

ICS 11.020
C59
23226—2008

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 285—2008

流行性感冒诊断标准

Diagnostic criteria for influenza

2008-02-28 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国卫生部 发布

目 次

前言	Ⅲ
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 诊断依据	1
4 诊断原则	1
5 诊断	2
6 鉴别诊断	2
附录 A(规范性附录)流感病毒分离培养和鉴定方法	3
附录 B(规范性附录)红细胞凝集抑制试验	14
附录 C(规范性附录)微量中和试验	15
附录 D(规范性附录)流感病毒核酸检测方法	21
附录 E(规范性附录)免疫荧光法检测方法	26
附录 F(资料性附录)流行性感冒病原学、流行病学和临床表现	27
附录 G(资料性附录)流感标本的采集、运送和处理规程	29

前 言

根据《中华人民共和国传染病防治法》制定本标准。

根据国家质检总局国家标准委公告(2005年第146号),GB 15994—1995《流行性感 冒诊断标准及处理原则》自本标准实施之日起废止。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E 是规范性附录,附录 F、附录 G 是资料性附录。

本标准由卫生部传染病标准专业委员会提出。

本标准由中华人民共和国卫生部批准。

本标准起草单位:中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所。

本标准主要起草人:舒跃龙、郭元吉、余宏杰、张焯、徐翠玲。

流行性感冒诊断标准

1 范围

本标准规定了流行性感冒的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级医疗卫生机构和人员对流行性感冒进行诊断、报告。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1 流感病毒分型 type of influenza virus

根据流感病毒核蛋白(NP)、M1 蛋白抗原性和基因特性的不同分为甲(A)、乙(B)、丙(C)三型。

2.2 甲型流感病毒亚型 subtype of influenza A virus

甲型流感病毒根据其表面的血凝素(H 或称为 HA)、神经氨酸酶(N 或称为 NA)抗原和基因特性的不同又可分为多个亚型。至今甲型流感病毒已发现的血凝素有 16 个亚型(H1~H16), 神经氨酸酶有 9 个亚型(N1~N9)。

2.3 流感样病例 influenza-like illness

发热,伴咳嗽或咽痛之一者。

3 诊断依据

3.1 流行病学史

在当地流行季节(如我国北方的冬春季,南方的冬春季和夏季),一个单位或地区集中出现大量上呼吸道感染患者,或医院门诊、急诊上呼吸道感染患者明显增加。

3.2 临床表现

3.2.1 通常表现为急起高热(腋下体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$)、畏寒、头痛、头晕、浑身酸痛、乏力等中毒症状及咽痛、干咳等呼吸道症状,但卡他性症状常不明显。

3.2.2 少数病例有食欲减退,伴有腹痛、腹胀、呕吐和腹泻等消化道症状。

3.2.3 少数病例也可并发鼻窦炎、中耳炎、喉炎、支气管炎、肺炎等,甚至会呼吸循环衰竭而死亡。

3.2.4 在两岁以下的幼儿,或原有慢性基础疾病者,两肺可有呼吸音减低、湿啰音或哮鸣音,但无肺实变体征。

3.2.5 重症患者胸部 X 射线检查可显示单侧或双侧肺实质性病变,少数可伴有胸腔积液等。

3.2.6 外周血象白细胞总数不高或偏低,淋巴细胞相对增加,重症患者多有白细胞总数及淋巴细胞下降。

3.3 实验室检查

流感标本的采集、运送和处理规程参见附录 G。

3.3.1 从患者呼吸道标本中分离和鉴定到流感病毒(见附录 A)。

3.3.2 患者恢复期血清中抗流感病毒抗体滴度比急性期高 4 倍或以上(见附录 B 和附录 C)。

3.3.3 在患者呼吸道标本流感病毒特异的核酸检测阳性(见附录 D)或检测出特异的抗原(见附录 E)。

3.3.4 采集标本经敏感细胞将病毒增殖一代后,流感病毒特异的核酸检测阳性(详见附录 D)或检测出特异的抗原(见附录 E)。

4 诊断原则

如果在非流行季节仅根据临床表现,流感很难与其他病原体,尤其呼吸道病原体导致的疾病区别,

对流感病例的确诊往往需要实验室的诊断依据。但在流感流行季节,当地一个单位或局部地区出现大量上呼吸道感染患者或医院门诊、急诊上呼吸道感染患者明显增加时,具备相应临床表现的可作为流感临床诊断病例。流行性感冒病原学、流行病学和临床表现参见附录 F。

5 诊断

5.1 临床诊断病例

具备 3.1 和 3.2 中任何一项临床表现者。

5.2 确诊病例

5.2.1 流感样病例并具备 3.3 中的任何一项者。

5.2.2 临床诊断病例并具备 3.3 中的任何一项者。

6 鉴别诊断

在体征上很难与多种病毒如呼吸道合胞病毒、鼻病毒、腺病毒、副流感病毒、冠状病毒等引起的上呼吸道感染进行鉴别,鉴别诊断主要依靠病原学、特异核酸检查和血清抗体测定。

附录 A

(规范性附录)

流感病毒分离培养和鉴定方法

A.1 病毒的分离培养

流感病毒的分离培养主要采用 MDCK 细胞和鸡胚培养方法分离病毒,具体技术如下:

A.1.1 MDCK 细胞分离病毒方法

A.1.1.1 MDCK 细胞培养技术

A.1.1.1.1 生物安全级别和生物安全规定

MDCK 细胞培养实验室生物安全级别,生物安全二级实验室,应该遵守生物安全实验室相应的生物安全规定。

A.1.1.1.2 细胞培养的所需材料

- a) 生长成片的 MDCK 细胞;
- b) 无菌的 T-25 细胞培养瓶;
- c) D-MEM 培养液;
- d) 青霉素、链霉素母液(10 000U/mL 青霉素;10 000 μ g/mL 硫酸链霉素),分装后保存于 -20°C ;
- e) HEPES 缓冲液,1mol/L 母液;
- f) 胎牛血清;
- g) EDTA-胰酶(0.05%胰酶;0.53mmol/L EDTA \cdot 4Na),分装后保存于 -20°C ;
- h) 牛血清白蛋白组分 V,7.5%溶液;
- i) 1mL、10mL 无菌移液管;
- j) 70%~75%的乙醇。

建议:要求经常检查试剂使用的有效期。

A.1.1.1.3 培养基和试剂的准备

- a) 含 L-谷氨酸的 D-MEM 培养液的准备(用于 MDCK 细胞培养)

500mL D-MEM 液中加入:

- 1) 青霉素、链霉素母液 5mL(终浓度达:100U/mL 青霉素;100 μ g/mL 链霉素);
- 2) HEPES 缓冲液 12.5mL(终浓度:25mmol/L);
- 3) 7.5%牛血清白蛋白组分 V 12.5mL。

- b) 细胞生长液

胎牛血清 10mL 加到 90mL 的上述 a) 的液体中,使胎牛血清的终浓度为 10%。

A.1.1.1.4 MDCK 细胞的培养程序

这里以 T-75 细胞瓶的单层细胞培养为例,叙述 MDCK 细胞的培养程序。如果细胞瓶的规格有变,MDCK 细胞悬液量必须做相应的调整。

- a) 首先将细胞培养瓶中的培养液弃去,加入 5mL 在 37°C 水浴中预热的 EDTA-胰酶。
- b) 温和地摇动细胞瓶 1min,使 EDTA-胰酶均匀分布在细胞薄层。然后用移液管吸去 EDTA 胰酶。
- c) 重新加入 5mL 在 37°C 水浴中预热的 EDTA-胰酶重复上述步骤。
- d) 加入 1mL EDTA-胰酶使其均匀分布在细胞薄层, 37°C 孵育细胞瓶直至细胞从塑料细胞瓶的表面分离(5min~10min)。必要时可以摇动或吹打来分离细胞。然后加入 1mL 胎牛血清灭活残余的胰酶。
- e) 加 9mL 已经配制好的含有 L-谷氨酸的 D-MEM 培养液,轻轻用移动移液管来吹散细胞团。

- f) 取 10mL 混合物加到 90mL 细胞生长液(细胞悬液的浓度大约为每毫升含 10^5 细胞)。
- g) 每个 T-25 细胞培养瓶加入 6mL(6×10^5 /mL)细胞悬液,剩余的细胞悬液可以加到 T-75 细胞瓶用于细胞传代。通常 6mL 细胞悬液 2d~3d 可生长成片(80%~90%)的单层细胞。
- h) 于 37℃ 培养箱里培养细胞,每天观察细胞状态。

A. 1. 1. 1. 5 MDCK 细胞计数方法

用血细胞计数板来精确计算细胞悬液中的细胞数,需要充分分散细胞。

- a) 在 0.2mL 中台盼蓝(0.1% PBS 溶液)中加入 0.2mL 细胞悬液,混匀。没有活性的细胞被染成蓝色。
- b) 取适量的细胞悬液分两边加入血细胞计数器的计数室。
- c) 计算计数室四个角上三线包围的正方形中的活细胞,压线的细胞不计数。
- d) 如果观察到成片或者成团的细胞,应重新悬浮细胞液,重新计数。
- e) 计算计数室 4 个角上正方形内的活细胞总数。
- f) 用式(A. 1)计算每毫升悬液中活细胞的数量。

$$C = T \times T_b \times 1/4 \times 10^4 \dots\dots\dots (A. 1)$$

C——每毫升内原始细胞数;
T——4 个角上正方形内的活细胞数;
T_b——台盼蓝的稀释度校正(稀释度计算为 1/T_b)。

- g) 计算稀释系数。
- h) 用稀释液将细胞稀释到所需的细胞工作浓度。

A. 1. 1. 1. 6 细胞的冻存

- a) 细胞冻存材料
 - 1) 已经生长成片的 MDCK 细胞;80%~90%成片,细胞生长良好存活率高;
 - 2) 二甲基亚砜(DMSO);
 - 3) 胎牛血清;
 - 4) EDTA-胰酶(0.05%胰酶;0.53mmol/L EDTA-4Na);
 - 5) 移液管:1mL、10mL。
- b) 细胞冻存步骤
 - 1) 冻存液的配置:9mL 胎牛血清、1mL 二甲基亚砜;
 - 2) 细胞消化:消化过程见 A. 1. 1. 1. 4 中的 a)~b);
 - 3) 细胞消化后,加入配置好的细胞冻存液,混匀后分装到细胞冻存管内;
 - 4) 细胞冻存浓度为 1×10^6 /mL;
 - 5) 细胞冻存过程:4℃ 2h, -20℃ 2h,放入液氮长期保存。

A. 1. 1. 1. 7 细胞的复苏

冻存细胞复苏原则为快速解冻,以避免冰晶重新结晶对细胞造成伤害,而导致细胞凋亡。细胞活化后,需要数日或继续传一至二代,其细胞特性才会恢复正常。

- a) 材料
 - 1) 37℃ 恒温水浴箱;
 - 2) 细胞生长液:配置方法同 A. 1. 1. 1. 3 中的 b);
 - 3) 70%~75%的酒精;
 - 4) 移液管:1mL、10mL。
- b) 细胞复苏步骤
 - 1) 将细胞生长液放入 37℃ 水浴预热,预热后以 70%~75%的乙醇擦拭外壁后放入生物安全柜内;

- 2) 自液氮中取出细胞冻存管,检查盖子是否旋紧,由于热胀冷缩过程盖子容易松掉;
- 3) 立即放入 37℃ 水浴中快速解冻,轻轻摇动使其在 1min 内全部融化,以 70%~75% 的乙醇擦拭保存管外部,移入生物安全柜内;
- 4) 取出 1.0mL 解冻的细胞冻存悬液,缓慢加入事先加好 5mL 生长液的 T-25 细胞培养瓶内,混合均匀,放入 37℃ 培养箱培养;
- 5) 次日,观察细胞形态,并且更换细胞生长液。

