

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4067—2014

### 进出境猴麻疹病毒病检疫技术规范

Quarantine protocol for measles to entry-exit monkey

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施



中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 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：中华人民共和国海南出入境检验检疫局、中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局、中华人民共和国云南出入境检验检疫局、中华人民共和国新疆出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：李丹丹、徐义刚、艾军、季新成、徐维加、林志雄、吴山楠、黄纪徽。

# 进出境猴麻疹病毒病检疫技术规范

## 1 范围

本标准规定了猴麻疹病毒的病原分离、病毒中和试验、实时荧光定量 PCR 试验、阻断 ELISA 抗体试验的技术要求。

本标准适用于进出境猴麻疹病毒的检疫。

## 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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 2025 动物检疫实验室生物安全操作规范

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

B95a 细胞:猴猴淋巴瘤母细胞

CPE:致细胞病变作用(cytopathic effect)

Ct 值:荧光信号到达设定的阈值所经历的循环数(cycle threshold)

ELISA:酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay)

MV:麻疹病毒(measles virus)

TCID<sub>50</sub>:半数组织培养感染量(tissue culture infective dose)

## 4 初步诊断

该病的介绍参见 A.1,可根据临床诊断和病理变化进行初步诊断,参见 A.2、A.3,确诊还需实验室诊断。

## 5 病毒分离

### 5.1 设备和器材

倒置光学显微镜、二氧化碳培养箱、冰箱(−20 ℃, −70 ℃)、50 μL、100 μL 微量可调移液器、无菌 96 孔细胞培养板、无菌塑料滴头、无菌塑料离心管(1.5 mL)或 5 mL~10 mL 无菌玻璃试管、无菌棉拭子。

### 5.2 试剂和材料

5.2.1 病毒: MV 病毒标准毒株。实验环境和防护要求见 GB 19489。

5.2.2 血清: MV 标准阳性血清、阴性血清。

5.2.3 被检样品: 病猴呼吸道或血液采集标本。若需要长途运输, 应将病料置于含有高浓度抗生素运输液中(每毫升 5 000 IU 青霉素, 5 000  $\mu\text{g}$  链霉素和 10  $\mu\text{g}$  两性霉素 B)。

5.2.4 细胞: 原代人胚肾细胞或其他原代细胞如人羊膜、人胚肺、猴肾等或人二倍体细胞或传代细胞如 B95a 细胞, 一般不超过四代, 按常规胰酶消化方法制备。

5.2.5 培养液: 199 培养液、生长液中加 10% 胎牛血清, 维持液中加 3% (或无) 胎牛血清, 含青霉素 200 IU/mL、链霉素 200  $\mu\text{g}$ /mL。

5.2.6 细胞分散液: 0.25% 胰蛋白酶。

### 5.3 样品采集

宜在皮疹出现前, 柯氏斑出现时采集样品。将灭菌棉棒稍蘸液体 (2% 牛血清 Eagle 液), 反复涂抹病猴咽部数次, 然后将棉棒浸于放入 2 mL 含有高浓度青霉素和链霉素的无钙镁 PBS 液中 (1 mL ~ 1.5 mL) 反复挤压。加肝素抗凝的血液白细胞中也可分离病毒。

### 5.4 病毒培养

取 0.1 mL ~ 0.2 mL 样品液接种于生长在试管中的单层原代人胚肾细胞 (或其他原代细胞如人羊膜、人胚肺、猴肾等或人二倍体细胞或传代细胞如 B95a 细胞) 上, 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h 后弃液, 再加入含双倍常规抗生素量的细胞维持液 1 mL, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养。开设未接种样品的空白对照培养。逐日观察, 待 80% ~ 90% 细胞出现病变时收获病毒悬液冻融或超声波处理后, 3 000 r/min 10 min, 取上清液, 分装小瓶, 置 -70  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。若未见病变需连续盲传三代, 每次培养观察 2 周, 如仍不出现病变则为阴性。

