

传染病突发公共卫生事件应急处置 技术规范 第10部分：病毒类应急 检测技术

Technical specification for emergency response of public health
emergent event caused by infectious disease—Part 10: Emergency
detection method of pathogenic in viral infectious disease

2024-12-27 发布

2025-01-27 实施

江苏省市场监督管理局 发布
中国标准出版社 出版

目 次

前言Ⅲ

引言Ⅳ

1 范围1

2 规范性引用文件1

3 术语和定义1

4 生物安全要求1

5 准备工作和质量控制1

6 分子生物学应急检测技术2

7 免疫学应急检测技术3

参考文献.....4

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是 DB32/T 4972《传染病突发公共卫生事件应急处置技术规范》的第 10 部分。DB32/T 4972 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：监测预警；
- 第 2 部分：事件报告和管理；
- 第 3 部分：风险评估；
- 第 4 部分：现场流行病学调查；
- 第 5 部分：恢复评估；
- 第 6 部分：应急消毒处置及应急人员个人防护；
- 第 7 部分：媒介生物应急监测、评估与控制；
- 第 8 部分：标本的采集、保存和运输；
- 第 9 部分：应急检测流程；
- 第 10 部分：病毒类应急检测技术；
- 第 11 部分：细菌类应急检测技术。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省卫生健康委员会提出并组织实施。

本文件由江苏省卫生健康标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：江苏省疾病预防控制中心、南京市疾病预防控制中心、盐城市疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：付建光、樊欢、邓斐、李志锋、王慎骄、王楠、许晓庆、余慧燕、李楚楚、秦圆方、田华、祁贤、彭杰夫、崔仑标。

引 言

传染病突发公共卫生事件是江苏省公共卫生安全的主要威胁,对社会、经济和人群健康造成巨大影响。本文件为贯彻落实《中华人民共和国传染病防治法》《中华人民共和国突发事件应对法》《突发公共卫生事件应急条例》等法律法规对传染病突发公共卫生事件的应急处置要求,提升江苏省传染病突发公共卫生事件的应急处置能力,保障人民群众的生命安全和社会稳定的目标而制定。

DB32/T 4972《传染病突发公共卫生事件应急处置技术规范》由以下 11 个部分构成:

- 第 1 部分:监测预警;
- 第 2 部分:事件报告和管理;
- 第 3 部分:风险评估;
- 第 4 部分:现场流行病学调查;
- 第 5 部分:恢复评估;
- 第 6 部分:应急消毒处置及应急人员个人防护;
- 第 7 部分:媒介生物应急监测、评估与控制;
- 第 8 部分:标本的采集、保存和运输;
- 第 9 部分:应急检测流程;
- 第 10 部分:病毒类应急检测技术;
- 第 11 部分:细菌类应急检测技术。

DB32/T 4972 的制定是对传染病突发公共卫生事件处置工作相关国家标准、行业标准的有力补充,为开展传染病突发公共卫生事件的监测预警、报告和管理、风险评估、现场流行病学调查、恢复评估、应急消毒处置和个人防护、媒介生物的应急监测评估与控制、标本的采集和检测等应急处置工作提供有力的科学依据和技术支撑,对保障公众健康和公共卫生安全具有重要意义。

传染病突发公共卫生事件应急处置 技术规范 第10部分:病毒类应急 检测技术

1 范围

本文件规定了传染病突发公共卫生事件应急处置中病毒类应急检测的生物安全要求、准备工作和质量控制、分子生物学应急检测技术和免疫学应急检测技术等。

本文件适用于传染病突发公共卫生事件应急处置中病毒类传染病病原体的应急检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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

WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

高通量测序 high-throughput sequencing

区别于传统 Sanger(双脱氧法)测序,能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术,通常一次测序反应能产出不低于 100 兆的测序数据。

注:又称下一代测序技术(Next-generation sequencing, NGS)或大规模平行测序(Massively parallel sequencing, MPS)。

4 生物安全要求

4.1 实验人员应根据 GB 19489 和风险评估的要求,配备不同类型传染病感染的个人防护装备,包括但不限于防护服、手套、外科口罩或医用防护口罩、防护面屏、防护帽。防护服宜每隔 4 h 更换一次。在发生意外暴露时,根据应急处置预案采取必要措施。

4.2 实验人员、实验场所、感染性标本处置及消毒灭菌等应符合 WS 233 中的实验室生物安全管理要求。

4.3 依据《医疗废物管理条例》规定处置医疗废物。

5 准备工作和质量控制

5.1 准备工作

5.1.1 根据实验需要,准备相应的生物安全柜、移液器、漩涡振荡仪、离心机等仪器和检测试剂耗材。

5.1.2 标本震荡后瞬时离心取上清用于病毒类核酸提取及抗原检测。

5.1.3 按照病毒 RNA/DNA 核酸提取试剂盒说明书,取适量标本进行核酸提取,提取完成后应立即封盖并马上进行分子生物学检测。剩余的标本和核酸应于 -80°C 条件下冻存。

