



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4346.8—2015

国境口岸烈性接触性传染病卫生检疫 技术规范 第8部分：实验室检测

Technical specification for health quarantine to the fulminating and highly fatal
contagious diseases at frontier ports—Part 8: Laboratory detection

2015-12-04 发布

2016-07-01 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

SN/T 4346《国境口岸烈性接触性传染病卫生检疫技术规范》分为 10 个部分：

- 第 1 部分：总则；
- 第 2 部分：风险评估与预警；
- 第 3 部分：风险交流；
- 第 4 部分：交通工具、货物及集装箱卫生检疫查验；
- 第 5 部分：人员及行李卫生检疫查验；
- 第 6 部分：境外病例转运专用包机卫生检疫；
- 第 7 部分：卫生处理；
- 第 8 部分：实验室检测；
- 第 9 部分：个人防护；
- 第 10 部分：保障。

本部分为 SN/T 4346 的第 8 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本部分主要起草人：李小波、林燕如、肖利力、黄吉城、孙肖红、郑夔、师永霞、冯庆文、袁帅、毕英杰。

国境口岸烈性接触性传染病卫生检疫 技术规范 第 8 部分:实验室检测

1 范围

SN/T 4346 的本部分规定了国境口岸入出境人员以接触传播为主要传播途径的烈性传染病实验室检测。实验室检测流程包括样本采集、处理,实验室检验程序、方法,结果判定及相关的生物安全要求。

本部分适用于口岸入出境人员烈性接触性传染病实验室检测。

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

SN/T 1439 国境口岸埃博拉病毒分子生物学检测方法

SN/T 3558 马尔堡病毒 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 检测方法

SN/T 4346.9 国境口岸烈性接触性传染病卫生检疫技术规范 第 9 部分:个人防护

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

人间传染的病原微生物名录 卫生部

3 实验室资质要求

进行本标准规定的烈性接触性传染病检测的实验室须为通过国家 CNAS 认可并获得国家卫生和计划生育委员会实验活动资质认定的生物安全三级实验室。实验室生物安全应符合 GB 19489 相关规定;聚合酶链反应(PCR)防污染措施按照 WS/T 230 执行。

4 检测对象

入出境口岸疑似感染埃博拉出血热、马尔堡出血热等烈性接触性传染病的人员。

5 样本采集、处理

5.1 由于烈性接触性传染病传染风险大,样本采集过程存在很大的生物安全风险,一般以采集患者血样为主,采样过程中应做好个人生物安全防护。一般发病 14 d 内,可在患者血样中检测到病毒核酸和抗原;发病 10 d~14 d 后的血样中可检出特异性抗体。

5.2 血液样本采集:静脉采集疑似病人抗凝全血 5 mL。样本采集、运送人员应严格按照相关规定做好个人生物安全防护,所有使用过的消耗品均须进行严格的消毒灭菌处理。

5.3 血液样本保存、运输:样本采集后,应于 4℃ 以下生物安全送样箱中尽快送到有资质的实验室检测,或-70℃ 以下保存待检。样本保存、运输过程中须严格按照国家高致病性菌、毒种相关规定进行,个人生物安全防护详见 SN/T 4346.9。

6 检测方法

6.1 分子生物学检测

6.1.1 适用样本范围

适用于人全血样本中烈性接触性传染病病原体核酸的检测。

6.1.2 主要仪器和设备

下列仪器和设备适用于本部分:

- 生物安全柜;
- 高压灭菌器;
- 普通冰箱;
- 水浴锅或金属浴;
- 冷冻离心机(带密封的离心安全杯,转速可达 20 000g);
- 实时荧光 PCR 仪。

6.1.3 主要试剂

下列试剂适用于本部分:

- 核酸提取试剂:使用 QIAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Mini Kit¹⁾,详见说明书;
- 一步荧光 RT-PCR 反应体系构建使用 AMBION 公司的 AgPath-ID™ One-step RT-PCR Kit¹⁾试剂盒进行;
- TRIZOL 试剂。

