



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2657—2010

## 国境口岸组织胞浆菌检验方法

Examination for *Histoplasma* at frontier port

2010-11-01 发布

2011-05-01 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：中华人民共和国广西出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：吴文旺、谭勇、胡慧宁、陆建新、潘光合、方晋。

# 国境口岸组织胞浆菌检验方法

## 1 范围

本标准规定了国境口岸组织胞浆菌的检验对象、方法、结果报告及阳性结果的处置。  
本标准适用于国境口岸组织胞浆菌的实验室检验。

## 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 19489 实验室 生物安全通用要求
- Doc9284-AN/905 危险物品安全航空运输技术细则(2007 年~2008 年)

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**组织胞浆菌** *Histoplasma*

组织胞浆菌属真菌界-半知菌亚门-丝孢菌纲-丝孢菌目-从梗孢科，为双相型真菌，在 25 ℃ 条件下培养为霉菌相，在 35 ℃ 培养及组织内为酵母相。对人类具有病原性的有荚膜组织胞浆菌和组织胞浆菌杜波变种。

### 3.2

**组织胞浆菌病** *histoplasmosis*

组织胞浆菌引起的感染性真菌病。通常经呼吸道传染，侵犯肺部引起急慢性肺部损害，临床主要表现为发热、咳嗽、咯血、胸痛、呼吸困难、盗汗、消瘦，严重者可引起全身播散，主要累及单核巨噬细胞系统，如肝、脾、骨髓、淋巴结等；也可侵犯肾上腺、皮肤、胃肠道等。该病遍及全球，主要流行于温带地区。

## 4 对象

- 4.1 来自流行区的出入境人员。
- 4.2 国境口岸可疑组织胞浆菌病病人。
- 4.3 申请检验的其他人员。

## 5 准备

### 5.1 器材与试剂

实验室检验常用器材参见附录 A，培养基和试剂参见附录 B。

### 5.2 实验室生物安全

实验室生物安全符合 GB 19489 的规定。大量活菌操作，在生物安全三级(BSL-3)实验室进行；动

物感染实验,在动物生物安全三级(ABSL-3)实验室进行。标本检测,包括样本的病原菌分离纯化、药物敏感性试验、生化鉴定、免疫学实验、涂片、显微观察等初步检测活动,在生物安全二级(BSL-2)实验室进行。标本或活菌培养物运输应符合国际民用航空组织 Doc9284-AN/905 中 A 类传染性物质的要求。

6 标本采集和处理

6.1 血液标本

静脉采血 15 mL,其中 10 mL 置含适量肝素抗凝剂的无菌管中,用离心力 1 500g~2 000g 离心 15 min,取中间层进行真菌培养和涂片检查;另 5 mL 分离血清进行血清学检查。

