



中华人民共和国国家标准

GB/T 18936—2003

20030436

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