



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4793—2017

国境口岸疟原虫实时荧光 PCR 检测方法

Test methods for *Plasmodium* by real time PCR at ports

2017-05-12 发布

2017-12-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国汕头出入境检验检疫局、中华人民共和国广州机场出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：师永霞、李小波、朱俊贤、李燕、黄吉城、幸芦琴、洪烨、孙薇、钟玉清、相大鹏。

国境口岸疟原虫实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了国境口岸疟疾检测的生物安全要求,标本的采集、运输和保存,疟疾实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于国境口岸入出境疑似恶性疟、间日疟、卵形疟和三日疟感染对象的实时荧光 PCR 检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求
人间传染的病原微生物名录(卫科教发[2006]15 号)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

疟疾 **malaria**

由人类疟原虫感染引起的寄生虫病,主要由雌性按蚊叮咬传播。疟原虫先侵入肝细胞发育繁殖,再侵入红细胞繁殖,引起红细胞成批破裂而发病。临床上以反复发作的间歇性寒战、高热、继之出大汗后缓解为特点。

3.2

疟原虫 **Plasmodium**

属于真球虫目(Eucoccidiida)、疟原虫科(Plasmodidae)、疟原虫属(*Plasmodium*),是疟疾的病原体。寄生于人类的疟原虫有 4 种,即间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)及卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*),分别引起间日疟、恶性疟、三日疟和卵形疟。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

实时荧光 RT-PCR:实时荧光反转录-聚合酶链反应。

Ct 值:每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

DNA:脱氧核糖核酸。

FAM:FAM 荧光染料,一种荧光报告基团。

5 生物安全要求

疟原虫相关材料的实验活动按照 GB 19489 和《人间传染的病原微生物名录》中的生物安全要求进行。

6 人抗凝血清标本的采集、运输和保存

无菌采集疑似病例静脉血 3 mL~5 mL 至 2% EDTA-Na₂ 抗凝管,用耐低温油性记号笔记上编号,低温冷链送到实验室检测。如 24 h 内不能送到实验室,-20 ℃ 低温保存。实验室接到样本后,应尽快进行检测,并避免反复冻融。

7 主要仪器

- 本方法使用的主要仪器包括:
- 荧光定量 PCR 仪;
 - 超净工作台;
 - IIA 级生物安全柜;
 - 高压灭菌锅;
 - 低温高速离心机(最大离心力 20 000×g);
 - 漩涡振荡器;
 - 冰箱(4 ℃、-20 ℃和-70 ℃);
 - 移液器等。

8 主要试剂

本方法使用的主要试剂包括核酸提取试剂,如 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Blood Extraction Minikit 提取疟原虫核酸¹⁾、实时荧光 PCR 通用试剂如中国 CYbio 公司的 HR Qpcr Master Mix²⁾、染料掺入法荧光 PCR 试剂如 Qiagen 公司的 QuantiTect SYBRGreenPCR Kit³⁾、无 DNA 酶的双蒸水、引物和探针等,引物和探针序列见表 1。

表 1 疟原虫实时荧光 PCR 检测的引物和探针

引物/探针名称	序列(5'-3')	备注
Plas-FP	AGTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA	疟原虫通用
Plas-RP	TCATCCAAMRCCTAGTCGGCATAGTTTAT	
Plas-Pro	FAM-ACCGTCGTAATCTT-MGB	
PF-FP	CTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAA	恶性疟
PF-RP	TATTCCATGCTGTAGTATTCAAACACAA	
PF-Pro	FAM-TGTTTCATAACAGACGGGTAGTCATGATTGAGTTCA-BHQ1	

1),2),3)由指定单位提供,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

表 1（续）

引物/探针名称	序列(5'-3')	备注
PV-FP	ACGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT	间日疟
PV-RP	ACTTCCAAGCCRAAGCAAAGAAAGTCC	
PV-Pro	FAM-TTCGTATCGACTTTGTGCGCATTTTGC-BHQ1	
PO-FP	ATTAATGTGTCCTTTTCCCTATTCT	卵形疟,熔解曲线 T_m 值为 72.5 ℃
PO-RP	GCTTTACAATCAAACGAATACATTC	
PM-FP	CCGACTAGGTGTTGGATGATAGAGTAAA	三日疟
PM-RP	AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA	
PM-Pro	FAM-CTATCTAAAAGAAACACTCAT-MGB	

9 疟疾的实时荧光 PCR 检测

9.1 核酸提取

按试剂盒说明提取核酸,用于实时荧光 PCR 检测或-20 ℃储存 DNA 待检。

9.2 疟原虫通用实时荧光 PCR 检测

9.2.1 加样

制备实时荧光 PCR 反应液,反应体系为 25 μL(见表 2)。每个反应体系均设立阴性对照和阳性对照,阳性对照模板为根据疟原虫上下游引物间的核苷酸序列合成的 DNA 片段,阴性对照模板为不含疟原虫核酸的标本或无 DNA 酶的水。