A. 1. 1. 1. 8 MDCK 细胞系的敏感性的检测

在过量传代的情况下,MDCK 细胞可能会失去其对呼吸道病毒的敏感性。因此实验室应保持低代数的细胞株在液氮中。为了保持该分离系统的敏感性,当细胞复苏后被连续传 15 代~20 代,达到 40 代以上时,需要进行敏感性测定,测定时选择已知 TCID₅₀ 的病毒来检验 MDCK 细胞系的敏感性。如果细胞的敏感性已经下降,即应复苏新的细胞株。所用细胞系应确保无支原体等污染。

选择已知 TCID₅₀ 的流感病毒,在同一条件下分别感染早代(小于 30 代)的细胞株和现有的细胞株,对其进行 TCID₅₀ 测定。如果测试的 TCID₅₀ 比早代的低 2 个或以上 lg,表明其对病毒的敏感性已下降,不应继续使用;如果两者相差不超出一个 lg,表明可继续使用。

A. 1. 1. 2 流感病毒的 MDCK 细胞分离标准操作规程

A. 1. 1. 2. 1 试验材料

- a) 已经 75%~90% 成片的 MDCK 细胞,选用 T-25 大小的细胞培养瓶来用作病毒分离;
- b) TPCK 处理胰酶(牛胰腺来源 VIII 型);
- c) HEPES 缓冲液,1mol/L 母液;
- d) D-MEM 培养基、Hank's 液;
- e) 青霉素、链霉素母液(10 000U/mL 青霉素;10 000μg/mL 硫酸链霉素);
- f) 牛血清白蛋白组分 V,7.5% 溶液;
- g) 临床样品 0.5mL(标本的采集及处理方法参见附录 G);
- h) 1mL 无菌移液管;
- i) 10mL 无菌移液管。

A. 1. 1. 2. 2 培养液和试剂的准备(建议:要求经常检查试剂使用的有效期)

a) 细胞维持液

500mL D-MEM 液中加入:

- 1) 青霉素、链霉素母液 5mL(终浓度达:100U/mL 青霉素;100μg/mL 链霉素);
- 2) 牛血清白蛋白组分 V 12.5mL(终浓度:0.2%);
- 3) HEPES 缓冲液 12.5mL(终浓度:25mmol/L)。

b) 病毒生长液

每 500mL 细胞维持液中加入 0.5mL 的 TPCK-胰酶(母液浓度为 2mg/mL)使 TPCK-胰酶的终浓度为 2μg/mL。

A. 1. 1. 2. 3 流感病毒细胞分离程序

所有有关流感病毒分离的操作都应在生物安全 II 实验室中的生物安全柜里进行,必须遵守生物安全规定,严格执行标准操作规程和废弃物管理规定。

a) 75%~90% 成片细胞的准备

- 1) 用 40 倍物镜观察细胞生长状态。选择处于对数生长期的 MDCK 细胞用于病毒的分离。
- 2) 轻轻倒出细胞生长液,用 6mL Hank's 液分别清洗细胞 3 遍。

b) 细胞培养瓶的接种

- 1) 用无菌的移液管将清洗细胞的 Hank's 液从细胞培养瓶中移出;
- 2) 用无菌的移液管吸取 200μL 临床样品置于细胞培养瓶中,温和摇动数次;

- 3) 37℃培养箱中吸附 1h~2h;
- 4) 吸出接种物,用 Hank's 液清洗细胞,清洗 2 次,然加入 6mL 含 2μg/mL TPCK-胰酶的病毒生长液于细胞培养瓶中;
- 5) 放置于 33℃~35℃培养箱培养;
- 6) 每日观察细胞病变情况(细胞病变的特征是细胞肿胀圆化,细胞间隙增大;细胞核固缩或破裂;严重时细胞部分或全部脱落)。

c) 细胞培养物的收获

- 1) 当 75%~100%细胞出现病变时进行收获,收获之前可以将细胞冻融 1 次~2 次,以提高收获标本的病毒滴度。即使无细胞病变也应该于第 7 天收获。
- 2) 进行红细胞凝集试验(HA), $HA \geq 8$ 的进行病毒的鉴定(具体方法参见流感病毒的鉴定技术中的 HA 试验和 HI 试验部分)。如没有红细胞凝集现象,应继续盲传 1 次~2 次。HA 试验仍为阴性者,认为 MDCK 细胞病毒分离阴性,标本按生物安全有关规定进行处理。对于 $HA \leq 8$ 的细胞分离物继续进行细胞传代,直至 $HA \geq 8$ 时再进行病毒的鉴定。连续传代 2 次以上, HA 仍小于 8 的细胞分离物,可以采用 RT-PCR 或者 Real-TimePCR 方法进行核酸检测。
- 3) $HA \leq 8$ 的细胞分离物的传代方法与标本相同。 $HA \geq 8$ 进行细胞传代时应将病毒液进行 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释后,再感染细胞。具体的稀释浓度与 HA 的滴度有关。一般滴度小于 32 时选择 10^{-1} 倍稀释;滴度大于 32 以上时选择 10^{-2} 或 10^{-3} 稀释。

A. 1.2 鸡胚分离病毒方法

A. 1.2.1 试验材料

- a) 9 日龄~11 日龄鸡胚;
- b) 照卵灯;
- c) 70%~75%乙醇;
- d) 一次性注射器;
- e) 鸡卵开孔器;
- f) 融化的蜡或胶水;
- g) 10mL 管和试管架;
- h) 10mL 移液管;
- i) 无菌镊子。

A. 1.2.2 流感病毒鸡胚分离程序

所有有关病毒分离的操作都应在生物安全二级实验室生物安全柜中进行,必须遵守生物安全规定,严格执行标准操作规程和废弃物管理规定。进入生物安全二级实验室要求遵循生物安全实验室的个人防护要求。

A. 1.2.2.1 验卵

- a) 用照卵灯检测鸡胚,标记出鸡胚的气室与尿囊的界限、胚胎的位置。
- b) 如果鸡胚是死胚、没有受精、有裂痕、发育不全、或表面有好多渗水孔,应弃掉。
- c) 如何判断鸡胚状态
 - 1) 血管:活胚血管清晰;死胚模糊,成淤血带或淤血块。
 - 2) 胎动:活胚有明显的自然运动,但是大于 14d 后胎动则不明显;死胚无胎动。
 - 3) 绒毛尿囊膜发育界限:密布血管的绒毛尿囊膜与鸡胚胎的另一面形成明显的界限。

A. 1.2.2.2 鸡胚接种

- a) 将鸡胚的气室朝上放置在蛋盘上,标记每个鸡胚,通常每个样本接种 3 个鸡胚。
- b) 用 70%~75%乙醇消毒鸡胚,在气室端钻孔,开 10mm×6mm 裂口。

- c) 用注射器吸 200 μ L 处理过的临床标本,装上 16 号针头。
- d) 从裂口中滴入无菌的液体石蜡,然后轻轻晃动鸡胚,让液体石蜡在鸡胚壳膜内层(脏层)铺开,此时在照卵灯下即可清楚的看到鸡胚胎的位置。将注射针头刺入胚胎的胛下胸前,用针头轻轻拨动下胛及腿,当进入羊膜腔时,能看到鸡胚随着针头的拨动而动,即可注射 100 μ L 临床标本。将针头退出至 1/2 寸,将另外 100 μ L 临床标本注入鸡胚尿囊腔。
- e) 用同一注射器和针头将同一标本依上法接种另外两枚鸡胚。
- f) 将针头弃于合适的生物安全装置中。
- g) 用消毒过的医用胶布封口。
- h) 33 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C 温箱培养鸡胚 2d~3d。A 型流感病毒培养 2d, B 型流感病毒培养 3d, 呼吸道标本培养 3d。鸡胚进行病毒分离培养时,每天检查鸡胚生长情况,24h 内死亡的鸡胚,认为是非特异死亡应弃去。

A. 1. 2. 2. 3 鸡胚尿囊液和羊水的收获

- a) 鸡胚在收获前应 4 $^{\circ}$ C 过夜或至少放置 4h。
- b) 标记 15mL 无菌塑料管与相应的鸡胚编号一致。用 70%~75% 乙醇消毒鸡胚顶部。
- c) 用无菌镊子撕破鸡胚气室蛋壳,推开鸡胚尿囊膜。用 10mL 吸管吸取鸡胚尿囊液置于相应的收集管中。刺破鸡胚羊膜,尽量吸取羊水放置于另外的管中。羊水较少时也可以将 3 个鸡胚的羊水合并。
- d) 将鸡胚收获液 3 000r/min 离心 5min 去除血液和细胞。进行红细胞凝集试验(具体方法参见流感病毒的鉴定技术中的 HA 试验部分),HA \geq 8 的进行病毒的鉴定。如没有红细胞凝集现象的标本,应再进行鸡胚传代 2 次(对于“O”相的毒株,需要连续传代多次才能具备在鸡胚中生长的特性)。传代后 HA 滴度仍为阴性的标本,可以按有关生物安全规定进行处理。对于 HA \leq 8 的鸡胚分离物继续进行鸡胚传代,直至 HA \geq 8 时再进行病毒的鉴定。连续传代 2 次以上,HA 仍小于 8 的细胞分离物,可以采用 RT-PCR 或者 Real-TimePCR 方法进行核酸检测。
- e) 对于 HA \geq 8 的病毒进行鸡胚病毒传代前应将病毒液进行 10 $^{-1}$...10 $^{-3}$ 稀释。具体的稀释度与 HA 滴度的大小有关。一般滴度小于 32 时选择 10 $^{-1}$ 倍稀释;滴度大于 32 以上时选择 10 $^{-2}$ 或 10 $^{-3}$ 稀释。

A. 2 流感病毒鉴定

A. 2. 1 流感病毒红细胞凝集及红细胞凝集抑制试验

流感病毒的血凝素(HA)能够引起红细胞凝集,因此而得名。用于检测流感病毒红细胞凝集活性的红细胞凝集试验就是根据病毒的这一特性而建立的。当血清中特异性抗体与病毒血凝素结合后,则可以抑制红细胞凝集的出现。即为红细胞凝集抑制试验(HI)的理论根据。

微量红细胞凝集抑制实验是目前最常用的一种鉴定流感病毒的方法。该方法简单、易行、结果可信。用于 HI 的标准参照血清必须及时更换。人和其他动物血清中含有对流感病毒的非特异性抑制素,因此在进行 HI 测定之前所用的血清必须经特殊处理以清除非特异性抑制素。

A. 2. 1. 1 生物安全要求

生物安全要求及个人防护要求与流感病毒的分离相同,并应遵守相应的生物安全规定。

A. 2. 1. 2 实验材料

A. 2. 1. 2. 1 当时人群中流行的流感病毒如 A(H1N1)、A(H3N2)、B 型流感病毒的标准参照抗原与参照血清。

A. 2. 1. 2. 2 缓冲液和其他试剂

- a) 红细胞悬液(鸡、火鸡、豚鼠、或人“O”型红细胞,由于“O”相毒株不能凝集鸡红细胞,所以在对该种病毒进行鉴定时应使用豚鼠红细胞或人“O”型红细胞)。
- b) 磷酸缓冲液(PBS):0.01mol/L,pH7.2。

- c) 生理盐水。
- d) 其他
 - 1) 37℃水浴；
 - 2) 56℃水浴；
 - 3) 台式离心机；
 - 4) 多道可调加样器；
 - 5) 离心管；
 - 6) 96孔微量板：鸡、火鸡红细胞选择“V”型底微量板；豚鼠和人“O”型红细胞选择“U”型底微量板。

