

DONGWUYIQING

动物疫情

监测分析与疫病预防控制技术规范

实施手册



内蒙古人民出版社

动物疫情监测分析与疫病 预防控制技术规范实施手册

主编:张 甄

(第一卷)

内蒙古人民出版社

内蒙古人民出版社发行
呼和浩特市新城西街 20 号
邮编：010010
各地新华书店经售

*

2003 年 4 月第 一 版 开本 787×1092 1/16
2003 年 4 月第一次印刷 印张 128
印数 1 - 500 字数 2400 千字
ISBN 7 - 204 - 06512 - 3/2·184
定价：998.00 元（一、二、三、四卷）

前 言

动物防疫检疫和畜产品安全问题已经成为世界关注的话题，严重影响着每个国家的社会稳定、经济发展和人民健康。搞好动物防疫工作，不仅可以促进畜牧业的发展，而且有利于农业和农村经济结构调整，有利于农业增效、农民增收，有利于树立我国畜产品的国际形象和促进对外贸易的发展。

为了做好动物疫病的预防、控制、监测、检疫和扑灭工作，我们在参阅大量有关文献的基础上，总结多年来我国动物防疫工作取得的新成果、新经验、新技术，编写了《动物疫情监测分析与疫病预防控制技术规范》一书，全书内容包括以下几个部分：

第一篇 动物疫病概论

第二篇 动物疫病预防

第三篇 动物疫情诊断技术与监测分析

第四篇 动物传染病及其预防控制技术

第五篇 动物寄生虫病及其预防控制技术

第六篇 动物及其产品检验检疫

同时，为了配合农业部畜牧兽医局根据《中华人民共和国动物防疫法》制定的《高致病性禽流感防治技术规范》等7个重大动物疫病防治技术规范的执行，本书采用了最新资料重点阐述了各类动物疫病的防治技术。

由于编者水平有限，加之时间仓促，书中缺点、错误在所难免，诚希读者批评指正。

编 者

编 委 会

主 编：张 勇

副主编：尤 海

编 委：

张 勇	尤 海	赵天朔	魏承运
谢琼灵	钱凯林	孙静雯	张模群
陆永坤	高华枫	程忠惠	陈思宇
于伟平	汪世勤	许炳乾	焦虢宇

最新动物疫病 预防控制技术规范

高致病性禽流感防治技术规范

高致病性禽流感（Highly Pathogenic Avian Influenza, HPAI），是由正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒引起的禽类烈性传染病。世界动物卫生组织（OIE）将其列为 A 类动物疫病，我国将其列为一类动物疫病。

为预防、控制和消灭高致病性禽流感，依据《中华人民共和国动物防疫法》及有关的法律法规，特制定本规范。

1 适用范围

本规范规定了高致病性禽流感的诊断、疫情报告、疫情处理、防治措施、控制和净化标准。本规范适用于中华人民共和国境内的一切从事禽类饲养、经营和禽类产品生产、经营，以及从事动物防疫活动的单位和个人。

2 诊断

2.1 有下列情况之一的，可确认为高致病性禽流感：

2.1.1 有典型的临床症状和病理变化，发病急、死亡率高，且能排除鸡新城疫和中毒性疾病，血清学检测阳性。

2.1.2 未经免疫鸡场的家禽出现 H₅、H₇ 亚型禽流感血清学阳性。

2.1.3 在禽群中分离到 H₅、H₇ 亚型禽流感病毒株或其它亚型高致病力禽流感毒株。

2.2 流行特点

鸡、火鸡、鸭、鹅、鹌鹑、雉鸡、鹧鸪、鸵鸟、鸽、孔雀等多种禽类均易感。传染源主要为病禽和带毒禽（包括水禽和飞禽）。病毒可长期在污染的粪便、水等环境中存活。病毒的传播主要通过接触感染禽及其分泌物和排泄物、污染的饲料、水、蛋托（箱）、垫草、种蛋、鸡胚和精液等媒介，经呼吸道、消化道感染，也可通过气源性媒介传播。

