

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1460—2004

SN/T 1460—2004

### 输入性蚊类携带西尼罗病毒与 圣路易脑炎病毒的检测方法

Detecting methods for west nile virus and St. Louis  
encephalitis virus in imported mosquitoes

中华人民共和国出入境检验检疫  
行业标准  
输入性蚊类携带西尼罗病毒与  
圣路易脑炎病毒的检测方法  
SN/T 1460—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.bzcb.com](http://www.bzcb.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

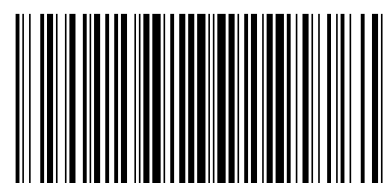
\*

书号: 155066·2-16059 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 1460-2004

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.2 样品预处理和制备

### A.2.1 样品预处理

同 6.2.1.1。

### A.2.2 样品制备

将待检蚊虫样本每组用含 10 倍于常规细胞培养用量青、链霉素的无菌生理盐水漂洗三次,然后按每只蚊虫加 0.04 mL 无菌生理盐水(内含青霉素 100 IU/mL,链霉素 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),用玻璃研磨器制成匀浆,置 4℃作用 4 h~8 h;以 14 000 r/min 离心 3 min,然后取上清用于接种,分离病毒。

## A.3 病毒分离培养

### A.3.1 细菌污染检查

将上述除菌液接种于普通营养琼脂平板,37℃培养 24 h,检查细菌生长情况。若有细菌生长,应进一步作无菌处理。

### A.3.2 蚊胸腔接种

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  $\mu\text{L}$  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℃培养 10 d。

分离西尼罗病毒接种白纹伊蚊;分离圣路易脑炎病毒接种埃及伊蚊。

### A.3.3 蚊检测样本制备

将接种培养 10 d 后的伊蚊样本和正常对照组伊蚊分别用含 10 倍于常规细胞培养用量青、链霉素的无菌生理盐水漂洗三次,然后按每只蚊虫加 0.04 mL 无菌生理盐水(内含青霉素 100 IU/mL,链霉素 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),用玻璃研磨器制成匀浆,置 4℃作用 4 h~8 h;以 14 000 r/min 离心 3 min,然后取上清用于病毒检测。

## A.4 检测方法

### A.4.1 病毒鉴定

#### A.4.1.1 方法(血凝抑制试验,HI 试验)

##### A.4.1.1.1 血凝素滴定

在 V 型孔微量血凝反应板的第一排 1 孔~8 孔及第二排 1 孔~4 孔各孔内加生理盐水 50  $\mu\text{L}$ ,第三排 1 孔~2 孔加生理盐水 100  $\mu\text{L}$ (鹅红细胞对照孔)。

于第一排第 1 孔加 1:10 稀释的样品匀浆 50  $\mu\text{L}$ ,依次倍比稀释至第 8 孔,吸出 50  $\mu\text{L}$  弃去,稀释度分别为 1:20~1:2 560。于第二排第 1 孔加 1:5 稀释的对照组蚊虫匀浆 50  $\mu\text{L}$ ,倍比稀释为 1:10~1:80。以上各孔内再加入生理盐水 50  $\mu\text{L}$ 。然后在各孔内均加入 1%鹅红细胞悬液(GRBC)50  $\mu\text{L}$ (总量为 150  $\mu\text{L}$ )。将血凝反应板置微型振荡器上混合 1 min,放入湿盒内,室温静置 45 min~60 min 后观察结果。

以出现“++”血凝为终点,作为 1 个血凝单位(HAU);正式试验一般采用 4 个 HAU。如果血凝滴度为 1:640,则 4 个 HAU 为 1:160,即将样品匀浆作 1:160 稀释用于血凝抑制试验。

正常蚊虫匀浆及鹅红细胞对照孔应不出现血凝现象。

##### A.4.1.1.2 血凝抑制试验(HI 试验)

血凝抑制试验操作如下:

- a) 将抗西尼罗病毒和抗圣路易脑炎病毒的标准血清分别用生理盐水从 1:20 开始,倍比稀释至所标示的 HI 效价,每孔 50  $\mu\text{L}$ ,设置为两列。

## 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:郑剑宁、裘炯良、黄廷学、闫护森、施惠祥、卢岳云、杨定波。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

