

ICS 11.020
CCS C 04

团 体 标 准

T/CPMA 0XX—202X

病原微生物菌(毒)种分离和鉴定方法
鼻病毒

Isolation and identification of pathogenic microorganisms—Human rhinoviruses

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持文件一并附上。

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

中华预防医学会 发布

目 次

前言.....II

引言..... III

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 缩略语..... 1

5 设备和材料..... 2

6 培养基和试剂..... 2

7 分离技术要求..... 3

8 鉴定技术要求..... 4

9 分离和鉴定程序..... 4

10 分离和鉴定方法..... 5

11 质量控制和生物安全要求..... 8

附录 A（资料性）鼻病毒病原学和流行病学..... 9

参考文献..... 10

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。

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。

本文件由中华预防医学会提出并归口。

本文件起草单位：中国医学科学院病原生物学研究所、中国疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所。

本文件主要起草人：王健伟、郭丽、任丽丽、魏强、相子春、韩俊、陈岚、王营、姜孟楠、赵元元。



引 言

人鼻病毒(Human rhinovirus, HRV)感染是约 50%的普通感冒、哮喘和慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)恶化的病因。鼻病毒三个种(species, A, B 和 C)包括约 160 余种公认的人类基因型。鼻病毒的感染大多数是轻微的和自限性的。病毒在 33℃~35℃时复制最优,因此感染常见于上呼吸道,引起持续性支气管痉挛性咳嗽,也可导致继发性细菌感染,如鼻窦炎和中耳炎。鼻病毒也可以在 37℃复制,因此也是引起幼儿和有免疫缺陷成人下呼吸道感染的第二大公认病因,引起肺炎、毛细支气管炎、支气管炎和支气管肺炎。近年来研究发现,鼻病毒感染还与慢性阻塞性肺疾病、哮喘和囊性纤维化的急性加重和住院时间延长有关。在社区获得性肺炎中,鼻病毒感染与呼吸衰竭显著相关。

流行病学研究表明,7 岁以下儿童比成年人更容易感染鼻病毒,几乎所有儿童在 2 岁之前都经历过鼻病毒感染,而哮喘患者更容易感染。

幼儿和有免疫缺陷成人出现下呼吸道感染,慢性阻塞性肺疾病、哮喘和囊性纤维化患者出现急性加重,社区获得性肺炎患者出现严重下呼吸道感染,应考虑进行鼻病毒的分离和鉴定,以明确感染的病因。

病原微生物菌（毒）种分离和鉴定方法 鼻病毒

1 范围

本文件规定了鼻病毒分离和鉴定的方法。

本文件适用于全国各级病原微生物菌（毒）种保藏机构，以及涉及人间传染的鼻病毒研究、教学、检测、诊断等相关活动的机构。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鼻病毒 human rhinovirus

与肠道病毒有相似的基因组结构，衣壳蛋白由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 组成的小 RNA 病毒科肠道病毒属的病毒。

注：是引起普通感冒的重要病原体，与其它肠道病毒不同的是，鼻病毒不耐酸，pH 值低于 5~6 时病毒活性不稳定。可在人宫颈癌细胞、人胚肺及二倍体细胞系或人胚气管器官培养中增殖。鼻病毒病原学和流行病学见附录 A。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE: 细胞病变效应 (Cytopathic Effect)

Ct: 循环阈值 (Cycle Threshold)

DMEM: 改良的 eagle 培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

FBS: 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum)

HRV: 鼻病毒 (Human Rhinovirus)

NCR: 非编码区 (Noncoding Region)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

PS: 青链霉素混合液 100× (Penicillin-Streptomycin Solution)

Q-PCR: 荧光定量 PCR (Quantitative Fluorescence PCR)

RT-PCR: 逆转录 PCR (Reverse Transcription PCR)

TCID₅₀: 半数组织培养感染剂量(50%组织细胞感染量) (Fifty-percent Tissue Culture Infective Dose)

VP: 病毒蛋白基因 (Virus Protein Gene)

5 设备和材料

鼻病毒分离和鉴定所用设备和材料为：

- a) 生物安全柜：Ⅱ级；
- b) 冰箱：4℃、-20℃、-80℃；
- c) 低温高速离心机；
- d) 荧光定量 PCR 仪；
- e) 普通 PCR 仪；
- f) CO₂ 培养箱；
- g) 水浴锅；
- h) 倒置显微镜；
- i) 水平电泳仪：包括电源、电泳槽、胶槽和梳子；
- j) 凝胶成像系统；
- k) 聚合仪；
- l) 超薄切片机；
- m) 透射电子显微镜；
- n) 微量移液器：量程 10 μL、200 μL 和 1000 μL；
- o) 八道移液器：量程 300 μL；
- p) 电动移液器：量程 10 mL；
- q) 无菌刻度移液管：10 mL；
- r) 无菌离心管：1.5 mL、15 mL 和 50 mL；
- s) 无菌吸头：10 μL、200 μL 和 1000 μL；
- t) PCR 管：0.2 mL；
- u) 细胞培养板：24 孔；
- v) 细胞培养瓶：T25、T75；
- w) 细胞冻存管：1.8 mL；
- x) 封口膜；
- y) 覆膜铜网；
- z) 包埋管。

