



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3391—2012

---

## 国境口岸巴贝西原虫检验规程

Codes of examination of *Babesia* at frontier port

2012-12-12 发布

2013-07-01 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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：付维明、鞠文东、孙毅、杨德文、徐宁、包力、程成、王艳梅、丁淑丽。

# 国境口岸巴贝西原虫检验规程

## 1 范围

本标准规定了国境口岸巴贝西原虫检验对象、方法、结果报告、生物安全要求及结果判定。  
本标准适用于国境口岸人、蜱、宿主动物感染巴贝西原虫的检验。

## 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 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

巴贝西原虫 *Babesia parasites*

是一种隶属巴贝西属、寄生于血液红细胞中的原生动物的原生动物,可由蜱或输血传播,引起人和动物巴贝西原虫病。

## 4 实验室生物安全防护

检测样本的采集和处理应符合无菌操作原则,进行标本检测的实验室应符合 GB 19489 中生物安全二级实验室要求。

## 5 对象

5.1 疑似感染巴贝西原虫的出入境人员、口岸边境人群的血液样本和其他组织样本。

5.2 蜱及宿主动物标本。

## 6 试剂及器材

试剂及器材参见附录 A,或购买符合要求的商品化试剂盒。

## 7 标本的采集和处理

参照附录 B 的方法进行。

## 8 实验室检验方法

### 8.1 形态学检验

8.1.1 将染色的玻片置于低倍显微镜载物台上,对准焦距。在涂片上红细胞分散均匀的部分,滴加镜油一滴,在油镜下耐心仔细按顺序观察。

8.1.2 红细胞被染成红褐色,巴贝西原虫细胞质被染成蓝色,细胞核染成深蓝色,但并非任何一个蓝点或蓝环即为巴贝西原虫,因为可能有染液沉渣及其他异物混淆,区别异物的主要依据是掌握显微镜的细调节器,通过它的上下移动,若蓝点或蓝环与红细胞在同一平面,而且具有一定的轮廓结构是巴贝西原虫,反之则为异物。

8.1.3 当确定为巴贝西原虫后,进一步辨认它为红细胞内期的某个发育阶段,在薄血片中尚可找到其他白细胞或血小板。

8.1.4 对于几种常见白细胞的形态应加以区别,以免混淆:

- 环状体:被寄生的红细胞尚无改变,原虫形似宝石戒指。核呈深蓝色点状。细胞质为蓝色环状,其大小不等,约占红细胞的直径八分之一至四分之一左右。
- 二分体:主要特征是细胞质有伪足伸展,并形成空泡,细胞核显著增大,呈典型对称的配对排列。
- 四联体:细胞质开始变为致密,失去空泡及伪足,呈规则的四联排列。

### 8.2 血清学检验

参照附录 C 规定的方法进行,使用符合条件商品化试剂。

### 8.3 聚合酶链反应(PCR)检验

参照附录 D 规定的方法进行。

### 8.4 离体培养鉴定

按照附录 E 规定的方法进行。

## 9 结果判定

### 9.1 形态学检验

9.1.1 血涂片中观察到典型的环形体或四联体,报告“观察到巴贝西原虫”。

9.1.2 血涂片中未观察到典型的环形体或四联体,报告“未检出巴贝西原虫”。

### 9.2 血清学检验

9.2.1 血清学检验阳性,报告“巴贝西原虫抗体(或抗原)阳性”。

9.2.2 血清学检验阴性,报告“巴贝西原虫抗体(或抗原)阴性”。

### 9.3 聚合酶链反应(PCR)检验

9.3.1 PCR 检验阳性,报告“巴贝西原虫核酸检验阳性”。

9.3.2 PCR 检验阴性,报告“巴贝西原虫核酸检验阴性”。

#### 9.4 离体培养鉴定

9.4.1 标本中培养出巴贝西原虫,报告“细胞培养检出巴贝西原虫”。

9.4.2 盲传三代未见可疑巴贝西原虫,报告“细胞培养三代,未检出巴贝西原虫”。

#### 10 阳性结果处置

10.1 离体培养阳性结果应出具阳性报告单。

10.2 离体培养阳性结果应向上级主管部门报告。



SN/T 3391—2012

附 录 A

(资料性附录)

