



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3560—2013

国境口岸黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒、西尼罗病毒的多重实时荧光RT-PCR 检测方法

Detecting method for Yellow fever virus, Dengue virus, Chikungunya virus, West Nile virus by multiplex real-time fluorescence RT-PCR at frontier ports

2013-03-01 发布

2013-09-16 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、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：田桢干、郑夔、李强、孙立新、黄吉城、章琪、李平、曹敏、贾巍、何宇平、张显光、卢钟山。

国境口岸黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒、西尼罗病毒的多重实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了国境口岸黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒、西尼罗病毒的多重实时荧光 RT-PCR 检测方法检验的对象、检测方法、程序及结果报告。

本标准适用于国境口岸出入境人或蚊类携带黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒、西尼罗病毒的实验室快速筛查检测。

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/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

实时荧光 RT-PCR:实时荧光反转录-聚合酶链反应

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

HEX:HEX 荧光染料,一种荧光报告基团

Texas Red:Texas Red 荧光染料,一种荧光报告基团

CY5:CY5 荧光染料,一种荧光报告基团

BHQ:黑洞淬灭基团

LNA:锁核苷酸

4 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

4.1

黄热病毒 Yellow fever virus

属于黄病毒科黄病毒属成员,为 RNA 病毒,是引起人类黄热病的病原体。传播媒介为蚊虫。

4.2

登革病毒 Dengue virus

属黄病毒科黄病毒属,包括 I、II、III、IV 四种血清型,是有包膜的单股正链 RNA 病毒。登革病毒

可感染人,并引起登革热,严重者甚至可引起登革出血热或登革休克综合症。埃及伊蚊和白纹伊蚊是登革病毒的主要传播媒介。

4.3

基孔肯雅病毒 Chikungunya virus

披膜病毒科甲病毒属的第四组,核心含单股 RNA。人体感染该病毒后,可以引起基孔肯雅热,该病起病快,传播范围广。我国南方广泛存在的白纹伊蚊是其主要的传播媒介。

4.4

西尼罗病毒 West Nile virus

黄病毒科黄病毒属的重要成员,其基因组为单股正链 RNA 分子。西尼罗病毒可感染人,引起西尼罗热。库蚊是西尼罗热病毒的主要传播媒介。在欧洲和北美为尖音库蚊,在亚洲则为三带喙库蚊和致倦库蚊。

5 仪器和设备

需要如下仪器、设备:

- 含 FAM、HEX、Texas Red、CY5 四种荧光检测通道的实时荧光 PCR 仪;
- 生物安全柜;
- 普通冰箱;
- 70 °C 超低温冰箱;
- 普通台式离心机;
- 高速冷冻离心机(转速可达 20 000 g);
- 微量可调移液器(10 μ L、100 μ L、1 000 μ L)及配套带滤芯吸头;
- 离心管(1.5 mL);
- 涡旋器。

6 检测对象

- 6.1 入出境口岸疑似携带黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒、西尼罗病毒的媒介蚊虫。
- 6.2 入出境口岸疑似感染黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒、西尼罗病毒的人员。

7 检测

7.1 准备

实验室生物安全应符合 GB 19489 的规定。PCR 防污染措施按 WS/T 230 的要求。

7.2 实验室检测

7.2.1 标本的采集、运输和保存

7.2.1.1 人血清标本

无菌采集发病后 5 d 内静脉血 3 mL~5 mL,室温静置 30 min 使其凝固,然后 500 g 离心 10 min,去除纤维蛋白和红血球,收集血清于 2 mL 无菌螺口塑料管中,用耐低温油性记号笔记上编号,于 4 °C 送样箱中尽快送到实验室检测,或-70 °C 以下保存待检。

7.2.1.2 蚊子标本

根据实际工作需要采集蚊子标本。将采集的蚊子直接放入 -20°C 冰箱冻死后,取出,分类编号,按30只一份。装入2 mL螺口塑料管内,用耐低温油性记号笔记上编号,于 -70°C 以下运输或保存待检。

7.2.2 标本的处理

7.2.2.1 血清标本的处理

血清标本无需处理可直接提取核酸进行检测,如不能及时检测应存放在 -70°C 冰箱。

7.2.2.2 蚊标本的处理

在冰上操作。从 -70°C 容器中取出蚊标本,倒入研磨器中,加入1 mL标本处理液,反复研磨至组织碎片基本消失,随后将研磨液吸入1.5 mL eppendorf 离心管,配平后置预冷 4°C 的离心机上,20 000 g 离心10 min。取上清液进行核酸提取,剩余的蚊标本研磨液需保存在 -70°C 冰箱以备复查。

7.2.3 病毒核酸提取

可采用市售病毒 RNA 提取试剂盒以 QIAamp Viral RNA Kit,德国 Qiagen 公司产品为例¹⁾,内含 AVL、AW1、AW2、AVE 等成分。

