ICS 11.220
CCS B 41

DB53

云 南 省 地 方 标 准

DB53/T 1064.2—2021

绿孔雀检疫技术 第2部分：禽流感病毒实验室检测技术规范

Quarantine technique for *Pavo muticus*
—Part 2: Technical specifications for laboratory examination of *Avian Influenza Virus*

2021-09-30 发布 2021-10-14 实施

云南省市场监督管理局 发布

目　　次

前言 III
引言 V
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　缩略语 2
5　总则 2
6　禽流感病毒毒株的毒力划分和血清亚型 2
7　仪器设备和试剂 3
7.1　实验室器材 3
7.2　试剂 3
8　样品 3
8.1　采样要求与原则 3
8.2　采样类型和采样方法 3
8.3　样品储运 4
9　试验步骤 4
9.1　样品制备 4
9.2　鸡胚接种 4
9.3　MDCK 细胞培养 4
9.4　病毒血凝（HA）试验和血凝抑制（HI）试验 5
9.5　逆转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）扩增检测 5
9.6　H 蛋白序列分析 7
10　试验数据处理 7
10.1　HA 试验结果判定 7
10.2　HI 试验结果判定 7
10.3　核酸检测结果判定 8
附录 A（规范性）　缓冲溶液和 1%鸡红细胞悬液 9
附录 B（资料性）　采样记录表 10

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。

本文件是DB53/T 1064《绿孔雀检疫技术》的第2部分。DB53/T 1064已经发布了以下部分：

——第 1 部分：禽副黏病毒实验室检测技术规范；

——第 2 部分：禽流感病毒实验室检测技术规范；

——第 3 部分：羽虱实验室检测技术规范；

——第 4 部分：消化道线虫实验室检测技术规范。

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。

本文件由云南省林业与草原局、云南省市场监督管理局共同提出。

本文件由云南省林业标准化技术委员会（YNTC02）归口。

本文件主要起草单位：云南农业大学、云南省标准化研究院。

本文件主要起草人：陈培富、黄艳梅、卓娜、李建春、胡世享、杨俊、钱丽敏、何依蓉、邹丰才、杨建发。

引 言

绿孔雀（*Pavo muticus*）在我国仅分布于云南，是国家Ⅰ级重点保护野生动物，也是全球濒危物种，并已列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)和《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》。为切实贯彻《中华人民共和国野生动物保护法》和《中华人民共和国动物防疫法》，编制并发布DB53/T 1064《绿孔雀检疫技术》地方标准，可让从事绿孔雀保护的相关人员按标准化和规范化程序开展绿孔雀病原学诊断，从而采取必要的防治措施，以提高染疫绿孔雀的成活率，维护绿孔雀种群健康和地区生态平衡，提升生物多样性保护成效。

本文件已发布4个部分：

——第 1 部分：禽副黏病毒实验室检测技术规范。本部分从禽副黏病毒实验室检测技术的总则、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范；

——第 2 部分：禽流感病毒实验室检测技术规范。本部分从禽流感病毒实验室检测技术的总则、禽流感病毒毒株的毒力划分和血清亚型、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范；

——第 3 部分：羽虱实验室检测技术规范。本部分从羽虱实验室检测的原理、试验条件、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范；

——第 4 部分：消化道线虫实验室检测技术规范。本部分从消化道线虫实验室检测技术的试验原理、常见线虫形态特征、试验条件、仪器设备和试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等方面制定了规范。

绿孔雀检疫技术
第 2 部分：禽流感病毒实验室检测技术规范

重要提示：由于禽流感病毒可感染人类，采样和检测人员应穿戴防护服及口罩，并采取必要的消毒措施。涉及禽流感病毒的实验操作，应在相应的生物安全级别实验室（符合GB 19489的要求）进行。本检测技术规范中凡接触病毒样品的检验器材、废弃物及其包装物均应做消毒或灭菌等无害化处理，以免污染环境或扩散病毒。

1 范围

本文件规定了绿孔雀（*Pavo muticus*）检疫技术中禽流感病毒实验室检测技术的总则、禽流感病毒毒株的毒力划分和血清亚型、仪器设备和试剂、样品、试验步骤和试验数据处理。

本文件适用于绿孔雀检疫技术中禽流感病毒实验室检测。

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，标注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不标注日期的引用文件，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 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