6 培养基和试剂

鼻病毒分离和鉴定所用培养基和试剂为：

- a) 通用引物序列信息：参见表 1。
- b) 探针序列信息：参见表 1。
- c) 分型 PCR 引物信息：参见表 2。
- d) 5×TBE 电泳缓冲液：Tris 碱 54 g + 硼酸 27.5 g + Na₂EDTA • 2H₂O 3.72 g，加去离子水定容至 1 L。琼脂糖凝胶电泳时使用浓度为 0.5×。
- e) 50×TAE 电泳缓冲液：Tris 碱 242 g + Na₂EDTA • 2H₂O 37.2 g + 离子水 600 mL + 57.1 mL 的醋酸，加去离子水定容至 1 L。琼脂糖凝胶电泳时使用浓度为 1×。
- f) 琼脂糖。
- g) 溴化乙锭（EB）或其他替代核酸染料。
- h) 6×DNA 上样缓冲液。
- i) DNA 分子量标准（DNA Marker）：范围 100 bp~1000 bp。

- j) 细胞培养基: DMEM 高糖培养基 + 10% FBS + 1% PS。
- k) 病毒孵育液: DMEM 高糖培养基 + 1% PS。
- l) 病毒维持液: DMEM 高糖培养基 + 2% FBS + 1% PS。
- m) 鼻病毒培养敏感细胞: H1-Hela、Hela、WI-38、MRC-5、Wis.L。
- n) RT-PCR 试剂: 一步法 RT-PCR 试剂盒。
- o) 无 RNA 酶的水。
- p) 磷钨酸: 1%, pH6.8。
- q) 戊二醛: 2.5%, pH7.4。
- r) 二甲砷酸钠: 0.1 M, pH7.4。
- s) 四氧化钨: 1%。
- t) 乙醇: 50%、70%、90%、100%。
- u) 树脂。
- v) 乙酸双氧铀: 1%。
- w) 枸橼酸铅: 0.2%。
- x) 双蒸水。

7 分离技术要求

7.1 临床样本

临床样本为呼吸道感染者的鼻咽拭子、支气管肺泡灌洗液、气管分泌物、深度诱导痰等。

7.2 样本筛查

按照核酸提取试剂盒说明书提取样本核酸, 应利用鼻病毒通用引物和探针进行 Q-PCR 扩增。

7.3 PCR 内部质控

核酸提取和 PCR 扩增过程中应有质控, 每个检测体系应设阳性对照和阴性对照。

7.4 敏感细胞

A 种和 B 种鼻病毒敏感细胞为 H1-HeLa、HeLa、WI-38、MRC-5、Wis.L, 常用 H1-HeLa 进行病毒分离和培养。C 种鼻病毒用鼻窦黏膜组织进行分离, C 种鼻病毒不能用标准的组织培养方法进行培养。

7.5 病毒培养条件

病毒培养环境应保持温度 33℃~35℃, CO₂ 浓度 5%±0.1%。

7.6 病毒分离

分离方法按照 10.2 进行, 病毒分离成功时可见培养细胞出现明显 CPE, 表现为细胞肿胀、变圆、脱落等。无明显 CPE 时可将培养细胞冻融 2 次后盲传 3 代, 观察 CPE。

7.7 病毒滴度测定

应采用标准终点稀释法测定鼻病毒滴度 TCID₅₀, 测定方法按照 10.2.4 进行。

7.8 病毒分装

病毒液应分装于螺口冻存管中, 并记录病毒名称、代次、敏感细胞、病毒滴度、分装体积、冻存日

期、操作者等信息。

8 鉴定技术要求

8.1 基因型鉴定

8.1.1 应对鼻病毒基因 VP2/4 和/或 VP1 进行扩增测序，检测方法按照 10.3.1 进行。

8.1.2 对测得的病毒基因序列进行序列比对，判断病毒的种和基因型。

8.2 形态学鉴定

对分离的鼻病毒进行负染或制备超薄切片，利用电子显微镜进行形态学鉴定。检测方法按照 10.3.2 进行。负染后，电镜下可见鼻病毒具备小 RNA 病毒的形态学特征，无包膜、呈球形、直径约为 30 nm，偶可见空心病毒颗粒。超薄切片电镜下细胞质内可见高电子密度球形病毒颗粒，直径约 30 nm，有时病毒可聚集成结晶状病毒包涵体。