为 50  $\mu\text{L}$ 。

95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 2 min,再加入 1IU~2IU 的 *Taq* DNA 聚合酶,50  $\mu\text{L}$  矿物油覆盖。将反应管置于 PCR 扩增仪内 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,再 94 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s $\rightarrow$ 55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s,30 次~36 次循环,然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 12 min,最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

#### 6.2.6 设立对照

在下列操作中应设立对照:

- 在样品处理过程中应设立阳性样品对照、阴性样品对照和空白对照;
- 分别取已胸内接种感染西尼罗病毒与圣路易脑炎病毒的实验室羽化雌伊蚊作为阳性对照;
- 取实验室羽化的正常雌伊蚊作为阴性对照;
- 取等体积的水代替模板作为空白对照。

#### 6.2.7 琼脂糖凝胶电泳

用 TBE 电泳缓冲液配制 2% 的琼脂糖(含 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溴化乙锭,EB)平板。将平板放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将 6  $\mu\text{L}$  样品和 2  $\mu\text{L}$  样品缓冲液混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照,推荐使用 pUC19 DNA/Msp(HpaII)。5 V/cm 电泳约 0.5 h,当溴酚蓝到达底部时停止。

#### 6.2.8 结果判定

6.2.8.1 在紫外灯下观察核酸带并判断结果。

6.2.8.2 PCR 后阳性对照会出现一条 DNA 片段带,阴性对照和空白对照没有该核酸带。DNA 片段带的位置根据所选引物对的不同而不同。

6.2.8.2.1 西尼罗病毒核酸带的位置如下:

- 引物对 1 检测出的病毒核酸带在 70 bp 位置;
- 引物对 2 检测出的病毒核酸带在 408 bp 位置;
- 引物对 3 检测出的病毒核酸带在 103 bp 位置。

6.2.8.2.2 圣路易脑炎病毒核酸带的位置如下:

- 引物对 1 检测出的病毒核酸带在 393 bp 位置;
- 引物对 2 检测出的病毒核酸带在 495 bp 位置;

6.2.8.3 待测样品电泳后在相应 bp 数的 DNA 位置上有核酸带者为阳性。

6.2.8.4 无核酸带或核酸带的大小不是相应 bp 数的为阴性。

### 7 病毒分离鉴定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 逆转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)检测到西尼罗病毒或圣路易脑炎病毒特异性基因,报告为“检出西尼罗病毒特异性基因或圣路易脑炎病毒特异性基因(RT-PCR 法)”。

8.2 含病毒材料进行蚊胸腔接种后采用血凝抑制试验(HI 试验)鉴定证实,报告为“检出西尼罗病毒或圣路易脑炎病毒(HI 试验)”。

8.3 ELISA 双抗体夹心法检测结果阳性,报告为“检出西尼罗病毒或圣路易脑炎病毒抗原(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指定的实验室做复检或鉴定。阳性结果应立即向上级主管部门报告。

## 输入性蚊类携带西尼罗病毒与圣路易脑炎病毒的检测方法

### 1 范围

本标准规定了国境口岸输入性蚊类携带西尼罗病毒与圣路易脑炎病毒检测的生物安全要求、检测对象、检测方法、结果的报告、阳性结果处置。

本标准适用于检验检疫机构对输入性蚊类体内携带西尼罗病毒与圣路易脑炎病毒的检测和报告,对口岸发现的蚊类检测西尼罗病毒或圣路易脑炎病毒也可参照执行。

### 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。凡是注明日期的引用文件,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。凡是未注明日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 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、货物及行李带入境内的库蚊、伊蚊属。

#### 3.2

**西尼罗病毒** **west nile virus, WNV**

为西尼罗热的病原体,属黄病毒科,黄病毒属。电镜下呈球形,有囊膜,40 nm~60 nm 的 20 面体对称型单股正链 RNA 病毒,约 1 000 bp~11 000 bp。

#### 3.3

**圣路易脑炎病毒** **St. Louis encephalitis virus, SLEV**

为圣路易脑炎的病原体,属黄病毒科,黄病毒属的 RNA 病毒。

### 4 检测对象

输入性蚊类。

### 5 生物安全要求

下列操作必须在生物安全 3 级(BSL 3)实验室中进行:

- 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;
- 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。