

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4859—2017

国境口岸结核分枝杆菌复合群鉴定方法

Identification of *Mycobacterium tuberculosis complex* at frontier port

2017-07-21 发布

2018-03-01 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：中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陆晔、王健、章琪、方筠、孟成艳、叶魏、查期、贾哲甫、张晓航、韩晓辉、周娴、邱瑾。

引 言

近几年结核病实验室诊断新技术不断涌现,实现了快速而准确检测结核分枝杆菌及其耐药性的目标。目前我国依据《WS288—2008 肺结核诊断标准》进行结核病诊断,其中结核病的实验室诊断仍主要依赖于痰标本涂片显微镜检查、传统的固体培养。显微镜检查敏感度较低,并且无法区分活性和非活性生物体,无法鉴别分枝杆菌类型。传统的固体培养基上,结核杆菌生长需要长达八周的时间,报告时间长。在无法及时确诊的情况下,适当的治疗被延迟。同时,实验室还需要快速而价廉的培养物鉴定方法用以区分结核分枝杆菌复合菌群和非结核分枝杆菌。WHO 在结核病诊断方面的相关标准持续改进,将新的技术与方法恰当的纳入诊断方案,这也是有效采用新的诊断方法的先决条件之一。

本标准在充分评估的基础上,规范了结核分枝杆菌实验室鉴定技术的应用路径,及综合判断方案。通过新技术的采用,提高了国境口岸肺结核病的防控效率。

国境口岸结核分枝杆菌复合群鉴定方法

1 范围

本标准规定了国境口岸结核分枝杆菌复合群鉴定的生物安全要求、鉴定程序、鉴定方法、结果报告等内容。

本标准适用于国境口岸出入境人员感染结核分枝杆菌复合群的检测鉴定。

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

结核病实验室生物安全手册 世界卫生组织

人间传染的病原微生物名录 卫生部

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

结核分枝杆菌复合群 *Mycobacterium tuberculosis complex*; MTC

传染性结核病的病原菌复合群,包括结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌、田鼠分枝杆菌、非洲分枝杆菌。MTC 的细菌呈杆状,菌体大小 $0.6\ \mu\text{m} \times (1\ \mu\text{m} \sim 4\ \mu\text{m})$,抗酸染色阳性,革兰氏染色阳性。生长缓慢,约 10 h 繁殖一代,据接种量的多少,10 d~30 d 肉眼可见菌落生长。罗氏(Lowenstein-Jensen)培养基上的菌落粗糙、致密,呈颗粒、结节、或菜花样,乳白或米色,不透明。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis):聚丙烯酰胺凝胶电泳

TBE (Tris-Boric acid):Tris-硼酸核酸电泳缓冲液

bp(base pair):碱基对

5 生物安全措施

根据 WHO《结核病实验室生物安全手册》与 GB 19489 和《人间传染的病原微生物名录》的要求,结核分枝杆菌复合群相关检测鉴定材料的生物安全要求如下:

- 样本处理与检测应于生物安全二级(BSL-2)实验室,在 IIA 级或以上级别生物安全柜内进行;
- 大量活菌操作,如培养物鉴定,药敏检测等,应在生物安全三级(BSL-3)实验室或结核病防护实验室内的生物安全柜中进行。结核病防护实验室,是指在生物安全二级实验室基础上,实验

区域与实验室外部由缓冲区域物理隔离,实验区域控制为单向气流;

——MTC 的细菌培养物运输包装分类为 A 类,UN 编号为 UN2814;

——操作人员佩戴医用 N95 口罩,穿着一一次性防护服,戴一次性医用橡胶手套,更换防水工作鞋;