9 分离和鉴定程序

鼻病毒分离和鉴定程序流程见图 1。

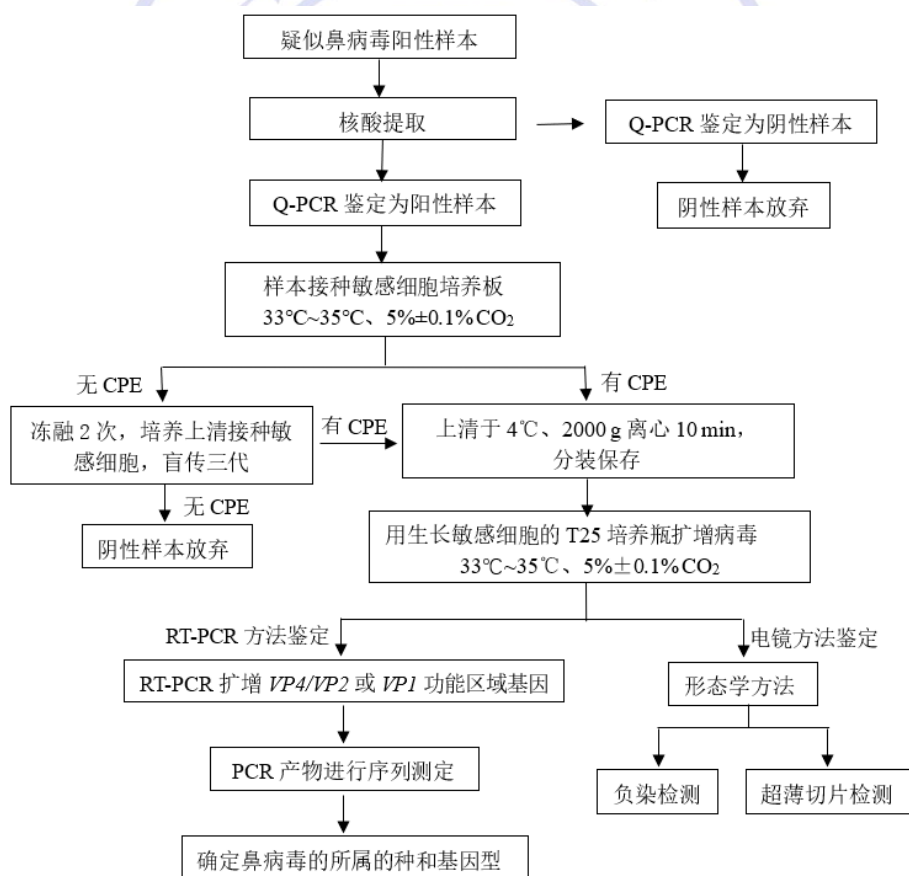


图 1 鼻病毒分离和鉴定流程

10 分离和鉴定方法

10.1 阳性样本筛查

10.1.1 通用引物和探针序列

通用引物和探针序列信息见表 1。

表 1 通用引物和探针序列信息

引物或探针	名称	5'~3' 序列	扩增区域
引物	RV_5NCR_F	CYAGCCTGCGTGGC	NCR
引物	RV_5NCR_R	GAAACACGGACACCCAAAGTA	
探针	RV_5NCR	TCCTCCGGCCCCTGAATGYGGC	

10.1.2 病毒 RNA 提取

根据试剂盒说明书提取样本 RNA。

10.1.3 反应体系

应根据商品化一步法 Q-PCR 试剂盒说明书进行。

示例：无 RNA 酶的水 7.5 μL ，2 \times RT-PCR 缓冲液 12.5 μL ，引物-探针混合物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）2 μL ，25 \times RT-PCR 酶混合物 1 μL ，病毒 RNA 2 μL ，共 25 μL 。

10.1.4 扩增条件

应根据商品化一步法 RT-PCR 试剂盒说明书进行。

示例：50 $^{\circ}\text{C}$ ，15 min；95 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min；95 $^{\circ}\text{C}$ ，15 sec，60 $^{\circ}\text{C}$ ，15~30 sec，至少 40 个循环。

10.1.5 结果判定

10.1.5.1 阴性，无扩增曲线，或 $C_t \geq 40$ 。

10.1.5.2 阳性， $C_t < 35$ 且具典型的“S”型扩增曲线。

10.1.5.3 可疑阳性，具有典型“S”型扩增曲线，但 C_t 在 35~40 之间，需重复试验确证。若重复试验 C_t 值 < 35 ，具有典型的“S”型扩增曲线，该样本判断为阳性，否则为阴性。

10.2 病毒分离

10.2.1 病毒接种

10.2.1.1 样本接种前一天将细胞传至 24 孔细胞培养板，次日细胞应至 60%~70% 丰度。

10.2.1.2 将呼吸道样本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10000 g 离心 20 min，吸出 100 μL 样本，加于 200 μL 孵育液中混合待用。

10.2.1.3 用不含血清的 DMEM 培养基清洗细胞两遍，将上述 300 μL 样本接种于细胞上，完全覆盖细胞，置于 33 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\pm 0.1\%$ CO_2 培养箱吸附 1 h。

10.2.1.4 吸弃病毒液，加入 500 μL 病毒维持液，置 33 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\pm 0.1\%$ CO_2 培养箱培养。设置正常细胞作为对照。

10.2.2 CPE 观察

按上述方法将样本接种细胞后，每 24 h 在倒置显微镜下观察 CPE，以 0%~25% 细胞 CPE 变化为“+”，26%~50% 细胞 CPE 变化为“++”，51%~75% 细胞 CPE 变化为“+++”，76%~100% 细胞 CPE

变化为“++++”。正常细胞形态为“-”。

10.2.3 培养物收集

当细胞出现 CPE 后，将细胞培养板置于-80℃冰箱和 37℃水浴冻融两次，将细胞培养上清于 4℃、2000 g 离心 10 min，离心后的上清液分装于冻存管中，并记录病毒名称、代次、细胞、日期、操作人等信息。