## 6 病毒中和试验

### 6.1 病毒繁殖

收获 B95a 细胞上出现 CPE 的病毒悬液, 复传一代, 待 CPE 达 85% 以上, 收获病毒培养物冻融 1 次, 3 000 r/min 10 min, 取上清, 分装置 -70  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 6.2 病毒毒力测定

制备的病毒抗原或购进的标准病毒抗原, 用维持液将其作 10 倍递增稀释至  $10^{-8}$ , 每一梯度病毒稀释液接种细胞培养板八孔, 每孔 50  $\mu\text{L}$ 。随后每孔加入细胞悬液 ( $3 \times 10^5$  个细胞/mL) 100  $\mu\text{L}$  和细胞培养液 50  $\mu\text{L}$ 。同时, 每板设 8 孔细胞对照。置 37  $^{\circ}\text{C}$  二氧化碳培养箱培养, 从 24 h ~ 168 h 逐日观察细胞病变, 按 Karber 方法计算培养细胞半数感染量 ( $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ )。

### 6.3 中和测定

6.3.1 细胞对照: 设 4 孔正常细胞对照, 每孔加细胞悬液 100  $\mu\text{L}$  ( $3 \times 10^5$  个细胞/mL)、细胞维持液 100  $\mu\text{L}$ 。

6.3.2 阴性对照: 设 4 孔阴性对照, 每孔加阴性血清和 100  $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$  病毒悬液各 50  $\mu\text{L}$ , 再加入细胞悬液 100  $\mu\text{L}$  ( $3 \times 10^5$  个细胞/mL)。

6.3.3 病毒回归对照: 将被鉴定病毒稀释成 1 000、100、10、1、0.1  $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ , 每个稀释度作 4 孔, 每孔加入病毒悬液 50  $\mu\text{L}$ , 再加入细胞悬液 100  $\mu\text{L}$  ( $3 \times 10^5$  个细胞/mL), 补充细胞维持液 50  $\mu\text{L}$ 。

6.3.4 中和: 用 100  $\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$  猴麻疹病毒分离毒株与猴麻疹病毒标准阳性血清 (效价不低于 1: 32) 作微量中和试验。试验在 96 孔组织培养板上进行, 阳性血清、阴性血清经 56  $^{\circ}\text{C}$  30 min 灭能。



标准阳性血清作 1 : 10 稀释,平行作 4 孔,每孔加 1 : 10 稀释的阳性血清和 100 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L 病毒各 50  $\mu$ L,振荡 3 min~5 min,置 37  $^{\circ}$ C 中和 1 h,加入细胞悬液 100  $\mu$ L( $3 \times 10^5$  个细胞/mL),置 37  $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱培养。

## 6.4 结果判定

当病毒对照在 100 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L~300 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L 出现 CPE,阴性、正常细胞对照成立时,才能进行判定。判定时间为 24 h~168 h。经 1 : 10 稀释的猴麻疹病某型标准阳性血清能与病毒中和,使 50% 以上的细胞不出现 CPE 者判为阳性,即为鉴定病毒的血清型。

## 7 实时荧光 PCR 实验

### 7.1 设备和器材

荧光定量 PCR 仪;高速冷冻离心机;旋涡混匀器;恒温循环水浴槽;低温冰箱;可调单头微量移液器(0.1  $\mu$ L~2.5  $\mu$ L,0.5  $\mu$ L~10.0  $\mu$ L,10  $\mu$ L~100  $\mu$ L,20  $\mu$ L~200  $\mu$ L)。

### 7.2 试剂和材料

#### 7.2.1 病毒基因组 RNA 提取试剂盒。

#### 7.2.2 引物和探针:

上游引物:5'-TCCGATACAACCTACCACCTACA-3'

下游引物:5'-ATCGCTGTCCTCAACAACCC-3'

荧光探针:5'-FAM-TGGTGCCCCAGGTCAGAGTCATAGAT-TAMRA-3'

