附件1

**全国病媒生物病原学监测方案（试行）**

为开展全国病媒生物病原学监测工作，通过主动监测，获得病媒生物病原学监测数据，掌握相关病媒生物携带病原微生物的基本流行规律，为相关媒介生物传染病的风险评估和预测预警提供科学依据，特制定本方案。

**第一部分 鼠传病原监测**

# 一、监测目的

1. 监测鼠传病原在鼠类宿主中活动水平和流行动态。
2. 为全国相关传染病流行趋势的风险评估、预测预警、防治对策和措施的制定提供科学依据。

# 二、监测内容与工作要求

## （一）监测对象

1.鼠类宿主

（1）生态学监测标本

参照《全国病媒生物监测方案》（国卫办疾控函〔2016〕215号）、《全国病媒生物监测实施方案》（中疾控传防发〔2016〕56号）中“鼠类监测”相关要求执行。主要包括城镇居民区、重点行业(餐饮、食品制售、建筑工地、屠宰场和酿造厂等)、农村居民区、农田和林地等生境。

（2）补充监测标本

各地可根据本地鼠传疾病流行情况和本地条件适当补充采样区域，增加其他生境鼠类生物标本的采集。

（3）鼠类生态学和补充监测标本的数量

前一年11月、当年1月、3月3个月合计和当年5月、7月、9月3个月合计标本各不少于100只。

2.鼠传病原

本方案主要针对法定传染病中的主要鼠传病原、引起新发和再发传染病的鼠传病原以及具有潜在威胁人类健康的鼠传病原进行监测。致病菌包括致病性钩端螺旋体、莫氏立克次体、嗜吞噬细胞无形体、巴尔通体、恙虫病东方体和土拉弗朗西斯菌；病毒包括汉坦病毒和发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒（新型布尼亚病毒，SFTSV）。选择上述至少2种病原进行监测。

## （二）监测时间

1. 参照《全国病媒生物监测实施方案》中“鼠类监测实施方案”执行。
2. 可根据当地实际情况，增加目标病原的鼠间流行高峰期监测。
3. 每个监测月的鼠类组织标本均应进行病原分子生物学检测。检测结果不晚于3月31日（前一年11月、当年1月和3月的检测结果）和9月30日上报（5月、7月和9月的检测结果）。

## （三）监测方法

1. 鼠类宿主

参照《全国病媒生物监测实施方案》“鼠类监测实施方案”执行（附表1-1）。

1. 鼠传病原

鼠传病原检测应用Taqman探针荧光定量PCR/RT-PCR方法（附表1-2）。

具体操作主要包括组织标本采集、保存和运输、核酸提取、PCR扩增、结果判读和数据分析。方法参见附件1-1、附件1-2、附件1-3和附件1-4。

## （四）生物安全与防护

在从事鼠类动物、生物组织标本采集和相关实验室操作时的生物安全和个人防护参照《全国病媒生物监测实施方案》执行，相关操作不可造成人员感染和环境污染。

在从事病原检测相关操作时，按照有关病原的生物安全等级要求，参照国家卫生健康委颁布的《人间传染的病原微生物名录》、《病原微生物实验室生物安全管理条例(国务院第424号令)》、《实验室生物安全通用要求（GB19489-2008）》和《病原微生物实验室生物安全通用准则（WS233-2017）》、《可感染人类的高致病性病原微生物菌(毒）种或样本运输管理规定》、《医疗废物管理条例》以及各实验室内部管理准则执行。

# 三、监测系统组成和职责

## （一）监测系统

以全国病媒生物监测系统为依托，监测系统由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所及各级疾病预防控制中心组成。

## （二）分工和职责

1. 中国疾病预防控制中心传染病所

负责《全国病媒生物病原学监测方案》（以下简称《方案》）的制定、组织、协调和督导；承担病媒生物病原学监测的技术指导和培训，提供阳性对照标准品，负责监测信息的收集、整理、分析、总结和反馈；并进行监测工作的督查和质量控制。

1. 省(自治区，直辖市)疾病预防控制部门

按照《方案》要求，落实开展辖区内监测工作；确定一名主管领导负责协调，督促检查监测方案落实；按时上报和分析辖区内监测结果。

# 四、数据收集、分析与上报

## （一）数据收集内容

1. 病媒生物鼠传病原学监测—动物采集情况登记表（附表1-3）
2. 病媒生物鼠传病原学监测—实时荧光定量PCR/RT-PCR法检测鼠传病原结果记录表（附表1-4）
3. 病媒生物鼠传病原学监测—监测点宿主动物带菌（毒）率调查表（附表1-5）
4. 病媒生物鼠传病原学监测—各省不同市/区（县）带菌（毒）率汇总表（附表1-5）

## （二）数据上报内容和时间

1. 各省级疾病预防控制中心在完成捕鼠和病原检测任务后，5个工作日内将鼠密度和鼠感染情况监测结果报中国疾病预防控制中心传染病预防控制所。前一年11月、当年1月和3月的监测结果不晚于3月31日上报，当年5月、7月和9月的监测结果不晚于9月30日上报。
2. 上报内容包括数据信息（附表1-3、1-4、1-5和1-6）和年度监测工作总结报告，以下简称“年报总结”，主要内容包括全年监测宿主动物数量、种类，检测动物数量、分布和带菌（毒）情况，分析监测点鼠传病原流行规律以及下一年度监测工作计划（附件1-5），年报总结在当年12月31前上报。
3. 各省上报数据经监测工作负责人确认后，发送到指定邮箱shubyjc@icdc.cn。