10.2.4 病毒滴度测定

10.2.4.1 细胞传代

以 1×10^4 cell/100 μ l/孔传代至 96 孔板，次日细胞应至 70%~80% 丰度。

10.2.4.2 病毒稀释

次日，用病毒孵育液将病毒进行 10 倍系列稀释， 10^{-1} ~ 10^{-8} 共八个稀释度，每个稀释度 8 个复孔。

10.2.4.3 细胞洗涤

弃细胞培养液，用不含血清的 DMEM 培养基清洗细胞两遍。

10.2.4.4 病毒孵育

将系列稀释的病毒接种到细胞上，置 33℃~35℃、5% \pm 0.1% CO₂ 培养箱孵育 1 h，留一排细胞不加病毒作为阴性对照。

10.2.4.5 细胞洗涤

弃病毒孵育液，用不含血清的 DMEM 培养基清洗细胞两遍。

10.2.4.6 病毒培养

每孔加入 100 μ l 病毒维持液，置 33℃~35℃、5% \pm 0.1% CO₂ 培养箱培养 5 d~7 d。

10.2.4.7 CPE 观察

倒置显微镜下观察 CPE，计数病变孔与非病变孔，计算 TCID₅₀。以观察该孔是否出现 CPE 确定该孔是否为阳性孔，假如某个梯度 8 个孔中共有 6 个阳性孔，则将该梯度的结果记为 6/8，依次类推。

10.2.4.8 计算病毒 TCID₅₀

用 Reed-Muench 公式计算病毒滴度。

Reed-Muench 计算公式 $TCID_{50} = \text{高于 } 50\% \text{ 死亡率的病毒稀释度的对数} + \text{距离比值} \times \text{稀释倍数} (10)$ 的对数。距离比值 = $(\text{高于 } 50\% \text{ 的百分数} - 50\%) / (\text{高于 } 50\% \text{ 的百分数} - \text{低于 } 50\% \text{ 的百分数})$ 。

10.3 病毒鉴定

10.3.1 RT-PCR 方法

10.3.1.1 分型引物信息

分型引物信息见表 2。

表 2 分型引物信息

引物名称	5'~3' 引物序列	扩增区域	长度
HRV-A/B F	GGGACCAACTACTTTGGGTGTCCGTGT	VP4/VP2	550 bp
HRV-A/B R	GCATCIGGYARYTTCCACCACCANCC		
HRV-C F	ACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC	VP4/VP2	330 bp
HRV-C R	TTTCCRATAGTGATTTGCTTKAGCC		

10.3.1.2 反应体系

利用商品化一步法试剂盒进行 RT-PCR 扩增，将细胞培养上清提取病毒 RNA，配置如下反应体系：
无 RNA 酶的水 8.5 μL ，2 \times 一步法混合物 12.5 μL ，基因特异性正向引物（10 μM ）1 μL ，基因特异性反向引物（10 μM ）1 μL ，病毒 RNA 2 μL 。

10.3.1.3 扩增条件

逆转录步骤根据试剂盒说明书进行：94 $^{\circ}\text{C}$ ~98 $^{\circ}\text{C}$ ，3 min（根据试剂盒说明书调整）；94 $^{\circ}\text{C}$ ~98 $^{\circ}\text{C}$ ，30 sec，55 $^{\circ}\text{C}$ ，30 sec，72 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min。

10.3.1.4 结果判定

PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，根据 PCR 产物大小初步判断是否为鼻病毒。PCR 产物利用分型引物进行双向序列测定，并进行序列拼接，通过序列比对判断鼻病毒的种和基因型。

10.3.2 电镜鉴定方法

10.3.2.1 负染检测

病毒培养上清或细胞冻融后，于 2000 g 离心 10 min。将 30 μL 上清滴在封口膜上，将载网有膜面接触样本，漂浮在样本上 5 min~10 min，夹起载网，吸除多余样本，以同样方式将载网漂浮在 1% 磷钨酸（pH6.8）上 1 min，夹起载网，吸除多余染液，置室温干燥后用透射电子显微镜检测。可见鼻病毒具备小 RNA 病毒的形态学特征，无包膜、呈球形、直径约为 30 nm，偶可见空心病毒颗粒。

10.3.2.2 超薄切片检测

10.3.2.2.1 固定

用细胞刮子刮下细胞，于 1000 g 离心 15 min，吸弃上清，细胞沉淀加入 2.5% 戊二醛（pH7.4）于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h，以 0.1 M 二甲砷酸钠（pH7.4）洗涤 10 min \times 3 次。以 1% 四氧化锇于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h，以双蒸水洗涤 10 min \times 3 次。

10.3.2.2.2 脱水与浸透

分别以 50%~70%~90%~100%~100% 乙醇进行梯度脱水，每次 10 min。分别以树脂:无水乙醇比例 1:1 和 3:1 各浸透样本 1 次，再用纯树脂浸透样本 2 次，每次 2 h。

