ICS 11.020
C59
23225—2008

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 284—2008

人感染高致病性禽流感诊断标准

Diagnostic criteria for human infection with avian influenza virus

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、缩略语 …… 1
3　诊断依据 …… 2
4　诊断原则 …… 3
5　诊断标准 …… 3
6　鉴别诊断 …… 3
附录 A(规范性附录)人禽流感病毒分离培养和鉴定方法 …… 4
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(资料性附录)人禽流感病毒核酸检测方法 …… 21
附录 E(规范性附录)免疫荧光法检测人禽流感病毒抗原 …… 26
附录 F(资料性附录)人禽流感的病原学、流行病学与临床表现特点 …… 27

前　言

根据《中华人民共和国传染病防治法》制定本标准。

本标准的附录A、附录B、附录C、附录E是规范性附录，附录D、附录F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、北京大学人民医院。

本标准主要起草人：郭元吉、余宏杰、高占成、舒跃龙、冯子健、杨维中。

人感染高致病性禽流感诊断标准

1 范围

本标准规定了人感染高致病性禽流感的诊断依据、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及其工作人员对人感染高致病性禽流感的诊断、报告。

2 术语和定义、缩略语

2.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1.1 人禽流感 human-avian influenza

由禽流感病毒中某些亚型病毒(目前报道的有 H5、H7、H9 及 H10 亚型病毒中的一些毒株)所引起的急性呼吸道传染病,它所表现出的临床症状随所感染病毒的亚型不同而异:从结膜炎、轻微的上呼吸道卡他症状至出现急性呼吸窘迫综合征和多器官功能衰竭,甚至导致死亡。

2.1.2 高致病性禽流感 highly pathogenic avian influenza, HPAI

甲型流感病毒基因组具有宿主特异性,并不是所有禽流感病毒都能引起禽流感。根据对禽致病性的强弱,禽流感病毒可分为高致病性、低致病性和非致病性。但是这种致病性的划分仅对禽类而言。

按照国际兽医局(Office International des'Epizooties, OIE)的判断标准:静脉内致病指数(intravenous pathogenicity index, IVPI)2.3～3.0(波动在 1.74～3.0)为高致病性;1.2～1.4 为低致病性;0(波动在 0～1.0)为非致病性。同时还可用一种快捷的方法来测定:接种禽流感病毒于无特殊病原(special pathogen free, SPF)鸡胚,收获其新鲜尿囊液,HA 滴度>1∶16,并细菌培养为阴性;至少静脉注射 8 只 4～8 周龄的 SPF 鸡,0.1mL/只;对照组两只鸡同部位注射 0.1mL 灭菌过的生理盐水。如果注射后 8d 内,实验组 75%或以上鸡死亡而对照组无死亡,为高致病性的;如只有少数鸡死亡为低致病性的;无死亡为非致病性的。

除此而外,还有两个参考指标:一个为禽流感病毒颗粒血凝素蛋白重链(HA1)与轻链(HA2)之间连接肽碱性氨基酸的多寡,多的为高致病性,寡的为低或非致病性;另一个是在缺乏胰蛋白酶条件下,在细胞培养中能形成蚀斑的为高致病性,不能形成蚀斑的为低或非致病性。

2.1.3 流感样病例

发热(体温≥38℃),伴咳嗽或咽痛之一者,而缺乏其他的实验室确定诊断依据。

2.2 缩略语

以下缩略语适用于本标准。

WHO: World Health Organization, 世界卫生组织

HPAI: highly pathogenic avian influenza, 高致病性禽流感

OIE: Office International des'Epizooties, 国际兽医局

IVPI: intravenous pathogenicity index, 静脉内致病指数

SPF: special pathogen free, 无特殊病原

ARDS: acute respiratory distress syndrome, 急性呼吸窘迫综合征

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction, 逆转录聚合酶链式反应

HI: hemagglutination inhibition test, 红细胞凝集抑制试验

MN: microneutralization test, 微量中和试验

SARS:severe acute respiratory syndrome,严重急性呼吸综合征,传染性非典型肺炎

IFA:immunofluorescence assay,免疫荧光试验

3 诊断依据

3.1 流行病学史

3.1.1 发病前7d内,接触过禽,尤其是病禽、死禽(包括野生禽、家禽),或其排泄物、分泌物及7d内下的蛋,或暴露于其排泄物、分泌物污染的环境。

3.1.2 发病前14d内,曾经到过有活禽交易、宰杀的市场。

3.1.3 发病前14d内,与人禽流感疑似、临床诊断或实验室确诊病例有过密切接触,包括与其共同生活、居住,或护理过病例等。

3.1.4 发病前14d内,在出现异常病、死禽的地区居住、生活、工作过。

3.1.5 高危职业史:从事饲养、贩卖、屠宰、加工、诊治家禽工作的职业人员;可能暴露于动物和人禽流感病毒或潜在感染性材料的实验室职业人员;未采取严格的个人防护措施,处置动物高致病性禽流感疫情的人员;未采取严格的个人防护措施,诊治、护理人禽流感疑似、临床诊断或实验室确诊病例的医护人员。

3.2 临床表现(参见附录F)

3.2.1 H7亚型人禽流感

主要表现出结膜炎和上呼吸道卡他症状。

3.2.2 H9N2亚型人禽流感

类似普通人流感,通常仅有轻微的上呼吸道感染症状。

3.2.3 H10N7亚型人禽流感

仅有轻微的上呼吸道感染症状。

3.2.4 H5N1亚型人禽流感

a) 潜伏期一般为1d~7d,通常为2d~4d。患者呈急性起病,早期表现类似普通型人流感。主要为发热,体温大多持续在39℃以上,可伴有流涕、鼻塞、咳嗽、咽痛、头痛、肌肉酸痛和全身不适。部分患者可有恶心、腹痛、腹泻、稀水样便等消化道症状。

b) 重症患者病情发展迅速,几乎所有患者都有临床表现明显的肺炎,可出现急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、肺出血、胸腔积液、全血细胞减少、多脏器功能衰竭、休克及瑞氏(Reye)综合征等多种并发症。可继发细菌感染,发生败血症。

c) 外周血象检查白细胞总数一般正常或降低。重症患者多有白细胞总数及淋巴细胞减少,并有血小板降低。

d) 体征:重症患者可有肺部实变体征等。

e) 胸部影像学:病初病变形态可为斑片状、大片状、多片的、融合的单侧或双侧肺实变,肺实质渗出阴影浅淡,呈絮状、磨玻璃样密度,重症患者病变进展迅速,1d~2d内范围扩大,密度加深呈肺实变密度,边缘模糊,病变内可见"空气支气管征",病变多表现为两肺弥漫性分布,没有明显的以段或叶划分的特征,相当部分病例演变为"白肺"样改变,可合并胸腔积液。