# 五、监测系统质量控制

## （一）指导、培训与考核

各监测点所在省疾控中心根据工作需要，组织专业技术人员进行技术培训和考核。

## （二）实验室质量控制

参照实验室质量认可体系管理相关实验室环境、操作流程、设备、管理文件和人员培训等内容。主要包括以下内容：

1. PCR实验室分区管理，制定登记、消毒和实验室环境监测制度；
2. 规范管理专用仪器设备和试剂耗材的使用；
3. 对操作人员进行岗位规范化培训；
4. 制定实验操作标准操作程序；
5. 制定技术资料档案管理制度，规范管理相关档案资料。

## （三）病原学检测室间质量评价

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所组织各监测单位病原检测能力的室间质量评价。

# 六、附录

1. 附表1-1 病媒生物鼠传病原学监测—鼠类采集方法
2. 附表1-2 病媒生物鼠传病原学监测—相关鼠传病原检测方法一览表
3. 附表1-3 病媒生物鼠传病原学监测—动物采集情况登记表
4. 附表1-4 病媒生物鼠传病原学监测—实时荧光定量PCR/RT-PCR法检测鼠传病原结果记录表
5. 附表1-5 病媒生物鼠传病原学监测—监测点宿主动物带菌（毒）率调查表
6. 附表1-6 病媒生物鼠传病原学监测—各省不同市/区（县）带菌（毒）率汇总表
7. 附件1-1 病媒生物鼠传病原学监测—鼠类生物组织采集、保存和运输操作程序
8. 附件1-2 病媒生物鼠传病原学监测—实时荧光定量PCR检测莫氏立克次体等6种鼠传致病菌标准操作程序
9. 附件1-3 病媒生物鼠传病原学监测—实时荧光定量RT-PCR检测汉坦病毒基因及分型
10. 附件1-4 病媒生物鼠传病原学监测—实时荧光定量RT-PCR检测发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒基因
11. 附件1-5 病媒生物鼠传病原学监测—年度监测工作总结报告

**附录**

**附表1-1. 病媒生物鼠传病原学监测—鼠类采集方法**

|  |  |
| --- | --- |
| **宿主** | **采集方法a** |
| **国家级监测点** | **常规监测点** | **补充监测点b** | **鉴定方法** |
| 鼠类 | 夹(笼)夜法 | 室内可选夹（笼）夜法 | 室内可选夹（笼）夜法 | 形态学 |
| 室外可选夹（笼）夜法 | 室外可选夹（笼）夜法 |
| 注：a 参照《全国病媒生物监测实施方案》；b 可根据当地鼠传病原流行情况适当增加多种生境和流行高峰期鼠类生物标本的采集 |

**附表1-2. 病媒生物鼠传病原学监测—相关鼠传病原检测方法一览表**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **病原细菌a** | **组织标本** | **核酸提取b** | **检测方法** | **检测限****参考值d** | **检测设备** |
| 致病性钩端螺旋体 | 肝、脾、肾 | 磁珠法、柱膜法 | Taqman荧光定量PCR**c** | Cq≤35 | 伯乐CFX96 |
| 莫氏立克次体 | 肝、脾、肾 | 磁珠法、柱膜法 | Taqman荧光定量PCR**c** | Cq≤36 | 伯乐CFX96 |
| 嗜吞噬细胞无形体 | 肝、脾、肾 | 磁珠法、柱膜法 | Taqman荧光定量PCR**c** | Cq≤35 | 伯乐CFX96 |
| 巴尔通体 | 肝、脾、肾 | 磁珠法、柱膜法 | Taqman荧光定量PCR**c** | Cq≤35 | 伯乐CFX96 |
| 恙虫病东方体 | 肝、脾、肾 | 磁珠法、柱膜法 | Taqman荧光定量PCR**c** | Cq≤33 | 伯乐CFX96 |
| 土拉弗朗西斯菌 | 肝、脾、肾 | 磁珠法、柱膜法 | Taqman荧光定量PCR**c** | Cq≤36 | 伯乐CFX96 |
| 汉坦病毒 | 肺 | TRIzol、柱膜法 | Taqman荧光定量RT-PCR | Cq≤35 | 伯乐CFX96 |
| 新型布尼亚病毒 | 肝、脾、肺 | TRIzol、柱膜法 | Taqman荧光定量RT-PCR | Cq≤35 | 伯乐CFX96 |
| 注：a 可根据当地情况全选或者任选；b 手工或者高通量方法依据实验室设备条件确定；c 为单重检测方法；d 需要根据扩增仪适当调整 |

**附表1-3. 病媒生物鼠传病原学监测—动物采集情况登记表**

监测点： 省（自治区、直辖市） 地（市）

填表人： 采集时间： 年 月 日

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标本编号a | 鼠种 | 性别 | 采集地点b | 生境c | 捕获方法 | 经纬度 | 海拔 | 备注 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 注：a 应与鼠类生态学监测采集的动物编号一致；b 填写区（县）-街道（乡、镇）；c 城镇居民区、农村居民区、重点行业、农田耕地、森林、灌丛、草原、湿地、高山植被、荒漠/半荒漠、绿洲、自定义 |

**附表1-4. 病媒生物鼠传病原学监测—实时荧光定量PCR/RT-PCR法检测鼠传病原结果记录表**

监测点： 省（自治区、直辖市） 地（市） 填表人：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标本编号a | 采集地点b | 采集时间 | 检测时间 | 鼠种 | 汉坦病毒 | 新型布尼亚病毒 | 致病性钩端螺旋体 | 莫氏立 克次体 | 恙虫病 东方体 | 巴尔通体 | 嗜吞噬细胞无形体 | 土拉弗朗西斯菌 |
| ＋/－c | Cq值 | ＋/－ | Cq值 | ＋/－ | Cq值 | ＋/－ | Cq值 | ＋/－ | Cq值 | ＋/－ | Cq值 | ＋/－ | Cq值 | ＋/－ | Cq值 |
| HTNV型 | SEOV型 | S基因 | L基因 | M基因 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 注：a 与附表1-3相同；b 填写区（县）-街道（乡、镇）；c 结果阳性填“＋”，阴性填“－” |
| 检测单位： 检测人签字： 负责人签字：  |