——操作人员需要每年进行胸部 X 光检查、血清 HIV 检查。

6 仪器和设备

6.1 II 级生物安全柜。

6.2 电子天平。

6.3 水平冷冻离心机(离心力 3 500 *g* 以上)。

6.4 37 °C 恒温培养箱。

6.5 荧光 PCR 仪。

6.6 水平电泳仪。

6.7 紫外成像仪。

6.8 100 °C 热浴仪。

6.9 正置光学显微镜。

6.10 微量加样器(2 μ L、20 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。

7 试剂和耗材

7.1 PCR 反应体系(商品化试剂)。

7.2 0.067 mmol/L, pH 6.8 磷酸缓冲液(PBS)。

7.3 N-乙酰-L-半胱氨酸(NALC)。

7.4 无菌 4% NaOH 溶液。

7.5 无菌 2.9% 枸橼酸钠溶液。

7.6 苯酚。

7.7 无水乙醇。

7.8 罗氏培养基。

7.9 革兰氏染色液。

7.10 抗酸染色液。

7.11 TBE 电泳缓冲液。

7.12 DNA 分子量标准(DNA Ladder Marker)。

7.13 50 mL 无菌离心管。

8 实验室检查

8.1 生长周期检查

8.1.1 罗氏培养基上 MTC 的生长周期

痰标本中的 MTC 在罗氏培养基上生长,通常第 3 周以后开始出现肉眼可见的菌落。

8.1.2 7H9 液体培养基中 MTC 的生长周期

8.1.2.1 痰标本中的 MTC 在 7H9 液体培养基中生长,通常第 14 天左右出现显微镜下可见的菌落。

8.1.2.2 痰标本中的 MTC 数量多、繁殖旺盛时,接种后第 4 天左右出现显微镜下可见的菌落。通常液体培养样本接种后立即报告阳性的为其他污染细菌。

8.2 形态学检查

肉眼观察罗氏培养基上的菌落。MTC 在罗氏培养基上是乳白或米色、不透明、粗糙、致密,呈颗粒、结节、或菜花样的菌落,单个菌落散在或聚集,参见图 A.1 和图 A.2,也可见细小的菌落连成一片菌苔。

8.3 抗酸染色检查

8.3.1 痰涂片的抗酸染色及检查

痰涂片抗酸染色后在 1 000 倍放大的正置光学显微镜下 MTC 呈红色的细长杆菌。部分红色菌体中可见浓染颗粒。可以一条散在,也可多条聚集,也可成团或成簇。参见图 A.3 和图 A.4。

8.3.2 罗氏培养基上 MTC 的抗酸染色及检查

罗氏培养基上的 MTC 菌落涂片抗酸染色后,在 1 000 倍放大的正置光学显微镜下呈成片的红色杆菌,密集成团。参见图 A.5。

8.3.3 液体培养基 7H9 中 MTC 的抗酸染色及检查

液体培养基中的 MTC 涂片抗酸染色后,在 1 000 倍放大的正置光学显微镜下呈致密、条索状的红色菌团。参见图 A.6。

8.4 免疫学鉴定方法

通过对液体培养基中 MPB64 分泌蛋白的检测,能够确定培养基中是否含有结核分枝杆菌复合群。选用国家食品药品监督管理总局(CFDA)注册认证的商品试剂盒,按照说明书进行检测。

8.5 分子生物学鉴定方法

8.5.1 MTC 的实时荧光 PCR 检查

通过对痰液样本或培养物中结核分枝杆菌特异性核酸片段的检测,鉴定样本中是否含有结核分枝杆菌复合群。选用国家食品药品监督管理总局(CFDA)注册认证的商品试剂盒,按照说明书进行检测。

8.5.2 MTC 的线性探针杂交固相膜显色检测

通过扩增结核分枝杆菌 16S rRNA 特异性片断,扩增产物经过化学变性后,与带有探针固化的试纸条杂交,通过显色反应检测确定是否含有目的片段。选用国家食品药品监督管理总局(CFDA)注册认证的商品试剂盒,如:Hain Lifescience 公司的 Geno Type(r) MTBDRplus¹⁾,按照说明书进行检测。

8.5.3 MTC 的 DNA 序列测定及比对

参见附录 B。

8.5.4 MTC 核酸及 rpoB 基因突变检测

检测结核菌阳(涂片阳性或者细菌培养阳性)痰沉淀物样本中的结核分枝杆菌复合群特异性核酸片段和利福平耐药相关的 rpoB 基因突变,完成分枝杆菌鉴定及利福平耐药分析。选用国家食品药品监督管理总局(CFDA)注册认证的商品试剂盒,如:Cepheid 公司的 Xpert MTB/RIF¹⁾,按照说明书进行

