

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2097—2008

---

### 入出境人员猴痘检验规程

Codes for examination of monkeypox at entry-exit port

2008-07-17 发布

2009-02-01 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：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国惠州出入境检验检疫局、中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所。

本标准主要起草人：幸芦琴、李小波、钟玉清、阮力、师永霞、郭波旋、黄吉城、洪焯、相大鹏、郑夔。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

# 出入境人员猴痘检验规程

## 1 范围

本标准规定了入出境口岸入出境人员猴痘病毒的实验室检验方法与结果报告,包括样本采集、处理,检验程序、方法,结果判定及报告。

本标准适用于入出境口岸猴痘病毒的实验室检验。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 2.1

#### 猴痘 monkeypox

由猴痘病毒(monkeypox virus)引起的人兽共患传染病,临床主要表现为高热、头痛、背痛、全身不适、咳嗽、淋巴结肿大,伴全身出现类似天花的皮疹,偶尔出现腹痛。

### 2.2

#### 实时荧光 PCR real-time fluorescence PCR

实时荧光 PCR 方法是在常规 PCR 的基础上,加入一条特异性的荧光探针。该探针为一段寡核苷酸,两端分别标记一个报告基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,利用 *Taq* 酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭基团分离,从而荧光监测系统可以接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的积累与 PCR 产物形成完全同步。

### 2.3

#### Ct 值 cycle threshold

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。

## 3 仪器和设备

需要如下仪器设备。

- Roche 荧光定量 PCR 仪;
- 生物安全柜;
- 高压灭菌器;
- 普通冰箱;
- 普通台式离心机(带密封的离心安全杯);
- 冷冻离心机(带密封的离心安全杯);
- 研钵;
- 涡旋器。

## 4 试剂

4.1 核酸提取试剂:使用 TakaRa 基因组 DNA 提取试剂盒<sup>1)</sup>,详见说明书。

4.2 Hot-Start Mix master 反应试剂盒购自 Roche 公司<sup>1)</sup>。

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。

4.3 灭菌双蒸水。

4.4 实时荧光 PCR 检测的引物和探针

F3L-F 5'-CTCATTGATTTTTTCGCGGGATA-3'

F3L-R 5'-GACGATACTCCTCCTCGTTGGT-3'

F3L-P-MGB 5'FAM-CATCAGAATCTGTAGGCCGT-MGBNFQ-3'。

## 5 样本采集

5.1 皮疹、痂皮采集:取皮疹上盖或痂皮,装入 2 mL 的灭菌塑料管里,密封,4℃或 4℃以下保存运输。

5.2 水疱液、脓疱液采集:用附有注射针的一次性注射器吸取 0.2 mL 的 PBS,从疱膜插入,来回 2 次~3 次混匀后吸取内容液,把吸取的内容液装入血清管,4℃或 4℃以下保存运输。

5.3 全血采集:静脉采集疑似病人抗凝全血 5 mL,4℃或 4℃以下保存运输。

## 6 样本处理

使用 TakaRa 基因组 DNA 提取试剂盒制备病毒核酸。

### 6.1 提取试剂准备(在使用前进行)

溶液 A、溶液 B 若出现沉淀,于 65℃加热溶解,待恢复至室温后使用。

### 6.2 病毒核酸提取步骤

#### 6.2.1 样本制备

6.2.1.1 皮疹、痂皮等病变组织:取 1 mg~100 mg 的病变组织移入冰浴预冷的研钵中,快速用力研成匀浆(富含胶原蛋白的皮肤等组织需加液氮研磨至粉末状);加入 650 μL 的溶液 A 和 0.9 μL 的 RNase A1,温和研磨 30 s;收集 650 μL 研磨好的组织匀浆移至收集管中,如果匀浆不足 650 μL,补充溶液 A 至 650 μL,65℃水浴 5 min。

6.2.1.2 水疱液、脓疱液及病人血液:取 250 μL 的水疱液、脓疱液及病人全血(含抗凝剂)加入收集管中;加入 500 μL 的溶液 A;加入 1 μL 的 RNase A1,激烈振荡 15 s 后,冰浴 5 min。

