

—D(C):5'—TTG CAC CAA CAG TCA ATG TC—3'(20 bp)。

### B.3.2.2 型特异性引物

常用登革病毒型特异性引物有：

—TS1:5'—CAC CTC AGT AAT TCG AGG ACA T—3'(22 bp)；

—TS2:5'—CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG—3'(21 bp)；

—TS3:5'—TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C—3'(22 bp)；

—TS4:5'—CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A—3'(22 bp)。

### B.3.3 培养材料

#### B.3.3.1 细胞培养物标本

将感染病毒后的 C6/36 白纹伊蚊传代细胞培养 5 d~7 d,分别收集上清液和细胞,置-70℃保存。

#### B.3.3.2 组织标本

尸检标本、感染登革病毒后的乳鼠脑、脾、肝等组织,置-70℃保存。

#### B.3.3.3 血液标本

无菌采集发病后 3 d~5 d 内静脉血 3 mL,置-70℃保存。

### B.3.4 病毒 RNA 制备

按商品试剂盒说明书进行操作。所提取的病毒 RNA 如不立即使用,应置于-70℃保存。

### B.3.5 PCR 扩增

按商品试剂盒说明书的操作说明,对提取的病毒 RNA 进行 PCR 扩增。

### B.3.6 扩增产物鉴定和分析

#### B.3.6.1 琼脂糖凝胶电泳分析

在 100 mL 1×TBE 中加 2 g 琼脂糖,在微波炉内溶解后,加入 5 μL 溴化乙锭(10 mg/mL)混匀,稍冷后制成 2%的胶。取 10 μL 扩增产物与 1 μL 含溴酚蓝的样品缓冲液混合,加到琼脂糖凝胶孔中,同时加上含期望扩增片段大小的分子量标准作为参照,用 1×TBE 作电泳缓冲液进行电泳,电泳完毕后置紫外灯下观察扩增产物的带型,如果条带的分子量与预期片段大小相同,则表明为特异扩增产物。

#### B.3.6.2 限制酶切分析

根据被扩增片段中的内切酶位点,用相应的内切酶消化,同样在紫外灯下观察,如出现预期片段(如有一酶切位点,则出现两个片段),则证明扩增产物是特异的。

#### B.3.6.3 碱基序列分析

按常规方法对扩增产物进行部分核苷酸序列分析。

### B.3.7 意义

此法可对早期病例进行登革病毒的检测及分型鉴定。

# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1470—2004

## 国境口岸登革热检验规程

Examination codes for dengue fever at frontier port



SN/T 1470-2004

版权专有 侵权必究

\*

书号:155066·2-16069

定价: 8.00 元

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

中华人民共和国出入境检验检疫  
行业 标准  
国 境 口 岸 登 革 热 检 验 规 程  
SN/T 1470—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.bzcs.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 16 千字  
2005年2月第一版 2005年2月第一次印刷

\*  
书号: 155066·2-16069 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

## B.2 应用乳小白鼠分离登革病毒

### B.2.1 材料

同 B.1.1。

C6/36 白纹伊蚊传代细胞改用 1 d~3 d 龄乳小白鼠。

### B.2.2 病毒分离

每一待检标本接种 10 只 1 d~3 d 龄小白鼠,每只脑内接种全血或 1:10 血清或组织悬液 10  $\mu$ L~20  $\mu$ L,接种后 48 h 内死亡者作非特异性死亡,弃去。存活者观察至 10 d 左右仍未发病时,剖取其中 2 只,取脑,用 pH8.0 肉汤制成 10% 悬液,盲传 1 d~3 d 龄小白鼠 10 只,其余的及盲传的均观察至第 4 周,未发病作阴性结果。在观察期内若发病(出现松毛、蜷缩、活动力降低、站立不稳、抽搐、离群、不进食、瘫痪等症状)则剖取半边脑,制成 10% 鼠脑悬液,按盲传法转种 1 d~3 d 龄小白鼠,并作无菌试验,另一半脑置 5.43 mol/L(50%)甘油缓冲液中低温保存。无菌试验阴性而重复以上症状的乳鼠作为可疑毒株传代、保种,并进行鉴定。

### B.2.3 病毒鉴定

同 B.1.3。

脑组织片的制备:取发病濒死的小鼠脑组织以冰冻切片制成 10 孔组织片,经吹干,冷丙酮固定 10 min,冲洗,吹干后放 -20℃ 保存。正常脑组织同法制作。

## B.3 RT-PCR 技术检测登革病毒基因及基因分型

### B.3.1 仪器与试剂

#### B.3.1.1 仪器

常用仪器主要有:

- 10  $\mu$ L~100  $\mu$ L、100  $\mu$ L~1 000  $\mu$ L 可调加样器;
- 台式高速离心机(转速 14 000 r/min 以上);
- 旋涡混合器;
- 电泳仪、电泳槽;
- 基因扩增仪;
- 紫外分析仪。

#### B.3.1.2 试剂

常用试剂及其制备:

- 病毒 RNA 提取商品试剂盒;
- 一步法 RT-PCR 商品试剂盒;
- 10×TBE 缓冲液(108 g Tris 粉,9.3 g EDTA- $\text{Na}_2$ ,55 g 硼酸,完全溶解后用稀盐酸调至 pH8.0,加水至 1 000 mL,用前稀释成 0.5 或 1 倍);
- 加样缓冲液(0.5% 溴酚蓝和质量体积比为 40% 的蔗糖溶于水后,分装于 4℃ 保存);
- 溴化乙锭(10 mg/mL,使用浓度为 0.5  $\mu$ g/mL);
- 琼脂糖(电泳纯);
- 无 RNA 酶蒸馏水;
- 无水乙醇。

### B.3.2 引物

#### B.3.2.1 通用引物

常用登革病毒通用引物有:

- D(G):5'-TAT GCT GAA ACG CGC GAG AAA-3'(21 bp);

**附录 B**  
(资料性附录)  
**病原学检测**

**B.1 C6/36 白纹伊蚊传代细胞分离登革病毒****B.1.1 材料**

常用的材料主要有：

- C6/36 白纹伊蚊传代细胞；
- 新生小牛血清；
- Eagles；
- 青霉素、链霉素；
- 各型登革病毒单克隆抗体；
- 羊抗鼠荧光 IgG 及免疫荧光试验用品。

**B.1.2 病毒分离**

C6/36(白纹伊蚊纯系细胞株)传代细胞。待细胞长成单层后,倒去培养液,每管接种用 Hanks 液稀释成  $10^{-1}$  的患者血清 0.1 mL 或组织悬液 0.2 mL,37℃ 吸附 1 h 后加维持液 0.9 mL 或 0.8mL,置 35℃ 静止培养,观察 7 d。若细胞出现膨大至融合,折光度增强、颗粒增多等现象,取细胞悬液 0.1 mL,进行传代,仍出现同样病变者,为阳性结果,应保种并进行鉴定。若 7 d 后细胞不出现病变,需盲传 1 代~2 代,仍不出现病变者用间接免疫荧光试验作进一步检查,阴性者作阴性报告。

**B.1.3 病毒鉴定****B.1.3.1 间接免疫荧光试验(IFA)****B.1.3.1.1 细胞片制备**

把出现“++”病变的 C6/36 白纹伊蚊传代细胞管倒去维持液(若不出现病变,则需培养 7d 再制片),用 pH7.2 磷酸缓冲液洗两次后加磷酸缓冲液 3 mL,用滴管把细胞从管壁上吹下,吹散,2 000 r/min 离心 5min,弃去磷酸缓冲液,加磷酸缓冲液 0.2 mL 把沉渣吹散,滴加在 10 孔的载玻片各孔中,电风扇吹干,加冷丙酮固定 10 min,用磷酸缓冲液冲洗两次,蒸馏水漂洗一次,吹干,-20℃ 保存。正常 C6/36 白纹伊蚊传代细胞对照按同法制片。

**B.1.3.1.2 检测**

取出保存的待鉴定细胞片,吹干,于各孔中按顺序滴加 4 个型登革病毒使用单位的单克隆抗体,各型两孔,对照两孔滴加磷酸缓冲液,置湿盒内 37℃ 水浴 30 min,取出用磷酸缓冲液冲洗三次,蒸馏水漂洗一次,吹干,滴加含 130  $\mu\text{mol/L}$ (1:8 000)伊文思蓝的 2 单位抗鼠 IgG 荧光抗体。置湿盒内 37℃ 水浴 30 min,用磷酸缓冲液冲洗三次,蒸馏水漂洗一次,吹干,用甘油缓冲液封片,镜检,记录结果。

**B.1.3.1.3 结果判断**

在感染细胞的胞浆中出现黄绿色特异性免疫荧光颗粒的为阳性结果。组织细胞被染成橙红色或暗红的为阴性结果。

**B.1.3.1.4 意义**

从待检血液、组织标本中分离出登革病毒,经鉴定,可确认登革病毒感染和病毒型别。

**B.1.3.2 血凝抑制试验**

参照第 A.2 章。

意义:鉴定病毒和病毒分型。

## 前 言

本标准的附录 A、附录 B 均为资料性附录。

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:中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:熊国欢、赖天然、陈莉莉、梁军、关淳、刘云凯。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。