**附表1-5. 病媒生物鼠传病原学监测—监测点宿主动物带菌（毒）率调查表**

监测点： 省（自治区、直辖市） 地（市）

填表人： 填报时间： 年 月 日

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 鼠种 | 汉坦病毒 | 新型布尼亚病毒 | 致病性钩端螺旋体 | 莫氏立克次体 | 恙虫病东方体 | 巴尔通体 | 嗜吞噬细胞无形体 | 土拉弗朗西斯菌 |
| 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**附表1-6. 病媒生物鼠传病原学监测—各省不同市/区（县）带菌（毒）率汇总表**

填表单位： 省（自治区、直辖市）

填表人： 填报时间： 年 月 日

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 市/区(县) | 汉坦病毒 | 新型布尼亚病毒 | 致病性钩端螺旋体 | 莫氏立克次体 | 恙虫病东方体 | 巴尔通体 | 嗜吞噬细胞无形体 | 土拉弗朗西斯菌 |
| 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) | 阳性数 | 检测数 | 阳性率(%) |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
| 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 | 　 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

附件1-1

**病媒生物鼠传病原学监测—鼠类生物组织采集、保存和运输操作程序**

1. **目的**

规范鼠类生物组织采集、保存和运输操作方法。

1. **适用范围**

鼠类现场采集、保存、运输及实验室生物组织取样。

1. **实验操作的环境条件**

鼠类捕获操作在现场完成，肝、脾、肾和肺生物组织取样在生物安全二级实验室完成。

1. **操作步骤**

4.1 实验准备

4.1.1 实验用仪器设备

生物安全柜、-70 ℃超低温冰箱、高压灭菌器、液氮罐、搪瓷盘、5 ml一次性注射器、直头眼科镊、眼科剪、大号镊子、吸管、冻存管、鼠袋、鼠固定板。

4.1.2 个人防护用具

防护服、白色防蚤袜、长筒雨靴、手套、口罩、眼罩、杀虫气雾剂和驱避剂。

4.2 实验操作

4.2.1 鼠标本采集

捕获的鼠单体装鼠袋。登记捕获方法、时间、地点、状态（活体、死亡、是否腐败等）等鼠标本的基本信息（附表1-3）。

4.2.2 鼠脏器组织采集

4.2.2.1 操作用解剖器械均需高压灭菌处理，将所用器械以解剖顺序依次排列在灭菌有盖的搪瓷盘内。

4.2.2.2 鼠体固定于解剖盘上，腹部向上，用75%乙醇消毒腹部皮肤。

4.2.2.3 以镊子提起耻骨缝前面的皮肤，用剪刀剪开，并沿正中线直剪到下颌部。然后用钝头剪刀或刀柄剥离皮肤，再把皮肤向四肢剪开，翻转皮肤。剪开腹壁前用碘酊或酒精消毒。

4.2.2.4 用无菌剪刀沿正中线自阴部至膈肌为止剪开横切开，并切取肝、脾和肾脏器放入冻存管中，保存在-70 ℃超低温冰箱或液氮罐。

4.2.2.5 另换灭菌剪刀，切开膈肌，剪断胸骨两侧软肋骨，翻起胸骨，切取肺脏放入冻存管，保存在-70 ℃超低温冰箱中或液氮罐。

4.2.2.6 解剖完毕，将剩余鼠体高压后按实验室垃圾处理，75%酒精处理生物安全柜台面，紫外消毒30 min。所用的器械均需高压消毒处理。

4.2.3 标本保存和运输

4.2.3.1 将捕获的活鼠连同鼠笼（夹）装入鼠袋，扎紧袋口，严防体表寄生虫逃逸。

4.2.3.2 将捕获的死鼠从鼠夹上取下，单只装入鼠袋，扎紧袋口，严防体表寄生虫逃逸。

4.2.3.3 用于病原检测的标本可直接冷冻保存（-70 ℃超低温冰箱）或液氮罐保存。

4.2.3.4 用于病原检测的组织标本可放在RNAlater保存液中。新鲜组织细胞中的RNA可以完好的在37 ℃下保存一天，25 ℃下保存一周，4 ℃下保存一个月，在-20 ℃或-80 ℃下长期保存。RNA病毒标本可在37 ℃保存一个月。

4.2.3.5 标本运送时采用低温冷藏运输，运输时应遵守《可感染人类的高致病性病原微生物菌(毒）种或样本运输管理规定》和《人间传染的病原微生物名录》，避免对人员和环境造成污染。

1. **安全防护要求**

5.1 现场标本采集防护要求

5.1.1 工作人员应穿白（浅）色防护服、防蚤袜。放（收）鼠夹时戴白色线手套，2人1组，相互检查身体是否有蚤或蜱，发现后及时清除。身体暴露部位也可以使用驱避剂防护。

5.1.2 收鼠夹时，不要用手直接接触鼠体，装鼠袋时，动作要快，随即扎紧口袋。对死（自毙）鼠或捕获口鼻出血的鼠，需用大号镊子，装入鼠袋后，外套双层塑料袋。鼠笼捕获的鼠，须连同鼠笼一并装入大号鼠袋。

5.1.3 在鼠传疾病疫区采集鼠类标本时，工作人员应经过生物安全防护培训，合格后方可进行相关操作。

5.2 实验室安全防护要求

5.2.1 鼠类标本采集、解剖时工作人员应做好个人防护，防止被病原体感染或鼠体表寄生虫叮咬。解剖过程应按相应病原体生物安全级别在生物安全二级及以上实验室中进行，做好相应防护。

