

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3487—2013

---

### 猴痘检疫技术规范

Quarantine protocol for monkeypox

2013-03-01 发布

2013-09-16 实施

---

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局 发 布

仅供OKAYB10内部学习使用

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张敬友、唐泰山、王凯民、陈国强、张睿、陈雷、姜焱、蒋原、张常印、黄素文。

# 猴痘检疫技术规范

## 1 范围

本标准规定了猴痘病毒 PCR 和荧光 PCR 检疫规范。  
本标准适用于猴痘的流行病学调查和口岸检疫。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Ct 值:荧光信号到达设定的阈值所经历的循环数

dNTPs:脱氧核糖核苷三磷酸

DNA:脱氧核糖核酸

HEX:六氯-6-甲基荧光素

PCR:聚合酶链式反应

荧光 PCR:荧光聚合酶链式反应

## 4 临床症状

皮疹,包括斑点状皮疹、突起状皮疹、小水泡状皮疹、脓包状皮疹、全身性或局部性皮疹、分散性或融合性皮疹;结膜炎;鼻炎;咳嗽;食欲不振;嗜睡。参见附录 A。

## 5 实验室诊断

### 5.1 PCR 试验

#### 5.1.1 试验仪器

5.1.1.1 PCR 热循环仪。

5.1.1.2 电泳仪。

5.1.1.3 凝胶成像系统。

#### 5.1.2 试剂

5.1.2.1 试剂级别:除另有规定,本方法试验用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水,所用化学试剂均为分析纯。

5.1.2.2 裂解液配制见附录 B 的 B.1,TE 缓冲液配制方法见 B.2,电泳缓冲液 TAE 配制方法见 B.3,2%琼脂糖凝胶板制备见 B.4。

5.1.2.3 人工合成的猴痘病毒阳性核酸片段作为阳性对照,以不含猴痘病毒的动物组织核酸提取物为阴性对照,以灭菌水为空白对照。

5.1.2.4 引物:

引物 1(20 pmol/ $\mu$ L):5'-TTCCGTCAATGTCTACACAGGCA-3'

引物 2(20 pmol/ $\mu$ L):5'-TACAGTTCCGACGATACTCCTCC-3'

5.1.2.5 PCR 反应试剂:10 倍 PCR 反应缓冲液、2.5 mmol/L dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、5 U/ $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶等使用商品化试剂。

5.1.2.6 电泳加样缓冲液:30%的甘油水溶液中加桔黄 G 到 0.25%(质量浓度)。

5.1.2.7 DNA 分子量标记:100 bp~2 000 bp。

### 5.1.3 操作方法

#### 5.1.3.1 样品采集

##### 5.1.3.1.1 皮疹、痂皮采集

取皮疹上盖或痂皮,装入灭菌塑料管中,密封,4℃或4℃以下保存运输,7 d 内完成检测。

##### 5.1.3.1.2 水疱液、脓疱液采集

用无菌注射器采集水疱液、脓疱液 250  $\mu$ L,4℃或4℃以下保存运输,7 d 内完成检测。

##### 5.1.3.1.3 全血采集

无菌采集疑似动物肝素抗凝全血 2 mL,4℃或4℃以下保存运输,7 d 内完成检测。

#### 5.1.3.2 样品 DNA 的制备

5.1.3.2.1 取 0.2 g~1.0 g 皮疹、痂皮组织,加入等量灭菌石英砂充分研磨。然后按照 1:5 比例(质量体积)加入 0.01 mol/L PBS(pH 7.6~7.8),-20℃反复冻融 2 次。然后 4℃、8 000 r/min 离心 5 min。水疱液、脓疱液和全血等液体样品不需经过此步骤,直接进入下一步。

5.1.3.2.2 取上清液或液体样品 200  $\mu$ L,加入 1.5 mL 离心管内,加入 400  $\mu$ L 细胞裂解液,反复颠倒混匀;加入 600  $\mu$ L 的酚/三氯甲烷混合液混匀,4℃、12 000 r/min 离心 5 min;取上清液加入 600  $\mu$ L 三氯甲烷混匀,12 000 r/min 离心 5 min;取上清液加入 0.8 倍的异丙醇混匀并 10 000 r/min 离心 10 min;弃去上清液,加入 70%乙醇洗涤,离心 5 min,晾干后加入 50  $\mu$ L TE 缓冲液溶解沉淀,备用。

#### 5.1.3.3 PCR 反应体系配制

采用 20  $\mu$ L 的反应体系:2  $\mu$ L 10 倍 PCR 反应缓冲液、0.4  $\mu$ L 的 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2  $\mu$ L 的 5 U/ $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶、引物 1、引物 2 各 0.4  $\mu$ L、0.4  $\mu$ L 2.5 mmol/L dNTPs,用水补至 20.0  $\mu$ L。取比待检样品数多两只的含有 PCR 反应混合物的 PCR 管,分别加入待检样品 DNA 提取物、阴性对照、阳性对照及空白对照 0.5  $\mu$ L 到相应 PCR 管中,2 000 r/min 离心 10 s,立即进行 PCR 扩增。

