

《H5 亚型禽流感病毒现场快速检测技术》

编制说明

一、工作简况

(一) 任务来源

《H5 亚型禽流感病毒现场快速检测技术》国家标准项目由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出，由国家标准化委员会 2008 年下达任务，项目任务编号为 2007-2031-T-326。

拟制的《H5 亚型禽流感病毒现场快速检测技术》国家标准包括荧光微球免疫层析和胶体金免疫层析两种检测方法。经查，目前涉及禽流感免疫层析检测方法的标准有 1 个行业标准和 1 个地方标准，制标的主持单位均为本国标的拟制单位——深圳出入境检验检疫局，其中行业标准《H5 和 H9 亚型禽流感病毒压电免疫传感器和超敏荧光试纸条检测方法》于 2016 年 8 月通过审定并已报批，地方标准《A 型流感病毒荧光微球试纸条快速检测方法》(SZDB/Z 209-2016)已于 2016 年 11 月发布，并于 2016 年 12 月 1 日开始实施。上述两个标准采用的荧光微球标记技术与拟制的《H5 亚型禽流感病毒现场快速检测技术》中的一种技术相同，但是检测对象和采用的全部方法不尽相同，本标准的拟制与已有标准没有使用冲突的地方，却是互为补充的关系。尤其建议相关技术在禽流感病毒现场快速检测的应用应尽快从地方标准-行业标准上升到国家标准级别，以推进实用、有效、准确的检测技术尽快应用到基层/现场实验室，对各型流感的检测尤其是 H5 亚型这种高致病性禽流感病毒实施更加及时有效的监控。

(二) 背景

禽流感(AI)是由 A 型流感病毒引起的一种禽类感染的疾病综合症。国际兽医局(OIE)规定该病为必须报告的动物疫病之一，我国农业部将其列为一类动物疫病。该病不但严重危害家禽健康，也可感染人，具有重要的公共卫生意义。在禽流感防控中，快速准确的检测尤为重要。目前，AI 监测方法包括传统方法与分子生物学方法。传统方法主要有病毒分离培养鉴定和血清学诊断，其不足之处在于操作繁琐、耗时和结果重复性不好。而分子生物学方法，如 RT-PCR 与基因芯片技术等被应用于检测 AIV，具有特异、敏感、简便快捷等特点，但对实验条件要求高，所需仪器设备昂贵，对人员的操作技能水平也有要求，不易在基层兽医部门进行普及推广。因此，研究适用于基层实验室，研制 AIV 现场快速准确检测的新型方法仍然是热点之一。基于荧光微球和胶体金的免疫层析检测技术是上述问题的解决方案之一，其中，荧光微球免疫层析技术的灵敏度又较胶体金高 10 倍-100 倍，是既能实现现场检测，又能够实现超敏准确的检测，是取代禽流感传统和分子生物学检测方法的必然趋势。

尽管我国基于荧光微球或胶体金免疫层析现场检测的相关产品和市场均已相当成熟，但有关现场检测的国家标准仍处于空白。我国提出了标准战略，要求在紧密跟踪和借鉴采用国外先进标准的基础上，制定高于国际标准的我国标准。目前，作为国际标准制订的组织 OIE（世界动物卫生组织）等，针对禽流感只制

订了实验室的检测标准，且主要是病毒的分离鉴定、HI、ELISA 和 RT-PCR 等方法，并没有现场检测的标准。鉴于现场检测已经成为主要的检测手段，是防控禽流感发生和流行的必要手段之一，因此迫切需要制订相关标准，一方面可以在标准制订中领先世界，规范禽流感的现场检测，以抢占禽流感现场检测标准的制高点；另一方面通过制订超前的、达到国际领先水平的禽流感病毒系列现场检测标准，可切实提高处置禽流感突发公共事件的能力，将禽流感突发公共事件造成的影响降到最低限度；再者，可以为我国合理制订我国的技术壁垒提供技术支持，为对外贸易争取主动权。

禽流感多种血清型中致病力高的类型主要集中在 H5 亚型，本标准选定 H5 亚型禽流感，制定基于 H5 亚型禽流感病毒血凝素特异性单克隆抗体的荧光微球和胶体金两种免疫层析现场快速检测技术标准，作为突破我国禽流感现场快速检测技术标准空白的第一次尝试，具有重大的意义。

（三）起草单位

略

（四）主要工作过程

本标准编制已完成了起草阶段及征求意见阶段的各项工作，有关情况如下：

1. 起草阶段

（1）2012 年 8 月-2014 年 12 月，制标单位在圆满完成在广东省社会发展项目《甲型 H1N1 流感病毒超敏现场鉴别试剂研制及应用》(2012B031500003)和深圳市重大科技攻关《高致病性禽流感现场超敏检测试剂及配套装置》(CXZZ20130320154210829)研究基础上，研究、制备并获得 H5 亚型禽流感病毒血凝素特异性单克隆抗体，作为检测试纸条识别检测目标的特异性包被物质。在国家科技部 863 重大专项《面向公共安全用纳米材料及诊断技术的开发》(2013AA032204)研究基础上，研究、开发并获得新型荧光微球与胶体金作为标记物材料，基于侧流层析原理，组装了 H5 亚型禽流感荧光微球免疫层析检测试纸条和 H5 亚型禽流感胶体金免疫层析检测试纸条。