5.2.2 开展病原检测需配备生物安全二级实验室，其结构、防护水平、工作安排、人员防护、实验操作规程、实验垃圾处理和意外事故的处置都应符合相关规定，详细参照《实验室生物安全通用要求（GB19489-2008）》和《病原微生物实验室生物安全通用准则（WS233-2017）》。

5.3 预防接种

工作人员应提前接种相关疫苗。

附件1-2

**病媒生物鼠传病原学监测—实时荧光定量PCR检测莫氏立克次体等6种鼠传致病菌标准操作程序**

1. **目的**

本标准操作程序目的在于规范应用实时荧光定量PCR（qPCR）技术检测6种鼠传致病菌。

1. **适用范围**

适用于鼠类生物组织中莫氏立克次体、嗜吞噬细胞无形体、恙虫病东方体、土拉弗朗西斯菌、巴尔通体和致病性钩端螺旋体特异靶基因的快速检测。

1. **检测的环境条件**

qPCR检测与核酸提取步骤需要分区操作，在专门的PCR室或区域操作。

1. **实验步骤**

**4.1 实验准备**

进入实验场所之前，需提前准备所需试剂和耗材，调试仪器，核对标本。

**4.2 主要仪器设备**

荧光定量PCR仪，核酸提取仪，核酸浓度测定仪，10—1000 μl移液器

**4.3 主要试剂与耗材**

引物和探针序列见表1，组织基因组DNA提取试剂盒，qPCR Master Mix，10—1000 μl吸头，0.2—1.5 μl离心管

|  |
| --- |
| 表1 引物和探针序列 |
| **检测病原体** | **引物和探针名称** | **序列和探针标记（5'— 3'）** |
| 莫氏立克次体 | Pr47F | TGTTGATGGTGCAGGATTTGA |
|  | Pr110R | CGAATTTGTAGCGACAGGAAGA |
|  | mo-T | FAM-CAAACTGGCGCTGGTGT-MGB |
| 嗜吞噬细胞无形体 | wu-FP | CCACGCAAGTCGCATTGAT |
|  | wu-RP | GCCGGGTACTTTCGCAATT |
|  | wu-T | FAM-CTTACAGGTGCTATCATC-MGB |
| 恙虫病东方体 | Ot56 kD-F | CGCCAGTRATMATTCCTCCRA |
|  | Ot56 kD-R | TTTYWGCTAGTGCRATAGAATTRG |
|  | Taqman-Ot | FAM-TAAGGACCACACTCTAATC-MGB |
| 土拉弗朗西斯菌 | AKR-F | GCAGGGCGAGCACCATT |
|  | AKR-R | ATCTTGCATGGTCACCACTTGA |
|  | AKR-T | FAM-CGATATTTGCCTGTTAGCACTCCT-BHQ |
| 巴尔通体 | ssrA-F | GCTATGGTAATAAATGGACAATGAAATAA |
|  | ssrA-R | GCTTCTGTTGCCAGGTG |
|  | ssrA-T | FAM-ACCCCGCTTAAACCTGCGACG-BHQ1 |
| 致病性钩端螺旋体 | Lepto F | CCCGCGTCCGATTAG |
|  | Lepto R | TCCATTGTGGCCGR（A/G）ACAC |
|  | Lepto P | FAM-CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC-BHQ |

**4.4 操作程序**

**4.4.1 核酸提取**

可采用磁珠法和柱膜法。等量剪取鼠肝、脾和肾组织置于同一管中混合，按照对应试剂盒说明书应用手工或者高通量核酸提取仪提取核酸。如果应用手工提取方法，需要将混合组织先进行研磨处理再进入提取步骤。混合组织总用量依据所用提取方法或者试剂盒确定。

**4.4.2 PCR扩增**

反应体系按试剂盒说明书配置，总体积为20 μl，Taq DNA聚合酶和dNTP混合液qPCR Master Mix 10 μl，探针0.4 μl（终浓度200 nmol/L），上下游引物各0.8 μl（终浓度400 nmol/L），DNA模板3 — 5 μl，去离子水补齐。

反应参数：第1步，95 ℃预变性5 min，1个循环；第2步，95 ℃变性15 s，60 ℃ 退火45 s，40个循环。

反应设阳性和空白对照，阳性对照模板为各病原的靶标序列质粒标准品。

**4.4.3结果判读**

请参照各仪器使用说明书进行设置，反应结束后自动保存结果，根据图像分析后调节基线，通常为系统默认（用户可根据实际情况自行调整）。各类鼠传病原检测阈值：莫氏立克次体Cq ≤ 36、嗜吞噬细胞无形体Cq ≤ 35、恙虫病东方体Cq ≤ 33、土拉弗朗西斯菌Cq ≤ 36、巴尔通体Cq ≤ 35和致病性钩端螺旋体Cq ≤ 35。以上阈值为应用伯乐CFX96扩增仪判断标准，如使用其他型号扩增仪应重新评估检测阈值。

