

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1718—2006

出入境口岸回归热检验规程

Examination codes of relapsing fever at entry-exit port

2006-01-26 发布

2006-08-16 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

本标准的附录 B 为规范性附录,附录 A、附录 C、附录 D 为资料性附录。

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:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:初月、古莉冰、朱玉兰、孙颖、张树平、徐媛。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

出入境口岸回归热检验规程

1 范围

本标准规定了出入境口岸回归热的检验对象、方法、结果报告、阳性结果处置。
本标准适用于出入境口岸的回归热检验。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

回归热 relapsing fever

由疏螺旋体引起,以节肢动物为媒介传播的急性传染病。

3 对象

3.1 疑似感染回归热螺旋体的出入境人员。

3.2 采集来自流行区动物身上的虱、蜱。

4 标本的处理

4.1 血液标本

发热期病人(体温在 39℃ 以上)的血液标本采集后,室温放置 1 h 后,用离心机 3 000 r/min 离心 15 min,吸取血清进行检测。离心后的血清如在 3 d 内检测,可放于 2℃~8℃ 冰箱保存;3 d 以上短期保存的,可在-20℃ 冰箱保存,长期保存,应在-80℃ 冰箱保存。

4.2 尿液标本

新鲜尿液标本 3 mL~5 mL 立即送检。

4.3 媒介标本

采集的虱、蜱 10 个以上用 500 μ L EDTA- Na_2 清洗,晾干。液氮保存或-80℃ 以下保存。

5 准备

检验试剂的准备参见附录 A。

6 实验室检验方法

出入境口岸回归热螺旋体实验室的检验方法如下:

——显微镜检测,见附录 B;

——血清学检测,参见附录 C;

——聚合酶链反应(PCR)检测,参见附录 D。

7 结果报告

7.1 显微镜检验报告

7.1.1 直接用暗视野显微镜检查或经染色后镜检,如见到卷发样,长约为红细胞直径的 2 倍~5 倍的疏螺旋体,即可报告“检出回归热螺旋体”;没有发现,报告“未检出回归热螺旋体”,同时注明检测方法。

7.1.2 全血棕黄色层定量分析(QBC),见到发荧光的螺旋体集中在交界面时,报告“检出回归热螺旋

体”；没有发现，报告“未检出回归热螺旋体”。

7.1.3 动物接种后每日采血镜检，于1 d~2 d见到大量螺旋体，报告：“经×日动物接种，检出回归热螺旋体”；没有发现，报告：“经动物接种，未检出回归热螺旋体”。

7.2 血清学、PCR 检验报告

7.2.1 检验结果为阴性，报告“阴性”，并注明检测方法。

7.2.2 检验结果为阳性，报告“阳性”，并注明检测方法。

8 阳性结果的处置

对初次回归热菌株及相应标本应送上级实验室(或指定的实验室)做复检或鉴定。阳性结果应在12 h内向上级主管部门及当地的卫生行政机关报告。

附 录 A
(资料性附录)

回归热螺旋体检验主要试剂及器材

A.1 主要试剂

A.1.1 培养基的主要成分

A.1.1.1 BSKH 培养基

精氨酸 57 mg/L, 柠檬酸 700 mg/L, 2'-脱氧胞嘧啶-盐酸 11.6 mg/L, 黄素腺嘌呤二核苷酸 0.106 mg/L, 硫酸镁 97.69 mg/L, 乙酸钠 50 mg/L, 磷酸二氢钠 122 mg/L, 葡糖醛酸钠 3.88 mg/L。

A.1.1.2 BSK11

精氨酸 70 mg/L, 柠檬酸钠 800 mg/L, 2'-脱氧胞嘧啶 10 mg/L, 黄素腺嘌呤二核苷酸 1.0 mg/L, 凝胶 14 000 mg/L, 硫酸镁 200 mg/L, 乙酸钠 83 mg/L, 磷酸二氢钠 140 mg/L, 葡糖醛酸钠 4.2 mg/L。

