

禽流感实验室检测技术方案

一、实验室网络设置

实验室网络由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家流感中心和省级流感实验室两级组成。

二、实验室条件及生物安全操作的要求

1. 省级流感实验室实验条件及生物安全的操作要求

(1) 实验生物安全要求：安全 II 级+（BSL-2 级+）或安全 III 级（BSL-3 级）。

(2) 特异性 H5 的 RT-PCR 病毒核酸检测、血清学检测中用到的血凝抑制实验（HI）可以在安全 II 级+（BSL-2 级+）实验室里操作。

(3) 特异性 H5 的 RT-PCR 病毒核酸检测在安全 II 级+（BSL-2 级+）实验室的生物安全柜里提取病毒的核酸，进行病毒核酸检测的实验室要求请参照国家有关核酸检测要求的规定。

(4) 微量中和实验、特异性 H5 的 RT-PCR 病毒核酸检测阳性的采样标本的病毒分离、尸检标本的检测必须在安全 III 级（BSL-3 级）实验室里操作。

(5) 省级流感实验室实验条件：具备进行禽流感相关临床标本初筛所需的生物安全柜、离心机、PCR 仪、电泳仪、紫外线检测仪等配套设备。

2. 国家流感中心

实验生物安全要求：生物安全Ⅱ级+（BSL-2级+）和生物安全Ⅲ级（BSL-3级）实验室。

3. 省级流感实验室职责

（1）禽流感采样标本的临床标本特异性 H5 的 RT-PCR 病毒核酸检测；

（2）禽流感 H5 的血清学检测工作；

（3）特异性 H5 的 RT-PCR 病毒核酸检测阳性标本的病毒分离必须在生物安全Ⅲ级（BSL-3级）实验室；

（4）没有生物安全Ⅲ级（BSL-3级）实验室的，将标本送国家流感中心做病毒的分离工作。

4. 国家流感中心实验室职责

（1）国家流感中心设立在中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所流感室；

（2）对各省报告的禽流感疑似病例或确诊病例进行复核、确认；

（3）对不具备禽流感病毒分离条件的省份送检标本的检测、分离和确认；

（4）对需要做微量中和实验的血清标本进行微量中和试验；

（5）对各省级实验室检测人员的培训；

（6）对各省级流感实验室的质量控制。

三、原始标本采集

1. 标本采集人员

医疗机构的医生、护士或当地疾病预防控制中心专业人员负责标

本采集并填写标本登记表，标本采集人员按照《禽流感职业暴露人员防护原则》做好个人防护。

2. 标本采集种类和时限

(1) **采集标本的种类**：疑似禽流感患者的咽、鼻拭子或含漱液、血清以及死亡病例的尸检肺组织、气管分泌物。

(2) 采集标本时间：

- 1) 咽、鼻拭子或含漱液在发病的头 3 天采集；
- 2) 急性期血清在发病后 7 天内采集，恢复期血清在发病后 2-4 周采集；
- 3) 尸检标本尸检时采集。

3. 标本的运送：所有采集的标本应在医院采集时立即分装，一式二份，其中一份单独保存，以备复核。采集的标本若不能在 24 小时内送达，则应尽快在 -70°C 以下保存。无 -70°C 条件的需在 -20°C 冰箱短时间暂存，并尽快联系递送标本。

4. 标本采集的方法：详见国标《流行性感冒诊断标准及处理原则》

四、送流感中心的标本包装、运送与接收

1. 标本的包装

(1) 标本必须放在大小适合的带螺旋盖内有橡胶圈的塑料管里，拧紧。

(2) 将密闭后的标本放入大小适合的塑料袋内密封；每袋装一份标本。

(3) 直接在塑料管上用油性记号笔写明样本的种类、采样时间、编号、姓名，同时也将标本有关信息填在禽流感人体标本送检登记表，连同塑料管用另一塑料袋内密封。

(4) 将装标本的密封袋放入专用运输箱内（或疫苗冷藏包），放入冰排，然后以柔软物质填充，内衬具吸水和缓冲能力的材料。同一患者 2 份以上的密封标本，可以放在同一个塑料袋内再次做密封。若将进行病毒分离，可将密封好的装有标本的容器直接放入液氮运输罐内运输。所有容器必须印有生物危险标识。