巴贝西原虫检验主要试剂及器材

A.1 主要试剂

A.1.1 姬姆萨(Gimsa)染液

姬姆萨染料	0.8 g
甘油	50 mL
甲醇	50 mL

将 0.8 g 染料加到 50 mL 甘油中,混匀,置 60 ℃ 2 h,不时搅拌。取出凉至与室温相同时加入甲醇 50 mL,用磁力搅拌过夜。用滤纸过滤,滤液即为原液。应用时用 PBS(1/15 mol/L,pH 6.4~6.8)或蒸馏水稀释十倍。

A.1.2 培养基的主要成分及制备方法

A.1.2.1 PRMI-1640 培养液

(1) RPMI 1640 溶液	
RPMI 1640	20.8 g
高纯水或去离子水	1 800 mL
(2) 1 mol/L HEPES 缓冲液	
HEPES	11.9 g
高纯水或去离子水	50 mL

注: HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperagine-*N'*-2-ethanesulfonic acid 为 *N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸,相对分子质量 238.2。

(3)将(1)和(2)分别溶解后混合在一起,补充三蒸水至 1 920 mL。混合后用 0.22 μm 或更小孔径的微孔滤膜过滤除菌。分装 100 mL/瓶,4 ℃ 保存。

A.1.2.2 其他组分

(1) 200 mmol/L L-谷氨酰胺溶液	
L-谷氨酰胺	2.922 g
高纯水	100 mL
(2) 抗生素配制(1 万单位/mL)	
青霉素	1 000 000 U
链霉素	1 000 000 μg
无菌高纯水	100 mL

溶解后无菌操作分装 1 mL/瓶,-20 ℃ 保存。

(3) 两性霉素 B 配制(25 μg/mL)	
两性霉素 B	2.5 mg
高纯水	100 mL

过滤除菌,分装 1 mL 瓶,−20℃ 保存。

#### A. 1.2.3 RPMI 1640 完全培养基

RPMI 1640 培养液	100 mL
L-谷氨酰胺(200 mmol/L)	1 mL
抗生素(青、链霉素)	1 mL
两性霉素 B(25 μg/L)	1 mL
7.5%NaHCO <sub>3</sub>	2.8 mL
灭活小牛血清	20 mL

过滤除菌,分装 1 mL/瓶,−20℃ 保存。

#### A. 1.2.4 阿氏(Alsever)血液保存液

葡萄糖	2.05 g
柠檬酸钠·5H <sub>2</sub> O	0.80 g
柠檬酸·H <sub>2</sub> O	0.55 g
氯化钠	0.42 g

加蒸馏水至 100 mL,溶解后过滤,分装,115℃ 灭菌 10 min,4℃ 保存。血液与阿氏液混合比例为体积分数 1/1~1/2。

#### A. 1.2.5 原虫冻存液(水溶剂,以下为体积分数)

甘油	28%
山梨醇	3%
氯化钠	0.9%

#### A. 1.2.6 原虫复苏液(水溶剂,以下为体积分数)

山梨醇	16%
氯化钠	0.9%

#### A. 1.3 PCR 试剂

A. 1.3.1 TRIS-HCl(pH 8.8):181.7 g/L TRIS(三羟甲基氨基甲烷),浓盐酸(HCl)调整 pH 值。

A. 1.3.2 TE 缓冲液:10 mmol/L TRIS-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

A. 1.3.3 10×PCR 缓冲液:500 mmol/L 氯化钾(KCl),40 mmol/L 氯化镁(MgCl<sub>2</sub>),100 mmol/L TRIS-HCl,pH 8.5。

A. 1.3.4 电泳缓冲液:242 g Tris 碱,57.1 mL 冰乙酸,100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0),加蒸馏水至 1 000 mL,使用时十倍稀释。

A. 1.3.5 20×SSC 缓冲液:在 800 mL 蒸馏水中溶解 175.3 g 氯化钠(NaCl)和 88.2 g 柠檬酸钠,加入数滴 10 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液调节 pH 值至 7.0,加水定容至 1 L,分装后高压灭菌。