**4.4.4结果记录与存档**

将判读结果记录在附表1-4中，相关检测人和负责人签字后存档。

附件1-3

**病媒生物鼠传病原学监测—实时荧光定量RT-PCR检测汉坦病毒基因及分型**

1. **目的**

本标准操作程序目的在于规范应用实时荧光定量PCR（qPCR）技术检测肾综合征出血热汉坦病毒。

1. **适用范围**

适用于鼠肺组织中汉坦病毒特异靶基因的快速检测。

1. **检测的环境条件**

qPCR检测与核酸提取步骤需要分区操作，在专门的PCR室或区域操作。

1. **实验步骤**

**4.1 实验准备**

进入实验场所之前，要事先准备好所需试剂和耗材，调试仪器，核对标本。

**4.2 主要仪器设备**

荧光定量PCR仪，核酸提取仪，核酸浓度测定仪，10—1000 μl移液器

**4.3 主要试剂与耗材**

引物和探针序列见表1，TRIzol，RNA提取试剂盒，一步法荧光定量RT-PCR试剂盒，10—1000 μl吸头，0.2—1.5 μl离心管

|  |
| --- |
| 表1 引物和探针序列 |
| **引物名称** | **序列（3’**— **5’）** | **荧光/淬灭基团** |
| HTNV型 | F(771-793) | GCTTCTTCCAGATACAGCAGCAG | FAM/BHQ-1 |
| R(862-884) | GCCTTTGACTCCTTTGTCTCCAT |
| P(811-839) | CCTGCAACAAACAGGGAYTACTTACGGCA |
| SEOV型 | F(217-237) | GATGAACTGAAGCGCCAACTT | HEX/BHQ-1 |
| R(272-291) | CCCTGTAGGATCCCGGTCTT |
| P(239-263) | CCGACAGGATTGCAGCAGGGAAGAA |
| 注：方法引自庞正.病毒性出血热多重荧光定量RT-PCR检测方法的建立[D].中国疾病预防控制中心,2013. |

**4.4 操作程序**

**4.4.1 核酸提取**

剪取鼠肺组织，手动或者自动研磨处理，采用TRIzol或者其他RNA提取试剂盒制备RNA模板。操作方法按照试剂盒说明书应用手、工或者高通量核酸提取仪提取核酸。

**4.4.2 PCR扩增**

反应体系按试剂盒说明书配置，总体积为25 μl，反应设阳性和空白对照。

|  |  |
| --- | --- |
| **成份** | **体积（µl）** |
| 2×Reaction Mix | 12.5 |
| 上游引物10 µM | 0.5 |
| 下游引物10 µM | 0.5 |
| 探针10 µM | 0.3 |
| Enzyme mix | 1.0 |
| RNA模板 | 5.0 |
| 加DEPC水至 | 25.0 |

反应参数为50 ℃ 30 min；95 ℃ 10 min；95℃ 15 s，60 ℃ 45 s，40个循环。

**4.4.3结果判读**

请参照各仪器使用说明书进行设置，反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节基线，通常为系统默认（用户可根据实际情况自行调整）。检测阈值为Cq ≤ 35。

**4.4.4结果记录与存档**

将判读结果记录在附表1-4中，相关检测人和负责人签字后存档。

附件1-4

**病媒生物鼠传病原学监测—实时荧光定量RT-PCR检测发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒基因**

1. **适用范围**

适用于鼠脾、肝、肺和肾等组织中发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒（SFTSV）特异靶基因的检测。

1. **检测的环境条件**

RT-PCR检测与核酸提取步骤需要分区操作，在专门的PCR室或区域操作。

1. **实验步骤**

**4.1 实验准备**

进入实验场所之前，要事先准备好所需试剂和耗材，调试仪器，核对标本。

**4.2 主要仪器设备**

荧光定量PCR仪，核酸提取仪，核酸浓度测定仪，10—1000μl移液器

**4.3 主要试剂与耗材**

引物和探针序列见表1，TRIzol，RNA提取试剂盒，一步法荧光定量RT-PCR试剂盒，10—1000μl吸头，0.2—1.5μl离心管

表1 引物和探针序列

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **基因片段** | **引物名称** | **序列（3’— 5’）和探针** | **片段大小（bp）** |
| S基因 | S-F-3 | GGGTCCCTGAAGGAGTTGTAAA | 1104–1125 |
| S-R-3 | TGCCTTCACCAAGACTATCAATGT | 1155–1178 |
| S-Probe-3 | TexasRed-TTCTGTCTTGCTGGCTCCGCGC-BHQ-2 | 1127–1148 |
| L基因 | L-F-3 | AGTCTAGGTCATCTGATCCGTTYAG | 3138–3162 |
| L-R-3 | TGTAAGTTCGCCCTTTGTCCAT | 3209–3230 |
| L-Probe-3 | HEX-CAATGACAGACGCCTTCCATGGTAATAGGG-BHQ1 | 3168–3197 |
| M基因 | M-F-3 | AAGAAGTGGCTGTTCATCATTATTG | 1369–1393 |
| M-R-3 | GCCTTAAGGACATTGGTGAGTA | 1424–1445 |
| M-Probe-3 | FAM-TCATCCTCCTTGGATATGCAGGCCTCA-BHQ-2 | 1394–1420 |
| 注：方法引自Sun Y, Liang M, Qu J, et al. Early diagnosis of novel SFTS bunyavirus infection by quantitative real-time RT-PCR assay[J]. Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2012, 53(1):48-53. |

**4.4 操作程序**

**4.4.1 核酸提取**

剪取等量鼠脾、肝、肾组织（总量按RNA提取试剂盒要求确定），手动或者自动研磨处理，采用TRIzol或者其他RNA提取试剂盒制备RNA模板。操作方法按照试剂盒说明书应用手工或者高通量核酸提取仪提取核酸。

**4.4.2 PCR扩增**

反应体系按试剂盒说明书配置，总体积为25 μl，反应设阳性和空白对照。

|  |  |
| --- | --- |
| 成份 | 体积（µl） |
| 2×Reaction Mix | 12.5 |
| 上游引物10 µM | 0.5 |
| 下游引物10 µM | 0.5 |
| 探针10 µM | 0.3 |
| Enzyme mix | 1.0 |
| RNA模板 | 5.0 |
| 加DEPC水至 | 25.0 |

反应参数为50 ℃ 30 min；95 ℃ 10 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 45 s，40个循环。