禽流感 avian influenza

禽流感是由正粘病毒科（*Orthomyxoviridae*）甲型流感病毒属（*Influenzavirus* A）成员引起禽类的一种急性、全身出血性传染病。

3.2

病毒血凝 viral hemagglutination

具有血凝活性的病毒（如流感病毒）粒子，凭借其表面的血凝素识别、结合特定动物红细胞表面受体并使红细胞凝集（即红细胞不再自然下沉汇集）。

3.3

病毒血凝抑制 viral hemagglutination inhibition

抗体特异性结合于具有血凝活性的病毒粒子的血凝素（H）抗原位点，干扰病毒H蛋白与红细胞受体之间的结合，从而阻断或抑制病毒粒子凝集红细胞的能力。

3.4

反转录-聚合酶链式反应 reverse transcription - polymerase chain reaction

以RNA（mRNA）为模板，经逆转录酶催化生成 cDNA，再以cDNA为模板进行聚合酶链式反应（PCR）扩增，常用于获得目的基因或检测mRNA表达。

3.5

弗林蛋白 furin

亦称作成对碱性氨基酸裂解酶，是动物细胞产生的内切蛋白酶，能识别、裂解流感病毒血凝素（H）蛋白中存在的R-X-X-R^{V}位点，产生H1和H2两个亚基，以形成具有感染活性的流感病毒粒子。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AIV：禽流感病毒 *Avian influenza virus*

AMV：禽成髓细胞瘤病毒 *Avian myeloblastosis virus*

DEPC：焦碳酸二乙酯 Diethypyrocarbonate

dNTP：脱氧核苷酸 Deoxyribonucleotide triphosphate

H：血凝素 Hemagglutinin

HA：血凝 Hemagglutination

HAU：血凝单位 Hemagglutination unit

HEPES：4-羟乙基哌嗪乙磺酸 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HI：血凝抑制 Hemagglutination inhibition

HPAI：高致病性禽流感 Highly pathogenic avian influenza

M：基质蛋白 Matrix protein

MDCK：犬肾传代细胞 Madin-Darby kidney cells

N：神经氨酸酶 Neuraminidase

PBS：磷酸缓冲盐溶液 Phosphate-buffered saline

PCR：聚合酶链式反应 Polymerase chain reaction

RBCs：红细胞 Red blood cells

RNA：核糖核酸 Ribonucleic acid

RT-PCR：反转录-聚合酶链式反应 Reverse transcription - polymerase chain reaction

SPF：无特定病原体 Specific pathogen free

5 总则

5.1 鸡胚接种和MDCK细胞培养均是分离禽流感病毒的有效方法，检测流感病毒时，根据具体情况选用其一，或同时采用。

5.2 取5.1收获的尿囊液或MDCK细胞培养物上清做HA试验和HI试验，确定分离毒株的种属及血清型（亚型）。

5.3 对5.1或5.2分离毒株采用RT-PCR扩增分析其M基因，做出禽流感病毒定性鉴定。

5.4 对5.2确定的禽流感病毒H5、H7或H9血清亚型的分离毒株，用血清亚型特异性引物做RT-PCR扩增检测其H基因，并依据H基因测序结果判定分离毒株的致病性程度。

6 禽流感病毒毒株的毒力划分和血清亚型

根据禽流感病毒致病性或毒力的不同，可以将禽流感分为高致病性禽流感、低致病性禽流感和无致病性禽流感。已知流感病毒可分为18个H亚型和11个N亚型。其中，由H5和H7亚型毒株（以H5N1和H7N7为代表）引起的禽流感通常为HPAI，其传染性强，死亡率高、危害大。

7 仪器设备和试剂

7.1 实验室器材

PCR仪、凝胶成像系统、台式低温高速离心机、电泳仪、电泳槽、冰箱、微量移液器、水浴锅、照胶仪、手术器械、棉拭子、离心管、抗凝管、一次性滤器（滤膜孔径0.45 μm）、细胞培养瓶、V形孔血凝反应板、微型振荡器等。

7.2 试剂

RNA提取试剂或试剂盒、氯仿、异丙醇、75%乙醇、1.0%琼脂糖凝胶、阿氏液（Alsever’s solution）（见附录A.1）、1% 鸡红细胞悬液（见附录 A.2）、0.01 mol/L PBS（pH 7.2）、核酸染料、标准禽流感病毒抗原与参考毒株、阳性对照血清、阴性对照血清、MDCK 细胞、DMEM 培养基、青霉素、链霉素、HEPES、胰蛋白酶、引物、10×扩增反应缓冲液、dNTPs（每种核苷酸2.5 mmol/L）、琼脂糖、核酸上样缓冲液、胶回收试剂盒等。

