



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3392—2012

国境口岸莱姆病螺旋体检验规程

Codes of examination of *Borrelia burgdorferi* 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

本标准是按照 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学研究所。

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

国境口岸莱姆病螺旋体检验规程

1 范围

本标准规定了国境口岸莱姆病螺旋体的检验对象、方法、生物安全要求及结果判定。
本标准适用于国境口岸莱姆病螺旋体的检验。

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

SN/T 1638—2005 国境口岸莱姆病监测规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

莱姆病螺旋体 *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 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,进行样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 疑似感染莱姆病的人出境人员、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

6.1 莱姆病螺旋体培养及聚合酶链反应(PCR)检验试剂和器材参见附录 A,或购买符合要求的商品化检测试剂盒。

6.2 血清学检验试剂和器材见 SN/T 1638—2005 中附录 A,或购买符合要求的商品化试剂盒。

7 标本的采集和处理

按照附录 B 的方法进行。

8 实验室检验方法

8.1 形态学检验

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,400 倍暗视野或油镜下耐心仔细按顺序观察,红细胞被染成红褐色,莱姆病螺旋体被染成蓝色,间距约 8~10 个螺距,螺距较大。

8.2 血清学检验

按照 SN/T 1638—2005 中附录 A 规定的方法进行,或按照商品化试剂说明书操作。

8.3 聚合酶链反应(PCR)检验

参照附录 C 规定的方法进行。

8.4 离体培养鉴定

按附录 D 规定的方法进行。

9 结果判定

9.1 形态学检验

9.1.1 标本中观察到典型的莱姆病螺旋体,报告“观察到莱姆病螺旋体”。

9.1.2 标本中 300 个以上视野,未观察到典型的莱姆病螺旋体,报告“未检出莱姆病螺旋体”。

9.2 血清学检验

9.2.1 血清学检验阳性,报告“莱姆病螺旋体抗体阳性”。

9.2.2 血清学检验阴性,报告“莱姆病螺旋体抗体阴性”。

9.3 聚合酶链反应(PCR)检验

9.3.1 PCR 检验阳性,报告“莱姆病螺旋体核酸检验阳性”。

9.3.2 PCR 检验阴性,报告“莱姆病螺旋体核酸检验阴性”。

9.4 离体培养鉴定

9.4.1 标本中培养出莱姆病螺旋体,报告“离体培养检出莱姆病螺旋体”。

9.4.2 盲传三代未见可疑莱姆病螺旋体,报告“离体细胞培养三代,未检出莱姆病螺旋体”。

10 阳性结果的处置

10.1 形态学检验和血清学检验阳性的标本,应选择离体分离培养方法进行复检验证。

10.2 离体培养阳性结果应出具阳性报告单,升向上级主管部门报告。

附录 A (资料性附录)

莱姆病螺旋体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 °C 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 BSK II 培养液

(1) CMRL 1066(商品培养基)	100 mL
高纯水或去离子水定容到	500 mL
(2) 5.7%明胶(Gelatin)缓冲液	
明胶	17.0 g
高纯水或去离子水定容到	300 mL
121 °C, 15 min 灭菌。	
(3) 300 mL 蒸馏水,加热至 50 °C~70 °C,依次加入:	
新胨 Neopetone	5.0 g
胰胨 Tryptone	1.0 g
酵母提取物 Yeastolate	1.0 g
搅拌 10 min 至室温,调 pH 之前加成分见(4)	
(4) 依次加入	
海培斯 HEPES	6.0 g
柠檬酸钠(分析纯)	0.7 g
葡萄糖(分析纯 R)	5.0 g
丙酮酸钠(分析纯)	0.8 g
N-乙酰氨基葡萄糖(N-acetylglucosamine)	0.4 g
磷酸氢钠(分析纯)	2.2 g
氯化镁 MgCl ₂ · 6H ₂ O(分析纯)	0.8 g

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。

- (5) 加入 35%牛血清白蛋白(Bovine serum Albumin, BSA Fraction IV)143 mL。
- (6) 10 mol/L NaOH 调 pH 至 7.4。
- (7) 0.2 μmL 滤膜除菌后总量定容到 1 L。

SN/T 3392—2012

(8) 取 300 mL 明胶与(7)液 700 mL 混合(或者二者按体积比为 3:7 混合)。

(9) 无菌试验后,加入 100 mL 无菌灭活小牛血清后,低温保存。

A. 1. 2. 2 冻存液(水溶剂,以下为体积百分比)

甘油	28%
山梨醇	3%
氯化钠	0.9%

A. 1. 3 PCR 试剂

A. 1. 3. 1 TRIS-HCl(pH8.8):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(pH8.0),1 mmol/L EDTA(pH8.0)。

A. 1. 3. 3 10×PCR 缓冲液:500 mmol/L 氯化钾(KCl),40 mmol/L 氯化镁(MgCl₂),100 mmol/L TRIS-HCl,pH8.5。

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(pH8.0),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

5 mL 康氏管;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;全排式生物安全柜;CO₂ 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、1 000 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
(规范性附录)
标本的采集和处理

B.1 疑似感染者标本的采集

- B.1.1 血液(末梢血或静脉血)、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 用不抗凝或促凝真空管采集并保存患者急性期(发病3 d内)、第一周、第三周血清用于血清学检测。
- B.1.4 典型红斑或溃疡斑组织切片,无菌保存后立即送检。