A. 1.3.6 琼脂糖:电泳级。

#### A. 2 器材

##### A. 2.1 离体培养器材

24 孔细胞培养板;滤膜滤器;旋涡振荡器;离心机;暗视野光学显微镜;解剖显微镜;全排式生物安

## SN/T 3391—2012

全柜;CO<sub>2</sub> 恒温培养箱;0.22 μm 除菌滤膜;高压蒸汽灭菌器;玻璃吸管(2 mL、5 mL)、量筒(50 mL、200 mL)、三角烧瓶(200 mL、100 mL);电子天平(精确到 0.001 g);普通冰箱。

### A.2.2 PCR 器材

离心机;PCR 仪;电泳仪;可调移液器;1 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL;凝胶成像仪。



**附 录 B**  
(资料性附录)  
**标本的采集和处理**

**B.1 疑似感染者标本的采集**

**B.1.1** 疑似感染者的血液(末梢血、静脉血、骨髓)、其他组织的印片可进行病原学检测,常规采样后立即送检。

**B.1.2** 无菌方法采集血液,EDTA 抗凝后无菌试管 4℃ 保存,立即送检。

**B.1.3** 用未抗凝的真空管采集患者急性期(发病三天内)、第三周、第六周血清,用于血清学检测。

**B.2 疑似感染者标本的处理**

**B.2.1 制作血涂片**

**B.2.1.1** 血液标本取 1  $\mu\text{L}$ ~3  $\mu\text{L}$ ,置于一张洁净载玻片(甲片)的一端,涂片时用左手在拇指及食指持握该片的两端。

**B.2.1.2** 另取一张载玻片作推片(乙片),将其一端接触甲片血滴,使血滴沿推片向两侧展开,两片之间保持 45° 的夹角。

**B.2.1.3** 将乙片紧靠甲片,沿着甲片的表面轻而迅速地向前推动,直到甲片的另一端为止。推片时注意保持一定的速度和两片间的角度,切忌过分用力或中间停顿,否则将使血球破碎或涂布不匀。质量好的薄血膜应呈舌形,血细胞分布均匀。

**B.2.1.4** 将制好的血片置于空气中干燥,用甲醇一到两滴置于血片上,均匀散开,固定血膜,干透后再染色。

**B.2.2 血涂片染色方法**

血涂片染色采用国际通用的 Gimsa 染液进行(1:10)稀释后(现稀释现用),染色 30 min,清洗,自然风干后观察。

**B.2.3 用于血清学试验的血液处理**

采集后的血液以相对离心力 300g 离心 5 min,分离出血清。

**B.3 蜱及宿主动物标本采集**

蜱及宿主动物采集,参照 SN/T 1312 进行。宿主动物血液标本,应常规无菌取样,用有盖无菌或不抗凝的真空管采集保存。

**B.4 蜱及宿主动物标本处理**

**B.4.1** 参照 B.2.1、B.2.2、B.2.3 制作血涂片。

**B.4.2** 血液采集后以相对离心力 300g 离心 5 min,分离出血清。

附 录 C  
(资料性附录)  
巴贝西原虫血清学检验

## C.1 血清抗原检验

### C.1.1 原理

使用抗 Babesia 单克隆抗体或多克隆抗体,利用阳性抗体血清与抗原的结合,通过间接免疫荧光(IFA)方法,检测病人或宿主动物或蜱中巴贝西原虫。

### C.1.2 操作步骤

C.1.2.1 将患者的血液按 B.2.1 方法制作薄血涂片,风干后,丙酮固定 15 min,晾干备用。将阳性抗体血清 10  $\mu$ L~20  $\mu$ L 覆盖于薄血片上,37  $^{\circ}$ C 湿盒孵育 45 min。甩去多余血清,用 PBS(pH 7.2)洗涤 2~3 次,风干。

C.1.2.2 将 FITC 标记的酶标二抗,10  $\mu$ L~20  $\mu$ L 覆盖于薄血片上,37  $^{\circ}$ C 湿盒孵育 45 min。甩去多余血清,用 PBS(pH 7.2)洗涤 2~3 次,风干后用荧光显微镜观察。

