

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

猫呼吸道症候群病原分子快速诊断 重组酶介导链替换核酸扩增法

Rapid diagnosis of feline respiratory syndrome pathogenic molecules using
recombinase-mediated strand replacement nucleic acid amplification method

征求意见稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

目 次

目 次.....I

前 言..... II

1 范围.....1

2 规范性引用文件1

3 术语和定义1

4 符号和缩略语2

5 方法提要.....3

6 引物与探针序列3

7 试剂与材料3

8 仪器设备.....4

9 检测步骤.....4

10 质量控制5

11 结果判断与表述5

12 结果表述6

13 生物安全及检测过程中防止交叉污染的措施.....6

附 录 A.....7

附 录 B.....8

附 录 C.....9

附 录 D..... 10

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。

本文件由浙江农林大学动物科技学院动物医学院提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

猫呼吸道症候群病原分子快速诊断重组酶 介导链替换核酸扩增法

1 范围

本文件规定猫呼吸道症候群重组酶介导链替换核酸扩增法(RAA法)分子快速诊断技术规范要求。

本文件适用于猫呼吸道症候群（猫杯状病毒、猫疱疹病毒、猫支原体、猫衣原体、猫波氏杆菌）兽医临床快速定性诊断。

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/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

GB/T 27401 实验室质量控制规范动物检疫

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

猫杯状病毒：feline calicivirus, FCV

猫杯状病毒属于杯状病毒科(Caliciviridae)水疱疹病毒属病毒(Vesivirus)病毒。病毒粒子呈球形,无囊膜,为线性单股正链RNA病毒,可感染家猫及其他猫科动物。

3.2

猫疱疹病毒：feline herpesvirus, FHV

猫疱疹病毒属疱疹病毒科，甲型疱疹病毒亚科病毒，外有囊膜，双股的DNA，于细胞核内进行增殖，并形成核内包涵体，可感染家猫及其他猫科动物。

3.3

猫支原体：feline mycoplasma, Myc

猫支原体是一种革兰氏阴性的杆状球菌，主要借由宿主吞噬细胞吞噬作用或借细胞之胞饮作用将基体摄入细胞内，主要引起猫支原体肺炎、上呼吸道感染和慢性支气管炎等。

3.4

猫衣原体: *chlamydophila*, C

猫衣原体, 是一种细胞内革兰氏阴性菌, 主要引起猫科动物眼部感染及上呼吸道感染, 慢性结膜炎等。

3.5

猫波氏杆菌: *bordetella bronchiseptica*, Bb

猫波氏杆菌是一种需氧革兰氏阴性菌, 主要影响猫的呼吸道系统, 出现流鼻涕、打喷嚏咳嗽呼吸急促等症状, 常与其他细菌病毒混合感染引发各种疾病。

3.6

实时荧光 RAA: Real-time-RAA

一种重组酶介导链替换的恒温核酸快速扩增技术(简称RAA技术)。利用从细菌或真菌中获得的重组酶, 在恒温下(一般为37°C~42°C), 该重组酶可与引物紧密结合, 形成酶和引物的聚合体, 在单链DNA结合蛋白SSB的帮助下, 打开模板DNA的双链结构, 当引物在模板DNA上搜索到与之完全匹配的互补序列时, 在DNA聚合酶的作用下, 边转录边形成新的DNA互补链, 扩增产物以指数级增长。利用荧光探针的标记, 随着RAA反应的进行, RAA产物与荧光信号的增长呈现对应关系。

3.7

实时逆转录荧光 RT-RAA: RT-real-time-RAA

一种重组酶介导链替换的恒温核酸快速扩增技术(简称RT-RAA技术)。利用从细菌或真菌中获得的重组酶, 在恒温下(一般为37°C~42°C), 该重组酶可与引物紧密结合, 形成酶和引物的聚合体, 在单链DNA结合蛋白SSB的帮助下, 打开模板DNA的双链结构, 当引物在模板DNA上搜索到与之完全匹配的互补序列时, 在逆转录酶和DNA聚合酶的作用下, 边转录边形成新的DNA互补链, 扩增产物以指数级增长。利用荧光探针的标记, 随着RAA反应的进行, RAA产物与荧光信号的增长呈现对应关系。

