ICS
点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

犬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 canine respiratory syndrome pathogenic molecules using recombinase-mediated strand replacement nucleic acid amplification method

征求意见稿

中国兽医协会 CVMA

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.....6
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

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

犬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

本文件规定犬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。

本文件适用于犬呼吸道症候群（犬瘟热病毒、犬流感病毒、犬副流感病毒、犬支原体、犬波氏杆菌、犬腺病毒）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

犬瘟热病毒：canine distemper virus, CDV

犬瘟热病毒属于泛嗜性麻疹病毒(Pantropic morbillivirus)是一种有包膜的负性单链 RNA 病毒，主要感染犬类动物。

3.2

犬流感病毒：canine influenza virus, CIV

犬流感病毒属于正黏病毒科和 A 型流感病毒（Influenza A virus, IAV）属，是一种单股负链 RNA 病毒，对家犬及其他全科类动物具有高度传染性，可引起严重的呼吸道症状和致死性肺炎。

3.3

犬副流感病毒：Canine parainfluenza virus, CPIV

犬副流感病毒在分类上属副粘病毒科中n型副流感病毒亚型，主要引起犬的卡他性鼻炎和支气管炎等呼吸道症状。

3.4

中国兽医协会 CVMA

犬支原体：canine mycoplasma, CMYC

犬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，是犬传染性呼吸道疾病之一，主要引起支原体肺炎、上呼吸道感染和慢性支气管炎等。

3.5

犬波氏杆菌：bordetella bronchiseptica, Bb

犬波氏杆菌，是博德特氏菌属（*Bordetella*）的一种小型革兰氏阴性杆状细菌，它会引犬传染性支气管炎，表现为流鼻涕、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

犬腺状病毒：canine adenovirus, CAV

犬腺状病毒属于乳腺病毒属(Mastadenovirus)和腺病毒科(Adenoviridae)，是导致犬传染性肝炎的最主要原因之一，主要通过尿液及眼鼻分泌物传播，

3.7

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℃~42℃),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。

3.8

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℃～42℃),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。

3.9

CT **值**：cycle thresholod

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。

3.10

T **值**：cycle thresholod

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

中国兽医协会 CVMA

下列符号适用于本文件。

c——核酸浓度，单位为微克每微升(μg/μL)

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 trithyl ammonium bromide）

DNA：脱氧核糖核酸 （deoxyribonuleic acid）

RNA： 核糖核酸 （ribonuleic acid）

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

EDTA： 乙二胺四乙酸 （ethylene diaminetetraacetic 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，分别采用犬瘟热病毒、犬流感病毒、犬副流感病毒、犬支原体、犬波氏杆菌、犬腺病毒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，实现对犬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

犬瘟热病毒实时RT-RAA荧光检测所用的引物探针参见附录 A.1。

犬流感病毒实时RAA荧光检测所用的引物探针参见附录 A.2。

犬副流感病毒实时RAA荧光检测所用的引物探针参见附录 A.3。

犬支原体实时RAA荧光检测所用的引物探针参见附录 B.1。

犬波氏杆菌实时RAA荧光检测所用的引物探针参见附录 B.2。

犬腺病毒实时RAA荧光检测所用的引物探针参见附录 B.3。

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 Na_2EDTA。

7.2 酚：氯仿：异戊醇=25：24：1

7.3 异丙醇。

中国兽医协会 CVMA

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 0.5μL~10μL，10μL~100μL，20μL~200μL，200μL~1000μL。

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 mL CTAB提取缓冲液(pH8.0),涡旋振荡混匀后于70℃孵育15min,期间颠倒离心管2-3次；12000 r/min 离心5 min,取上清液于一新的干净1.5 mL离心管中，加入500 μL酚：氯仿：异成醇(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 μL70%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280 nm 处的吸光值A260和A280。核酸的浓度按照式(1)计算：

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

当A1/A2比值在1.7～1.9之间时，适宜于RAA/RT-RAA扩增。

中国兽医协会 CVMA

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

犬瘟热病毒/犬流感病毒/犬副流感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

犬支原体/犬波氏杆菌/犬腺病毒实时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℃，60s，1个循环；42℃，30s，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℃，60s；42℃，20min，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

