

团 体 标 准

T/CVMA 286—2025

口蹄疫病毒与塞内卡病毒双重实时荧光 RT-PCR 检测方法

Detection method of duplex real-time fluorescence RT-PCR assay for foot
and mouth disease virus and seneca vally virus

2025 - 9 - 30 发布

2025 - 9 - 30 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

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。

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、江苏省动物疫病预防控制中心、岳阳市动物疫病预防控制中心、怀化市动物疫病预防控制中心、重庆市潼南区动物疫病预防控制中心、天津市动物疫病预防控制中心、上海市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：于宁卫、孙雨、李晓霞、李琦、胡冬梅、宋晓晖、孙航、阚威、李静、郑思思、林元清、张旭、王新杰、孙晓明、高姗姗、袁晓涛、徐鹏、闫新博、郑辉、王梦婕、魏若瑶、赵小平、何海洋、丁美月、戴玉娇、李文钢、石瑜、张玉杰、沈莉萍。

中国兽医协会
CVMA

口蹄疫病毒与塞内卡病毒双重实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了口蹄疫病毒与塞内卡病毒双重实时荧光RT-PCR检测方法的原理、试剂材料、仪器用具、样品采集处理和运输保存、样本提取、试剂制备、加样和结果判定等。

本文件适用于猪口蹄疫病毒和塞内卡病毒的特异性核酸检测。

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 RT-PCR: 实时荧光反转录聚合酶链式反应 (Real-time reverse transcription polymerase chain reaction)

BHQ: 无荧光淬灭基团 (Black hole quencher)

bp: 碱基对 (Base pair)

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

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)

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

O-P 液: 食道—咽喉部分泌物 (Oesophageal-Pharyngeal fluids)

RNA: 核糖核苷酸 (Ribonucleic acid)

SVV: 塞内卡病毒 (Seneca valley virus)

5 试剂材料

5.1 试剂

5.1.1 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。

5.1.2 青霉素 1000 IU/mL

5.1.3 链霉素 500 IU/mL

5.1.4 0.04 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4), 配方见附录 A.1。

5.1.5 三氯三氟乙烷或氯仿

5.1.6 RNA 提取相关试剂见附录 A.2 ~ A.5 或其他等效商品化核酸提取试剂。

5.1.7 实时荧光 RT-PCR 检测试剂为商品化试剂。

5.2 阳性对照

含有口蹄疫病毒靶基因片段 (参考序列见附录B.1)、塞内卡病毒靶基因片段 (参考序列见附录B.2) 其阳性对照按照附录B.3制备。

5.3 阴性对照

灭菌双蒸水, 按照附录B.4制备。

5.4 引物和探针序列

引物和探针序列见附录C。

6 仪器设备

高速冷冻离心机、电子天平、荧光PCR仪、-20℃低温冰箱、pH计、磁力搅拌器、恒温水浴锅、高压灭菌锅、生物安全柜、可调移液器 (2.5 μL, 10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1000 μL) 和各规格移液器枪头、离心管、研钵等。

7 样品的采集和运输保存

7.1 样品的采集和处理要求

样品采集和处理应符合NY/T 541的要求。

7.2 样本的采集

7.2.1 血清样品

采集动物血液, 每头应不少于5 mL。无菌分离血清, 装入2 mL离心管中, 加盖密封后备用。

7.2.2 组织样品

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2 g ~ 5 g装入样品保存管, 加盖封口, 密封备用。临床表现健康, 但需做病原学检测

的动物,可在屠宰时采集淋巴结、脊髓、扁桃体、心脏肌肉。对肉品进行病原学检测时,可采集骨骼肌。组织样品应不少于2 g,装入样品保存管中,密封备用。

7.2.3 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,加青霉素1000 IU/mL、链霉素500 IU/mL,加盖封口备用。

7.2.4 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,加盖封口备用。

7.3 样品保存和运输

待检样品在2℃~8℃保存不应超过24 h。样品采集后,置于加冰袋的保温箱中,密封,24 h内送至实验室进行检测。如不能立即检测,需将样品注明采样点名称、样品名称、编号及样品数量置于-20℃低温冰箱保存。 -20℃保存不超过三个月; -80℃以下可长期保存。

7.4 样品的处理

7.4.1 生物安全措施

样品处理的生物安全措施按照GB 19489进行。

7.4.2 组织样品的处理

将采集的动物机体组织,置组织匀浆器中充分研磨,加入青霉素1000 IU/mL、链霉素500 IU/mL, 0.04 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)制成1:5的组织悬液,4℃浸毒过夜。次日以3000×g离心10min,取上清液备用。

7.4.3 水泡液样品的处理

水泡液以3000×g离心10min,取上清液备用。

7.4.4 O-P 液样品的处理

将O-P液倒入灭菌塑料离心管内,再加入不少于样品1/3体积分量的三氯三氟乙烷或氯仿。用高速组织匀浆机以12000×g搅拌3 min,然后以3000×g离心10 min。此时液体分成两相,将上层水相分装入样品保存管中备用。