10.3.2.2.3 包埋与聚合

将样本转移至包埋管，放入聚合仪内，按照树脂使用说明书设定温度进行聚合。

10.3.2.2.4 修块

聚合后的树脂块用刀片进行修块，暴露出细胞并将表面修整为等腰梯形。

10.3.2.2.5 切片

用超薄切片机对树脂块进行超薄切片，切片厚度为 50 nm~100 nm，以铜网捞取切片，置室温晾干。

10.3.2.2.6 染色

分别以 1%醋酸双氧铀和 0.2%枸橼酸铅染液进行染色，时间分别为 10 min 和 5 min，每次染色后以双蒸水洗涤铜网 10 min×3 次。

10.3.2.2.7 观察和结果判定

晾干载网，用透射电子显微镜观察。细胞质内可见高电子密度球形病毒颗粒，直径约 30 nm，有时病毒可聚集成结晶状病毒包涵体。

11 质量控制和生物安全要求

11.1 应制定病毒分离和鉴定等关键技术方法的标准操作程序，技术方法应经过至少两家独立实验室确认和验证。

11.2 细胞传代应保持在 10 代以内。

11.3 病毒应是纯培养物，无外源因子污染。

11.4 病毒的分离、培养、传代、滴度测定和鉴定等试验过程应记录并可溯源。

11.5 病毒分离、培养、滴度测定等操作应在生物安全二级实验室开展，所有操作应符合 GB 19489。

11.6 废弃样本应进行高压蒸汽灭菌处理，并做好销毁记录。

附 录 A

(资料性)

鼻病毒病原学和流行病学

鼻病毒 (human rhinovirus) 是人类呼吸道感染最常见的病毒之一, 也是引起普通感冒的主要病因。其中, rhinovirus 来自希腊语鼻“rhinos”和拉丁语 virus, 于 1956 年发现。鼻病毒在鼻腔内 33℃~35℃条件下增殖。鼻病毒属于小 RNA 病毒科肠道病毒属, 有三个种 (species, A, B 和 C) 包括约 160 余种公认的鼻病毒基因型, 它们的区别在于表面蛋白不同。

气溶胶和飞沫通过空气传播是鼻病毒传播的主要途径, 可经口鼻进入人体。也可通过直接和间接接触传播, 最常见的是“手-鼻-手”途径。潜伏期一般为 48 h~72 h。

鼻病毒感染一年四季均可发生, 秋季和春季患病率增加, 夏季最低。总体而言, 全年鼻病毒感染约占普通感冒的一半, 超过 80% 的感染发生在春季和秋季。在婴儿中可以检测到对多种鼻病毒的基因型反应, 在儿童和青少年时期, 基因型的数量增加。基因型特异性抗体的流行在青年人中达到高峰(平均阳性率为 60%), 并在整个成年期保持在 40%~50%。

在中国成人的鼻病毒感染中, 以 HRV-A 的感染率最高 (65%), 其次为 HRV-B (25%), HRV-C (10%) 的感染率最低。发热、咽部充血和头痛是鼻病毒感染患者最常见的临床症状。HRV-A 感染的患者上呼吸道症状的比例高于 HRV-B 和 HRV-C 感染的患者。而全身症状如寒冷和肌痛在 HRV-B 感染人群中更常见。在儿童的鼻病毒感染中, 以 HRV-A 感染率最高 (51.5%), 其次为 HRV-C (38.4%), HRV-B 的感染率最低 (10.1%)。患儿感染 HRV-A 和 HRV-B 后的疾病严重程度相当。不同的基因型在成人和儿童的流行存在差异, HRV-A 中的 A90 基因型和 HRV-B 中的 B48 基因型在成人中的流行率最高。而在儿童中, HRV-A 中的 A12 基因型和 HRV-B 中的 B42 基因型在儿童中的流行率最高。

根据原卫生部制定的《人间传染的病原微生物名录》(卫科教发〔2006〕15 号), 鼻病毒危害程度属于第三类, 未经培养的感染材料的操作、病毒分离、培养和滴度测定等操作在生物安全二级 (BSL-2) 实验室中进行, 采用 B 类 (UN3373) 包装运输。灭活材料和无感染性材料的操作在生物安全一级 (BSL-1) 实验室中进行。

鼻病毒没有脂质包膜, 有机溶剂如 75% 乙醇、0.1% 邻苯酚、乙醚、2% 戊二醛、1% 碘和家用漂白剂均可杀灭病毒。病毒在 56℃ 水浴加热 16 分钟后失活, pH=6 或 pH=3 环境快速完全失活。病毒在不锈钢、漆木、尼龙、醋酸酯、奥纶、涤纶、羊毛和丝绸上存活 3 h, 在棉质、人造丝、面巾纸和纸巾上存活 1 h, 在鼻粘膜中存活 24 h。干燥对病毒存活率无明显影响。