2.3 临床症状

潜伏期从几小时到数天，最长可达 21 天。表现为突然死亡、高死亡率，饲料和饮水消耗量及产蛋量急剧下降，病鸡极度沉郁，头部和脸部水肿，鸡冠发绀、脚鳞出血和神经紊乱；鸭鹅等水禽有明显神经和腹泻症状，可出现角膜炎，甚至失明。

2.4 病理变化

2.4.1 剖检病变：全身组织器官严重出血。腺胃粘液增多，刮开可见腺胃乳头出血、腺胃和肌胃之间交界处粘膜可见带状出血；消化道粘膜，特别是十二指肠广泛出血；呼吸道粘膜可见充血、出血；心冠脂肪及心内膜出血；输卵管的中部可见乳白色分泌物或凝块；卵泡充血、出血、萎缩、破裂，有的可见“卵黄性腹膜炎”。水禽在心内膜还可见灰白色条状坏死。胰脏沿长轴常有淡黄色斑点和暗红色区域。急性死亡病例有时未见明显病变。

2.4.2 病理组织学变化：主要表现为脑、皮肤及内脏器官（肝、脾、胰、肺、肾）的出血、充血和坏死。脑的病变包括坏死灶、血管周围淋巴细胞管套、神经胶质灶、血管增生和神经元性变化；胰腺和心肌组织局灶性坏死。

2.5 实验室诊断

2.5.1 病原鉴定

2.5.1.1 符合相应生物安全级别的，且经国务院畜牧兽医行政管理部门认定的省级以上动物疫病诊断实验室和研究机构的实验室，可开展病原鉴定工作。

2.5.1.2 样品采集

活禽样品应采集泄殖腔拭子和气管拭子；死禽样品应采集气管、脾、肺、肝、肾和脑等组织器官；小珍禽样品应采集新鲜粪便（见附件一）。

2.5.1.3 病原学诊断

主要包括病原分离、鉴定（见附件二）和毒力测定（见附件三）。

2.5.2 血清学诊断

主要包括琼脂凝胶免疫扩散试验（AGID）（不适用于水禽）（见附件四）、血凝抑制试验（HI）（见附件五）。

3 疫情报告

3.1 任何单位和个人发现患有本病或疑似本病的禽类，都应当立即向当地动物防疫监督机构报告。

3.2 动物防疫监督机构接到疫情报告后，按农业部《动物疫情报告管理办法》和《国家高致病性禽流感防治应急预案》等有关规定执行。

4 疫情处理

实行以紧急扑杀为主的综合性防治措施。

4.1 发现疑似高致病性禽流感疫情时，畜主应立即将病禽（场）隔离，并限制其移动。动物防疫监督机构要及时派员到现场进行调查核实，进行流行病学调查、临床症状检查、病理解剖、采集病料、实验室诊断等，根据诊断结果采取相应措施。

4.2 当发生高致病性禽流感时，按下列要求处理：

4.2.1 划定疫点、疫区、受威胁区由所在地县级以上畜牧兽医行政管理部门划定疫点、疫区、受威胁区。

疫点：指患病动物所在的地点。一般是指患病禽类所在的禽场（户）或其它有关屠宰、经营单位；如为农村散养，应将自然村划为疫点。

疫区：指以疫点为中心，半径 3-5 公里范围内区域。疫区划分时，应注意考虑当地的饲养环境和天然屏障（如河流、山脉等）。

受威胁区：指疫区外延 5-30 公里范围内的区域。

4.2.2 封锁

由县级以上畜牧兽医行政管理部门报请同级人民政府决定对疫区实行封锁；人民政府在接到封锁报告后，应在 24 小时内发布封锁令，并对疫区进行封锁。

对疫点、疫区采取不同的处理措施。其中：

疫点 出入口必须有消毒设施。严禁人、禽、车辆进出和禽类产品及可能受污染的物品运出，在特殊情况下必须出入时，须经所在地动物防疫监督机构批准，经严格消毒后，方可出入。

疫区 交通要道建立动物防疫监督检查站，派专人监视动物和动物产品的流动，对进出人员、车辆须进行消毒。停止疫区内禽类及其产品的交易、移动。水禽必须圈养，或在指定地点放养。