#### 5.1.3.4 PCR 反应的循环程序

将 PCR 管放入 PCR 热循环仪中,按下列程序进行 DNA 扩增:95℃预变性 5 min 后,95℃1 min,51℃1 min,72℃1 min,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。

#### 5.1.3.5 PCR 扩增产物的电泳检测

PCR 扩增结束后,取 5  $\mu$ L PCR 扩增产物分别和 2  $\mu$ L 加样缓冲液混合后,加入到 2%琼脂糖凝胶

(用含溴化乙锭的 TAE 溶液配制)加样孔中,在凝胶的合适位置加入 DNA 分子量标记。用电泳仪进行电泳,电压大小根据电泳槽长度来确定,一般控制在 3 V/cm~5 V/cm,电泳时间为 30 min~35 min。电泳结束后,将凝胶放在紫外光源下检查,用凝胶成像系统记录图像结果。

#### 5.1.4 结果判定

紫外光源下观察凝胶或者记录的图像。阳性对照出现一条 301 bp 的条带,阴性对照无任何条带。如果样品中出现和阳性对照大小一致的条带,判为阳性;如果样品中没有出现 301 bp 的特异性条带,判为阴性。必要时可对扩增的 301 bp 的条带进行测序,其序列参见附录 C。

## 5.2 Taqman 探针荧光 PGR 试验

### 5.2.1 试验仪器

荧光 PCR 热循环仪。

### 5.2.2 试剂

5.2.2.1 以人工合成的猴痘病毒阳性核酸片段作为阳性对照,以不含猴痘病毒的动物组织为阴性对照,以灭菌水为空白对照。

#### 5.2.2.2 引物:

引物 3(50 pmol/ $\mu$ L):5'-GACAGGGTTAACACCTTTCCAATAAAT-3'

引物 4(50 pmol/pL):5'-CAGTTCCGACGATACTCCTCCT-3'

Taq Man 探针(10 mmol/L):5'-FAM-TCTACGACAATGGATGCTGATACACGGC-TAMRA-3'

5.2.2.3 PCR 试剂:10 $\times$  Ex Taq 缓冲液、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、5 U/ $\mu$ L Ex Taq<sup>TM</sup>酶使用商品化试剂。

### 5.2.3 操作方法

#### 5.2.3.1 样品采集

同 5.1.3.1。

#### 5.2.3.2 样品 DNA 的制备

同 5.1.3.2。

#### 5.2.3.3 PCR 反应体系配置

配制比待检样品数多 3 支的一步法荧光 PCR 反应预混液。按照 10 $\times$  Ex Taq 缓冲液 2.5 $\mu$ L、dNTPs(各 2.5 mmol/L)4  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L)4.5  $\mu$ L、引物及探针各 1.25  $\mu$ L、Ex Taq<sup>TM</sup>酶 0.25  $\mu$ L、BSA(0.05%)1  $\mu$ L,用水补至 25  $\mu$ L,轻柔混匀,瞬时离心,冰浴放置备用。取比待检样品数多 3 只的含有 PCR 反应混合物的 PCR 管,分别加入待检样品 DNA 提取物、阴性对照、阳性对照及空白对照 2  $\mu$ L 到相应 PCR 管中,冰浴放置备用。

#### 5.2.3.4 荧光 PCR 反应的循环程序

将 PCR 管放入荧光 PCR 热循环仪中,采用 HEX 通道采集荧光,按下列程序进行 DNA 扩增:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后;95  $^{\circ}$ C 20 s,58  $^{\circ}$ C 1 min,45 个循环。

## 5.2.4 结果判定

5.2.4.1 阴性对照和阳性对照满足下列条件时试验才成立：阴性对照无明显扩增曲线且 Ct 值大于 40，阳性对照出现明显扩增曲线且小于 40。

5.2.4.2 在对照成立的前提下，待测样品出现明显扩增曲线且 Ct 值小于或等于 36，判为阳性。待测样品未出现明显扩增曲线、Ct 值大于等于 40，判为阴性；待测样品出现明显扩增曲线且 Ct 值介于 36 和 40 之间，判为可疑；可疑样品应重测，如仍为可疑，判为阳性。