参 考 文 献

- [1] GB/T 37864—2019 生物样本库质量和能力通用要求
- [2] WS 315—2010 人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构设置技术规范
- [3] 中华人民共和国疫苗管理法（中华人民共和国主席令第 30 号）
- [4] 中华人民共和国生物安全法（中华人民共和国主席令第 56 号）
- [5] 病原微生物实验室生物安全管理条例（中华人民共和国国务院令第 424 号）
- [6] 国务院关于修改和废止部分行政法规的决定（中华人民共和国国务院令第 698 号）
- [7] 人间传染的高致病性病原微生物实验室和实验活动生物安全审批管理办法（中华人民共和国卫生部令第 50 号）
- [8] 人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构管理办法（中华人民共和国卫生部令第 68 号）
- [9] 人间传染的病原微生物名录（中华人民共和国卫科教发[2006]15 号）
- [10] 刘剑君, 魏强. 病原微生物保藏管理与技术手册[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2019
- [11] Field's Virology. 6th edition. EDITORS-IN-CHIEF: David M. Knipe. Peter M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins.
- [12] Xiang Z, Gonzalez R, Wang Z, Xiao Y, Chen L, Li T, Vernet G, Paranhos-Baccalà G, Jin Q, Wang J. Human rhinoviruses in Chinese adults with acute respiratory tract infection. *J Infect.* 2010 Oct;61(4):289-98.
- [13] Xiang Z, Gonzalez R, Xie Z, Xiao Y, Liu J, Chen L, Liu C, Zhang J, Ren L, Vernet G, Paranhos-Baccalà G, Shen K, Jin Q, Wang J. Human rhinovirus C infections mirror those of human rhinovirus A in children with community-acquired pneumonia. *J Clin Virol.* 2010 Oct;49(2):94-9.
- [14] Xiang Z, Gonzalez R, Xie Z, Xiao Y, Chen L, Li Y, Liu C, Hu Y, Yao Y, Qian S, Geng R, Vernet G, Paranhos-Baccalà G, Shen K, Jin Q, Wang J. Human rhinovirus group C infection in children with lower respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis.* 2008 Oct;14(10):1665-7
- [15] Ren L, Xiang Z, Guo L, Wang J. Viral infections of the lower respiratory tract. *Curr Infect Dis Rep.* 2012 Jun;14(3):284-91.



中华预防医学会

《病原微生物(毒)种分离和鉴定方法 鼻病毒》

团体标准编制说明

2021.4.15

一、工作简况

(一) 任务来源。2019年5月,中国医学院病原生物学研究所(以下简称“医科院病原所”)组织中国疾控中心、中国疾病预防控制中心病毒病所等有关单位联合申报了《鼻病毒的分离、鉴定和保存技术规范》团体标准。根据2020年3月27日《中华预防医学会关于公布2019年第一批团体标准立项项目的通知》,经专家会审,《鼻病毒的分离、鉴定和保存技术规范》(以下简称团标)正式批准立项。

(二) 协作单位。团标批准立项后,2020年4月,按照《中华预防医学会团体标准管理办法》等有关规定,医科院病原所作为团标牵头单位,组织中国疾控中心、中国疾病预防控制中心病毒病所等协作单位成立团标起草小组。

(三) 主要工作过程。

1、开展资料收集和调研。起草小组成立后,各成员分工协作,收集国内外相关资料,并对国内有关单位开展需求调研,为起草工作做好充分准备。

2、草拟团标初稿。根据申请内容、前期资料收集、前期工作基础和调研情况,牵头单位成员于2020年8月草拟团标初稿,以备起草小组讨论修改。

4、组织专家研讨过程稿。

在2021年1月26日在北京长白山国际酒店召开了标准编制工作组会议,2021年4月2日在中国疾病预防控制中心召开了标准编

制工作组会议，专门针对前期调研阶段的工作进行总结，并组织起草组内及起草组外的相关专家积极研讨；讨论的内容主要集中在行标的框架及行标的内容撰写。包括：

分离技术要求：从临床样本要求、鼻病毒的初步筛查、质量控制和敏感细胞系等方面提出要求。

鉴定技术要求：要求应用不同的技术方法进行鉴定，具有可行性。

分离和鉴定方法：对鼻病毒的分离和鉴定的方法进行描述，具有可操作性。

为了确保起草工作的有序展开，起草组内专家及相关领域的权威专家，2021年5月8日在中国疾病预防控制中心再次召开了、标准编制工作组会议，对《鼻病毒的分离、鉴定和保存技术规范》的初稿进行讨论，起草组认真听取专家意见，对有关意见进行梳理，并修改完善，初步形成团标“征求意见稿”。

5、论证征求意见

在起草组讨论、专家研讨等会议基础上，2021年5月28日，在苏州召开“生物资源挖掘保藏工程合作项目暨病原微生物保藏团体标准研讨会”上，邀请了10位相关领域专家，针对《鼻病毒的分离、鉴定和保存技术规范》等9项团体标准，邀请专家进行逐一讨论，进言献策。会上还邀请中华预防医学会卫生标准工作委员会冯岚秘书长解读团标制定的法规和政策，对团标的编写说明、如何体现编写过程，以及具体的编排、格式、顺序等内容，做了详细解读，并提出建设性的建议。同时会议征求超过10份相关专家的意见。