3.3 实验室检测

3.3.1 病毒分离

病毒分离阳性并经亚型鉴定确认(见附录A)。

3.3.2 血清学检查

3.3.2.1 患者恢复期血清进行红细胞凝集抑制(hemagglutination inhibition,HI)试验(见附录B)。

3.3.2.2 微量中和试验(microneutralization test,MNT),禽流感病毒(HA)(H5或H7或H9等亚型)抗体阳性(HI抗体或中和抗体效价≥80)(见附录C,不含≥55岁者)。

3.3.2.3　恢复期血清抗体滴度比急性期血清高4倍或以上(见附录B和附录C)。

3.3.3　**病毒抗原及核酸检测**

在患者的临床标本检查到人禽流感病毒特异性的核酸(参见附录D)或特异的H亚型抗原(见附录E)。

4　诊断原则

人禽流感病例的诊断需要结合病例的流行病学史、临床表现和实验室检测，综合进行判断。流行病学史是诊断的重要条件，但不是必要条件。确诊病例需要严格的病毒学或血清学检测证据，尤其是恢复期血清抗体滴度比急性期血清高4倍或以上的证据。为早期、及时发现人禽流感病例，医务人员应详细询问患者的流行病学史，根据流行病学史和临床表现可作出人禽流感疑似病例诊断。

5　诊断标准

5.1　人禽流感疑似病例

具备3.1中任何一项，且无其他明确诊断的肺炎病例。

5.2　人禽流感临床诊断病例

具备以下任何一项者：

5.2.1　具备3.1中任何一项加3.2中任何一项，且符合3.3.2.1、3.3.2.2中任一项。

5.2.2　诊断为人禽流感疑似病例，无法进一步获得其临床标本进行实验室确诊，而与其有共同暴露史的其他人已被诊断为人禽流感确诊病例，并且没有其他疾病确定诊断依据者。

5.3　人禽流感确诊病例

具备以下任何一项者：

5.3.1　具备3.2中任一项加3.3.1。

5.3.2　具备3.2中任一项加3.3.2。

5.3.3　具备3.2中任一项加3.3.3中任一项，并经两个不同实验室所证实。

5.4　人禽流感排除病例

具备以下任何一项的人禽流感疑似或临床诊断病例：

5.4.1　患者禽流感病毒分离阴性(3.3.1)或病毒抗原及核酸检测阴性(3.3.3)，且恢复期血清比急性期血清的抗体滴度没有4倍或以上增高；

5.4.2　死亡患者未采集到急性期和恢复期双份血清，尸检肺组织病毒分离阴性(3.3.1)或病毒抗原及核酸检测阴性(3.3.3)，并经两个不同实验室所证实；

5.4.3　有明确的其他疾病确诊依据。

6　鉴别诊断

临床上应注意与人流感、上呼吸道感染、细菌性肺炎、传染性非典型肺炎(severe acute respiratory syndrome，SARS)、传染性单核细胞增多症、巨细胞病毒感染、汉坦病毒肺综合征、衣原体肺炎、支原体肺炎和艾滋病合并的各种肺部感染等疾病进行鉴别诊断。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）
人禽流感病毒分离培养和鉴定方法

A.1 人禽流感病毒的分离培养

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：生物安全三级实验室，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）T-75 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 000μg/mL 硫酸链霉素），分装后保存于－20℃；
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·4Na），分装后保存于－20℃；
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%的酒精。

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-谷氨酸的完全型 D-MEM 培养液的准备（用于 MDCK 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；100μg/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 的完全型 D-MEM 液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 细胞瓶单层培养为例，叙述 MDCK 细胞的培养程序。如果细胞瓶的规格有变，MDCK 细胞悬液的量浓度必须做相应的调整。用于细胞培养的培养基、EDTA-胰酶等，应先放置 37℃水浴预热。

a）首先将细胞培养瓶中的培养液弃去，加入 5mL 在 37℃水浴中预热的 EDTA-胰酶。
b）温和地摇动细胞瓶 1min，使 EDTA-胰酶均匀分布在整个细胞薄层。然后用移液管吸去 EDTA 胰酶。
c）重新加入 5mL 在 37℃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整个细胞薄层，37℃孵育细胞瓶直至细胞从塑料表面分离（5min～10min）。必要时可以摇动或吹打来分离细胞。加入 1mL 胎牛血清来中和残余的胰酶活性。

e）加 9mL 完全型 D-MEM，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，该培养液含终浓度为 10%的胎牛血清。（细胞悬液的浓度大约为每 mL 含 10^5 个细胞）。

g）每个 T-25 细胞培养瓶加 6mL(600 000 个细胞)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 细胞悬液数目可长成成片生长的细胞。

h）于 37℃培养箱里培养细胞，每天观察细胞状态。

A. 1. 1. 1. 5　细胞的冻存

a）细胞冻存材料

1）成片的 MDCK 细胞：细胞生长良好存活率高，成片率达 80%～90%；

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：消化过程同细胞培养的消化；

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. 6　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，需要数日或继续传代一至二代，其细胞生长或细胞特性表现才会恢复正常。

a）材料

1）37℃恒温水浴箱。

2）细胞生长液

完全型 D-MEM　9mL

胎牛血清　1mL

3）T-25 培养瓶，无菌移液管。

4）70%～75%的酒精。

5）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%的酒精擦拭，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%的酒精擦拭保存管外部，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. 7　质量控制

MDCK 细胞代数的增加会降低其对呼吸道病毒的敏感性。因此实验室应保持低代次的细胞株在液氮中。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，在间隔期可以用已知滴度的阳性质控病毒来检验 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污染。

A. 1. 1. 1. 8　MDCK 细胞系的敏感性的检测

选择已知滴度的阳性质控人禽流感病毒，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 $TCID_{50}$ 测定。如果测试的 $TCID_{50}$ 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　人禽流感病毒的 MDCK 细胞分离标准操作规程

