

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

猪病原微生物检测——高通量靶向测序法

Detection of swine pathogens——Targeted high-throughput sequencing

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

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。

本文件由中国农业大学提出。

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：

引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到条目 6.1 和条目 6.2 相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：中国农业大学

地址：北京市海淀区马连洼街道圆明园西路 2 号

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

猪病原微生物检测——高通量靶向测序法

1 范围

本文件规定了高通量靶向测序技术在猪病原微生物鉴定的应用推荐与相关要求，包括靶向测序的适应证、不同猪病原微生物联合鉴定组合推荐、靶向测序技术介绍、测序结果报告解读要求、病原检出与诊断规范等。

本文件适用于猪病原微生物的高通量靶向检测。

本文件适用于规范高通量靶向测序在猪病原微生物检测中的应用，指导有关高通量靶向测序在兽医临床中的研发、定价和推广。

本文件适用于兽医临床领域中涉及高通量靶向测序项目研发和应用的猪养殖场和猪屠宰场、高等院校兽医实验室、第三方检测机构、技术研发企业等。

本文件不适用于单分子测序技术。

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 16548 病害动物和病害动物产品生物安全处理规程

GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程

GB/T 35537-2017 高通量基因测序结果评价要求

GB/T 35890-2018 高通量测序数据序列格式规范

GB/T 40171-2021 磁珠法 DNA 提取纯化试剂盒检测通则

GB/T 40664-2021 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求

YY/T 1723-2020 高通量基因测序仪

NY/T 541-2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

中华人民共和国国务院令 第424号 病原微生物实验室生物安全管理条例

中华人民共和国农业部公告第302号 兽医实验室生物安全技术管理规范

中华人民共和国农业部公告第503号 高致病性动物病原微生物菌（毒）种或者样本运输包装规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

高通量靶向测序 Targeted High-throughput Sequencing

高通量靶向测序英文是 Targeted High-throughput Sequencing。基本工作流程包括样品采集、核酸提取，而后通过 PCR 扩增手段富集样品核酸中的靶向序列，通过对富集靶标区域进行测序最终实现多

种靶标基因共检，而后经生信分析从而完成检测。

3.2

序列 Sequencing

高通量靶向测序需要进行测序文库构建，包括样品前处理、核酸提取、接头连接及靶向片段文库扩增等，最终构建的文库在高通量测序平台上进行测序，得到数据的碱基序列称为序列。

[注：改写 GB/T 35890-2018 高通量测序数据序列格式规范定义 3.6]

3.2.1

序列的读长 Read length of sequencing

指测序反应所能测得序列的长度，是影响分析准确度的重要因素。最大读长取决于所选的测序平台以及靶向扩增区域的长度。通常在检测报告中显示的序列数为某基因的特异序列条数。

[注：改写 GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程定义 3.24]

3.3

测序深度 Sequencing depth

指在一次高通量靶向测序试验中对特定靶向基因组区域的测序覆盖度。通常以×倍为单位来表示，如 100×表示该基因组的特定靶向区域的碱基被测序 100 次。

[注：改写 GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程定义 3.31]

3.3.1

平均测序深度 Mean depth

指针对特定靶向检测区域测序所得的碱基总数除以该区域的长度。

[注：改写 GB/T 30989-2014 高通量基因测序技术规程定义 3.32]

3.3.2

有效平均测序深度 Mapped depth

指去重后的平均测序深度。

3.4

相对丰度 Relative abundance 和绝对丰度 Absolute abundance

相对丰度是指比对到的某病原基因的序列数占该病原所有基因总序列数的百分比。绝对丰度是指比对到的某病原基因的序列数占总数据量的百分比。

3.5

序列比对 Sequencing mapping

将两条或者两条以上的测序序列进行匹配，确定最优相似性的过程称为比对，是靶向测序分析中微生物或基因鉴定的基础。

3.6

外参核酸 Spike-in nucleic acid 和内参基因 Internal control gene

外参核酸是指外源加入的质控核酸标准品。内参基因是指靶动物的管家基因，能够在细胞内组成稳定性表达。

4 符号和缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PCR: 聚合酶链式反应, Polymerase Chain Reaction

