

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

猫衣原体与支气管败血波氏杆菌双重实时荧光定量 PCR 检测方法

Duplex real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of *Chlamydia felis* and *Bordetella bronchiseptica*

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - - XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

本标准按 GB/T 1.1-2020给出的规则起草。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：上海市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：杨德全、鞠厚斌、王建、赵洪进、李鑫、杨显超、葛菲菲、沈海潇、王晓旭、陶田谷晟、沈莉萍、于慧茹。

猫衣原体与支气管败血波氏杆菌双重实时荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猫衣原体和支气管败血波氏杆菌双重实时荧光定量 PCR 鉴别诊断方法。

本文件适用于猫眼分泌物、鼻咽拭子、血液中猫衣原体和支气管败血波氏杆菌核酸检测。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

实时荧光定量 PCR：实时荧光聚合酶链式反应（real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction）

BHQ：无荧光淬灭基团（black hole quencher）

Ct 值：每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数（cycle threshold）

DEPC：焦碳酸二乙酯（diethyl pyrocarbonate）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

FAM：6-羧基荧光素（6-carboxyfluorescein）

HEX：六氯-6-甲基荧光素（hexachloro fluorescein）

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 总则：除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 的要求，所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

5.1.2 TRIzol：2℃~8℃保存。

5.1.3 氯仿：2℃~8℃保存。

5.1.4 异丙醇：-20℃预冷。

5.1.5 DEPC 水：配制方法按附录 A 中 A.1。

5.1.6 75% 乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制，-20℃预冷。

5.1.7 DNAzol：2℃~8℃保存。

5.1.8 8 mmol/L NaOH 溶液：配制方法按附录 A 中 A.2。

5.1.9 双重荧光 PCR 反应液配方：配制方法按附录 B.1。

5.1.10 阳性对照、阴性对照见附录 A 中 A.3 和 A.4。

5.2 引物和探针

双重实时荧光定量PCR扩增用上、下游引物和探针序列参见附录C.1。

6 仪器设备

6.1.1 荧光 PCR 检测仪。

6.1.2 高速冷冻离心机。

6.1.3 振荡器。

6.1.4 微量移液器（量程：0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL 和 200 μL~1 000 μL）。

6.1.5 冰箱（2℃~8℃和-20℃以下）。

7 样品的采集与处理

7.1 总则

样品的采集、保存与运输按照NY/T 541执行。生物安全要求按照GB 19489的规定。

7.2 样品采集

血液、眼分泌物和鼻咽拭子样品采集分别按照NY/T 541中6.1.2.7、6.12和6.19中的规定执行。

7.3 样品处理

7.3.1 全血样品：按照 NY/T 541 中 6.1.3.1 中的规定执行。

7.3.2 鼻咽拭子样品：将鼻咽拭子样品在振荡器上充分混合后，将拭子中的液体挤出后弃去拭子。3000 r/min 离心 5 min，取上清液，转入 1.5 mL 灭菌离心管中，用于后续的核酸提取。

8 操作方法

8.1 样品 DNA 提取

8.1.1 在样本制备区进行。DNA 提取使用 DNAzol 裂解法提取；也可采用其他等效的商品化试剂盒提取。

8.1.2 待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用 n 表示，取 n 个灭菌 1.5 mL 离心管，逐管编号。

8.1.3 每管加入 800 μ L DNAzol。

8.1.4 每管对应编号分别加入 200 μ L 待检样品、阳性对照和阴性对照，混匀，于 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 10 min。

8.1.5 取 900 μ L 上清，置新的灭菌 1.5 mL 离心管中，加入 500 μ L 无水乙醇，混匀，室温放置 3 min，于 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 5 min。

8.1.6 弃上清，沿管壁缓缓加入 900 μ L 无水乙醇，颠倒洗涤，于 4 $^{\circ}$ C、10000 r/min 离心 5 min。反复洗涤两次后，将离心管倒扣于吸水纸上，自然晾干或用移液器移去残液。

8.1.7 用 50 μ L 8 mmol/L NaOH 溶液溶解沉淀，2000 r/min 离心 5 s，获得 DNA 溶液，可直接用于检测或保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

8.2 扩增试剂的准备与配制

8.2.1 在试剂储存和准备区进行。

8.2.2 设实时荧光 PCR 反应管数为 n ，为待检样品数+阳性管数+阴性管数，每个反应的体系见附录 B，为了避免移液器取样损失，建议按 $n+1$ 个反应进行配制。配制反应液在冰盒中进行。将配制的荧光 PCR 反应液充分混匀，按照每管 20 μ L 分装于 0.2 mL 透明 PCR 管内，将 PCR 管置于 96 孔板上，按顺序加样并做好标识，转移至样本制备区。