A.1.1.3 MKM 培养基

包含 0.7×CMRL 1066(包含 Neopepton 2.1 g/L, HEPES 4.2 g/L, Na-citrate 0.5 g/L), 葡萄糖 3.5 g/L, 丙酮酸钠 0.56 g/L, N-乙酰氨基葡萄糖 0.28 g/L, 碳酸氢钠(NaHCO₃) 1.5 g/L, 5%加热失活兔血清, 牛血清白蛋白 34 g/L, 凝胶 10 g/L。

A.1.2 血清学试剂的配制

A.1.2.1 TBS-T(pH7.4)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	2.42 g
氯化钠(NaCl)	8.19 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
Tween-20	50 μL
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2.2 EIA 封闭液

胎牛血清	30 mL
TBS-T	1 000 mL

A.1.2.3 TSE-Tween 溶液(pH7.4)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	6.05 g
氯化钠(NaCl)	8.78 g
EDTA	1.46 g
Tween-20	50 μL
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2.4 ELISA 稀释液(pH7.4)

马血清	50 mL
硫酸糖苷	10 μL
Tween-20	0.5 mL
PBS	1 000 mL

A.1.3 PCR 检测试剂的配制

A.1.3.1 SDS 溶液

氢氧化钠(NaOH)	4 g
氯化钠(NaCl)	117 g

十二烷基硫酸钠(SDS)	50 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 1. 3. 2 TSE 缓冲液(pH8.0)

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	6.05 g
EDTA	14.6 g
蔗糖	150 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 1. 3. 3 TE 缓冲液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	1.21 g
EDTA	0.29 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 2 主要器材

A. 2. 1 显微镜检验用器材

- 普通生物显微镜；
- 荧光显微镜；
- 离心机。

A. 2. 2 血清学检验用器材

- 96孔聚乙烯板；
- 37℃水浴箱；
- 超声波破碎仪；
- 酶标检测仪、洗板机；
- 普通冰箱。

A. 2. 3 PCR 检验用器材

- 高速台式离心机；
- PCR 仪；
- 电泳仪；
- 微波炉；
- 荧光 PCR 仪；
- 凝胶成像分析系统或紫外线投射仪。

附 录 B
(规范性附录)
直接显微镜检测

B.1 暗视野检查

将加有抗凝剂的血液、新鲜尿液 1 滴~2 滴于玻片上,加盖盖玻片后,置于暗视野显微镜下观察,若发现两端尖削的具有 5 个~7 个不规则疏螺旋的细长螺旋体时,再取血进行染色检查。

B.2 染色检查

B.2.1 取血 1 滴~2 滴置于玻片两端制成薄片和厚片,薄片用甲醇固定,厚片则加蒸馏水溶血,用瑞式或姬姆萨染色。

B.2.2 在 100×油浸接物镜下观察,可见形如曲发样染成红色或紫红色疏螺旋体。

B.2.3 根据临床表现也可取脑脊液和尿液进行检查。

B.3 全血棕黄色层定量分析(QBC)

B.3.1 收集病人的外周血液样本,将大约 55 μL ~65 μL 加入 QBC 管中,与包被在管内的吖啶橙染料混匀。

B.3.2 塞住管口,在 12 000 r/min 下离心 5 min。

B.3.3 取血浆和白血球交界面的样品在荧光显微镜下用 50×油浸接物镜观察有发荧光的螺旋体。

B.4 动物接种后显微镜检查

取病人血液 2 mL 注射入小白鼠或幼龄大白鼠腹腔内,若标本有污染,则改作皮下注射。于次日起每日取被接种动物血液作暗视野及染色镜检,一般在注射后 2 d~3 d 可找到螺旋体。若未检出,须继续培养检查至 2 周。

附录 C
(资料性附录)
血清学检测方法

C.1 酶联免疫分析试验(EIA)

C.1.1 实验步骤

C.1.1.1 将 0.1 μg *B. hermsii* 菌液溶解于 100 μL 0.1 mol/L 碳酸钠(Na_2CO_3)缓冲液(pH9.6)中,用该缓冲液包被聚苯乙烯板,放于 4 $^\circ\text{C}$ 过夜。

C.1.1.2 然后用洗液 TBS-T 洗涤五次。

C.1.1.3 300 μL /孔的 EIA 封闭液 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 30 min 后,用 TBS-T 洗涤五次。

