



中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—××××

H5 亚型禽流感病毒现场快速检测技术

Protocol of the rapid detection assay on-site for H5 subtype of avian influenza virus

(送审稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国 发布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准依据GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》制定。

本文件的某些内容有可能涉及专利，应按照专利法的规定执行。本文件的发布机构不应承担识别这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC181)归口。

本标准起草单位：略。

本标准主要起草人：略。

H5 亚型禽流感病毒现场快速检测技术

1 范围

本标准规定了H5亚型禽流感病毒荧光微球快速免疫层析检测技术和胶体金快速免疫层析检测技术及操作方法。

本标准适用于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。

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，仅所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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

3 原理

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。

4 仪器、材料与试剂

4.1 仪器

- 4.1.1 紫外分析仪和荧光试纸检测仪。
- 4.1.2 组织研磨器。
- 4.1.3 低温高速离心机。
- 4.1.4 微量移液器。
- 4.1.5 冰箱。
- 4.1.6 计时器。

4.2 材料

4.2.1 阳性对照：由国家禽流感参考实验室提供的 H5 亚型禽流感病毒标准抗原（灭活全病毒），HA 效价为 2^6 或以上。

4.2.2 阴性对照：SPF 家禽组织匀浆或 SPF 鸡胚尿囊液上清液。

4.2.3 H5 亚型禽流感病毒荧光微球免疫层析检测试纸条：用于 H5 亚型禽流感病毒检测。试纸条产品需由合格供应商提供，并在投入使用前通过实验室质量监控及验收合格方可投入使用。

4.2.4 H5 亚型禽流感病毒胶体金免疫层析检测试纸条：用于 H5 亚型禽流感病毒检测。试纸条产品需由合格供应商提供，并在投入使用前通过实验室质量监控及验收合格方可投入使用。

4.3 试剂

4.3.1 水：符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

4.3.2 荧光微球免疫层析检测试纸条法-棉拭子样品处理液：见附录 A 中 A.1。

4.3.3 荧光微球免疫层析检测试纸条法-组织样品处理液：见附录 A 中 A.2。

4.3.4 胶体金免疫层析检测试纸条法-棉拭子样品处理液：见附录 A 中 A.3。

4.3.5 胶体金免疫层析检测试纸条法-组织样品处理液：见附录 A 中 A.4。

5 样品采集与处理

5.1 样品的采集

5.1.1 应按照 GB/T 18088 《出入境动物检疫采样》中的规定进行，并做好生物安全防护。

5.1.2 拭子样采集

将棉拭子插入禽类的咽喉、肛门或者粪便中适当搅动，取出后放入含 2 mL 棉拭子样品处理液的离心管中。

5.1.3 组织样采集

采取不少于 2 g 的待检组织，置于无菌容器中。

5.2 样品贮运

样品采集后，放入密闭的样品袋内（一个采样点的样品，放一个样品袋），于保温箱中加冰、密封，送实验室。

5.3 样品处理

5.3.1 棉拭子样品处理

将棉拭子与 2 mL 棉拭子样品处理液充分混匀，编号备用。

5.3.2 组织样品处理

用无菌采集器取 0.5 g 待检组织样品至无菌研钵中，加入 1 mL 组织样品处理液，研磨均匀后，10000 g 离心 5 min，取上清用于检测。

5.4 样本贮存

制备好的待测样本在 2 °C ~ 8 °C 条件下保存应不超过 24 h，若需长期保存应置 -70 °C 以下，但应避免反复冻融（冻融不超过 3 次）。

6 H5 亚型禽流感病毒荧光微球免疫层析试纸条检测

6.1 设立对照

6.1.1 在检测过程中，必须设立阳性对照、阴性对照和空白对照，并与待检样品一起检测。

- 6.1.2 取H5亚型禽流感病毒标准抗原作为阳性对照，阳性对照物血凝（HA）效价不小于1:64。
- 6.1.3 取SPF家禽组织匀浆或SPF鸡胚尿囊液上清液作为阴性对照。
- 6.1.4 取等体积的样品处理液作为空白对照。

6.2 检测操作

- 6.2.1 根据样品数量，预计需要使用的H5亚型禽流感病毒荧光微球免疫层析试纸条数量，取出试纸条后置于一新的密封袋中，在室温（20℃~25℃）下放置30 min。
- 6.2.2 从密封袋中取出试纸条，吸取60 μL~100 μL待测样本，逐滴加到试纸条的样品孔中，水平放置。
- 6.2.3 在5 min~15 min内观察并记录结果，超过15 min的判读结果无效。
- 6.2.4 整个检测过程需在30 min内完成。

