

DB 5304

玉溪市地方标准

DB 5304/T XXXX—2022

主要动物疫病免疫抗体监测技术规范

2022 - 11 - 01 发布

2023 - 02 - 01 实施

玉溪市市场监督管理局 发布

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。

本文件由玉溪市动物疫病预防控制中心提出。

本文件由玉溪市农业农村局归口。

本文件起草单位：玉溪市动物疫病预防控制中心

本文件主要起草人：吕嵘、杨耀兰、罗晓燕、杨秋楠、宋诗雅、李晶、张晓舟、徐聪、莫洪涛、吴明伟、杨曦。

主要动物疫病免疫抗体监测技术规范

1 范围

本规范规定了动物疫病免疫抗体监测的主要监测病种、血清样品采集、采样单填写、血清分离与保存、样品的送检与接收、抗体监测方法及结果判定、监测结果记录与汇总、血清留样、无害化处理。

本规范适用于玉溪市主要动物疫病免疫抗体监测。

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/T 16550 新城疫诊断技术
GB/T 16551 猪瘟诊断技术
GB/T 18090 猪繁殖与呼吸综合征诊断方法
GB/T 18635 动物防疫 基本术语
GB/T 18935 口蹄疫诊断技术
GB/T 18936 高致病性禽流感诊断技术
GB/T 27982 小反刍兽疫诊断技术
NY/T 541 兽医诊断样品采集保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

动物疫病

主要是指生物性病原引起的动物群发性疾病，包括动物传染病、寄生虫病。

3.2

抗体

在病原刺激下产生的一类能与抗原发生特异性结合的免疫球蛋白，抗体主要存在于体液中。

3.3

免疫监测

普检或抽检动物群体的抗体水平，以监控群体的免疫状态，为实施计划免疫和增强免疫提供依据。

3.4

血清

血浆去除纤维蛋白后的(胶体性)液体。

3.5

血凝试验(HA)

某些抗原或特殊物质有凝集某些动物红细胞的特性,通过这种反应检测抗原的生物活性。

3.6

血凝抑制试验(HI)

具有血凝活性的抗原与相应特异性抗体结合后,其血凝活性被抑制。这一试验可用作血清学检测。

3.7

酶联免疫吸附试验

将某一反应组分包被(吸附)在固相(如微量板)上,进行血清学反应后,用结合物的酶系统进行检测。在实际应用中,有直接法、间接法、夹心法、竞争法、阻断法、抗原捕捉法等。

4 主要监测病种

在玉溪市范围内开展的主要动物疫病监测病种。

国家强制免疫病种:高致病性禽流感、口蹄疫、小反刍兽疫。

地方计划免疫病种:新城疫、猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征。

5 血清样品采集

5.1 采血器材

防护服、防护口罩、无粉乳胶手套、注射器、针头、普通真空采血管、2ml离心管、碘酊、75%酒精棉球、冰袋、冷藏容器、采样登记表、记号笔、签字笔等。

5.2 采血时间

猪免疫注射28天后(口蹄疫免疫35天后),其他动物免疫21天后方可采血。

5.3 采血方法

——生猪站立式或仰卧式前腔静脉采血、牛羊站立式颈静脉或尾静脉采血、禽类翅静脉采血;

——对采血部位的皮肤先剃(拔)毛,碘酊消毒,75%的酒精脱碘。

6 采样单填写

采血时应按《血清样品采样登记表》(参见附录A)的内容详细填写采样单,采样单一式两份,一份由被采样单位保存,一份由采样单位保存。

7 血清的分离与保存

7.1 血清分离

采集的血液样品可室温放置析出血清，或经4000r/min、3-5分钟离心，吸出上层血清，放置于合适的离心管中。

7.2 血清编号

血清编号为“行政区域拼音大写字母”加上“不同动物种类血清编号英文字母和阿拉伯数字组合”标记。

- a) 猪以“A01、A02、A03……An”模式编写；
- b) 牛以“B01、B02、B03……Bn”模式编写；
- c) 羊以“C01、C02、C03……Cn”模式编写；
- d) 禽以“D01、D02、D03……Dn”模式编写。

例如：红塔区猪血清编号为：HT A01；通海县禽血清编号为：TH D01

用防水记号笔清晰标记于离心管。

7.3 血清的保存

血清立即检测可放在4℃保存；如果保存时间较长，应放置在-20℃冰箱内保存。

8 样品的送检与接收

——运输血清样品时将血清放在盛有冰块的冷藏箱中运送；

——样品送检前送检单位填写《实验室样品送样表》（参见附录表 B.1）；样品送达兽医实验室，实验室人员进行接收样品登记，填写《实验室接样登记表》（参见附录表 B.2）。

