ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 20-2020

动物布鲁氏菌实时荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for the detection of Brucella spp. in animal

中国兽医协会
CVMA

2020-12-22 发布　　2020-12-22 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。

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。

本文件起草单位：中国兽医药品监察所、中国动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：秦玉明、董浩、原霖、沈青春、丁家波、彭小薇、蒋卉、冯宇、许冠龙、朱良全、范学政。

中国兽医协会
CVMA

动物布鲁氏菌实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了动物布鲁氏菌（Brucella spp.）实时荧光 PCR 的试剂与耗材、仪器与设备、样品、试验步骤、试验数据处理。

本文件主要用于布鲁氏菌（Brucella spp.）核酸检测，样本主要包括：动物脾脏、肝脏、淋巴结、血液、奶样、精液、阴道分泌物、流产胎儿内容物，也可检测被布鲁氏菌污染的环境样品。

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 18646 动物布鲁氏菌病诊断标准

GB 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 1467 奶牛布鲁氏菌病PCR诊断技术

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试剂与耗材

4.1 提取试剂

宜选取商品化的细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

也可按照NY/T 1467 奶牛布鲁氏菌病PCR诊断技术进行布鲁氏菌DNA提取。

4.2 实时荧光 PCR 扩增试剂

应按照不同的实时荧光 PCR 平台的说明书选取推荐的实时荧光 PCR 扩增试剂。

4.3 引物探针

Brucella spp.上游引物(Bru F)：5′-cgctcgcgcggtggat-3′

Brucella spp.下游引物(Bru R)：5′-cttgaagcttgcggacagtcacc-3′

Brucella spp.探针 (Bru P)：5′-FAM- acgaccaagctgcatgctgttgtcgatg-BHQ1-3′

5 仪器与设备

二级生物安全柜、分析天平、水浴锅、高速离心机、实时荧光 PCR 仪、组织研磨器、-20℃冰箱、涡旋震荡仪、移液器。

6 样品

动物脾脏、肝脏、淋巴结、血液、奶样、精液、阴道分泌物、流产胎儿胃内容物等疑似感染布鲁氏菌病的动物体液或组织样品，也可检测被布鲁氏菌污染的环境样品。

7 试验步骤

7.1 样品的采集及运输

样品采集按照 GB/T 18646 或 NY/T 1467 执行。

样品运输按照农业部公告第 503 号执行

7.2 样品的处理

按照GB/T 18646和NY/T 1467 执行。

7.3 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。

7.4 实时荧光 PCR 扩增方法

配制布鲁氏菌实时荧光 PCR 扩增反应体系见表 1。

表1 布鲁氏菌实时荧光PCR扩增反应体系

试剂	终浓度 μmol/L	体积 μL
2×酶混合液 [a]	/	10
Bru F（10 μmol/L）	0.3	0.6
Bru R（10 μmol/L）	0.3	0.6
Bru P（10 μmol/L）	0.3	0.6
DNA 模板	/	2
无菌无核酸酶水	/	6.2
总体积		20.0
注：a 为实时荧光 PCR 扩增试剂。		

将表1中所有试剂加到实时荧光PCR反应管后，充分混匀，做好标记。布鲁氏菌实时荧光PCR扩增所用荧光报告基团为FAM，淬灭基团为BHQ或None。在实时荧光PCR仪上按表2所示程序进行扩增反应。

表2　布鲁氏菌实时荧光PCR扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	95 ℃	2 min	1
2	95 ℃	10 s	40
3	60 ℃	35 s	
注：在每个循环第二步（60 ℃ 35 s ）收集荧光信号。			

7.5　实时荧光 PCR 扩增反应的对照

在进行实时荧光PCR实验时，应设置阳性对照和阴性对照。以提取的布鲁氏菌基因组DNA溶液或含有布鲁氏菌IS711基因全长序列的质粒作为阳性对照；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7.4。

8　试验数据处理

8.1　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。

8.2　结果判定

8.2.1 阳性对照Ct值≤38并出现特定的扩增曲线，阴性对照无Ct值并且无特征性扩增曲线，实验结果成立，否则实验结果不成立。
8.2.2 被检样品FAM荧光信号Ct值≤38并出现特定的扩增曲线，可判定为布鲁氏菌核酸阳性。
8.2.3 被检样品38＜Ct值≤40并出现特定的扩增曲线，需重新取样提取基因组DNA，复检后仍出现上述结果的，判为阳性样品，否则判为阴性样品。
8.2.4 被检样品无Ct值或者无特征性扩增曲线的样品，可判定为布鲁氏菌核酸阴性。

9　实验室生物安全要求

9.1　本方法涉及实验室生物安全管理要求见 GB 19489。国家农业行政主管部门另有规定的，按其规定执行。
9.2　使用过的实验器材和液体废弃物应先经过消毒液浸泡处理，再经高温高压处理后按医疗废弃物进行处理。剩余样品等固体废弃物应在生物安全柜中密封包装，经表面消毒后移出，再经高温高压处理后按医疗废弃物进行处理。

中国兽医协会 CVMA