

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4399—2015

### 国境口岸伯氏疏螺旋体实时荧光 PCR 检测方法

Detection with real-time PCR for *Borrelia burgdorferi* at frontier port

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

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：中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局、军事医学科学院微生物流行病研究所。

本标准主要起草人：鞠文东、杨德文、王艳梅、孙毅、程成、徐宁、付维明、丁淑丽、包力。

# 国境口岸伯氏疏螺旋体实时荧光 PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了国境口岸伯氏疏螺旋体(三种常见基因型 *B.garinii*, *B.b.s.s* 和 *B.afzelii*)的检验对象、方法、生物安全要求及结果判定。

本标准适用于国境口岸伯氏疏螺旋体(三种常见基因型 *B.garinii*, *B.b.s.s* 和 *B.afzelii*)的实时荧光 PCR 的检测。

## 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/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 1312 国境口岸森林脑炎监测规程

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**伯氏疏螺旋体** *borrelia burgdorferi*

细胞外寄生、微嗜氧型的螺旋体,经蜱传播,是引起人体莱姆病(Lyme disease)的病原体,引起的临床症状多样,除慢性游走性红斑和关节炎外,还常伴有心脏损害和神经系统受累等症状。

## 4 检测对象

4.1 疑似感染伯氏疏螺旋体的临床样本如血液及其他组织样本。

4.2 从出入境交通工具、集装箱及口岸地区等场所采集的游离蜱及从上述场所宿主动物体表采集的寄生蜱。

4.3 出入境交通工具、集装箱及口岸地区等场所的宿主动物。

## 5 生物安全和分子生物学检测防污染要求

5.1 检测工作中的个人防护按照 GB 19489 的规定执行。

5.2 实验室应遵循 GB 19489 对生物安全 2 级实验室(BSL-2)的生物安全要求。

5.3 使用过的实验用品应按照 GB 19489 对废弃物的处理要求进行无害化处理。

## 6 仪器和试剂

### 6.1 仪器和器材

本方法使用主要仪器和设备如下:

- 实时荧光定量 PCR 仪及配套 PCR 反应管；
- 生物安全柜；
- 高速台式离心机(最高离心力 12 000 g 以上)；
- 台式离心机(最高离心力 2 000 g 以上)；
- 漩涡振荡器；
- 恒温水浴锅；
- 高压灭菌锅；
- 低温冷藏、冷冻冰箱；
- 微量可调移液器(10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1 000  $\mu$ L)及配套带滤芯吸头；
- Eppendoff 管。

## 6.2 主要试剂

- 除另有规定外,所有化学试剂均采用分析纯。
- 实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 溶菌酶(20 g/L)、蛋白酶 K(10 g/L)、RNA 酶(10 g/L)、150  $\mu$ L 酚、三氯甲烷、异戊醇混匀液。
- PCR 反应液:ABI 公司的 PCRMIX<sup>1)</sup>,品名为 Taqman Universal Master Mix II, with UNG 1-pack。
- 荧光 PCR 引物、探针:应为色谱纯。
- 阳性菌株或质粒:与相应 PCR 引物、探针匹配。
- 用于荧光 PCR 检测的伯氏疏螺旋体通用引物和探针序列如下:  
Reverse primer 5'-AGC CTT AAT AGC ATG C/TAA GCAAAA TG-3'  
Forward primer 5'-CTA GTG TTT TGC CAT CTT CTT TGA AAA-3'  
Probe FAM 5'-GCG CTG TTT TTT TCA TCA AGG CTG CTA AC-3'-TAMRA

## 7 检测程序

### 7.1 样本的采集

#### 7.1.1 血液样本

无菌方法采集血液,EDTA 抗凝后无菌试管 4℃保存,立即送检。

#### 7.1.2 人体组织样本

人体组织样本,如典型红斑或溃疡斑组织切片、关节液、脑脊液等可作为病原学检测样本,无菌保存后立即送检。

#### 7.1.3 蜱及宿主动物样本

蜱及宿主动物采集后首先进行分类鉴定,按照 SN/T 1312 进行。

### 7.2 样本的运送与保存

样本运输采用冰壶加冰或泡沫盒加冰密封运输。对于不立即检测的样本,可保存于-20℃待检。

---

1) 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和推荐。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。



### 7.3 样本的前处理

#### 7.3.1 血液样本

无需处理可直接用于核酸提取。

#### 7.3.2 人体组织样本

组织切片用无菌生理盐水研磨至匀浆状,4℃保存,作分离培养、PCR检测备用。

#### 7.3.3 蜱及宿主动物样本

取同种类的蜱或者宿主动物组织约50 mg,加入无菌生理盐水研磨至匀浆状,4℃保存,备用。

### 7.4 样本的DNA提取

在上述样本的匀浆液或血液样本200 μL加入200 μL DNA提取液充分混匀,沸水浴10 min(误差不超过1 min)。16 200 g离心5 min,上清可直接作为荧光PCR反应的DNA模板。也可以使用商品化的DNA提取试剂盒并按其说明书操作。

### 7.5 实时荧光PCR反应液配置

反应体系设置为20 μL,组成如下:PCRMIX 10 μL,上游引物(10 μmol/L)1 μL,下游引物(10 μmol/L)1 μL,DNA模板2 μL,探针(5 μmol/L)1 μL,ddH<sub>2</sub>O 5 μL。依据上述反应体系配制待检样本、阳性对照品、阴性对照品的荧光PCR检测反应液,并置于PCR反应管中。

### 7.6 PCR扩增

PCR反应管置于荧光PCR仪上,反应参数设置为:50℃ 2 min;95℃ 10 min;后接45个循环:每个循环变性95℃ 15 s,退火57℃ 60 s,57℃收集荧光信号。所有相同的样品和对照都设有两孔以进行平行检测。因不同荧光PCR仪的性能差异,可通过条件优化适当调整PCR循环的温度和时间。

## 8 结果判定及报告

### 8.1 基线和阈值设定

基线调整取6个~15个循环的荧光信号,阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性对照品的检测荧光曲线的最高点,也可根据仪器噪声情况调整。

### 8.2 检测结果的判定

在实时荧光PCR实验中,若阳性对照有明显的荧光增幅现象,且Ct值在预期的范围之内(≤35);阴性对照和空白对照无荧光增幅现象,则表明反应体系运行正常,可以进行结果判定,否则,实验视为无效,需重新实验。

当同时进行的阳性、阴性和空白对照实验结果正常,本方法检验结果判定及报告如下:

- 检测样品无荧光增幅现象,判为阴性,报告“未检出伯氏疏螺旋体特异性基因(实时荧光PCR法)”;
- 检测样品有明显的荧光增幅曲线,且Ct值≤35时,判为阳性,报告“检出伯氏疏螺旋体特异性基因(实时荧光PCR法)”;
- 检测样品荧光增幅曲线的Ct值介于35和40之间时,应重新进行检测。若重新检测的Ct值

SN/T 4399—2015

仍介于 35 和 40 之间,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性,报告“检出伯氏疏螺旋体特异性基因(实时荧光 PCR 法)”;如果曲线无明显的对数增长期,则判为阴性;

——检测样品荧光增幅曲线的 Ct 值介于 40 和 45 之间时,建议采用浓缩方式处理核酸样本,再重新进行实时荧光 PCR 检测。若重新检测的 Ct 值有明显减少趋势,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性,报告“检出伯氏疏螺旋体特异性基因(实时荧光 PCR 法)”。此类样本建议用其他方法进一步验证:否则判为阴性,报告“未检出伯氏疏螺旋体特异性基因(实时荧光 PCR 法)”。

---