A. 1. 1. 2. 1　试验材料

a) T-25 细胞瓶已经 75%～90%成片的 MDCK 细胞；

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；

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) 处理好的临床样品 0.5mL；

h) T-25 培养瓶用于病毒培养；

i) 1mL 无菌移液管；

j) 10mL 无菌移液管。

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

a) 细胞培养液

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 不含血清的 D-MEM 液之中加 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　人禽流感病毒细胞分离程序

所有有关人禽流感病毒分离的操作都应在生物安全三级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 经加抗生素等处理过的临床样品置于细胞培养瓶中；

3) 37℃吸附 1h～2h；

4) 吸附后，Hank's 液清洗细胞 1 次～2 次，然后加 6mL 含 2μg/mL TPCK-胰酶的病毒生长液于细胞培养瓶中；

5) 放置于 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 滴度≥8 的可进行病毒的鉴定(具体方法参见人禽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，继续传代 1 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≤8 的细胞分离物继续进行细胞传代，直至 HA≥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。或用 HI 法对 H 亚型进行鉴定。

A. 1. 2　鸡胚分离人禽病毒方法

A. 1. 2. 1　试验材料

a）9 日龄～11 日龄无特殊病原(SPF)鸡胚；

b）照卵灯；

c）70%～75%酒精；

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　人禽流感病毒的鸡胚分离程序

所有有关人禽流感病毒分离的操作都应在生物安全三级实验室的生物安全柜中进行，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。进入生物安全三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

血管：活胚血管清晰；死胚模糊，成淤血带或淤血块。

胎动：活胚明显的自然运动，但是大于 14d 的胎动则不明显；死胚无胎动。

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 10 个鸡胚；

b）用 70%～75%酒精消毒鸡胚，在气室端钻孔；

c）用注射器吸 200μL 处理过的临床标本，装上 16 号针头；

d）将鸡胚垂直放置，将 200μL 呼吸道标本注入鸡胚尿囊腔内；

e）用同一注射器和针头将同一标本依上法接种剩余鸡胚；

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）35℃培养箱培养。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　鸡胚接种和收获

于培养后 24h、36h、48h、60h、和 72h 分别取两枚鸡胚收获鸡胚的尿囊液。

a）鸡胚在收获前应 4℃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%酒精消毒鸡胚顶部；

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；

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(具体方法参见人禽流感病毒的鉴定技术中的 HA 试验部分)，HA≥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 1 次。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≤8 的鸡胚分离物继续进行鸡胚传代，直至 HA≥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-Time RT-PCR 方法进行核酸检测。也可用 HI 法对 H 亚型进行鉴定。

A.2 人禽流感病毒鉴定

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。用于检测人禽流感病毒滴度的红细胞凝集试验也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试验是目前最常用的一种鉴定人禽流感病毒的方法。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新，最好包括当时的疫苗株和流行代表株。HI 中所用的血清必须经特殊处理以清除非特异性抑制素及非特异性凝集素。

A.2.1.1 生物安全要求

生物安全要求及个人防护要求与人禽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 人禽流感病毒(H5、H7、H9)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、豚鼠、马或人“O”型红细胞)；

b) 磷酸盐缓冲液(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) 无菌纱布；

7) 96 孔微量板：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) 磷酸盐缓冲液(PBS)，0.01mol/L，pH7.2

25×PBS 缓冲液：2.74g Na_2HPO_4，0.79g NaH_2PO_4 加去离子水至 100mL。

b) 工作液配制：25×PBS 缓冲液完全溶解后，取 40mL 25×PBS 液，加入 8.5g NaCl，加去离子水至 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，保存期为 3 周。

c) 生理盐水：0.85% NaCl

20×母液：170g NaCl 加入 1 000mL 去离子水，高压灭菌。

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，保存期为 3 周。

d) 阿氏液配制：

20.5g 葡萄糖

8.0g 枸橼酸钠

4.2g NaCl

0.55g 枸橼酸

加去离子水至 1 000mL，用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调整 pH 至 6.1±0.1，用 0.22μm 的细菌滤器过滤。

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) 加入等容量的 PBS 液体洗涤，充分混匀，1 200r/min 离心 5min，弃上清；

c) PBS 液体洗涤三次。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%。人禽流感病毒红细胞凝集试验各项条件比较见表 A.1。

表 A.1 人禽流感病毒红细胞凝集试验各项条件比较

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	细胞沉积成泪滴状，倾斜时细胞向下流	细胞沉积成泪滴状，倾斜时细胞向下流	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(16h～18h)；

c) 56℃水浴加热 30min，灭活 RDE 残余活性。

A.2.1.5.2 处理后血清中有无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 25μL PBS；

b) A1 到 A5 各加 50μL 处理后的血清，A6 加 50μL PBS；

c) 用多道加样器从 A1 行开始，各孔取 25μL 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 25μL；

e) 每孔补加 25μLPBS；

f) 每孔加入 50μL 红细胞悬液，混匀；

g) 置室温(22℃～25℃)孵育 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) 1 200r/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 50μL PBS。

c) A1～G1 各加 100μL 标准抗原或待检病毒。H1 加 100μL PBS 作为阴性对照。

d) 用多道加样器从第一列各孔分别取 50μL 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 50μL。

e) 每孔加入 50μL 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，观察血凝现象并记录结果。

g) 红细胞凝集以“+”记录；只有部分红细胞凝集记录为“+/−”；无凝集记录“−”。红细胞凝滴度的判定以出现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 个凝集单位的抗原

a) 一个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 个凝集单位/25μL 的抗原病毒量；

b) 制备 4 个单位凝集凝抗原时：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 25μL 抗原，那么测定一份血清需 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) 其次，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 个血凝集单位的稀释度。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；

