

团 体 标 准

T/CVMA XX-XXXX

口蹄疫病毒、塞内卡病毒双重实时荧光定量
RT-PCR 检测方法

Fluorescence loop-mediated isothermal amplification for detection of African swine
fever virus

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

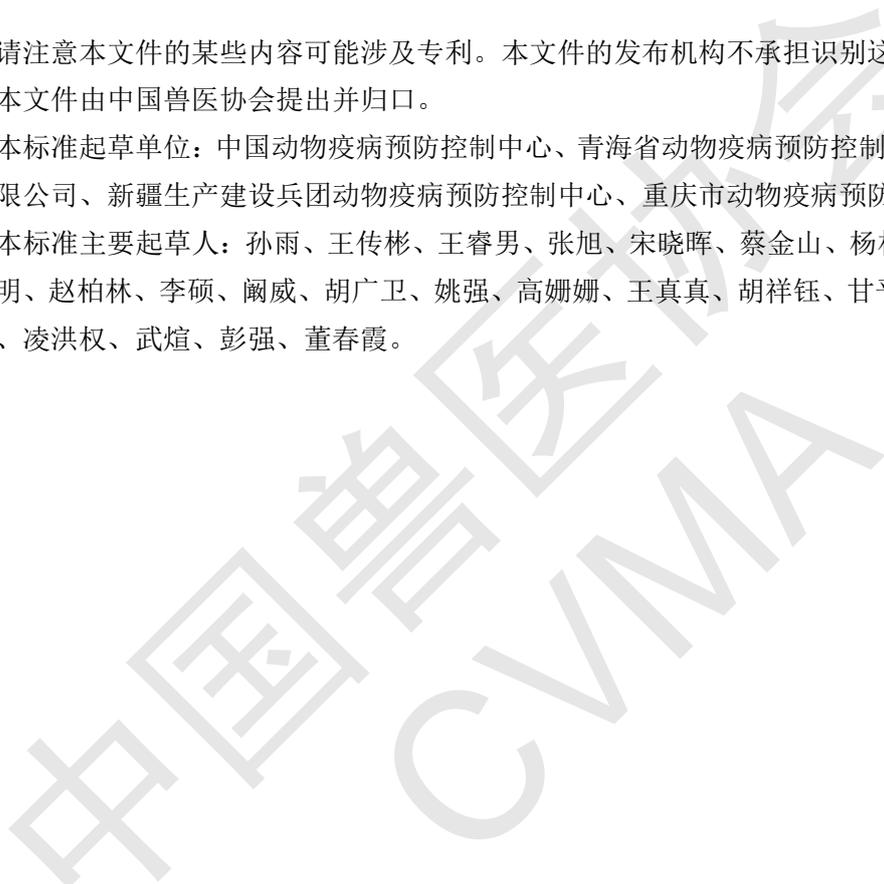
本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：中国动物疫病预防控制中心、青海省动物疫病预防控制中心、北京亿森宝生物科技有限公司、新疆生产建设兵团动物疫病预防控制中心、重庆市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：孙雨、王传彬、王睿男、张旭、宋晓晖、蔡金山、杨林、孙航、马英、王新杰、孙晓明、赵柏林、李硕、阚威、胡广卫、姚强、高姗姗、王真真、胡祥钰、甘平、毕一鸣、黄辉、张力、殷涛、凌洪权、武煊、彭强、董春霞。



口蹄疫病毒、塞内卡病毒双重实时荧光定量 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了口蹄疫病毒和塞内卡病毒的实时荧光定量RT-PCR检测方法试剂、仪器用具、样品采集、加样、荧光定量RT-PCR检测、结果判定。

本文件适用于血清、各种组织样品、水泡液及O-P液等标本中的口蹄疫病毒和塞内卡病毒的核酸检测。

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（包括所有的修改单元）适用于本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求执行。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法执行。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范执行。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

荧光定量反转录-聚合酶链式反应（real time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction）

荧光定量RT-PCR反应

在RT-PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个RT-PCR进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

[来源：GB/T 27982-2011,3.1]

3.2

荧光阈值（threshold）

荧光定量RT-PCR反应的前15个循环的荧光信号作为荧光本底信号，荧光阈值的缺省设置是3个~15个循环的荧光信号的标准偏差的10倍。

[来源：GB/T 27982-2011,3.2, 有修改]