除了组织专门的征求意见稿论证会，起草组将征求意见稿发函至全国从事病原微生物相关的疾控部门、临床、教学、科研等

单位的专家征求意见,并对所有专家提出的意见进行汇总、分析、确认,修改,起草组修改形成团标上报“征求意见稿”。

6.形成预审稿,上报预审。

通过以上两方面的意见征集,共收集了来自疾控、科研、高校、临床、食药监等 11家机构的21条意见,其中涉及“标题名称”1条,“术语定义”6条,“缩略语”1条,“设备和材料”1条,“培养基和试剂”2条,“分离技术要求”1条。“鉴定技术要求”3条,“分离和鉴定程序”1条,“分离和鉴定方法”2条,“质量控制和生物安全要求”2条,“参考文献”1条,经过起草组组内对21条专家反馈意见进行逐项研究讨论,采纳21条并给出说明解释。

7.召开团标预审会议,形成征求意见稿。

根据学会要求,起草组于2021年8月27日在中国疾病预防控制中心组织召开团标预审会议,会议邀请位领域内来自疾控、科研、临床、高校和食药监的11位专家对征求意见稿进行预审,与会专家认真听取报告,充分讨论后通过预审并形成预审意见。针对提出的30条意见,标准起草组对标准的正文和附录部分再次逐条进行讨论研究,采纳 27条,未采纳3条,对预审稿进一步修订完善,于2021年9月形成了《病原微生物菌(毒)种分离和鉴定方法 鼻病毒》正式的公开征求意见稿。

(四)起草组成员及其所做的主要工作。

起草组成员主要来自医科院病原所、中国疾控中心、中国疾控中心病毒病所等单位。医科院病原所王健伟研究员和郭丽研究员作为团标主要起草人,搭建团标起草框架与内容,组织协调各成员分工协助、主持召开会议研讨与论证,整理专家意见并组织成员修改完善。

二、标准编制原则和确定标准主要内容

（一）编制原则。

1、权威性。起草小组由医科院病原所牵头，联合了中国疾控中心、中国疾控中心病毒病所等国家级科研院所和国家级疾控中心共同编写。医科院病原所、中国疾控中心和中国疾控中心病毒病所是国家卫生健康委指定的国家级保藏中心，同时也是国家病原微生物资源库依托单位，三家单位多年从事感染人类病毒的分离、鉴定和保藏工作。作为标准编写牵头单位的医科院病原所是国家为应对传染病对人类健康的重大挑战、加强传染病领域的研究力量、调整国家传染病防控和研发体系布局新组建的卫生行业中唯一专业从事传染病研究的国家级科研单位。起草小组成员来自上述单位从事鼻病毒疾控和科研的权威团队和专家，代表了我国鼻病毒研究和病原微生物保藏领域的最高水平。

2、民主性。起草过程中，起草小组广泛征求疾控、科研、教学、诊断、治疗等涉及鼻病毒分离和鉴定工作的各领域单位与专家意见。通过调研各单位，听取各单位、各领域专家的需求与建议，为起草工作做好准备，并及时对团标过程稿修改完善。

3、实用性。团标起草坚持从实际出发，从涉及全国各级病原微生物菌(毒)种保藏机构，以及涉及人间传染的鼻病毒研究、教学、检测、诊断、研发等相关工作需求出发，重点从目前困扰的问题，如病毒株的分离培养条件不够明确、鉴定标准不全面、信息不统一等最为迫切的问题入手，坚持重点突出，做深做细，以获得规范的鼻病毒分离和鉴定方法。

4、科学性。起草小组广泛收集了国内外相关资料，依托十三五传染病防治科技重大专项课题相关研究数据和产出，作为团体编制的支撑来源，确保团标内容的科学性、严谨性。

5、时效性。依据国家对病原微生物菌（毒）种保藏管理的

要求，团标主要解决保藏机构、科研和检测机构等对鼻病毒的分离和鉴定方法标准的需求，作为技术支撑部门，团标的起草与编制已有前期工作基础，在编制期间提供共享及技术支撑，并适时复审更新关注最新进展

（二）主要内容。

1、基本框架。团标包括了前言、引言、范围、规范性引用文件、术语和定义、缩略语、设备和材料、培养基和试剂、分离技术要求、鉴定技术要求、分离和鉴定程序、分离和鉴定方法、质量控制和生物安全要求、资料性附录、参考文献等主要部分。

2、主要内容。在团标的正文中，首先对鼻病毒分离和鉴定所需要的仪器和设备、培养基和试剂提出要求；对鼻病毒分离技术、鉴定技术等提出个性规范要求；对鼻病毒分离和鉴定程序进行规范；鼻病毒的分离和鉴定方法是成功分离病毒的基础和依据；同时从质量控制和生物安全角度提出了共性和个性规范要求。

3、资料性附录。增加资料性附录对鼻病毒的病原学进行说明。

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

目前，随着世界范围内人类活动的增加，人们感染各种病毒的机会也在不断增加，其中呼吸道病毒容易发生变异，新的病毒株和变异株不断出现，易引起新发突发传染病暴发流行，近十余年连续出现的全球重大传染病疫情中，多由呼吸道病毒引起，每次疫情的暴发都对社会稳定和经济发展造成严重冲击。因此，呼吸道病毒已成为全球传染病防控和研究的重点。鼻病毒（Human Rhinovirus, HRV）是导致人类呼吸道感染的重要病原，50%的普通感冒是由HRV感染引起的。既往研究认为，HRV 感染多可自