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 个凝集单位抗原需复核滴定：取 50μL 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 50μL 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 50μL 病毒含有 8 个凝集单位，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 50μL 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 50μL 病毒仅含有 4 个凝集单位，病毒量需要加倍。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 25μL PBS。

b) 常用的 3 种人禽流感抗血清

1) 抗 A(H5N1)亚型血清；

2) 抗 A(H7N7)亚型血清；

3) 抗 A(H9N2)亚型血清；

4) A1 至 A3 及 A6 至 A8 分别加入上述处理好的标准血清，每孔加入 50μL；A4、A5 各加 50μL PBS 作为阴性对照。

c) 用多道加样器从 A 行分别取 25μL 血清，由 A 行至 H 行做 2 倍系列稀释血清，弃去 H 行 25μL。

d) A1 至 H5 每孔加入 25μL 待检病毒液 1(4 个凝集单位的抗原)。

e) A7 至 H10 每孔加入 25μL 待检病毒液 2(4 个凝集单位的抗原)。

f) 对照孔(A4、A5)不加抗原，用 25μL PBS 代替。

g) 混匀，置室温 30min，观察红细胞凝集抑制试验结果。

h) 另取血凝板，同样做标准血清对照。

当特定的抗体与相应的血凝抗原结合后，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(无或部分红细胞凝集被抑制)，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时有交叉抑制，但当两种标准血清对本身病毒抗原抑制效价相同时，其中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，可以判定为此种人禽流感病毒。

A.2.1.5.7 红细胞凝集抑制试验注意事项

a) 血红细胞凝集抑制试验必须用4个凝集单位/25μL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从吸附的红细胞表面游离下来很快，这时应将反应板放置4℃，并注意观察时间；

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 确定待检病毒的血凝抑制试验

包括以下对照

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.2.2 甲型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-酮苷连接。世界卫生组织国际流感参照和协作中心，于1973年公布了国际上统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。

a) 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。

b) 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 pyrruvic acid)。

c) β-甲醛丙酮酸经硫代巴比妥酸的作用形成生色团。

d) 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，常使用单特异性血清(只针对NA)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，pH 5.9)

甲液：4mmol/L　　磷酸氢二钠

乙液：4mmol/L　　磷酸二氢钠

丙液：6mmol/L　　氯化钙

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。

注：常常加入丙液会出现沉淀，故一般不加丙液。

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 加入至 100mL 去离子水中，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。

h）煮锅及玻璃制品

A.2.2.2 神经氨酸酶活性及活性抑制试验操作步骤

A.2.2.3 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 50μL/管，在底物对照管中加入 50μL 生理盐水。

b）每个试管加入 50μL PBS(pH 5.9)混匀，每管中加入 100μL 底物溶液(胎蛋白)，充分混匀后 37℃水浴 16h～18h。

c）从水浴中取出试管，放置室温冷却，每管中加入 100μL 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℃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到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。

注：准确的方法是用直线回归公式计算出 A 值为 0.5 时，病毒悬液的浓度。

A.2.2.4 神经氨酸酶活性抑制测定

a）测定血清作 0.5lg(一个 0.5lg 稀释为 1∶316，它的近似值为 1∶32)稀释，每个稀释度取 50μL 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，50μL/管。混匀，37℃水浴孵育 1h。

c）从水浴中取出试管，在每个试管中加入 100μL 底物溶液，混匀，37℃水浴 16h～18h。

d）从水浴中取出试管，余下步骤同活性测定的 c)～i)。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.1)。

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

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 3～4 个点，使其中 1～2 点剩余酶活性不到 50%，而其他 1～2 点剩余酶活性大于 50%，在这 3～4 个点中划一条直线，同样使这条直线一侧的 1～2 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。

准确的方法为：用直线回归公式计算能抑制 50%酶活性的血清最高稀释度的倒数。

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：生物安全三级。

如果采用灭活的人禽流感病毒进行血清学诊断时，可以在生物安全二级实验室里进行操作，并应当遵守生物安全二级实验室的有关生物安全的规定。

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：配制方法见前章。

c）根据实际需求选择 H5 或 H7 或 H9 的标准抗原和抗体

A(H5N1)亚型代表毒株标准抗原

A(H7N7)亚型代表毒株标准抗原

A(H9N2)亚型代表毒株标准抗原

d）制备 4 个血凝单位抗原：配制方法见附录 A 中相应部分。

B.3 实验步骤

a）必须设立血清对照板；

b）除 A 行外，每孔加入 25μL PBS 缓冲液；

c）按以下顺序，再 A 行各孔加入处理过的血清 50μL

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(H5N1)亚型标准抗血清

A10：A(H7N7)亚型标准抗血清

A11：A(H9N2)亚型标准抗血清

d）用多道加样器从 A 行各孔分别吸取 25μL 血清，由 A 行至 H 行进行 2 倍稀释血清，弃去 H 行最后 25μL；

e）红细胞凝集抑制试验板：每孔加入 25μL 新配制的 4 个凝集单位的人禽流感标准抗原；

f）血清对照板每孔加入 25μL 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 50μL 红细胞悬液，混匀；

j）室温孵育 30min；

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。试验由两个阶段组成：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-抗体混合培养阶段，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。中和试验以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 HA 蛋白结合，从而使病毒失去吸附、融合、脱壳的能力，并失去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最可靠的方法之一。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抗原性变化，又能反映机体的抗病毒水平。③该方法使用感染性病毒，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，费时费力。结合感染细胞快速鉴定方法，改进后的中和试验可以在两天内完成，并且可以一次测定较大量血清样品。改进的中和试验是通过 ELISA 来测定细胞内病毒颗粒 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：人禽流感病毒抗体水平检测时，应在生物安全三级实验室里进行，防护要求与三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（$TCID_{50}$）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

1）MDCK 细胞：低代数的 MDCK 细胞（小于 25 代）

2）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　　100×抗生素

3）TPCK-胰酶(使用终浓度为 2μg/mL)

4）固定液：80%的丙酮，4℃预冷，即配即用。

400mL　　丙酮

100mL　　PBS，pH7.2

C.3.2　ELISA 实验材料

a）抗体 1：鼠抗甲型流感病毒核蛋白单克隆抗体

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 pH 5.0 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%双氧水)

即配即用

磷酸盐-枸橼酸缓冲液，pH 5.0

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)

f）终止反应液：0.5mol/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、抗血清和细胞等。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

