



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3952—2014

国境口岸甲型流感病毒检测方法 Dot-ELISA 法

Detection of influenza A virus at frontier port—Dot-ELISA

2014-04-09 发布

2014-11-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、厦门大学公共卫生学院。

本标准主要起草人：杨坤宇、陈慧、吴冰冰、张毅、李庶甘、陈帆、陈毅歆、林青、杨剑。

国境口岸甲型流感病毒检测方法

Dot-ELISA 法

1 范围

本标准规定了甲型流感病毒的术语和定义、生物安全防护要求、样本的采集与处理、酶联免疫渗滤法的检测步骤、结果判定、检测报告与阳性结果的处置。

本标准适用于在国境口岸对人感染甲型流感病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 2752.1 卫生检疫人员的自我防护规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

甲型流感病毒 influenza A virus

甲型流感病毒归属于正粘病毒科(Orthomyxoviridae),是一种球形或杆状、有包膜的单股负链RNA病毒。甲型流感病毒可以感染禽类、人和猫等哺乳动物,根据表面糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)抗原性的不同,可将甲型流感病毒分成16个H和9个N亚型。甲型流感病毒可引起急性呼吸道传染病,该病主要通过空气中的飞沫、人与人之间的接触、被污染物品的接触传播。典型的临床症状为迅速发热、浑身酸痛、乏力等。

3.2

核蛋白 nucleocapsid; NP

由甲型流感病毒基因组第5片段编码,含498个氨基酸,是一种单体磷酸化的非糖基化蛋白,与3种RNA多聚酶一起构成核糖核酸蛋白体(RNPs),RNPs与RNA聚合酶共同构成病毒的核心部分。NP在流感病毒的8个基因中最为保守,具有型特异性,是将流感病毒分为A、B、C三种型的重要依据。

3.3

酶联免疫渗滤法 dot-enzyme linked immunosorbent assay; dot-ELISA

甲型流感酶联免疫渗滤法采用酶联免疫原理中的双抗体夹心法和免疫渗滤技术,用于检测样本中的甲型流感病毒核蛋白NP抗原。在硝酸纤维素膜上包被抗NP抗原的单克隆抗体,待测样本经裂解液处理后,被硝酸纤维素膜上的单克隆抗体捕获,形成抗原-抗体复合物,再加入抗NP抗原的酶标抗体,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,最后通过酶催化底物显色进行结果判定。

4 生物安全防护要求

现场采样人员的个人防护应符合SN/T 2752.1的要求,实验室结构和设施、安全操作规范、安全设

备、试验人员防护及废弃物品处理应符合 GB 19489 中二级生物安全防护实验室的要求。

5 检测对象

疑似感染流感病毒的人出境旅客及国际航行交通工具员工、国境口岸现场的工作人员及其他申请检测人员。

6 材料与试剂

6.1 仪器和耗材

振荡器、可调式微量加样器、普通冰箱(2℃~8℃)、超低温冰箱(-70℃)、压舌板、带有聚丙烯纤维头的采样拭子、与可调式微量加样器配套使用的滤芯吸头、能装 2 mL 液体的尖嘴塑料过滤瓶。

6.2 试剂

Hank's 液、裂解液、反应板、标本洗涤液、酶标试剂、显色液、终止液等检测所需的各种试剂的准备参见附录 A。除另有规定外,所有化学试剂均采用分析纯。

7 标本的采集、处理与转运

7.1 标本的采集

7.1.1 咽拭子:嘱受采集人员发“啊”音,必要时以压舌板轻压舌部,用带有聚丙烯纤维头的拭子适度用力擦拭双侧扁桃体及咽后壁,应避免触及舌部。将拭子折断,弃去手接触部分,将带有医用棉签的部分浸泡至 1 mL~2 mL 的 Hank's 液体中。在标本保存管上标注被采集人员姓名、采集时间和标本编号。

7.1.2 鼻咽拭子:将带有聚丙烯纤维头的拭子平行于上颚插入鼻孔,使拭子头部深入鼻腔根部,轻轻旋转,保持数秒,待拭子头吸收分泌物以后,缓慢转动退出。将拭子折断,弃去手接触部分,将带有医用棉签的部分浸泡至 1 mL~2 mL 的 Hank's 液体中。在标本保存管上标注被采集人员姓名、采集时间和标本编号。

7.2 标本的转运与保存

采集标本后,在冷藏条件下(2℃~8℃)由专人运送至实验室。

7.3 标本的保存

如果标本在 2 天内检测,可暂时储存于 2℃~8℃;如果标本在 2 天以后检测,保存于-70℃以下,标本避免反复冻融。

8 实验室检测¹⁾

8.1 检测前处理

检测前将试剂盒平衡至室温(约 15 min),用振荡器将标本振荡混匀。

1) 检测过程和结果判定以北京万泰生物药业股份有限公司生产的甲型流感病毒抗原(Flu A-Ag)快速诊断试剂盒为例。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对这一产品的认可,其他等效市售商品试剂盒也可采用,操作时应严格按照试剂盒说明书要求进行。