A. 2. 1. 3 试剂配制

- a) 磷酸缓冲液(PBS):0.01mol/L, pH7.2。
25×倍 PBS 母液:2.74g Na₂HPO₄, 0.79g NaH₂PO₄ 加去离子水至 100mL。
- b) 工作液配制:25 倍 PBS 缓冲液完全溶解后,取 40mL 25 倍 PBS 液,加入 8.5g NaCl,加去离子至 1 000mL。用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调整 pH 至 7.2。121℃高压灭菌 15min,消毒后至 4℃保存。
- c) 生理盐水:0.85% NaCl。
20×母液:170g NaCl 加入 1 000mL 去离子水,121℃高压灭菌 15min,消毒后至 4℃保存。
生理盐水(0.85%):20×母液 50mL 加入去离子水 950mL。
121℃高压灭菌 15min,消毒后至 4℃保存。
- d) 阿氏液配制
 - 1) 25g 葡萄糖；
 - 2) 8.5g 枸橼酸钠；
 - 3) 4.5g NaCl；
 - 4) 0.55g 枸橼酸。

加去离子水 1 000mL,用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调整 pH 至 6.1,用 0.22μm 的细菌滤器过滤,或 121℃高压灭菌 30min,消毒后至 4℃保存。

A. 2. 1. 4 红细胞悬液配制

- a) 取阿氏液中的红细胞,1 200r/min 离心 5min,弃上清。
- b) 加入至少 10 倍沉淀物的 PBS 液体洗涤,充分混匀,1 200r/min 离心 5min,弃上清。
- c) PBS 液体按以上方法洗涤三次。最后一次洗涤后,1 200r/min 离心 10min。
- d) 将红细胞加入到合适的 PBS 中,稀释至合适的浓度,通常为 1mL 红细胞加入到 99mL PBS 中(1%)。火鸡、鸡的红细胞,实验终浓度一般为 0.5%,如用人“O”型、豚鼠红细胞,终浓度为 0.75%。使用不同类型红细胞进行红细胞凝集试验各项条件比较见表 A. 1。

表 A. 1 流感病毒红细胞凝集试验各项条件

红细胞	鸡	火鸡	豚鼠	人“O”型血
终浓度	0.5	0.5	0.75	0.75
孔底部形状	V 型	V 型	U 型	U 型
孵育时间	30min	30min	60min	60min
细胞对照	细胞沉积成点状,倾斜时细胞向下流成泪滴状	细胞沉积成点状,倾斜时细胞向下流成泪滴状	细胞沉积成环状	细胞沉积成环状

A. 2. 1. 5 流感病毒红细胞凝集与红细胞凝集抑制试验操作步骤

A. 2. 1. 5. 1 RDE(受体破坏酶)处理标准参照血清

- a) 1份血清加入4份RDE,混合;
 - b) 37℃水浴过夜;
 - c) 56℃水浴加热30min,灭活RDE的活性。
- A. 2. 1. 5. 2 处理后血清中是否有残留非特异性凝集素
- a) 选用适当的微量板,从B1至H6中加入25 μ L PBS;
 - b) A1到A5各加50 μ L处理后的血清,A6加50 μ L PBS;
 - c) 用多道加样器从A1行开始,各孔取25 μ L血清,由A行至H行进行2倍稀释血清;
 - d) H行各孔稀释混匀后其取25 μ L;
 - e) 每孔补加25 μ L PBS;
 - f) 每孔加入50 μ L红细胞悬液,混匀;
 - g) 置室温(22℃~25℃)30min~60min,观察有无凝集,如出现凝集则表示血清中有残余的非特异性凝集素。该血清必须用红细胞吸附去除非特异性凝集素后才能使用。
- A. 2. 1. 5. 3 红细胞吸附去除非特异性凝集素
- a) 1体积的红细胞可以去除20倍体积的RDE处理过的血清;
 - b) 红细胞与血清混匀后,置4℃,1h;
 - c) 1200r/min离心10min;
 - d) 小心吸取上清液;
 - e) 重复操作直至血清中的非特异性凝集素被去除。
- A. 2. 1. 5. 4 红细胞凝集试验(HA)检测待检病毒滴度
- a) 据所用的红细胞种类选用适当的微量板。将微量板横向放置;垂直方向称列,如孔A1~H1称为第一列;平行方向称行,如A1~A12称为A行。
 - b) 除第一列各孔外(A1~H1),其余每孔加50 μ L PBS。
 - c) A1~G1各加100 μ L标准抗原或待检病毒。H1加100 μ L PBS作为红细胞对照。
 - d) 用多道加样器从第一列各孔分别取50 μ L病毒液,由第一列至第12列做二倍系列稀释。最后一列每孔弃去50 μ L。
 - e) 每孔加入50 μ L红细胞悬液,轻弹微量板,使红细胞与病毒充分混合。
 - f) 室温孵育30min~60min,观察红细胞凝集现象并记录结果。
 - g) 红细胞完全凝集以“+”记录;只有部分红细胞凝集记录为“+/-”;无凝集记录“-”。红细胞凝集滴度的判定以出现完全凝集的最高稀释度为终点,其稀释度的倒数即为病毒的红细胞凝集滴度。
- A. 2. 1. 5. 5 制备用于红细胞凝集抑制试验的4个红细胞凝集单位的抗原
- a) 一个红细胞凝集单位指能引起等量标准化的红细胞凝集时病毒的量。进行红细胞凝集抑制试验时一般用4个红细胞凝集单位(指25 μ L体积中含有4个红细胞凝集单位)的病毒量。
 - b) 制备4个红细胞凝集凝抗原时,首先计算出红细胞凝集抑制试验所需的病毒抗原的总量。如每份血清作8孔稀释,每孔用抗原25 μ L抗原,那么测定一份血清须0.2mL抗原。根据标准血清的份数计算出实验所需病毒抗原量,然后配制抗原。
 - c) 计算出病毒稀释度。用病毒红细胞凝集滴度(HA滴度)除以8,得到的商即为4个红细胞凝集单位的稀释度。如,某病毒的HA滴度为64,除以8等于8。按1:8(1mL病毒液加7mL PBS)稀释该病毒即可得到4个凝集单位的病毒量/25 μ L的抗原病毒量。
 - d) 为了保证红细胞凝集抑制试验中抗原用量一致并且准确无误,新配制的4个凝集单位抗原须复核滴定:取50 μ L稀释好的抗原,用等量PBS做2倍系列稀释(同病毒滴定)后加入50 μ L红细胞悬液,至室温孵育30min~60min后观察凝集结果。如只有前4孔出现凝集,表明每50 μ L病毒含有8个凝集单位(即25 μ L中含有4个红细胞凝集),该病毒稀释准确,可以用于红细胞凝

集抑制试验。如第 5 孔也出现凝集,说明每 50 μ L 病毒含有 16 个凝集单位,该抗原必须等量稀释。如只有前 3 孔凝集,表明每 50 μ L 病毒仅含有 4 个凝集单位,病毒量须要加倍。此外,4 个凝集单位抗原必须每次用前新配制。

A. 2. 1. 5. 6 红细胞凝集抑制试验(HI)鉴定未知病毒

根据所用的红细胞选用适当的微量板

- a) 除 A 行外,每孔各加 25 μ L PBS。A5、A6 各加 50 μ L PBS 作为阴性对照。
- b) 常用的 4 种抗血清
 - 1) 抗 A(H1N1)亚型血清;
 - 2) 抗 A(H3N2)亚型血清;
 - 3) 抗 B 型 Yamagata 系病毒血清;
 - 4) 抗 B 型 Victoria 系病毒血清。
- c) A1 至 A4 及 A7 至 A10 分别加入上述处理好的标准血清,每孔加入 50 μ L; A5、A6 各加 50 μ L PBS 作为阴性对照。
- d) 用多道加样器从 A 行分别取 25 μ L 血清,由 A 行至 H 行做 2 倍系列稀释血清,弃去 H 行 25 μ L。
- e) A1 至 H5 每孔加入 25 μ L 待检病毒液 1(4 个凝集单位的抗原)。
- f) A7 至 H10 每孔加入 25 μ L 待检病毒液 2(4 个凝集单位的抗原)。
- g) 对照孔(A5、A6)不加抗原,用 25 μ L PBS 代替。
- h) 混匀,至室温孵育 30min~60min,观察红细胞凝集抑制试验结果。
- i) 取另一块微量板,同样做标准血清对照。

当特定的抗体与相应的血凝素抗原结合后,可以抑制病毒引起的红细胞凝集现象。红细胞凝集抑制效价是指抑制红细胞凝集出现时血清的最高稀释度的倒数。如 1:80 稀释的血清孔不出现凝集(完全抑制),1:160 稀释的血清孔出现凝集(无红细胞凝集抑制),该血清对测定病毒的红细胞凝集抑制效价为 80。

标准参照血清对待检抗原的抑制效价 ≥ 20 才可以算为阳性。

一个待检抗原不能同时被两种或两种以上的标准血清抑制。

待检病毒与标准参照血清有交叉抑制,但与一种标准参照血清抑制效价大于其他参照血清 4 倍以上时,可以判定为此种流感病毒。

红细胞凝集抑制试验不仅可以用于鉴定待检病毒的型别及亚型,也常用于检测同型别病毒间的抗原性变异情况。

A. 2. 1. 5. 7 红细胞凝集抑制试验注意事项

- a) 红细胞凝集抑制试验必须用 4 个凝集单位/25 μ L 的抗原,抗原必须新鲜配制;
- b) 孵育时间准确,有些病毒引起的凝集现象因病毒游离消失很快,可以将反应板放置 4 $^{\circ}$ C,或缩短孵育时间来此类问题;
- c) 红细胞悬液的配制必须标准化;
- d) 正确存放试剂,避免反复冻融及污染;
- e) 冻干的试剂应按照说明溶解,保存。

A. 2. 1. 5. 8 红细胞凝集抑制试验的对照

- a) 红细胞对照;
- b) 阴性对照血清,以防其他非特异性抗体的影响;
- c) 标准血清对照,防止非特异性凝集素及抑制素的干扰;
- d) 详细记录实验过程。

A. 2. 1. 5. 9 红细胞凝集及红细胞凝集抑制试验的其他限制因素

- a) 病毒在不同宿主中的生长能力。流感病毒的进化常常导致宿主范围改变。长期以来,分离培养流感病毒最常用的是鸡胚。但是近年来一些流行株很难用鸡胚分离成功,所以很多实验室改用 MDCK 细胞或原代猴肾细胞分离流感病毒。用细胞培养分离传代的病毒 HA 滴度一般较鸡胚传代病毒低。MDCK 细胞传代数的高低影响其对病毒的敏感性,应尽量选用代数较低的细胞。
- b) 病毒对各种红细胞的凝集能力。流感病毒能凝集禽类或一些哺乳类动物的红细胞。但是位于血凝素上受体结合部位的氨基酸发生点突变,则可影响病毒对某些红细胞的凝集能力。鸡红细胞是较常用的一种红细胞,因其方便易得、孵育时间较短、红细胞凝集抑制结果清晰易读。但是近年来发现有些病毒,特别是新分离出的病毒或代数较低的病毒不能凝集鸡红细胞。如果遇到这种情况,应更换豚鼠红细胞。除此之外,火鸡红细胞也较常用。
- c) 非特异性红细胞凝集抑制素。人和动物血清中都存在有非特异性抑制素。非特异性抑制素实质上是游离在血清中类似流感病毒受体的唾液酸残基。这些类似受体的多糖类物质能与病毒血凝素分子上的受体结合部位结合,因此用于红细胞凝集抑制或其他试验的血清必须彻底清除其中所含的非特异性红细胞凝集抑制素。人和动物血清中的非特异性红细胞凝集抑制素分为 α 、 β 、 γ 三种,这三种抑制素对不同的病毒的抑制能力不同。常用的清除非特异性红细胞凝集抑制素的方法有霍乱滤液(受体破坏酶的一种)清除法,过碘酸钾清除法等。

A. 2.2 流感病毒神经氨酸酶活性试验及其活性抑制试验

病毒神经氨酸酶(E. C. 3. 2. 1. 18 酰基神经氨酸水解酶)催化裂解末端唾液酸和邻近 D-半乳糖或 D-半乳糖胺间 α -苷连接。世界卫生组织国际流感参照和协作中心,于 1973 年公布了国际上同一的流感病毒神经氨酸酶活性(NA)及其活性抑制(NI)测定方法。