- 取血清标本或蚊标本研磨液 140 μL 加入 560 μL 裂解缓冲液(lysis buffer)(AVL),在旋涡混合器上振荡 15 s 混匀,室温静置 10 min。
- 加入 560 μL 无水乙醇终止反应,在旋涡混合器上振荡 15 s 混匀。
- 裂解后的液体分两次移入管柱,每次 6 000 g 离心 1 min,此时病毒 RNA 会吸附在管柱底部的膜上。
- 加 500 μL 洗液(AW1)至管柱上,6 000 g 离心 1 min,弃去 AW1。
- 加 500 μL 洗液(AW2)至管柱上,20 000 g 离心 3 min,弃去 AW2。进一步 20 000 g 离心 1 min 以彻底去除残留在膜上的乙醇。
- 加入 60 μL 洗脱液(AVE),室温静置 1 min。
- 将管柱置于 1.5 mL 离心管上, 4°C 6 000 g 离心 1 min,得到的 RNA 即可进行实时荧光 RT-PCR 检测。

7.2.4 多重实时荧光 RT-PCR 检测

7.2.4.1 用于多重实时荧光 RT-PCR 检测的引物及探针

用于多重实时荧光 RT-PCR 检测黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒、西尼罗病毒的引物及探针序列及探针标记的荧光染料见表 1。

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。

表 1 多重实时荧光 RT-PCR 检测的引物及探针序列及标记的荧光染料

引物/探针	引物/探针序列(5'-3')	片段大小 bp	目标病毒
YFVf	GCTAATTGAGGTGCATTGGTCTG	89	黄热病毒
YVFr	CTGCTAATCGCTCAACGAACG		
YFVp	FAM-TCTGCAAATCGAGTTGCTAGGCAATAAACAC-BHQ1		
DENf	GCATATTGACGCTGGGARAGAC	67	登革病毒
DENr	GCGTTCTGTGCCTGGAWTGATG		
DENp	HEX-CA+GAGA+TCC+TGC+TGTCTC-BHQ1		
CHIKf	TGAGCGTCGGTGCCCAC	81	基孔肯雅病毒
CHIKr	GAGTCTTATACCGTACTCCCACCGT		
CHIKp	Texas Red-CGTACGAACACGTAACAGTGATCCCGAAC-BHQ2		
WNVf	GAAGTTGGGTAGACGGTGCTGC	90	西尼罗病毒
WNVr	GGTTCTGAGGGCTTACGTGGATC		
WNVp	CY5-CTGCGACCCAACCCCAAGGAGGACT-BHQ2		
注：登革病毒探针 DENp 为 LNA 探针，探针序列中的字母前带“+”号的表示 LNA 修饰碱基。其他三种病毒探针均为常规 TaqMan 探针。			

7.2.4.2 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。阳性对照为根据黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒、西尼罗病毒核苷酸序列体外合成的 RNA 片段，空白对照用无菌水作为荧光 PCR 反应的模板。

7.2.4.3 多重实时荧光 RT-PCR 反应体系组成

多重实时荧光 RT-PCR 采用一步法实时 RT-PCR 试剂盒(以 QuantiTect Multiplex RT-PCR Kit, 德国 Qiagen 公司产品²⁾为例), 多重实时荧光 RT-PCR 反应体系采用以下参数: 2 × QuantiTect Multiplex PCR Master Mix 12.5 μL; 引物探针混合液 5 μL(每种探针终浓度为 0.2 μmol/L、每种引物终浓度为 0.2 μmol/L); RNA 模板 5 μL; 去离子水 2.5 μL; 总体积 25 μL。

7.2.4.4 反应条件

多重实时荧光 RT-PCR 反应条件: 50 °C 逆转录 20 min; 95 °C 变性 15 min; 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火(延伸)75 s, 45 个循环, 在退火(延伸)阶段检测荧光信号。

7.2.4.5 荧光阈值的设定

PCR 反应完成后应设定荧光阈值以分析样品的(C_t)值。以 PCR 反应的前 3 个~15 个循环的荧光信号作为基线信号(噪音), 荧光阈值理论上定义为基线信号的标准偏差的 10 倍。在实际应用中可以根

2) 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。

据仪器基线信号进行人工调整,设定原则是以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线(无规则的噪音线)的最高点,且不出现(C_t)值为准。

7.2.4.6 质控标准

本文件质控标准为:

——阴性对照:无扩增曲线;

——阳性对照:出现典型的扩增曲线, C_t 值应小于 30.0。

否则,试验视为无效。

7.3 检验结果判断及报告

本方法检验结果判断及报告如下:

——某种病毒探针对应的检验样本 C_t 值小于或等于 35.0 时,报告该病毒核酸检测结果阳性;

——某种病毒探针对应的检验样本 C_t 值大于 35.0 且小于 45.0 时,重复检测一次,如果 C_t 值仍小于 45.0,且曲线有明显的对数增长期,可报告该病毒核酸检测结果阳性,否则报告阴性;

——某种病毒探针对应的样本检测不到 C_t 值时,报告该病毒核酸检测结果阴性;

——筛选阳性的样本进行黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒、西尼罗病毒 RT-PCR 特异性检测和进一步鉴定。

8 废弃物的处理

检验过程中的废弃物,收集后进行高压蒸汽灭菌处理或其他等效的处理方法。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
国境口岸黄热病毒、登革病毒、基孔肯雅
病毒、西尼罗病毒的多重实时荧光
RT-PCR 检测方法

SN/T 3560—2013

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)64275323

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 12 千字
2013年8月第一版 2013年8月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-25792 定价 16.00 元



SN/T 3560-2013