8 样品

8.1 采样要求与原则

8.1.1 采样要求

采样应符合 NY/T 541 的要求。

8.1.2 采样原则

采集的样品应具有典型性，从濒死、死亡或处于急性发病期的绿孔雀采集样品，对暴发疫病的群体宜采集多只发病或死亡绿孔雀的样品。采样过程应无菌操作，装样品的容器应确保密封完好，注意避免被污染以及污染环境，并及时填写采样记录表（见附录 B），确保样品编号与标签一致。

8.2 采样类型和采样方法

8.2.1 口咽拭子和泄殖腔拭子

采样方法如下：

a) 取咽喉拭子时，将拭子深入孔雀喉头口及上颚裂来回刮 3 次～5 次取咽喉分泌液；
b) 取泄殖腔拭子时，将拭子深入孔雀泄殖腔转一圈并沾取少量内容物；
c) 同一个体的咽喉拭子和泄殖腔拭子合并放入预先盛有 1.0 mL PBS（含 100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素）的离心管中，盖紧管盖，并对样品编号。

8.2.2 组织样品

若绿孔雀死亡在 24 h 以内，则适合采集组织样品。每只绿孔雀采集肺（或气管）、脑、心、肝、脾、胃、肾等组织各 1 份，数量均宜不少于 3 g。待检样品装入一次性密封袋或其它灭菌容器，确保密封完好，编号，送实验室。

8.2.1 血清

每只孔雀采集静脉血 2 mL～3 mL，盛于无菌器皿中或 10 mL 离心管中，37 ℃静置 1 h 或 4 ℃静置 3 h～4 h，经 2 000 r/min~3 000 r/min 离心 15min 分离血清，将血清移、分装于新的无菌离心管，盖紧，封好管口，贴上标签。

刚死亡的绿孔雀可用无菌注射器从其心脏采血，直接转移至无菌离心管中，密封，编号，同法分离血清。

8.3 样品储运

8.3.1 口咽及泄殖腔拭子

拭子样品在 4 ℃ 条件下保存不应超过 24 h，若长期保存，应置于−80 ℃冰箱。

8.3.2 组织样品

组织样品应冰冻（−20 ℃以下）保存和运输，且不能反复冻融。

8.3.3 血清

一周内做检查的血清可置 4 ℃冰箱保存。若长时间保存，应将血清放入−20 ℃或−80 ℃冰箱冻存。

9 试验步骤

9.1 样品制备

9.1.1 口咽及泄殖腔拭子

用经灭菌的镊子将拭子中的液体充分挤出，混匀样品，直至拭子上没有肉眼可见的样品，室温放置30min，4 ℃ 3 000 r/min离心15min，转移上清液于1.5 mL无菌离心管内，编号备用。

9.1.2 组织样品

取适量待检样品置于洁净、灭菌并烘干的研钵中，加入液氮充分研磨。按1 g 组织样品加10 mL PBS的比例混匀，4 ℃ 3 000 r/min离心15min，取上清液转入1.5 mL 无菌离心管内，编号，备用。

9.2 鸡胚接种

9.2.1 样品处理

取9.1得到的上清液过滤，滤过液作为接种材料。

9.2.2 样品接种

取9.2.1样品，以0.2 mL/胚剂量经尿囊腔途径接种9 d～11 d SPF鸡胚，每个样品接种3～5枚鸡胚，封闭进针孔，在37 ℃ 孵化箱内孵育，每隔12 h观察鸡胚死亡情况。无菌收集24 h~96 h死亡鸡胚及96 h仍存活鸡胚的尿囊液，采用HI试验测定尿囊液有无HA活性。