4.2.3 扑杀

确认为高致病性禽流感时，在动物防疫监督机构的监督指导下对疫点内所有的禽只进行扑杀。

4.2.4 无害化处理

对所有病死禽、被扑杀禽及其禽类产品（包括禽肉、蛋、精液、羽、绒、内脏、骨、血等）按照 GB 16548《畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程》执行；对于禽类排泄物和被污染或可能被污染的垫料、饲料等物品均需进行无害化处理。禽类尸体需要运送时，应使用防漏容器，须有明显标志，并在动物防疫监督机构的监督下实施。

4.2.5 紧急免疫

对疫区和受威胁区内的所有易感禽类进行紧急免疫接种，登记免疫接种的禽群及其养禽场（户），建立免疫档案。

4.2.6 消毒

对疫点内禽舍、场地以及所有运载工具、饮水用具等必须进行严格彻底地消毒（见附件六）。

4.2.7 紧急监测

对疫区、受威胁区内禽类实施紧急疫情监测，掌握疫情动态。

4.2.8 疫源分析与追踪调查

根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。对仍可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的禽类及其产品、可疑污染物（包括粪便、垫料、饲料等）等应立即开展追踪调查，一经查明立即按照 GB 16548-1996《畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程》采取就地销毁等无害化处理措施。

4.2.9 封锁令的解除

疫点内所有禽类及其产品按规定处理后，在动物防疫监督机构的监督指导下，对有关场所和物品进行彻底消毒。最后一只禽只扑杀 21 天后，经动物防疫监督机构审验合格后，由当地畜牧兽医行政管理部门向原发布封锁令的同级人民政府申请发布解除封锁令。疫区解除封锁后，要继续对该区域进行疫情监测，6 个月后如未发现新的病例，即可宣布该次疫情被扑灭。

4.2.10 处理记录

对处理疫情的全过程必须做好完整的详细记录，以备检查。

5 预防与控制

5.1 加强饲养管理，提高环境控制水平。

饲养、生产、经营场所必须符合动物防疫条件，取得《动物防疫合格证》。饲养场实行全进全出饲养方式，控制人员出入，严格执行清洁和消毒程序。鸡和水禽禁止混养，养鸡场与水禽饲养场应相互间隔 3 公里以上，且不得共用同一水源。养禽场要有良好的防止禽鸟（包括水禽）进入饲养区的设施，并有健全的灭鼠设施和措施。

5.2 加强消毒，做好基础防疫工作各饲养场、屠宰厂（场）、动物防疫监督检查站等要建立严格的卫生（消毒）管理制度。

5.3 监测

5.3.1 由县级以上动物防疫监督机构组织实施。

5.3.2 监测方法

未经免疫区域：以流行病学调查、血清学监测为主（包括琼脂扩散试验、血凝抑制试验等方法），结合病原分离和毒型鉴定、毒力鉴定进行监测。免疫区域：以病原学监测为主，结合血清学监测。

5.3.3 监测对象：以鸡、火鸡、鸭、鹅等为主，也包括鹌鹑、雉鸡、鹧鸪、鸵鸟、鸽、孔雀和候鸟等易感禽类。

5.3.4 监测环节与措施

5.3.4.1 产地监测：对未免疫和免疫的养禽场均可采用病原学监测方法进行监测。对所有原种、曾祖代、祖代和父母代养禽场，有出口任务的养禽场，商品代养禽场每年要进行两次监测；散养禽不定期抽检。采样比例：每群采 10 只禽的棉拭子，放在同一容器内，混合为一个样品，用于鸡胚接种，进行病毒分离。对于未免疫的养禽场以血清学监测为主。有出口任务养禽场的监测，每批次按照 0.5% 的比例采样；每批次数量超过 10 万只的，按 0.1% 的比例采样；其它所有养禽场每半年至少监测一次。父母代以上种禽场，每批次（群）按照 0.5% 的比例进行监测；商品代养禽场，每批次（群）按照 0.1% 的比例进行监测。散养禽不定期抽检。每批次（群）监测数量不得少于 20 份。