6.2 骨髓标本

采集 0.5 mL~2 mL 抽吸标本置含肝素的灭菌容器中待检。

6.3 下呼吸道标本

推荐每天一次连续三次痰标本送检和培养,或者收集支气管肺泡灌洗液检查。

6.4 肝、脾、淋巴结穿刺液

进行直接涂片和培养。

6.5 皮肤及粘膜损害渗出物

进行直接涂片和培养。

6.6 组织标本

取肝、脾组织制成涂片或进行组织病理检查。

6.7 标识

所采集的标本应进行标识,标识应具有唯一性。

7 实验室检验

7.1 检验程序

检验程序参见附录 C。

7.2 病原学检验

直接涂片检查、分离培养、生化反应、动物接种方法参见附录 D。

7.3 血清学检验

双向免疫扩散试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)参见附录 E。

8 结果报告

8.1 直接涂片检查阳性,报告“涂片检查找到真菌孢子”,并注明细胞内或细胞外;直接涂片检查阴性,

报告“涂片检查未找到真菌孢子”。

8.2 分离培养阳性,且尿素酶试验阳性,明胶液化试验阴性,报告“检出荚膜组织胞浆菌”。

8.3 分离培养阳性,且尿素酶试验阴性,明胶液化试验阳性,报告“检出组织胞浆菌杜波变种”。

8.4 分离培养阴性,报告“培养八周末见菌落生长”。

8.5 双向免疫扩散试验、酶联免疫吸附试验阳性,报告“组织胞浆菌抗体呈阳性反应”,并注明检验方法;反之报告阴性,也注明检验方法。

## 9 阳性结果的处置

对分离培养出的组织胞浆菌菌株应送上一级实验室做复检或鉴定。阳性结果应按规定向上级主管部门报告。

附 录 A  
(资料性附录)  
实验室检验常用器材

A.1 病原学检验常用器材

- A.1.1 霉菌培养箱(25 ℃和 35 ℃)。
- A.1.2 显微镜。
- A.1.3 高压灭菌器。
- A.1.4 普通冰箱。
- A.1.5 离心机。
- A.1.6 生物安全柜。
- A.1.7 水浴锅。
- A.1.8 玻璃器皿、解剖用具、接种工具。
- A.1.9 动物饲养器具等。

A.2 血清学检验常用器材

- A.2.1 酶联免疫测定仪。
- A.2.2 洗板机。
- A.2.3 电热恒温箱。
- A.2.4 普通冰箱。
- A.2.5 普通离心机。
- A.2.6 96 孔聚乙烯反应板。
- A.2.7 微量加样器。
- A.2.8 振荡器。
- A.2.9 玻片、打孔器。

附 录 B  
(资料性附录)  
常用培养基及试剂

B.1 病原学检验常用培养基及试剂

B.1.1 沙氏琼脂培养基(SDA)

B.1.1.1 组成

|     |          |
|-----|----------|
| 葡萄糖 | 40.0 g   |
| 蛋白胨 | 10.0 g   |
| 琼脂  | 15.0 g   |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |

B.1.1.2 制法

上述混合后 121 ℃ 10 min 灭菌,冷却至 50 ℃左右加入庆大霉素 50 mg、放线菌酮 200 mg,混匀,分装试管(18 mm×180 mm)每管加培养基 7 mL,置斜面,冷后备用。

B.1.2 脑心浸汁培养基(BHI)

B.1.2.1 组成

|      |          |
|------|----------|
| 脑心浸膏 | 35.0 g   |
| 琼脂   | 15.0 g   |
| 蒸馏水  | 1 000 mL |

B.1.2.2 制法

上述混合后,121 ℃ 10 min 灭菌后冷却至 50 ℃左右,分装试管(18 mm×180 mm)每管加培养基 7 mL,置斜面,冷后备用。不加琼脂为液体培养基。

B.1.3 尿素琼脂

B.1.3.1 组成

|           |          |
|-----------|----------|
| 葡萄糖       | 40.0 g   |
| 琼脂        | 20.0 g   |
| 蛋白胨       | 1.0 g    |
| 氯化钠       | 15.0 g   |
| 磷酸二氢钾     | 42.0 g   |
| 酚红        | 0.012 g  |
| 20%尿素(后加) |          |
| 蒸馏水       | 1 000 mL |

B.1.3.2 制法

各成分混合均匀后调 pH 至 6.8,加入琼脂 20.0 g,121 ℃ 10 min 灭菌,冷却至 45 ℃~50 ℃时,每

450 mL 培养基中加入抽滤灭菌的 20% 尿素 50 mL,均匀后分装试管(12 mm×100 mm)每管 3 mL 置斜面,冷后备用。

B. 1. 4 明胶培养基

B. 1. 4. 1 组成

|     |         |
|-----|---------|
| 明胶  | 12. 0 g |
| 肉浸液 | 100 mL  |

B. 1. 4. 2 制法

100 mL 肉浸液中加入明胶 12. 0 g,隔水加热溶解,矫正 pH 至 7. 2,趁热以绒布过滤。分装小试管(12 mm×100 mm)每管 3 mL,121 ℃15 min 灭菌后置斜面,冷后备用。

