

团体标准

卡介苗接种异常反应分离菌株鉴定检测标准

**Standard Operation Procedure of identification of Isolates among
adverse event following BCG vaccination**

中国防痨协会 发布

目 录

前言	III
卡介苗接种异常反应分离菌株鉴定检测标准	1
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 适用范围	2
5 操作流程	2
5.1 实验原理	2
5.2 材料与设备	2
5.3 分离株处理	3
5.4 鉴定方法（多重 PCR 法）	3
5.5 结果判定	3
附录 A（规范性）卡介苗接种异常反应分离菌株鉴定检测流程图	5
参考文献	6

前言

本文件按照 GB/T1.1—2020 《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由上海生物制品研究所有限公司、成都生物制品研究所有限公司、中国食品药品检定研究院、解放军第三〇九医院提出。

本文件由中国防痨协会归口。

本文件起草单位：上海生物制品研究所有限公司、成都生物制品研究所有限公司、中国食品药品检定研究院、解放军第三〇九医院。

本文件主要起草人：李秀玲、葛永红、赵爱华、何秀云、陈哲文、屈戈、景辉、白家峰、魏东、刘菊、马雷钧、肖漓、蒋家庆、王俊。

卡介苗接种异常反应分离菌株鉴定检测标准

1 范围

本文件规定了卡介苗接种异常反应分离株鉴定的操作流程与结果判定。

本标准适用于各级儿童医院、综合医院儿科或感染科、结核病专科医院以及其它相关医疗卫生机构。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

《中华人民共和国药典》 三部

WHO Technical Report Series No. 979, 2013

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 疑似预防接种异常反应（Adverse Event Following Immunization，简称 AEFI）

是指在预防接种后发生的怀疑与预防接种有关的反应或事件。

3.2 多重 PCR 法（Multiplex PCR method）

是指在在同一 PCR 反应体系里加上二对以上引物，同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应，其反应原理，反应试剂和操作过程与一般 PCR 相同。

3.3 国家生物参考品（National biological reference）

系指用国际生物参考品标定的，或由中国自行研制的（尚无国际生物参考品）用于微生物（或其产物）的定性鉴定或疾病诊断的生物试剂、生物材料或特异性血清；或指用于定量检测某些物质的生物效价的参考物质。

4 适用范围

适用于卡介苗 AEFI 异常反应临床分离株鉴定，辅助 AEFI 诊断。

5 操作流程

5.1 实验原理

卡介苗菌株在最初的衰减过程丢失了很多基因，基因组上有长度不等的缺失区域（RD）（Regions of Difference），其 RD1 是一个很特殊的片段，所有的卡介苗亚株共同缺失 RD1 区，而 RD1 存在于所有有毒分枝杆菌中，因此这个基因水平上的特点将卡介苗与其他有毒的结核分枝杆菌复合群区分开来。通过检测 RD1 区的存在与否，可以特异性的鉴别 BCG。RD1 片段全长为 9458 bp，基于 RD1 区所设计的 3 条引物，其中 ET1 和 ET3 跨越 RD1 区，位于 RD1 区两侧，而引物 ET2 则位于 RD1 区内。当菌株缺失 RD1 区时，两侧引物结合，扩增将得到一条 193 bp 长度的片段；若菌株存在 RD1 区时，两侧引物虽然结合但是由于产物过长不能有效扩增，而 ET3 和 ET2 结合扩增生成一条 146 bp 长度的片段，通过高浓度琼脂糖凝胶电泳即可以对结果进行鉴定。

5.2 材料与设备

试剂：生理氯化钠溶液，DNA 提取试剂盒，10 倍 PCR 缓冲液(10 X PCR Buffer)，

dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L)，*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μl)，

引物 ET1 (10 μmol/L) 5'-AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC-3'，

引物 ET2 (10 μmol/L) 5'-CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG-3'，

引物 ET3 (10 μmol/L) 5'-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3'，

6 倍上样缓冲液(6 X loading buffer)，灭菌超纯水，TAE 电泳缓冲液(pH8.0 Tris-醋酸 40mM，EDTA 2mM) 或 TBE 电泳缓冲液 (pH8.0 Tris-硼酸 45mM，EDTA 1mM)、3%琼脂糖凝胶，DNA 分子量标记物 50bp DNA ladder，嵌入染料(GOLDEN VIEW 或 GelRed 等)。

实验用具：1 μL、10 μL、20 μL、200 μL、1000 μL 加样器，200 μL、1.5 mL EP 管，镊子、试管架、吸管。

设备：离心机，水浴系统、PCR 仪，电泳系统，成像系统

参考品：卡介苗(BCG)DNA 国家参考品 (2014 国生参字 0053，编号 230024)

5.3 分离株处理

分离菌株处理:挑取固体培养基上菌落至 50 μ l 生理氯化钠溶液中,沸水浴 10min,8000r/min 离心 5min,取上清作为分离株 DNA 模板。液体培养基获得培养物取 1ml 移入 1.5mlEP 管中,12000r/min,离心 5min,弃上清,留 40-50 μ l 液体重悬培养物,加入 1ml 生理氯化钠溶液,12000r/min,离心 5min,弃上清,留 40-50 μ l 液体重悬,沸水浴 10min,8000r/min 离心 5min,取上清作为分离菌株 DNA 模板,亦可采用商业化 DNA 提取试剂盒获得分离菌株 DNA 模板。获得分离菌株 DNA 模板后,可直接进行试验,亦可-20 $^{\circ}$ C 保存。

