

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1486—2004

SN/T 1486—2004

### 输入性蚊类携带的黄热病毒检测方法

Detecting methods for yellow fever virus in imported mosquitoes

中华人民共和国出入境检验检疫  
行业标准  
输入性蚊类携带的黄热病毒检测方法  
SN/T 1486—2004

\*

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.bzchs.com](http://www.bzchs.com)

电话:68523946 68517548

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 15 千字

2005年2月第一版 2005年2月第一次印刷

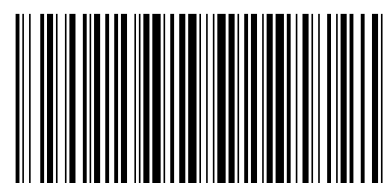
\*

书号: 155066·2-16085 定价 8.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



SN/T 1486-2004

2004-11-17 发布

2005-04-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

### A.3 病毒分离培养

#### A.3.1 胸腔接种法

将实验室内饲养羽化的正常伊蚊放在冰浴的试管里 5 min~10 min,待其不活动后,放在解剖镜下的载玻片上,以接种用注射针头刺入蚊虫体内。雌蚊注射部位是中胸前侧片的前部与气孔下部之间的膜。雄蚊是注入于其颈膜,一刺入蚊体就将玻璃管刻有标记的部位置于解剖镜视野下,看到液柱时推动注射器的柱塞。当已达到接种的液体量,即对注射器的柱塞减压或稍向后拉。注意不要刺穿蚊体,并检查所接种的液体是否都注入蚊体。每只蚊接种 0.17  $\mu$ L 后,用小镊子把蚊虫从接种用注射针头上取下,放入蚊笼中,置 27 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C 培养 10 d,同时设置未染毒正常蚊虫作为对照组。

#### A.3.2 细胞培养法

将待检蚊虫匀浆接种 C6/36 细胞单层培养,每管接种 100  $\mu$ L,每份样品接种 3 管~4 管细胞,置 28 $^{\circ}$ C 培养,黄热病毒所致细胞病变表现为折光性增强、圆缩、脱落,可收取细胞培养上清液低温保存,供传代或作进一步鉴定之用。如未发现有上述变化,应于第 7 d 取培养液重复冻融两次,取上清液接种新鲜正常细胞,盲传 3 代后,仍无细胞病变的可判断为阴性。

#### A.3.3 乳鼠脑内接种

取待检蚊虫匀浆,在乙醚麻醉下注入 3 d~4 d 龄同窝乳鼠脑内,0.025 mL/只,每份样品接种 5 只~8 只,在防蚊的条件下观察 14 d 乳鼠,每天两次(接种后 24 h 内死亡的,应判断为非病毒感染死亡,不必继续做病毒培养分离)。发现有松毛、震颤、步履蹒跚等症状,说明可能有病毒感染,应在其濒死前取病鼠脑组织制备匀浆或低温冷冻切片,用于进一步鉴定。盲传 2 代(盲传方法为:按无菌操作取出鼠脑组织,用 pH7.2~pH8.0 含血清或白蛋白的缓冲液制成 10% 脑悬液,脑内注射 1 d~3 d 龄乳鼠)后,未出现上述病变的,初步可判断为阴性。

### A.4 病毒鉴定方法

#### A.4.1 病毒鉴别(血凝抑制试验,HI 试验)

##### A.4.1.1 血凝素滴定

每次进行血凝抑制实验前必须作血凝素滴定,50  $\mu$ L 的 PBS 或盐水加入 96 孔微量板 A-H 行的 2 孔~12 孔,被检病毒各 50  $\mu$ L 分别加入 A-H 行的第一孔,然后倍比稀释至第 11 孔,弃去 50  $\mu$ L,12 孔为阴性对照。加 50  $\mu$ L 的 1% 鹅红细胞于每一孔,注意从低浓度至高浓度加入。混匀、室温静置 45 min~60 min。完全血凝的最高稀释度的倒数为血凝滴度。完全凝集为+,不完全凝集+/-,无凝集为一。结果判定以++为作为一个血凝单位(HAU),血凝抑制实验用 4 HAU。