6.2.2 加入 400 μL 的溶液 B,振荡混合。

6.2.3 加入 1 mL 的 4℃预冷的溶液 C,充分混匀后,12 000 r/min 离心 2 min。

6.2.4 弃去上层有机相,再加入 1 mL 的 4℃预冷的溶液 C,充分混匀后,12 000 r/min 离心 2 min。

6.2.5 弃去上层有机相,然后将水相溶液(无色下层)转移至置于收集管上的滤杯中,12 000 r/min 离心 1 min。

6.2.6 弃滤杯,在溶液中加入 400 μL 的 DB 缓冲液,混合均匀。

6.2.7 将试剂盒中的离心柱子安置于收集管上,将上一步的混合溶液转移至离心柱子中,12 000 r/min 离心 1 min,弃滤液。

6.2.8 将 500 μL 的 Rinse A 加入至离心柱子中,12 000 r/min 离心 30 s,弃滤液。

6.2.9 将 700 μL 的 Rinse B 加入至离心柱子中,12 000 r/min 离心 30 s,弃滤液。

6.2.10 重复 7.2.9 操作一次。

6.2.11 将离心柱子安置于新的 1.5 mL 离心管上,在离心柱子膜的中央处加入 50 μL 的 Elution Buffer,室温静置 1 min。

6.2.12 12 000 r/min 离心 1 min 洗脱 DNA。

## 7 实时荧光 PCR 检测

7.1 实时荧光 PCR 反应液的制备:设置 20 μL 反应体系,每个待检样本反应液的组成为:

——无菌水 11.25 μL;

——25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.4 μL;

- 20  $\mu\text{mol/L}$  F3L-F 0.75  $\mu\text{L}$ ;
- 20  $\mu\text{mol/L}$  F3L-R 1  $\mu\text{L}$ ;
- 10  $\mu\text{mol/L}$  F3L-P-MGB 0.6  $\mu\text{L}$ ;
- Hot-start mix 2  $\mu\text{L}$ ;
- 模板 2  $\mu\text{L}$ 。

7.2 PCR 反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s(single)50 循环。

## 8 结果判断

使用 Roche 荧光定量 PCR 仪进行结果分析时,基线(baseline)设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点。

8.1 实时荧光 PCR 反应系统的质量控制:反应结果应同时符合以下 2 个条件,否则实验结果无效。

- 阴性对照无扩增曲线,为阴性。
- 阳性对照 Ct 小于 35 并有明显扩增曲线。

8.1.1 阴性:无 Ct 值或 Ct 大于等于 45,且无明显扩增曲线,报告为猴痘病毒核酸荧光 PCR 检测阴性。

8.1.2 阳性:Ct 值小于等于 40,并有明显扩增曲线,报告为猴痘病毒核酸荧光 PCR 检测阳性。

8.1.3 Ct 值在 40~45 之间的样本建议重做,若重做结果仍然有明显扩增曲线,则该样本判断为猴痘病毒核酸荧光 PCR 检测阳性,否则为阴性。

8.2 本方法的检测灵敏度为  $10^2$  copies/reaction,检测效果最佳模板浓度范围为  $10^4 \sim 10^8$  copies/reaction。

## 9 结果报告

阳性样本结果报告:猴痘病毒核酸荧光 PCR 检测阳性。

阴性样本结果报告:猴痘病毒核酸荧光 PCR 检测阴性。

## 10 生物安全措施

根据中华人民共和国卫生部发布的《人间传染的病原微生物名录》规定,猴痘病毒危害程度分类为 1 类,所有有关猴痘病毒的实验室操作应按照规定执行。

- 10.1 猴痘病毒培养应在生物安全三级(BSL-3)实验室内进行。
- 10.2 未经培养的感染性材料的操作应在生物安全三级(BSL-3)实验室内进行。
- 10.3 猴痘相关的灭活材料操作应在生物安全二级(BSL-2)实验室内进行。
- 10.4 无感染性材料的操作可在生物安全一级(BSL-1)实验室内进行。
- 10.5 猴痘感染性材料的运输包装分类为 A 类,UN 编号为 UN2814。

中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
入 出 境 人 员 猴 痘 检 验 规 程  
SN/T 2097—2008

\*

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

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

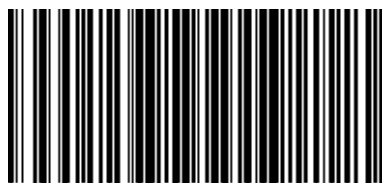
开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 7 千字

2008年9月第一版 2008年9月第一次印刷

印数 1—2 000

\*

书号: 155066·2-19091 定价 6.00 元



SN/T 2097-2008