国家参考品处理:取卡介菌(BCG)DNA 国家参考品 1 支,加入灭菌超纯水 200 μ l 复溶,静置 2~3 分钟后用作参考品对照(参考品溶液复溶后可重新分装于容器中置-20 $^{\circ}$ C 冻存,每次使用 1 支,避免反复冻融)。

5.4 鉴定方法(多重 PCR 法)

PCR 反应体系:取分离菌株 DNA 模板 5 μ l,加至 45 μ l 反应试剂中【10 倍 PCR 缓冲液 5 μ l、dNTP Mixture 2 μ l、5 U/ μ l *Tap* DNA 聚合酶酶 0.3 μ l、2 μ l 引物 ET1、4 μ l 引物 ET2、2 μ l 引物 ET3,灭菌超纯水 29.7 μ l】,共 50 μ l 反应体系。取 BCG DNA 国家参考品溶液 5 μ l 同法操作。每个供试品平行做 2 管。

PCR 反应:反应体系于 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、64 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 30 次后,72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。

琼脂糖凝胶电泳:取 10 μ l PCR 产物加 2 μ l 6 倍上样缓冲液均匀混合后上样于 3% 琼脂糖凝胶泳道(GOLDEN VIEW 或 GelRed 为染料,浓度约为 0.5 μ g/ml)。50bp DNA ladder 直接上样 6 μ l。将 3%琼脂糖凝胶放入含 TAE/TBE 电泳缓冲液的电泳槽中,100mA 电泳时间 50min 左右(染料应运行至凝胶一半位置以上)。

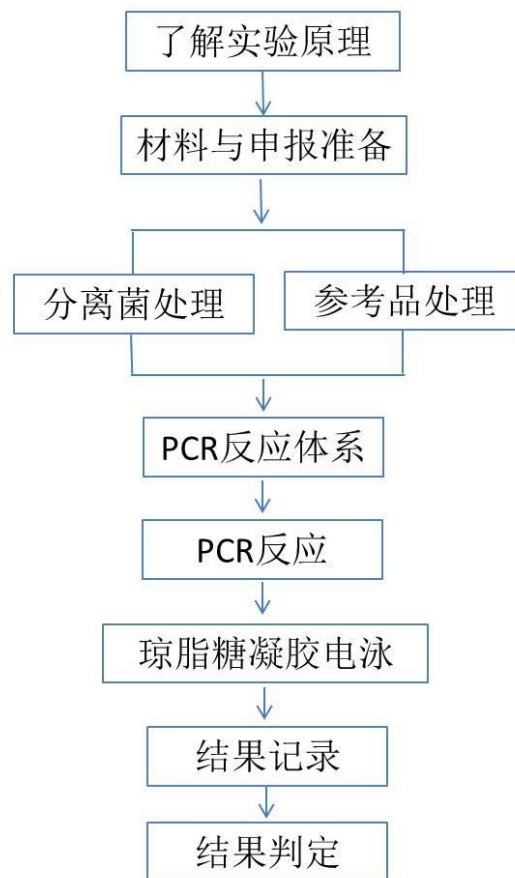
结果记录:采用凝胶成像仪或其他含 UV 光源设备,以 50bp DNA ladder 为分子量标记,观察琼脂糖凝胶上分离菌株与参考品 PCR 扩增片段数量及分子量大小,保存凝胶照片,并对泳道进行标记。

5.5 结果判定

分离菌株 PCR 扩增产物若与国家参考品一致,为一条约 200bp (193bp) 核酸片段,则分离

菌为卡介菌。

附录 A（规范性）卡介苗接种异常反应分离菌株鉴定 检测流程图



注：

分离菌株PCR扩增产物若与国家参考品一致，为一条约200bp（193bp）核酸片段，则分离菌为卡介苗

参考文献

- 1.国家药典委员会. 皮内注射用卡介苗 , 中华人民共和国药典三部 (2020 年版) . 中国医药科技出版社, 2020:124-126.
- 2.World health organization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines.Technical Report Series No.979,2013,
http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/TRS_979_Annex_3.pdf.
- 3.Seki M, Sato A, Honda I, et al. Modified multiplex PCR for identification of Bacillus Calmette-Guérin substrain Tokyo among clinical isolates.Vaccine. 2005 May 2; 23(24):3099-102. PMID: 15837207.
4. 赵爱华, 寇丽杰, 乔来艳等. 卡介菌及其衍生制品鉴别实验用 BCG DNA 国家参考品的研制. 中国药事, 2010, 24 (3) : 244-247。
5. Markey K, Ho MM,Choudhury B,and et al. Report of an international collaborative study to evaluate the suitability of multiplex PCR as an identity assay for different sub-strains of BCG vaccine. Vaccine. 2010 Oct 8;28(43):6964-9.
- 6.邱阿明, 赵爱华, 李建蓉, 等。多重 PCR 方法特异性鉴定卡介苗菌株多糖核酸的初探, 微生物学免疫学进展, 2008, 36 (2) : 13-15.
- 7.王丁丁, 付丽丽, 寇丽杰等, 豚鼠模型卡介苗接种所引发的淋巴结炎致病菌的分离和鉴定. 中国防痨杂志, 2016.38 (3) 209-214.