9.3 MDCK 细胞培养

具体操作步骤如下：

a) 将样品滤过液接种于长成致密单层的 MDCK 细胞瓶内，置于 35 ℃～37 ℃、含 5% CO_2 培养箱内培养，使病毒吸附细胞 2 h；
b) 弃掉样品液，用 DMEM 维持液（含 3%犊牛血清）洗一遍，每瓶加入 5 mL DMEM 维持液，置于 35 ℃～37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养。维持液成份：DMEM 培养基，青霉素、链霉素、HEPES、胰酶终浓度分别为 100 IU/mL、100 μg/mL、25 mmol/L 和 2 μg/mL，用 $NaHCO_3$ 将 pH 值调整为 7.2，过滤除菌，无菌检验合格；
c) 逐日在倒置显微镜下观察细胞病变，分别取阴性对照、未出现病变的和出现病变的细胞培养物上清液，用 HA 试验测定病毒的血凝滴度（效价）；
d) 当 75%～100%细胞出现病变时收获病毒，将细胞瓶放于−70℃冰箱，冻融 1～2 次以使细胞破裂及释放病毒。

9.4 病毒血凝（HA）试验和血凝抑制（HI）试验

9.4.1 病毒血凝（HA）试验

病毒血凝（HA）试验方法：
a) 在 96 孔 V 型微量反应板，每孔预先加 25 μL PBS；
b) 向第 1 孔加入 25 μL 病毒溶液（尿囊液或细胞培养物上清），反复吹吸 3 次～5 次混匀；
c) 从第 1 孔吸取 25 μL 病毒溶液加入第 2 孔，混匀后吸取 25 μL 加入第 3 孔，如此进行 2 倍连续稀释至第 11 孔，从第 11 孔吸取 25 μL 溶液弃去，但第 12 孔加入 25 μL PBS 或正常尿囊液作为阴性对照孔；
d) 每孔加入 25 μL PBS；
e) 每孔加入 25 μL 1%鸡红细胞悬液；
f) 轻轻振荡血凝反应板以混匀反应体系，室温（20 ℃～25 ℃）静置 40min，或 4 ℃静置 60min，当阴性对照孔的红细胞在孔底汇集成原点时判定结果。

9.4.2 病毒血凝抑制（HI）试验

病毒血凝抑制（HI）试验方法：
a) 在 96 孔血凝反应板，每孔预先加入 25 μL PBS；
b) 向第一孔加入 25 μL 血清样品，混匀；
c) 在血凝反应板上将血清作横向的 2 倍连续稀释，但第 12 孔、第 13 孔、第 14 孔和第 15 孔分别设置为加 25 μL PBS 的红细胞对照孔、加未做任何免疫禽血清的阴性对照孔、加新城疫病毒抗体的对照孔和加禽腺病毒抗体的对照孔（对已确定禽流感病毒血清亚型的分离毒株，还可设置阳性对照孔）；
d) 每孔加入 25 μL 4 HAU 的病毒抗原，室温（20 ℃～25 ℃）静置不少于 30min，或 4 ℃静置不少于 60min；
e) 每孔加入 25 μL 1 %RBCs，轻轻振荡混匀，室温（20 ℃～25 ℃）静置约 40min，或 4 ℃放置约 60min，当红细胞对照孔呈显著钮扣状时判定结果。

9.5 逆转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）扩增检测

9.5.1 病毒 RNA 的提取

可用商品化RNA提取试剂盒提取待检样品（棉拭子、组织或鸡胚尿囊液）、阳性对照样品及阴性对照样品的病毒RNA。也可用RNA提取试剂（如Trizol）提取，方法如下：
a) 将经预处理的 250 μL 待检样品加入 750 μL RNA 提取试剂中，振荡 2min，室温放置 5min；

b) 加入 250 μL 氯仿，在微型振荡器上振荡 1min，室温放置 5min，4 ℃、12 000 r/min（约 14 000×g）离心 15min；
c) 转移上层水相至新离心管中，加入等量的异丙醇，充分混匀，室温放置 15min，4℃ 条件下 12 000 r/min（约 14 000×g）离心 15min；
d) 小心吸弃上清，加入预先经 DEPC 处理的 75%乙醇 750 μL，4 ℃、12 000 r/min（约 14 000×g）离心 5min；
e) 小心吸弃上清，将沉淀自然风干或于 50 ℃烘干，加适量的经 DEPC 处理的超纯水溶解；
f) 取 5 μL 提取物与 1 μL 6×核酸上样缓冲液混匀，做 1%琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 提取效果，对组织样品观测到 28S、18S 及 5.8S rRNA 三个条带或至少前两个条带，提示 RNA 提取合格；
g) 提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT 或 RT-PCR 扩增，若需长期保存 RNA，应置于–80 ℃冰箱或液氮内。