表 2 疟原虫实时荧光 PCR 反应体系

反应成分	体积/μL
2×Master Mix	12.5
10 μmol/L 正向引物	1.25
10 μmol/L 反向引物	1.25
5 μmol/L 探针	1.25
无 DNA 酶的双蒸水	3.75
待测样本 DNA	5

9.2.2 实时荧光 PCR 扩增反应

在不同的荧光定量 PCR 仪上,TaqMan 探针实时荧光 PCR 的反应条件略有不同。以 ABI 7500HT 荧光定量 PCR 仪为例,实时荧光 PCR 检测扩增程序为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 10 s,58 ℃ 45 s,40 个循环,在 58 ℃收集荧光。如使用其他仪器,应根据其他仪器的要求进行适当调整。

9.3 疟原虫种特异性实时荧光 PCR 检测

9.3.1 加样

采用荧光探针法进行恶性疟、间日疟和三日疟的实时荧光 PCR 检测,分别在 3 个离心管中配制恶性疟、间日疟和三日疟的反应液,反应体系为 25 μ L(见表 2)。采用染料掺入法进行卵形疟的实时荧光 PCR 检测,反应体系为 25 μ L(见表 3)。每个反应体系均设立阴性对照和阳性对照,阳性对照模板分别为根据恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫和三日疟原虫上下游引物间的核苷酸序列合成的 DNA 片段,阴性对照模板为不含疟原虫核酸的标本或无 DNA 酶的水。

表 3 卵形疟原虫实时荧光 PCR 反应体系

反应成分	体积/ μ L
2 \times PCR buffer	12.5
10 μ mol/L 正向引物 PO-FP	0.75
10 μ mol/L 反向引物 PO-RP	0.75
无 DNA 酶的双蒸水	9
待测样本 DNA	2

9.3.2 实时荧光 PCR 扩增反应

在不同的荧光定量 PCR 仪上,TaqMan 探针实时荧光 PCR 的反应程序略有不同。ABI 7500HT 荧光定量 PCR 仪的扩增程序如下,如使用其他仪器,应根据其他仪器的要求进行适当调整:

- 荧光探针法实时荧光 PCR 检测扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 45 s,40 个循环,在 58 $^{\circ}$ C 收集荧光;
- 染料掺入法实时荧光 PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 15 min;94 $^{\circ}$ C 15 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s(收集荧光),40 个循环;最后对 PCR 产物进行熔解曲线分析,程序为 94 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,95 $^{\circ}$ C 15 s。

10 结果分析

10.1 阈值确定

一般是以荧光 PCR 反应的前 3 个~15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,以本底信号标准差的10 倍作为荧光阈值,以样品扩增产生的荧光信号达到荧光阈值时所对应的循环数为循环阈值(Ct 值)。

10.2 质量控制

- 反应结果应同时符合以下两个条件:
- 阴性对照无扩增曲线;
 - 阳性对照 Ct<35 并有明显扩增曲线。

10.3 结果判定

10.3.1 疟原虫通用引物探针检测结果判定

根据以下条件进行结果判定:

- 疟原虫通用引物和探针对应的检验样本无明显扩增曲线,且检测不到 Ct 值,判断为疟原虫荧光 PCR 检测阴性;
- 疟原虫通用引物和探针对应的检验样本 $Ct \leq 35$,并有明显扩增曲线,判断为疟原虫荧光 PCR 检测阳性。可使用疟原虫种特异性引物和探针进行进一步的疟原虫种类鉴定;
- 疟原虫通用引物和探针对应的检验样本 Ct 值大于 35 且小于 40 的标本应重做。若重做结果仍然有明显扩增曲线,则判断为疟原虫荧光 PCR 检测阳性,否则为阴性。

10.3.2 疟原虫种特异性引物探针检测结果判定

根据以下条件进行结果判定:

- 某种种类疟原虫引物和探针对应的检验样本无明显扩增曲线,且检测不到 Ct 值时,判断为该种类疟原虫荧光 PCR 检测阴性;
- 某种种类疟原虫引物和探针对应的检验样本 $Ct \leq 35$,并有明显扩增曲线,判断为该种类疟原虫荧光 PCR 检测阳性;
- 某种种类疟原虫引物和探针对应的检验样本 Ct 值大于 35 且小于 40 的标本应重做。若重做结果仍然有明显扩增曲线,则判断为该种类疟原虫荧光 PCR 检测阳性,否则为阴性。