### C.1.3 结果判断

阴性结果:荧光显微镜观察,红细胞内部或细胞间未见特异性荧光。

阳性结果:荧光显微镜观察,红细胞内部或细胞间可见,呈环状体或四联体状特异性绿色较强荧光。

## C.2 血清抗体检验

### C.2.1 原理

利用抗体血清与阳性抗原的结合,通过间接免疫荧光(IFA)方法,检测病人或宿主动物中巴贝西原虫抗体。

### C.2.2 操作步骤

C.2.2.1 将患者的血液按 B.2.3 方法制备血清,或直接采血置于紫帽促凝血清分离管中分离血清。

C.2.2.2 将患者血清 10  $\mu$ L~20  $\mu$ L 覆盖于阳性抗原片上,37  $^{\circ}$ C 湿盒孵育 45 min。甩去多余血清,用 PBS(pH 7.2)洗涤 2~3 次,风干。

C.2.2.3 将 FITC 标记的酶标二抗,10  $\mu$ L~20  $\mu$ L 覆盖于阳性抗原片上,37  $^{\circ}$ C 湿盒孵育 45 min。甩去多余血清,用 PBS(pH 7.2)洗涤 2~3 次,风干,风干后用荧光显微镜观察。

### C.2.3 结果判断

阴性结果:荧光显微镜观察,未见特异性荧光。

阳性结果:荧光显微镜观察,可见特异性荧光呈环状体或四联体,如阳性荧光太强可将患者血清梯度稀释测定其抗体滴度。

## 附录 D

(资料性附录)

## 巴贝西原虫聚合酶链反应检验

## D.1 扩增引物

下列是根据巴贝西原虫基因 18S rRNA 设计的一对引物,在 GenBank 中参考序列号为 M93660,具有高度特异性,供使用时参考。阳性标本可扩增出 154 bp 的片段。

外引物

上游引物:5'-CTTAGTATAAGCTTTTATACAGC-3'

下游引物:5'-ATAGGTCAGAAACTTGAATGATACA-3'

内引物

上游引物:5'-GTTATAGTTTATTTGATGTTTCGTTT-3'

下游引物:5'-AAGCCATGCGATTTCGCTAAT-3'

## D.2 模板制备

## D.2.1 原虫虫株的模板制备

D.2.1.1 取原虫虫株感染率超过 10% 的红细胞 10  $\mu$ L,溶于 90  $\mu$ L TE 缓冲液中。

D.2.1.2 加入溶菌酶(20 g/L)10  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C 水浴 30 min。

D.2.1.3 加入 10% 十二烷基硫酸钠溶液(SDS)10  $\mu$ L,60  $^{\circ}$ C 水浴 10 min(变清为止),室温冷却。

D.2.1.4 加入蛋白酶 K(10 g/L)10  $\mu$ L 37  $^{\circ}$ C 60 min。

D.2.1.5 加入 RNA 酶(10 g/L)10  $\mu$ L 37  $^{\circ}$ C 30 min。

D.2.1.6 加入 150  $\mu$ L 酚、三氯甲烷、异戊醇混匀液,抽提三次。

D.2.1.7 加入冰乙醇,12 000 r/min 离心 10 min,弃上水相,自然干燥,加入 1 $\times$ SSC 100  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 保存待测。

## D.2.2 临床标本的模板制备

D.2.2.1 取血 2 mL,5 000 r/min,5 min,弃上清液,加 TE 缓冲液 300  $\mu$ L。

D.2.2.2 100  $^{\circ}$ C 煮沸 30 min,室温冷却。

D.2.2.3 加入 RNA 酶(10 g/L)10  $\mu$ L 37  $^{\circ}$ C 30 min。

D.2.2.4 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液 10  $\mu$ L 用于 PCR 扩增。

## D.2.3 蜱及宿主动物标本的模板制备

D.2.3.1 蜱标本处理:取蜱一只(幼虫可五到十只为一组),用体积分数为 70% 的乙醇溶液浸泡 5 min~10 min 进行表面消毒,然后用无菌蒸馏水洗涤 2~3 次,无菌滤纸吸干水分。研磨器加 TE 缓冲液研磨至细粉末状,然后按照 D.2.1.2 至 D.2.1.7 程序进行。

D.2.3.2 宿主动物血液标本按 D.2.2 处理。

## D.3 第一轮扩增

D.3.1 取无菌的 0.2 mL PCR 扩增管,设置阴性对照、阳性对照,将样品编号,按照以下加样量加样:



模板	2.0 $\mu\text{L}$
10 $\times$ PCR 缓冲液(含氯化镁)	5.0 $\mu\text{L}$
4 dNTPs(1.25 mmol/L)	4.0 $\mu\text{L}$
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$
聚合酶(5 U/mL)	0.5 $\mu\text{L}$
超纯水	36.5 $\mu\text{L}$

**D.3.2** 混匀,6 000 r/min 离心 1 min,将管内液体甩入管底。

**D.3.3** 设置扩增反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$  5 min;94 $^{\circ}\text{C}$  60 s,58 $^{\circ}\text{C}$  60 s,72 $^{\circ}\text{C}$  120 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$  5 min,进行第一轮 PCR 扩增。

#### **D.4 第二轮扩增**

按照 D.3.1 体系,把上下游引物改为内引物,将第一轮扩增产物作 10 倍到 50 倍稀释后作为模板,按 D.3.2 混匀,设置扩增反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$  5 min;94 $^{\circ}\text{C}$  60 s,55 $^{\circ}\text{C}$  60 s,72 $^{\circ}\text{C}$  120 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$  5 min,进行第二轮 PCR 扩增。

#### **D.5 电泳**

取 10  $\mu\text{L}$  扩增产物,加入 2  $\mu\text{L}$  溴酚蓝上样缓冲液,混匀,加样于 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5  $\mu\text{g/mL}$  溴化乙锭)胶孔中,以 5 V/cm 稳定电压电泳 30 min,用凝胶成像系统观察是否出现目的条带(154 bp)。

#### **D.6 结果判定**

如阴性对照和空白对照未出现条带,阳性对照和待测样品均出现预期大小的扩增条带(扩增片段大小为 154 bp),则可初步判定该样品巴贝西原虫核酸检验阳性,应进一步进行测序验证;如果待测样品中未出现 PCR 扩增产物,则判断为待测样品巴贝西原虫核酸检验阴性。

附 录 E  
(规范性附录)  
巴贝西原虫离体培养鉴定

### E.1 初培养

将患者或宿主动物的血液标本,用玻璃珠法机械抗凝,加入 RPMI 1640 培养液,以相对离心力  $300g$  离心  $10\text{ min}$ ,用无菌吸管吸弃上清液,保留淡黄色粘层,而后用 RPMI 1640 培养液或的 PBS 液 ( $\text{pH } 6.8$ )洗涤红细胞层  $2\sim 3$  次,备用。取正常“O”型血红细胞,加入 RPMI 1640 培养液,以相对离心力  $300g$  离心  $10\text{ min}$ ,用无菌吸管吸弃上清液,仅留红细胞。而后用 RPMI 1640 培养液或的 PBS 液 ( $\text{pH } 6.8$ )洗涤红细胞层  $2\sim 3$  次,备用。在 24 孔细胞板中加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  患者或宿主动物红细胞,加入正常“O”型血红细胞  $100\text{ }\mu\text{L}$ ,然后补充 RPMI 1640 完全培养基至  $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ ,加盖板后用封口膜封固。将细胞培养板放置于蜡烛缸中,点燃蜡烛,待蜡烛即将熄灭时盖好蜡烛缸,将蜡烛缸放置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 38\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养。每  $24\text{ h}$  换液,无菌吸管吸弃上清培养液并加入等量新鲜 RPMI 1640 完全培养基,取样后参照 B.2.1、B.2.2、B.2.3 制作血涂片,按照 8.1 方法进行观察。

### E.2 传代培养

取 E.1 初培养中阳性培养物  $40\text{ }\mu\text{L}$ ,加入正常红细胞  $160\text{ }\mu\text{L}$ ,然后补充 RPMI 1640 完全培养基至  $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ ,加盖板后,按 E.1 初培养蜡烛缸法进行培养,监测红细胞感染率至达到  $10\%$  以上即可冻存。

### E.3 冻存保种

当感染率超过  $10\%$  时,以相对离心  $300g$  离心  $5\text{ min}$ ,弃上清液,将沉淀物混匀,分别取  $150\text{ }\mu\text{L}$  加入冷冻管内,各等量加入冻存液。先放入  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱  $2\text{ h}$  后,冰浴  $5\text{ min}\sim 10\text{ min}$  后再放入液氮罐中冻存。

---