2. 标本运送

(1) 航空或铁路运输。

(2) 专人专车运送：主要用于近距离样品运送。

3. 标本的接收

(1) 各省级中心实验室应公布标本接收联系方式，并实行 24 小时标本接收制；

(2) 国家实验室标本接收：

需送国家流感中心实验室检测的原始标本、病毒分离物、可疑阳性标本、血清等，填写标本送检登记表，在低温保存条件下，于 24 小时内送至中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所流感中心进行复核。国家流感中心标本接收联系方式为：中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所，地址：北京市宣武区迎新街 100 号，联系人：郭元吉、王敏，联系电话：010-63534632，010-63581337，传真：(010) 63534632。

五、标本检测方法

1. 禽 H5 病毒核酸检测：

材料：疑似禽流感患者的咽、鼻拭子或含漱液，死亡病例的尸检肺组织、气管分泌物。

方法：RT-PCR，用于禽 H5 亚型流感病毒的快速检测、测序及排除工作

试剂：特异性 H5 及甲型流感病毒的引物、病毒 RNA 提取试剂盒、逆转录酶、Taq DNA 聚合酶等试剂，建议使用德国 QIAGEN 的 Rneasy Mini Kit（病毒核酸提取）和 QIAquick Gel Extraction Kit（PCR 产物纯化）产品。

2. 病毒分离及鉴定：

材料：疑似禽流感患者的咽、鼻拭子或含漱液，死亡病例的尸检肺组织、气管分泌物。

方法：采用鸡胚和 MDCK 细胞分离方法，血凝及血凝抑制试验（HAI）具体方法详见国标《流行性感冒诊断标准及处理原则》。经特异性 H5 RT-PCR 病毒核酸检测阳性的采样标本的病毒分离及鉴定工作必须在安全 III 级（BSL-3 级）实验室里操作。

试剂：鸡胚接种采用 SPF 鸡胚，MDCK 细胞等。

3. 疑似病例的血清学检测：

材料：疑似病例的急性期和恢复期的双份血清

方法：血凝抑制实验具体方法详见国标《流行性感冒诊断标准及处理原则》。

试剂：H5 灭活病毒。

4. 微量中和试验

材料：疑似病例的急性期和恢复期的双份血清

试剂：H5 活病毒，必须在生物安全 III 级（BSL-3 级）实验室里操作。

六、检测结果的确认

以下情况的原始标本及分离物送国家流感中心检测、复核、确认。

1. 标本分离物血凝实验（HA）阳性，同时 H5 血凝抑制试验（HI）阴性，H5 的 RT-PCR 检测阳性。
2. 标本分离物血凝实验（HA）阳性，同时 H5 血凝抑制试验（HI）阳性或 H5 的 RT-PCR 检测阳性。
3. 标本分离物血凝实验（HA）阳性，同时 H5 的 RT-PCR 检测阳性。
4. 病人恢复期血清比急性期血清的 H5 抗体有 4 倍或以上增高。
5. 标本分离阳性，H5 血凝抑制试验阴性，并已排除了是当前流行的甲、乙型毒株的可能。

七、检测结果报告

一般情况下，实验室收到的样本立即进行实验，并于收到标本后 24 小时内出具 RT-PCR 检测报告，3-5 天出具病毒分离培养结果，于分离到病毒后的 3-5 天出具流感病毒的血凝抑制结果，微量中和实验须 3-5 天完成。

当实验过程中出现不可预测情况或意外事件，影响了按时出具报告时，应及时报告和说明。