含阳性和阴性对照。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）阴性血清对照

1）阴性一般来自于已知或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）阳性血清对照

用已知含有特异性抗体的血清。

C.4.2　病毒和正常细胞对照

a）病毒和正常细胞对照

病毒对照一般设立4个孔，即将细胞与100 $TCID_{50}$的病毒进行混合培养。同时设立4个孔为正常细胞对照，即将细胞与病毒稀释液进行混合培养。

病毒细胞对照：50μL病毒稀释液＋50μL病毒＋100μL MDCK细胞

正常细胞对照：100μL病毒稀释液＋100μL MDCK细胞

b）病毒工作液滴度检查

一般第1孔加入含有200 $TCID_{50}$的100μL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：50μL 2倍系列稀释病毒液（第1孔为100 $TCID_{50}$）＋50μL病毒稀释液＋100μL 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——$TCID_{50}$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，红细胞凝集试验测定病毒的存在并细菌培养呈阴性，分装后－70℃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146μL 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100μL病毒液，每个稀释度重复4孔。

季节性流感病毒一般在胰酶存在的条件下才能在MDCK细胞中很好增殖，因此病毒稀释液中需加入终浓度为2μg/mL TPCK-胰酶。而高致病性禽流感病毒在无胰酶存在条件下可在MDCK细胞中增殖，因此在细胞维持液中不必加入任何TPCK-胰酶。

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（162cm^2的细胞培养瓶）37℃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，在细胞计数板上计数细胞数量。

用病毒稀释液将细胞稀释成1.5×10^5细胞/mL。

加100μL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37℃，5% CO_2孵箱中培养18h～20h。

C.5.1.4 测定组织细胞半数感染剂量（$TCID_{50}$）

弃去微量培养板中的细胞液，250μL PBS洗细胞一次。

弃去PBS（不要让细胞干燥），每孔加入100μL固定液。

覆盖微量培养板，于室温固定细胞10min。

弃去固定液，让微量培养板室温干燥。

用ELISA检测细胞感染（参见ELISA部分）。

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。

若含有不同稀释度病毒孔平均OD值是正常细胞对照孔平均OD值2倍以上，则判断为病毒生长

阳性。

根据 Reed 和 Muench 方法对病毒滴度进行计算，计算出病毒的 $TCID_{50}$/100mL。

在进行中和试验前，稀释病毒液，使之 50μL 中含有 100 $TCID_{50}$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 10μL 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) 人血清测定前需 56℃加热灭活 30min；

c) 每孔中加入 50μL 病毒稀释液；

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

e) 加入 10μL 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∶1 280。

C.5.2.2 病毒的准备

a) 稀释病毒至 100 $TCID_{50}$/50mL。根据病毒特性选择是否在稀释液中加入 TPCK-胰酶(大约 5mL/每板)。

b) 除细胞对照孔外，每孔加入 50μL 病毒工作液。

c) 加入 50μL 病毒稀释液于细胞对照孔。

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

e) 摇匀病毒-血清混合物，放 37℃培养箱作用 2h。

C.5.2.3 MDCK 细胞的准备

加 100μL 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，37℃，5% CO_2 培养箱孵育 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，从而达到良好的试验效果。

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 100μL/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、敏感、快速和简易等优点。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.5.4.1 ELISA 试验操作步骤

a) 用 250μL/次 PBS 洗涤微量培养板 3 次，以去除残余的丙酮；

b) 用封闭液 1∶4 000(或最佳稀释度)稀释抗体 1(鼠抗甲型流感病毒 NP 单克隆抗体)；

c) 每孔加入稀释后的抗体 1，1 000μL，室温作用 1h；

d) 用 250μL/次洗涤液洗涤板 4 次以除去游离的抗体 1；

e) 用封闭液 1∶2 000(或是最佳稀释度)稀释抗体 2(HRP 标记的羊抗鼠 IgG);

f) 每孔加入稀释后的抗体 2,100μL,室温作用 1h;

g) 用 250μL 洗涤液洗涤板 6 次以去除游离的抗体 2;

h) 每孔加入 OPD 底物 100μL(10mg OPD+20mL 枸橼酸缓冲液+10μL 30%双氧水,即用即配);

i) 室温放 10min 左右显色,直至细胞阳性对照孔变成橙黄色,而正常细胞对照孔尚未变色时,每孔加入 0.5mol/L 硫酸 100μL 终止反应;

j) 用酶标仪(490nm)读出每孔 OD 值。

C.5.4.2 结果判定

公式(C.1)用于判定中和反应结果。

(细胞阳性对照平均 OD 值—细胞阴性对照平均 OD 值)/2+细胞阴性对照平均 OD 值=X …… (C.1)

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.5.5 流感病毒中和试验的质量控制

a) 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;

b) 病毒工作液滴度检测孔,前 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;

c) 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;

d) 每次测定过程中,阳性血清对照的中和抗体滴度应该在 2 倍以内波动。

C.5.6 操作注意事项

a) 待检人血清需 56℃灭活 30min,动物血清需 RDE 处理。

b) 待检血清需要重复测定时,应分装后冻存,以免反复冻融。

c) 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。

d) MDCK 细胞应处于对数生长期,严禁细胞过度生长或代数过高。因此,必须在 10 代前进行细胞冻存,保存于液氮中备用。

e) 牛血清中有中和病毒感染力的作用物资,试验过程中切勿将细胞培养液与病毒稀释液混淆使用。

f) 病毒与抗血清混合,常规采用 37℃作用 1h,该试验采用 37℃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。

g) 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,以期获得最佳稀释度。

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 来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血凝活性来代替 ELISA 方法,但细胞培养时间一般从 18h～24h 增至 2d～4d。

C.6 病毒 $TCID_{50}$ 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 $TCID_{50}$ 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

阳性孔累计数由下向上累积(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)×100

注 4:计算距离比

距离比例=(大于 50%的阳性百分比−50)/(大于 50%的阳性比−小于 50%的阳性百分比)