（2）2015 年 1 月-2015 年 10 月，第一，广泛收集 H5 亚型禽流感标准毒株（已灭活）、H5 亚型禽流感疫苗株、其他血清型的禽流感标准毒株（已灭活）和禽呼吸道疾病相关疾病毒株（已灭活）等实验材料，完成标准方法的特异性试验和灵敏度试验。第二，广泛收集禽类组织、拭子、粪便、血清等临床样本，同时采用标准研制的方法与相关国标方法，完成标准方法的验证试验。

（3）2015 年 11 月-2016 年 6 月，分别完成了 H5 亚型禽流感荧光微球免疫层析检测试纸条方法和 H5 亚型禽流感胶体金免疫层析检测试纸条方法的建立，优化了各项检测参数，完成了特异性试验和灵敏度比对试验。同时采用已有的检测 H5 亚型禽流感病毒的国标方法，完成了临床样品的比对验证检测。最终确定了标准草稿的各个检测步骤操作的具体内容。

（4）2016 年 7 月-2016 年 12 月，完成了标准制定相关资料的收集、汇总、整理和分析，形成了标准的征求意见稿。

2. 征求意见阶段

（1）2017 年 1 月-2017 年 3 月，启动了征求意见程序，向质检系统直属局检测技术中心、检验检疫科学研究院、省级动物卫生研究所和高校等不同行业领域的 12 个单位发出了征求意见函，广泛收集各界的专业意见和建议。并交给 5

家有禽流感检测业务的检测机构完成标准复核验证程序。

(2) 2017年4月-2017年5月,收集整理意见和建议,对征求意见稿和编制说明进行修改,形成送审稿,并提交。

征求意见的对象具有广泛代表性,涵盖了系统内开展动物及其产品检验检疫工作的检测技术机构、负责检验检疫科技攻关研发的科研单位,有丰富的动物疫病研究理论基础和背景的高等院校,以及地市级疾病预防控制中心等多个领域的12家检测机构/单位,确保了收集的意见和建议具有科学性、实用性。本次征求意见回函单位共有10个,没有回函单位有2个。其中有意见或建议的单位有1个,共提出了6条意见或建议;经认真研讨和考虑,标准起草小组同意采纳有4条,占意见总数的67%,未采纳2条,占意见总数的33%;所有意见或建议的处理情况,均在《征求意见汇总处理表》中逐条对应备注栏中有详细说明。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

(一) 标准的编写原则

本标准的编制依据《中华人民共和国标准化法》,按照中华人民共和国国家标准 GB/T1.1—2009《标准化工作导则,第1部分标准的结构和编写规则》的规定进行。

(二) 提出本标准的依据

本方法是采用荧光微球或胶体金标记技术,应用膜免疫层析双抗体夹心法来检测样品中的H5亚型禽流感病毒。其主要原理是:将一种抗H5亚型禽流感血凝素的特异性单克隆抗体标记荧光微球或胶体金后渗入试纸条的样品垫中,同时将另一种抗H5亚型禽流感血凝素的特异性单克隆抗体固定于硝酸纤维素膜的测试区带(T线),将抗鼠IgG抗体固定于硝酸纤维素膜的质控区带(C线)。加入待测样品后,基于侧流免疫层析原理,样品中的H5亚型禽流感病毒,先与样品垫中已标记了一种单抗的荧光微球或胶体金结合,流向测试区,再与另一种单抗结合,形成抗体-抗原-荧光微球或胶体金标记抗体免疫复合物;同时,过剩的标记了单抗的荧光微球或胶体金流一直往前侧流至质控区,与抗鼠IgG抗体结合,形成抗体-荧光微球或胶体金标记抗体复合物。荧光微球免疫层析检测试纸在紫外光激发下读取结果,在质控区出现荧光条带前提下,测试区出现荧光条带为阳性结果,未出现荧光条带为阴性结果。胶体金免疫层析检测试纸可直接肉眼观察,在质控区出现红色检测条带前提下,测试区出现红色条带为阳性结果,未出现红色条带为阴性结果。

制标单位采用上述技术原理,拟制订的《H5亚型禽流感病毒现场快速检测方法》将充分参考国家标准、国际标准以及国内外禽流感现场检测的最新研究成果等相关内容,在长期对活禽的泄殖腔棉拭子、喉拭子、粪便、组织和血清等样品的H5亚型禽流感检测基础上,结合多次与香港政府实验室进行相关禽流感检测比对项目的成果,制订适合我国国情的H5亚型禽流感病毒现场检疫技术标准。

(三) 制定本标准的基础

制标单位承担的国家科技部“十二五”课题“深港食品有害物质全程溯源与实时监控关键技术研究及应用”(2012BAK17B08)、广东省社会发展项目《甲型H1N1流感病毒超敏现场鉴别试剂研制及应用》(2012B031500003)和深圳市重