cDNA: 互补脱氧核糖核酸, Complementary Deoxyribonucleic Acid

QC: 质量控制, Quality Control

5 试剂与耗材

5.1 核酸提取试剂

推荐使用商品化的微生物 DNA 提取试剂盒、病毒 DNA/RNA 提取试剂盒、RNA 反转录试剂盒。

5.2 文库构建试剂

推荐根据不同测序平台要求使用相应的建库试剂，并按照测序平台说明书进行建库处理。

5.3 靶向扩增试剂

可根据以上不同微生物病原联合鉴定推荐选择目标病原靶向扩增的组合性引物组，也可按照实际需求进行不同病原诊断组合的定制化设计，最终完成样品内多病原多靶点的靶向扩增。

6 仪器与设备

生物安全柜、水浴锅、离心机、PCR 扩增仪、Qubit、Nanodrop 核酸定量仪、纯水仪、涡旋振荡仪、制冰机、二代测序仪。

7 高通量靶向测序技术操作

高通量靶向测序操作过程主要包括样品采集及运输、样品前处理、测序文库构建、上机测序和数据分析等五个步骤。针对需要解决的临床问题和靶向测序的目标病原，对送检的样品类型、样品前处理、文库构建所用的不同传染病联合诊断的特异性引物池、文库构建方式、测序平台选择以及数据分析等步骤均有不同的需求。

7.1 样品采集及运输

靶向测序检测的样品采样及运输所涉及的实验操作应按 NY/T 541-2016 规定执行。

7.2 样品前处理

样品前处理的主要目的是从各种类型的送检样品中提取微生物核酸以确保后续测序步骤的有效进

行，根据不同测序平台说明书要求进行样品微生物核酸的质检与定量。

7.2.1 样品类型

取自动物，拟通过检验反映动物个体有状况的样品，包括固定/新鲜组织、血液、血清、尿液、鼻、咽拭子、粪便、分泌物等。

7.2.2 核酸提取

核酸提取方式主要分为溶液型抽提、柱式抽提和磁珠纯化法三类。实验室应充分评估各提取方式或试剂性能，根据不同样品类型和测序目的选择不同的方式或试剂进行提取。

7.2.3 核酸质量评估

提取后应对核酸质量进行验证，验证指标包括核酸的浓度和纯度。一般来说，靶向测序对于核酸质量的要求相对较低。在不要求核酸完整性的前提下，建议充分裂解细胞，确保所有微生物核酸能最大程度裂解释放。

应使用合适的 DNA 样品和文库构建试剂进行文库构建。进行文库构建的 DNA 样品类别选择标准按表 1，RNA 样品类别选择标准按表 2。

表 1 进行文库构建的 DNA 样品类别选择标准

DNA 样品类别	是否满足文库构建
A 类	满足文库构建要求，DNA 总量 $\geq 100\text{ng}$
B 类	满足文库构建要求，DNA 总量 $\geq 10\text{ng}$ ，且 $< 100\text{ng}$
C 类	不完全满足文库构建要求，可以尝试进行该步骤，但不保证测序质量。建议重新采样，重新提取样品 DNA

表 2 进行文库构建的 RNA 样品类别选择标准

RNA 样品类别	是否满足文库构建
A 类	满足文库构建要求，反转录后的 cDNA 总量 $\geq 100\text{ng}$
B 类	满足文库构建要求，反转录后的 cDNA 总量 $\geq 10\text{ng}$ ，且 $< 100\text{ng}$
C 类	不完全满足文库构建要求，可以尝试进行该步骤，但不保证测序质量。建议重新采样，重新提取样品 RNA，并进行反转录

7.3 测序文库构建

靶向测序文库构建是使用特异性引物池靶向扩增目标区域的 DNA 分子，根据不同的诊断目的将不同猪传染病病原体进行恰当组合，可以在明确病原谱的前提下富集目标区域的待测 DNA 分子，并将其连上特定的检测接头序列，包括分子标签等。根据不同的测序平台选择合适的文库构建方法，可以有效避免上机样品出现较大偏倚，从而尽可能地减少测序误差。在构建测序文库的同时，加入外参核酸作为阴性对照文库和加入病原核酸标准物质作为阳性对照文库，如果没有标准物质，则加入病原靶标基因质粒，控制建库过程中可能引入的污染。