8 样本提取

8.1 若选用附录A中所列试剂提取RNA,则参照以下步骤进行操作:

- 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照,分别加入裂解液600 μL,充分颠倒混匀,室温静置3~5 min;
- 瞬时离心,将液体吸入吸附柱中,12000×g离心30 s;
- 弃去收集管中液体,加入600 μL洗涤液,12000×g离心30 s;
- 重复上一步骤;

e) 弃去收集管中液体, $12000\times g$ 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 μL ;

g) 室温静置2 min, $12000\times g$ 离心1 min, 离心管中液体为模板RNA。得到的核酸模板尽量在2h内进行实时荧光扩增, 若需长时间保存须放置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 但应避免反复冻融。

8.2 若使用 RNA 试剂盒提取 RNA, 则按试剂盒说明书进行操作。也可采用其他等效的 RNA 提取方法。

9 双重实时荧光 RT-PCR 反应

9.1 反应体系

口蹄疫病毒与塞内卡病毒双重实时荧光RT-PCR反应体系配置见附录D中D.1。

9.2 反应程序

口蹄疫病毒与塞内卡病毒双重实时荧光RT-PCR反应程序见附录D.2。

10 结果判定

10.1 质控标准

当所有阳性对照的FAM和HEX检测通道均有典型的S型扩增曲线且Ct值均应 ≤ 30 , 阴性对照的FAM和HEX检测通道均无扩增曲线且Ct >38 或者无值时, 试验成立; 否则试验无效。

10.2 结果判定

10.2.1 口蹄疫病毒阳性: 若被检样本仅 FAM 检测通道出现典型的 S 型扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 35 ; 而 HEX 检测通道 Ct 值 >38 或无 Ct 值, 且无典型的 S 型扩增曲线, 表示样品中含有口蹄疫病毒核酸。

10.2.2 塞内卡病毒阳性: 若被检样本仅 HEX 检测通道出现典型的 S 型扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 35 ; 而 FAM 检测通道 Ct 值 >38 或无 Ct 值, 且无典型的 S 型扩增曲线, 表示样品中含有塞内卡病毒核酸。

10.2.3 口蹄疫病毒和塞内卡病毒阳性: 若被检样本 FAM 检测通道与 HEX 检测通道均出现典型的 S 型扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 35 , 表示样品中同时含有口蹄疫病毒核酸和塞内卡病毒核酸。

10.2.4 可疑: 若被检样本的 RT-PCR 反应体系 FAM 和/或 HEX 检测通道出现典型 S 型扩增曲线, 且 $35 < \text{Ct 值} \leq 38$, 此时应对样本进行重复检测。如重复实验结果仍为 $35 < \text{Ct 值} \leq 38$, 且出现典型 S 型扩增曲线, 则判定样本口蹄疫病毒核酸和/或塞内卡病毒核酸为阳性, 否则为阴性。

10.2.5 阴性: 若被检样本的 RT-PCR 反应体系 FAM 和 HEX 检测通道均无典型 S 型扩增曲线, 且 Ct 值 >38 或无 Ct 值, 则判定样本口蹄疫病毒核酸和塞内卡病毒核酸为阴性。

荧光RT-PCR检测结果参照图见图D.3, 上述结果描述及判定可参见附录D.4。

附录 A

(资料性)

样品保存试剂和 RNA 提取试剂的配制

A.1 磷酸盐缓冲液 (0.04 mol/L, pH 7.4)

称取34.00 g氯化钠、6.20 g磷酸氢二钠、0.81 g磷酸二氢钠溶于800 mL双蒸水中搅拌至完全溶解，用氢氧化钠调节溶液至7.4，加双蒸水定容至1 L。采用 $(121 \pm 2)^\circ\text{C}/0.1\text{ MPa}$ ，15 min高压灭菌后贮存于4℃。

A.2 乙二铵四乙酸二钠溶液 (0.5 mol/L, pH 8.0)

称取18.61 g乙二铵四乙酸二钠溶于80 mL双蒸水中搅拌至完全溶解，用氢氧化钠调节溶液pH至8.0，最后加双蒸水定容至100 mL。

A.3 裂解液

称取118.2 g异硫氰酸胍、5.85 g氯化钠、4.73 g三羟甲基氨基甲烷溶于800 mL双蒸水中搅拌至完全溶解，再加入20 mL pH 8.0浓度0.5 mol/L 的乙二铵四乙酸二钠溶液，最后加双蒸水定容至1 L。

A.4 洗涤液

称取17.9 g磷酸氢二钠、7.8 g磷酸二氢钾、2.25 g氯化钠于200 mL双蒸水中搅拌至完全溶解，加双蒸水定容至250 mL，再加入750 mL无水乙醇，充分混匀。