## 6 结果综合判定

具有临床症状，并且 5.1 或 5.2 中出现阳性结果即可判为猴痘阳性。

## 附录 A

### (资料性附录)

#### 猴痘概述

#### A.1 总则

猴痘(Monkeypox;MP)是由猴痘病毒(Monkeypox virus;MPV)引起的一种急性人兽共患传染病。猴痘是一种以皮肤出疹为特征的、类似于人天花的病毒性疾病,通过密切接触,由动物传染给人,并可在人与人之间传播,属于人畜共患传染病,主要分布在中非和西非热带雨林地区,美国曾出现感染病例。猴痘病毒属于痘病毒科,正痘病毒属,是结构较为复杂的 DNA 病毒。猴痘检测方法分为三大类,第一类是病原分离的方法,通过细胞培养,分离出猴痘病毒;第二类是基因诊断的方法,采用 PCR 方法检测到标本中的猴痘病毒核酸;第三类是电镜检查,发现受检物中有与正痘病毒形态一致的病毒存在。猴痘病毒分离检测方法,结果准确,但检测周期太长,而且对实验室生物安全要求极高;采用 PCR 方法检测标本中的猴痘病毒核酸,灵敏度高、特异性好、检测时间短;电镜检查的方法,灵敏度不高,需要电镜,样品准备复杂,操作复杂。猴痘病毒与痘病毒之间存在抗原交叉,因此以检测猴痘病毒抗体的血清学试验特异性不够,诊断意义不大。

#### A.2 临床诊断

除猴类外,鼠、兔等动物均可患病,但各种动物症状不一。猴初期体温升高,7 d~14 d 出现皮疹,皮疹多而分散,直径 1 mm~4 mm,分布于口腔黏膜、躯干、臀部与四肢,通常最多出现于脚掌和手掌上。丘疹迅速变为水疱和脓疱,最后干涸结痂。幼猴可能发生重度感染而死亡,死亡率为 3%~5%。猩猩的症状轻重不一。鼠发热、咳嗽、结膜炎、淋巴结病变,并伴有结节性皮疹。部分土拨鼠以死亡而告终,多数能康复。冈比亚硕鼠的临床症状表现比较温和,无呼吸道症状,仅限于皮疹。猩猩的症状轻重不一。

#### A.3 病理变化

取病变部位做组织学检查,可见上皮细胞变性,网状细胞增生和炎性细胞浸润,在感染细胞内可见大量的小型嗜酸性包涵体。

**附 录 B**  
(规范性附录)  
试剂配制

**B.1 DNA 裂解液**

100 mg/L 蛋白酶 K, 10 mmol/L Tris-HCl, 15 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 4 g/L SDS  
pH 8.0。

**B.2 TE 缓冲液(pH 8.0)**

分别加入 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0) 10 mL 和 500 mmol/L EDTA(pH 8.0) 溶液 2 mL, 加水定容  
至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121 °C) 条件下灭菌 20 min。

**B.3 电泳缓冲液 TAE(50 倍)**

三羟甲基甲烷碱(Tris base)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L(pH 8.0) 乙二胺四乙酸(EDTA)	100 mL
蒸馏水	100 mL

待上述混合物完全溶解后, 加蒸馏水至 1 000 mL, 置 4 °C 冰箱中备用, 如配制 2% 的琼脂糖凝胶和  
用作电泳缓冲液, 则用蒸馏水稀释 50 倍成 TAE 缓冲液。

**B.4 2% 琼脂糖凝胶板**

取 1 g 琼脂糖(电泳纯)加入 50 mL TAE 缓冲液中, 在微波炉中充分溶解后, 加入最终浓度为  
0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溴化乙锭, 用 TAE 定容至 50 mL, 冷却至 60 °C 后, 倒入凝胶板中, 在距离底板 0.5 mm  
的位置上放置梳子, 以便加入琼脂糖后可以形成完好的加样孔, 凝胶的厚度为 4 mm, 待凝胶完全凝固  
后, 小心移去梳子, 将凝胶板放入电泳槽中, 加入恰好没过胶面约 1 mm 深的足量电泳缓冲液。



## 附 录 C

(资料性附录)

## 猴痘病毒 F3L 基因片段序列

1 TTCCGTCAAT GTCTACACAG GCATAAAATG TAGGAGAGTT ACTAGGCCCC ACTGATTCAA  
61 TACGAAAAGA CCAATCTCTC CTAGTTATTT GGCAGTACTC ATTAATAACG GTGACAGGGT  
121 TAACACCTTTCCAATAAATA ATTTTTTTTAA CCGGAATAAC ATCATCAAAA GACTTATTAT  
181 CCTCTCTCAT TGATTTTTTCG CGGGATACAT CATCTATTAT AGCATCAGA TCAGAATCTG  
241 TAGGCCGTGT ATCAGCATCC ATTGTCGTAG ACCAACGAGG AGGAGTATCG TCGGAACTGT  
301 A

---

中华人民共和国出入境检验检疫

行 业 标 准

猴痘检疫技术规范

SN/T 3487—2013

\*

中国标准出版社出版

北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)

北京市西城区三里河北街16号(100045)

总编室:(010)64275323

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

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

2013年9月第一版 2013年9月第一次印刷

印数 1—1 600

\*

书号: 155066·2-25857 定价 16.00 元



SN/T 3487-2013