8.2 裂解

将 200 μL 待测标本加入标本处理瓶中,再加入 400 μL 裂解液,将瓶盖拧紧,充分混匀。

8.3 加样

拧开标本处理瓶滴头盖,倒置标本处理瓶,用力挤瓶壁使标本尽可能多地滴入反应板中,待标本完全渗入后(约 10 min),摘掉反应板上的盖子。

8.4 加酶

在反应孔中加入 200 μL 的酶标试剂,待酶标试剂完全渗入后再反应 2 min~3 min。

8.5 洗涤

在反应孔中加入 350 μL 的洗涤液,待液体完全渗入后再加入 350 μL 的洗涤液。

8.6 显色

待洗涤液完全渗入后,在反应孔中加入 100 μL 的显色液,完全渗入后再反应 2 min~3 min。

8.7 终止

在反应孔中加入 50 μL 终止液,3 min 内观察结果。

9 结果判定

- 9.1 质控点(C)显色,检测点(T)不显色,结果判定为阴性[如图 1a)]。
- 9.2 质控点(C)显色,检测点(T)也显色,结果判定为阳性[如图 1b)]。
- 9.3 质控点(C)不显色,无论检测点(T)显色或不显色,结果均判定为无效[如图 1c)]。

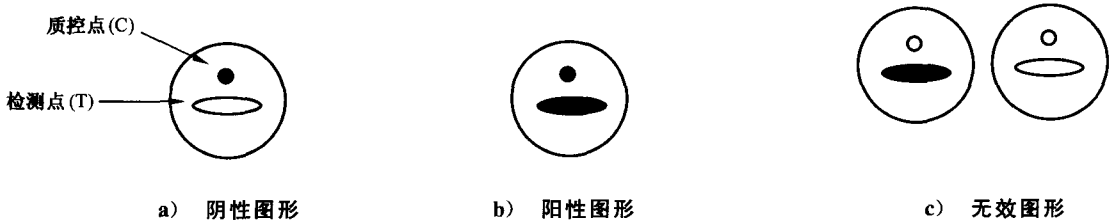


图 1 Dot-ELISA 法检测甲型流感病毒抗原的结果示意图

10 检测报告

- 10.1 结果呈阴性时可报告为“甲型流感病毒抗原阴性—Dot-ELISA 法”。
- 10.2 结果呈阳性时可报告为“甲型流感病毒抗原阳性—Dot-ELISA 法”。

11 阳性结果的处置

- 11.1 Dot-ELISA 法检测为阳性结果的相应标本应做进一步确诊。
- 11.2 确诊为阳性结果后应按规定向上级主管部门报告。

SN/T 3952—2014

附 录 A
(资料性附录)
主要试剂

A.1 Hank's 液

A.1.1 甲液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.06 g, KH_2PO_4 0.06 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 葡萄糖 1.0 g, NaCl 8.0 g, 去离子水 750 mL。

A.1.2 乙液: CaCl_2 0.14 g, 去离子水 100 mL。

A.1.3 应用液: 将乙液缓慢加入甲液中, 形成 A 液。在 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 将 0.35 g NaHCO_3 溶解在 100 mL 去离子水中, 形成 B 液。取 3 mL~5 mL 的 NaHCO_3 溶液溶解 0.02 g 酚红, 形成 C 液。将上述三种液体混合在一起, 再用去离子水定容至 1 000 mL, 充分混匀, 过滤消毒灭菌。

A.2 裂解液

将 15 g 十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)、58.5 g NaCl、30 mL 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)溶解至 600 mL 的去离子水中, 加入 75 mL 1 mol/L Tris-HCl($\text{pH}=8.0$), 用去离子水定容至 1 000 mL。

A.3 反应板

用抗重组甲型流感病毒 NP 蛋白的单克隆抗体包被反应孔, 每孔 100 ng。

A.4 质控点

包被羊抗鼠多克隆抗体, 每孔 50 ng。

A.5 酶标试剂

标记辣根过氧化物酶(HRP)的抗重组甲型流感病毒 NP 蛋白的单克隆抗体。

A.6 标本洗涤液

PBST(20 mmol/L NaCl, 2.68 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.76 mmol/L KH_2PO_4 , 0.05%吐温-20), 使用时稀释 20 倍。

A.7 显色液

3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine,TMB)膜底物显色液。

A.8 终止液

2 mol/L H_2SO_4 。