9.5.2 RT-PCR 扩增（一步法）

取提取的 RNA 3 μL 和每对引物（见表 1）各 1 μL，配制 RT-PCR 扩增体系（见表 2），盖紧 PCR 反应管盖子，置于 PCR 仪器反应孔内。扩增参数：45 ℃ 逆转录 45min；94 ℃ 预变性 2min，94 ℃变性 30s、52 ℃退火 45s、68 ℃延伸 45s，35 个循环，最后 68 ℃延伸 8min。

对扩增任何亚型的 H 基因（Hx）中包含 Furin 酶切位点的片段，按模板 RNA 5 μL，上、下游引物组合（见表 1）各 1 μL 配制 RT-PCR 反应体系。扩增参数除退火温度设置为 50 ℃，其余参数不变。

表 1 禽流感病毒 PT-PCR 引物

目的基因	引物名称	引物序列 5′→3′	扩增产物长度（bp）
M	M-229U	TTC TAA CCG AGG TGG AAA C	229
	M-229L	AAG CGT CTA CGC TGC AGT CC	
H5	H5-372U	GGA ATA TGG TAA CTG CAA CAC CA	369
	H5-372L	AAC TGA GTG TTC ATT TTG TCA ATG	
H7	H7-501F	AAT GCA CAR GGA GAG GGA ACT	501
	H7-501R	TGA YGC CCC GAA GCT AAA CCA	
H9	H9-273F	TGT GTC TTA CAG TGG GAC AAG CA	273
	H9-273R	TTG ACA AGA GGC CTT GGT CCT AT	
Hx	HA-1057.1-F HA-1057.2-F HA-1057.3-F	GGR GAA TGC CCC AAA TAY GT GGR ARA TGC CCC AGR TAT GT GGR GAA TGC CCC AAR TAY AT	164～176
	HA-1232.1(555)-R	*CTG AGT CCG AAC ATT GAG* TTG CTA TGV TGR TAW CCA TAC CA	
	HA-1232.2(555)-R	*CTG AGT CCG AAC ATT GAG* TTY TGA TGY CTG AAD CCR TAC CA	
注：R=(A/G)，Y=(C/T)，W=(A/T)；斜体字母表示非病毒序列			

表 2　RT-PCR 扩增体系

组分	体积（μL）
无 RNA 酶灭菌超净水	14.6
10×扩增反应缓冲液	2.5
dNTPs（2.5 mmol/L each）	2.0
RNase 抑制剂（40 U/μL）	0.5
AMV 反转录酶（5 U/μL）	0.7
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.7
上游引物 P1（20 μmol/L)	0.5
下游引物 P2 (20 μmol/L)	0.5
模板 RNA	3.0
总计	25.0

9.5.3　电泳

取PCR产物按常规方法用1%琼脂糖凝胶进行电泳检查（电压8 V ～ 10 V/cm凝胶长度，30min ～ 40min）。

9.5.4　照胶

用凝胶成像系统在紫外光下进行拍照凝胶，记录PCR扩增结果。

9.6　H 蛋白序列分析

取HA滴度阳性，新城疫病毒抗体和禽腺病毒抗体HI滴度阴性的鸡胚尿囊液或MDCK细胞培养物上清，按9.5提取总RNA做H基因的RT-PCR扩增。出现对应表1所示扩增产物大小的H5亚型369 bp条带或Hx亚型164 bp～176 bp条带，参照胶回收试剂盒方法回收条带内的扩增产物，做双向核酸测序；根据基因序列推导氨基酸序列，对禽流感病毒H蛋白的Furin酶切位点进行碱性氨基酸数量和位置的分析。

10　试验数据处理

10.1　HA 试验结果判定

判定如下：

a）将血凝反应板倾斜 60 ℃，观察红细胞有无泪珠样流淌，完全无泪珠样流淌（出现 100%凝集）的病毒最高稀释倍数判为该病毒的血凝效价，即代表 1 个 HAU；

b）血凝判定标准：红细胞均匀分散在孔内、倾斜血凝反应板时不流淌判为完全凝集，记作++++；75%凝集记作+++；50%凝集记作++；25%凝集记作+；红细胞汇集于孔底中央呈圆点、倾斜血凝反应板时与对照孔（仅含 25 μL RBCs 和 50 μL PBS）RBCs 流淌相同的孔判定为不凝集，记作−。