**4.4.3结果判读**

请参照各仪器使用说明书进行设置，反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节基线，通常为系统默认（用户可根据实际情况自行调整）。检测阈值为Cq ≤ 35。

**4.4.4结果记录与存档**

将判读结果记录在附表1-4中，相关检测人和负责人签字后存档。

附件1-5

|  |
| --- |
| **病媒生物鼠传病原学监测****年度监测工作总结报告** |
| 填报人：  | 填报单位： 省（自治区、直辖市） |
| 监测年度： | 填报时间： 年 月 日 |
| **一、总体完成情况** | 　 |
| **二、监测内容与结果分析** | 1.监测点情况 | 包括监测点布设和近两年自然地理资料（包括地形、地貌、河流、植被、海拔、气温、降雨量、土壤等）和社会经济资料（人口数和居民人均收入）等 |
| 2.监测时间和频次 | 　 |
| 3.监测数据结果与分析 | 　 |
| **三、实验室质量控制与技术培训** | 　 |
| **四、问题分析与改进** | 　 |
| **五、下一年度工作计划** | 　 |
| **监测单位审核意见** | 负责人签字（盖章）： 年 月 日 |

注：表格不够可另附纸，于当年12月31日前上报。

**第二部分 蚊传病原监测**

# 一、监测目的

（一）掌握主要蚊传病原的空间、时间分布，绘制动态病原谱。

（二）掌握重要蚊传病原分型情况，绘制动态病原分型谱。

（三）掌握重要蚊传病原的传播媒介及其时空分布，为蚊传传染病的控制提供科学依据。

# 二、监测内容与工作要求

## （一）监测点的设置

在病媒生物生态学监测的基础上，每个省份选择2～5个地级市作为蚊传病原学监测点。

蚊传病原学监测点：各省根据当地生态环境特点、传染病流行情况等因素提出设立监测点的申请，监测点以省（自治区、直辖市）、地市级疾病预防控制中心为单位，中国疾病预防控制中心进行评估，通过评估和考核的单位成为蚊传病原学固定监测点单位。固定监测点每年需承担蚊传病原检测工作。

蚊传病原学流动监测点：省（自治区、直辖市）级疾病预防控制中心可根据本省蚊传传染病流行情况，自主选择不同城市和区域增加蚊传病原学流动监测点参照本实施方案开展蚊传病原检测工作。

## （二）采样点的选取

每个蚊传病原学监测点至少选2个县（区）开展监测工作，参照《全国病媒生物监测实施方案》中“蚊虫监测实施方案”采集蚊虫，开展监测。

蚊传病原学监测点与病媒生物蚊虫生态学监测点重合的单位，其病原学采样点的设置必须与生态学调查点相同，即采集蚊虫应来源于生态学监测点。

自主增加的流动监测点参照本实施方案选取采样点。

## （三）监测生境

参照《全国病媒生物监测实施方案》中“蚊虫监测实施方案”执行。每采样县（区）城区选择城镇居民区、公园(含街心公园)、医院各不少于2处，农村选择民房和牲畜棚(牛棚、猪圈、羊圈、养殖场等)各不少于2处。除牲畜棚外，其它均在外环境中进行。

## （四）监测对象及采集方法

监测对象为雌性成蚊。

标本采集方法参照《全国病媒生物监测实施方案》中“蚊虫监测实施方案”。诱蚊灯法/CO2诱蚊灯法和人诱停落法/双层叠帐法，至少选其一。各地可根据实际情况，增加其他采集方法。

## （五）监测频次、时间

监测频次：1次/年。

监测时间：每年6-7月。建议每年8月增加1次监测。

## （六）监测病原

本方案主要针对登革病毒、乙型脑炎病毒、黄热病毒和西尼罗病毒4种黄病毒属病原以及基孔肯雅病毒和辛德毕斯2种甲病毒属病原开展监测。不同蚊种需要检测的病原种类详见表1。

表1. 不同蚊种需要检测的病原种类列表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **序号** | **蚊种** | **需检测病原种类** |
| 1 | 淡色/致倦库蚊 | 乙型脑炎病毒；西尼罗病毒 |
| 2 | 三带喙库蚊 | 乙型脑炎病毒；西尼罗病毒；基孔肯雅病毒；辛德毕斯病毒 |
| 3 | 白纹伊蚊/埃及伊蚊 | 登革病毒；黄热病毒；乙型脑炎病毒；西尼罗；基孔肯雅病毒；辛德毕斯病毒；  |
| 4 | 中华按蚊 | 乙型脑炎病毒 |
| 5 | 当地其他优势蚊种 | 自行选择上述病原 |

## （七）标本采集、保存和运输

1. 蚊虫标本采集及分类

采样点内采集的蚊虫立即带回实验室进行分类鉴定，置于-20℃冰箱10-20分钟，蚊虫被冻晕后置于冰排上的白纸上进行分类鉴定，填写蚊媒标本采集信息表（附表2-1），分装于有RNAlater储存液的冻存管内，每管20-30只。

采集蚊虫标本包括淡色/致倦库蚊、三带喙库蚊、白纹伊蚊/埃及伊蚊、中华按蚊和当地其他优势蚊种。监测点根据当地蚊媒传染病流行情况，每监测点选择至少2种重要蚊媒，各不少于2000只，总数不低于5000只。各蚊种数量不足2000只时，可在监测点原采样县区适当增加同类型生境的采样点，同时可适当增加采集频次。