3.8

CT 值: cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。

3.9

T 值: cycle threshold

每个反应管内荧光信号达到设定阈值时所需要的时间。

4 符号和缩略语

下列符号适用于本文件。

c——核酸浓度, 单位为微克每微升($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

A——260nm处的吸光值

N——核酸稀释倍数

下列缩略语适用于本文件。

BS-RecA: 枯草芽孢杆菌重组酶 (Bacillus subtilis recombinase)

Bsu: 枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis)

CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyl triethyl ammonium bromide)

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)

dNTPs: 脱氧核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid)

RT-RAA: 反转录重组酶介导扩增 (Reverse transcription-recombinase-aid amplification)

SC-RecA: 天蓝色链霉菌重组酶 (Streptomyces coelicolor recombinase)

SSB: 单链DNA结合蛋白 (single stranded DNA binding protein)

Tricine: N-三羟甲基甲基氨基酸 (N-tris [Hydroxymethyl] methylglycine)

Tris: 三羟甲基氨基甲烷((Hydroxymethyl) aminomethane)

5 方法提要

参照NY/T 541—2016中6.12眼部组织和分泌物样品、6.19呼吸道样品采集规定，以样本核酸提取后的DNA/RNA为模板，分别采用猫杯状病毒、猫疱疹病毒、猫支原体、猫衣原体、猫波氏杆菌特异性引物和探针进行实时荧光RAA/RT-RAA扩增，根据实时荧光的增幅情况，实现对猫呼吸道症候群病原的临床快速诊断鉴定。

6 引物与探针序列

猫杯状病毒实时RT-RAA荧光检测所用的引物探针参见附录 A.1。

猫疱疹病毒实时RAA荧光检测所用的引物探针参见附录 A.2。

猫支原体实时RAA荧光检测所用的引物探针参见附录 A.3。

猫衣原体实时RAA荧光检测所用的引物探针参见附录 B.1。

猫波氏杆菌实时RAA荧光检测所用的引物探针参见附录B.2。

7 试剂与材料

7.1 CTAB 提取缓冲液(pH8.0): 10 g/L CTAB, 0.7 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris-HCl, 0.01 mol/L Na₂EDTA。

7.2 酚: 氯仿: 异戊醇=25: 24: 1。

7.3 异丙醇。

7.4 70% 乙醇(体积比)。

7.5 TE 缓冲液(pH8.0): 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 1 mmol/L EDTA(pH8.0)。

7.6 启动剂: 15%聚乙二醇, 280mM 乙酸镁。

7.7 RT-RAA 扩增体系：2.5 mmol/L dNTPs, 225 ng/μL SSB, 300 ng/μL RecA 重组酶蛋白 (SC-RecA/BS-RecA), 75 ng/uL Bsu DNA 聚合酶, 75 ng/uL Exo 核酸外切酶, 150 ng/uL MMLV 逆转录酶, 250 mmol/L Tricine, 12.5 mmol/L 二硫苏糖醇, 250 ng/μL 肌酸激酶。也可以使用等效的商品化的试剂盒代替。

8 仪器设备

8.1 实时荧光 PCR 仪。

8.2 恒温荧光检测仪。

8.3 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

8.4 恒温水浴锅。

8.5 离心机：转速大于等于 12000 r/min。

8.6 微量移液器：量程 0.5 μL~10 μL, 10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 200 μL~1000 μL。