大科技攻关“高致病性禽流感现场超敏检测试剂及配套装置”(CXZZ20130320154210829)等重大科技项目中,以H5亚型禽流感病毒为研究对象,建立基于荧光微球和胶体金技术的免疫层析快速检测方法,目前此项目已顺利通过科技部验收。制标单位在上述三项重大科研项目研究成果基础上,获得了H5亚型禽流感病毒血凝素特异性单克隆抗体,作为检测试纸条识别检测目标的特异性包被物质。在国家科技部863重大专项《面向公共安全用纳米材料及诊断技术的开发》(2013AA032204)研究基础上,研究、开发并获得新型荧光微球与胶体金作为标记物材料,基于侧流层析原理,组装了H5亚型禽流感荧光微球免疫层析检测试纸条和H5亚型禽流感胶体金免疫层析检测试纸条。因此,制标单位已在标准拟制前期取得了标准中涉及的检测技术的软硬件两大方面的核心技术,在标准拟制过程中,主要工作是将检测方法的操作标准化、结果的判定标准化,为标准的拟制奠定了重要基础。

(四) 实验内容

1、H5亚型禽流感胶体金免疫层析检测方法

(1) 标准拟制采用的代表性病毒材料及包被抗体

流感各型毒株抗原(已灭活)或疫苗株清单(共92株)及来源信息见附件1。用于验证方法特异性的其他禽呼吸道相关疾病病毒抗原包括传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、日常送检样品等为本室保存,清单见附件2。H5亚型禽流感病毒血凝素特异性单抗。

(2) 反应条件的优化

对H5亚型禽流感病毒胶体金检测试剂卡的检测样品上样量、胶体金颗粒大小、检测时间进行优化,以建立最佳的H5型禽流感病毒检测试剂卡。

A) 检测时间的优化

对所建立的H5亚型禽流感病毒胶体金检测试剂卡检测方法,分别对H5N1(Re-4)HI标准抗原、阴性对照、空白对照等样品进行反复检测,加入待测样品20 μ L,在上样后1min、5min、10min、15min、20min和30min观察结果。发现在阴性对照和空白对照均成立的情况下,15min内,所有H5亚型禽流感病毒样品在检测卡的检测区中出现阳性显色条带。据此,确定所建立的H5亚型禽流感病毒胶体金检测试剂卡的最佳反应时间为15min。

B) 胶体金颗粒大小的优化

为了缩窄检测时显色与不显色之间的灰色区域,提高试剂卡的灵敏性,对20nm、30nm、40nm、50nm四种不同规格的胶体金颗粒标记H5亚型禽流感病毒血凝素特异性单抗,和其他部分组合成快速检测试纸卡,按照所建立的H5亚型禽流感病毒胶体金检测方法进行检测,结果为:胶体金颗粒为40nm时,所有H5亚型禽流感病毒样品在检测卡的检测区中出现阳性显色条带,而其他亚型禽流感病毒样品、其他禽呼吸道疾病病毒样品、阴性对照和空白对照(蒸馏水)在检测卡的检测区均没有出现显色条带。从总体上来说,随着胶体金颗粒大小的增大,检测灵敏度相应升高,但是相应地也出现假阳性反应,所以综合考虑,选定胶体金颗粒大小为40nm的胶体金进行标记反应,反应效果最好。

C) 不同规格硝酸纤维膜的优化

采用Whatman Schleicher & Schuel公司生产的三种规格的硝酸纤维膜作为反应膜,组合成H5亚型禽流感病毒胶体金检测试剂卡,对清单中92株流感病毒标准抗原、其他禽呼吸道疾病病毒抗原、阴性对照、空白对照样品共122份样品

进行检测。结果为：采用Whatman PuraBind G-R规格硝酸纤维膜作为反应膜的测试中，在所有H5亚型禽流感病毒样品在检测卡的检测区中出现阳性显色条带，而其他亚型流感病毒样品、其他禽呼吸道疾病病毒样品、阴性对照和空白对照（蒸馏水）的检测卡的检测区中均没有出现显色条带。据此确定，采用Whatman PuraBind G-RH5规格的硝酸纤维膜作为H5亚型禽流感病毒胶体金检测试纸卡的反应膜材料。

D) 不同规格吸水垫的优化

采用 Whatman Schleicher & Schuell 公司生产的三种规格的吸水垫，组合成 H5 亚型禽流感病毒胶体金检测试剂卡，对清单中 92 株流感病毒标准抗原、其他禽呼吸道疾病病毒抗原、阴性对照、空白对照样品共 122 份进行检测。结果为：采用 Schleicher & Schuell 2668 规格的吸水垫的测试卡中，所有 H5 亚型禽流感病毒样品在检测卡的检测区中出现阳性显色条带，而其他亚型流感病毒样品、其他禽呼吸道疾病病毒样品、阴性对照和空白对照（蒸馏水）检测卡的检测区中均没有出现显色条带。据此确定 H5 亚型禽流感病毒胶体金检测方法所用吸水垫采用 Schleicher & Schuell 2668 材料。

(3) 特异性试验

按照优化好的 H5 亚型禽流感病毒胶体金检测试剂卡检测清单中 92 株流感病毒标准抗原、其他禽呼吸道疾病病毒抗原、阴性对照、空白对照样品共 122 份进行检测，结果所有 H5 亚型禽流感病毒样品在检测卡检测区中出现阳性显色条带，而其他亚型流感病毒样品、其他禽呼吸道疾病病毒样品、阴性对照和空白对照（蒸馏水）检测卡的检测区中均没有出现显色条带（图 1，展示部分样品检测结果）。表明，所建立的方法能特异性检出 H5 亚型禽流感病毒，与其他病毒抗原之间没有交叉反应。