##### A.4.1.2 血凝抑制试验(HI 试验)

阴性血清和阳性血清作为对照。加 PBS 或生理盐水 25  $\mu$ L 于 96 孔板的第 B 行至 H 行的每一孔。加 1:10 稀释的标准血清 50  $\mu$ L 于 A 行的每一孔。用多通道移液器从 A 行各孔取 25  $\mu$ L 血清,倍比稀释至 H 排各孔,弃去 25  $\mu$ L。25  $\mu$ L 被检病毒的 4 HAU 抗原加至各孔,混匀,室温静置 15 min~30 min,然后加 50  $\mu$ L 的 1% 鹅红血球,室温静置 30 min~60 min 后观察结果。在阴性对照孔中 RBC 完全沉淀后判定血凝抑制效价。

##### A.4.1.3 结果判定

阴性血清对照均无自凝现象,阳性血清对照应抑制相应血凝素凝集细胞。血凝被完全抑制的血清最大稀释度的倒数为血凝抑制试验的终点,该孔稀释度即为 HI 试验的效价。

——血清抗体滴度 4 倍或以上升高者为阳性。

——血清抗体滴度 4 倍以下者为阴性。

## 前 言

本标准的附录 A 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。

本标准由中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国海南出入境检验检疫局、中华人民共和国陕西出入境检验检疫局负责起草。

本标准主要起草人:张升、郑剑宁、俞雪钧、黄兴琪、黄廷学、闫护森。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

——待测样品与阳性对照电泳后在相同位置出现特异性病毒核酸显色条带者为阳性。

——无核酸带或核酸带的大小不是相应 bp 数的为阴性。

## 7 病毒分离鉴别与酶联免疫吸附试验检测方法

参见附录 A。

## 8 检测结果报告

8.1.1 逆转录聚合酶链式反应法检测为阳性的,报告为“检出黄热病毒特异性基因(RT-PCR 法)”。

8.1.2 血凝抑制试验(HI 试验)检测阳性的,报告为“黄热病毒检测阳性(HI 试验)”。

8.1.3 ELISA 双抗体夹心法检测结果阳性,报告为“检出黄热病毒抗原(ELISA 双抗体夹心法)”。

## 9 阳性结果处置

采用 RT-PCR 法或其他检测方法进行检测,出现阳性结果的相应标本应送有资质的实验室做复检或鉴定。确定阳性结果后应立即向上级主管部门报告。

# 输入性蚊类携带的黄热病毒检测方法

## 1 范围

本标准规定了国境口岸输入性蚊类中携带的黄热病毒检测的检测对象、生物安全要求、检测方法、结果的报告及处置。

本标准适用于检验检疫机构对输入性蚊类体内携带黄热病毒的检测和报告。口岸发现的蚊类携带黄热病毒检测可参考本标准执行。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

SN/T 1243 国境口岸黄热病检验规程

WS 233 微生物生物医学实验室生物安全通用准则

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 3.1

**输入性蚊类 imported mosquitoes**

通过入境交通工具、集装箱、货物、行李及邮包携带入境的伊蚊属。

### 3.2

**黄热病毒 yellow fever virus**

为黄热病的病原体,属虫媒病毒中披膜病毒科黄病毒属。黄热病毒颗粒呈球形,直径  $22\ \mu\text{m}\sim 38\ \mu\text{m}$ ,外有脂蛋白包膜包绕,包膜表面有刺突,病毒基因组为单股正链 RNA。

## 4 检测对象

输入性蚊类中伊蚊属,主要为埃及伊蚊。

## 5 实验室生物安全要求

实验室生物安全要求见 SN/T 1243 及 WS 233。

下列操作必须在生物安全 3 级(BSL-3)实验室进行:

——用蚊胸腔接种的方法分离病毒;

——收集或浓缩病毒或其培养产物;

——溶解、固定或其他方法处理灭活的病毒;

——可能产生含病毒气溶胶的样品处理;

——离心管和离心机转头的封闭和开启。