8.7 涡旋振荡器。

8.8 纯水仪，实验用水符合 GB/T 6682 中一级水要求。

8.9 离心管：2mL、1.5mL。

9 检测步骤

9.1 核酸提取

取临床采样的棉拭子样本至一活净的1.5 mL 离心管中,加入600 μL CTAB提取缓冲液(pH8.0), 涡旋振荡混匀后于70℃孵育15 min, 期间颠倒离心管2-3次; 12000 r/min 离心5min, 取上清液于一新的干净 1.5mL离心管中, 加入500 μL酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1), 上下颠倒离心管2~3次后涡旋振荡混匀, 12000 r/min离心5 min; 转移上层水相至一新的1.5 mL 离心管中, 加入0.7倍体积异丙醇, 上下颠倒离心管2~3次, 4℃静置30 min, 4℃下12000 r/min离心3 min, 小心弃去上清液; 加入700 μL 70%乙醇, 重悬沉淀, 12000 r/min 离心1 min, 小心弃去上清液; 打开管盖, 室温挥发干液体, 加入50 μL~100 μLTE缓冲液(pH8.0) 溶解核酸, 核酸提取也可采用等效提取试剂或市售商品化核酸提取试剂盒, 按说明书进行核酸提取即用或-80℃冻存备用。

9.2 核酸浓度和纯度的测定

使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测260 nm和280nm 处的吸光值A₂₆₀和A₂₈₀。核酸的浓度按照式(1)计算:

$$c=A \times N \times 50 / 100 \dots\dots\dots (1)$$

当A₁/A₂比值在1.7~1.9之间时, 适宜于RAA/RT-RAA扩增。

9.3 实时逆转录荧光 RT-RAA 扩增

9.3.1 RT-RAA 扩增反应总体系

猫杯状病毒实时逆转录荧光扩增反应总体系见附录C.1

9.4 实时荧光 RAA 扩增

9.4.1 RAA 扩增反应总体系

猫疱疹病毒/猫支原体/猫衣原体/猫波氏杆菌实时逆转录荧光扩增反应总体系见附录C.2

9.5 实时荧光 RAA/RT-RAA 扩增反应程序

9.5.1 实时荧光 PCR 仪反应程序

42 °C, 60 s, 1个循环; 42 °C, 30 s, 40个循环, 在每次循环时收集荧光。

9.5.2 恒温荧光检测仪反应程序

42 °C, 60 s; 42 °C, 20 min, 在第二阶段收集荧光。

9.6 实验对照

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照、空白对照。采用含有目的片段的靶基因质粒（附录D）作为阳性对照样品，采用不含目的基因片段的模板作为阴性对照样品，以与模板等体积的双蒸水作为空白对照样品。

10 质量控制

10.1 实时荧光 PCR 仪器

10.1.1 空白对照

无荧光对数增长，相应的无报告 Ct 值。

10.1.2 阴性对照

无荧光对数增长，相应的无报告 Ct 值。

10.1.3 阳性对照

有荧光对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的 Ct 值小于等于 30.0。

10.2 恒温荧光检测仪

10.2.1 空白对照

无荧光对数增长，相应的无报告 T 值(时间)。

10.2.2 阴性对照

无荧光对数增长，相应的无报告 T 值(时间)。

10.2.3 阳性对照

有荧光对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的 T 值(时间)小于等于 15 min。

11 结果判断与表述

11.1 实时荧光 PCR 仪器结果判定

11.1.1 在符合条款 8.1 的情况下，结果才能判定有效。

11.1.2 如 Ct 值小于等于 35.0，则判定被检样品阳性

11.1.3 如大于 35.0 小于 40.0，则重复一次。如再次检测结果仍然是大于 35.0 小于 40.0,则判定被检样品阳性。

11.1.4 如无报告 Ct 值或无荧光对数增长则判定被检样品阴性。

11.2 恒温荧光检测仪结果判定

11.2.1 在符合条款 8.2 的情况下，结果才能判定有效。

11.2.2 如 T 值(时间)小于等于 15 min，则判定被检样品阳性。

11.2.3 如 T 值(时间)大于 15 min 小于 20 min，则重复一次。如再次检测结果仍然是大于 15 min 小于 20 min，则判定被检样品阳性。

11.2.4 如无报告 T 值(时间)或无荧光对数增长则判定被检样品阴性。

12 结果表述

12.1 样本阳性

表述为“检出阳性片段”。

12.2 样本阴性

表述为“未检出阳性片段”。

13 生物安全及检测过程中防止交叉污染的措施

RAA扩增灵敏度高使得其容易污染导致假阳性，因此应高度重视扩增产物的污染问题，反应过程中和反应完成后应避免开盖。加样过程应在生物安全柜中进行，加样顺序为阴性对照、样本、阳性对照，切勿打乱顺序，废弃物处理应符合GB 19489中的规定。