#### 7.2.3 对照设立:

阳性对照:用已知 MV 病毒阳性组织制备的模板。

阴性对照:用已知 MV 病毒阴性组织制备的模板。

空白对照:用等体积的水代替模板。

### 7.3 操作方法

#### 7.3.1 RNA 的提取

7.3.1.1 在样品处理区进行。所有 RNA 提取器皿用 DEPC 水浸泡 24 h,灭菌后方可使用。

7.3.1.2 取  $n$  个 1.5 mL 灭菌离心管,其中  $n$  为待检样品数、一管阳性对照、一管阴性对照和一管空白对照之和,对每管进行编号标记。

7.3.1.3 每管加入 750  $\mu$ L Trizol,然后分别加入待检样品、阳性对照和阴性对照、去离子水各 250  $\mu$ L,混匀,静置 5 min;再加入 200  $\mu$ L 三氯甲烷,混匀,静置 5 min,于 4  $^{\circ}$ C 条件下,12 000 r/min 离心 15 min。

7.3.1.4 取相同数量的 1.5 mL 灭菌离心管,加入 500  $\mu$ L 异丙醇(-20  $^{\circ}$ C 预冷),对各个管进行对应编号。吸取离心后各管中的上清液转移至相应的新管中,上清液约吸取 500  $\mu$ L(注意不要吸出中间白色絮状层),轻轻颠倒均匀。

7.3.1.5 于 4  $^{\circ}$ C 条件下,12 000 r/min 离心 15 min。取出离心管,轻轻倒去上清液,加入 1 mL 75%乙醇,颠倒洗涤。

7.3.1.6 于 4  $^{\circ}$ C 条件下,12 000 r/min 离心 15 min。取出离心管,轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干。

7.3.1.7 每管加入 20  $\mu$ L 灭菌 DEPC 水,轻轻混匀,溶解管壁上的 RNA,2 000 r/min 离心 5 s,冰上保

SN/T 4067—2014

备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增或放置于  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 7.3.2 实时荧光定量 RT-PCR 反应体系

使用 One Step Prime Script<sup>TM</sup> RT-PCR Kit (ABI 7500) 试剂盒进行实时荧光 RT-PCR, 也可使用其他等效的荧光 PCR 检测试剂盒。25  $\mu\text{L}$  反应体系中含有  $2\times$  One Step RT-PCR Buffer III 12.5  $\mu\text{L}$ , Ex Taq HS 0.25  $\mu\text{L}$ , Prime Script RT Enzyme Mix II 0.25  $\mu\text{L}$ , 上游引物 (浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ )、下游引物 (浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ ) 和探针 (浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 5.5  $\mu\text{L}$ , RNA 模板 5  $\mu\text{L}$ 。

### 7.3.3 荧光 PCR 反应的循环程序

将 PCR 管放入荧光 PCR 热循环仪中, 按下列程序进行猴麻疹病毒核酸扩增:  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 min,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  2 min,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $59.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, 45 个循环, 收集荧光信号。

## 7.4 结果判定

### 7.4.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪音情况进行调整, 以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点为准。

### 7.4.2 质控标准

空白对照: 无 Ct 值并且无扩增曲线。

阴性对照: 无 Ct 值并且无扩增曲线。

阳性对照: Ct 值应小于或等于 35.0, 并出现特定的扩增曲线。

有效原则: 如空白对照、阴性对照和阳性对照不满足以上条件, 此次实验视为无效。

### 7.4.3 结果描述及判定

7.4.3.1 同时进行的阴性、阳性和空白对照实验结果正常, 待检样品无荧光增幅现象, 则判断样品中未检出猴麻疹病毒病原。

7.4.3.2 同时进行的阴性、阳性和空白对照实验结果正常, 待检样品有明显的荧光增幅曲线, 且 Ct 值小于或等于 35 时, 则判断样品中检出猴麻疹病毒病原阳性。

7.4.3.3 同时进行的阴性、阳性和空白对照实验结果正常, 待检样品荧光增幅曲线的 Ct 值介于 35 和 40 之间时, 应重新进行实时荧光 PCR 检测。若重新检测的 Ct 值大于或等于 40 时, 则判断样品中未检出猴麻疹病毒病原。若重新检测的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间, 则判断样品中检出猴麻疹病毒病原阳性。