9 抗体监测方法及结果判定

9.1 高致病性禽流感

9.1.1 免疫抗体监测方法：

血凝（HA）和血凝抑制试验（HI）

9.1.1.1 1%鸡红细胞制备

分别至少采集三只无特定病原体（SPF）健康公鸡或未免疫（禽流感和新城疫）健康公鸡全血3-5ml，置于30-50ml生理盐水中，洗涤离心2次，每次均以2000r/min 离心 5min，洗涤后弃去上清，混合于一个离心管中，以2000r/min离心5min。吸取底层红细胞用生理盐水配置1%体积的红细胞悬液。

9.1.1.2 血凝试验（HA）

- a) 在 96 孔 V 型（110°）微量反应板中，每孔加 25 微升生理盐水。反应板第 1 孔加 25 微升抗原原液，反复吹吸 3-5 次混匀。依次从第 1 孔倍比稀释至第 11 孔，从第 11 孔吸取 25 微升弃去。第 12 孔为生理盐水对照孔。每孔分别加 25 微升生理盐水和 25 微升 1%鸡红细胞悬液。震荡混匀，室温静置 30min，进行结果判定；
- b) 结果判定：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。

9.1.1.3 血凝抑制试验 (HI)

9.1.1.3.1 4 个血凝单位病毒抗原的配制

- 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。血凝抑制试验前应对 4 HAU 抗原进行回测, 调整准确;
- 以血凝试验终点滴度为 1: 256 (2^8 或 $8\log_2$) 为例, 4 HAU 为 $256/4=64$ (1: 64), 在 63 份生理盐水里加入 1 份抗原;
- 抗原回测检查: 选取 96 孔 V 型板 5 个孔, 在 2-5 孔每孔加入 25 微升生理盐水, 将配制好的 4 HAU 抗原 25 微升加入第 1-2 孔, 从第 2 孔开始按照 1: 1、1: 2、1: 4、1: 8、1: 16 倍比稀释, 即依次形成 4 HAU、2 HAU、1 HAU、1/2 HAU、1/4 HAU 抗原浓度; 再分别加入生理盐水 25 微升和 1% 鸡红细胞悬液 25 微升。震荡混匀, 室温静置 30min, 如果配置的抗原液为 4 HAU, 则 1: 4 稀释度将出现凝集终点; 如高于 4 HAU, 凝集终点将后移, 在已配制好的 4 HAU 抗原液中添加等量的生理盐水, 二次回测; 如低于 4 HAU, 凝集终点将前移, 在已配制好的 4 HAU 抗原液中添加等量的抗原, 二次回测。

9.1.1.3.2 血清抗体效价测定

96 孔 V 型 (110°) 反应板, 第 1 孔—第 11 孔均加入 25 微升生理盐水, 第 12 孔加入 50 微升生理盐水作为空白对照。第 1 孔加入 25 微升血清, 反复吹吸 3-5 次混匀后, 吸取 25 微升加入到第 2 孔, 依次倍比稀释至第 10 孔, 从第 10 孔吸取 25 微升弃去。第 11 孔为抗原对照。第 1 孔—第 11 孔均加入 25 微升 4 HAU 抗原, 在室温下静置 30min。每孔加入 25 微升 1% 鸡红细胞悬液, 震荡混匀, 室温下静置 30min, 待空白对照 (12 孔) 红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

9.1.2 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。血清 HI 抗体效价不低于 1: 16 (2^4 或 $4\log_2$) 为免疫合格。

9.2 口蹄疫

9.2.1 免疫抗体监测方法

酶联免疫吸附试验 (ELISA)

9.2.1.1 液相阻断 ELISA

按照 GB/T 18935-2018 液相阻断 ELISA 试验方法执行;

9.2.1.2 竞争 ELISA

使用商品化口蹄疫竞争 ELISA 检测试剂盒进行检测, 使用前应进行重复性及稳定性验证。

9.2.2 结果判定

- 液相阻断 ELISA: 牛、羊抗体效价 $\geq 2^7$ 为免疫合格, 猪抗体效价 $\geq 2^6$ 为免疫合格;
- 商品化口蹄疫竞争 ELISA 检测试剂盒抗体检测阳性判为合格。