5.3.4.2 流通环节的监测

对交易市场、禽类屠宰厂（场）、异地调入的活禽和禽产品进行不定期的病原学和血清学监测。

5.3.5 监测结果处理

监测结果要及时汇总，由省级动物防疫监督机构定期上报全国畜牧兽医总站。发现病原学和非免疫禽血清学阳性的，要按照《农业部动物疫情报告管理办法》的有关规定立即报告和处理。监测中发现因使用未经农业部批准生产的禽流感疫苗而造成血清学阳性禽群，一律按发生禽流感疫情处理。

5.3.6 免疫

在发生疫情时，对疫区、受威胁区内的所有易感禽只进行紧急免疫；在曾发生过疫情区域的水禽，必要时也可进行免疫。所用疫苗必须是经农业部批准使用的禽流感疫苗。

5.3.7 引种检疫

国内异地引入种禽及精液、种蛋时，应当先到当地动物防疫监督机构办理检疫审批手续且检疫合格。引入的种禽必须隔离饲养 21 天以上，并由动物防疫监督机构进行检测，合格后方可混群饲养。从国外引入种禽及精液、种蛋时，按国家有关规定执行。

6 无高致病性禽流感区标准

无高致病性禽流感区，必须满足以下条件：

- 6.1 达到国家无规定疫病区基本条件。
- 6.2 有定期、快速的动物疫情报告记录。
- 6.3 在过去3年内没有发生过高致病性禽流感；在过去6个月内，没有接种过禽流感疫苗；停止免疫接种后，没有引进接种过禽流感疫苗的禽类。
- 6.4 有有效的监测体系和监测区，过去3年内实施疫病监测，未检出H5、H7病原或H5、H7禽流感HI试验阴性。
- 6.5 所有的报告、监测记录等有关材料准确、详实、齐全。
- 6.6 若发生高致病性禽流感时，在采取扑杀措施及血清学监测的情况下，最后一只病禽扑杀后6个月；或采取扑杀措施、血清学监测及紧急免疫情况下，最后一只免疫禽屠宰后6个月，经实施有效的疫情监测和血清学检测确认后，方可重新申请无高致病性禽流感区。

附件一：

样品采集与处理

活禽病料应包括气管和泄殖腔拭子，最好是采集气管拭子。小珍禽用拭子取样易造成损伤，可采集新鲜粪便。死禽采集气管、脾、肺、肝、肾和脑等组织样品。将每群采集的10份棉拭子，放在同一容器内，混合为一个样品；容器中放有含有抗菌素的pH值为7.0-7.4的PBS液。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（2000IU/mL）、链霉素（2mg/mL），庆大霉素（50 μ g/mL），制霉菌素（1000IU/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。若不加抗生素，可用细菌过滤器过滤除菌。粪便、研碎的组织用含抗生素的溶液配成10-20%（W/V）的悬液，冰浴放置1-2小时内样品应尽快处理，如来不及处理，可放在-70℃或以下保存，若放在4℃保存不能超过5天。将混合样品用抗生素制成悬液，接种到9-11日龄鸡胚尿囊腔内，0.1mL/胚；置于35-37℃孵育4-7天，检测死胚和所有到孵化末期鸡胚尿囊液的血凝活性。用浓缩病毒和所有A型流感病毒共有的核衣壳或基质抗原的抗血清作免疫扩散试验，能确诊A型流感病毒。测定毒株对禽的致病力方法：将感染鸡胚尿囊液用生理盐水1:10稀释，以0.1mL/羽的剂量翅静

脉接种至少 8 只 4-8 周龄的易感鸡。每日观察鸡的死亡情况，连续观察 10 天。10 天内如果死亡率高于 75%，则认为该病毒毒株为高致病力。

附件二：

病原鉴定方法

增殖 A 型流感病毒的较好方法是将其接种于无特定病原体（SPF）鸡胚。粪便和组织悬液经 1000rp/m 离心 10 分钟，上清液以 0.2mL/胚的剂量经尿囊腔途径接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚，每个样品接种 5 个胚，于 37℃ 孵化箱内孵育 4-7 天。18 小时后每 8 小时观察鸡胚死亡情况，死亡鸡胚或者濒死鸡胚以及孵育末期所有的鸡胚放在 4℃ 冷却，检测尿囊液的 HA 活力（见附件 4）。阳性反应说明很可能有正粘病毒科的流感病毒，呈阴性反应的尿囊液至少应再接种一批鸡胚。用 AGID 试验（见附件 5）检测流感病毒，可证明 A 型流感病毒属所有成员共同存在的核衣壳和基质抗原。