6.3 结果判定

6.3.1 结果观察方式

在紫外灯光下肉眼观察或者放入荧光试纸检测仪中读取结果，依据使用的荧光微球标记物种类选择荧光试纸检测仪的波长范围。

6.3.2 试验对照的结果判读

6.3.2.1 阳性对照

在荧光微球免疫层析检测试纸条的测试区（T）和质控区（C）上均出现一条荧光条带。

6.3.2.2 阴性对照

仅在荧光微球免疫层析检测试纸条的质控区（C）上出现一条荧光条带。

6.3.2.3 空白对照

仅在荧光微球免疫层析检测试纸条的质控区（C）上出现一条荧光条带。

6.3.2.4 无效结果

在质控区（C）无条带，表明存在不正确操作过程或试纸条已变质损坏。

6.3.3 样本的结果判读

仅当阳性对照、阴性对照、空白对照的检测结果均成立条件下，对样本的检测结果进行判读。

6.3.3.1 阳性结果（+）

在荧光微球免疫层析检测试纸条的测试区（T）和质控区（C）上均出现一条荧光条带。

6.3.3.2 阴性结果（-）

仅在荧光微球免疫层析检测试纸条的质控区（C）上出现一条荧光条带。

6.3.3.3 无效结果

对于无效结果，应检查操作过程及试纸条是否变质等情况后，重新测试。

7 H5亚型禽流感病毒胶体金免疫层析试纸条检测

7.1 设立对照

- 7.1.1 在检测过程中，必须设立阳性对照、阴性对照和空白对照，并与待检样品一起检测。
- 7.1.2 取H5亚型禽流感病毒标准抗原作为阳性对照，阳性对照物血凝（HA）效价不小于1:64。
- 7.1.3 取SPF家禽组织匀浆或SPF鸡胚尿囊液上清液作为阴性对照。
- 7.1.4 取等体积的样品处理液作为空白对照。

7.2 检测操作

- 7.2.1 根据样品数量，预计需要使用的H5亚型禽流感病毒胶体金免疫层析试纸条数量，取出试纸条后置于一新的密封袋中，在室温（20℃~25℃）下放置30 min。
- 7.2.2 从密封袋中取出试纸条，吸取60 μL~100 μL待测样本，逐滴加到试纸条的样品孔中，水平放置。
- 7.2.3 在5 min~15 min内观察并记录结果，超过15 min的判读结果无效。
- 7.2.4 整个检测过程需在30 min内完成。

7.3 结果判定

7.3.1 结果观察方式

直接肉眼观察。

7.3.2 试验对照的结果判读

7.3.2.1 阳性对照

在胶体金免疫层析检测试纸条的测试区（T）和质控区（C）上均出现一条荧光条带。

7.3.2.2 阴性对照

仅在胶体金免疫层析检测试纸条的质控区（C）上出现一条荧光条带。

7.3.2.3 空白对照

仅在胶体金免疫层析检测试纸条的质控区（C）上出现一条荧光条带。

7.3.2.4 无效结果

在质控区（C）无条带，表明存在不正确操作过程或试纸条已变质损坏。

7.3.3 样本的结果判读

仅当阳性对照、阴性对照、空白对照的检测结果均成立条件下，对样本的检测结果进行判读。

7.3.3.1 阳性结果（+）

在胶体金免疫层析检测试纸条的测试区（T）和质控区（C）上均出现一条荧光条带。

7.3.3.2 阴性结果（-）

仅在胶体金免疫层析检测试纸条的质控区（C）上出现一条荧光条带。

7.3.3.3 无效结果

对于无效结果，应检查操作过程及试纸条是否变质等情况后，重新测试。

8 对于 H5 亚型禽流感病毒现场快速检测结果阳性的后期处理

如H5亚型禽流感病毒现场快速检测结果为阳性，应立即对试验耗材、环境等进行消毒处理，按照相关规定进行生物安全防护，监送样品至有资质的实验室进行确证检测。

附 录 A

(规范性附录)

样品处理液的配制

A.1 荧光微球免疫层析检测试纸条法-棉拭子样品处理液

磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)	2.3 g
磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.52 g
氯化钠 (NaCl)	8.77 g
去离子水	950 mL
调pH值为7.4后, 定容至1000 mL, 经121℃, 15 min高压灭菌。再加入:	
N-乙酰-L-半胱氨酸	5.0 g
NP-40	5.0 mL
混匀后分装, 置4℃贮存备用。	

A.2 荧光微球免疫层析检测试纸条法-组织样品处理液

磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)	2.3 g
磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.52 g
氯化钠 (NaCl)	8.77 g
去离子水	950 mL
调pH值为7.4后, 定容至1000 mL, 经121℃, 15 min高压灭菌, 置4℃贮存备用。	

A.3 胶体金免疫层析检测试纸条法-棉拭子样品处理液

十水四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	13.3 g
硼酸 (H_3BO_3)	16.08 g
氯化钠 (NaCl)	8.5 g
双蒸水	800 mL
调pH值为8.4后, 定容至1000 mL。高压灭菌后, 再加入:	
N-乙酰-L-半胱氨酸	5.0 g
NP-40	5.0 mL
混匀后分装, 置4℃贮存备用。	

A.4 胶体金免疫层析检测试纸条法-组织样品处理液

十水四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	13.3 g
硼酸 (H_3BO_3)	16.08 g
氯化钠 (NaCl)	8.5 g
双蒸水	800 mL
调pH值为8.4后, 定容至1000 mL。高压灭菌后, 置4℃贮存备用。	