

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4462—2016

国境口岸 O1 群和 O139 群霍乱弧菌和 霍乱肠毒素三重实时 PCR 的检测方法

Detection method for O1 serotype、O139 serotype *vibrio cholera* and enterotoxin
by triplex real-time fluorescence PCR at frontier port

2016-03-09 发布

2016-10-01 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：中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国珠海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：周冬根、王燕、李红、孙大为、郑剑宁、裘炯良、倪敏君、张升、张锜、杨天赐、莫秋华。

国境口岸 O1 群和 O139 群霍乱弧菌和 霍乱肠毒素三重实时 PCR 的检测方法

1 范围

本标准规定了国境口岸 O1 群和 O139 群霍乱弧菌以及霍乱肠毒素基因三重实时 PCR 检测方法检验的对象、标本采集、检验程序及结果判定报告。

本标准适用于国境口岸对 O1 群和 O139 群霍乱弧菌以及霍乱肠毒素基因的实验室检测。

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

WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

O1 群霍乱弧菌 O1 serotype *vibrio cholera*

菌体抗原由 3 种抗原因子 A、B、C 组成,又可分为 3 个血清型:小川型、稻叶型和彦岛型。根据表型差异,O1 群霍乱弧菌的每一个血清型还可分为 2 个生物型,即古典生物型和 El Tor 生物型。

3.2

O139 群霍乱弧菌 O139 serotype *vibrio cholera*

其临床表现及传播方式上与 O1 群霍乱弧菌完全相同,但不能被 O1 群霍乱弧菌诊断血清所凝集,抗 O1 群的抗血清对 O139 菌株无保护性免疫。在水中的存活时间较 O1 群霍乱弧菌长。

3.3

霍乱肠毒素 *vibrio cholera enterotoxin*

是目前已知的致泻毒素中最为强烈的毒素,是肠毒素的典型代表。作用于肠细胞膜表面上的受体,导致肠黏膜细胞分泌功能大为亢进,使大量体液和电解质进入肠腔而发生剧烈吐泻。

4 检测对象

4.1 疑似病人的排泄物、呕吐物。

4.2 被霍乱弧菌污染或有霍乱弧菌污染嫌疑的交通工具、行李、货物、集装箱、邮包、饮用水、压舱水、污水、餐饮用具、生活用品。

5 主要仪器设备

本方法使用的主要仪器如下:

- 超净工作台；
- 二级生物安全柜；
- 微型混合器、涡旋振荡器；
- 冰箱：4℃；-20℃；
- 恒温金属浴；
- 普通台式离心机；
- 高速冷冻离心机(离心力可达 20 000 g)；
- 可调式微量加样器(10 μL、100 μL、1 000 μL)及配套带滤芯吸头；
- 荧光 PCR 检测仪。

6 主要试剂

本方法使用的主要试剂如下：

- Qiagen multiplex PCR kit 检测试剂盒¹⁾；
- 无 DNA 酶的 DEPC 水；
- 引物和探针：引物和探针序列见表 1。

表 1 荧光 PCR 检测的引物和探针

引物/ 探针名称	序列(5'-3')	扩增片段 大小/bp
O1-F	CCAGATTGTAAAGCAGGATGGA	163
O1-R	GGTCATCTGTAAGTACAAC	
O1-P	FAM-CCCGGAGTTTGTAAAGCCCACTACCGGG-DABCYL	
O139-F	CATACCAACGCCCTTATCCATT	120
O139-R	GCATGACTGGCATCCCAAAAT	
O139-P	HEX-CGGGTGAGAAAAGACAGCAATAACACCCG-DABCYL	
ctxA-F	TCCGGAGCATAGAGCTTGA	80
ctxA-R	TCGATGATCTTGGAGCATTCC	
ctxA-P	CY5-CCGTGGATTCATCATGCACCGCCACGG-DABCYL	

7 检验程序

7.1 样本采集

7.1.1 粪便样本采集

采集自然排出的新鲜大便于灭菌容器中，水样便采集 1 mL~3 mL，成形便采集 1 g~3 g；亦可用已湿润的直肠棉拭由肛门插入直肠内 3 cm~5 cm 处并轻轻旋转，确保退出的棉拭上有可见的粪便，把棉拭放入灭菌容器中。粪便样本宜在发病早期(发病 4 d 内)，服用抗菌药物之前采集。