3.3

Ct值 (Ct value)

每个反应管内的荧光信号到达设定的荧光域值时所经历的循环数。

[来源：GB/T 27982-2011,3.3]

4 缩略语

FMDV: 口蹄疫病毒(foot and mouth disease virus)

SVV: 塞内卡病毒(seneca vally virus)

RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)

RT-PCR: 反转录-聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction)

bp: 碱基对 (base pair)

O-P 液: 食道-咽喉部分泌物(oesophageal-pharyngeal fluids)

5 试剂和引物

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682 中相关规定，RNA提取相关试剂见附录A，实时荧光RT-PCR检测试剂见附录B。

6 仪器用具

高速冷冻离心机、电子天平、荧光PCR仪、-20℃低温冰箱和-80℃超低温冰箱、pH计、磁力搅拌器、恒温水浴锅、高压灭菌锅、超净工作台、可调移液器 (2.5μL, 10μL, 20μL, 100μL, 200μL, 1000μL) 和可调移液器枪头、离心管、研钵等。

7 样品采集处理与储存

7.1 样品的采集与处理

7.1.1 血清样品

按常规方法抽取2~3 mL血液置洁净干燥的试管中，静置约1小时待血液凝固后，取血清200 μL，置于1.5 mL灭菌离心管中。

7.1.2 病灶组织和肉制品

用无菌的手术刀采集病灶周围破溃组织（如舌、鼻、蹄水泡皮），也可采集淋巴结、脊髓、扁桃体、心脏肌肉、骨骼肌。每份组织分别从三个不同位置取样，称取样品约1g，用手术剪剪碎混匀后取0.1g于研磨器中研磨，加入1.5ml生理盐水继续研磨，待匀浆后转至1.5ml灭菌离心管中，12000 r/min离心2分钟，取上清200 μ l备用。

7.1.3 水泡液样品

典型临床发病动物水泡液用灭菌注射器吸出至灭菌离心管中，12000 r/min离心2分钟，取上清200 μ l备用。

7.1.4 O-P 液样品

采样时动物站立保定，将探杯随吞咽动作送入被检动物食道上部10 cm—15 cm处，轻轻来回移动2—3次，然后将探杯拉出。如采集的O-P液被胃内容物严重污染，用水冲洗被检动物口腔后重新采样。在10mL离心管中加3 mL—5 mL O-P液保存液，将采集到的O-P液倒入灭菌离心管中，12000 r/min离心2分钟，取上清200 μ l备用。

7.2 样品的储存

7.2.1 血清

样品采集后，储存应置于-20 $^{\circ}$ C冰箱。

7.2.2 病料组织和肉制品

样品采集后，储存应置于-70 $^{\circ}$ C冰箱。

7.2.3 水泡液和 O-P 液样品

样品采集后，储存应置于-20 $^{\circ}$ C冰箱。

8 RNA 的提取

- a) 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照，分别加入裂解液 600 μ L，充分颠倒混匀，室温静置 3~5 min；
- b) 瞬时离心，将液体吸入吸附柱中，12,000 rpm 离心 30 s；
- c) 弃去收集管中液体，加入 600 μ L 洗涤液，12,000 rpm 离心 30 s；
- d) 重复上述步骤 8.3；
- e) 弃去收集管中液体，12,000 rpm 离心 2 min，以除去残留的洗涤液；
- f) 将吸附柱移入新的 1.5 mL 无菌离心管中，向柱中央加入洗脱液 60 μ L。
- g) 室温静置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min，离心管中液体为模板 RNA。得到的核酸模板尽量在 2 小时内进行实时荧光扩增，若需长时间保存须放置-70 $^{\circ}$ C冰箱，但应避免反复冻融。

h) 若使用 RNA 试剂盒提取 RNA，则按试剂盒说明书进行操作。

9 试剂准备

i) 实验前 20 分钟从-20℃冰箱中取出试剂盒相应试剂，使试剂完全溶解。

j) 核算实验所需要的反应数 (n)，并按照以下公示计算当次实验所需要的各种试剂量。

$n = \text{阴性对照数 (1 反应)} + \text{阳性对照数 (1 反应)} + \text{误差预留量} + \text{样本数}$ 。每个反应的体系为：14 μl 的荧光 PCR 反应液，1 μl 的酶混合物。向设定的 n 个 PCR 管中各分装 15 μl 。