8.3 加样

8.3.1 在样本制备区进行。

8.3.2 在上述 8.2.2 的反应管中分别加入 8.1.7 中制备的 DNA 溶液 5 μ L，使每管总体积达到 25 μ L，记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后，瞬时离心，500 r/min 离心 30 s。转移至扩增区。

8.4 荧光 PCR 反应

8.4.1 在扩增区进行。

8.4.2 将 8.3.2 中加样后的反应管放入荧光 PCR 检测仪中，设置探针：报告基团选择 FAM 和 HEX 两个荧光通道，淬灭基团均选择无 (None) 荧光。在荧光 PCR 仪上进行以下反应：50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s，在每个循环第二步 (60 $^{\circ}$ C 30s) 收集荧光信号，共 40 个循环。

9 结果判定

9.1 结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

9.2 实验成立的条件

9.2.1 阴性对照：两个检测通道均无 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线。

9.2.2 阳性对照：两个检测通道均出现典型的 S 型扩增曲线，且 C_t 值 ≤ 30 。

9.2.3 9.2.1 和 9.2.2 要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 阴性

两个检测通道均无 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线，表示样品中无猫衣原体和支气管败血波氏杆菌核酸。

9.3.2 双检测通道阳性

两个检测通道出现两条对应的典型的 S 型扩增曲线，且 C_t 值 ≤ 35 ，表示样品中同时存在猫衣原体和支气管败血波氏杆菌核酸。

9.3.3 单检测通道阳性

如仅 FAM 检测通道出现典型的 S 型扩增曲线，且 C_t 值 ≤ 35 ，而 HEX 检测通道无 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线，表示样品中存在猫衣原体核酸，但不含有支气管败血波氏杆菌核酸。

如仅 HEX 检测通道出现典型的 S 型扩增曲线，且 C_t 值 ≤ 35 ，而 FAM 检测通道无 C_t 值或无典型的 S 型扩增曲线，表示样品中存在支气管败血波氏杆菌核酸，但不含有猫衣原体核酸。

上述结果描述及判定可参加表1。

表1 结果描述与判定

FAM检测通道	HEX检测通道	结果描述判定
阳性	阳性	同时存在猫衣原体和支气管败血波氏杆菌核酸
阳性	阴性	存在猫衣原体核酸，但不含有支气管败血波氏杆菌核酸
阴性	阳性	存在支气管败血波氏杆菌核酸，但不含有猫衣原体核酸
阴性	阴性	无猫衣原体和支气管败血波氏杆菌核酸

9.3.4 有效原则

C_t 值 > 35 ，且出现典型的 S 型扩增曲线的样品建议复检。复检仍出现上述结果的，判相应检测通道的病毒核酸为阳性，否则判为阴性。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A
(规范性)
溶液配制

A.1 DEPC水配方

将 DEPC 加入去离子水（符合 GB/T6682 要求）中至终浓度为 0.1%（体积比），充分混合均匀后作用 12 h，分装，121 °C 高压灭菌 30 min，冷却后冷藏备用。

A.2 8 mmol/L NaOH 溶液

称量0.32g NaOH，溶解到 1 000 mL去离子水中，混匀，分装，常温保存。

A.3 阳性对照

为含猫衣原体和支气管败血波氏杆菌基因目的片段的质粒DNA。

A.4 阴性对照

为不含猫衣原体和支气管败血波氏杆菌基因目的片段的质粒DNA。

附 录 B
(规范性)
荧光 PCR 反应液配方

B.1 荧光PCR反应液配方

荧光 PCR 反应液配方见表 B.1。

组分	1个检测反应的加入量 (μL)
Probe qPCR Mix, with UNG (2×)	12.5
<i>C. felis</i> -1F	0.5
<i>C. felis</i> -1R	0.5
<i>C. felis</i> -1P	0.4
<i>B. bronchiseptica</i> -2F	0.5
<i>B. bronchiseptica</i> -2R	0.5
<i>B. bronchiseptica</i> -2P	0.5
ddH ₂ O	4.6
DNA	5

B.2 注意事项

在检测过程中，应严防不同样品间的交叉污染。

反应液分装时应避免产生气泡，上机前检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。

附 录 C
(资料性)
引物和探针

表 C.1 引物、探针的名称与序列

名称	序列 (5'-3')
<i>C. felis</i> -1F	GAACTGCAAGCAACACCACTG
<i>C. felis</i> -1R	CCATTCGGCATCTTGAAGATG
<i>C. felis</i> -1P	FAM -CGCTGCCGACAGATCAAATTTTGCC-BHQ1
<i>B. bronchiseptica</i> -2F	ACTATACGTCGGGAAATCTGTTTG
<i>B. bronchiseptica</i> -2R	CGTTGTCGGCTTTCGTCTG
<i>B. bronchiseptica</i> -2P	ROX-CGGGCCGATAGTCAGGGCGTAG-BHQ2