A.5 洗脱液

称取71.6 g磷酸氢二钠、31.2 g磷酸二氢钾于800 mL双蒸水中搅拌至完全溶解，最后加双蒸水定容至1 L。

附录 B

(资料性)

阳性对照和阴性对照的制备

B.1 口蹄疫病毒靶基因片段参考序列 (GenBank Accession No.OQ356338.1)

5' -ACTTTCCTCAAAAGGCACTTCCACATGGATTACGGAACTGGGTTTTACAAACCTGTGAT
GGCTTCGAAGACCTCGAGGCTATCCTCTCCTTTGCACGCCGTGGGACCATACAGGAGAAGTT
GATCTCCGTGGCAGGACTCGCAGTCCACTCTGGACCTGATGAGTACCGGCGTCTCTTTGATCCC
 TTTCAGGGTCTCTTTGAGATTCCAAGCTACAGATCACTTTACCTGCGTTGGGTGAACGCCGTGTGC
 GGCGACGCATGATCCCTCAGATGTCACAATTGGCAGAAAGACTCTGAGGCGAGCGACGCCGTAG
 GAGTGAAAGGACCGAAAGGGCCTTTCCCGCTTCCTATTTCAAAAAAAAAAAAAAC-3'

注：下划线部分为连入pMD-19T载体中的包含口蹄疫病毒目标检测片段部分，粗体为引物和探针序列。

B.2 塞内卡病毒靶基因片段参考序列 (GenBank Accession No.MN887248.1)

5' -AACAAGGGTTCTATCTTCCCTCCGACTTCCTCTCTCTCCGATGCTGTTTTTTTAAAACGC
 AGATTCGTCCAAAACAATGACGGCTTATATAAACCAGTTATGGATTAAAGAATTTGGAAGCCA
TGCTCTCCTACTTCAAACCAGGAACACTACTCGAGAAGCTGCAATCTGTTTCTATGTTGGCT
CAACACTCTGGAAGAAGAATATGATAGATTGATGCACCCCTTCGCTGACTACGGTGCCGTACC
 GAGTCACGAGTACCTGCAGGCAAGATGGAGGGCCTTGTTTCGACTGACCTGGATAGCCCAACGCG
 CTTTCGGTGCTGCCGCGATTCTGGGAGAACTCAGTCGGAACAGAAAAGGGAAA-3'

注：下划线部分为连入pMD-19T载体中的包含塞内卡病毒目标检测片段部分，粗体为引物和探针序列。

B.3 阳性对照的制备

以口蹄疫病毒和塞内卡病毒基因组 RNA 为模板，利用设计的 2 对特异性引物分别进行 RT-PCR 扩增，PCR 扩增产物经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳检测后，用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物，连接至 pMD19-T 载体构建重组质粒 pMD-FMDV、pMD-SVV，经菌液 PCR 鉴定、测序加以验证。利用紫外分光光度计检测 2 种阳性质粒浓度，并按下面公式将浓度换算成拷贝数，DNA 拷贝数/ μL = $[6.02 \times 10^{23} \times \text{DNA 浓度} (\text{ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-9}] / (\text{DNA 碱基数} \times 660)$ ，经计算并将重组质粒标准品的拷贝数调为 1.0×10^8 拷贝/ μL 。即得到口蹄疫病毒和塞内卡病毒阳性对照所需的重组质粒标准品母液。将母液 10 倍系列稀释之后，可作为口蹄疫病毒与塞内卡病毒双重实时荧光 RT-PCR 检测方法的阳性对照使用。

用 500 μL TE Buffer (pH 8.0) 对 pMD-FMDV、pMD-SVV 质粒进行溶解和 10 倍梯度稀释，按本标准建立的方法测定 FAM 通道和 HEX 通道 Ct 值。选择 FAM 通道和 HEX 通道 Ct 值在 23 ~ 28 之间的稀释倍数作为阳性对照。

B.4 阴性对照的制备

灭菌双蒸水：将双蒸水高压灭菌后作为阴性对照。

附 录 C
(规范性)
引物和探针序列

口蹄疫病毒、塞内卡病毒的引物、探针的名称与序列见表C.1。

表C.1 引物和探针序列

病原	引物和探针	序列 (5' → 3')	预期片段大小/bp
口蹄疫病毒	正向引物FMDV -F	ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA	107
	反向引物FMDV -R	GCGAGTCCTGCCACGGA	
	探针FMDV -P	FAM -TCCTTTGCACGCCGTGGGAC -BHQ	
塞内卡病毒	正向引物SVV -F	AGAATTTGGAAGCCATGCTCT	78
	反向引物SVV -R	GAGCCAACATAGARACAGATTGC	
	探针SVV -P	HEX -TTCAAACCAGGAACACTACTCGAGA -BHQ	