6.1.4 血液样本处理

在具备检测活动资质的实验室生物安全柜内,取 100 μL 全血样本与 1 mL TRIZOL 试剂轻柔颠倒混合(1:10 比例),室温放置 10 min 备用,此操作过程应尽量轻柔,严格控制生物气溶胶的产生。

6.1.5 RNA 提取

6.1.5.1 采用 QIAGEN 公司的病毒 RNA 提取试剂盒以 QIAamp Viral RNA Mini Kit,德国 QIAGEN 公司产品为例¹⁾,内含 AVL、AW1、AW2、AVE 等成分。

6.1.5.2 取上述作用后的标本 140 μL 加入 560 μL 裂解缓冲液(Lysis buffer, AVL),在旋涡混合器上振荡 15 s 混匀,室温静置 10 min。

6.1.5.3 加入 560 μL 无水乙醇终止反应,在旋涡混合器上振荡 15 s 混匀。

6.1.5.4 裂解后的液体分两次移入管柱,每次 6 000 g 离心 1 min,此时病毒 RNA 会吸附在管柱底部的膜上。

1) 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。

6.1.5.5 加 500 μL 洗液(AW1)至管柱上,6 000 g 离心 1 min,弃去 AW1。

6.1.5.6 加 500 μL 洗液(AW2)至管柱上,20 000 g 离心 3 min,弃去 AW2,进一步 20 000 g 离心 1 min 以彻底去除残留在膜上的乙醇。

6.1.5.7 加入 60 μL 洗脱液(AVE),室温静置 1 min。

6.1.5.8 将管柱置于 1.5 mL 离心管上,温度 4 $^{\circ}\text{C}$,6 000 g 离心 1 min,得到的 RNA 即可进行实时荧光 RT-PCR 检测。

6.1.6 实时荧光 PCR 检测

埃博拉病毒核酸检测按照 SN/T 1439 执行。

马尔堡病毒核酸检测按照 SN/T 3558 执行。

其他病毒检测参照相应的标准执行。

6.2 血清学检测

6.2.1 双抗体夹心法 ELISA 检测核蛋白抗原

6.2.1.1 适用样本范围

适用于人血清样本中烈性接触性传染病病原体核蛋白抗原的检测。

6.2.1.2 主要仪器和设备

下列仪器和设备适用于本部分:

- 恒温培养箱;
- 含波长 450 nm 的酶标仪;
- 洗板机;
- 移液器。

6.2.1.3 主要试剂

双抗体夹心法 ELISA 抗原检测试剂盒。

6.2.1.4 样本处理

血清样本 60 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 1 h 后,置于生物安全三级实验室核心工作区生物安全柜内。在洗板机废液收集桶内加入含 10%有效氯的消毒剂,加入量为废液桶总体积的 5%。

6.2.1.5 操作步骤

操作步骤如下(具体参照试剂盒说明书进行):

- a) 将试剂盒在冰箱中取出,放置室温平衡 30 min,使用前将试剂轻轻震荡混匀。
- b) 配液:将新鲜配制的洗液注入洗板机的洗液桶内。
- c) 编号:将样本对应微孔板编号,每板设阴性对照 3 孔,模拟阳性对照 2 孔和空白对照 1 孔。
- d) 加稀释液:每孔加稀释液 20 μL ,空白孔除外。
- e) 加样:分别在相应孔中加入待测样本或阴阳性对照各 100 μL ,空白孔除外。
- f) 温育:用封板膜封板后,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min。
- g) 加酶:每孔加酶标试剂 50 μL ,空白孔除外,轻轻震荡混匀。
- h) 温育:用封板膜封板后,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。
- i) 洗板:小心揭掉封板膜,用洗板机洗涤 5 遍。

SN/T 4346.8—2015

- j) 显色:每孔加入显色剂 A、显示剂 B 各 50 μL ,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 30 min。
- k) 测定:每孔加终止液 50 μL ,10 min 内测定结果。设定酶标仪波长于 450 nm 处(建议使用双波长 450 nm/600 nm~650 nm 检测),用空白孔调零后测定各孔 A 值。
- l) 清洗、消毒洗板机:按洗板机内置程序分别采用蒸馏水、20%乙醇和 75%乙醇进行清洗消毒,30 min 后,再用蒸馏水清洗。