## 8 ELISA 抗体检测试验

### 8.1 设备和器材

可检测 450 nm 波长的酶标仪、培养箱、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱、微量移液器、96 孔酶标板、吸管、量筒等。

### 8.2 试剂和材料

包被液、抗原和单抗稀释液、血清稀释液、PBST、底物液和终止液的配置方法见 B.6。

### 8.3 操作步骤

#### 8.3.1 包被

用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释抗原(猴麻疹病毒或表达蛋白)至工作浓度,包被 96 孔 ELISA 反应板,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜。

#### 8.3.2 洗板

甩去板中液体,每孔加 200  $\mu\text{L}$  PBST 缓冲液,洗板 3 次,每次 5 min,拍干。

#### 8.3.3 封闭

每孔加入 200  $\mu\text{L}$  含 5%脱脂乳的 PBST 封闭液,37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h。

#### 8.3.4 洗板

按 8.3.2 操作进行。

#### 8.3.5 加样

加入已经稀释的待检血清,在微量孔内分别加入 100  $\mu\text{L}$  阴性对照、阳性对照和 1:25 倍稀释的待检血清。留一个孔为底物空白使用。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。

#### 8.3.6 洗板

按 8.3.2 操作进行。

#### 8.3.7 加单抗

加入工作浓度酶标猴麻疹单克隆抗体(空白孔除外),每孔 100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。

#### 8.3.8 洗板

按 8.3.2 操作进行。

#### 8.3.9 加底物

每孔加入 100  $\mu\text{L}$  底物显色液 TMB(包括空白孔),37  $^{\circ}\text{C}$  避光作用 10 min。

#### 8.3.10 终止

每孔加入 2 mol/L 硫酸 50  $\mu\text{L}$ ,终止反应。在 10 min 内测各孔 OD 值。

#### 8.3.11 读数

用酶标仪在 450 nm 波长下,测定其吸光值。

### 8.4 结果判定

强阳性血清抑制率  $PI$  大于或等于 85%,弱阳性血清抑制率  $PI$  在 45%~65%之间,阴性血清 OD 值在 0.8~1.4 之间。试验成立,可进行结果判定。

被检血清  $PI$  大于或等于 45%的,判为阳性;被检血清  $PI$  小于 35%的,判为阴性;被检血清  $35\% \leq PI < 45\%$  的,判为可疑,需重新检验。如重新检验结果仍为  $35\% \leq PI < 45\%$  的,则判为阳性。

SN/T 4067—2014

$PI$  按式(1)计算:

$$PI = \left( 1 - \frac{\text{被检或阳性血清 OD 值}}{\text{阴性血清平均 OD 值}} \right) \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$PI$ ——血清抑制率, %。



附 录 A  
(资料性附录)  
简介

### A.1 猴麻疹病毒介绍

麻疹是麻疹病毒引起的急性呼吸道传染病,主要症状有发热、上呼吸道感染、眼结膜炎等,而出现红色斑丘疹和颊粘膜上有麻疹粘膜斑为其特征,该病主要通过呼吸道传播,患猴咳嗽、喷嚏时,病毒随飞沫排出,直接到达易感猴的呼吸道或眼结膜而致感染,患猴为唯一传染源。一般认为出疹前后 5 d 均有传染性,该病传染性强,易感猴直接接触后 90% 以上可发病。实验猴麻疹是造成断奶仔猴死亡的重要传染病之一。据统计,在断奶仔猴中麻疹发病率为 5%,死亡率为 90%。2006 年底至 2007 年在中国南方部分实验猴养殖场曾出现实验猴麻疹,致死率高达 90%,给实验猴养殖业造成了极大的经济损失,也直接影响到科学研究的开展。

