ICS 11.220
B 41

团 体 标 准

T/CVMA 41-2020

犬致病性钩端螺旋体荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for detection of canine pathogenic leptospira

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：上海市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：王晓旭、王建、徐锋、赵洪进、沈莉萍、齐新永、宁昆、鞠厚斌、杨德全、杨显超、龚国华、夏炉明、朱九超、葛杰、白艺兰。

中国兽医协会
CVMA

犬致病性钩端螺旋体荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了犬致病性钩端螺旋体荧光PCR检测的操作方法。

本文件适用于犬的血液、尿液、肾脏组织等样本或分离菌株中犬致病性钩端螺旋体核酸的检测。

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 14926.46 实验动物 钩端螺旋体检测方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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。

BHQ： 无荧光淬灭基团（black hole quencher）

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

DEPC：焦炭酸二乙酯（diethyl pyrocarbonate）

DNA： 脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

ddH_2O： 双蒸水（double-distilled H_2O）

FAM： 6-羧基荧光素（6-carboxy-fluorescein）

PCR： 聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）

PBS： 磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline buffer）

5 试剂与材料

5.1 引物和探针

本文件参照犬致病性钩端螺旋体特有的 *LipL32* 基因序列，设计引物序列如下：

上游引物： 5′- RCCAGGCGAYGGAGACT-3′

下游引物： 5′- GGTTTTGCTTTCGCAGCTTT-3′

探针序列： 5′-FAM- ATGCCACATTGGTTTGA-BHQ-3′

R：A/G，Y：C/T

5.2 试剂

5.2.1 DNA 提取试剂：核酸提取液配制详见附录 A，也可选取商品化 DNA 提取试剂盒。

5.2.2 核酸扩增试剂：核酸扩增预混液（Premix Ex *Taq* ）、ddH_2O 等商品化核酸扩增试剂。
5.2.3 阳性对照为灭活的致病性钩端螺旋体培养物，阴性对照为灭菌 PBS。

6 仪器与设备

6.1 II级生物安全柜。
6.2 可调节微量移液器（量程：1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL 和 200 μL~1 000 μL）。
6.3 荧光 PCR 检测仪。
6.4 微量台式离心机。
6.5 低温冷藏柜（2 ℃~8 ℃）。

7 样品的采集与处理

7.1 总则

样品采集步骤参照GB/T 14926.46执行，且采样过程要符合GB 19489实验室生物安全通用要求相关要求。

7.2 样品的采集与处理

7.2.1 血液样品

以穿刺点为中心向外环状擦拭，消毒范围直径至少 1 cm~3 cm；进针后采集 1 mL 左右的血液置于 EDTA 抗凝管中，并上下颠倒不少于 5 次，充分混匀。

7.2.2 尿液样品

尽可能取中段尿，必要时进行导尿采集尿液或膀胱穿刺取尿。采集尿样不少于2 mL，置于5 mL离心管中，封闭好管口防止漏液。提取核酸前，采用4000 r/min离心30 min，弃上清，用200 μL（可根据沉淀量适当增加重悬液体体积）无菌生理盐水重悬，用于核酸提取。

7.2.3 组织样品

无菌采集肾脏（尽可能包膜完整）于灭菌平皿中，或根据不同病型，尸检取肺脏、肝脏等样本。无菌生理盐水水冲洗表面后，取0.5 g组织样本剪碎，加1 mL无菌生理盐水充分研磨，将研磨液用作核酸提取。

7.2.4 分离菌株

若为固体培养，则用灭菌棉签蘸取菌落，于灭菌PBS中制备成菌悬液，用于核酸提取。若为液体培养，则提取核酸前，采用4000 r/min离心30 min，弃上清，用200 μL（可根据沉淀量适当增加重悬液体体积）无菌生理盐水重悬，用于核酸提取。

8 操作方法

8.1 DNA 提取

8.1.1 若选取附录 A 所列试剂，则按照下列方法提取。
8.1.1.1 向1.5 mL离心管中加入200 μL DNA提取液1（见附录A.1），分别在不同离心管中加入待测样品和阴性对照、阳性对照各200 μL。混合震荡均匀后，于4 ℃、12000 r/min离心10 min。