7.4 测序

应使用合适的文库高通量测序试剂进行高通量测序。高通量测序按 GB/T 35537-2017 的附录 A 进行。

7.5 数据分析

生物信息分析是对测序后的原始序列数据进行分析和处理，对于靶向测序的检测结果具有重要的决定性意义。高通量靶向测序的基本生物信息分析流程包括搭建特定病原靶标基因分析数据库、数据的质量控制与过滤、比对与分析等。因此结合靶向测序的数据分析流程，提出以下建议：

7.5.1 质控步骤

建议实验室能根据检测方法与检测需求的特点来搭建实验室分析平台，结合靶向测序特点与预期用途来建立质量控制标准。每个步骤都要仔细评估数据处理的准确性和完整性，确保达到预期性能。

样品经过高通量测序得到的原始数据，应进行质量控制，去除含接头或低质量的序列、外源或宿主基因组序列，再进行后续生物信息学分析。

7.5.2 碱基识别质量值要求

解读报告时考虑以下几个参数，包括测序质量（是否去除低复杂度、低质量序列、Q20、Q30 等）、覆盖率、深度、丰度、微生物序列的数据量等。

测序完成后，应进行 Q20、Q30 的统计和评估。每个 DNA 样品可用数据对应的碱基识别质量值应符合如下要求：

- 大于 Q20 的碱基比例 $\geq 90\%$ ；
- 大于 Q30 的碱基比例 $\geq 80\%$ 。

7.5.3 可用数据量要求

可用测序数据量应达到声明靶标病原可从样品中检测到的最小测序数据量。每个样品测序生成的可用高质量序列数目应大于 1×10^4 条。

注：序列数目为单端测序序列条数，或双端测序序列对数。

7.5.4 靶标基因序列比对分析

数据质控后，参考病原靶标基因数据库，对样品数据进行序列对比分析，内参靶标基因检出率不低于 10%，则测序试验数据可靠。样品病原靶标基因覆盖序列的读长不小于测序长度的 80%（如测序读长 150bp，则获得的靶标基因序列不少于 120bp），序列的同源性不低于 95%。分析后数据储存的文件格式应按 GB/T 35890-2018 规定执行。

7.6 结果描述及判定

7.6.1 阳性

比对分析后，所有病原靶标基因序列数目不少于 1000 条，特定病原靶标基因序列数目不少于 20 条，同时在阴性对照文库中无检出，可以判定该病原靶标基因有检出，该病原检测结果为阳性。

7.6.2 阴性

比对分析后，所有病原靶标基因序列数目不少于 1000 条，特定病原靶标基因序列数目未检出或少于 5 条，同时在阴性对照文库中无检出，可以判定该病原靶标基因无检出，该病原检测结果为阴性。

7.6.3 可疑

比对分析后，所有病原靶标基因序列数目不少于 1000 条，特定病原靶标基因序列数目在 5-20 条之间，同时在阴性对照文库中无检出，则判定该病原靶标基因为可疑，建议对该样品进行重复试验。

8 注意事项

为保证测序结果的准确性，提高结果的可信度，提出以下几点注意事项：

8.1

靶向测序可能的污染来源主要是核酸提取与建库过程中引入的污染，建议实验室自建有效的防污染策略，包括使用阴性对照文库的方法。

8.2

建议实验室验证自建的数据库中病原基因组序列的准确性，过滤数据库错误和不正确的序列，并定期更新病原基因组的数据库，以及提高检测的敏感性和准确性。

8.3

实验室在建立检测方法后，要充分验证方法的准确性、灵敏性、可重复性，并且建议对某些常见感染物种进行检出限、携带和交叉污染的验证。

8.4

在样品检测完成后，确认无需对样品进行保留即做无害化处理，应按照 GB 16548、中华人民共和国国务院令 424 号和中华人民共和国农业部公告第 302 号的规定执行。

附 录 A
(资料性)