附 录 D

(资料性)

双重实时荧光 RT-PCR 反应

D.1 双重实时荧光RT-PCR反应体系

双重实时荧光 RT-PCR 反应体系见表 D.1。

表D.1 双重实时荧光RT-PCR反应体系 (20 μ L)

组分	体积 (μ L)	终浓度 (μ M)
2×One —Step Probe qPCR Mix	10.00	1×
20×One —Step Enzyme Mix	1.00	1×
引物 FMDV —F	0.70	0.35
引物 FMDV —R	0.70	0.35
引物 SVV —F	0.80	0.40
引物 SVV —R	0.80	0.40
探针 FMDV —P (FAM 标记)	0.50	0.25
探针 SVV —P (HEX 标记)	1.00	0.50
模板	5	
无核酸酶水补齐至总体积	20	

注：1.此反应体积以2×One —Step Probe qPCR Mix和20×One —Step Enzyme Mix为例，如果使用其他等效试剂，请遵照试剂说明书配制。2.将混合液充分混合后，最后加入模板，短暂离心，按照下列反应程序进行荧光RT-PCR反应。

D.2 双重实时荧光RT-PCR反应程序

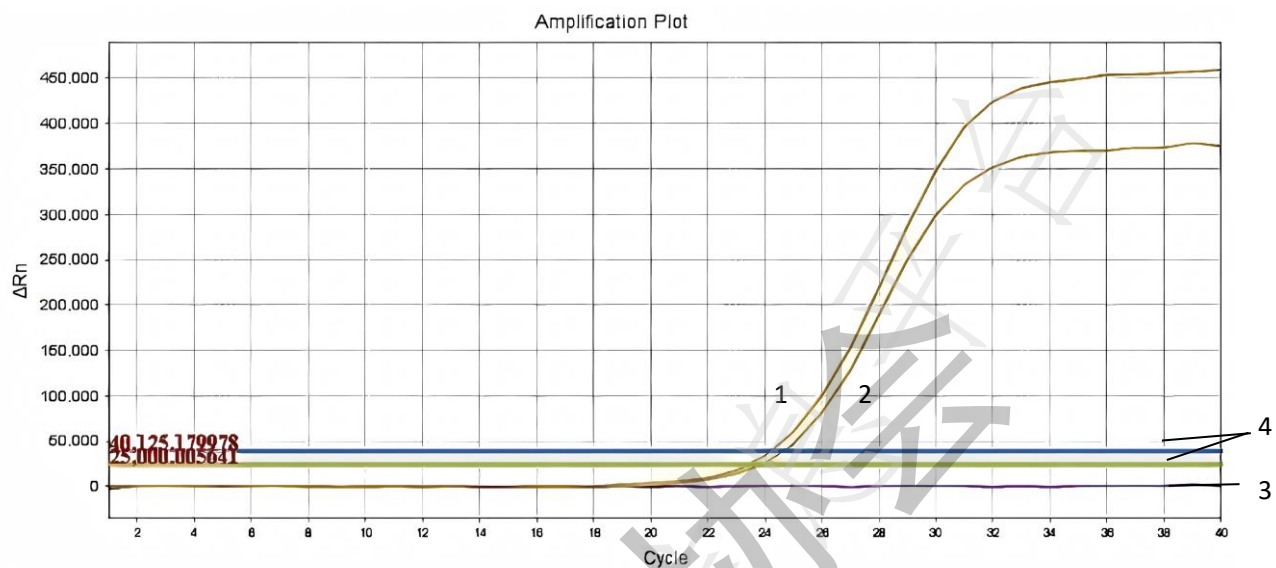
双重实时荧光 RT-PCR 反应程序见表 D.2。

表D.2 双重实时荧光RT-PCR反应程序

温度	反应时间	循环数
45 $^{\circ}$ C	10 min	1
95 $^{\circ}$ C	10 min	1
95 $^{\circ}$ C	15 sec	40
60 $^{\circ}$ C	45 sec	

D.3 双重实时荧光RT-PCR检测结果参照图

双重实时荧光 RT-PCR 检测结果参照图见图 D.3。



标引序号说明：
1——FMDV 阳性对照；
2——SVV 阳性对照；
3——阴性对照和空白对照；
4——阈值线；
 ΔRn ——相对荧光强度；
Cycle——循环数。

图D.3 双重实时荧光RT-PCR检测结果参照图

D.4 结果判定

双重实时荧光 RT-PCR 反应结果描述与判定见表 D.4。

表D.4 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	阴性	含有口蹄疫病毒核酸
阴性	阳性	含有塞内卡病毒核酸
阳性	阳性	含有口蹄疫病毒和塞内卡病毒核酸
阴性	阴性	无口蹄疫病毒和塞内卡病毒核酸