检测过程中防止交叉污染的措施按照GB/T27401规定执行。

附录 A

A.1 猫杯状病毒 RT-RAA引物序列

名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
猫杯状病毒	F: TTTGGAGCATTACAACAGCCAGTTTAATGG	139bp	ORF 1
	R:AATATTTAAGCACGTTAGCGCAGGTTGAG		
	P:ATTCGAGTGGCATGACCGCCCTACACTGTGA[FAM-dT][THF][BHQ1 -dT]GTTCGAAGTTTGAG-C3		
注：目的基因序列参见附录D.1。F为上游引物，R为下游引物，P为探针，FAM-dT,THF,BQH-dT和C3spacer均为探针修饰基团。			

A.2 猫疱疹病毒RAA引物序列

名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
猫疱疹病毒	F: AATGCTATACTGGCGTAGTCTCTTTGAAA	247bp	TK
	R: GGCGAGAGGGTGTCTATCTATGATTAGGG		
	P:GTCTCTTTGAAACTGATGTTGTCGGTGG[FAM-dT][THF][BHQ1-dT]CTATGCCGTCCAGGA-C3		
注：目的基因序列参见附录D.2。F为上游引物，R为下游引物，P为探针，FAM-dT,THF,BHQ1-dT和C3spacer均为探针修饰基团。			

A.3 猫支原体RAA引物序列

名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
猫支原体	F: AGAAGCACTTGCAGGAGATAACGCTGGATT	114bp	EF-Tu
	R: AATTCTGTGTGAGGGATAATTGAACCTG		
	P:TGGATTATTACTTCGTGGAGTAAACCGTGAAGA[FAM-dT][THF][BHQ1-dT]TGAACGTGGACAAG-C3		
注：目的基因序列参见附录D.3。F为上游引物，R为下游引物，P为探针，FAM-dT,THF,BHQ1-dT和C3spacer均为探针修饰基团。			

附录 B

B.1 猫衣原体RAA引物序列

名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
猫衣原体	F: TAGAAATCAATAAAACAGACGGAGGCACA	142bp	pmp9
	R: ACTAAAGATCCTGCGGATAGGGTAATAGG		
	P: AAACAGACGGAGGCACAAGCTATACGGG[FAM-dT][T HF][BHQ1-dT]GATCATCTTTTCAG-C3		
注：目的基因序列参见附录D.4。F为上游引物，R为下游引物，P为探针，FAM-dT,THE,BHQ1-dT和C3spacer均为探针修饰基团。			

B.2 猫波氏杆菌RAA引物序列

名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
猫波氏杆菌	F: TAAGTCGGTCGCAAACCTGCCGTAATCC	203bp	flaA
	R: CGATTGGGACTTGTTTCAGGTTGTTCTGG		
	P: GCTGCCCCGTTTGAAGAAGCCTTTCTC[FAM-dT]C[TH F][BHQ1-dT]GGGAGCCTCAACATGG-C3		
注：目的基因序列参见附录D.5。F为上游引物，R为下游引物，P为探针，FAM-dT,THF,BHQ1-dT和C3spacer均为探针修饰基团。			

附录 C

C.1 猫杯状病毒实时逆转录荧光RT-RAA反应总体系

试剂	体积/ μL
实时荧光RT-RAA扩增体系（冻干粉）	20
启动剂	14
正向引物($10\mu\text{mol/L}$)	1.0
反向引物($10\mu\text{mol/L}$)	1.0
探针($10\mu\text{mol/L}$)	0.3
模板	8.7
反应总体系	25

C.2 猫疱疹病毒/猫支原体/猫衣原体/猫波氏杆菌实时荧光RAA反应总体系

试剂	体积/ μL
实时荧光RAA扩增体系（冻干粉）	20
启动剂	14
正向引物($10\mu\text{mol/L}$)	1.0
反向引物($10\mu\text{mol/L}$)	1.0
探针($10\mu\text{mol/L}$)	0.3
模板	2.0
反应总体系	25