2. 标本保存、运送

标本应浸泡于RNAlater储存液中，4℃过夜，第二天放置4℃以下条件保存，但不超过1周。标本运送时采用低温冷藏运输，标本运输应遵守国家相关生物安全规定。

## （八）标本检测要求

1. 核酸检测

蚊虫采集后1周内，对捕获的蚊虫进行RNA核酸提取和病原检测，病原核酸检测阳性标本的PCR产物送由测序公司进行序列分析。

2. 基因组序列分析

病原核酸阳性的标本由国家、省或有条件的市级疾病预防控制机构进行基因组序列分析。

## （九）实验室检测方法

1. 标本处理

将分类后的蚊虫，按照采集地点，每20～30只为一份进行研磨处理（附件2-1）。

2. 病毒核酸检测

用RT-PCR的方法进行病毒核酸检测（附件2-2）。

## （十）生物安全

蚊媒病原实验室检测应按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》等相关规定要求，做好生物安全工作。

# 三、监测系统组成和职责

以全国病媒生物监测系统为依托，监测系统由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所及各级疾病预防控制中心组成。

## （一）中国疾病预防控制中心传染病所

负责《全国病媒生物病原学监测方案》（以下简称《方案》）的制定、组织、协调和督导；承担病媒生物病原学监测的技术指导和培训，提供扩增引物、阳性对照标准品，负责监测信息的收集、整理、分析、总结和反馈；并进行监测工作的督查和质量控制。

## （二）省(自治区，直辖市)疾病预防控制部门

按照《方案》要求，落实开展辖区内监测工作；确定一名主管领导负责协调，督促检查监测方案落实；按时上报、分析监测结果。

# 四、数据收集、分析与上报

## （一）数据收集内容

监测点上报以下表格，省级连同各监测点报表一同上报。

1. 病媒生物蚊媒标本采集信息表（附表2-1）

2. 病媒生物蚊传病原学检测结果统计表（附表2-2）

## （二）上报内容、时间和形式

1. 上报内容：附表2-1和2-2。核酸检测中每个阳性标本的序列测定结果放置一个电子文件夹，文件夹名称为其标本号，报送结果中应包括原始测序彩图文件和序列文件的电子版拷贝。

2. 上报时间：各监测点检测标本工作结束5个工作日内上报数据，最迟不应晚于当年7月31日。

3. 形式：发送邮件至wenbyjc@icdc.cn

# 五、监测系统质量控制

## （一）指导、培训与考核

各监测点所在省疾控中心根据工作需要，组织专业技术人员进行技术培训和考核。

## （二）实验室检测质控

1. PCR检测实验室需要分区管理。

2. 操作人员需要岗位培训。

3. 专用设备、试剂耗材规范管理，设置登记、消毒、实验室环境监测和档案管理制度。

4. 实验操作需要标准操作规程。

5. 实验室内部评估（自行评估）。

6. 实验室外部评估（国家疾控进行评估）。

## （三）病原学实验的核实工作

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所组织各省级疾病预防控制中心病原检测能力的室间质量评价。

# 六、附录

（一）附表2-1 病媒生物蚊媒标本采集信息表

（二）附表2-2 病媒生物蚊传病原学检测结果统计表

（三）附件2-1 蚊虫标本处理标准操作程序

（四）附件2-2 RT-hemi-nested PCR法检测蚊媒病毒核酸标准操作程序

**附录**

**附表2-1 病媒生物蚊媒标本采集信息表**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **标本号a** | **蚊种** | **数量b** | **采集生境c** | **采样点地址d** | **采样点经纬度** | **海拔** | **备注** |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |

注：a储存蚊子的管号；标本号编号原则：行政区域名+市名首字母+蚊种首字母+储存管序号，行政区域名：详见《中华人民共和国信息产业部关于中国互联网络域名体系的公告》，市名和蚊种名取前两个字的首字母，举例：吉林省长春市淡色库蚊第58管，标本号为glccds58；b每管内装蚊子数量；c为居民区、公园、医院、农户、牛棚、猪圈和养殖场；d采样点地址：请详细到村、街道。

监测方法： 监测时间： 监测单位： 监测人：

**附表2-2 病媒生物蚊传病原学检测结果统计表**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **监测点a** | **标本号范围b** | **蚊虫数量****（只）c** | **蚊种** | **检测病原体种类** | **阳性组数d** | **批阳性率e** | **最小感染率f** | **检测日期** | **检测人** |
|  | xxxxsd1-100 | 2000 | 三带喙库蚊 | 乙型脑炎病毒 | 2 | 2% | 1‰ |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

注：a病媒生物病原学监测点；b检测该蚊种的所有标本号；c检测该蚊种的总蚊虫数量；d检测出病原阳性的管数；e批阳性率=PCR阳性组数/研磨批次×100％；f最小感染率=PCR阳性组数/检测蚊虫数量×1000‰。

填表时间：\_\_\_\_\_\_年 月 日 监测单位：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_； 填表人：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

附件2-1

**蚊虫标本处理标准操作程序**

1. **目的**

采集蚊虫标本检测前处理。

1. **操作步骤**

2.1 将标本从RNAlater储存液中取出，放入装有0.5ml Hank’s液的研磨管中。

2.2 用研磨器研碎（根据研磨器条件自行调整，组织破碎完全即可），2000转/分钟离心15分钟，取上清用于核酸提取。

2.3 如不能及时提取，应将标本保存于-70℃以下冰箱，并记录标本量和盒中位置。

附件2-2

**RT-hemi-nested PCR法检测蚊媒病毒核酸标准操作程序**

1. **目的**

媒介蚊虫标本中病毒核酸的提取及PCR检测。

1. **适用范围**

适用于传播媒介蚊虫标本的检测。

1. **检测的环境条件**

在标本中提取蚊媒病毒RNA的实验要求在BSL-2实验室操作，PCR检测在专门PCR室或区域操作。

1. **实验步骤**

4.1实验准备

4.1.1在标本中提取蚊虫病毒RNA要求在BSL-2实验室，PCR检测在综合实验室独立区域或专门PCR室操作。

4.1.2进入实验场所之前，要事先准备好所需试剂和标本。预约实验场所，并看前一位实验者是否已经清场。

4.2 RNeasy Mini Kit提取蚊虫标本病毒RNA

4.2.1 从Kit中取出RLT液，根据标本数量分装适量RLT液按照1:100体积比分别加入β-巯基乙醇，分装至相应的预先标记好的微量离心管中，每管600µL。

4.2.2 将150 µl组织研磨混悬液分别加入相应的RLT液管中，充分混匀。

4.2.3 混匀后依次加入750µl 70％的乙醇，充分混匀。

4.2.4 从Kit中取出带收集管的滤柱，打开包装将其做好标记。取步骤4.2.3中的混合液750µl加入滤柱中，12000rpm，离心15s，弃收集管中的离心液。