=(75−50)/(75−0)=0.3

$TCID_{50}$ 的对数=大于 50%的阳性百分比的最高稀释对数+距离比例×稀释系数的对数

=5+0.3×0.5=5.15

$TCID_{50}$=10−5.15/100μL

100 $TCID_{50}$/100μL=10−3.15

100 $TCID_{50}$/50μL=10−3.15/2=10−3.15+0.3=10−2.8=1∶1 631

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
（资料性附录）
人禽流感病毒核酸检测方法

D.1 RT-PCR 快速诊断方法

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 产物达到扩增的效果。

D.1.1 生物安全要求

进行疑似人禽流感 RT-PCR 快速检测时可以在生物安全二级实验室里进行，对于患者呼吸道标本的核酸提取可以在生物安全二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（如：德国 QIAGEN 公司以及罗氏公司的病毒核酸提取试剂盒）；
b）无菌 1.5mL 离心管；
c）10μL、20μL、200μL、1 000μL 的移液器及移液器枪头；
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 500μL RLT；
b）取采样液（鼻拭子、咽拭子、胸水等）或病毒培养物（鸡胚尿囊液或细胞培养液）100μL，加入上述 Eppendorf 管中；
c）加 5μL β-巯基乙醇，充分混匀；
d）加 600μL 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 600μL）吸入于滤柱中，12 000r/min 离心 15s，弃收集管中的离心液；
g）于滤柱中加入 700μL RW1，12 000r/min 离心 15s；
h）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 500μL RPE，12 000r/min 离心 15s 弃收集管中液体；
i）滤柱放回收集管上，于滤柱中加入 500μL RPE，13 000r/min～14 000r/min 离心 2min；
j）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30μL～50μL 无 RNA 酶的水，室温静置 1min～3min；
k）12 000r/min 离心 1min，弃滤柱。收集的离心液即为提取病毒的 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）所有用过的吸头、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

主要有两种试验方法，一种方法是使用 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。第二种为传统的方法，即第一步先逆转录合成 cDNA，第二步再进行 PCR 反应。

禽流感病毒核酸快速检测检测其血凝素和神经氨酸酶基因片断，常用引物如下。由于禽流感病毒的血凝素和神经氨酸酶基因的多变性，应注意根据实际情况及时更新引物序列。

H5 亚型的 HA 片段的引物序列如下，PCR 产物扩增片段大小为 219bp。

H5HA-F920　　5'-GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC-3'

H5HA-R1138　　5'-CTC CCC TGC TCA TTG CTA TG-3'

H7 亚型的 HA 片段的引物序列如下，PCR 产物扩增片段大小为 183bp

H7HA-F245　　5'-CCCAATGTGAYCAATTCCT-3'

H7HA-R428　　5'-GCTCCATTRGTTCTTATTCC-3'

H9 亚型的 HA 片段的引物序列如下，PCR 产物扩增片段大小为 383bp

H9HA-F426　　5'-GAA TCC AGA TCT TTC CAG AC-3'

H9HA-R808　　5'-CCA TAC CAT GGG GCA ATT AG-3'

AN1 亚型的 NA 片段的引物序列如下，PCR 产物扩增片段大小为 615bp

AN1-F550　　5'-TTG CTT GGT CAG CAA GTG C-3'

AN1-R1164　　5'-CAG TCA CAC CAT TTG GA TCC-3'

AN2 亚型的 NA 片段的引物序列如下，PCR 产物扩增片段大小为 280bp

AN2-F1121　　5'-CGC TAC GGT TAT GAG ACT TTC AG-3'

AN2-R1401　　5'-ATA TTC GCC CCA TCA GGC CAT GAG-3'

注：引物应随病毒株不同而异。

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）一步法 RT-PCR 试剂盒，以下以 QIAGEN One Step RT-PCR Kit 为例介绍操作方法。

b）RNase inhibitor　　40u/μL

c）上游引物　　20pmol/μL

　下游引物　　20pmol/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
10mM 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 e，循环 34 次
9）72℃　　10min
10）4℃　　保存

d）PCR 产物检测

琼脂糖凝胶配制：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 5μL PCR 产物，与 1μL 6×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 5μL 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 30min～40min。

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 $KMnO_4$，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 NaOH，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，如，Catalog＃ M5101 Paromeg；
b）5×RT Buffer；
c）2.5mmol/L dNTP；
d）Rnase inhibitor　　40u/μL；
e）上游引物　　200ng/μL；
f）下游引物　　200ng/μL；
g）无 RNA 酶的水　　(Rnase Free Water)；
h）Ex-Taq 酶　　(5u/μL DRR 001A 250u)或 Taq DNA 聚合酶；
i）10×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 模板在核酸提取区)

无 RNA 酶的水	6.8μL
5×RT Buffer	4μL
2.5mmol/L dNTP	2μL
上游引物	1μL
Rnase inhibitor	0.2μL
逆转录酶	1μL
RNA 模板	5μL(培养病毒 RNA 为 5μL；原始标本应为 10μL，H_2O 为 1.8μL)

总量:20μL

将上述反应液混匀,42℃水浴作用 1h。然后 94℃ 3min,放置冰上(下步 PCR 反应或−20℃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	35.5μL
10×PCR Buffer	5μL
2.5mmol/L dNTP	2μL
上游引物	1μL
下游引物	1μL
Ex-Taq 酶	0.5μL
cDNA 模板	5μL

总量:50μL

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供参考,如果引物更换,相应的反应条件需要做适当调整。

94℃	3min
94℃	40s
52℃	40s
72℃	2min(应根据扩增片段大小适当修改延伸时间)

返回第 2 部,循环 30 次

72℃	7min
4℃	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 PCR(real-time 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。

D.2.2 常用方法主要有 TaqMan 荧光探针和 SYBR 荧光染料

D.2.2.1 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.2.2.2 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.2.3 相关的几个概念

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。

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。

相关概念的图示见图 D.1。

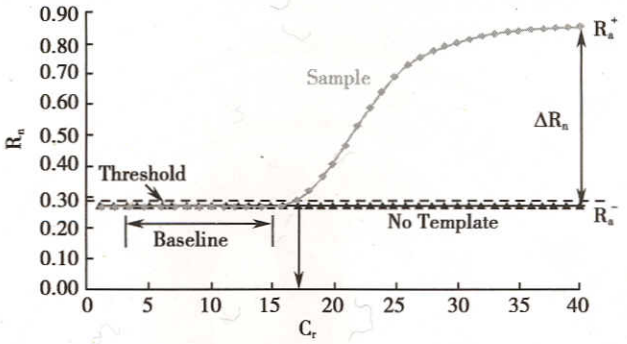

图 D.1　样品 Real-Time RT-PCR 反应标准曲线图

D.2.4　实验试剂

a) 引物:A 型和 B 型流感通用引物;H1、H3、H5、H7 和 H9 亚型引物;

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(非感染性体外转录 RNA);

g) 阴性对照。

D.2.5　试验操作步骤

核酸提取方法同 RT-PCR 的快速诊断。

附 录 E
（规范性附录）
免疫荧光法检测人禽流感病毒抗原

E.1 原理

人禽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人禽流感病毒抗原，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 10μL 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 10μL 鼠抗人禽流感相应亚型的特异性抗体(1∶1 000)；
f）玻片在湿盒中 37℃放置 45min；
g）pH7.2 PBS 洗涤 1min；
h）室温晾干载玻片；
i）每孔加入 10μL 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℃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×荧光显微镜下检查。