病原微生物高通量靶向检测操作

A. 1 测序样品的选择

猪病原微生物高通量靶向测序可根据不同猪只的临床症状、检测目的等选择测序样品，通用原则是宜采集与检测目的有关的，病原感染明显部位的样品，样品例如表A.1所示。

表A. 1 测序样品的选择

序号	不同症状病原微生物联合检测	样品类型	备注
1	猪呼吸道症状病原微生物	鼻拭子、咽拭子、舌尖拭子、唾液、痰液、腹股沟淋巴液、血液、血清等	根据检测目的进行样品核酸提取，实现 DNA/RNA 共检，同时检测 DNA 病毒、RNA 病毒、细菌、支原体、寄生虫、螺旋体等多种病原微生物
2	猪消化道症状病原微生物	肛门拭子、粪便、肠道组织、血液、血清等	
3	猪生殖道症状病原微生物	母猪阴道拭子、公猪精液、胎儿组织、胎衣、胎盘、血液、血清等	
4	猪神经症状病原微生物	脑脊液、脊椎穿刺液、血液、血清等	
5	猪皮肤病变病原微生物	水疱液、病变皮肤拭子、血液、血清等	

A. 2 测序流程

A. 2. 1 基本流程图

按照各测序仪器厂商提供的测序样品制备流程和测序操作进行测序样品的处理、文库构建和测序。基本流程见图A.2



图A. 2 测序基本流程图

A. 2. 2 测序样品处理

A. 2. 2. 1 核酸提取

对待测序的生物样品进行核酸提取，并对提取的核酸进行质量检测。

A. 2. 2. 2 靶向片段扩增

将提取的核酸进行目标病原微生物的靶向扩增，富集检测目标片段得到靶标检测文库。

A. 2. 2. 3 接头连接

将富集目标片段的靶标检测文库连接接头得到待测序文库。

A. 2. 3 待测序文库质量控制

按照测序仪厂商提供的质量要求进行质量控制，建库过程中宜设置阴性对照和阳性对照。

A. 2. 4 测序

按照测序仪厂商提供的标准测序流程进行测序操作。

中国兽医协会
CVMA

附 录 B

（资料性）

病原微生物靶标基因选择

B.1 病原微生物靶标基因选择

猪病原微生物高通量靶向测序主要通过对目标病原微生物靶标基因的测序实现病原微生物的鉴定与其他特征检测，可根据病原微生物基因组特征选择特异性鉴定基因、特异性毒力基因、分型基因等，所有以上不同特征的基因都可称为病原微生物的靶标基因，靶标基因例如表 B.1 所示，以下展示的靶标基因适用于以下病原但不限于以下病原。

表 B.1 病原微生物靶标基因的选择

序号	病原类型	病原微生物	靶标基因
1	病毒性病原微生物	非洲猪瘟病毒	p72; p54; EP402R; MGF505-1R; MGF505-2R; MGF360-13L; MGF360-14L; K205R
2		猪繁殖和呼吸道综合征病毒	orf6; orf7
3		猪伪狂犬病毒	gE; gB
4		猪圆环病毒	cap; rep
5		猪瘟病毒	5'UTR; E2
6		口蹄疫病毒	polyprotein; 5'UTR
7		猪流感病毒	M; H1; H3
8		猪传染性胃肠炎病毒	N; S
9		猪流行性腹泻病毒	N; S1
10		猪德尔塔（丁型）冠状病毒	N; S
11		猪急性腹泻综合征冠状病毒	N; S
12		猪轮状病毒	VP6; VP7
13	细菌性病原微生物	副猪嗜血杆菌	vtaA; infB
14		猪多杀性巴氏杆菌	plpE; kmt1
15		猪胸膜肺炎放线杆菌	omlA; apxIVA
16		猪链球菌	gdh; recN; gapdh
17		致病性大肠杆菌	K88; K99; 987P; F41; astA; eltA/LTa; eltB/LTb; est/STa; ST; ipaH; escV; eae; stx1A; stx1B; stx2A; stx2B; aggA; aafA
18		致病性沙门氏菌	Stn; SC0358; SC1242; hin; mdh
19		产气荚膜梭菌	cpa; cpb; etx; iap; cpe; net(B)
20		胞内劳森菌	aspA; LI0662
21		艰难梭菌	tcdA; tcdB
22	其他病原微生物	猪鼻支原体	p37; 16SrRNA
23		猪肺炎支原体	p36; p102-
24		猪痢疾蛇形螺旋体	nox; tlyA; tlyB; tlyC; hlyA

25		猪附红细胞体	ppa; g1
26		刚地弓形虫	B1; RE

中国兽医协会
CVMA