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。

7.1.2 呕吐物样本采集

采集自然呕吐的呕吐物于灭菌容器中,水样呕吐物采集 1 mL~3 mL,非水样呕吐物采集 1 g~3 g。

7.1.3 水样采集

7.1.3.1 直接采集法

用灭菌容器采集水样。饮用水、压舱水用灭菌容器采集 500 mL 样本;江、湖、河、海、塘或井水则采集岸边 20 cm 深度以内的表层水 500 mL,放于灭菌容器中。采集的水样宜尽快(3 h 内)送到实验室。不能在 3 h 内送检的,宜在采水点即将 50 mL 10 倍浓缩碱性蛋白胨水(见附录 A 中 A.1)加入 450 mL 水样中,混匀。

7.1.3.2 纱布块集菌法

用中心系有 1 m 以上线绳的 20 cm×20 cm 灭菌脱脂纱布块放在采水点的水中,将线绳固定于岸边物体上,放置过夜(16 h~24 h),次日将吸着水(约 18 mL)的纱布块放入灭菌容器中送实验室。

7.1.4 物体表面样本的采集

用灭菌棉拭蘸以碱性蛋白胨水涂抹可疑部位,置于灭菌容器中。

7.2 样本保存与运送

7.2.1 因霍乱弧菌对低温敏感,样本不需要冷藏保存运送,只须将用于霍乱弧菌检验的样本置于室温运送和保存。实验室收到的样本应按照 GB 19489 要求,一般宜当天做到直接分离或/和增菌后分离。

7.2.2 不能于当天进行检验的样本,可选择 4℃~8℃保存,24 h 内检验。

7.2.3 采集的粪便或呕吐物样本不能立即送检时(3 h 内),宜根据运送时间,选择样本传递保存方式。如运送时间小于 8 h,将样本放入碱性蛋白胨水中传递。如运送时间大于 8 h,将样本放入 Cary-Blair 二氏运送培养基(见附录 A 中 A.2)中传递,带有样本的棉拭宜完全地插入 Cary-Blair 二氏运送培养基底部。

7.3 样本处理

7.3.1 水样的处理

取 450 mL 用直接采集法采集的水样,以 1 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 8.4~9.2。

7.4 增菌培养

7.4.1 粪便样本的增菌培养

取水样便约 1 mL 或成形便约 1 g 或棉拭样本放入 8 mL~10 mL 碱性蛋白胨水中,成形便要磨碎,轻轻摇匀;35℃~37℃培养 6 h~8 h。

7.4.2 水样的增菌培养

在经 pH 调节后的用直接采集法采集的 450 mL 水样中,加入 10 倍浓缩碱性蛋白胨水 50 mL,为抑制杂菌可再加入 1%亚碲酸钾 0.25 mL~0.5 mL 和 1 000 U/mL 青霉素 1 mL,35℃~37℃培养 16 h~24 h;对用纱布块集菌法采集的水样,将 50 mL 碱性蛋白胨水加入盛有纱布块样本的灭菌容器中,可再加 1%亚碲酸钾 0.05 mL 和 1 000 U/mL 青霉素 0.15 mL,35℃~37℃培养 16 h~24 h。

SN/T 4462—2016

7.4.3 用棉拭涂抹法采集的样本的增菌培养

将用棉拭涂抹法采集的样本棉拭,放入 8 mL~10 mL 碱性蛋白胨水中,35 ℃~37 ℃培养 6 h~8 h。

7.5 细菌核酸的提取

7.5.1 煮沸裂解法

取 1 mL 增菌液放入 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 10 min;弃上清液,加入 100 μL DNA 提取液(见附录 A 中 A.3)充分悬浮沉淀,100 ℃沸水浴 10 min;冷却至室温,12 000 r/min 离心 5 min,离心取上清液作为 PCR 扩增的模板。

7.5.2 试剂盒提取纯化核酸法

按适用于细菌基因组提取的商品试剂盒说明书操作,如 QIAamp DNA mini kit 试剂盒。

7.6 阳性对照、阴性对照和空白对照设置

检测过程中应按照 WS/T 230 执行,分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照为分别根据 O1 群霍乱弧菌目标扩增基因序列、O139 群霍乱弧菌目标扩增基因序列及霍乱肠毒素基因(ctxA)目标扩增基因序列经体外化学合成、载体构建的 DNA 片段,阴性对照为可选择其他种类弧菌的核酸样本,空白对照用无菌水作为荧光 PCR 反应的模板。