E.2.3 结果判断

阳性信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。

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

附 录 F
（资料性附录）
人禽流感的病原学、流行病学与临床表现特点

禽流行性感冒，简称禽流感（avian influenza or bird flu）为一种由禽流感病毒引起的动物传染病，主要发生在禽，也可发生在哺乳类动物，至今在人间仅有散发病例。

人禽流感（human-avian influenza）是一种由禽流感病毒中某些亚型病毒的一些毒株所引起的人急性呼吸道传染病，其临床表现随所感染病毒亚型不同而异，目前能够感染人的禽流感病毒主要有 H5、H7、H9 亚型中一些毒株，H7 亚型病毒主要引起结膜炎或上呼吸道症状；H9N2 亚型病毒同普通流感所致临床表现类似；而 H5N1 亚型病毒所引起的症状重，病死率高。

F.1 病原学

禽流感病毒属正黏病毒科甲型流感病毒属，呈多形性，其中球形直径为 80nm～120nm，有囊膜。基因组为分节段单股负链 RNA。依据其颗粒表面抗原血凝素（H）和神经氨酸酶（N）蛋白抗原性及其所编码基因特性的不同，目前已发现的 H 有 16 个亚型（H1～H16），N 有 9 个亚型（N1～N9），至今发现能感染人的有：H5N1、H9N2、H7N7、H7N2、H7N3、H7N5 和 H10N7 亚型毒株；感染猪的有：H1N1、H4N6、H9N2 亚型毒株，以及禽与哺乳类流感病毒基因重配株；感染马的有 H3N8 亚型毒株；感染海豹的有：H7N7、H4N5、H4N6 和 H3N3 亚型毒株；感染鲸的有：H1N3、H13N2 和 H13N9 亚型毒株；感染水貂的有：H10N7 亚型毒株。

禽流感病毒对乙醚、氯仿、丙酮等有机溶剂均敏感。常用消毒剂，如氧化剂、稀酸、卤素化合物（如漂白粉和碘剂）等均可迅速破坏其感染性。

禽流感病毒对外界环境抵抗较强。在低温环境的粪便中，病毒至少能存活 3 个月，在 22℃水中能存活 4d，在 0℃能存活 30d 以上。然而，65℃加热 30min 或煮沸（100℃）2min 可灭活。在 pH4.0 条件下，具有一定的抵抗力。病毒在直射阳光下 40h～48h 即可灭活，如果用紫外线直接照射，可迅速破坏其感染性。一些高致病性禽流感病毒株能致死性地感染实验小鼠，用鸡胚分离或传代高致病性禽流感病毒时能致鸡胚死亡。传代狗肾（MDCK）和传代牛肾（MDBK）细胞对禽流感病毒均敏感。所有禽流感病毒都具有凝集鸡、豚鼠和人红细胞能力。

禽流感病毒感染人时，人体免疫系统能够激发体液和细胞免疫反应并逐渐控制感染，清除病毒。一般情况下，保护性抗体在感染后 10d 开始出现，2 周～4 周达高峰。然而，禽 H5N1 毒株感染后，用常规的红细胞凝集抑制（HI）法不易测出抗体应答反应，须用微量中和法才可测出。

F.2 流行病学

F.2.1 流行概况

禽流感病毒感染人的事件，可追溯到 20 世纪 50 年代，当时美国就已发现两名兽医被 H7N5 毒株感染而引起了结膜炎。2003 年，荷兰多个养鸡场发生了 H7N7 禽流感爆发后，共有 89 人确诊感染了 H7N7，主要表现为结膜炎，其中一名 57 岁的兽医因急性呼吸窘迫综合征而死亡。2002～2003 年在美国弗吉尼亚、纽约，2004 年在加拿大分别发生了 H7N2 和 H7N3 感染人的报道。

1998 年和 1999 年在我国大陆，1999 年和 2003 年在我国香港发现了因 H9N2 感染而引起的普通流感样症状的儿童病例。

1997 年在我国香港特区，全球首次发生了 H5N1 毒株引起人感染禽流感的暴发事件，18 人发病，其中 6 例死亡。而后 2003 年初，香港又发生了一个家庭中父子感染 H5N1 禽流感发病。2003 年底亚洲动物 H5N1 禽流感暴发以来，截止 2006 年 11 月 16 日，全球有阿塞拜疆、柬埔寨、中国、印尼、土耳其、

伊拉克、吉布提、泰国、越南和埃及等10个国家报告了258例人禽流感实验室确诊病例，其中153例死亡。

目前发生的人禽流感病例多与当地的动物禽流感疫情相伴，虽然有冬春季节发病高峰，但部分东南亚国家和我国南方，即使在气温较高的6月份～8月份，也有人间病例发生。荷兰、中国香港特区、越南、泰国和印度尼西亚发生了多起家庭聚集性人禽流感疫情，但在地域分布上总体呈散发零星态势。

F.2.2 传染源

主要为病、死禽和健康携带禽流感病毒的水禽。

虽然目前已有猪、虎、豹、猫、海豹、鲸鱼和马等哺乳动物感染禽流感病毒或发病的报道，但至今尚无证据证实，这些动物能将禽流感病毒在自然条件下直接传给人类。

虽然2003年荷兰的H7N7人禽流感暴发和越南、泰国、印度尼西亚的人感染H5N1禽流感病毒疫情中出现了多起家庭聚集性发病，流行病学调查表明存在人与人之间传播的可能，但这种传播是非常有限的，而且病毒的分子生物学证据及血清流行病学调查结果均表明禽流感病毒尚不具备人传人的能力。因此人禽流感患者或隐性感染者作为传染源的意义非常有限。

F.2.3 传播途径

禽流感病毒在禽中一般认为可以通过多种途径传播，如经消化道、呼吸道、皮肤损伤和眼结膜等途径传播。至今成功的人工感染途径有：气溶胶、鼻内、鼻窦内、气管内、口、眼结膜、肌肉内、腹腔内、静脉内、泄殖腔和脑内接种各种不同的禽流感病毒可使易感禽感染。垂直传播、人物理传播和蚊虫传播的可能性也是存在的。野鸟特别是迁徙的水鸟，在动物禽流感的传播上有重要意义。

