

附件 4

麻疹风疹实验室检测技术指南

一、标本采集

(一) 血标本。用不含抗凝剂的采血管采集病例出疹后 28 天内静脉血 2—3mL，标明采集日期和病例姓名、编号，待血液凝固、血块收缩后，1500rpm/min 离心 20 分钟分离血清。如没有离心机，可在室温或冷藏条件下放置至血清完全析出。将血清移至带垫圈的外螺旋无菌管中，避免吸到红血球。

(二) 病原学标本。

咽拭子标本：出疹当日至出疹后 5 天内采集，越早越好。在咽喉部用无菌采样拭子适度用力擦拭，获得上皮细胞。将拭子放入有外螺旋盖非灭活病毒采样管（加抗生素）中。

尿液标本：用 50mL 带螺旋盖的无菌塑料离心管无菌收集 30mL—50mL 中段尿液，2000rpm/min 离心 5 分钟后，弃上清，沉淀用 2mL 标本维持液或病毒运输液重悬。重悬后的标本-70℃冻存。未经离心的尿液不得冷冻。

二、标本运送

(一) 血标本。采集后应尽快分离血清，分离后的血清标本应在 2—8℃保存，并尽快运送到麻疹风疹网络实验室，如 7 天内不能送达的，应于-20℃以下保存，避免反复冻融。

(二) 病原学标本。标本 2—8℃保存，并尽快送达麻疹风疹网络实验室。如 48 小时内不能送达的，-70℃以下保存。无-70℃保存条件者，可在-20℃保存并于 1 周内送达。

三、实验室检测

(一) 血清学检测。常用的血清学检测方法是酶联免疫吸附试验(ELISA)。具体操作步骤和结果判定按照试剂盒说明书进行。

(二) 核酸检测。常采用实时荧光 RT-PCR 方法进行麻疹风疹病毒核酸检测。

1.提取核酸。常使用商品化的核酸提取试剂盒提取核酸，提取过程可手动或使用自动核酸提取仪提取。

2.结果判定。参照试剂盒说明书进行结果分析和判定。

(三) 基因分型。

1.提取核酸。常使用商品化的核酸提取试剂盒提取核酸，提取过程可手动或使用自动核酸提取仪提取。

2.靶基因扩增。使用商品化的 RT-PCR 试剂盒进行麻疹风疹病毒靶基因的扩增。

3.序列测定、整理和分析。将靶基因扩增产物进行序列测定，使用序列分析软件对获得的序列进行剪辑，获得靶基因序列，将其与 WHO 参考株进行序列比对，获得基因分型结果。

(四) 病毒分离。

病原学标本-70℃至少冻融一次，使病毒从上皮细胞释放。取 0.3mL—0.5mL 标本液接种于生长良好的单层传代细胞系如 Vero/

SLAM 上，37℃吸附 1 小时—2 小时后弃液，加入维持液，37℃培养，次日观察有无细胞毒性，必要时换液。接种后每天观察细胞病变效应（CPE），连续观察 7 天，如果有特征性的麻疹病毒 CPE 出现，观察至 75% 以上的细胞发生病变（CPE+++），-70℃冻存。若无 CPE，-70℃冻化 3 次，再盲传 1 代—2 代。风疹病毒 35℃分离培养效果更好，通常风疹病毒在细胞上没有明显的 CPE，可直接盲传三代后，-70℃冻存。

收获的病毒分离物可采用核酸检测的方法对麻疹风疹病毒进行鉴定。

四、生物安全

样本的采集、运送和实验室检测等各项活动均应遵守国家相关生物安全管理规定。