愈，且以轻症为主。随着检测技术的进展和对病原学研究的深入，发现鼻病毒感染还与慢性阻塞性肺疾病、哮喘和囊性纤维化的急性加重和住院时间延长有关。在社区获得性肺炎中，鼻病毒感染与呼吸衰竭显著相关。**HRV** 与其他呼吸道病原的共感染与患者症状加重密切相关。

鼻病毒毒株是进行传染病防控和相关科学研究的重大需求，是开展临床诊断、监测预警至关重要的依据，也是开展人群呼吸道疾病与健康状况调查的重要载体，可为传染病的科学研究、疫苗和药物研发提供重要的科技基础保障和服务，必将成为我国传染病防控能力提升的重要和关键环节和国家的战略储备。但是，目前我国尚缺乏标准的鼻病毒分离和鉴定的标准方法，鼻病毒毒株分离和鉴定等技术标准的缺乏，成为提高我国病原微生物资源质量的一个薄弱环节，更难以保障实验室生物安全并促进生物资源共享和产业现实的现实与长远需求。因此，适应国家生物安全形势与生物产业发展的需要，制定鼻病毒分离鉴定方法的技术规范，为我国鼻病毒防治、检测、诊断试剂及疫苗等医药产业发展以及病原微生物资源共享利用提供技术基础和保障，具有重要现实意义，未来将会产生良好的经济效益。

编制过程中，起草组利用中国医学科学院病原生物学研究所、中国疾控中心、中国疾控中心病毒病所等单位的有利条件，在现有各单位的鼻病毒毒株分离鉴定技术平台及资源保藏基础上，进行测试验证，与一线工作人员不断沟通磨合，检验指标实际应用的实用性与效果。同时本团标将为病原微生物菌（毒）分离和鉴定方法体系化建设提供参考及示范，进一步促进生物资源保藏及“十四五”卫生健康标准化体系建设，具有良好的社会效益。

四、标准涉及的相关知识产权说明

本标准起草过程中，特别关注有关知识产权问题，注意有关引用和参考的知识产权保护。标准中所涉及的术语定义引自国家病原微生物管理相关的重要法律、法规。在主要内容编写上，团标参考了本团标起草组在实际工作中建立的鼻病毒毒株分离鉴定标准操作规程，以及国内外权威期刊发表的鼻病毒分离和鉴定相关技术文献，突出鼻病毒分离和鉴定技术要求的特殊性，具有本团标自身特点。

五、采用国际标准的程度与水平的简要说明

本标准起草中，借助标准网（www.bbs.biaozhuns.com），ISO（www.ISO.org）广泛查阅检索国际有关标准与技术指南，未检索到鼻病毒相关的国际标准。

六、重大意见分歧的处理经过和依据

在标准起草过程中，起草组高度重视各单位和专家提出的有关意见，特别是一些重大分歧性意见。针对重大意见分歧，起草组秉持开放原则，充分听取各方代表意见，多次召开会议研讨，咨询不同专家意见，寻找各方共同接受内容，并逐渐达成共识，形成征求意见稿等重要阶段性材料。

有关重大意见分歧主要集中在：标准的题目和内容是否包涵鼻病毒保藏的内容。经多次反复研讨，并参考资料，为突出针对性和实用性及可行性原则，最终达成共识，本标准的题目和内容不包涵鼻病毒保藏的内容，将标准题目最终确定为“病原微生物菌（毒）种分离和鉴定方法 鼻病毒”，英文题目最终确定为“Isolation and identification of pathogenic microorganisms—rhinoviruses”，标准的相关内容根据的题目进行撰写。

七、其他应予说明的事项

病原微生物资源是涉及国家资源安全和生物安全重大战略问题，是实施总体国家安全基本方针的重要组成部分。2021年4月15日《中华人民共和国生物安全法》实施，对生物资源的规范管理提出了更高的要求。如何规范、安全、有效的分离和鉴定国家战略性病原微生物资源，满足重大疾病、生物防御紧急应对等战略需求，目前还缺乏较为完善、系统的保藏技术体系的支撑和保障。

人鼻病毒是人呼吸道感染主要病原之一，属于小 RNA 病毒科肠道病毒属，分为A、B 和C 三个种（species），HRV-A包括80 个基因型(genotype)、HRV-B 包括32 个基因型，HRV-C包括57个基因型。中国流行的鼻病毒多种基因型共存，不同的基因型在成人和儿童的流行存在差异，HRV-A中的A90和HRV-B中的B48在成人中的流行率最高。而在儿童中，HRV-A中的A12和HRV-B中的B42在儿童中的流行率最高。随着感染者和临床病人不断增加、感染人群的变化，鼻病毒的分离和鉴定在鼻病毒检测、监测及治疗工作中的运用需求也在不断增加。长期以来，我国鼻病毒分离和鉴定技术缺乏规范化的技术标准，缺乏获得具有代表性的毒株，很难实现资源交流共享，同时也给国家生物安全带来隐患。鼻病毒分离和鉴定标准的建立，在为各级疾控部门、科研单位和医疗机构检测工作提供技术支持，对重要呼吸道感染性疾病的防控提供重要支撑作用。