B.2 疑似感染者标本的处理

- B.2.1 患者血液取1 μL~3 μL,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;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;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均匀。质量好的薄血膜应呈舌形,血细胞分布均匀。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: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并清洗,自然风干后镜检观察。
- B.2.3 血清学试验的血液采集后以相对离心力300g离心5 min,分离出血清。
- B.2.4 组织切片用体积分数为75%的乙醇溶液表面消毒5 min~10 min后加入BSK II培养基,无菌研磨至匀浆状,4℃保存,作分离培养、PCR检测备用。

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EDTA抗凝、促凝分离胶管的真空管采集试管保存。

B.4 蜱及宿主动物标本处理

- B.4.1 宿主动物血液样品参照B.2.1、B.2.2制作血涂片。
- B.4.2 血液样品采集后以相对离心力300g离心5 min,分离出血清。
- B.4.3 取蜱及宿主动物组织约50 mg或媒介蜱一只(幼蜱可五只到十只为一组),用体积分数为75%的乙醇溶液表面消毒5 min~10 min,再用无菌水洗涤两到三次后,加入BSK II培养基无菌研磨至匀浆状,以相对离心力150g离心10 min,取上清液4℃保存,备用。

SN/T 3392—2012

附 录 C
(资料性附录)
聚合酶链反应检测

C.1 扩增引物

下列是根据莱姆病螺旋体外膜蛋白 A(OspA)设计的一对引物,在 Genbank 中的参考序列号: NC000619。引物具有高度特异性,阳性标本可扩增出 309bp 的片段,供使用时参考。

上游引物: OA1 5'-AATAGGTCAATATTAGCCTTAATAGC-3'

下游引物: OA4 5'-TTATTTTAAAGCGT[G]T[C]TTT-3'

C.2 模板制备

C.2.1 莱姆病螺旋体的模板制备

C.2.1.1 取螺旋体阳性培养液 1 mL, 8 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 将沉淀物溶于 100 mL TE 缓冲液中。

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

C.2.1.3 加入体积分数为 10% 的十二烷基硫酸钠溶液(SDS) 10 μ L, 60 $^{\circ}$ C 水浴 10 min(变清为止), 室温冷却。

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

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

C.2.1.6 加入 150 μ L 酚、三氯甲烷、异戊醇混匀液, 抽提三次。

C.2.1.7 加入冰乙醇, 1 2000 r/min 离心 10 min, 弃上水相, 自然干燥, 加入 1 \times SSC 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 保存待测。

C.2.2 临床标本的模板制备

C.2.2.1 取血 2 mL, 5 000 r/min, 5 min, 弃上清液, 加 TE 缓冲液 300 μ L。

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

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

C.2.2.4 离心 12 000 r/min, 5 min, 取上清液 10 μ L 用于 PCR 扩增。

C.2.3 蜱及宿主动物标本的模板制备

C.2.3.1 蜱标本处理: 取蜱一只(幼虫可每五到十只为一组), 用体积分数为 70% 的乙醇溶液浸泡 5 min~10 min 表面消毒, 然后用无菌蒸馏水洗涤两到三次, 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 C.2.1.2~C.2.1.7 程序进行。

C.2.3.2 宿主动物血液标本按 C.2.2.2 处理。

C.3 扩增

C.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 μL
10×PCR 缓冲液(含氯化镁)	5.0 μL
4dNTPs(1.25 mmol/L)	4.0 μL
上游引物(10 μmol/L)	1.0 μL
下游引物(10 μmol/L)	1.0 μL
聚合酶(5 U/mL)	0.5 μL
超纯水	36.5 μL

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

C.3.3 设置扩增反应条件:94 ℃ 3 min;94 ℃ 45 s,54 ℃ 50 s,72 ℃ 120 s,35 个循环;最后 72 ℃ 5 min,进行 PCR 扩增。

C.4 电泳

取 10 μL 扩增产物,加入 2 μL 溴酚蓝上样缓冲液,混匀,加样于 1.5%琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/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(309 bp)。

C.5 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 309 bp),则可初步判定该样品莱姆病螺旋体 PCR 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,则可判断待测样品莱姆病螺旋体 PCR 检验阴性。

附 录 D
(规范性附录)
莱姆病螺旋体的离体培养鉴定

D.1 初培养

将疑似患者或宿主动物的血液标本,直接滴入 BSK II 培养基中,培养基与培养物的体积比一般在 8~10:1(下同),加塞后 33 ℃培养 3 d~7 d(不少于 3 d),CO₂ 浓度 5%(下同)。每周传代一次,取样一滴,加盖玻片后湿片 400 倍暗视野进行观察。媒介样品培养操作方法与结果和血液样品相同。

D.2 传代培养

取 D.1 初培养中阳性培养物两滴到三滴,加入新鲜 BSK II 培养基,加塞后 33 ℃培养 2 d~7 d。按 D.1 取样观察,当观察到每视野有螺旋体 10~20 条即可冻存。

D.3 冻存保种

取上述培养物,8 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,将沉淀物用新鲜 BSK II 培养基混匀,分别取 150 μL 加入冷冻管内,等量加入冻存液。先放入 4 ℃冰箱 2 h 后,冰浴 5 min~10 min 后再放入液氮罐中冻存。