### A.2 临床诊断

主要症状有发热,流涕、喷嚏、咳嗽、流泪、畏光,眼结膜充血等,而以皮肤出现红色斑丘疹和口腔颊粘膜上有麻疹粘膜斑为其特征。

### A.3 病理变化

当麻疹病毒侵犯各类组织和细胞时,主要引起炎症,有广泛单核细胞浸润和细胞坏死、融合形成多核巨细胞,此种巨细胞大小不等,形状不一,可含 100 个以上的细胞核,胞质内及胞核内均可见到嗜酸性包涵体,也可见到聚合的病毒衣壳体,尤以胞质内为多。在单核巨噬细胞系统中见到的多核巨细胞称为华-佛巨细胞(Warthin-Finkeldey cell),广泛存在于咽部淋巴组织、扁桃体、支气管旁及肠系膜淋巴结、阑尾及肠壁淋巴组织中;在呼吸道和肠道黏膜、皮肤上皮表层等组织找到的融合多核巨细胞称之为上皮巨细胞。呼吸道卡他症状明显时,呼吸道上皮巨细胞常从表面脱落,可在呼吸道分泌物中找到,有一定诊断意义。麻疹皮疹病理活检中可找到典型的上皮巨细胞,皮肤上皮细胞肿胀,空泡变性,出现坏死,继而角化脱屑。皮疹真皮层毛细血管内皮细胞肿胀、增生,伴淋巴细胞和组织细胞浸润,血管扩张,也曾在皮疹处找到病毒抗原。科氏斑病变与皮疹相仿,可坏死成小溃疡,大多为病毒血症结果,而非原发病灶。

附 录 B  
(规范性附录)  
试剂配制

B.1 培养液

199 培养液(或 MEM 培养基),加入 10%无病毒抗体的胎牛血清,抽滤除菌,加青霉素 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,链霉素 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

B.2 维持液

199 培养液(或 MEM 培养基),加入 3%无病毒抗体的胎牛血清,抽滤除菌,加青霉素 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,链霉素 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

B.3 细胞分散液

胰蛋白酶	2.50 g
乙二胺四乙酸二钠(EDTA)	0.20 g
无钙镁 PBS	1 000 mL

混匀抽滤除菌。

B.4 0.01 mol/L pH 7.4PBS

氯化钠(NaCl)	8.0 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.15 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.2 g
一级水	1 000 mL

将上述成分依次溶解、分装、高压灭菌(68.94 kPa 15 min)或抽滤除菌备用。

B.5 Eagle 液

B.5.1 原液甲

氯化钠(NaCl)	68.0 g
氯化钾(KCl)	4.0 g
磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	1.4 g
葡萄糖	10.0 g

将以上各成分溶解于水中,加水至 500 mL。加三氯甲烷 1 mL 防腐,至 0  $^{\circ}\text{C}$ ~4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

B.5.2 原液乙

氯化钠(NaCl)	2.0 g
-----------	-------

氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	1.7 g
0.4%酚红液	50 mL

将以上各成分溶解于水中,加水至 500 mL。加三氯甲烷 1 mL 防腐,至 0℃~4℃冰箱备用。

### B.5.3 Eagle 液配置

按下述比例配成 Eagle 氏液

原液甲	1 份
原液乙	1 份
一级水	18 份

68.94 kPa 15 min 灭菌后,至 0℃~4℃冰箱备用。使用时加 7.5%碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )液调 pH 7.2~7.6。

## B.6 ELISA 试剂

**B.6.1** 包被液(碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液, pH 9.6):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.5 g,  $\text{NaHCO}_3$  2.9 g, 加蒸馏水至 1 000 mL, 调 pH 至 9.6。

**B.6.2** 封闭液(含 5%脱脂乳的 PBS):

NaCl	137 mmol/L
KCl	2.7 mmol/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	10 mmol/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 mmol/L
脱脂乳	5%

**B.6.3** 底物显色液:TMB。

**B.6.4** 终止液(1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液):浓硫酸 10.87 mL 缓慢加入 50 mL 蒸馏水中,然后补加蒸馏水至 89.13 mL。

**B.6.5** PBST 液:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.15 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 g
水	1 000 mL

使用前加入 0.05%吐温-20。

实验用水应符合 GB/T 6682 的要求。