B. 1. 5 瑞氏染液

B. 1. 5. 1 组成

|          |          |
|----------|----------|
| 缓冲液:磷酸钾  | 1. 63 g  |
| 磷酸氢二钠    | 3. 20 g  |
| 蒸馏水      | 1 000 mL |
| pH7. 0   |          |
| 染液:瑞氏染色粉 | 0. 3 g   |
| 中性甘油     | 3. 0 mL  |
| 甲醇       | 97. 0 mL |

B. 1. 5. 2 制法

在研钵中研磨粉,加甘油,再研磨,加甲醇,充分混合,倒密闭瓶中,用前过滤。

B. 1. 6 吉姆萨染液

B. 1. 6. 1 组成

|         |          |
|---------|----------|
| 缓冲液:磷酸钾 | 2. 59 g  |
| 磷酸氢二钠   | 6. 7 g   |
| 蒸馏水     | 1 000 mL |
| pH7. 0  |          |
| 染液:吉姆萨粉 | 0. 6 g   |
| 中性甘油    | 50 mL    |
| 甲醇      | 50 mL    |

B. 1. 6. 2 制法

在研钵中研磨粉,加甘油,再研磨,加甲醇,充分混合,倒密闭瓶中。

B. 1. 6. 3 最终染液

缓冲液 6 mL 加染液 2 mL 充分混匀。

B.2 血清学检验常用试剂

B.2.1 双向免疫扩散试验试剂

B.2.1.1 pH8.6,0.1 mol/L 巴比妥-巴比妥钠缓冲液

|      |                |
|------|----------------|
| 巴比妥  | 1.84 g         |
| 巴比妥钠 | 10.3 g         |
| 硫柳汞  | 100 mg         |
| 蒸馏水  | 至 500 mL,加热溶解。 |

B.2.1.2 210 g/L 琼脂

称取琼脂糖 10 g 置 1 000 mL 三角烧瓶中,加蒸水 500 mL,水浴煮沸溶解后调整 pH8.6,0.1 mol/L 巴比妥-巴比妥钠缓冲液 500 mL,加 0.1 g 叠氮钠防腐,混匀后分装置 4 ℃ 冰箱保存备用。

B.2.1.3 组织胞浆菌诊断抗原液

由有资质的机构提供,选择适宜的稀释度。

B.2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂

B.2.2.1 包被稀释液(0.05 mol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液,pH9.6):

|      |                   |
|------|-------------------|
| 碳酸钠  | 1.5 g             |
| 碳酸氢钠 | 2.9 g             |
| 叠氮钠  | 0.2 g             |
| 双蒸水  | 1 000 mL,调 pH9.6。 |

B.2.2.2 封闭液(5%小牛血清/PBS 溶液):

|            |         |
|------------|---------|
| 小牛血清       | 50 mL   |
| PBS(pH7.4) | 950 mL。 |

B.2.2.3 洗涤液(PBST,pH7.4):

|          |                   |
|----------|-------------------|
| 氯化钠      | 8.0g              |
| 磷酸二氢钾    | 0.2g              |
| 十二水磷酸氢二钠 | 2.9g              |
| 氯化钾      | 0.2 g             |
| 硫柳汞      | 0.1 g             |
| 吐温-20    | 0.5 mL            |
| 双蒸水      | 1 000 mL,调 pH7.4。 |

B.2.2.4 样本稀释液(PBS,pH7.4):

|          |                   |
|----------|-------------------|
| 氯化钠      | 8.0 g             |
| 磷酸二氢钾    | 0.2 g             |
| 十二水磷酸氢二钠 | 2.9 g             |
| 氯化钾      | 0.2 g             |
| 硫柳汞      | 0.1 g             |
| 双蒸水      | 1 000 mL,调 pH7.4。 |