图1 H5亚型禽流感病毒胶体金免疫层析检测试纸卡特异性检测结果

1. H5N1, 2. H5N2, 3. H5N3, 4. H5N6, 5. H5N8, 6. H5N9, 7. H1N1,
8. H2N9, 9. H3N2, 10. IBV, 11. ILTV, 12. 蒸馏水 (空白对照)

(4) 田间样品检测比对试验

对深圳局动检实验室每天检测的送检禽流感棉拭子和泄殖腔棉拭子样品,在按照《H5亚型禽流感病毒荧光RT-PCR检测方法》(GB/T 19438.2-2004)检测的同时,用H5亚型禽流感病毒胶体金检测试剂卡进行检测,连续检测1个月,每天平均送检样品为3批,每批样品28份,共检测样品约1680份。检测结果完全一致。

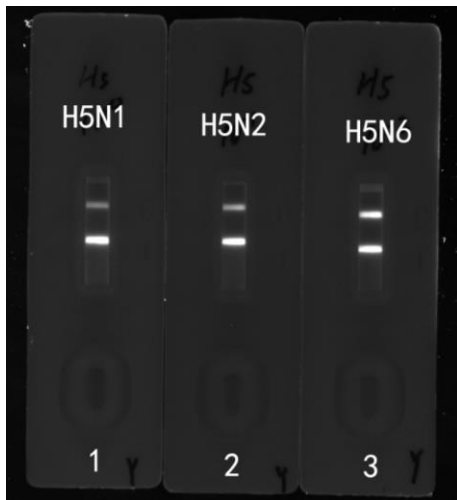
2、H5亚型禽流感荧光微球免疫层析检测方法

(1) 标准拟制采用的代表性病毒材料及包被抗体

流感各型毒株抗原(已灭活)或疫苗株清单(共92株)及来源信息见附件1。用于验证方法特异性的其他禽呼吸道相关疾病病毒抗原包括传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、日常送检样品等为本室保存,清单见附件2。H5亚型禽流感病毒血凝素特异性单抗。

(2) H5亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂条制备结果

采用所研制的H5亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂条,对清单中92株流感病毒标准抗原、其他禽呼吸道疾病病毒抗原、阴性对照、空白对照样品共122份样品进行检测,所有H5亚型禽流感病毒样品在检测卡中出现阳性显色条带,而其他亚型流感病毒样品、其他禽呼吸道疾病病毒样品、阴性对照和空白对照(蒸馏水)均没有出现显色条带。表明所建立的H5亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂条能够在现场对H5亚型禽流感病毒进行现场检测。



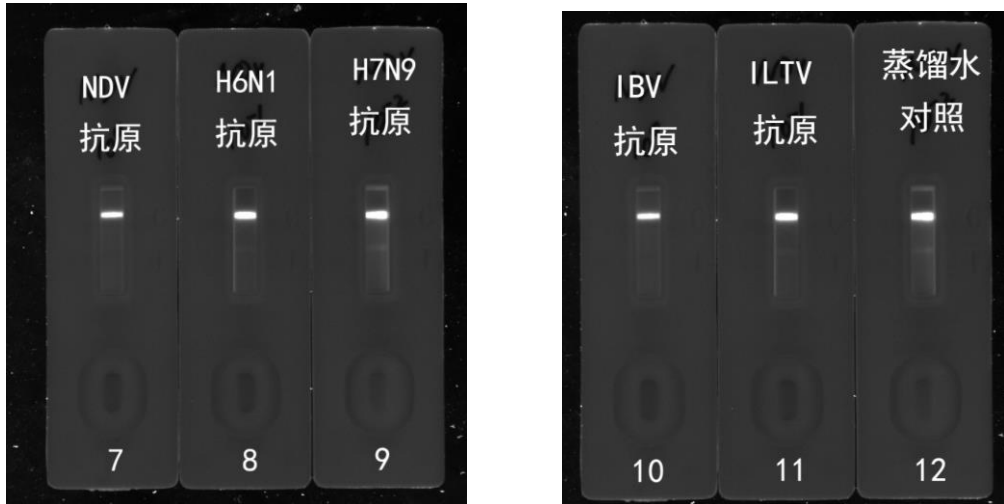


图 1 H5 亚型禽流感病毒荧光微球免疫层析检测试纸卡检测结果
(在荧光检测仪下读取结果)

1. H5N1, 2. H5N2, 3. H5N6, 4. H5N3, 5. H5N8, 6. H5N9, 7. NDV,
8. H6N1, 9. H7N9, 10. IBV, 11. ILTV, 12. 蒸馏水 (空白对照)

(3) H5 亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂条灵敏性结果

以已测定 EID₅₀ 的 H5N1 标准毒株为检测对象, 同时采用 H5 亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂条、鸡胚接种和《H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》(GB/T 19438.2-2004) 国标方法进行检测, 2 种方法的检测下限比较试验结果如表 1:

表 1 H5 亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂条与国标荧光 RT-PCR 检测下限比较试验结果

定量 毒株	检测 方法	病毒含量 (EID ₅₀ /0.1ml)								
		10 ⁹	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
H5N1 株	试纸条	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	鸡胚接种	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	国标荧光 RT-PCR	+	+	+	+	±	-	-	-	-