7.7 多重荧光 PCR 反应体系组成

具体配制见表 2。

表 2 样本三重荧光 PCR 检测反应体系

名称	体积/μL
2×multiplex PCR master mix	12.5
O1-F(100 μmol/L)	0.15
O1-R(100 μmol/L)	0.15
O1-P(50 μmol/L)	0.25
O139-F(100 μmol/L)	0.1
O139-R(100 μmol/L)	0.1
O139-P(50 μmol/L)	0.1
ctxA-F(100 μmol/L)	0.1
ctxA-R(100 μmol/L)	0.1
ctxA-P(50 μmol/L)	0.1
去离子水	7.35
DNA 模板	4
总计	25.0

7.8 三重荧光 PCR 反应

将加好样的 PCR 反应管分别转移到荧光 PCR 检测仪上进行扩增反应,程序设置为以 ABI Prism

7500 fast 型全自动荧光定量 PCR 检测仪为例说明,将荧光信号设置为:Reporter Dye:O1 群霍乱弧菌为 FAM,O139 群霍乱弧菌为 HEX,霍乱肠毒素为 CY5,Quencher Dye:BHQ1,Passive reference 选择 None。荧光 PCR 扩增程序按照表 3 中的程序进行设置,反应总体积为 25 μ L。对于其他型号的荧光定量 PCR 仪应按实际机型进行反应程序设置,没有 ROX 荧光通道的荧光定量 PCR 仪,不进行 ROX 的设置。

表 3 样本实时荧光 PCR 反应程序

步骤	反应温度	时间	采集荧光信号	循环数
变性	95 $^{\circ}$ C	15 min	否	1
扩增及荧光收集	95 $^{\circ}$ C	15 s	否	40
	57 $^{\circ}$ C	1 min	是	
	72 $^{\circ}$ C	15 s	否	

7.9 荧光域值的设定

PCR 反应完成后应设定荧光阈值以分析样品的 Ct 值。以 PCR 反应的前 3 个~15 个循环的荧光信号作为基线信号(噪音),Ct 值理论上定义为基线信号的标准偏差的 10 倍。在实际应用中可以根据仪器基线信号进行人工调整,设定原则是以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线(无规则的噪音线)的最高点,且不出现 Ct 值为准。

8 检验结果判断及报告

在荧光 RT-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(≤ 32);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如下:
- 检测样品有明显的荧光增幅曲线,且 Ct 值 ≤ 35 时,判为阳性。
 - 检测样品荧光增幅曲线的 Ct 值介于 35 和 40 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,否则判为阴性。此类样本建议用其他方法进一步验证。
 - 检测样品无荧光增幅现象,判为阴性。
- 结果报告模式见表 4。

表 4 结果报告模式

反应液	模式 1	模式 2	模式 3	模式 4	模式 5
O1 群霍乱	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
O139 群霍乱	阴性	阴性	阳性	阴性	阳性
霍乱肠毒素	阴性	阳性	阳性	阴性	阴性
结果报告	霍乱弧菌核酸阴性	O1 群霍乱弧菌核酸阳性,且含有毒素基因	O139 群霍乱弧菌核酸阳性,且含有毒素基因	O1 群霍乱弧菌核酸阳性	O139 群霍乱弧菌核酸阳性

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 碱性蛋白胨水

A.1.1 成分

成分如下:

- a) 蛋白胨:10.0 g;
- b) 氯化钠:10.0 g;
- c) 蒸馏水:1 000 mL。

A.1.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解,调至 pH 至 8.4~8.8,分装,每支试管 8 mL~10 mL 或每瓶 225 mL,121 °C 高压灭菌 20 min(10 倍碱性蛋白胨水的蛋白胨和氯化钠量增加 10 倍)。

也可用市场上销售的碱性蛋白胨水。

A.2 Cary-Blair 二氏运送培养基(C-B 半固体保存培养基)

A.2.1 成分

成分如下:

- a) 硫乙醇酸钠:1.5 g;
- b) 磷酸氢二钠:1.1 g;
- c) 氯化钠:5.0 g;
- d) 琼脂:5.0 g;
- e) 蒸馏水:1 000 mL;
- f) 1%氯化钙溶液:9 mL。

A.2.2 制法

除 1%氯化钙溶液外,其他按上述成分配制,加热溶解,待冷至 50 °C 时,加入 1%氯化钙溶液 9 mL,调 pH 至 8.4,分装试管,每支 8 mL~10 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 DNA 提取液

A.3.1 成分

成分如下:

- a) Tris • HCl:20 mmol/L;
- b) KCl:100 mmol/L;

- c) EDTA:2.5 mmol/L;
- d) NP-40:1%;
- e) PEG800:20%;
- f) 纯化水。

A.3.2 制法

按上述成分的终浓度进行称量配制,加热溶解,并调 pH 至 8.9,分装。