中国兽医协会 CVMA

8.1.1.2　吸去上清液后，加入10 μL DNA提取液2（见附录A.2），混匀震荡后，于4 ℃、12000 r/min离心10 s。

8.1.1.3　100 ℃干浴或沸水浴10 min。

8.1.1.4　加入90 μL无DNA酶的去离子水，12000 r/min离心10 min，上清则为所提取DNA。提取的DNA若需保存，须保存在-20 ℃。

8.1.2　若采用商品化 DNA 提取试剂盒，则参照产品说明书进行提取。

8.2　扩增试剂的准备与配制

8.2.1　在试剂储存和准备区进行。

8.2.2　荧光 PCR 反应体系

将所有试剂和引物、探针加入荧光定量 PCR 反应管（板）。配置反应体系参照表 1。配置完反应液后应充分震荡混匀并离心。

表 1 犬致病性钩端螺旋体荧光 PCR 扩增体系

试剂	体积
2×Premix Ex *Taq* (Probe qPCR)	10 μL
上游引物（10 μmol/L）	0.4 μL
下游引物（10 μmol/L）	0.4 μL
探针（20 μmol/L）	0.8μL
ddH_2O	6.4 μL
扩增试剂总体系	18 μL

8.3　加样

8.3.1　在样本制备区进行。

8.3.2　在上述 8.2.2 中的反应管（板）中分别加入提取的 DNA 模板或阴、阳性对照各 2 μL，使每管总体积达到 20 μL。记录反应管（板）对应的样品编号。

8.4　荧光 PCR 反应

8.4.1　在扩增区进行。

8.4.2　将 8.3.2 中加样后的反应管（板）放入荧光 PCR 检测仪中，编辑样品表后，选定荧光报告基团为 FAM，淬灭基团为 BHQ 或 none。反应参数设置如下表 2。

表 2 犬致病性钩端螺旋体荧光 PCR 扩增程序

步骤	温度	持续时间	循环数
1	95 ℃	15 s	1
2	94 ℃	5 s	40
3	58 ℃	10 s	
4	72 ℃	15 s	
注：在每个循环第二步 58 ℃时收集荧光信号。			

9　结果判定

9.1　结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好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。

9.2 实验成立的条件结果判定

9.2.1 阴性对照无 *Ct* 值，且无典型的 S 型扩增曲线。

9.2.2 阳性对照 *Ct* 值≤30，且出现典型的 S 型扩增曲线。

9.2.3 9.2.1 和 9.2.2 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 阴性

无*Ct*值并且无典型的S型扩增曲线，表示样品中无犬致病性钩端螺旋体核酸。

9.3.2 阳性

*Ct*值≤33，且出现典型的S型扩增曲线，表示样品中存在犬致病性钩端螺旋体核酸。

9.3.3 有效原则

*Ct*值＞33，且出现典型的S型扩增曲线的样品建议复检。复检仍出现上述结果的，判为阳性，否则判为阴性。

10 生物安全要求

10.1 本实验所涉及的病原微生物为人畜共患病，实验必须在生物安全二级实验室中进行。具体要求参见 GB 19489 实验室生物安全通用要求。

10.2 实验完毕和实验过程中产生的固体、液体废弃物，应当按照相应要求，进行灭菌处理后再按照 GB 19489 7.19 废弃物处置要求进行废弃。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（规范性）
DNA提取试剂及其配制

A.1　DNA提取液 1

称取聚乙二醇(PEG 8000)晶体20.74 g，氯化钠（NaCl）晶体17.53 g，加去离子水溶解，并定容至100 mL。

A.2　DNA提取液 2

1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris.HCl) 2 mL，2 mol/L 氯化钾(KCl) 5 mL，0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA) 0.5 mL，乙基苯基聚乙二醇(NP-40) 1 mL，加去离子水定容至100 mL。

即称取KCl 14.9l g，Tris 碱 12.11 g，EDTA 14.6l g，NaOH 6 g；量取1.21mL浓HCI，NP-40 1 mL加去离子水定容至100 mL。

A.3　无DNA酶的去离子水

将DEPC加入去离子水（符合GB/T 6682要求）中至终浓度为0.1 %（体积比），充分混合均匀后作用12 h，分装，121 ℃高压灭菌30 min，冷却后冷藏备用。

中国兽医协会 CVMA