注: +表示阳性, -表示阴性, ±表示弱阳性。

从比对试验的检测结果中可以得出 H5 亚型禽流感病毒检测试剂条的检测下限可达 10⁷EID₅₀/0.1ml, 国标荧光 RT-PCR 方法检测下限可达 10⁵EID₅₀/0.1ml。

(4) H5 亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂条特异性结果

采用所建立的 H5 亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂, 对清单中 92 株流感病毒标准抗原、其他禽呼吸道疾病病毒抗原、阴性对照、空白对照样品共 122 份样品以及深圳局近 3 年口岸送检的禽流感拭子、血清样品共 6043 份进行检测,

结果显示,所有 H5 亚型禽流感病毒标准抗原样品在检测卡中出现阳性显色条带,而其他亚型流感病毒样品、其他禽呼吸道疾病病毒样品、口岸送检样品、阴性对照和空白对照(蒸馏水)均没有出现显色条带,且结果与采用《H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》(GB/T 19438.2-2004) 国标方法的检测结果一致。表明所建立的 H5 亚型禽流感病毒荧光微球免疫层析快速检测试纸卡方法不受基质的影响,且检测特异性强。其中部分样品的检测图如下:

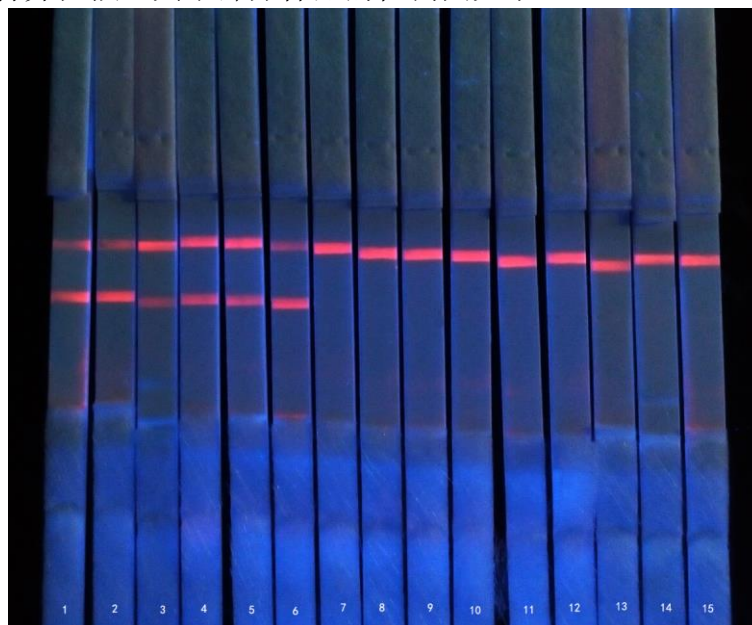


图 2 H5 亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂条特异性检测结果

1. H5N1, 2. H5N2, 3. H5N3, 4. H5N6, 5. H5N8, 6. H5N9, 7. H1N1, 8. H2N2,
9. H1N1, 10. H3N2, 11. H4N6, 12. H1N1, 13. H6N1, 14. H7N9, 15. H9N2

(5) H5 亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂条小规模田间试验结果

对采集田间试验样品 531 份,包括家禽棉拭子样品 510 份,全部同时进行 H5 亚型禽流感病毒荧光微球检测试剂条的检测和《H5 亚型禽流感病毒荧光 RT-PCR 检测方法》(GB/T 19438.2-2004) 国标方法的荧光 RT-PCR 检测,两者的检测结果一致,表明所建立方法的实用性强。

(五) 实际应用效果

本标准方法经 10 家单位复核验证和应用,均表示检测效果良好,尤其是荧光微球免疫层析检测技术,灵敏度高,快速、准确、高通量,应用前景良好。

三、主要试验或验证的分析、综述报告,技术经济论证,预期的经济效果

(一) 主要试验或验证的分析

本标准研制过程中,收集的流感各型毒株抗原(已灭活)或疫苗株清单(共 92 株)及来源信息见附件 1。用于验证方法特异性的其他禽呼吸道相关疾病病毒抗原包括传染性支气管炎病毒(IVB)、传染性喉气管炎病毒(ILTV)、日常送检样品等为本室保存,清单见附件 2。上述标准抗原或病料样品均采用了国标或

行标的标准方法完成材料的验证，方才用于研制方法的特异性试验。方法的各项主要技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法操作规定等均是建立在大量实验室数据上的归纳和总结，也交给了 10 家单位进行了方法的复检验证。

（二）预期的经济效果

尽管我国基于荧光微球或胶体金免疫层析现场检测的相关产品和市场均已相当成熟，但有关现场检测的国家标准仍处于空白。本标准第一次在我国提出了采用上述成熟的检测试剂产品推进 H5 亚型禽流感的现场快速标准方法，是与禽流感病毒的分离鉴定、HI、ELISA 和 RT-PCR 等标准有明显区别的标准，适应了防控禽流感发生和流行采用现场快速检测手段的趋势，也可以更好地规范禽流感现场检测试剂产品市场，抢占禽流感现场检测标准的制高点，可切实提高处置禽流感突发公共事件的能力，将禽流感突发公共事件造成的影响降到最低限度，为我国合理制订我国的技术壁垒提供技术支持，为对外贸易争取主动权，这将带来广阔的经济前景。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度