中国兽医协会 CVMA

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 15min。

11 结果判断与表述

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 15min 小于 20min,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。

检测过程中防止交了污染的措施按照GB/T27401规定执行。

中国兽医协会 CVMA

附 录 A

A.1 犬瘟热病毒RT-RAA引物序列及反应参数

名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
犬瘟热病毒	F: GTCGGGGAATTTAGAATGAACAAAATCT	184bp	N
	R: CTAATCCAGCTTCCACAATGTAGTTATCT		
	P:TATTGTTAGAAACAGGATTGCTGAGGACTFAM-dT(THF)BHQ1-dTCTTTGAGGCGATT-C3		
注：目的基因序列参见附录B。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.2 犬流感病毒 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
犬流感病毒	F: GCGATTTAAGTGATCCTCTCATTATTGC	188bp	M2、M1
	R: ACTCTGCTGTTCCTGCCGATACTCTTCC		
	P: CACTTGATATTGTGGATTCTTGATCGTC[FAM-dT][THF][BHQ1-dT]TCTTCAAATGTAT-C3		
注：目的基因序列参见附录D。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 犬副流感病毒 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
犬副流感病毒	F: TCAAGAACTGCAAGATCAGAGTGAGGAAGGT	220bp	N
	R: ATGATTGAGCATTGTGGCTGATGGTAGCGAAA		
	P:TTCTATTCTGCCTACGGATTGTTCTCAG[FAM-dT]A[THF]BHQ1-dTGGTGCAAGGGATT-C3		
注：目的基因序列参见附录F。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。			

中国兽医协会 CVMA

附 录 B

B.1 犬支原体RAA引物序列

名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
犬支原体	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F。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。			

B.2 犬波氏杆菌RAA引物序列

名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
犬波氏杆菌	F: TAAGTCCGTCGCAAACCTGCCGTAATCC	203bp	flaA
	R: CGATTGGGACTTGTTCAGGTTGTTCTGG		
	P: GCTGCCCGGTTTGAAGAAGCCTTTCTC[FAM-dT]C[THF][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,BQH-dT和C3spacer均为探针修饰基团。			

B.3 犬腺状病毒RAA引物序列

名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
犬腺状病毒	F: CTCCGTCGATGCTGCCACAATGGTCTTA	125bp	hexon
	R: CTTGTTGTCCAACTTAAAGTAAGAACTGGTT		
	P:AGGACGCCGCCGAATACTTGTCTCCCGCCC[FAM-dT]G[THF][BHQ1]-dTTCAGTTTGCCCAA-C3		
注：目的基因序列参见附录L。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。			

中国兽医协会 CVMA

附 录 C

C.1 犬瘟热病毒/犬流感病毒/犬副流感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(10μmol/L)	1.0
反向引物(10μmol/L)	1.0
探针(10μmol/L)	0.3
模板	8.7
反应总体系	25

C.2 犬支原体/犬波氏杆菌/犬腺病毒实时荧光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(10μmol/L)	1.0
反向引物(10μmol/L)	1.0
探针(10μmol/L)	0.3
模板	8.7
反应总体系	25

中国兽医协会 CVMA

附 录 D

D.1 犬瘟热病毒靶基因序列

atactgcagccgactcggagatgagaaggtgggttaagtacacccaacagagacgtgtggtcggggaatttagaatgaacaaaatctggcttgatattgttagaa
acaggattgctgaggacttatctctgaggcggttcatggtagcacttatcttggatatcaaacgatccccagggaacaagcctagaattgctgaaatgatttgtgata
tagataactacattgtggaagctggattagctagtttcatcttaactatcaaatttggcattgaaactatgtatccggctcttgggttgcatgagttttctggggagttaac
aactattgaatcccttatgatgctatatcaacagatgggtgaaacagcaccgtacatggttattctggaaaattctgttcagaacaaatttagtgcaggatcctaccca
ttgctctggagttatgccatgggtgttggtgttgaacttgaaaactccatgggagggttaaatttcggtagatcctactttgatccagcttatttcaggctcgggcaag
agatggtcagaagatctgccggcaaagtgagctctgcacttgccgccgagcttggcatcaccaaggaagaggctcagctagtgtcagaaatagcatccaaga