附录 D

D.1 猫杯状病毒靶基因序列

ttgaaaaactccgccaagacaatcgaccaacctcacgtggacaacagctctggaatgcgtgtttgtacgcaagccagcatgggtgtgagttttacaataaagtg
ttgaagtggcagaaaagagctgttgagtagcaggggtctccacatcgaaaccccaattactactcagctttggagcattacaacagccagtttaattggtgtggagg
cgcggtccgatcagatcaatttgatgatgcaaccgcccttctactgtgatgtgttcgaagtttgagcatgtgtcaacctgcgctaactgtctaaatattatgggtg
ggatc

D.2 猫疱疹病毒靶基因序列

Actgtccgcattacatagatgggtgcctatggaataggaaggttaacggcggaagtacctggtcagagcggatgaaaatcgaccgggatatacttacttcc
cagaaccaatgtctactggcgtagtctctttgaaactgatgtgtcgggtggtatctatgccgtccaggaccggaacgacgtgggaattatcagctgaagatgct
gcctatatcaccgccactatcaagcaagatttgccgcaccatacctcttttaccatccagactatccacaataacaggatatcagaaagttgtatgtgaggaacac
cccgcgtgaccctaatacatagatagacacctctcgctctctggtctgtttccactcgcaagatattttggtgggtgatagctcttgggtctgtacttagtcta
ggcaacacttccagagaacctcctgggtggaatctagtgtgaacaacctgaatacaggaacattgaagcgtctcaggggacgtcagaagacc

D.3 猫支原体靶基因序列

Cgttgaccatggtaaaactacattaacagctgctatagctacagtttagctaaaaaggttatctgaagctcgtgattatgcttctattgataatgtccagaagaaa
gagcacgtgttattacaattaatacatcacacattgaatatcaaactgaaaacgtcactatgctcacgttgactgtcctggtcacgtgactatgttaaaacatgat
tacaggggcagctcaaatggatgggtctatcttagttgttgcgaacagatggaccaatgcctcaaacacgtgaacacattctttatctagacaagttggtgttct
cgtatcgtgttttctaaacaaatgtgatattgaagggtgaagaagagatgattgaactgttgaattagaagttcgttcacttcttcagaatacggatttgatgga
gataatgctcaattattcgtggatctgctaaattagctcttgatgggttctcaatgagaagaaaaagttatggaattaatggatgcagttgatacatattgaaac
tccagaaaaagattttgaaaaaccattcttaattggctgttgaagacgttttcacaattacaggacgtggaactgttgctac

D.4 猫衣原体标准靶基因序列

tttatgatcctgtgtgttgaaggtagctgcagagaatctagaaatcaataaacagacggaggcacaagctatacgggttcgatcatctttcaggaaggtatg
tccctagtactcaagaaataatgaagcatgtttctaaatttcccaacctattacctatccgcaggatcttttagtttagaaaaaggagcccatctagaggctaaatc
ctaacacaaacggctggatctaaagtattcttagatcaaacatccagtatagaacaaaaagaaacctagatattaaagagctttgggttacgtcttgaggatttcacc
aacctacagccacaaaaatttctacagccggcaatgcccatagttacggtacaaggacctttgggaatctttgctgatcatgaaaccttctatgccaatcaatct
cttgctcacaatgtatagatcaagaattgctaaaactggtagataaagacatcacaaaaatcacgctcgttgatgttctgaa

D.5 猫波氏杆菌标准靶基因序列

ccctttccgccagattccccgcacatttccgaacttactttttgcttaagtccgtcgcaaacctgccgtaatccaggcaacaaaggaaatcgcggtgtg
caagcgaaagtcgatgttacagatgggcggcctagctgccgggttgaagaagcctttctcttgggagcctcaacatggctgcagtcataatcaactact
tgtcgtggttggccagaacaacctgaacaagtcaccaatcggccctgggtag