C.1.1.4 待测血清用 EIA 封闭液 1:500 倍稀释后加入聚苯乙烯板 U 型孔中(100 μL /孔)。设置 6 个阴性对照。

C.1.1.5 将检测板 37 $^\circ\text{C}$ 温浴 1 h 后,用 TBS-T 洗涤五次。

C.1.1.6 结合的抗体用偶联有碱性磷酸酶的羊抗人 IgG 和 IgM(重链和轻链)检测出来。

C.1.1.7 每孔加入该结合液 100 μL (TBS-T 1:10 000 稀释),37 $^\circ\text{C}$ 保温 1.5 h。如上洗涤后每孔再加入 100 μL 对磷酸硝基苯基酯(2 mg/mL)溶于含 1 mol/L 氯化镁(MgCl_2)的 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液,保温 0.5 h。然后用 5 mol/L 的氢氧化钠(NaOH)(100 μL /孔)终止反应。

C.1.1.8 405 nm 下测定其 A 值。

C.1.2 结果判定

C.1.2.1 当样品 A 值小于 6 个阴性对照平均值加一个标准方差的和时结果为阴性。

C.1.2.2 当样品 A 值大于 6 个阴性对照平均值加三个标准方差的和时结果为阳性。

C.1.2.3 样品 A 值介于两者之间的结果为不确定。

C.1.2.4 结果为阳性或不确定的样品进一步单独用 IgM 或 IgG 进行蛋白印迹(Western blots)实验确认。

C.2 蛋白印迹(Western blots)

C.2.1 将回归热螺旋体菌液进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白条带,然后转移至硝化纤维膜上。膜浸入 TSE-Tween 溶液室温过夜封闭。

C.2.2 加入人血清(1:100 稀释)标记 30 min,结合上的 IgM 或 IgG 用标记在适当支持物上的含有碱性磷酸酶的羊抗人 IgM 或 IgG 检测。

C.2.3 对于 IgM,如果三个区域(66,41-39 和 21-18kDa)中至少两个区域发生反应或 IgG 四个区域(66,41-39,32-28,21-18kDa)中至少三个区域发生反应时,结果为阳性。

C.3 免疫荧光分析试验(IFA)

C.3.1 BSKH 培养回归热螺旋体,离心收集菌体后用 PBS 洗涤两次,与羊红血细胞混匀。

C.3.2 将细胞悬浮物制备成薄血片,室温晾干,甲醇固定后储存于 -20 $^\circ\text{C}$ 备用。

C.3.3 人血清 1:16~1:2 048 对倍稀释后进行检测。

C.3.4 结合的抗体用 100 倍稀释的羊抗人 IgG-异硫氰酸盐荧光素和荧光显微镜来检测。荧光浓度用 +~++++ 来表示,终点用比阴性对照强的最大稀释倍数记录。几何平均数滴度方法参照 Perkins's method。

C.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)

- C.4.1 培养螺旋体细胞,待浓度长到 10^8 个/mL 时,12 500 r/min 离心收集菌体,PBS 洗涤两次,菌液稀释到 $A_{600}=0.05$ 。
- C.4.2 悬浮液用超声波仪破碎细胞。悬液中蛋白浓度定量参照 Bradford assay 手册。蛋白悬液放于 -4°C 备用。
- C.4.3 用螺旋体蛋白碎片 $100\ \mu\text{L}$ /孔包被 96 孔板, 37°C 过夜晾干。
- C.4.4 加入 $200\ \mu\text{L}$ 稀释液保温 1 h,再用 PBS-0.05% Tween-20 洗涤一次。
- C.4.5 加入 $100\ \mu\text{L}$ 对倍稀释的血清(从 1:32~1:4 096)保温 1 h。
- C.4.6 洗涤三次后,加入 $100\ \mu\text{L}$ 1:2 500 倍稀释的羊抗人 IgG,保温 1 h。
- C.4.7 再洗涤三次,用 50% 2,2-azino-di(3-ethyl-benzthiazoline sulfonate)显色 20 min, $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ 终止反应,在酶标仪 405 nm 下测定。