D.2 犬流感病毒靶基因序列

catggaggttgccaatcaggctaggcagatggtgcaagcaatgaggacaattggaacccaccctagctccagtgccggtctaaaagatgatcttcttgaaaactt
gcaggcctaccaaaaacgaatgggagtgcaaatgcagcgatttaagtgatcctctcattattgccgcaagtatcattgggatcttgcacttgatattgtggattcttga
tcgtcttttcttcaaatgtatttatcgtcaccttaaatacggtttgaaaagagggccttctacggaaggagtgcctgagtctatgagggaagagtatcggcaggaaca
gcagagtgctgtggatgttgacgatggtcattttgtcaacatagagctggagtaaaaaactaccttgtttctact

D.3 犬副流感病毒靶基因序列

agtcagagtagttcaataaggacctatcgagtttgggcaatttttcgtccccgacacaaaaatgtcatccgtgcttaaagcatatgagcgattcacactcactcaaga
actgcaagatcagagtgaggaaggtacaatcccacctacaacactaaaaccggtaatcagggtatttatactaacctctaataacccagagctaagatcccggctt
cttctattctgcctacggattgttctcagtaatggtgcaagggattcccatcgctttggagcattacttacaatgttttcgctaccatcagccacaatgctcaatcatgtc
aaattagctgatcagtcaccagaagctgatatcgaaagggtagagatcgatggctttgaggagggatcattccgcttaatccccaatgctcgttcaggtatgagcc
gtggagagatcaatgccta

D.4 犬支原体靶基因序列

cgttgaccatggtaaaactacattaacagctgctatagctacagttttagctaaaaaaggtttatctgaagctcgtgattatgcttctattgataatgctccagaagaaa
gagcacgtggtattacaattaatacatcacacattgaatatcaaactgaaaaacgtcactatgctcacgttgactgtcctggtcacgctgactatgttaaaaacatgat
tacaggggcagctcaaatggatggtgctatcttagttgttgctgcaacagatggaccaatgcctcaaacacgtgaacacattcttttatctagacaagttggtgttcct
cgtatcgttgttttcttaaacaaatgtgatatgttagaaggtgaagaagagatgattgaacttgttgaattagaagttcgttcacttctttcagaatacggatttgatgga
gataatgctccaattattcgtggatctgctaaattagctcttgatggtgttcctcaatgagaagaaaaagttatggaattaatggatgcagttgatacatacattgaaac
tccagaaaaagattttgaaaaaccattcttaatggctgttgaagacgttttcacaattacaggacgtggaactgttgctac

D.5 犬波氏杆菌靶基因序列

ccctttgccgccagattcccccgcacatttccgaacttcactttttttgcttaagtccgtcgcaaacctgccgtaatccaggcaacaaaggaaatcgcggcgctgtg
caagcgaaagtccgatgttacagatgggcggcctagctgcccggtttgaagaagcctttctctcttgggagcctcaacatggctgcagtcatcaataccaactact
tgtcgctggttgcccagaacaacctgaacaagtcccaatcggccctgggtag

D.6 犬腺病毒靶基因序列

ttttttgaccgcgccagctgagaagatggcaactccgtcgatgctgccacaatggtcttacatgcacattgctggccaggacgccgccgaatacttgtctcccgc
cctggttcagtttgcccaagcaaccagttcttactttaagttggacaacaagttcagaaaccccactgtggcccccactcacgatgtaaccactgaaaggtctcagc
gcttgcagttgcgctttgtgccagttatgcaagaagatggccagtacacttacaaaacccggttccaattggcagtgggagataacagggttctggacatggcca
gtacctactttgacattaggggcaccctagacagaggcccct

中国兽医协会 CVMA