 和 HI 试验。

C.2 非特异性抑制因子的处理

C.2.1 胰酶—加热—高碘酸盐法

利用胰酶—加热—高碘酸盐法处理非特异性抑制因子的操作如下:

- 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 值 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。
- 再加入 0.9 mL 高碘酸钾(将 230 mg KIO_4 用 0.01 mol/L、pH 值 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。
- 再加入 0.9 mL 的丙三醇盐溶液(1 mL 丙三醇加入 99 mL 的 0.01 mol/L、pH 值 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。
- 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。

C.2.2 受体破坏酶(RDE)处理法

利用 RDE 处理法处理非特异性抑制因子的操作如下:

- 取 1 体积血清(50 μL),加 4 体积 RDE(200 μL),37 °C 水浴 18 h(过夜)。
- 再加入 5 体积(250 μL)的 1.5% 浓度的柠檬酸钠,混匀,置 56 °C 水浴 30 min(以破坏残余的 RDE 活性)。
- 将 1 体积的 50% 的红细胞加入到 10 体积 RDE 处理的血清中(50 μL 红细胞+500 μL 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。
- 1 000g 离心 10 min,小心吸取上层上清,用于检测。处理后的血清最终为 10 倍稀释的血清。

C.2.3 处理非特异性抑制因子后血清 HI 试验方法

处理后血清 HI 试验方法如下:

- 第 2 孔~第 11 孔加入 0.025 mL PBS,第 12 孔加入 0.05 mL PBS 作为空白对照。
- 第 1 孔、第 2 孔加入处理后的血清 0.025 mL,第 2 孔血清与 PBS 充分混匀后吸 0.025 mL 于第 3 孔,依次 2 倍稀释至第 10 孔,从第 10 孔吸取 0.025 mL 弃去。第 11 孔为抗原对照。
- 第 1 孔~第 11 孔均加入 0.025 mL 4 HAU 抗原,在室温(约 20 °C)下静置 40 min 或 4 °C

60 min。

- d) 每孔加入 0.025 mL 1% (体积分数) 鸡红细胞悬液, 震荡混匀, 在室温 (约 20 °C) 下静置 40 min 或 4 °C 60 min, 对照孔红细胞呈显著纽扣状时判定结果。
- e) 结果判定。当阴性对照血清抗体效价不高于 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, 试验方可成立。以完全抑制 4 HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 抗体效价。被检血清 HI 抗体效价低于 1 : 10 判为阴性, 不低于 1 : 10 判为阳性。

附 录 D
(资料性附录)

禽流感病毒 RT-PCR 试验用引物

采用普通 RT-PCR 方法开展禽流感检测,可根据检测目的基因不同选择引物(参见表 D.1)。

表 D.1 禽流感病毒 RT-PCR 试验可选的引物

引物名称	引物序列 5'—3'	长度 bp	扩增目的基因
M-229U	TTCTAACCGAGGTCGAAAC	229	M
M-229L	AAGCGTCTACGCTGCAGTCC		
H5-372U	GGAATATGGTAACTGCAACACCA	372	H5
H5-372L	AACTGAGTGTTTCATTTTGTCAATG		
H7-501U	AATGCACARGGAGGAGGAACT	501	H7
H7-501L	TGAYGCCCCGAAGCTAAACCA		
H9-273U	TGTGTCTTACGATGGGACAAGCA	273	H9
H9-273L	TTGACAAGAGGCCTTGGTCCTAT		
N1-358U	ATTRAATACAAYGGYATAATAAC	358	N1
N1-358L	GTCWCCGAAAACYCCACTGCA		
N2-377U	GTGTGYATAGCATGGTCCAGCTCAAG	377	N2
N2-377L	GAGCCYTTCCARTTGTCTCTGCA		
N9-203U	ATAATGAAACAAACATCACCAA	203	N9
N9-203L	AGCATAGAACCTGCATTTCATCT		
注：W=(AT);Y=(CT);R=(AG)。			