9.3 小反刍兽疫

9.3.1 免疫抗体监测方法

按照GB/T 27982-2011 竞争ELISA试验方法执行；或等效使用商品化小反刍兽疫ELISA检测试剂盒进行检测，使用前应进行重复性及稳定性验证。

9.3.2 结果判定

竞争ELISA:平均抑制率(PI) >80, 判为强阳性, 50 < 平均抑制率(PI) ≤80, 判为弱阳性, 表述为小反刍兽疫血清学阳性。或商品化小反刍兽疫试剂盒抗体检测阳性判为合格。

9.4 新城疫

9.4.1 免疫抗体监测方法

血凝和血凝抑制试验(HA-HI), 具体试验步骤同9.1.1。

9.4.2 结果判定

血清HI抗体效价不低于1:32 (2⁵ 或 5log₂) 为免疫合格。

9.5 猪瘟

9.5.1 免疫抗体监测方法

按照GB/T 16551-2020 阻断ELISA试验方法或间接ELISA试验方法执行；或等效使用商品化ELISA检测试剂盒进行检测，使用前应进行重复性及稳定性验证。

9.5.2 结果判定

阻断ELISA抗体检测或间接ELISA抗体检测阳性判为免疫合格；或商品化猪瘟ELISA试剂盒抗体检测阳性判为合格。

9.6 猪繁殖与呼吸综合征

9.6.1 免疫抗体监测方法

按照GB/T18090—2008 间接ELISA试验方法执行；或等效使用商品化猪繁殖与呼吸综合征ELISA检测试剂盒进行检测，使用前应进行重复性及稳定性验证。

9.6.2 结果判定

间接ELISA抗体检测阳性判为合格；或商品化猪繁殖与呼吸综合征ELISA试剂盒抗体检测阳性判为合格。

10 监测结果记录与汇总

10.1 监测结果记录

实验室完成血清抗体检测后，按要求填写试验结果记录表。血凝抑制试验填写《血凝抑制试验结果记录表》（参见附录表C.1）；ELISA试验填写《ELISA试验结果记录表》（参见附录表C.2）。

10.2 监测结果的汇总

以监测区县、乡镇、规模畜禽场、行政村为单位，分动物病种、动物种类等进行结果汇总，填写《血清学监测结果统计表》（参见附表C.3）。

11 血清留样

血清监测完毕后，需要对血清进行保存不少于15日。样品留存填写《血清留样记录表》，（参见附录D）。

12 无害化处理

- 实验完毕后，及时分类收集实验室废弃物；
- 具有感染性实验室废弃物应进行高压蒸汽灭菌或放入消毒剂中浸泡 24 小时，移交专业医疗废弃物或无害化处理机构处置；
- 无害化处理填写《实验室废弃物处理记录表》，（参见附录 E）。

附 录 C
(规范性)
实验室检测结果记录表

表C.1 血凝抑制试验结果记录表

检测流转编号								样品数量							
检测项目								检测时间							
试剂生产厂家								试剂生产批号							
检测标准								4 HAU							
检测 流水号	原始 编号	血凝抑制滴度												结果	备注
		2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰	抗原 对照	空白 对照		

检测人员：

复核人员：

表C.2 ELISA 试验结果记录表

检测流转编号						样品数量					
样品名称						检测时间					
检测项目						检测方法					
样品编号		检测结果									
检测流水号	原编号	结果	检测流水号	原编号	结果	检测流水号	原编号	结果	检测流水号	原编号	结果
1			26			51			76		
2			27			52			77		
3			28			53			78		
4			29			54			79		
5			30			55			80		
6			31			56			81		
7			32			57			82		
8			33			58			83		
9			34			59			84		
10			35			60			85		
11			36			61			86		
12			37			62			87		
13			38			63			88		
14			39			64			89		
15			40			65			90		
16			41			66			91		
17			42			67			92		
18			43			68			93		
19			44			69			94		
20			45			70			95		
21			46			71			96		
22			47			72					
23			48			73					
24			49			74					
25			50			75					
备注											

检测人员：

复核人员：

表C.3 血清学监测结果统计表

畜（禽）类别：

监测方法:

单位：个、份

[illegible]

附 录 D
(资料性)
血清留样记录表

受理编号	样品流转 编号	样品种类	数量	留存地点	留样时间	保存条件	留样负责人	备注

备注：样品留存不少于15天，根据实际需要留存。

附 录 E
(资料性)
实验室废弃物处理记录表

时间	处理物品	受理编号	数量（单位：份、重量）	处理方法	处理人员	移交医疗废弃物处理时间
备注	处理物品：血清样品、组织样品、细菌培养物、废弃培养基、试验废弃物等 处理方法：高压灭菌、浸泡消毒、煮沸消毒、焚烧、其他					