目前国外均尚未有采用荧光微球或胶体金免疫层析快速检测技术检测 H5 亚型禽流感的国际标准。本标准的拟制在国际上是领先的。

五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

本标准符合当前相应法律法规的规定，不涉及禽流感活毒操作，适用于现场快筛检测，相关疾病检测的标准没有强制性标准，因此本标准不存在与强制性标准的衔接、协调问题。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

在征求意见过程中，存在重大分歧的意见是专家提出“（三）空白对照”的判定与“（二）阴性对照”完全相同，建议修改；“（四）无效结果”的判定标准不准确，建议改为“阴性对照在质控区（C）未出现荧光条带或者红色条带，表明存在不正确操作过程或试纸已变质损坏。”对此意见，制标小组不采纳，并已在征求意见汇总表备注栏中作出了清晰的解释说明，指出标准中规定的免疫层析试纸条方法，待测样品中不管有无 H5 亚型禽流感病毒，在样品垫中过剩的标记了单抗的荧光微球或胶体金流会一直往前侧流至质控区，与抗鼠 IgG 抗体结合，形成抗体-荧光微球或抗体胶体金标记复合物，读取结果时在质控区一定会出现荧光条带。因此，仅当质控区无条带情况下，才会判定“存在不正确操作过程或试纸条已变质损坏”。提出建议的专家可能对试纸条的制备原理有误解。

七、标准性质（强制性，推荐性）的建议，特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

该项标准的性质建议为推荐性，标准中涉及的 2 种快速检测方法，可以作为 H5 亚型禽流感病毒验证比对的检测方法标准，也是已发布的多个检测 H5 亚型禽流感标准的有益补充。

八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办

法等)

该项技术标准的制定，试验数据充分，科学性强，并经过了长期大量实际应用，适用于H5亚型禽流感病毒的流行病学调查、大规模筛查检测和疫情监测，可用于现场检测组织样品、拭子悬液及粪便样品等。可作为国家推荐性标准，在全国对H5亚型禽流感病毒的诊断、检测、检疫工作中进一步推广应用。

建议本标准尽快颁布实施。本标准发布实施后，建议组织标准应用部门或单位以举办国家标准培训班的形式推广本标准。

九、废止现行有关标准的建议；

当前，关于 H5 亚型禽流感病毒现场检测的国家标准和行业标准，均未有涉及采用胶体金和荧光微球进行现场检测的方法，本标准是 H5 亚型禽流感病毒检测标准的补充部分，可使 H5 亚型禽流感病毒的检测方法更加完善，因此没有关于废止现行有关标准的建议。

十、其他应予说明的事项。

本标准已经历 3 次送审。前三次送审情况分别如下：

(1) 2008 年 11 月 11 日第一次审定，本标准名称为《禽流感病毒 H5 亚型胶体金检测技术》，审定结论是要求增加标准方法验证的样品数量；

(2) 2009 年 12 月 8 日第二次审定，本标准名称为《禽流感病毒 H5 亚型胶体金检测技术》，已通过专家组审定，但是国家标准委认为标准内容太少，建议增加内容；

(3) 2016 年 11 月 30 日第三次审定，根据第二次审定的意见本标准增加了荧光微球免疫层析检测方法，并将检测对象从 H5 亚型禽流感病毒扩大到禽流感病毒，更名为《禽流感病毒现场快速检测技术》，提供原来审定时的胶体金免疫层析检测方法和新增的荧光微球免疫层析检测方法，以求更能适应现场禽流感快筛检测的需求，但是专家组建议检测对象还是设定在 H5 亚型禽流感病毒，要求返回修改全套资料。

附件 1

流感毒株标准抗原（已灭活）清单

毒株名称	血清型		宿主	来源
	H型	N型		
A/szciq-1/2001 (H1N1)	H1	N1	porcine	深圳局动植中心保存
A/szcdc0621/2009 (pdmH1N1)	H1 pdm	N1	human	深圳CDC
A/Singapore/1/1957 (H2N2)	H2	N2	human	深圳CDC
A/Mallard/Germany/SR517/2007 (H2N3)	H2	N3	avian	华南农大
A/mallard/Germany/R2711/07 (H2N9)	H2	N9	avian	上海巴氏德研究所
A/HongKong/1/1968 (H3N2)	H3	N2	Human	深圳局保健中心
A/ szciq-32/42/2002 (H3N2)	H3	N2	porcine	深圳局动植中心
A/mallard/Germany/R2619/2007 (H3N6)	H3	N6	avian	上海巴氏德研究所
A/mallard/Germany/Wv1303-04/2003 (H3N8)	H3	N8	avian	上海巴氏德研究所
A/mallard/China/Wv51/2005 (H4N2)	H4	N2	avian	华南农大
A/mallard/Germany/Wv1754-57/2003 (H4N6)	H4	N6	avian	华南农大
A/HongKong/156/1997 (H5N1; HP)	H5	N1	human	香港大龙化验室
H5N1(Re-4)HI, A/chicken/Shanxi/2/2006 (Clade 7)	H5	N1	avian	哈兽研
H5N1(Re-5)HI, A/duck/Anhui/1/2006 (Clade 2.3.4)	H5	N1	avian	哈兽研
H5N1(Re-6)HI , A/duck/Guangdong/S1322/2010 (Clade 2.3.2.1)	H5	N1	avian	哈兽研
H5N1(Re-7)HI , A/chicken/Liaoning/S4092/2011(Clade7.2.4)	H5	N1	avian	哈兽研
H5N1(Re-8)HI, A/Chicken/GuiZhou/4/2013 (Clade 2.3.4.4)	H5	N1	avian	哈兽研
Re-1灭活疫苗	H5	N1	avian	哈药集团生物疫苗有限公司
Re-4灭活疫苗	H5	N1	avian	
Re-5灭活疫苗	H5	N1	avian	
Re-6灭活疫苗	H5	N1	avian	
Re-7灭活疫苗	H5	N1	avian	
Re-8灭活疫苗	H5	N1	avian	
新流腺三联灭活疫苗	H5	N1	avian	