10.2　HI 试验结果判定

判定如下：

a) 红细胞均匀分散在孔底周围、倾斜血凝反应板时不流淌判为完全凝集，记作++++，75%凝集记作+++，50%凝集记作++，25%凝集记作+，红细胞集中在孔底中央呈圆点、倾斜血凝反应板时与对照孔（仅含 25 μL RBCs 和 50 μL PBS）RBCs 流淌相同的孔判定为不凝集或血凝被抑制，记作−；
b) 完全抑制 4 HAU 病毒抗原的血清最高稀释倍数为该血清抗体的 HI 滴度；
c) 检查各种对照：阴性对照血清 HI 滴度不高于 4 (2^2 或 2 $\log_2$)，阳性对照血清 HI 滴度与已知滴度误差不超过 1 个滴度，红细胞对照无自凝现象，结果有效，试验成立；
d) 如果高于 1:16（2^4 或 4 $\log_2$）稀释度的血清能完全抑制 4 HAU 的病毒抗原，判定该 HI 滴度为阳性，表明未经免疫个体发生禽流感病毒感染；
e) 如果血清 HI 滴度为 16，判为可疑，需重复 HI 试验，若 HI 滴度仍为 16，可判定血清抗体阳性，若 HI 滴度为 8 则判定为血清抗体阴性；
f) 在所有的确诊试验中针对试验采用的 HAU 应设病毒 HA 滴度的追溯性测定；
g) 当血凝活性不被新城疫病毒抗体和禽腺病毒抗体阻断，便可初步判定为禽流感病毒阳性。

10.3 核酸检测结果判定

判定如下：

a) 琼脂糖凝胶电泳显示阳性对照出现相应扩增条带、阴性对照无扩增条带时判定结果。出现 M 基因预期大小的 PCR 扩增片段，判定为 AIV 核酸阳性，否则判定为 AIV 核酸阴性。同时出现 H5、H7 或 H9 基因相应扩增条带的分离毒株，分别判定为 H5、H7 和 H9 血清亚型 AIV；
b) 根据 H 基因序列推导得出 H 蛋白的氨基酸序列，若 H 蛋白的 Furin 酶切位点为 B-X-B-$R^{\vee}$或 R-K-R-K-X-$R^{\vee}$，判定为高致病性禽流感病毒；若 H 蛋白的 Furin 酶切位点为 B/X-X-X-$R^{\vee}$（H5 亚型）或 B-X-$R^{\vee}$（H7 亚型）则判定为低致病性禽流感病毒。

注：B：碱性氨基酸；K：赖氨酸；R：精氨酸。

附 录 A
（规范性）
缓冲溶液和1%鸡红细胞悬液

A.1 阿氏液（Alsever's Solution）

A.1.1 阿氏液配方见表A.1。

表 A.1 阿氏液配方

序号	成分	含量/100 mL
1	葡萄糖	2.05 g
2	柠檬酸钠	0.80 g
3	柠檬酸	0.055 g
4	氯化钠	0.42 g

A.1.2 加蒸馏水100 mL，散热溶解后调pH值至6.1，69 kPa高压灭菌15min，4 ℃保存备用。

A.2 0.01 mol/L，pH 7.2 磷酸缓冲盐溶液（PBS）

A.2.1 配制25×PB

磷酸氢二钠 2.74 g ；磷酸二氢钠 0.79 g；加蒸馏水 100 mL。

A.2.2 配制1×PBS

25×PB 40 mL；氯化钠 8.5 g ；加蒸馏水至1 000 mL，调pH值至7.2，121 ℃高压灭菌30min或过滤除菌，4 ℃保存备用。

A.3 1% 鸡红细胞悬液

采集至少3只SPF鸡或无禽流感和新城疫抗体的健康公鸡的血液，与等体积的阿氏液混合，用0.01 mol/L、pH 7.2的PBS洗涤3～5次，每次均以1 000 r/min（200×g） 离心10min，洗涤（弃上清）后再用PBS配制成体积分数为1%红细胞悬液，4 ℃保存备用，有效期1周。

附　录　B
（资料性）
采样记录表

绿孔雀采样记录表见表B.1。

表 B.1　绿孔雀采样记录表

样品编号	采集份数	采集地名称	海拔	经度	纬度	采集日期	发病时间	免疫与用药史	疾病特征	采集人

云南省市场监督管理局
DB53
地方标准
发布