抗原制备方法：

1 用浓缩的尿囊液病毒或者用已感染的绒毛尿囊膜的提取物，这些抗原用标准血清进行标定。将含毒尿囊液以超速离心或者在酸性条件下进行沉淀以浓缩病毒。酸性沉淀法是将 1.0mol/L HCl 加入到含毒尿囊液中，调 pH 值到 4.0，将混合物置于冰浴中作用 1 小时，经 1000rp/m，4℃ 离心 10 分钟，弃去上清液。病毒沉淀物悬于甘氨酸-肌氨酸缓冲液中（含 1% 十二烷基肌氨酸缓冲液，用 0.5 mol/L 甘氨酸调 pH 值至 9.0）。沉淀物中含有核衣壳和基质多肽。

2 用含丰富病毒核衣壳的尿囊膜制备。从尿囊液呈 HA 阳性的感染鸡胚中提取绒毛尿囊膜，将其匀浆或研碎，然后反复冻融三次，经 1000rp/m 离心 10 分钟，弃沉淀，取上清液用 0.1% 福尔马林处理，制备抗原。

附件三：

静脉接种致病指数（IVPI）试验操作方法

收获接种病毒的 SPF 鸡胚的感染性尿囊液，测定其血凝价大于 1/16（24 或 lg24），将含毒尿囊液用灭菌生理盐水稀释 10 倍（切忌使用抗生素），将此稀释病毒液以 0.1mL/羽静脉接种 10 只 6 周龄 SPF 鸡，2 只同样鸡只接种 0.1mL 稀释液作对照（对照

鸡不应发病，也不计入试验鸡)。每隔 24 小时检查鸡群一次，共观察 10 天。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。死亡鸡在其死后的每次观察都记为 3)。

IVPI 值 = 每只鸡在 10 天内所有数字之和 / (10 只鸡 × 10 天)，如指数为 3.00，说明所有鸡 24 小时内死亡；指数为 0.00，说明 10 天观察期内没有鸡表现临床症状。

当 IVPI 值大于 1.2 时，判定分离株为高致病力禽流感病毒 (HPAIV)。

附件四：

琼脂凝胶免疫扩散试验 (AGID)

因为 A 型流感病毒都有抗原性相似的核衣壳和基质抗原，可以利用免疫扩散试验检测 A 型流感病毒的存在与否。制备的浓缩病毒制剂含有基质和核衣壳抗原；基质抗原与核衣壳抗原相比扩散得较快。琼脂免疫扩散试验已作为常规试验方法来检测鸡与火鸡的特异性抗体，并可作为鸡群感染证据。

1 抗原制备

一般常用的核衣壳浓缩制剂是从被感染的 10 日龄鸡胚绒毛尿囊膜中获得的，将其匀浆冻融三次，以 1000rp/m 离心 10 分钟，取上清液加 0.1% 福尔马林或 1%β - 丙内酯灭活，再离心即可作为抗原。流感病毒感染后不是所有的禽种都能产生沉淀抗体。

2 琼脂板制备

该试验常用 1 克优质琼脂粉或 0.8 - 1 克 琼脂糖加入 100 mL0.01mol/L、pH 值 7.2 的 8%氯化钠 - 磷酸缓冲液中，水浴加热融化，稍凉 (60℃ - 65℃)，倒入琼脂板内 (厚度为 3mm)，待琼脂凝固后，4℃冰箱保存备用。用打孔器在琼脂板上按 7 孔梅花图案打孔，孔径约 3 mm - 4mm，孔距为 3mm。