禽流感二价苗(Re-6+Re-4)	H5	N1	avian	广东永顺
H5N2(D7)灭活疫苗	H5	N2	avian	华大生物
禽流感二价灭活疫苗	H5	N1	avian	青岛易邦
禽流感二价灭活疫苗 H5+H9	H5	N1	avian	哈兽研
重组禽流感病毒H5亚型二价灭活疫苗(Re-6株+Re-8株)	H5	N1	avian	哈尔滨维科生物技术开发总公司
重组禽流感病毒H5亚型三价灭活疫苗(Re-6株+Re-7株+Re-8株),	H5	N1	avian	
重组禽流感病毒H5亚型二价灭活疫苗(Re-6株+Re-10株)	H5	N1	avian	
重组禽流感病毒H5亚型三价灭活疫苗(Re-7株+Re-8株+Re-10株)	H5	N1	avian	
A/Chicken/China/R11/2006 (H5N6; HP)	H5	N6	avian	华南农大
A/Chicken/China/R23/2012 (H5N8)	H5	N8	avian	华南农大
A/Human/China/2015 (H5N6)	H5	N6	Human	深圳CDC
A/ostrich/Germany/R5-10/2006 (H5N3, LP)	H5	N3	avian	上海巴氏德研究所
A/mallard/British Columbia/544/2005 (H5N9)	H5	N9	avian	上海巴氏德研究所
A/turkey/Germany/R30/1999 (H6N1)	H6	N1	avian	佛山科技大学
A/avian/Israel/289/2001 (H6N2)	H6	N2	avian	深圳局
H7 HI	H7	N2	avian	哈兽研
H7N9 HI	H7	N9	avian	哈兽研
A/chicken/China/412/2015(H7N9)	H7	N9	avian	华南农大
A/chicken/China/306/2016(H7N9,HP)	H7	N9	avian	华南农大
A/Human/China/2014 (H7N9)	H7	N9	avian	深圳CDC
A/duck/Potsdam/15/1980 (H7N7; LP)	H7	N7	avian	上海巴氏德研究所
H9 HI 1999	H9	N2	avian	哈兽研
H9 HI2002	H9	N2	avian	
H9 HI 2006	H9	N2	avian	
H9 HI 2010	H9	N2	avian	
H9 HI 2015	H9	N2	avian	
H9 HI 2017	H9	N2	avian	
H9N2疫苗(SS株)	H9	N2	avian	广东CIQ提供
H9N2疫苗(F株)	H9	N2	avian	上海CIQ提供
H9N2疫苗(SD696株)	H9	N2	avian	山东CIQ提供
H9N2疫苗(LG1株)	H9	N2	avian	齐鲁动保
H9N2疫苗(RE-2株)	H9	N2	avian	哈兽研
H9N2疫苗(HL株)	H9	N2	avian	河南普莱柯
H9N2疫苗(HP株)	H9	N2	avian	河北保定瑞普

H9N2疫苗(JY株)	H9	N2	avian	哈药集团
H9N2疫苗(HY106株)	H9	N2	avian	北京兽医生物
H9N2疫苗(WD株)	H9	N2	avian	乾元浩
H9N2疫苗(NJ02株)	H9	N2	avian	南京天邦
H9N2疫苗(YBF003株)	H9	N2	avian	青岛易邦
H9N2疫苗(SS株)	H9	N2	avian	青岛奥兰百特
A/Chicken/Shenzhen/922/2002(H9N2)	H9	N2	avian	深圳局动植中心保存
A/Chicken/Shenzhen/923/2006(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/924/2002(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/925/2002(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/926/2004(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/927/2002(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/928/2002(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/929/2001(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9210/2000(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/jiling/9211/2004(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9212/2003(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9213/2000(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9214/2000(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9215/2005(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9216/2000(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9217/2001(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9218/2002(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9219/2002(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9220/2002(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9221/2002(H9N2)	H9	N2		
A/Chicken/Shenzhen/9222/2003(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9223/2005(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Duck//Shenzhen/9224/2006(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9225/2007(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9226/2007(H9N2)	H9	N2	avian	
A/Chicken/Shenzhen/9227/2008(H9N2)	H9	N2	avian	
A/avian/Israel/232/2001 (H10N7)	H10	N7	avian	