6.2.1.6 结果判定

临界值计算:临界值=0.1+阴性对照组 A 值均值(阴性对照组 A 值低于 0.05 者以 0.05 计算)。

阴性对照的正常值范围:阴性对照孔 $A \leq 0.1$ 。

阳性对照的正常值范围: $A \geq 0.50$ 。

阳性判定:样品 A 值 \geq 临界值者为病毒抗原阳性。

阴性判定:样品 A 值 $<$ 临界值者为病毒抗原阴性。

6.2.2 抗体捕捉法 ELISA 检测 IgM 抗体

6.2.2.1 适用样本范围

适用于人血清样本中烈性接触性传染病病原体的 IgM 抗体检测。

6.2.2.2 主要仪器和设备

下列仪器和设备适用于本部分:

- 恒温培养箱;
- 含波长 450 nm 的酶标仪;
- 洗板机;
- 移液器。

6.2.2.3 主要试剂

抗体捕捉法 IgM 抗体检测试剂盒。

6.2.2.4 样本处理

血清样本 60 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 60 min 后,置于生物安全三级实验室核心工作区生物安全柜内。

在洗板机废液收集桶内加入含 10%有效氯的消毒剂,加入量为废液桶总体积的 5%。

6.2.2.5 操作步骤

操作步骤如下(具体参照试剂盒说明书进行):

- a) 将试剂盒在冰箱中取出,放置室温平衡 30 min,使用前将试剂轻轻震荡混匀。
- b) 配液:将新鲜配制的洗液注入洗板机的洗液桶内。
- c) 加稀释液:每孔加入样本稀释液 100 μL ,空白及阴阳性对照孔除外。
- d) 加样:在相应孔中加入待测样本 10 μL ,轻轻振荡混匀,阴、阳性对照加 100 μL 。
- e) 温育:用封板膜封板后,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。
- f) 洗板:小心揭掉封板膜,用洗板机洗涤 5 遍。
- g) 加酶:每孔加酶标试剂 100 μL ,空白孔除外。
- h) 温育:用封板膜封板后,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。
- i) 洗板:小心揭掉封板膜,用洗板机洗涤 5 遍。

- j) 显色:每孔加入显色剂 A、显色剂 B 各 50 μL ,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min。
- k) 测定:每孔加终止液 50 μL ,轻轻震荡混匀,10 min 内测定结果。设定酶标仪波长于 450 nm 处,用空白孔调零后测定各孔 A 值。
- l) 清洗、消毒洗板机:按洗板机内置程序分别采用蒸馏水、20%乙醇和 75%乙醇进行清洗消毒,30 min 后,再用蒸馏水清洗。

6.2.2.6 结果判定

临界值计算:临界值=0.1+阴性对照组 A 值均值(阴性对照组 A 值低于 0.05 者以 0.05 计算)。

阴性对照的正常值范围:阴性对照孔 $A \leq 0.1$ 。

阳性对照的正常值范围: $A \geq 0.50$ 。

阳性判定:样品 A 值 \geq 临界值者为病毒 IgM 抗体阳性。

阴性判定:样品 A 值 $<$ 临界值者为病毒 IgM 抗体阴性。

7 生物安全措施

《人间传染的病原微生物名录》规定,埃博拉病毒、马尔堡病毒等危害程度分类为第一类,所有相关的实验室操作应按照规定执行:

- 埃博拉病毒、马尔堡病毒培养和动物感染实验须在生物安全四级(BSL-4)实验室内进行;
- 未经培养的埃博拉病毒、马尔堡病毒感染性材料的操作须在生物安全三级(BSL-3)实验室内进行,操作实验室应获得国家相关认可资质;
- 埃博拉病毒、马尔堡病毒相关的灭活材料和无感染性材料操作可在生物安全二级(BSL-2)实验室内进行;
- 埃博拉病毒、马尔堡病毒等感染性材料运输包装分类为 A 类,UN 编号为 UN2814;
- 其他要求按 GB 19489 进行。