B.2.2.5 酶标记第二抗体、阴阳性对照血清:由有资质的机构提供。

**B.2.2.6 底物液(TMB-过氧化氢尿素溶液):**

底物液 A(3、3′、5、5′-四甲基联苯胺,TMB):

|      |             |
|------|-------------|
| TMB  | 200 mg      |
| 无水乙醇 | 100 mL      |
| 双蒸水  | 至 1 000 mL。 |

底物液 B 缓冲液(0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液,pH5.0~5.4):

|             |                      |
|-------------|----------------------|
| 磷酸氢二钠       | 14.60 g              |
| 柠檬酸         | 9.33 g               |
| 0.75%过氧化氢尿素 | 6.4 mL               |
| 三蒸水         | 1 000 mL,调 pH5.0~5.4 |

将底物液 A 和底物液 B 按 1:1 混合即成 TMB-过氧化氢尿素应用液。

**B.2.2.7 终止液(2 mol/L 硫酸溶液):**双蒸水 600 mL,浓硫酸 100 mL(缓慢滴加并不断搅拌),加双蒸水至 900 mL。

附 录 C  
(资料性附录)  
组织胞浆菌检验程序

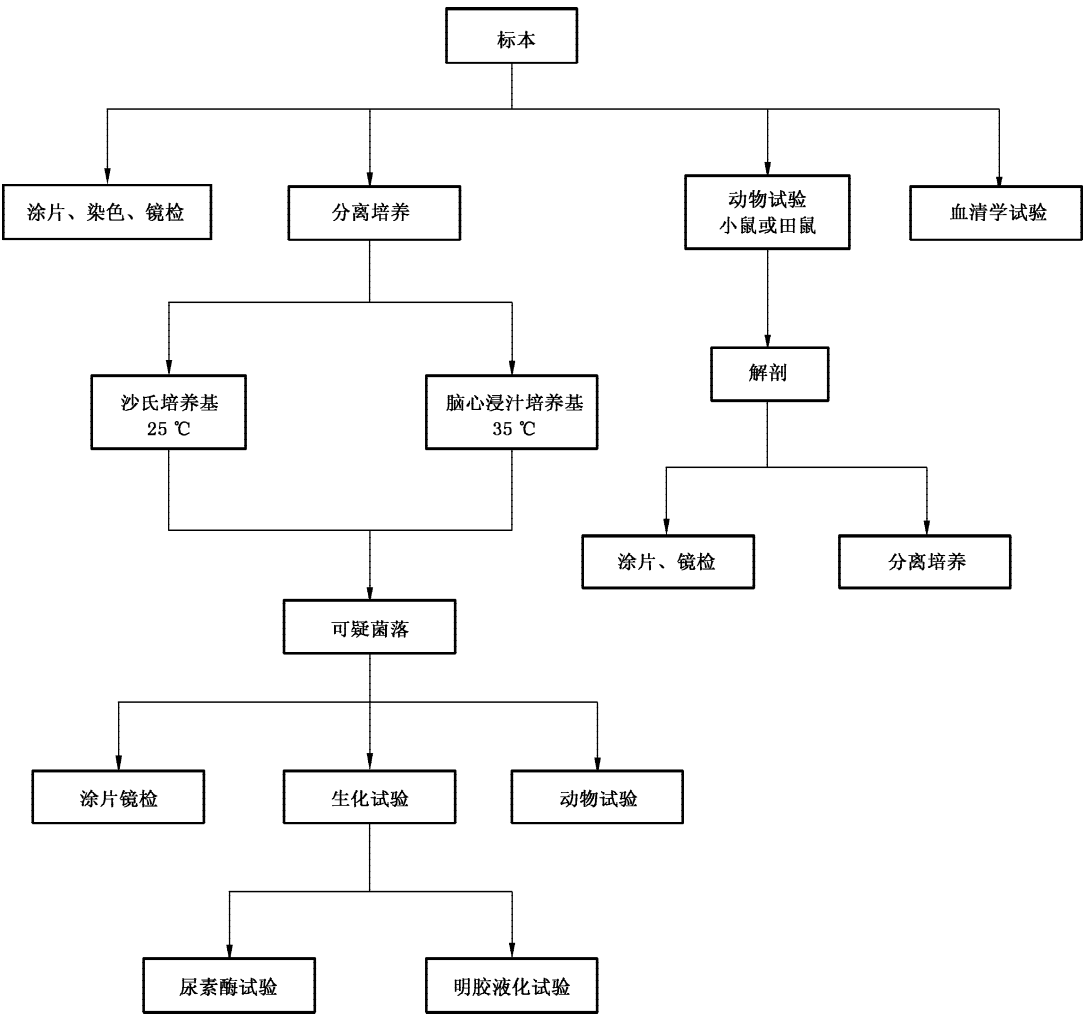


图 C.1 组织胞浆菌检验程序

附 录 D  
(资料性附录)  
病原学检查

D.1 直接涂片检查

D.1.1 瑞氏染色

D.1.1.1 将涂片平放染色架上。

D.1.1.2 加瑞氏染液数滴,以覆盖涂片为宜约 1 min。

D.1.1.3 滴加约等量的缓冲液与染液混合,室温下染色 5 min~10min。

D.1.1.4 用流水冲去染液,干燥后油镜检查。

D.1.2 吉姆萨染色

D.1.2.1 把涂片浸入 100%甲醇 3 min~5 min。

D.1.2.2 用混合好的吉姆萨染液覆盖玻片,放置 15 min。