3 加样用移液器滴加抗原于中间孔，周围 1、4 孔加阳性血清，其余孔加被检血清，每孔均以加满不溢出为度，每加一个样品应换一个滴头，并设阴性对照血清。

4 感作将琼脂板加盖保湿，置于 37℃温箱。24 - 48 小时后，判定结果。

5 结果判定

5.1 阳性。阳性血清与抗原孔之间有明显沉淀线时，被检血清与抗原孔之间也形成沉淀线，并与阳性血清的沉淀线末端吻合，则被检血清判为阳性。

5.2 弱阳性。被检血清与抗原孔之间没有沉淀线，但阳性血清的沉淀线末端向被检血清孔偏弯，此被检血清判为弱阳性（需重复试验）。

5.3 阴性。被检血清与抗原孔之间不形成沉淀线，且阳性血清沉淀线直向被检血清孔，则被检血清判为阴性。

附件五：

血凝抑制（HI）试验

1 操作程序

1.1 抗原血凝效价测定

1.1.1 10%和0.5% 鸡红细胞液的制备

1.1.1.1 采鸡血：用注射器吸取阿氏液约 1mL，取 3 日龄 - 10 日龄 SPF 鸡（最少 2 只），心脏采血约 2mL - 4mL，与阿氏液混合，放入装 10mL 阿氏液的离心管中混匀。

1.1.1.2 洗涤鸡红细胞：将离心管中的血液经 1500rp/m - 1800 rp/m 离心 8 分钟，弃上清液，沉淀物加入阿氏液，轻轻混合，再经 1500rp/m - 1800rp/m 离心 8 分钟，用吸管移去上清液及沉淀红细胞上层的白细胞薄膜，再多次重复以上过程后，加入阿氏液 20 mL，轻轻混合成红细胞悬液，4℃保存 5 天备用。

1.1.1.3 10%鸡红细胞悬液：取阿氏液保存不超过 5 天的红细胞，在锥形刻度离心管中离心 1500rp/m - 1800rp/m 8 分钟，弃去上清液，准确观察刻度离心管中红细胞体积（mL），加入 9 倍体积（mL）的生理盐水，用吸管反复吹吸使生理盐水与红细胞混合均匀。

1.1.1.4 0.5%鸡红细胞液：取混合均匀的 10%鸡红细胞悬液 1 mL，加入 19 mL 生理盐水，混合均匀即可。

1.1.2 抗原血凝效价测定

1.1.2.1 于微量血凝板的 A - G 排各孔分别加入生理盐水 50 μ L。

1.1.2.2 A - G 排每排的第 1 孔加入抗原 50 μ L，每一种抗原的血凝效价测定应作两排检验，如 A1 孔与 B1 孔各加入新城疫病毒抗原 50 μ L；C1 孔与 D1 孔各加入禽流感病毒（A 型）抗原 50 μ L，以此类推。

1.1.2.3 用微量移液器从第 1 孔至第 12 孔对抗原作系列倍比稀释，即将第 1 孔的抗原与生理盐水用移液器反复吹吸 3 次，吸出 50 μ L 移至第 2 孔，用生理盐水清洗吸头 3 次后，再用于下一个孔的混合，以此类推，直至第 12 孔，从第 12 孔吸出 50 μ L 弃去，

此孔抗原的最终稀释度为 1: 4096。

1.1.2.4 每孔中加入 0.5% 鸡红细胞悬液 50 μ L, 包括 H11 孔与 H12 孔。

1.1.2.5 将血凝板置振荡器上中速振荡 1-2 分钟。

1.1.2.6 置室温 (18 $^{\circ}$ C - 22 $^{\circ}$ C) 感作 45 分钟。

1.1.2.7 抗原血凝价判定: 感作完毕, 观察血凝板, 判读结果 (见下表)。

表 1 血凝试验结果判读标准

类别	孔底所见	结果
1	红细胞全部凝集, 均匀铺于孔底, 即 100% 红细胞凝集	++++
2	红细胞凝集基本同上, 但孔底有大圈	+++
3	红细胞于孔底形成中等大的圈, 四周有小凝块	++
4	红细胞于孔底形成小圆点, 四周有少许凝集块	+
5	红细胞于孔底呈小圆点, 边缘光滑整齐, 即红细胞完全不凝集	-