检测。

9 MTC 的鉴定及报告

9.1 痰液标本中 MTC 的鉴定和报告

显微镜下痰涂片中找到抗酸杆菌,痰液样本经 8.5.1、8.5.2 或 8.5.4 检测,获得阳性结果时,报告“检出结核分枝杆菌复合群”。

9.2 液体培养基中 MTC 的鉴定和报告

9.2.1 符合 8.1.2 液体培养分枝杆菌生长规律,菌落形态符合 8.3.3,可选择 8.4 或 8.5 中的方法进行鉴定。

9.2.2 满足 9.2.1 应用 8.4 的方法鉴定时,如为阳性结果时,报告“检出结核分枝杆菌复合群”;为阴性结果时,进一步应用 8.5 的方法鉴定。

9.2.3 满足 9.2.1 应用 8.5.1 或 8.5.2 鉴定结果阳性时,报告“检出结核分枝杆菌复合群”。

9.3 固体培养基上 MTC 的鉴定和报告

形态学检查符合 8.2,涂片检查符合 8.3.2,经 8.5 中任一种鉴定方法,结果阳性,报告“检出结核分枝杆菌复合群”。

9.4 阴性报告

任何样本经罗氏培养基或液体培养基 7H9 培养 8 周后,无菌落生长,或培养物涂片检查未发现抗酸杆菌,或发现抗酸杆菌但采用 8.5 中任一种方法检测,结果为阴性时,报告“未检出结核分枝杆菌复合群”。

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。

附录 A
(资料性附录)
MTC 的形态学特征

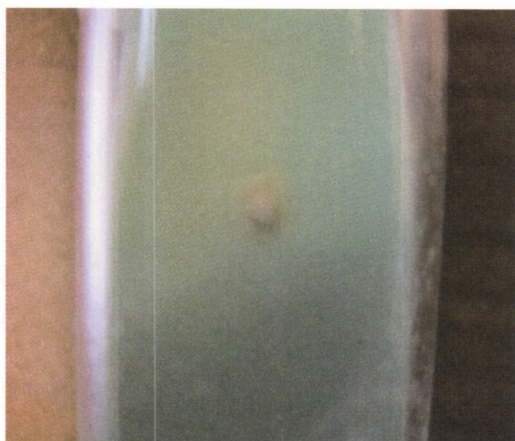


图 A.1 罗氏培养基上的 MTC 单个菌落

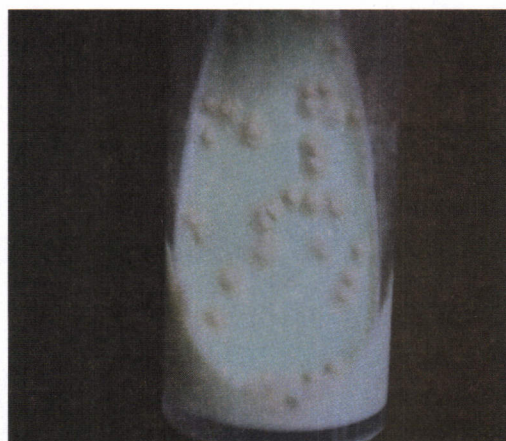


图 A.2 罗氏培养基上的 MTC 菌落形态

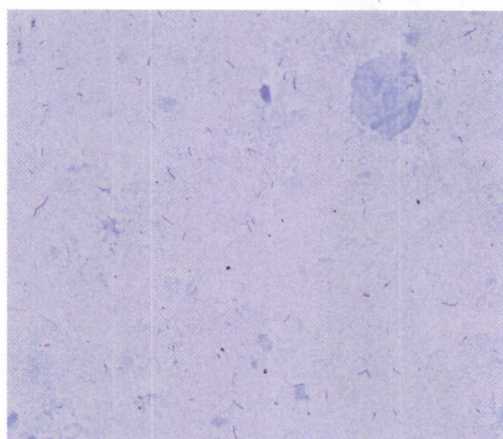


图 A.3 >10 条抗酸杆菌/视野
(抗酸染色, 1 000 倍放大)

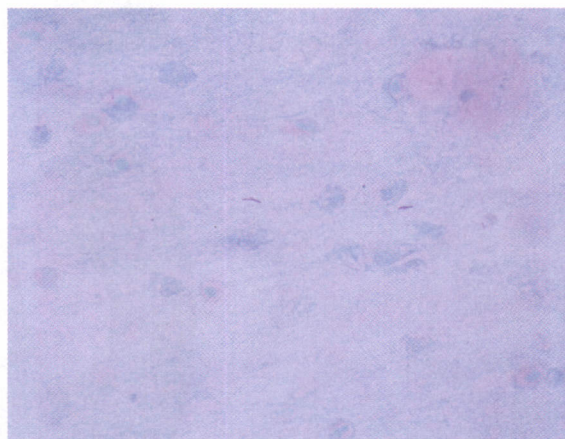


图 A.4 1 条~2 条抗酸杆菌/视野
(抗酸染色, 1 000 倍放大)

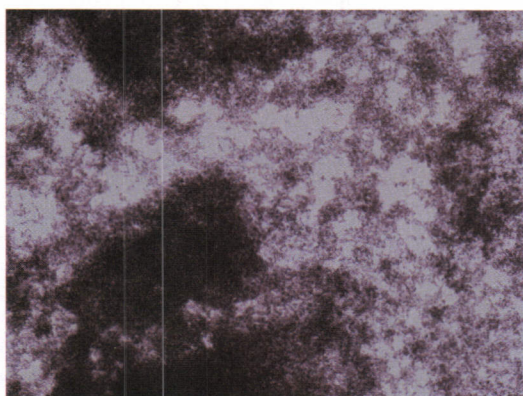


图 A.5 罗氏培养基上的 MTC 菌落涂片
(抗酸染色, 1 000 倍放大)

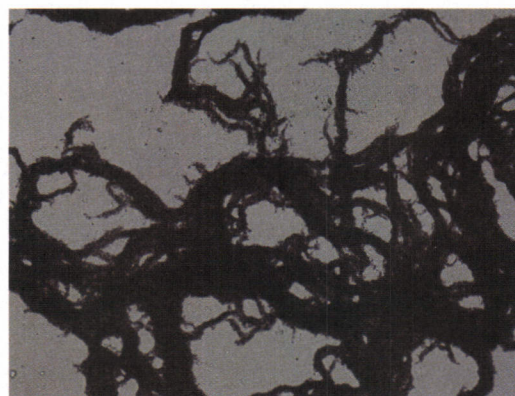


图 A.6 液体培养基中 MTC 菌落索状形态
(抗酸染色, 1 000 倍放大)

附录 B

(资料性附录)

MTC 的 DNA 测序检测法

B.1 细菌核酸提取

B.1.1 热裂解法

将放有细菌标本的 1.5 mL 无菌离心管于 80 °C 灭活 30 min, 100 °C 沸水浴 10 min, 冰上放置 2 min 后, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清至另一 1.5 mL 无菌离心管中, 为 DNA 模板, 用于核酸测序。可保存在 -70 °C 备用。

B.1.2 试剂盒提取纯化核酸法

按适用于革兰氏阳性细菌核酸提取的试剂盒说明书操作。

B.2 DNA 序列测定

B.2.1 用于扩增 PCR 的引物

扩增结核分枝杆菌 16S rRNA, 其片段大小 460 bp, 设计引物, 引物应用液浓度配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 进行储存, 序列分别如下:

引物 P1: 5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';

引物 P2: 5'-TACCGCGGCTGCTGGCAC-3'。

B.2.2 阳性对照和空白对照设置

检测过程中分别设阳性对照和空白对照。阳性对照为 MTC 菌株; 空白对照用无菌水作为 PCR 反应的模板。

B.2.3 扩增 PCR 反应体系组成

将引物储存液, 配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。扩增 PCR 反应体系采用以下参数: 2 \times Master mix 10 μL ; 引物 P1 和 P2 各 2 μL ; ddH₂O 4 μL , 最后加 DNA 模板, 约 0.5 ng, 使反应总体积为 20 μL 。