D.1.2.3 用流水冲去染液,待干燥后油镜检查。

D.1.3 结果

D.1.3.1 油镜下检查,荚膜组织胞浆菌表现为 2  $\mu\text{m}$ ~4  $\mu\text{m}$  直径、大小一致的圆形或卵圆形、芽生、有荚膜孢子,一端较尖,一端较圆,周围有一个似荚膜的亮圈,通常在大单核或多形核细胞内,有时在组织细胞外,多聚集成群,应怀疑组织胞浆菌。

D.1.3.2 组织胞浆菌杜波变种为 12  $\mu\text{m}$ ~15  $\mu\text{m}$  大小的、厚壁、圆形、芽生孢子,细胞内可见脂肪小滴,少数可见基底出芽。

D.1.3.3 找到符合以上形态特征的真菌孢子为直接涂片检查阳性;反之,为直接涂片检查阴性。

D.2 分离培养

D.2.1 总则

组织胞浆病的确定诊断需要依靠培养分离真菌。骨髓培养较敏感,血液应离心后取中间层作培养,其他标本直接种沙氏琼脂培养基(SDA)和脑心浸汁培养基(DHI),分离出单菌落后接种生化培养基,有条件应接种动物。

D.2.2 接种沙氏琼脂培养基(SDA)25  $^{\circ}\text{C}$  培养

菌落特征呈霉菌相生长。两种组织胞浆菌菌落形态相同,菌落生长慢,2 周可形成直径 3 mm~4 mm 菌落,具浓密的气生菌丝,正面初为白色,逐渐转变成棕色,背面棕色。镜检见分枝、分隔、细长的菌丝,有少量直径为 2  $\mu\text{m}$ ~4  $\mu\text{m}$  的圆形或梨形、壁光滑或有刺的小分生孢子,单个着生于两侧或短的分生孢子梗上。4 周左右可找到直径为 8  $\mu\text{m}$ ~15  $\mu\text{m}$  大分生孢子,圆形或梨形,厚壁光滑或有棘突呈齿轮状,着生于菌丝成直角的分生孢子梗顶端,这种齿轮状大分生孢子具有特征性。

D.2.3 接种脑心浸汁培养基(DHI)37  $^{\circ}\text{C}$  培养

菌落特征呈酵母相。约 4 周可见直径 3 mm~4 mm 的圆形、隆起、光滑、湿润、乳酪样酵母菌落。

镜下荚膜组织胞浆菌的形态特征与直接涂片镜检相同；而组织胞浆菌杜波变种可见大酵母细胞。接种液体培养基较固体培养基酵母相生长更好，涂片偶尔可见细小菌丝，其余均为酵母样孢子。