k) 盖紧 PCR 反应管盖后将 PCR 反应管转移至样本准备区，剩余试剂放回-20℃冰箱冷冻保存。

10 加样 (样本准备区)

l) 分别向上述 PCR 管中加入样本核酸提取所获得的样本各 5 μl ，阳性对照和阴性对照液各加 5 μl ，记录加样顺序。

m) 盖紧管盖，瞬时离心 30 秒。转移至扩增区。

11 荧光 RT-PCR 检测

n) 开机预热，检查仪器性能。

o) 将 PCR 反应管放在样品槽中相应位置，记录顺序。

p) 设置扩增参数，口蹄疫病毒(FMDV)-FAM 通道采集荧光信号；塞内卡病毒 (SVV) -HEX 通道采集荧光信号。实时荧光 PCR 反应程序为：45℃ 10min, 1 个循环；95℃ 10min, 1 个循环；95℃ 15s, 60℃ 45s, 40 个循环，在每次循环的退火时收集荧光。检测结束后，根据扩增曲线和 Ct 值判定结果。每个样品设置三个平行的反应体系，检测过程中应分别设立阴性对照、阳性对照。以含口蹄疫病毒、塞内卡病毒阳性质粒作为阳性对照，同时以双蒸水代替模板作为阴性对照。分别提取样品和对照品的 RNA 进行实时荧光 PCR 检测。

12 结果判定

12.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。合理调整阈值线，不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

12.2 对照结果的判定

阴性对照：检测结果线形应为直线或轻微斜线，无明显指数增长期和平台期，且Ct值>38或无Ct值。

阳性对照 Ct值 \leq 30，有明显指数增长，呈典型的S型曲线。

以上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。

12.3 检测结果的判定

阳性：若被检样本的PCR反应体系通道出现2条典型扩增曲线，且Ct值 ≤ 35 ，则判定样本中同时存在口蹄疫病毒和塞内卡病毒核酸。

可疑：若被检样本的PCR反应体系通道出现典型扩增曲线，且Ct值在35~38之间，此时应对样本进行重复检测。如重复实验结果Ct值仍在35~38之间，有明显指数增长，则判定为阳性，否则为阴性。

阴性：若被检样本的PCR反应体系通道无典型扩增曲线，且Ct值 > 38 或无Ct值，则判定样本口蹄疫病毒和塞内卡病毒阴性。

中国兽医协会
CVMA

附录 A

(规范性)

RNA提取试剂的配制

裂解液

异硫氰酸胍	236.40 g
氯化钠	11.70 g
三羟甲基氨基甲烷	9.46g
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 (EDTA) (pH=8.0)	40 mL
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

洗涤液

磷酸氢二钠	143.20g
磷酸二氢钾	62.40g
氯化钠	18.00g
灭菌双蒸水	加至 2000 mL
再加入 6000mL 无水乙醇，充分混匀。	

洗脱液

磷酸氢二钠	143.20g
磷酸二氢钾	62.40g
灭菌双蒸水	加至 2000 mL

附 录 B
(规范性)
实时荧光RT-PCR检测

B.1 10× PCR缓冲液的配制

Tris base	6.06 g
KCl	18.64 g
Triton X-100	5.00 mL

加无核酸酶灭菌蒸馏水至400 mL，用HCl调pH值至9.0（25℃），定容至500 mL。高压灭菌冷却后置于2~8℃保存备用。

B.2 引物序列

根据已报道的口蹄疫病毒、塞内卡病毒基因组序列设计 1 对用于特异性扩增的引物，具体引物信息与基因片段大小如下表所示。

表 B.1 口蹄疫病毒引物序列及目的片段长度

引物	引物序列 (5'→3')	预期片段大小 /bp
正向引物	5' -ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA-3'	87
反向引物	5' -GCGAGTCCTGCCACGGA-3'	
引物探针	5' -FAM-TCCTTTGCACGCCGTGGGAC-BHQ-3'	

表 B.2 塞内卡病毒引物序列及目的片段长度

引物	引物序列 (5'→3')	预期片段大小 /bp
正向引物	5' -AGAATTTGGAAGCCATGCTCT-3'	83
反向引物	5' -GAGCCAACATAGARACAGATTGC-3'	
引物探针	5' -HEX-TTCAAACCAGGAACACTACTCGAGA-BHQ-3'	