能使红细胞完全凝集 (100% 凝集, + + + +) 的抗原最高稀释度为该抗原的血凝效价, 此效价为 1 个血凝单位。注意对照孔应呈现完全不凝集 (-), 否则此次检验无效。

1.2 血凝抑制试验

1.2.1 被检血清样品准备

1.2.1.1 血清灭活: 被检血清, 包括阳性、阴性血清, 56 $^{\circ}$ C 水浴 30-45 分钟, 以破坏补体及血凝抑制因子。

1.2.2 抗原准备禽流感病毒 (A 型) 作血凝抑制试验时各种抗原所用血凝单位是 8 个与 4 个血凝单位。8 个血凝单位抗原的配置: 如果某抗原的血凝效价为 1: 1024, 8 个血凝单位为 $1024/8 = 128$ (即 1: 128), 取生理盐水 11.8mL, 加入 1: 10 稀释的抗原 1.0 mL, 混合均匀即为 1: 128 稀释液。

1.2.3 抗原血凝效价的重测定

1.2.3.1 为了确保血凝抑制试验时使用抗原的活性, 有必要对已配置的 8 个血凝单位抗原进行血凝效价的重测定, 此项试验常与血凝抑制试验同时进行。

1.2.3.2 A 至 H 各排第 1 孔分别加入 100 μ L 8 个血凝单位抗原。

1.2.3.3 A-H各排第2-8孔分别加入生理盐水 50 μ L。

1.2.3.4 将抗原分别作系列倍比稀释至第8孔，从第8孔吸出 50 μ L 弃去。

1.2.3.5 每孔加 0.5% 鸡红细胞悬液 50 μ L。

1.2.3.6 将血凝板置微量振荡器振荡 1-2 分钟。

1.2.3.7 室温 (18 $^{\circ}$ C - 22 $^{\circ}$ C) 感作 45 分钟。

1.2.3.8 观察结果，若血凝单位偏离两个以上稀释度，则血凝抑制试验无效。若血凝单位偏离 1 个稀释度，属可校正范围，按常规对被检血清的血凝抑制效价进行校正。

1.2.4 血凝抑制试验

1.2.4.1 血凝板每排检测一份被检血清。第1孔分别加入被检血清 20 μ L，再加入生理盐水 80 μ L，被检血清稀释度为 1: 5。

1.2.4.2 设阳性血清和阴性血清对照。

1.2.4.3 每排第2孔分别加入 50 μ L 8 个单位抗原，第3-11孔分别加入 50 μ L 4 个单位抗原。

1.2.4.4 用移液器自第1孔吹吸 3 次后，取出 50 μ L 移至第2孔，以此倍比稀释至第11孔，从11孔吸出 50 μ L 弃去。

1.2.4.5 第1孔为血清对照，第2孔被检血清为 1: 10 稀释，第3孔为 1: 20，第4孔为 1: 40，以此类推，第11孔为 1: 5120。

1.2.4.6 每孔加入 0.5% 鸡红细胞悬液 50 μ L。

1.2.4.7 将血凝板置微量振荡器上振荡 1-2 分钟。

1.2.4.8 置室温 (18 $^{\circ}$ C - 22 $^{\circ}$ C) 感作 45 分钟。

1.2.4.9 感作完毕，将血凝板倾斜 70 $^{\circ}$ ，凡沉淀于孔底的红细胞沿倾斜面向下呈线状流动，呈现与红细胞对照孔一样者为完全不凝集孔。出现完全不凝集的血清最高稀释度为该被检血清血凝抑制效价。

2 结果判定

禽流感 (A 型) 的血凝抑制效价 $\geq$ 1: 10 为阳性。该试验中，鸡血清极少出现非特异性阳性反应，被检血清不必进行预处理。其它禽类血清可能对鸡红细胞有非特异性凝集反应，可用鸡红细胞对被检血清进行吸附，以除去这种非特异性凝集特性。方法是在每 0.5mL 的被检血清中加入 0.025mL 的鸡红细胞，轻摇后静置 30 分钟以上，1500rp/m 离心 2~5 分钟。也可用不具有特异性抗体的被检禽红细胞代替鸡红细胞。