4.2.5 滤柱仍放回收集管上，将步骤4.2.3剩余的混合液全部转入滤柱中，12000rpm，离心15s，弃离心液。

4.2.6 于滤柱中加入700µl Wash Buffer RW1液，12000rpm，离心15s。

4.2.7 从QIAGEN RNeasy Mini Kit中取一支干净的2mL收集管，将离心后的滤柱移到新的收集管上，加入500µl Wash Buffer RPE液，12000rpm，离心15s。

4.2.8 弃收集管中的离心液，再于滤柱中加入500µl Wash Buffer RPE液，13000～14000rpm，离心2min。

4.2.9 将滤柱移到一个无RNA酶的干净的1.5mL eppendorf管上，向滤柱中加入30～50µl的RNase-free Water,室温静置1～3min。

4.2.10 离心机12000rpm，离心1min，离心液即为待检RNA，立即检测或-70℃以下保存。

4.3 常规半套式RT-PCR方法

4.3.1逆转录合成cDNA

待检RNA提取物使用QuantiNovaTM Rererse Transcription Kit 获取cDNA。

4.3.1.1将RNA模板和试剂盒中的gDNA Removal Mix、Reverse Transcription Enzyme置于冰上溶解备用，Reverse Transcription Mix、RNase-free water室温溶解备用。

4.3.1.2根据试剂盒说明，在0.2 ml无核酸酶PCR管中配置去除基因组DNA反应体系（15 µl）。

4.3.1.3 45℃孵育2 min，马上转移至冰上或冷藏，去除基因组DNA后的总RNA直接用于反转录。

4.3.1.4 在上述反应液中加入Reverse Transcription Enzyme和Reverse Transcription Mix，混匀，瞬时离心，25℃孵育3 min，45℃孵育10 min，85℃孵育5 min，cDNA置于冰上或-20℃冷藏备用，用于后续PCR扩增。

4.3.2 登革、乙型脑炎、西尼罗、黄热病毒核酸PCR扩增

4.3.2.1引物：引物序列见下表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **引物** | **片段大小（bp）** |
| 第1轮引物 | XF-F1 | 263 |
| XF-R |
| 第2轮引物 | XF-F2 | 215 |
| XF-R |

4.3.2.2 PCR扩增

根据实验室内所使用病毒核酸PCR扩增试剂盒特点，正向引物XF-F1和反向引物XF-R配置第一轮PCR体系，进行第一轮PCR扩增。推荐反应条件为：95℃预变性2分钟，然后95℃变性1分钟，52℃退火1分钟，72℃延伸10秒，反应30循环，最后72℃延伸5分钟。

第二轮分型PCR扩增体系配置采用正向引物XF-F2与反向引物XF-R。推荐反应条件为：95℃预变性2分钟，95℃变性1分钟，54℃退火1分钟，72℃延伸10秒，反应30循环，最后72℃延伸5分钟。

4.3.2.3 1%浓度琼脂糖电泳分析，确定是否含有病毒。

4.3.2.4 结果判读

阳性：第2轮电泳显示215bp的DNA片段。

阴性：无特异性核酸片段扩增。

4.3.2.5 意义

阳性结果可以确定该蚊虫标本感染有登革、乙型脑炎、西尼罗、黄热病毒，可用于蚊媒病毒疫情的早期预警。

4.3.3 辛德毕斯病毒、基孔肯雅病毒核酸PCR扩增

4.3.3.1 引物：引物序列见下表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **引物** | **片段大小（bp）** |
| 第1轮引物 | XA-F1 | 433 |
| XA-R |
| 第2轮引物 | XA-F2 | 310 |
| XA-R |

4.3.3.2 PCR扩增

根据实验室内所使用病毒核酸PCR扩增试剂盒特点，正向引物XA-F1和反向引物XF-R配置第一轮PCR体系，进行第一轮PCR扩增。推荐反应条件为：95℃预变性2分钟，然后95℃变性1分钟，54℃退火1分钟，72℃延伸10秒，反应30循环，最后72℃延伸5分钟。

第二轮分型PCR扩增体系配置采用正向引物XA-F2与反向引物XA-R。推荐反应条件为：95℃预变性2分钟，95℃变性1分钟，60℃退火1分钟，72℃延伸10秒，反应30循环，最后72℃延伸5分钟。

4.3.3.3 1%浓度琼脂糖电泳分析，确定是否含有病毒。

4.3.3.4 结果判读

阳性：第2轮电泳显示310bp的DNA片段。

阴性：无特异性核酸片段扩增。

4.3.3.5 意义

阳性结果可以确定该蚊虫标本感染有辛德毕斯病毒、基孔肯雅病毒，可用于蚊媒病毒疫情的早期预警。

附件2

省级疾控机构病媒生物病原学监测负责人回执单

机构名称： （盖章）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 姓名 | 电话 | 手机号 | 微信号 | 电子邮箱 |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |