



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3888—2014

入出境动物皮张携带鼠疫耶尔森氏菌 快速检测方法

Rapid detection of *Yersinia pestis* from entry-exit animal skins

2014-01-13 发布

2014-08-01 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：中华人民共和国内蒙古出入境检验检疫局、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：乔舜、魏怀波、田丽、葛润平、郭文霞、王东胜、郝广福、张胜。

出入境动物皮张携带鼠疫耶尔森氏菌 快速检测方法

1 范围

本标准规定了出入境动物皮张携带鼠疫杆菌的样本采样、保存及反相间接血凝试验和聚合酶链反应试验的快速检测方法。

本标准适用于出入境旱獭、狐狸、狼、豺、麝鼠、灰鼠等可能感染鼠疫杆菌的动物皮张及寄生物的病原体检测。

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 279 鼠疫诊断标准

国务院令 第424号 病原微生物实验室生物安全管理条例

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

动物皮张 animal skins

可能携带鼠疫杆菌的旱獭皮、狐狸皮、狼皮、豺皮、麝鼠皮、灰鼠皮等。

4 实验室条件及防护要求

4.1 准则

检测标本的处理和保存应在 BSL-2 级以上实验室中进行。BSL-2 级以上实验室的要求要符合 GB 19489 和《病原微生物实验室生物安全管理条例》中同级别实验室的要求,并按照以上两个文件的要求来进行个人防护。检测方法主要参考 WS 279。

4.2 个人防护

采用实验室二级防护标准。

4.3 实验仪器设备

生物安全柜、DNA 扩增仪、凝胶成像分析系统、电泳仪、高压灭菌器、电子天平、水浴锅、恒温箱、V 孔板、移液器、不锈钢剪刀、打孔器。

5 样本的采集和保存

5.1 梳检寄生物

在大白盆内(或 1 m×1 m 的白布单)梳检寄生物,将检到的寄生物置于样品管内保存。

5.2 取样部位

选择待检皮张的头颈部、尾部、四肢各个部位,有血液、淋巴结附着部位优先采样。

5.3 取样方法

每张皮张按头颈部、四肢、尾部不同部位分别取 1 cm² 大小的样本 6 块,用 10 cm×15 cm 塑料封口袋保存;血渍、淋巴结的部位用刀片刮取血渍,于 10 mL 带盖离心管内保存。

5.4 样本存放

采集到的样本放置于-20℃冰柜或低温冰箱中冷冻保存,待检。

5.5 样本处理

5.5.1 反相间接血凝试验(Reverse indirect hemagglutination assay, RIHA)样品处理方法

粉碎样本,加生理盐水浸没,浸泡 24 h。吸取浸泡液 1 500 r/min 离心 5 min,吸取上清液,56℃灭活 30 min 后制成样液,备检。

5.5.2 聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)试验样本处理方法

5.5.2.1 取 1 g 龙胆紫,先用 2 mL 酒精溶解后,加蒸馏水至 100 mL,混匀,取此溶液 10 mL 加入 90 mL 蒸馏水制备成 1 g/L 龙胆紫液;取 2 g NaCl 加入 100 mL 蒸馏水中,取此液 100 mL 加入 1 g/L 龙胆紫液 0.5 mL,混匀后,分装高压灭菌 30 min,配制成洗蚤液备用。

5.5.2.2 粉碎样本,用双蒸水浸没,浸泡 24 h。吸取浸泡液 1 500 r/min 离心 5 min,吸取上清液,56℃灭活 30 min 后制成样液,备检;蚤、蜱、螨等寄生物样本置于研蚤板 U 孔内,用洗蚤液反复清洗干净,弃去清洗液,研磨后用生理盐水按照 100 μL/只蚤(螨)、500 μL/只蜱比例制成悬液,1 500 r/min 离心 5 min,吸取上清液,56℃灭活 30 min 后制成样液,备检。

6 检测方法

6.1 反相间接血凝试验(RIHA)

6.1.1 试剂

6.1.1.1 1%鼠疫 F1 抗体致敏血球。

6.1.1.2 抑制剂为 1:100 稀释的鼠疫免疫血清。

6.1.1.3 阳性对照血清:阴性混合血清加 F1 抗原至 1 mg/mL,1:100 稀释后作为阳性对照。

6.1.2 标本准备

按照 5.5.1 准备标本。

6.1.3 初筛试验操作步骤

6.1.3.1 每份被检液在 V 型孔微量血凝板稀释 5 孔。

6.1.3.2 用移液器向每孔分别加入 25 μL 稀释液。

6.1.3.3 在第 1 孔中加入被检液 25 μL , 吸排 4 次~6 次, 充分混匀, 取 25 μL 移至第 2 孔, 充分混匀, 依次稀释至最后一孔, 弃掉 25 μL 。

6.1.3.4 分别在各孔内加入 1% 鼠疫 F1 抗体致敏血球 25 μL , 振荡混匀。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱或室温 2 h 后观察结果。

6.1.4 结果判定

6.1.4.1 “#”: 凝集血球铺满孔底, 有明显折边, 抗体过量时, 凝集呈疏松花圈状。

6.1.4.2 “+++”: 凝集血球铺满孔底, 无折边。

6.1.4.3 “++”: 血球不完全凝集, 孔底呈整齐的圆圈状, 但圈内外有明显的血球凝集。

6.1.4.4 “+”: 孔底形成较小的圆圈, 在圈内外只有很少的血球凝集。

6.1.4.5 “-”: 血球全部沉积在 V 型孔的底部, 呈整齐的小珠状。

6.1.4.6 呈现“++”以上的凝集现象时, 进行复判操作。

6.1.5 反相血凝的确证试验(复判)

6.1.5.1 每份初筛阳性的被检材料在 V 型孔微量血凝板做二列复判试验, 第一列为抑制列, 第二列为凝集列。

6.1.5.2 用移液器向抑制列每孔加入 25 μL 抑制剂, 向凝集列每孔加 25 μL 稀释液。

6.1.5.3 分别向每列第 1 孔中加入被检液 25 μL , 两列分别进行倍比稀释, 方法同 6.1.3.3, 至每列最后一孔弃 25 μL , 室温作用 15 min。

6.1.5.4 各孔内加入 1% 鼠疫 F1 抗体致敏血球 25 μL , 振荡混匀, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱或室温 2 h 后观察结果。

6.1.5.5 设置对照:

a) 空白对照: 稀释液 25 μL + 1% 鼠疫 F1 抗体致敏血球 25 μL ;

b) 阴性对照: 被检液 25 μL + 1% 单宁酸血球 25 μL ;

c) 阳性对照: 阳性对照血清 + 1% 鼠疫 F1 抗体致敏血球 25 μL 。

6.1.5.6 结果判定: 方法同 6.1.4。最终结果, 空白对照、阴性对照孔不出现凝集现象, 阳性对照成立。当抑制列呈“++”凝集的孔比试验列少 2 孔以上, 判定为特异性凝集。阳性最终效价为凝集排呈现“++”的最高稀释度。

6.2 聚合酶链反应(PCR)试验

6.2.1 溶液及电泳胶体制备

6.2.1.1 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0): 在 800 mL 蒸馏水中加入 186.1 g EDTA, 在磁力搅拌器上搅拌, 用 NaOH(约 20 g)调 pH 至 8.0。然后定容至 1 L, 分装后高压灭菌备用。

6.2.1.2 5 \times TBE 储存液, 如下:

Tris	54 g
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	20 mL
硼酸	27.5 g
蒸馏水	补足至 1 000 mL

6.2.1.3 琼脂糖凝胶: 1% 琼脂糖, 冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$, 每 100 mL 加入 5 μL Goldview 染料, 倾注

SN/T 3888—2014

胶体。

6.2.2 目标基因

6.2.2.1 从疑似鼠疫的标本中检测鼠疫菌时,以鼠疫菌的 *fra* 及 *pla* 二基因的片段作为 PCR 扩增的目标基因。

6.2.2.2 针对上述目标基因采用的引物序列和扩增产物的长度如下:

目标基因	引物序列	产物长度
<i>fra</i>	1F 5'-GGAACCACTAGCACATCTGTT-3'	249 bp
	1R 5'-ACCTGCTGCAAGTTTACCGCC-3'	
<i>pla</i>	2F 5'-ACTACGACTGGATGAATGAAAATC-3'	456 bp
	2R 5'-GTGACATAATATCCAGCGTTAATT-3'	

6.2.2.3 上述引物合成后如为冻干状态,短暂离心后打开,加入适量灭菌三蒸水混合均匀配制成浓度为 100 μmol/L 的储存液,−20 ℃ 保存。使用前配制成 10 μmol/L 浓度的工作液。

6.2.3 内部对照

6.2.3.1 内部对照以鼠疫菌 EV 株 DNA 为模板,采用上述 1F 和 1R 引物首先扩增出 *fra* 基因 249 bp 片段,再以 16SrRNA 基因引物:

F 5'-AGCGGCAGCGGGAAGTAGTT-3'
R 5'-TCAACCCCTTCCTCCTCGCT-3'

扩增出 16SrRNA 基因 396 bp 片段。采用 TOPO TA Cloning Kit 克隆 *fra* 基因片段,鉴定为阳性的克隆子质粒采用 *Hpa* I 酶切,再以 T4 DNA 连接酶将 16SrRNA 基因片段连接在上述质粒的缺口 中。连接后的质粒再次克隆。成功插入 *fra* 和 16SrRNA 基因片段的质粒作为内部对照模板。

6.2.3.2 按上述方法建成的内部对照模板,根据测定的质粒含量配制成浓度为 0.56 μg/mL 的工作溶液。该对照模板以上述的 1F 和 1R 引物扩增的产物长度为 645 bp。

6.2.4 试剂保存

引物、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、Goldview 染料、分子量标准(marker)保存于−20 ℃,均应尽量减少冻融次数。

6.2.5 标本处理

按照 5.5.2 准备标本。

6.2.6 PCR 反应体系(总量 25 μL)

采用其他总量时,下列配方按比例改变。

无菌去离子水	13.5 μL
10×反应缓冲液	2.5 μL
4×dNTP 混合物(每种 2.5 mmol/L)	2 μL
引物(1F、1R、2F、2R)	各 1 μL
内部对照模板(IC)	1 μL
待测标本	1 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	1 μL

Taq DNA 聚合酶应在临用前取出,使用前置与冰上,最后加入反应体系,加入完毕后尽快将酶收 回冷冻保存,并立即短暂离心反应体系后开始扩增。

6.2.7 扩增

预变性 95 ℃ 5 min;然后 95 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;最后保持 72 ℃ 5 min。共 100 min。

6.2.8 电泳

6.2.8.1 反应完毕后,向反应管中加入溴酚蓝指示剂 5 μL ,混合均匀,短暂离心。

6.2.8.2 向电泳胶体的每一孔中加入上述处理的反应产物 8 μL ,每一板胶体至少在边缘的 2 孔中加分子量标准。

6.2.8.3 按照 5 V/cm 电压下在 TBE 缓冲液中电泳 1 h。

6.2.8.4 用凝胶成像仪读取结果并照相。无凝胶成像仪时可在紫外透射灯下观察结果并用相机照相。

6.2.9 判断结果

6.2.9.1 电泳后显示符合 249 bp、456 bp 及 645 bp 长度的 3 条带型者为阳性;显示一条目标条带与对照条带者为鼠疫弱毒菌;只显示 645 bp 一条带者为阴性。

6.2.9.2 显示多数、不规则条带,并与上述预计长度均不相符者(排除实验因素干扰)为阴性。

6.2.9.3 阳性结果样品应通过对扩增产物进行核酸序列测定,以确定最终结果。