

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4614—2016

国境口岸玛雅罗病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR method for Mayaro virus detection at frontier ports

2016-08-23 发布

2017-03-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

中华人民共和国出入境检验检疫

行 业 标 准

国境口岸玛雅罗病毒荧光

RT-PCR 检测方法

SN/T 4614—2016

*

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 0.5 字数 10 千字

2017年12月第一版 2017年12月第一次印刷

印数 1—500

*

书号: 155066·2-32345 定价 14.00 元

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：中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：孙肖红、马雪征、刘键、徐宝梁、白红岩、张丽萍。

国境口岸玛雅罗病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了玛雅罗病毒检测的生物安全要求、标本的采集、运输和保存,标本的处理和荧光 RT-PCR 检测。

本标准适用于玛雅罗病毒的荧光 RT-PCR 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

人间传染的病原微生物名录(中华人民共和国卫生部 卫科教发[2006]15号)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

玛雅罗病毒 Mayaro virus; MAYV

玛雅罗病毒是一种蚊传虫媒病毒,属于披膜病毒科甲病毒属,趋血蚊是其主要传播媒介,主要流行于澳大利亚。人类感染后临床表现类似登革热,有发热、寒战、头痛、眼睛痛,皮疹和关节炎,在缺乏实验室诊断时很容易被混淆为登革热。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct 值	每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数;
FAM	FAM 荧光染料,一种荧光报告基团;
RNA	核糖核酸;
RT-PCR	反转录-聚合酶链反应。

5 生物安全要求

中华人民共和国卫生计生委发布的《人间传染的病原微生物名录》规定,玛雅罗病毒的未经培养的感染性物质、灭活材料的操作应在不同级别生物安全实验室进行。具体如下:

- 玛雅罗病毒相关的感染性材料的操作应在生物安全二级(BSL-2 或 ABSL-2)实验室内进行;
- 玛雅罗病毒相关的灭活材料在生物安全一级(BSL-1)实验室内进行;
- 玛雅罗病毒感染性材料运输包装分类为 B 类,UN 编号为 UN3373。

SN/T 4614—2016

6 标本的采集、运输和保存

6.1 人血清标本

无菌采集可疑病人的静脉血 3 mL~5 mL,室温静置 30 min,然后 500 g 离心 10 min,收集上清(血清)于 2 mL 螺口塑料管内,用耐低温油性记号笔记录上编号,4 ℃ 以下送检。不能及时检测的标本应保存于-70 ℃ 或以下温度。

6.2 蚊类

根据实际工作需要采集蚊虫标本。将采集的蚊虫直接放入-20 ℃ 冰箱冻死后,取出,分类编号,按 30 只~50 只一份,装入 2 mL 螺口塑料管内,用耐低温油性记号笔记录上编号,干冰或液氮运输,或-70 ℃ 以下保存待检。

7 标本的处理

7.1 人血清标本

血清标本可直接提取核酸。

7.2 蚊类

7.2.1 从-70 ℃ 容器中取出蚊虫标本,倒入研磨器中。

7.2.2 加入 1 mL PBS 或生理盐水吹洗,弃去液体后加入 1 mL PBS 或生理盐水,反复研磨至组织碎片基本消失。

7.2.3 将研磨液吸入 1.5 mL 离心管,配平后置预冷 4 ℃ 的离心机上,20 000 g 离心 10 min。

7.2.4 取上清液提取核酸。

8 荧光 RT-PCR 检测

8.1 主要仪器

需要以下仪器:

- 荧光定量 PCR 仪;
- 超净工作台;
- 生物安全柜;
- 高压灭菌锅;
- 低温高速离心机:最大离心力 20 000 g;
- 漩涡振荡器;
- 冰箱:4 ℃、-20 ℃ 和 -70 ℃;
- 移液器:10 μL、20 μL、100 μL、200 μL 和 1 mL。

8.2 主要试剂

- 8.2.1 核酸提取试剂:用美国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA Kit 提取病毒核酸¹⁾。
- 8.2.2 荧光 RT-PCR 通用试剂:Ag-Path-ID™ One step RT-PCR Kit,美国 Ambion 公司产品¹⁾。
- 8.2.3 无 RNA 酶的 DEPC 水。
- 8.2.4 引物和探针:引物和探针序列见表 1。

表 1 玛雅罗病毒荧光 RT-PCR 检测的引物和探针

引物/探针名称	序列(5'-3')	扩增片段(E 基因)
MAYV-F	GCGCTGACGTGTGCAAAC	118 bp
MAYV-R	TTCACATACGCCTCGACAGTC	
MAYV-P	FAM-CGATTACGCAGCCGCCTACCGC-TAM	

8.3 核酸提取

按试剂盒操作说明书。

8.4 加样

准备实时荧光 RT-PCR 反应液,设 25 μL 反应体系,每个待检标本反应液的组成为:2×RT-PCR Buffer 12.5 μL、10 μmol/L MAYV-F 1 μL、10 μmol/L MAYV-R 1 μL、10 μmol/L MAYV-P 0.5 μL、25×RT-PCR Enzyme Mix 1 μL、模板 RNA 5 μL。同时设立阴性对照和阳性对照,阳性对照模板可为玛雅罗病毒核酸,也可为根据病毒核苷酸序列体外合成的 RNA 片段,阴性对照模板为不含玛雅罗病毒核酸的标本或无 RNA 酶的 DEPC 水。

8.5 实时荧光 RT-PCR 扩增反应

在不同的荧光定量 PCR 仪上,TaqMan 探针实时荧光 RT-PCR 的反应条件略有不同。以 ABI 7 500 HT 荧光定量 PCR 仪为例,实时荧光 RT-PCR 检测扩增程序为:45 ℃ 25 min,95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s,55 ℃ 60 s(收集荧光信号),40 个循环。如使用其他仪器,应根据其他仪器的要求适当调整反应条件。

8.6 结果分析

8.6.1 阈值确定

阈值确定的方法对所有的样品都是统一的,一般是以荧光 PCR 反应的前 3~15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,以本底信号标准差的 10 倍作为荧光阈值,以样品扩增产生的荧光信号达到荧光阈值时所对应的循环数为循环阈值(Ct 值)。

8.6.2 质量控制

- 反应结果应同时符合以下 2 个条件:
- 阴性对照无扩增曲线;

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。

SN/T 4614—2016

——阳性对照 $C_t \leq 35$ 并有明显扩增曲线。

8.6.3 结果判定

根据以下条件进行结果判定：

——无 C_t 值或 C_t 值 > 38 ，且无明显扩增曲线，判断为玛雅罗病毒荧光 RT-PCR 检测阴性。

—— C_t 值 ≤ 35 ，并有明显扩增曲线，判断为玛雅罗病毒荧光 RT-PCR 检测阳性。

—— $36 \leq C_t$ 值 ≤ 38 的标本必须重做，若重做结果仍然有明显扩增曲线，则判断为玛雅罗病毒荧光 RT-PCR 检测阳性，否则为阴性。

——荧光 RT-PCR 结果阳性的标本可进一步进行 RT-PCR 扩增，对扩增片段测序和序列比对后，确认是否为玛雅罗病毒核酸阳性。



SN/T 4614-2016

书号：155066 · 2-32345

定价：14.00 元