附 录 D
(资料性附录)
PCR 技术检测

D.1 血清标本的检测**D.1.1 引物和探针**

利用核酸序列分析软件选择回归热螺旋体鞭毛基因上一段序列作为引物,该对引物特异性高,可作使用时参考。使用 Beacon Designer2.0 软件设计分子荧光探针,荧光探针用 5'-tetrachloro-6-carboxy fluorescein(TET)和 3'-4-[4'-dimethylaminophenylazo]benzoic acid(DABCYL)标记。

Brec442F 5'-GCTGAAGAGCTTGGAATGCAAC-3'

Brec551R 5'-GCTTCATCCTGATTTGCACCAAC-3'

Br479MBP TET-CGCGATCACCAGCATCATTATCTGAATCACAAATCGCG-DABCYL

D.1.2 模板

取 1 mL 血清,13 000 r/min 离心 10 min,吸去 800 μ L 悬浮物,残留的 200 μ L 与 300 μ L SDS 溶液混匀。95 $^{\circ}$ C 温浴 15 min 后,加入 200 μ L 0.1 mol/L Tris-HCl(pH8)。然后用酚、三氯甲烷、异戊醇抽提,用水溶解螺旋体 DNA。为了定量 PCR,用浓度为含有 $10^0 \sim 10^8$ 螺旋体的目的基因的质粒进行分析。该质粒 pCRII-TOPO(包含 borrelia 扩增子,Br442F,Br551Rprimers)由 TOPO TA cloning kit 构建。

D.1.3 扩增

25 μ L 体系,参照以下加样量加样:

模板	1 μ L
10 \times buffer[含有 50 mmol 氯化镁(MgCl ₂)]	2.5 μ L
dNTP(2 mmol/L)	2.5 μ L
上游引物(10 μ mol/L)	1.25 μ L
下游引物(10 μ mol/L)	1.25 μ L
荧光探针(10 μ mol/L)	0.5 μ L
Taq 酶(5 U/ μ L)	0.25 μ L
三蒸水	15.75 μ L

反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min,然后两步法扩增 94 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s 进行 45 个循环。

D.2 虱、蜱标本检测**D.2.1 样本制备**

将采集的虱、蜱 10 个以上装入 1.5 mL 管中,碾碎后装入消毒的玻璃珠,然后加入 500 μ L 浓度为 10 mg/mL 的 TES 缓冲液。37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min,加入 30 μ L 10%SDS,再温浴 20 min。然后 15 000 r/min 离心 3 min,将上清液转移至干净的 1.5 mL 管中。上清液加入 100 μ L 酚-三氯甲烷(1:1),振荡 15 s,静置 2 min,15 000 r/min 离心 15 min。小心转移上层水相至一新的 1.5 mL 离心管中,加 500 μ L 异戊醇混匀,冰上静置 10 min。4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 15 min,弃上清,加入 1 mL 70%乙醇清洗沉淀,最后用 10 μ L TE 缓冲液溶解。

D.2.2 引物

下列一对引物是根据回归热螺旋体鞭毛基因的一段设计,具有高度特异性,可作使用时参考。阳性标本可扩增出 282 bp 的片段。

上游引物:5'-AGCTGGATCACAAAGCTTCATGGACA-3'

下游引物:5'-CCCTCTATCTTTGCAAGTGACA-3'

D.2.3 扩增

取 PCR 管编号,参照以下加样量加样:

模板	1 μ L
10 \times buffer	2 μ L
dNTP(25 mmol/L)	0.2 μ L
上游引物(1 μ mol/L)	1 μ L
下游引物(1 μ mol/L)	1 μ L
<i>Taq</i> 酶	0.3 μ L
三蒸水	14.2 μ L

充分混匀后,在离心机上将管内液体甩入管底。

进行 PCR 扩增,反应条件:94 $^{\circ}$ C 15 s,然后 93 $^{\circ}$ C 10 s,48 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 3 min。

D.2.4 电泳检测

扩增结束后在管中加入溴酚蓝,在 1.5%琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭)电泳,紫外灯下观察结果。