#### D.2.4 结果判断

分离培养出双相型真菌，且符合 D.2.2 和 D.2.3 的菌落特征及镜下形态特征为阳性；培养 8 周无菌落生长为阴性。

### D.3 生化反应

#### D.3.1 尿素酶试验

接种尿素酶培养基 25℃ 培养 4 d 左右，荚膜组织胞浆菌可分解尿素；组织胞浆菌杜波变种不分解尿素。

#### D.3.2 明胶液化试验

接种明胶培养基 25℃ 培养 7 d 左右，荚膜组织胞浆菌不能液化明胶；组织胞浆菌杜波变种能液化明胶。

### D.4 动物接种

推荐进行动物接种。豚鼠、大鼠、小鼠、田鼠、兔、猴都易感，但以小鼠和田鼠为佳。

标本或培养物以生理盐水制成菌悬液，腹腔注射 5 只小鼠，每只接种量为 0.5 mL，2 周后处死 1 只动物，以后每周处死 1 只，解剖取肝、脾组织直接涂片检查可发现并能重新培养分离出组织胞浆菌。

附 录 E  
(资料性附录)  
血清学试验

E.1 双向免疫扩散试验

E.1.1 实验步骤

- E.1.1.1 取 10 g/L 琼脂糖,置 56 ℃ 水浴融解。
- E.1.1.2 将玻璃板(规格为 7.5 cm×2.5 cm)放置水平台上,吸取已融化的 10 g/L 琼脂糖 5.6 mL 浇注其上,凝固后即成 3 mm 厚的琼脂板。
- E.1.1.3 选用两孔模式在琼脂板上成双打孔,孔直径 3 mm,孔间距 10 mm。
- E.1.1.4 在一侧孔内加入组织胞浆菌诊断抗原液(适宜稀释度)约 10 μL,在另一侧相对应的孔内加入待测血清约 10 μL。
- E.1.1.5 置 37 ℃ 湿盒内扩散反应 24 h。
- E.1.1.6 观察白色沉淀线。

E.1.2 结果判断

待测血清与组织胞浆菌抗原之间出现 2 条沉淀线,外线为 H 线(组织胞浆菌特异线),另一沉淀线为 M 线(真菌类沉淀线)为阳性,提示组织胞浆菌感染;无组织胞浆菌特异线为阴性。

E.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)

E.2.1 实验步骤

- E.2.1.1 包被抗原:用包被稀释液适当稀释纯化的组织胞浆菌素(HMIN、PHMIN,包被量每孔 20 μg~200 μg),包被 96 孔的聚乙烯板,每孔 100 μL,4 ℃ 下过夜,洗涤液洗涤 3 次,250 μL/孔,每次 3 min,去除未结合的抗原。
- E.2.1.2 封闭酶标反应板:将封闭液(5%小牛血清/PBS 溶液)加满各反应孔,4 ℃ 下过夜,洗涤液洗涤 3 次,250 μL/孔,每次 3 min。
- E.2.1.3 加待测血清、阴阳性对照血清,100 μL/孔,温育 60 min 后,洗涤 3 次,250 μL/孔,每次 3 min,去除未结合的待测抗体。
- E.2.1.4 加入酶标记抗体每孔 100 μL,温育 30 min 后,洗板 3 次,250 μL/孔,每次 3 min,去除未结合的酶标抗体。
- E.2.1.5 加入酶底物应用液每孔 100 μL,避光置湿盒 37 ℃ 温育 30 min。
- E.2.1.6 终止反应:每孔加 2 mol/L 硫酸 50 μL 终止反应,15 min 后,用酶标检测仪波长 450 nm,测定每孔 OD 值。

## E.2.2 结果判断

用测定标本的 OD 值与阴性测定孔平均 OD 值的比值(P/N)表示,当 P/N 大于 2.1 为阳性,小于或等于 2.1 为阴性。

---