- 1) 自由的 N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid)经神经氨酸酶的作用,自胎蛋白底物中释放。
- 2) 经过碘酸盐的氧化作用,将 N-乙酰神经氨酸转化为 β -甲醛丙酮酸(β -formyl pyruvic acid)。
- 3) β -甲醛丙酮酸经硫代巴比妥酸的作用形成生色团。
- 4) 用有机溶剂提取生色团。用分光光度计测定吸光值。这样可以测定标本神经氨酸酶的活性,并且可确定用于神经氨酸酶抑制试验的标准剂量。

神经氨酸酶活性抑制试验是测定血清抑制标准量酶活性的效价。

NI 测定已经成为流感病毒鉴定不可缺少的手段之一。因 NI 活性测定结果是流感病毒神经氨酸亚型划分的主要依据之一。有时该方法也用于了解流感病毒 NA 抗原性变异和血清学诊断等方面。NI 测定不受血清中非特异性抑制素的影响,但易受病毒颗粒血凝素抗体的影响,即空间干扰。为解决这一弊端,在流感病毒鉴定中,常使用单价血清(只针对 NA 的)或基因重配毒株所制备的免疫血清[如使基因重配株 NA 抗原为 N2 或 N1,其 HA 抗原为马 1(H7)亚型的]。

A. 2.2.1 实验材料

- a) 磷酸缓冲液(PBS, pH5.9):
甲液:4mmol/L 磷酸氢二钠溶液;
乙液:4mmol/L 磷酸二氢钠溶液;
丙液:6mmol/L 氯化钙溶液。

甲液 19mL 加乙液 81mL 混匀,将 pH 值调至 5.9 ± 0.5 ,pH 值偏高用乙液调整,偏低用甲液调整。然后加入丙液,此时 CaCl_2 的终浓度为 6mmol/L。置 4℃ 保存。

- b) 胎蛋白:用蒸馏水将融解胎蛋白配成 48mg/mL~50mg/mL 的溶液。
- c) 过碘酸盐试剂:4.28g 过碘酸钠溶于 38mL 去离子水中,加入 62mL 浓磷酸,充分混合,存于棕色玻璃瓶中。
- d) 砷试剂:10g 亚砷酸钠和 7.1g 无水硫酸钠溶于 100mL 去离子水中,加入 0.3mL 浓硫酸。
- e) 硫代巴比妥酸试剂:1.2g 硫代巴比妥酸和 1.4g 无水硫酸钠加入 200mL 去离子水,沸水中加热溶解,用前新配置,使用期限为一周。

f) 生理盐水:0.85g NaCl 加入 100mL 去离子水溶解,置室温保存。

g) 酸化正丁醇试剂:100mL 正丁醇中加入 5mL 浓盐酸,保存棕色瓶中室温保存。

A. 2. 2. 2 神经氨酸酶活性及活性抑制试验操作步骤

A. 2. 2. 2. 1 神经氨酸酶活性测定

- a) 病毒溶液用生理盐水作倍比稀释,一般新鲜尿囊液抗原作 1:2~1:32 稀释。稀释好的病毒,每个稀释度 50 μ L 每管,在底物对照管中加入 50 μ L 生理盐水。
- b) 每个试管加入 50 μ L PBS(pH5.9)混匀,每管中加入 100 μ L 底物溶液(胎蛋白),充分混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 16h~18h。
- c) 从水浴中取出试管,放置室温冷却,每管中加入 100 μ L 过碘酸盐试剂,充分混合,置室温 20min。
- d) 每管中加入 1mL 砷试剂。由于碘的释放出现棕色,摇荡试管使棕色消失呈现乳白色,必要时试验可以在此步骤暂停,测定物置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。其余测定步骤不能暂停。
- e) 每管中加入 2.5mL 硫代巴比妥酸试剂,充分混匀。该试剂需在煮沸溶解时加入试管中。
- f) 立即将试管放置到煮沸的水浴中煮沸 15min,此时出现红色即为神经氨酸酶活性反应。
- g) 将试管置冰水中冷却,然后加入 4mL 酸化的正丁醇,塞上干净的橡皮塞,剧烈震荡 1min~2min,使红色转移到有机层。
- h) 1 500r/min 离心 5min,上层达到透亮不混浊。
- i) 分光光度计波长调至 549nm,用底物对照管调整零点,然后,从高稀释度到低稀释度,将管中的上层溶液吸置透光池中,依次测出并记录它们的吸光度 A 值(光密度 OD 值),A 值越高表明活性越强。
- j) 一个酶活性单位的确定:一般将 A 值为 0.45~0.85 的病毒稀释度作为一个酶单位。我们将 A 值 0.5 的病毒稀释度为一个酶单位,用于酶活性抑制测定。一个酶单位的确定方法如下:

取一张半对数坐标纸,其纵轴(对数)表示病毒的稀释度,横轴(算术)表示吸光度。将所得的 A 值标在相应的位置上,在 A 值 0.5 处附近找出 4 个点,其中 2 个点 A 值大于 0.5,2 个 A 值小于 0.5。依据这 4 个点作一条直线,这条直线要使它的一侧点至其垂直线的平均值与另一侧点至其垂直线的平均值相等。找出 A 值相 0.5 相对应的纵轴的值,这一值就是一个酶单位的稀释度。

A. 2. 2. 2. 2 神经氨酸酶活性抑制测定

- a) 测定血清作 0.5lg 稀释,每个稀释度取 50 μ L 于试管中,并作正常血清对照组。
- b) 将已经测定的病毒抗原用生理盐水配置成一个酶单位,加入测定血清中,50 μ L/管。混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1h。
- c) 从水浴中取出试管,在每个试管中加入 100 μ L 底物溶液,混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 16h~18h。
- d) 从水浴中取出试管,接下步骤同活性测定的 c)~i) 步。测定吸光度时从低血清稀释度向高稀释度测定。
- e) 计算血清对神经氨酸酶活性抑制效价。根据测定血清与正常血清两组的测定结果,求出每组血清同一稀释度 A 值的商数,即为经血清作用以后所剩的酶活性百分数。酶活性计算见式(A. 2):

$$\frac{\text{每一稀释度(如 1:10)血清+病毒的 A 值}}{\text{同一稀释度(1:10)正常血清+病毒的 A 值}} \dots\dots\dots (A. 2)$$

f) 血清效价是能抑制 50%的酶活性的最高血清稀释度的倒数。它的确定方法如下:

取半对数坐标纸,纵轴(对数)表示血清稀释度,横轴(算术)表示剩下的神经氨酸酶活性的百分数。将 5 步得到的数值放在坐标纸上相应的位置。从活性 50%处划一条与纵坐标平行的直线,在 50%酶活性处找出 3 个~4 个点,使其中 1 点~2 点剩余酶活性不到 50%,而其他 1 点~2 点剩余酶活性大于 50%,在这 3 个~4 个点中划一条直线,同样使这条直线一侧的 1 点~2 点至直线垂直线的平均值与另一侧的垂直线的平均值相等。与 50%剩余酶活性相对应的纵坐标的点所表示的,即使该血清神经氨酸

酶抑制效价。

注：对流感病毒株鉴定时，对阳性血清常用 200mmol/L, pH5.9 的 PBS 进行倍比稀释，一般从 1 : 10 开始，用量 100 μ L 每管，这样加上 100 μ L 抗原和 100 μ L 底物总量为 300 μ L/管，与标准的 200 μ L/管有出入，但对定性影响不大；正常对照血清不用同型免疫血清替代；结果用肉眼判断，不测 A 值；至于血凝素抗体空间干扰问题，一般情况下不加以重视，因为它的干扰程度约为 10%，免疫血清抑制效价多为 1 : 640 左右，这样当 NI \geq 40 时判断为阳性，一般就不受空间干扰影响了。对重要的流感病毒株鉴定时需要用单价的抗血清进行鉴定。

附录 B
(规范性附录)
红细胞凝集抑制试验

B.1 生物安全要求

生物安全级别:二级。

B.2 实验材料

- a) 待检血清:待检血清必须先经 RDE 处理去除非特异性抑制素。方法见附录 A。
- b) 标准化的红细胞悬液:配置方法见附录 A。
- c) 已知标准抗原如常用的以下几种抗原:
A(H1N1)亚型代表毒株标准抗原;
A(H3N2)亚型代表毒株标准抗原;
B型 Yamagata 系代表毒株标准抗原;
B型 Victoria 系代表毒株标准抗原。
- d) 制备 4 个红细胞凝集单位抗原:配制方法见附录 A 中相应部分。

B.3 实验步骤

- a) 根据所用红细胞选用适当的微量板,须设立血清对照板。
- b) 除 A 行外,每孔加入 25 μ L PBS 缓冲液。
- c) 按以下顺序,再 A 行各孔加入处理过的血清 50 μ L。
A1:待检血清标本 1,急性期血清;
A2:待检血清标本 1,恢复期血清;
A3:待检血清标本 2,急性期血清;
A4:待检血清标本 2,恢复期血清;
A5:待检血清标本 3,急性期血清;
A6:待检血清标本 3,恢复期血清;
A7:待检血清标本 4,急性期血清;
A8:待检血清标本 4,恢复期血清;
A9:A(H1N1)亚型标准抗血清;
A10:A(H3N2)亚型标准抗血清;
A11:B型 Yamagata 系标准抗血清;
A12:B型 Victoria 系标准抗血清。
- d) 用多道加样器从 A 行各孔分别吸取 25 μ L 血清,由 A 行至 H 行进行 2 倍稀释血清,弃去 H 行最后 25 μ L。
- e) 红细胞凝集抑制试验板:每孔加入 25 μ L 新配制的 4 个凝集单位的抗原。
- f) 血清对照板每孔加入 25 μ L PBS。
- g) 轻轻弹击微量板,使抗原与抗体充分混合。
- h) 室温孵育 15min。
- i) 每孔加入 50 μ L 红细胞悬液,混匀。
- j) 室温孵育 30min~60min。
- k) 观察红细胞凝集抑制试验结果,对照板应不出现凝集。

附 录 C (规范性附录) 微量中和试验

C.1 原理

微量中和试验是一种敏感性高、特异性强的血清学方法,用于测定血清中的病毒特异性中和抗体水平。试验有两个阶段组成:①病毒-抗体中和反应阶段,即定量病毒与倍比稀释血清样本样品混合,并作用一定时间;②病毒-抗体混合孵育阶段,即将病毒-抗体混合物接种于敏感宿主(组织培养细胞,鸡胚或动物),并培养一段时间。中和试验是测定病毒的感染力为基础,血清中的病毒特异性中和抗体与病毒表面蛋白结合,从而使病毒失去吸附和感染宿主细胞的能力。结果的判定将依据定量病毒受倍比稀释免疫血清中和后的残余感染力。中和试验技术不仅表现在质的方面,即一种病毒或病毒亚型只能被相应的免疫血清中和,而且,表现在量的方面,即中和一定量病毒的感染力需要一定效价的抗体。

病毒中和实验技术是反映机体抵抗特定病毒感染力的最可靠的方法。流感病毒中和实验技术有以下几个优点:①由于中和抗体作用于流感病毒表面血凝素蛋白(HA),使流感病毒失去感染能力,因此流感病毒中和试验主要用于检测血清中的特异性抗血凝素蛋白抗体;②流感病毒中和实验既能检测病毒株的功能性变化,又能反映机体的抗病毒水平;③该方法主要使用感染性病毒,不需要进行病毒或病毒蛋白的纯化,因此,可以被迅速用于检测新病毒或人群免疫状态。

传统的流感病毒中和试验主要基于对 MDCK 细胞病变抑制作用的观察,既费时又费力。结合感染细胞快速鉴定方法,改进后的中和试验可以在 2d 内完成,并且可以一次测定大量血清样品。流感病毒微量中和试验技术,使以血清中的病毒特异性中和抗体与流感病毒表面血凝素蛋白结合,从而抑制病毒感染 MDCK 细胞为原理,系列稀释的血清与定量病毒(100 TCID₅₀)混合,然后接种于 MDCK 细胞,过夜培养后,病毒核蛋白(NP)将在细胞内表达,然后通过 ELISA 方法检测细胞内 NP 蛋白的表达水平。

整个微量中和试验分为三个部分:①病毒滴定;②病毒中和试验;③酶联免疫吸附试验(ELISA)。

C.2 生物安全要求

生物安全级别与个人防护要求:人流感病毒抗体水平检测时,应在生物安全二级实验室里进行,防护要求与二级实验室的要求相同。并应遵守相应的生物安全规定。

C.3 实验材料

C.3.1 中和反应实验材料

- a) 病毒:进行中和试验之前,需先进行病毒滴度(TCID₅₀)的滴定。
- b) 血清样品:包括待检血清和阳性及阴性血清对照。人血清试验前需 56℃ 灭活 30min,动物血清需 RDE 处理。-20℃ 储存,避免多次反复冻融。
- c) MDCK 细胞和细胞培养液试剂。

MDCK 细胞:低代数的 MDCK 细胞(小于 25 代)

MDCK 细胞培养液:D-MEM + 5%胎牛血清+抗生素

500mL D-MEM 培养液

5.5mL 青霉素、链霉素母液(10 000U/mL 青霉素; 10 000μg/mL 硫酸链霉素)

25.5mL 胎牛血清,40nm 滤过

EDTA-胰酶

d) 其他

- 1) 平底 96 孔微量培养板。
- 2) 病毒稀释液:DMEM+1%牛血清白蛋白+抗生素,即配即用。

- 429mL DMEM
- 66mL 7.5%牛血清白蛋白(BSA)
- 5mL 稀释倍数抗生素
- 3) TPCK-胰酶(使用浓度为 2mg/mL)。
- 4) 固定液:80%的丙酮,即配即用,4℃保存。
- 400mL 丙酮
- 100mL PBS, pH7.2

C.3.2 ELISA 实验材料

- a) 抗体 1:鼠抗流感病毒甲型核蛋白单克隆抗体。
- b) 抗体 2:辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG。
- c) 洗涤液:PBS+0.05%吐温-20。

4mL PBS, pH7.2

2mL 吐温-20

- d) 封闭液:PBS+0.1%牛血清白蛋白+0.5%吐温-20。

867mL PBS, PH7.2

132mL 牛血清白蛋白

1mL 吐温-20

- e) 底物和底物溶液。

常用的辣根过氧化物酶(HRP)所用的底物为联苯二胺(OPD)

底物溶液为 pH5.0 磷酸盐-枸橼酸缓冲液(0.05mol/L)

底物和底物溶液:10mg OPD

20mg 枸橼酸缓冲液(含 0.015%过氧化氢水溶液)

即配即用

- f) 磷酸盐-枸橼酸缓冲液, pH5.0。

58.8g 枸橼酸三钠

1L 蒸馏水

用盐酸调节 pH 为 5.0

加 0.015%双氧水(临用前加入)

- g) 终止反应液:1mol/L 硫酸(28mL 浓硫酸+1L 蒸馏水)。

C.4 质量控制

病毒中和实验技术是一个相当复杂的过程,参与中和反应的因素有病毒、抗血清和宿主细胞。这些因素的变化都会影响中和试验结果。因此,需对中和试验的整个过程进行质量控制。每次测定必须设立阴性和阳性血清对照,阳性和阴性细胞对照,以及对病毒使用剂量进行测定。

C.4.1 血清对照

血清中含有(阳性对照)或不含有(阴性对照)对测定病毒的特异性中和抗体。血清对照一般分装成多份,-20℃保存,并且避免反复冻融使用。

- a) 血清阴性对照:

1) 阴性一般来自于与待检血清年龄相同的正常人群,该人群未曾暴露于待检病毒;

2) 测定过程中,阴性对照血清与待检血清应处于相同稀释度。

- b) 血清阳性对照:人血清一般采用急性期和恢复期双份血清做对照。

C.4.2 病毒和细胞对照

- a) 阳性和阴性细胞对照:一般设立 4 个重复孔为阳性细胞对照,即将细胞与 100 倍组织细胞半数感染剂量(100 TCID₅₀)的病毒进行混合培养。同时设立 4 个孔为阴性细胞对照,即将细胞与病

毒稀释液进行混合培养。

阳性细胞对照:50 μ L 病毒稀释液+50 μ L 病毒+100 μ L MDCK 细胞。

阴性细胞对照:100 μ L 病毒稀释液+100 μ L MDCK 细胞。

- b) 病毒工作液滴度检查:一般第 1 孔加入含有 200 TCID₅₀ 的 100 μ L 病毒液, 然后进行 2 倍稀释, 再与 MDCK 细胞进行混合培养。

病毒滴度检查:50 μ L 2 倍系列稀释病毒液(第 1 孔为 100 TCID₅₀) + 50 μ L 病毒稀释液 + 100 μ L MDCK 细胞(1.5×10^4 细胞/孔)。

C. 5 微量中和试验操作步骤

C. 5. 1 病毒滴度的测定(组织细胞半数感染量——TCID₅₀ 滴定)

C. 5. 1. 1 流感病毒的制备

利用鸡胚尿囊腔接种法制备流感病毒, 收获尿囊液, 通过红细胞凝集试验测定病毒的存在, 分装后 -70 $^{\circ}$ C 冻存。

C. 5. 1. 2 病毒的稀释

取 1 管冻存病毒尿囊液, 1 : 100 稀释。

第一排孔加入 146 μ L 1 : 100 稀释过的病毒液, 然后做系列半对数稀释, 使之成为 10^{-2} 、 $10^{-2.5}$ 、 10^{-3} 、 $10^{-3.5}$ …… 10^{-7} 。每孔含有 100 μ L 病毒液, 每个稀释度重复 4 孔。

人流感病毒一般在胰酶存在的条件下才能感染 MDCK 细胞, 因此病毒稀释液中需加入终浓度为 2 μ g/mL TPCK-胰酶。某些毒性很高的禽流感病毒在无胰酶存在条件下即可感染 MDCK 细胞, 因此在测定新病毒滴度时, 最好配制含有和不含有胰酶的两种稀释液, 以获得最佳结果。

C. 5. 1. 3 MDCK 细胞的准备

使用前 2d 将 MDCK 细胞 1 : 10 传代, 使之 70%~90% 成片, 处于对数生长期的细胞对病毒具有最大的敏感性, 细胞过度生长以及代数太高(大于 25 代)将使细胞对病毒的敏感性降低。

弃去细胞培养液, 用 5mL EDTA-胰酶洗细胞一次, 然后弃去。

加 4mL~5mL EDTA-胰酶覆盖细胞(162cm² 的细胞培养瓶)37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 10min~20min。

待细胞开始脱落时, 加入 5mL~10mL MDCK 细胞培养液, 吹打分散细胞, 并将细胞转入离心管, 2 000r/min 离心 5min, 用 PBS 洗涤 2 次, 以除去牛血清。

将细胞悬浮于 1mL 病毒稀释液中, 用吸管充分吹打分散细胞, 加病毒稀释液至 10mL, 用细胞计数板计数细胞数量。

用病毒稀释液将细胞稀释成 1.5×10^5 细胞/mL。

加 100 μ L 细胞(1.5×10^4 细胞/孔)于已稀释好病毒的微量细胞培养板中。

在 35 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱中培养 18h~20h。

C. 5. 1. 3. 1 MDCK 细胞计数方法

用血细胞计数板来精确计算细胞悬液中的细胞数, 需要充分分散细胞。

- 在 0.2mL 中台盼蓝(0.1% PBS 溶液)中加入 0.2mL 细胞悬液, 混匀。没有活性的细胞被染成蓝色。
- 取适量的细胞悬液分两边加入血细胞计数器的计数室。
- 计算计数室四个角上三线包围的正方形中的活细胞, 压线的细胞不计数。
- 如果观察到成片或者成团的细胞。应重新悬浮细胞液, 重新计数。
- 计算计数室 4 个角上正方形内的活细胞总数。
- 用式(C. 1)计算每毫升悬液中活细胞的数量。

$$C = T \times T_b \times 1/4 \times 10^4 \dots\dots\dots (C. 1)$$

C——每毫升内原始细胞浓度;

T——4 个角上正方形内的活细胞数;

Tb——台盼蓝的稀释度校正值(稀释度计算为 $1/Tb$)。

g) 计算稀释系数。

h) 用稀释液将细胞稀释到所需的细胞工作浓度。

C. 5. 1. 4 测定组织细胞半数感染剂量(TCID₅₀)

a) 弃去微量培养板中的细胞液,250 μ L PBS洗细胞一次;

b) 弃去PBS(不要让细胞干燥),每孔加入100 μ L固定液;

c) 覆盖微量培养板,于室温固定细胞10min;

d) 弃去固定液,让微量培养板室温干燥;

e) 用ELISA检测细胞感染(参见ELISA部分);

f) 利用ELISA检测仪,于490nm波长,测定每孔吸光度(OD)值,计算细胞对照孔的平均OD值;

g) 若含有不同稀释度病毒孔平均OD值是细胞阴性对照孔平均OD值2倍以上,则判断为病毒生长阳性;

h) 根据Reed和Muench方法对病毒滴度进行计算,最终获得TCID₅₀/100mL(TCID₅₀滴定的计算见C. 5. 6);

i) 在进行中和试验前,稀释病毒液,使之50 μ L中含有100 TCID₅₀病毒。

C. 5. 2 病毒微量中和试验

C. 5. 2. 1 待检血清的准备和稀释

a) 检测一种病毒的中和抗体需要10 μ L血清,每份血清须进行至少一次重复测定,每块板可检测11份样品;

b) 人血清需56 $^{\circ}$ C加热灭活30min;

c) 每孔中加入50 μ L病毒稀释液;

d) 第一排中(A1~A11)在加入40 μ L病毒稀释液,使之成为90 μ L/每孔;

e) 加入10 μ L待检血清于第一排A1~A11;

f) 将待检血清作系列倍比稀释(A~H)使之成为1:10、1:20、1:40...1:1280。

C. 5. 2. 2 病毒的准备

a) 稀释病毒至100 TCID₅₀/50mL。根据病毒特性选择是否在稀释液中加入TPCK胰酶(大约5mL/板)。

b) 除细胞阴性对照外,每孔加入50 μ L病毒工作液。

c) 加入50 μ L病毒稀释液于细胞阴性对照孔。

d) 选择1列孔作病毒工作液滴度核实。每孔加入200 TCID₅₀/100mL,作系列倍比稀释,使之成为100 TCID₅₀、50、25、12、6...0.7。然后每孔加入50 μ L病毒稀释液使体积成为100 μ L/孔。

e) 摇匀病毒-血清混合物,放37 $^{\circ}$ C温箱作用2h。

C. 5. 2. 3 MDCK细胞的准备

加100 μ L细胞液(1.5×10^4 细胞/孔)于含有病毒-血清混合物以及倍比稀释病毒工作液的微量板中,35 $^{\circ}$ C温箱孵育18h~22h。

当测定大量样品时,每叠培养板一般不超过4块~5块,各叠板之间要保持一定距离,以确保混合物受热均匀,从而达到良好的中和效果。

C. 5. 2. 4 细胞固定

a) 弃去微量培养板中的细胞液;

b) 250mL PBS洗细胞一次;

c) 弃去PBS(不要让细胞干燥),加入100 μ L/孔固定液;

d) 覆盖微量培养板,于室温固定细胞10min;

e) 弃去固定液,让微量培养板室温干燥。

C. 5.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

ELISA 的基本原理是:酶结合物与相应抗体或抗原特异性结合,再遇酶底物时,在酶的强烈催化下使原来无色的底物产生化学反应,即形成有色产物,便可用肉眼或分光光度计定量检测其含量。该方法具有特异性、敏感性、快速性和简易性等优点。在流感病毒微量中和试验中,酶结合物(HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体)与存在于 MDCK 细胞内的病毒核蛋白抗原-核蛋白单克隆抗体复合物结合,HRP 酶催化 OPD,使无色底物形成橙黄色化合物。再由 ELISA 检测仪测定吸光度值,从而获得中和抗体滴度。

C. 5.3.1 ELISA 试验操作步骤

- 用 250 μ L PBS 洗涤微量培养板 3 次,以去除残余的丙酮;
- 用封闭液 1:4 000(或最佳稀释度)稀释抗体 1(抗流感病毒核蛋白-NP 单克隆抗体);
- 每孔加入稀释后的抗体 1,1 000 μ L,室温作用 1h;
- 用 250 μ L 洗涤液洗涤板 4 次以除去抗体 1;
- 用封闭液 1:2 000(或最佳稀释度)稀释抗体 2(HRP 标记的羊抗鼠 IgG);
- 每孔加入稀释后的抗体 2,100 μ L,室温作用 1h;
- 用 250 μ L 洗涤液洗涤板 6 次以去除抗体 2;
- 每孔加入 OPD 底物 100 μ L(10mg OPD+20mL 枸橼酸缓冲液+10 μ L 30%过氧化氢水溶液,即用即配);
- 室温放 10min 左右显色,直至细胞阳性对照孔变成橙黄色,而细胞阴性对照孔尚未变色时,每孔加入 1M 硫酸 100 μ L 终止反应;
- 在 ELISA 测定以上(490nm)读出每孔 OD 值。

C. 5.3.2 结果判定

式(C.2)用于判定中和反应结果。

$$X = (\text{细胞阳性对照平均 OD 值} - \text{细胞阴性对照平均 OD 值}) / 2 + \text{细胞阴性对照平均 OD 值} \dots\dots (C.2)$$

X 为细胞半数感染域值,每孔 OD 值低于 X 值时,判定为中和试验反应阳性,中和反应阳性的血清最高稀释度即为血清的中和抗体滴度。

在特殊情况下可用目测法判定结果,即加入底物后,肉眼下出现橙黄色反应的为阳性,无色为阴性。待检系列稀释血清中无色孔的最高稀释度即为血清的中和抗体滴度。

C. 5.4 流感病毒中和试验的质量控制

- 阴性血清对照孔的 OD 值应该与阳性细胞对照的 OD 值无明显差别;
- 病毒工作液滴度检测孔,上数 3 孔~5 孔呈阳性反应,显示正常病毒量,若超过 5 孔阳性,则为病毒量过量,若少于 3 孔阳性,则为病毒量不足;
- 阴性细胞对照孔 OD 值一般小于 0.2,阳性细胞对照孔的 OD 值一般在 1 左右;
- 每次测定过程中,阳性血清对照的中和抗体滴度应该在 2 倍之内波动。

C. 5.5 操作注意事项

- 待检人血清需 56 $^{\circ}$ C 灭活 30min,动物血清需 RDE 处理。
- 待检血清需要重复测定时,应分装后冻存,以免反复冻融。
- 每管病毒只能使用一次,若重复使用,或血清阳性对照结果过高或过低,以及细胞阳性对照 OD 值过低,须对病毒进行重新滴定。
- MDCK 细胞应处于对数生长期,严禁细胞过度生长(代数过高)。因此,必须在 10 代前进行细胞冻存,保存于液氮中备用。
- 牛血清中有中和病毒感染力的作用,试验过程中切勿将细胞培养液与病毒稀释液混淆使用。
- 病毒与抗血清混合,常规采用 37 $^{\circ}$ C 作用 1h,该试验采用 37 $^{\circ}$ C 作用 2h,但针对不同耐热性的病毒,孵育温度和时间应有所增减。
- 在 ELISA 过程中,每步都要洗涤,以保证结果可靠。

- h) 选择合适的抗体稀释浓度,一般预先将不同稀释度的抗体以及酶结合抗体进行 ELISA 测定,以及获得最佳稀释度。
- i) 正确控制显色时间,以降低背景染色。
- j) 大量测定时,为稳定培养液的 pH 值,可用 HEPES 增加溶液的缓冲能力,减少 pH 值变化对细胞的不利影响。
- k) 在缺少病毒特异性抗体的情况下,可用观察细胞病变或检测微量培养板中每孔红细胞凝集活性来代替 ELISA 方法,但细胞培养时间一般从 18h~24h 增至 2d~4d。

C. 5.6 病毒 TCID₅₀ 滴度的计算

组织培养半数感染量是病毒感染一半组织细胞时的病毒的稀释度,一般使用 Reed-Muench 方法计算,详细过程见表 C. 1。

表 C. 1 Reed-Muench 方法计算 TCID₅₀ 滴度的病毒稀释度配比情况

稀释度	阳性数目(1)	阴性数目(2)	阳性数(3)	阴性数(4)	比率(5)	阳性数百分比(6)
10 ⁻⁴	4	0	11	0	11/11	100
10 ^{-4.5}	4	0	7	0	7/7	100
10 ⁻⁵	3	1	3	1	3/4	75
10 ^{-5.5}	0	4	0	5	0/5	0

注 1: 计算各病毒稀释度阳性孔数目(1)和阴性孔数目(2)。

注 2: 计算阳性和阴性孔的累积数

阳性孔累积数由下向上累积(3); 阴性孔累积由上向下累积(4)。

注 3: 计算阳性孔的百分比: 比率(5) = (3) / [(3) + (4)]

$$(6) = (5) \times 100$$

注 4: 计算距离比

$$\begin{aligned} \text{距离比例} &= (\text{大于 } 50\% \text{ 的阳性百分比} - 50) / (\text{大于 } 50\% \text{ 的阳性比} - \text{小于 } 50\% \text{ 的阳性百分比}) \\ &= (75 - 50) / (75 - 0) = 0.3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{TCID}_{50} \text{ 的对数} &= \text{大于 } 50\% \text{ 的阳性百分比的最高稀释对数} + \text{距离比例} \times \text{稀释系数的对数} \\ &= 5 + 0.3 \times 0.5 = 5.15 \end{aligned}$$

$$\text{TCID}_{50} = 10^{-5.15} / 100 \mu\text{L}$$

$$100 \text{ TCID}_{50} / 100 \mu\text{L} = 10^{-3.15}$$

$$100 \text{ TCID}_{50} / 50 \mu\text{L} = 10^{-3.15} / 2 = 10^{-3.15} + 0.3 = 10^{-2.8} = 1 : 1631$$

注 5: 稀释系数的对数

1 : 10 稀释为 1; 半对数稀释为 0.5; 倍比稀释为 0.3; 1 : 5 稀释为 0.7。

附录 D
(规范性附录)
流感病毒核酸检测方法

D.1 RT-PCR 快速诊断方法

核酸检测是一种鉴定流感病毒基因组的有力方法,即使基因组含量很低或死病毒也可以检测到。

流感病毒的基因组是负链 RNA,在进行 PCR 扩增前必须合成与病毒 RNA 互补的 DNA,即为 cDNA。逆转录酶(RT)就是用于合成 cDNA 的多聚酶,因此,扩增流感病毒基因组的过程称为 RT-PCR。

RT-PCR 需要一对型别特异引物,四种脱氧核苷酸(dNTPs),RNA 模板,逆转录酶及 Taq DNA 多聚酶;首先由逆转录酶将病毒的 RNA 逆转录合成 cDNA,然后再进行聚合酶链反应经 25 个~30 个循环,使 DNA 产物达到倍增的效果。

D.1.1 生物安全要求

生物安全级别与个人防护要求:生物安全二级实验室,防护要求与二级实验室的要求相同。并应遵守相应的生物安全规定。进行高致病性禽 H5 RT-PCR 快速检测时可以在生物安全二级实验室里进行,核酸提取在生物安全三级实验室的生物安全柜里完成。

D.1.2 病毒核酸提取**D.1.2.1 实验材料及仪器**

- a) 病毒核酸提取试剂盒;
- b) 无菌 1.5mL 离心管;
- c) 10 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L 加样器和枪头;
- d) 可调 14K 微型离心机;
- e) 旋转混合器。

D.1.2.2 操作步骤

具体的病毒核酸提取步骤请参照所购买的试剂盒来进行,下面以 QIAGEN 公司的 Rneasy Mini Kit 为例介绍试验步骤:

- a) 取 1 支无菌、无 RNA 酶的 1.5mL Eppendorf 管,加入 500 μ L RLT。
- b) 取采样液(鼻拭子、咽拭子、胸腔积液等)或病毒培养物(鸡胚尿囊液或细胞培养液)100 μ L,加入上述 Eppendorf 管中。
- c) 加 5 μ L β -巯基乙醇,充分混匀。
- d) 加 600 μ L 70%乙醇,于旋转混合器混匀。
- e) 从试剂盒中取出带滤膜的离心柱,并标上标本号。
- f) 将第 4 步的混合液体分两次(每次 600 μ L)吸入于滤柱中,12 000r/min 离心 15s,弃收集管中的离心液。
- g) 滤柱仍放回收集管上,将第 4 步的混合液全部吸入滤柱中,12 000r/min 离心 15s,弃收集管中液体。
- h) 于滤柱中加入 700 μ L RW1,12 000r/min 离心 15s。
- i) 从试剂盒中取出一支新的 2mL 收集管,将离心后的滤柱转到新的收集管上,于柱子中加入 500 μ L RPE,12 000r/min 离心 15s 弃收集管中液体。
- j) 滤柱放回收集管上,于滤柱中加入 500 μ L RPE,13 000r/min~14 000r/min 离心 2min。
- k) 从试剂盒中取出一支 1.5mL Eppendorf 管,将滤柱转到新的 1.5mL 管上,于滤柱中加入 30 μ L~50 μ L 无 RNA 酶的水,室温静置 1min~3min。

l) 12 000r/min 离心 1min,弃滤柱。收集的离心液即为提取的病毒 RNA,可以直接用于逆转录实验,或在-20℃以下保存,-30℃可保存 3 个月~4 个月。

D. 1.2.3 注意事项

- a) 试剂盒中的 RPE 液用前需加 44mL 无水乙醇,使终体积达到 55mL;
- b) 所有用过的枪头、收集管放入 2%次氯酸钠消毒缸中过夜。

D. 1.3 RT-PCR 操作步骤

这里介绍两种试验方法,一种为传统的方法,即第一步先逆转录合成 cDNA,第二步再进行 PCR 反应。第二种方法是使用 One Step RT-PCR 试剂盒,将逆转录和 PCR 扩增过程同在一个反应管内完成。

D. 1.3.1 一步法 RT-PCR 试验操作步骤

D. 1.3.1.1 实验材料

- a) QIAGEN One Step RT-PCR Kit Cat No 210212
- b) RNase inhibitor 40u/μL(Promega)
- c) 上游引物 200ng/μL
- 下游引物 200ng/μL
- d) 模板 RNA (Templet RNA)

D. 1.3.1.2 实验步骤

a) PCR 反应配置(在清洁区缓冲间,加 RNA 模板应在核酸室)。

无 RNA 酶水(Rnase Free Water)	28.75μL
5×Buffer	10μL
10mmol/L dNTP	2μL
Enzyme Mix	2μL
Rnase inhibitor	0.25μL
上游引物	1μL
下游引物	1μL
RNA 模板	5μL
	总量:50μL

b) 将 PCR 反应管放入 PCR 扩增仪。

c) RT-PCR 反应条件:此循环的反应条件仅共参考,如果引物更换,相应的反应条件需要做适当调整。

- 1) 60℃ 1min
- 2) 42℃ 10min
- 3) 50℃ 30min
- 4) 95℃ 15min
- 5) 94℃ 30s
- 6) 52℃ 30s
- 7) 72℃ 1min
- 8) 返回第 5 部,循环 34 次
- 9) 72℃ 10min
- 10) 4℃ 保存

d) PCR 产物检测

琼脂糖凝胶配置:用 1×TBE 将琼脂糖配成 1.2%~1.5%溶液,加热使之完全溶解。冷却到 50℃~60℃时加入溴化乙锭(ethidium bromide EB,10μg/μL),终浓度为 0.5μg/mL。

PCR 产物检测:将凝胶放入电泳槽,加入 1×TBE Buffer,使它淹没过胶面。每份标本取 4μL PCR

产物,与 $1\mu\text{L}$ $5\times$ Loading Buffer 充分混匀后全加入凝胶孔中。于同一凝胶的第一孔加入 $5\mu\text{L}$ 分子量标准样品。加完样后,盖上电泳槽盖子,接通电源,稳压 100V ,电泳时间 $30\text{min}\sim 40\text{min}$ 。

结果分析:用 UV ~ 254 暗箱式紫外透射仪观察电泳结果,在透射波长 254nm 下观察结果效果较好。或者用凝胶成像系统观察电泳结果。

e) 注意事项:含 EB 的琼脂糖经处理后放入科研垃圾袋内统一处理。含有 EB 的凝胶处理方法:

- 1) 加 1 倍体积的 0.5mol/L 高锰酸钾水溶液,小心混匀。
- 2) 加 1 倍体积的 2.5mol/L HCl,小心混匀。于室温放置数小时。
- 3) 加 1 倍体积的 2.5mol/L 氢氧化钠水溶液,小心混匀后即可丢弃。

D. 1.3.2 二步法 RT-PCR

D. 1.3.2.1 实验材料

- a) 逆转录酶:AMV Reverse Transcriptase
- b) $5\times$ RT Buffer
- c) 2.5mmol/L dNTP
- d) RNA 酶抑制剂 $40\text{u}/\mu\text{L}$
- e) 上游引物 $200\text{ng}/\mu\text{L}$
- f) 下游引物 $200\text{ng}/\mu\text{L}$
- g) 无 RNA 酶的水
- h) Ex-Taq 酶($5\text{u}/\mu\text{L}$ DRR 001A 250u)或 Taq DNA 聚合酶
- i) $10\times$ PCR Buffer

D. 1.3.2.2 实验步骤

a) 逆转录反应(在清洁区缓冲间,加 RNA 模板在核酸提取室)。

无 RNA 酶的水	$6.8\mu\text{L}$
$5\times$ RT Buffer	$4\mu\text{L}$
2.5mmol/L dNTP	$2\mu\text{L}$
上游引物	$1\mu\text{L}$
RNA 酶抑制剂	$0.2\mu\text{L}$
逆转录酶	$1\mu\text{L}$
RNA 模板	$5\mu\text{L}$

总量: $20\mu\text{L}$

将上述反应液混匀, 42°C 水浴作用 1h 。然后 94°C 3min ,放置冰上(下步 PCR 反应或 -20°C 待用)。

b) PCR 反应配置(在清洁区缓冲间,加 cDNA 模板应在 PCR 扩增室)

无 RNA 酶的水	$35.5\mu\text{L}$
$10\times$ PCR Buffer	$5\mu\text{L}$
2.5mmol/L dNTP	$2\mu\text{L}$
上游引物	$1\mu\text{L}$
下游引物	$1\mu\text{L}$
Ex-Taq 酶	$0.5\mu\text{L}$
cDNA 模板	$5\mu\text{L}$

总量: $50\mu\text{L}$

c) 将 PCR 反应管放入 PCR 扩增仪。

d) PCR 反应条件:此循环的反应条件仅共参考,如果引物更换,相应的反应条件需要做适当调整。

94°C	3min
94°C	40s

52°C 40s
 72°C 2min
 返回第 2 部,循环 30 次
 72°C 7min
 4°C 保存

e) PCR 产物检测:同一步法 PCR 产物检测。

D.2 实时荧光定量 RT-PCR(real-time RT-PCR)

D.2.1 基本原理

实时荧光定量(real-time)RT-PCR 术,是指在 RT-PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 RT-PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量或定性分析的方法。常用的荧光基团主要有 TaqMan 荧光探针和 SYBR 荧光染料。

D.2.1.1 TaqMan 荧光探针

PCR 扩增时,在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号可被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶的 5'-3'外切酶活性将与 PCR 产物杂交形成双链的探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

D.2.1.2 SYBR 荧光染料

在 PCR 反应体系中,加入过量 SYBR 荧光染料,SYBR 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后,发射荧光信号,而不掺入双链中的 SYBR 染料分子不会发射任何荧光信号,从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。

D.2.2 相关概念

Ct 值:C 代表 cycle,t 代表 threshold。Ct 值是指反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

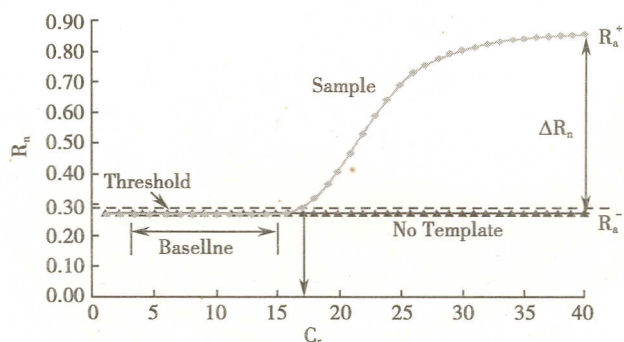


图 D.1 样品 real-time RT-PCR 反应标准曲线

阈值(threshold):PCR 反应前 15 个循环荧光信号作为荧光本底信号,荧光阈值的缺省设置是 6 个~15 个循环荧光信号标准偏差的 10 倍。

基线(baseline):指 PCR 反应指数扩增前平均本底荧光信号值,通常取 6 个~15 个循环的平均荧光信号值。

Ct 值与起始模板的关系:每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多,Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线,其中横坐标代表起始拷贝数的对数,纵坐标代表 Ct 值。因此,只要获得未知样品的 Ct 值,可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

D.2.3 实验试剂

- a) 引物:A型和B型流感通用引物;H1、H3亚型分型引物;
- b) RT-PCR酶;
- c) RT-PCR反应液;
- d) TaqDNA聚合酶;
- e) 无RNA酶的水;
- f) 阳性对照(可以使用病毒核酸或者体外转录RNA);
- g) 阴性对照;
- h) 无RNA酶的水。

D.2.4 试验操作步骤

D.2.4.1 核酸提取

方法同RT-PCR的快速诊断。

D.2.4.2 RT-PCR反应体系配置

根据所购买的试剂盒配置反应体系。

D.2.4.3 反应设置

a) 根据实际情况和不同的仪器设备设置合适的反应参数。

b) 质控标准

阴性对照的检测结果为阴性。

阳性对照的Ct值应 ≤ 28.0 。

否则,此次实验视为无效。

D.2.4.4 结果判断

a) Ct值无数值的样本为阴性样本。

b) Ct值 ≤ 30.0 的样本为阳性。

c) Ct值大于30.0的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性,否则为阳性。

D.2.4.5 问题解决

a) 若阴性对照出现扩增,可以考虑由于环境污染而造成的假阳性。此时应设立空白对照检测:在实验当天取一盛有500 μL 纯水的1.5mL离心管置于工作台,并于实验结束后作为待检样品检测,检测结果应为阴性。若出现阳性则说明发生环境污染,此时应对室内进行通风、擦洗工作台及实验用品,并对实验用离心管、吸头重新高压灭菌,更换所有自备试剂。

b) 阳性对照Ct值大于30,则应考虑RNA降解,此时应对实验用离心管、吸头重新高压灭菌,并严格按照操作流程进行实验。

附录 E
(规范性附录)
免疫荧光法检测方法

E.1 原理

流感病毒主要感染呼吸道上皮细胞,因此在患者呼吸道标本的脱落细胞中含有流感病毒抗原,通过直接检查上皮细胞内病毒特异性抗原即可诊断。

E.2 免疫荧光试验操作步骤

E.2.1 标本处理

- a) 标本采集最好用负压抽取法收集的呼吸道分泌物;
- b) 在标本中加入维持培养液至总体积为 4mL;
- c) 使用吸管吹打悬浮液数次;
- d) 2 000r/min 离心 5min;
- e) 保留上清液做培养;
- f) 用 10mL pH7.2 PBS 清洗细胞沉淀,弃上清;
- g) 用 0.5mL pH7.2 PBS 重新悬起沉淀。

E.2.2 间接免疫荧光法试验步骤

- a) 在特富龙涂层的 12 孔显微载玻片的每个孔上加入 10 μ L 细胞悬浮液;
- b) 用载玻片干燥器干燥载玻片或室温自然干燥;
- c) 用 100%冰丙酮室温 10min 固定载玻片;
- d) 室温晾干载玻片;
- e) 每孔加 10 μ L 流感相应亚型的特异性抗体(1:1 000);
- f) 玻片在湿盒中 37 $^{\circ}$ C 放置 45min;
- g) pH7.2 PBS 洗涤 1min;
- h) 室温晾干载玻片;
- i) 每孔加入 10 μ L 1:20 兔抗鼠荧光素结合物(二抗),及 0.1%埃文斯蓝(Evans Blue)做负染;
- j) 玻片在湿盒中 37 $^{\circ}$ C 放置 45min;
- k) pH7.2 PBS 洗涤 1min;
- l) 室温晾干载玻片;
- m) 加上盖玻片,加上甘油;
- n) 在 400 \times 荧光显微镜下检查。

E.2.3 结果判断

阳性讯号为细胞质内苹果绿色荧光,阴性细胞显示为深红色的细胞质部分。观察到三个以上荧光阳性即可判为阳性。

附录 F

(资料性附录)

流行性感冒病原学、流行病学和临床表现

流行性感冒(influenza)简称流感,是一种由流行性感冒病毒所引起的常见呼吸道疾病,主要表现为发热,体温一般 38℃以上,并且伴有咳嗽或肌肉酸疼。流感病毒分为由甲(A),乙(B),丙(C)三型,均可感染人。甲型流感病毒根据表面抗原的不同分为不同的亚型,根据红细胞凝集素抗原的不同分为 16 个亚型,根据神经氨酸酶的不同分为 9 个亚型。甲型流感病毒常以流行形式出现,能引起世界性流感大流行。乙型流感病毒常常引起局部暴发,未曾引起世界性流感大流行,至今尚未找到它存在于人之外其他动物中的确凿证据。丙型流感病毒主要以散在形式出现,主要侵袭婴幼儿,一般不引起流行,猪也是它的天然宿主之一。

F.1 病原学

流感病毒在病毒分类学上属正黏病毒科(Orthomyxoviridae)。常为球形囊膜病毒,直径 80nm~120nm,丝状体常见于刚分离到的病毒,长度可达数微米。它的基因组是分节段的(甲、乙型毒株含 8 个节段,而丙型仅含 7 个节段,少一个编码神经氨酸酶蛋白的节段),单链,负链的 RNA。甲、乙型毒株基因组至少分别编码 10 种和 11 种蛋白。由于基因组是分节段的,故易产生同型不同株间基因重配。流感病毒,尤其甲型流感病毒 HA 基因能经常不断地发生点突变,导致其编码的 HA 蛋白分子上氨基酸序列发生替换,造成其抗原性不断地发生漂移,每次抗原性漂移常带来不同程度的流感流行。

根据病毒核蛋白(NP)和膜蛋白(MP)抗原特性及其基因特性不同,把流感病毒分为甲、乙、丙三型。甲型流感病毒根据其表面血凝素(H)和神经氨酸酶(N)蛋白结构及其基因特性又可分成许多亚型,至今甲型流感病毒已发现的血凝素有 16 个亚型(H1~H16),神经氨酸酶有 9 个亚型(N1~N9)。

甲型包括 16 种血凝素亚型和 9 种神经氨酸酶亚型的甲型流感病毒都可以在鸟类特别是在水禽中存在,这些亚型的流感病毒与宿主之间存在着一种相对的进化平衡,即病毒在宿主中相对稳定地存在并且不导致宿主致病。由于流感病毒的种属特异性,并不是所有的甲型流感病毒可以感染人,目前可以感染人的甲型流感病毒包括 H1、H2、H3、H5、H7、H9 以及 N1、N2、N3、N7 亚型。除可以感染人之外,甲型流感病毒还可以感染其他动物,如猪、马以及海豹以及鲸鱼和水貂等。到目前为止可以感染猪的甲型流感病毒包括 H1、H3 以及 N1、N2、N7;可以感染马的甲型流感病毒包括 H3、H7 以及 N7、N8;可以感染海豹的甲型流感病毒包括 H3、H4、H7 以及 N3、N6、N7;可以感染鲸鱼以及水貂的甲型流感病毒包括 H1、H10、H13 以及 N1、N3、N4、N9。乙型流感病毒目前尚未发现除人之外的其他自然宿主。丙型流感病毒除感染人之外还可以感染猪,郭元吉等于 1981—1982 年从中国猪群中分离出多株丙型流感病毒。

甲型流感病毒可以引起世界性的流感大流行,自 20 世纪以来,有明确记载并且有病原学依据的世界流感大流行一共有 4 次:①发生于 1918—1919 年的西班牙流感,由 H1N1 亚型流感病毒引起,这是目前所知最大的一次流感大流行,估计有 2 500 万人~4 000 万人死亡。目前科学家已经从以前保留的标本以及从美国阿拉斯加冻存的尸体标本中测定了引起此次流感大流行病毒的序列,从目前的序列分析结果显示,大流行株与在人和猪分离到的 H1N1 接近,而不同于高致病性的禽流感病毒,因此现在还很难确定此次流感大流行毒株的起源;②发生于 1957 年的亚洲流感,此次流感大流行由 H2N2 亚型流感病毒引起,导致了数百万人的死亡,H2N2 病毒是由当时流行的 H1N1 病毒与禽流感病毒 H2N2 病毒重配而来,其中 HA、NA 以及 PB1 基因来自禽流感病毒,其他 5 个基因来自当时流行的 H1N1 病毒;③1968 年的香港流感是由 H3N2 病毒引起,该病毒由禽流感病毒和当时流行的人流感病毒通过重配而来,其中 HA 以及 PB1 基因来自禽流感病毒,其他基因来自 H2N2 亚型流感病毒;④1977 年 H1N1 亚型流感病毒在人群中消失 20 年之后重新出现,这次流感大流行的规模远远小于前几次流感大流行的规

模,其病毒就是 1957 年之前在人群中流行的 H1N1 病毒,但是这种病毒如何在自然界保存? 又如何重新在人群中出现的机制并不是很清楚,很难设想一种病毒在一种宿主中存在 20 年而没有任何变化,一种可能的解释是这种病毒可能在某个地方冻存起来,然后又通过某种方式释放到人群中,但是人们并不清楚这其中的具体过程。

F.2 流行病学

F.2.1 传染源和传播途径

流感患者和隐性感染者是流感的主要传染源。从潜伏期末到发病的急性期(约 7d)都有传染性。一般来讲,体温恢复正常后即已不带病毒。流感主要是通过空气飞沫和直接接触传播的。

F.2.2 易感人群

由于流感病毒的变异,所以会使人能不停地成为易感人群,特别是当一个新的亚型出现时,几乎所有的人都是易感人群,这也是为什么会引起世界大流行的原因。

F.2.3 流行病学特点

突然暴发,经呼吸道传播迅速扩散,造成不同程度的流行,波及面广,具有一定的季节性(我国北方流行一般均发生在冬季,而南方多发生在夏季和冬季),一般流行 3 周~4 周后会自然停止,发病率高但死亡率低。感染率最高的为青少年,高危人群为年迈体弱或带有慢性疾病患者。每次流感流行后在人群中总要造成不同程度的超额死亡。

流感分为散发、局部暴发(也称暴发)、流行和大流行。一般在非流行期间,发病率较低,病例在人群中呈散在分布各病例在发病时间及地点没有明显的联系,这种情况叫散发;一个集体或一个小地区在相当短的时间内突然发生很多流感病例叫暴发;在较大地区内的流感发病率明显的超过一般的发病水平,可称为流行;大流行有时也称世界性大流行,是由于新亚型毒株出现,人群普遍的缺乏免疫力。因此,传播迅速,流行广泛波及全世界(超越国界和洲界),发病率高并有一定的死亡。世界性大流行常有 2 个~3 个波,一般说来,第一波持续时间短,发病率高,第二波时间长,发病率低,但是很可能死亡率很高;有时还有第三波。

流感还可引起每年的流感流行,根据世界卫生组织的报告,全球每年流感病例为 6 亿~12 亿例,死亡 50 万~100 万人,其中重症流感病例 300 万~500 万例,重症流感的病死率为 8%~10%。主要的高危人群包括小孩,老人以及患有慢性疾病及免疫低下的人群。在美国每年平均导致 3.6 万人死亡。

F.3 临床表现

流感感染由于病毒型别、亚型及毒力的不同,以及由于不同人群的免疫状态、年龄、生理以及健康状况等内在因素的影响,可以表现为隐性感染或者显性感染。显性感染者也会由于各种因素的影响病情也有所不同。流感感染潜伏期一般为 1d~4d,平均为 2d,患者出现症状的前 1d 至后 5d 都有传染性,儿童的病毒存在期会更长。一般体温正常后无传染性。

无合并感染的流感临床特征是突然发病,高热,体温一般在 38℃ 以上,全身中毒症状明显,表现为头痛、肌肉酸痛、严重不适。上呼吸道症状如咳嗽、咽疼、流鼻涕等很难与其他病毒或细菌感染,如呼吸道合胞病毒、流感嗜血杆菌等引起的上呼吸道症状区分,卡他性症状常不明显。少数病例有食欲减退,伴有腹痛、腹胀、呕吐和腹泻等消化道症状。婴儿流感的临床症状往往不典型,可见高热惊厥;部分患儿表现为喉气管支气管炎,严重者出现气道梗阻现象;新生儿流感虽少见,但一旦发生常呈败血症表现,如嗜睡、拒奶、呼吸暂停等,常伴有肺炎,病死率高。

在临床上一般将发热(体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$),伴咳嗽或咽痛之一者,而缺乏其他的实验室确定诊断的病例确定为流感样病例。临床病例应该结合流感的流行病学史以及临床症状进行,如果是处于当地流感流行季节,一个单位或地区出现大量上呼吸道感染患者或医院门诊、急诊上呼吸道感染患者明显增加时,流感样病例可以诊断为临床诊断病例。确诊流感病例必须依赖于实验室的诊断。

附录 G

(资料性附录)

流感标本的采集、运送和处理规程

G.1 流感呼吸道和组织临床标本的采集、运送和处理

G.1.1 流感呼吸道和组织临床标本的采集

病毒分离成功与否很大程度上取决于临床标本的质量,及其保存运输等环节。多数标本取自患者上呼吸道鼻咽腔,其次为气管和支气管分泌物及尸检组织。标本采集后应立即放入适当的采样液中低温保存。

常用的采样液有以下三种:pH7.4~7.6的Hank's、Eagle's或不加抗菌素的生理盐水(漱口液)。为防止采样液生长细菌和真菌,在采样液中需加入抗菌素及抗真菌药物。加入抗菌素以后重新调节pH值为7.4,配制好以后,分装每个采样管5mL,-20℃冻存。采样方法有以下几种:

- a) 鼻拭子:将带有聚丙烯纤维头的拭子轻轻插入鼻道内鼻腭处,停留片刻后缓慢转动退出。以另一拭子拭另侧鼻孔。将拭子头浸入采样液中,尾部弃去。
- b) 咽拭子:用带有聚丙烯纤维头的拭子擦拭双侧咽扁桃体及咽后壁,同样将拭子头浸入采样液中,尾部弃去。
注:亦可将鼻、咽拭子收集于同一采样管中,以便提高分离率,减少工作量。
- c) 漱口液:用10mL生理盐水漱口。漱时让患者头部微后仰,发“噢”声,让生理盐水在咽部转动。然后,用平皿或烧杯收集洗液。
- d) 鼻洗液:患者取坐姿,头微后仰,用移液管将5mL生理盐水注入一侧鼻孔,嘱患者同时发K音以关闭咽腔。然后让患者低头使生理盐水流出,用平皿或烧杯收集洗液。重复此过程洗两侧鼻孔。
- e) 鼻咽抽取物:气管和支气管分泌物常采用此法采集。用与负压泵相连的收集器从鼻咽部抽取黏液。先将收集器头部插入鼻腔,接通负压,旋转收集器头部并缓慢退出。收集抽取的黏液,并用采样液5mL涮洗收集器3次。
- f) 尸检组织标本:必要时采集尸检的肺组织标本进行病毒分离。标本为尸检组织物。

G.1.2 呼吸道和组织临床标本运送

新鲜采集的临床标本应在4℃条件下48h内运送至实验室。未能48h内送至实验室的,应置-70℃或以下保存。标本送至实验室后,病毒分离标本应尽快进行接种分离,48h内能进行接种的可置于4℃保存,如未能接种应置-70℃或以下保存。

冻存的临床采集标本应在冻存的条件下,低温送至实验室。冻存的标本送到实验室后,48h内能进行病毒分离的,可以放置4℃保存。如未能分离的标本应置-70℃或以下保存。

临床标本采集管必须使用带螺口的塑料管,并且符合国家生物安全的有关规定。

G.1.3 呼吸道和组织临床标本处理

临床采集标本送至实验室后,须经处理后再进行病毒的分离接种。含聚丙烯纤维的拭子的标本,先将含聚丙烯纤维的拭子在管壁反复挤压后取出。鼻腔或咽部洗液的标本,充分振荡标本管,将粘液打碎。置4℃待其自然沉淀5min~10min,取上清5mL。上清液可直接接种或低温保存。

鼻咽漱液或抽取液:用干净灭菌过的毛细吸管,在无菌条件下反复吹打收集的溶液,以便打碎黏液,同样置4℃待其自然沉淀5min~10min,取上清5mL。上清液可直接接种或低温保存。

组织标本的处理,取肺组织标本放至平皿中,用灭菌生理盐水清洗肺组织2遍~3遍,研磨成组织悬液,配置10%~20%的组织悬液,2000r/min离心10min,加入抗生素,取上清直接接种。

注:如采样液中尚未加抗菌素,应在接种前补加,用量同上前,混匀后置4℃过夜或室温作用2h以

上方可接种。

G.2 血清标本的采集、处理与保存

血清标本多用于流感暴发时的血清学核实诊断。血清标本采集应该包括急性期和恢复期双份血清,单份血清一般不能用作诊断。急性期血样应尽早采集,可在采集病毒分离标本时同时采集,并且不能晚于发病后 7d。恢复期血清则在发病后 2 周~4 周采集,一般采集空腹血。

- a) 取一根至少能装 3mL 以上,干净和灭过菌的血清管做好标记,并进行登记,登记的内容包括:医院名称,患者姓名,性别,标本号,急性期(acute, A)或是恢复期(convalescence, C),采样日期(年,月,日)。
 - b) 从患者手臂静脉采 2mL 血,放入准备好的上述血清管中。
 - c) 然后置室温数小时待血液完全凝固。
 - d) 1 500r/min~2 000r/min 离心 10min,收集血清于 1.5mL 无菌管中,做好标记。
 - e) 血清可置 4℃ 存放 1 周,存放超过 1 周需置 -20℃ 或以下保存。
-

中 华 人 民 共 和 国
卫 生 行 业 标 准
流 行 性 感 冒 诊 断 标 准
WS 285—2008

*

出版发行：人民卫生出版社（中继线 010-67616688）
地 址：北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼
邮 编：100078
网 址：<http://www.pmph.com>
E - mail：pmph@pmph.com
购书热线：010-67605754 010-65264830
印 刷：北京新丰印刷厂
经 销：新华书店
开 本：880×1230 1/16 印张：2.5
字 数：73 千字
版 次：2008 年 9 月第 1 版 2008 年 9 月第 1 版第 1 次印刷
书 号：14117·214
定 价：23.00 元

版权所有，侵权必究，打击盗版举报电话：010-87613394

（凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换）



WS 285—2008