附 录 E
(资料性附录)
RT-PCR 反应液配制

E.1 RT-PCR 反应体系

每个 RT-PCR 反应体系包括的组分参见表 E.1。

表 E.1 RT-PCR 反应液配方

组分	1 个检测体系的加入量 μL
5×反应缓冲液	5.0
10 mmol/L dNTP	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
AMV 反转录酶(200 U/ μL)	0.5
Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.5
无核酶灭菌水	14.0

E.2 无核酸酶水

将 DEPC 加入去离子水中至终浓度为 0.1%，充分混合均匀后作用 12 h，分装， $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30 min，冷却后冷藏备用。

附 录 F

(资料性附录)

实时荧光 RT-PCR 引物探针序列及反应液配方

F.1 引物和探针

采用实时荧光 RT-PCR 方法开展禽流感检测,可根据检测目的基因参见表 F.1 提供的序列合成引物和探针,纯度为 HPLC 级,用 RNase-Free 灭菌水溶解并稀释至终浓度 $10 \mu\text{mol/L}$, -20°C 保存备用。

表 F.1 禽流感病毒实时荧光 RT-PCR 试验可选的引物和探针

引物和探针名称	序列 (5'-3')
M 上游引物	GACCRATCCTGTCACCTCTGAC
M 下游引物	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA
M 探针	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG
H5 上游引物	AGGGAGGATGGCAGGGAATG
H5 下游引物	TCTTTGTCTGCAGCGTACCCACT
H5 探针	ATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATG
H7 上游引物	CTAATTGATGGTTGGTATGGTTTCA
H7 下游引物	AATTGCCGATTGAGTGCTTTT
H7 探针	CAGAATGCACAGGGAGAGGGAAGTCT
N6 上游引物	TGCAGGATGTTTGCTCTGAGTC
N6 下游引物	CGAAATGGGCTCCTATCATGTAT
N6 探针	ACAACACTCAGAGGGCAACATGCGAAT
N8 上游引物 1	TCCATGYTTTTGGGTTGARATGAT
N8 下游引物 1	GCTCCATCRTGCCAYGACCA
N8 探针 1	TCHAGYAGCTCCATTGTRATGTGTGGAGT
N9 上游引物	CAGAAGGCCTGTTGCAGAAATT
N9 下游引物	CCGTTGTGGCATAACATTTCAG
N9 探针	CACATGGGCCCCGAAACATACTAAGAACACA
H9 上游引物	GCTGGAATCTGAAGGAACTTACAAA
H9 下游引物	AGGCAGCAAACCCATTG
H9 探针	TCCTCACCATTATTCGACTGTCGCCTC

表 F.1 (续)

引物和探针名称	序列 (5'-3')
HPH7 上游引物	CAAAGGAGTCTTCTGCTGGCA
HPH7 下游引物	TAGGCCTCTCGCAGTCCGT
HPH7 探针	CAGGGATGAAGAATGTTCTGAGGTTCCAA
注 1: M 和 N8 引物探针引自 OIE。 注 2: R = (AG); Y = (CT); K = (GT); H = (ATC)。	

F.2 实时荧光 RT-PCR 反应液配方

每个反应体系包括的组分参见表 F.2。

表 F.2 实时荧光 RT-PCR 反应液配方

组分	1 个检测体系的加入量 μL
2×RT 缓冲液	10.0
酶混合液	0.5
上游引物 (10 μmol/L)	0.8
下游引物 (10 μmol/L)	0.8
探针 (10 μmol/L)	0.4
无核酶灭菌水	2.5

F.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 °C/15 min;第二阶段,预变性 95 °C/2 min;第三阶段,95 °C/15 s,60 °C/60 s,40 个循环,在第三阶段每次循环退火延伸时收集荧光。试验结束后,根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

F.4 注意事项

在检测过程中,应严防不同样品间的交叉污染。反应液分装时应避免产生气泡,上机前检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。