5.2 质量控制

5.2.1 每一批次反应过程中应至少设置一个阴性和阳性对照,必要时增加空白对照。

5.2.2 测序过程中数据 Q30(用于衡量高通量测序中碱基准确度的指标,测序数据中碱基识别质量值为30,表示其碱基识别准确率为99.9%)应 $\geq 80\%$ 。

5.2.3 宏基因组测序提取的核酸中 DNA 的 A260/A280 值应 >1.8 , RNA 的 A260/A280 值应 ≥ 2.0 。背景核酸模型应每个月更新1次。

6 分子生物学应急检测技术

6.1 实时荧光 PCR 技术(Real-time PCR)

6.1.1 反应体系配制(PCR 反应液、酶、引物、探针及模板)及反应程序设置(反应温度、循环数及荧光通道)应参照相应病毒核酸检测试剂盒说明书。

6.1.2 阴性对照、阳性对照、内参(如有)结果成立时,进行结果判断。阴性显示无 Ct 值、无 S 形扩增曲线,阳性显示 Ct 值小于或等于病毒核酸检测试剂盒说明书规定值,且有 S 形扩增曲线。

6.2 等温扩增技术

6.2.1 将核酸模板(RNA 病毒先进行反转录合成第一条 cDNA 链)或标本上清、引物、DNA 合成酶、基质等共同置于商品化试剂盒指定温度下,经一个步骤即可完成。

6.2.2 当阴性对照、阳性对照结果成立时,应使用以下方法进行结果判定:

- a) 浊度检测:肉眼观察反应管内出现白色浑浊判定为阳性,未浑浊判为阴性;
- b) 荧光检测:加入荧光指示剂后,根据试剂盒说明书判定结果。

6.3 数字 PCR 技术

6.3.1 根据 PCR 仪器和试剂的要求制备反应体系,将体系分配到微小分区或微滴中并封盖,进行 PCR 反应。使用荧光染料或探针监测目标核酸的扩增,配套软件统计分析各反应中的阳性液滴数。

6.3.2 当阴性对照、阳性对照、内参(如有)结果成立时,进行结果判断,确定目标核酸及其定量信息,包括标本中每个荧光通道的浓度、精度、误差,依据试剂盒说明书进行结果判读。

6.4 高通量测序技术

6.4.1 单一病原体及靶向测序按照试剂盒说明进行目的基因的扩增富集纯化,纯化后产物进行文库构建、上机测序、数据分析等步骤。宏基因组测序对符合要求的核酸进行文库构建、上机测序、数据分析等。具体反应体系及反应程序参照相应测序平台及试剂盒说明书,根据应急检测实际选择是否执行去宿主操作。

6.4.2 单一病原体及靶向测序完成后,当序列覆盖度、测序深度满足质控标准时,可进行病毒分型与突变位点分析。宏基因组测序完成后,应先过滤背景核酸模型,找出标本中相对明确检出的微生物列表,分析微生物的序列特征及物种检出情况,最后结合临床资料综合分析判定。

7 免疫学应急检测技术

7.1 免疫胶体金技术

7.1.1 检测标本的类型、上样体积及操作步骤参照相应的试剂盒说明书。

7.1.2 实验完成后按照试剂盒的要求的时间对结果进行观察,当检测线和质控线均为阳性结果时,判定对应的检测项目阳性;当质控线为阳性,检测线为阴性结果时,判定对应的检测项目为阴性;当质控线为阴性时,判定结果为无效结果,需重复实验。

7.2 酶联免疫吸附测定技术(ELISA)

7.2.1 参照试剂盒说明书依次加入抗原包被(如需要)、待检标本上清及对照、酶标记物、底物、终止液,具体流程参照相应病毒 ELISA 检测试剂盒说明书。

7.2.2 以空白对照调零,读取酶标仪器上各孔 450 nm 和(或)492 nm 等波长的 OD 值,参照说明书要求设置参比波长并计算阳性值,判定结果。

7.3 化学发光技术

7.3.1 参照试剂盒说明依次加入磁性颗粒抗原包被、待检及对照血清、碱性磷酸酶标记的蛋白、底物、碱性磷酸酶催化底物液发光,具体流程参照相应病毒化学发光检测试剂盒说明书。

7.3.2 根据化学发光试剂盒的生物参考区间判定实验结果。每一批次化学发光实验过程中应做质控品,质控品结果成立时,进行结果判定。

参 考 文 献

- [1] GB/T 40226—2021 环境微生物宏基因组检测高通量测序法
 - [2] WS 271—2007 感染性腹泻诊断标准
 - [3] WS/T 792—2021 日本血吸虫抗体检测标准酶联免疫吸附试验法
 - [4] WS/T 799—2022 污水中新型冠状病毒富集浓缩和核酸检测方法标准
-