B.2.4 扩增 PCR 反应条件

扩增 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; (95 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s) \times 25 循环; 72 °C 延伸 7 min; 4 °C 保温。因不同 PCR 仪器的性能差异, 可根据条件优化适当调整 PCR 退火温度和时间。

B.2.5 无水乙醇沉淀纯化 PCR 产物

PCR 产物加入无菌纯水至 50 μL , 再加入 50 μL 酚: 氯仿 (1: 1), 混匀。12 000 r/min 离心 8 min, 取上清转移到另一干净的 0.6 mL 离心管中。无菌纯水补充体积到 100 μL , 加入 10 μL (1/10 体积) 3 mol/L pH 5.2 醋酸钠 (NaAc) 和 200 μL 的无水乙醇 (2 倍体积), 混匀。-20 °C 放置 4 h 及以上。12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。加入 500 μL 75% 乙醇, 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 室

温干燥。加入 100 μL 无菌纯水溶解 DNA, 取 2 μL 电泳定量。

B.2.6 琼脂糖凝胶电泳

用 $0.5\times\text{TBE}$ 电泳缓冲液制备 2.0% 的琼脂糖凝胶平板(含溴化乙锭或其他等效染料)。取 5 μL PCR 扩增产物和 3 μL 上样 $5\times$ 缓冲液, 再加入 7 μL 双蒸水混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照, 推荐使用 DL2000 DNA 分子量标准, 电泳约 2 h。采用凝胶成像分析系统观察核酸条带并判断结果。选取 460 bp 位置的条带割胶回收, 测定其浓度。

B.2.7 DNA 序列测定

B.2.7.1 测序 PCR

460 bp 的 PCR 产物测序用量为 3 ng~10 ng。测序 PCR(20 μL 体系): BigDye Mix (1:16) 8 μL ; Primer(P1) 1 μL ; DNA(10 ng/ μL) 1 μL ; 超纯水 10 μL 。测序 PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, (96 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 4 min) \times 25 个循环。4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

B.2.7.2 测序 PCR 产物纯化

每反应管加入 2 μL EDTA (125 mmol/L) 及 2 μL NaAc (3 mol/L, pH 5.2) 到管底, 50 μL 100% 酒精, 充分混匀, 室温放置 15 min, 12 000 g 离心 30 min, 马上去掉酒精, 先轻轻倒掉大部分上清液, 然后用枪吸去残余的上清。加入 250 μL 70% 酒精, 12 000 g 离心 15 min, 用枪移去上清液。(重复 1 次此步骤)。让残余的酒精在室温挥发干, 然后加入 10 μL 1 Hi-Di Formamide 溶解样品。准备好的样品在 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 min, 然后迅速冰冷 4 min。

B.2.7.3 仪器自动测序

取纯化后的测序 PCR 产物 10 μL , 上样电泳, 由仪器进行 DNA 序列测定。

B.2.7.4 测序结果处理

输入 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网址, 进入子页面 microbes, 将测序获得的核酸序列, 进行 DNA 序列比对。

B.3 检验结果报告

当阳性对照比对结果为 Mycobacterium Tuberculosis Complex, 而空白对照没有任何核酸条带出现时才可对样本进行结果判断及报告, 否则视为实验失败, 需重新实验。

本标准检验结果判断如下:

- 检测样品比对结果为 Mycobacterium Tuberculosis Complex, 且 100%~98% 序列一致时, 报告为“检出结核分枝杆菌复合群基因(测序法)”;
- 检测样品比对结果为 Mycobacterium Tuberculosis Complex, 但一致序列小于 98% 时, 或显示其他细菌名称时, 报告为“未检出结核分枝杆菌复合群基因(测序法)”。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
国境口岸结核分枝杆菌复合群鉴定方法
SN/T 4859—2017

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 18 千字
2018年8月第一版 2018年8月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 • 2-33442 定价 18.00 元



SN/T 4859-2017