ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 18-2020

塞内卡病毒荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time RT-PCR assay for detection of Senecavirus A

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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：青岛立见诊断技术发展中心、中国动物卫生与流行病学中心。

本文件主要起草人：张志、李阳、孙学强、刘爽、徐烽烨、王永玲、宫枫举、官丽娟、邵钰、李翠翠、李晓成、尼博、于晓慧、王琳、周晓翠。

中国兽医协会
CVMA

塞内卡病毒荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了塞内卡病毒荧光RT-PCR检测时的仪器设备、样品采集保存和运输、荧光PCR操作程序、结果判定、注意事项。

本文件适用于猪水泡皮、EDTA抗凝全血、脾脏等组织及猪制品中塞内卡病毒的核酸检测。

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

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

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。

SVA：塞内卡病毒（Senecavirus A）

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

Ct：扩增循环次数（Threshold cycle）

FAM：羧基荧光素（Carboxyfluorescein）

5 仪器设备

5.1 荧光 PCR 检测仪

5.2 台式冷冻离心机（可控温至 4 ℃、离心速度可达 12 000 r/min 以上）

5.3 冰箱（2 ℃~8 ℃、-20 ℃和-70 ℃三种）

5.4 微量移液器（0.1 μL~2.5 μL、1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL）及匹配的吸头

5.5 高压灭菌锅

5.6 6 耗材

5.6.1 1.5 mL 和 5 mL 离心管

5.6.2 0.2 mL PCR 薄壁管或八联管

5.6.3　10 μL~200 μL 带滤芯吸头
5.6.4　15 mL 样品保存管

6　试剂

6.1　病毒 RNA 提取试剂盒

6.2　SVA 检测引物和荧光探针，序列如下：

上游引物qSVA-F：5’-CTGCGCTGGGACCGTATCTCA-3’
下游引物qSVA-R：5’-CGCCGCGCCACCTCATT-3’
荧光探针qSVA-Probe：5’-FAM-TCGCCGTAAGCGTGCACCGAGACAG-BHQ1-3'

6.3　荧光 RT-PCR 反应液

含有反转录酶、Taq聚合酶和反应缓冲液（按照附录A配置），除另有规定外，所用生化试剂均为分析纯，试验用水符合GB/T 6682的要求。

6.4　阳性对照

灭活的SVA细胞培养物。

6.5　阴性对照

已知SVA阴性猪的肝脏或脾脏组织悬液。

7　样品的采集、保存和运输

7.1　样品的采集

样品的采集按照NY/T 541的规定执行。可取发病猪的水泡液、水泡皮，以及脾脏、扁桃体、淋巴结等主要组织。

7.2　样品的保存

采集的样品可立即进行检测，不能立即检测的样品，在2 ℃~8 ℃条件下不超过24 h，-20 ℃以下保存3个月，-70 ℃以下保存数年。

7.3　样品的处理

样品处理过程中的生物安全要求和措施，按照GB 19489进行，涉及到的基因扩增和分区要求见SN/T 1193。
7.3.1　水泡液：直接用于核酸提取。
7.3.2　组织样品：将采集的组织置组织匀浆器中，加入1：5的0.01 mol/L的PBS缓冲液（pH值7.2），充分研磨，4 ℃ 3000 r/min离心10 min，取上清液备用。

7.4　样品的运输

必须低温保存运输样品，且在规定温度下的保存期内送达和检测。

8　荧光 RT-PCR 操作程序

8.1 样品RNA提取

在核酸提取区进行。可用商品化的病毒RNA提取试剂盒提取样品的RNA。提取的RNA应立即进行荧光RT-PCR扩增，如不能立即检测，4 ℃保存不宜超过8 h，长期保存应置-70 ℃。

8.2 反应体系的配置

反应配置应在专门的区域进行。采用25μL反应体系，扩增体系配制如下：

2×一步RT-PCR缓冲液	12.5 μL
Ex Taq HS (5 U/μL)	0.5 μL
反转录酶 (5 U/μL)	0.5 μL
上游引物（10 μmol/L）	0.5 μL
下游引物（10 μmol/L）	0.5 μL
探针（5 μmol/L）	0.5 μL
样品RNA或对照	2 μL
无核酶水	8 μL

8.3 荧光RT-PCR反应

在检测区进行。在荧光PCR仪上选用FAM通道，设置如下反应参数：

42 ℃反转录15 min，95 ℃变性3 min，然后40个循环（95 ℃ 10 s，60 ℃ 20 s），并在循环反应中60 ℃采集FAM信号。

9 结果判定

9.1 阈值设定

阈值设定原则根据不同的荧光PCR仪的噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增的最高点为准。

9.2 质量控制

读取每个样品的Ct值。当阳性对照有特异性扩增曲线而且Ct值≤30，阴性对照无特异性扩增曲线，说明质控合格。以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 被检样品有特异性扩增曲线，而且Ct值≤35，判定为SVA核酸阳性。

9.3.2 被检样品无特异性扩增曲线或者Ct值>37，判定为SVA核酸阴性。

9.3.3 被检样品有特异性扩增曲线，而且35<Ct值≤37，判定为可疑，可疑样品重新检测。如重复检测后Ct值≤37，且扩增曲线均为典型的S型曲线，判定为SVA核酸阳性；如重复检测后无Ct值或Ct值>37，判定为SVA核酸阴性。

10 注意事项

10.1 本方法使用国家农业行政主管部门批准的其他检测引物、探针时，应对检测程序和判定标准作相应调整。

中国兽医协会 CVMA

10.2　本方法样品处理过程中使用的耗材和器皿，应高压灭菌处理；在荧光RT-PCR反应中使用过的枪头和PCR反应管，禁止高温高压处理，应用2 %的84消毒液浸泡30 min后，再作为医疗废弃物处理。

中国兽医协会
CVMA

附　录　A
（规范性）
荧光RT-PCR反应液组成

荧光RT-PCR反应液组成

本反应液用于一步法RT-PCR反应，储存液浓度为2×工作浓度，使用时需加Ex Taq HS等DNA聚合酶、反转录酶、上下游引物、探针和无RNA酶水等稀释至1×工作浓度。

2×荧光RT-PCR反应液含：

50 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris-HCl（pH8.3），2.5 mmol/L $MgCl_2$，0.2 mmol/L dNTP mix，1 U RNase Inhibitor，2 mmol/L DTT，5 %甘油，其余为无核酶水。

中国兽医协会
CVMA