

ICS

备案号:

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

布鲁氏菌 A19 疫苗株鉴定荧光定量 PCR 检测方法

Real-Time PCR for Identification of Brucella A19 Vaccine strain

(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》的规定起草。

本文件不涉及专利。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、中国兽医药品监察所、中国食品药品检定研究院、临沂大学。

本文件主要起草人：董浩、原霖、王传彬、彭小微、范学政、刘洋、秦玉明、毕一鸣、冯宇、张兴林、牛建蕊。

布鲁氏菌 A19 疫苗株鉴定荧光定量 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了布鲁氏菌 A19 疫苗株鉴定荧光定量 PCR 检测方法。

本文件适用于动物血液样品、脾脏、肝脏、淋巴结、流产物、环境样品等样本中布鲁氏菌 A19 疫苗株的核酸进行鉴别诊断。

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/T20001.4-2015 标准编写规则 第4部分：试验方法标准

GB/T 18646 动物布鲁氏菌病诊断标准

NY/T1467 奶牛布鲁氏菌病PCR诊断技术

3 试剂与耗材

3.1 提取试剂

宜选取商品化的细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

3.2 荧光定量 PCR 扩增试剂

宜按照不同的荧光定量 PCR 平台的说明书选取推荐的荧光定量 PCR 扩增试剂。

3.3 引物探针

布鲁氏菌通检上游引物(Bu F): 5' - CGCTCGCGCGGTGGAT -3'

布鲁氏菌通检下游引物(Bru R): 5' - CTTGAAGCTTGCGGACAGTCACC -3'

布鲁氏菌通检探针 (Bru P): 5' -FAM- ACGACCAAGCTGCATGCTGTTGTCGATG -BHQ1-3'

A19 鉴定上游引物(A19 F): 5' -CGCGGGCTTCCTGATG-3'

A19 鉴定下游引物(A19 R): 5' -GGCCCAGACCGGGAAATA -3'

A19 鉴定探针 (A19 P): 5' -VIC-ACCTTGCAGGAATTCGGCATCATCC-BHQ1-3'

4 仪器与设备

生物安全柜、分析天平、水浴锅、高速离心机、荧光 PCR 仪、组织研磨器、-20℃冰箱、涡旋震荡仪。

5 操作步骤

5.1 样品的采集及运输

按照GB/T 18646和NY/T1467 执行。

5.2 样品的处理

按照GB/T 18646和NY/T1467 执行。

5.3 细菌基因组提取

按照所选取的细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行提取。

5.4 分型荧光定量 PCR 扩增方法

按照表 1 配制布鲁氏菌 A19 疫苗株鉴定荧光定量 PCR 扩增反应体系。

表 1
布鲁氏菌
A19 疫苗株
鉴定荧光定
量 PCR 扩
增反应体系

试剂	终浓度	体积
2×酶混合液 ^a	/	10 μL
Bru F (10 pmol/μL)	0.3 μmol/L	0.6 μL
Bru R (10 pmol/μL)	0.3 μmol/L	0.6 μL
Bru P (10 pmol/μL)	0.3 μmol/L	0.6 μL
A19 F (10 pmol/μL)	0.3 μmol/L	0.6 μL
A19 R (10 pmol/μL)	0.3 μmol/L	0.6 μL
A19 P (10 pmol/μL)	0.3 μmol/L	0.6 μL
DNA 模板	/	2 μL
无菌无核酸酶水	/	4.4 μL
总体积	/	20.0 μL
注：a 为荧光定量 PCR 扩增试剂。		

将表1中所有试剂加到荧光PCR反应管后，充分混匀，做好标记。布鲁氏菌A19疫苗株鉴定荧光定量PCR扩增所用荧光报告基团为FAM和VIC，淬灭基团为BHQ或None。在荧光定量PCR仪上按表2所示程序进行扩增反应。

表 2 布鲁氏菌 A19 疫苗株鉴定荧光定量 PCR 扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
----	----	------	-----

1	95 ℃	2 min	1
2	95 ℃	15 s	40
3	60 ℃	1 min	
注：在每个循环第二步（60 ℃ 35s）收集荧光信号。			

5.5 布鲁氏菌 A19 疫苗株鉴定荧光定量 PCR 扩增反应的对照

在进行布鲁氏菌A19疫苗株鉴定荧光定量PCR实验时，应设置阳性对照和阴性对照。以提取的布鲁氏菌A19疫苗株基因组DNA溶液和非A19疫苗株的布鲁氏菌基因组DNA溶液作为阳性对照；以细菌基因组提取试剂盒的洗脱液替代DNA模板作为阴性对照。各对照PCR扩增体系中，除模板外，其余组分和PCR扩增程序同5.4。

6 结果判定

6.1 阈值设定

阈值线设定于刚刚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。

6.2 结果判定

6.2.1 阳性对照：布鲁氏菌A19疫苗株基因组DNA溶液，FAM荧光信号Ct值 ≤ 38 并出现特定的扩增曲线，VIC荧光信号无Ct值并且无特定扩增曲线；非A19疫苗株的布鲁氏菌基因组DNA溶液，FAM荧光信号Ct值 ≤ 38 并出现特定的扩增曲线，VIC荧光信号Ct值 ≤ 38 并出现特定的扩增曲线；阴性对照FAM和VIC荧光信号均无Ct值并且无特定扩增曲线，实验结果成立，否则实验结果不成立。

6.2.2 被检样品FAM荧光信号Ct值 ≤ 38 并出现特定的扩增曲线，VIC荧光信号无Ct值并且无特定扩增曲线，判断为布鲁氏菌A19疫苗株核酸阳性。

6.2.3 被检样品FAM荧光信号Ct值 ≤ 38 并出现特定的扩增曲线，VIC荧光信号Ct值 ≤ 38 并出现特定的扩增曲线，判断为非A19疫苗株的布鲁氏菌核酸阳性，但不排除样品中A19疫苗株核酸阳性，应结合免疫背景综合判断。

6.2.4 被检样品中FAM或VIC荧光信号 $38 < \text{Ct值} \leq 40$ 并出现特定的扩增曲线，需重新取样提取基因组DNA，扩增后结果判定仍是可疑的，可判定为阳性。

6.2.5 被检样品VIC荧光信号Ct值 ≤ 38 并出现特定的扩增曲线，FAM荧光信号无Ct值并且无特定扩增曲线，判定为结果无效。

6.2.6 无扩增曲线，判断为阴性。

中国兽医协会
CVMA