季节性流感的传播途径包括吸入具有传染性的飞沫或飞沫核、直接接触或通过污染物的间接接触，将病毒接种到患者的上呼吸道或结膜的黏膜上。不同传播途径的相对传播效率尚未确定。然而对于人禽流感(H5N1)的感染，迄今为止尚未明确其具体的传播途径。

感染禽流感病毒(H5N1)禽类的呼吸道分泌物，唾液和粪便中可以排泄出大量的病毒，而且病毒可以在低温、低湿、水中存活数天至数周。研究表明人感染H5N1亚型禽流感的主要途径是密切接触病死禽或携带病毒的表面健康的禽类，危险行为包括宰杀、拔毛和加工被感染禽类。少数案例中，当儿童在散养家禽频繁出现的区域玩耍时，暴露于家禽的粪便也被认为是一种传染来源。目前研究的多数证据表明存在禽-人传播，可能存在环境-人传播，还有少数、非持续证据支持有限的人际传播。

目前认为人禽流感是直接从禽或禽流感病毒污染的环境或物品传播到人，自然条件下的具体传播途径尚不清楚，其主要途径可能是通过空气传播、密切接触传播。

F.2.3.1 空气传播

病禽或携带流感病毒禽的分泌物或排泄物通过空气飞沫播散。禽类分泌物和排泄物中的禽流感病毒可随飞沫散布在空气中、粪便中的禽流感病毒可随灰尘飞扬被吸入易感者的呼吸道而引起人的感染。比较小的分泌液经过蒸发后成为小颗粒，悬浮于空气中成为气溶胶，可随空气飘荡数小时。

F.2.3.2 密切接触传播

可能通过接触病、死禽排泄物、分泌物，或其排泄物、分泌物污染的环境或物品而传播。

F.2.4 易感人群

由于禽流感病毒具有较严格的宿主特异性，因此一般认为人对禽流感病毒不易感。目前感染禽流感H5N1而发病的年龄范围从1岁以下到80岁以上，但12岁以下儿童多发。与性别及职业无关。一般认为12岁以下儿童、老人、与家禽尤其是病死禽密切接触人群以及与患者密切接触者(包括医务人员)为感染禽流感病毒的高危人群。然而，从事养禽业、屠宰家禽业、兽医几乎不被感染，因此被感染而发病者，是否存在个体免疫缺陷而导致发病，值得进一步研究。

无症状的H5N1感染者在中国香港、越南、泰国、日本和印度尼西亚均有报道。但仍需进一步加以证实。

F.3 临床表现

F.3.1 潜伏期

一般为1d～7d，通常为2d～4d。

F.3.2 临床症状

F.3.2.1 H7亚型病毒的患者

主要表现出结膜炎或上呼吸道卡他症状，至今仅荷兰报道有一例被H7N7亚型毒株感染后出现急性呼吸窘迫综合征症状，并最后导致死亡。

F.3.2.2 H9N2亚型病毒的患者

类似人普通流感，通常仅有轻微的上呼吸道感染症状。

F.3.2.3 H5N1亚型病毒的患者

患者呈急性起病，早期表现类似普通型流感。主要为发热，体温大多持续在39℃以上，可伴有流涕、鼻塞、咳嗽、咽痛、头痛、肌肉酸痛和全身不适。部分患者可有恶心、腹痛、腹泻、稀水样便等消化道症状。

重症患者可出现高热不退，病情发展迅速，几乎所有患者都有临床表现明显的肺炎，可出现急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肺出血、胸腔积液、全血细胞减少、多脏器功能衰竭、休克及瑞氏(Reye)综合征等多种并发症。可继发细菌感染，发生败血症。

瑞氏(Reye)综合征，是非常严重并经常引起致命性的急性脑病和迅速发生的肝脂肪变。病因尚不明了，与甲型或乙型流感病毒感染有关，或病毒感染与服用阿司匹林联合引起的。多见于长期服用阿司匹林的儿童和青少年。

F.3.3 体征

重症H5N1流感患者表现为急性病容，呼吸急促(28次/分～70次/分)，呼吸窘迫。肺部查体可表现为肺部实变体征，听诊时可闻吸气相湿啰音，累及胸膜时也可闻胸膜摩擦音，个别患者胸部有压痛感。

F.3.4 胸部影像学检查

病初病变形态可为斑片状、大片状、多片的、融合的单侧或双侧肺实变，肺实质渗出阴影浅淡，呈絮状、磨玻璃样密度，重症患者病变进展迅速，1d～2d内范围扩大，密度加深呈肺实变密度，边缘模糊，病变内可见“空气支气管征”，病变多表现为两肺弥漫性分布，没有明显的以段或叶划分的特征，相当部分病例演变为“白肺”样改变，可合并胸腔积液。

F.3.5 临床实验室检查(针对H5N1禽流感患者)

F.3.5.1 外周血象

外周血象检查可见白细胞总数一般不高或降低。重症患者多有白细胞总数及淋巴细胞减少，并有血小板降低。可见$CD4^+$明显减少，$CD4^+/CD8^+$ T淋巴细胞比例倒置，<1.0(正常应为1.4～2.0)。

F.3.5.2 尿常规

我国目前相当比例人禽流感患者(>50%)尿常规发现蛋白尿(+～++++)，部分患者可见镜下血尿和管型等。

F.3.5.2 肝酶和心肌酶学

绝大部分有肺部受累的人禽流感患者伴有丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酸激酶(CK)和肌酸激酶同功酶(CK-MB)升高。

F.3.6 预后

人禽流感的预后与感染病毒的亚型有关，感染H9N2，H7N7，H7N2，H7N5和H7N3病毒者，大多预后良好；感染H5N1者预后较差，报道的病死率在59%以上。

影响预后的因素除与感染病毒的亚型有关外，还与患者年龄、体质，是否有基础性疾病，治疗是否及时，以及是否发生并发症等有关。

中华人民共和国
卫生行业标准
人感染高致病性禽流感诊断标准
WS 284 — 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：2.25
字　　数：53 千字
版　　次：2009 年 1 月第 1 版　2009 年 1 月第 1 版第 1 次印刷
书　　号：14117 • 213
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 284—2008