附件 2

H5 亚型禽流感病毒荧光微球和胶体金免疫层析检测试剂条特异性验证样品清单及检测结果

样品类型	样品名称	样品来源	样品份数	检测结果			检测结论
				国家标准	H5 荧光试纸条	H5 胶体金试纸条	
阳性样品	H5p 1-10	深圳局	10	Ct 值:16.21~32.85	10 份阳性(两条带)	10 份阳性(两条带)	一致
阴性样品	H5n 1-10	深圳局	10	Ct 值:0.00	10 份阴性(一条带)	10 份阴性(一条带)	一致
H5 HI 标准抗原	Re-1	哈兽研	6	Ct 值:12.47~18.36	阳性(两条带)	阳性(两条带)	完全一致
	Re-4				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	Re-5				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	Re-6				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	Re-7				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	Re-8				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
H5 亚型的各类疫苗	Re-1 灭活疫苗	哈药集团生物 疫苗有限公司	15	Ct 值:24.14~32.53	阳性(两条带)	阳性(两条带)	结果完全一致
	Re-4 灭活疫苗				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	Re-5 灭活疫苗				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	Re-6 灭活疫苗				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	Re-7 灭活疫苗				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	Re-8 灭活疫苗				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	新流腺三联灭活疫苗				阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	二价苗(Re-6+Re-4)	广东永顺			阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	H5N2(D7)灭活疫苗	华大生物			阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	禽流感二价灭活疫苗	青岛易邦			阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	禽流感二价灭活疫苗 H5+H9	哈兽研			阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	重组禽流感病毒 H5 亚型二价灭活疫苗	哈尔滨维科生			阳性(两条带)	阳性(两条带)	

	(Re-6 株+Re-8 株)	物技术开发总公司						
	重组禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗 (Re-6 株+Re-7 株+Re-8 株),					阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	重组禽流感病毒 H5 亚型二价灭活疫苗 (Re-6 株+Re-10 株)					阳性(两条带)	阳性(两条带)	
	重组禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗 (Re-7 株+Re-8 株+Re-10 株)					阳性(两条带)	阳性(两条带)	
H7 HI 标准抗原	H7 HI	哈兽研	2	H5 阴性, H7 Ct:16.27、21.66	阴性(一条带)	阴性(一条带)	一致	
	H7N9 HI				阴性(一条带)	阴性(一条带)		
H9 HI 标准抗原	H9 HI 1999	哈兽研	6	H5 阴性, H9 Ct:11.64~32.74	阴性(一条带)	阴性(一条带)	一致	
	H9 HI2002				阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	H9 HI 2006				阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	H9 HI 2010				阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	H9 HI 2015				阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	H9 HI 2017				阴性(一条带)	阴性(一条带)		
H9 亚型的各类疫苗	SS 株	广东分离	13	H5 阴性, H9 Ct:26.73~33.86	阴性(一条带)	阴性(一条带)	一致	
	F 株	上海分离			阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	SD696 株	山东			阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	LG1 株	齐鲁动保			阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	RE-2 株	哈兽研			阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	HL 株	河南普莱柯			阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	HP 株	河北保定瑞普			阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	JY 株	哈药集团			阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	HY106 株	北京兽医生物			阴性(一条带)	阴性(一条带)		
	WD 株	乾元浩			阴性(一条带)	阴性(一条带)		

	NJ02 株	南京天邦			阴性(一条带)	阴性(一条带)	
	YBF003 株	青岛易邦			阴性(一条带)	阴性(一条带)	
	L 株	青岛奥兰百特			阴性(一条带)	阴性(一条带)	
新城疫 HI 抗原	NDV HI	哈兽研			阴性(一条带)	阴性(一条带)	
新城疫弱毒疫苗	NDV II(B1 株)	英特威	4	H5 阴性, NDV Ct:11.95~16.54	阴性(一条带)	阴性(一条带)	一致
	NDV IV(F 株)				阴性(一条带)	阴性(一条带)	
	NDV IV(Lasota 株)				阴性(一条带)	阴性(一条带)	
传染性法氏囊病病毒 IBV	血清 I 型	深圳局保存	5	H5 阴性	阴性(一条带)	阴性(一条带)	一致
传染性法氏囊病病毒 IBV	血清 II 型		3	H5 阴性	阴性(一条带)	阴性(一条带)	
传染性喉气管炎病毒 ILTV			16	H5 阴性	阴性(一条带)	阴性(一条带)	
阴性基质	SPF 尿囊液	深圳局	6	H5 阴性	阴性(一条带)	阴性(一条带)	一致
	水				阴性(一条带)	阴性(一条带)	
	细胞培养液				阴性(一条带)	阴性(一条带)	
	PBS 溶液				阴性(一条带)	阴性(一条带)	
	唾液				阴性(一条带)	阴性(一条带)	
	阴性鸡血清				阴性(一条带)	阴性(一条带)	
阴性送检样品	鸡泄殖腔拭子	深圳局近三年 检测样品	2000	H5 阴性	阴性(一条带)	阴性(一条带)	一致
	鸡粪便		530		阴性(一条带)	阴性(一条带)	
	鸡组织样品		313		阴性(一条带)	阴性(一条带)	
	进口冻禽产品		3200		阴性(一条带)	阴性(一条带)	
汇总			6139				