ICS 点击此处添加 ICS 号
点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXX—2021

动物 A 型流感病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒美洲型和欧洲型三重荧光 RT-PCR 检测方法

Triplex real time RT-PCR detection method for Animal influenza A virus、North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus

（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

目 次

前言 II
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 缩略语 1
5 仪器和设备 2
6 试剂和材料 2
7 病料采集和处理 2
8 病毒总核酸的提取 2
9 荧光 RT-PCR 反应 2
10 生物安全要求 4
附录 A（资料性附录） 病原基因参考序列 5
附录 B（资料性附录） 附表：引物和探针序列 6
附录 C（资料性附录） 病毒核酸提取步骤 7

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。

本文件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这些专利的责任。

本文件由中国海关科学技术研究中心提出。

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

动物A型流感病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒美洲型和欧洲型三重荧光RT-PCR检测方法

1 范围

本文件规定了动物A型流感病毒与北美种和欧洲种猪繁殖与呼吸综合征病毒三重荧光RT-PCR检测方法操作规程。

本文件适用于动物A型流感病毒与北美种和欧洲种猪繁殖与呼吸综合征病毒的鉴别诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 动物疫病实验室检验采样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

三重荧光RT-PCR Triplex real time RT-PCR

三重荧光反转录-聚合酶链式反应。

3.2

Ct值 Cycle threshold

每个反应孔内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环次数。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AIV-A：动物A型流感病毒（Animal Influenza A Virus）

PRRSV-NA：北美种猪繁殖与呼吸综合征病毒（North American Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus）

PRRSV-EU：欧洲种猪繁殖与呼吸综合征病毒（European Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus）

中国兽医协会 CVMA

FAM: 6-羧基荧光素(6-Carboxyfluorescein)
Cy5：荧光发光基团
Hex：六氯-6-甲基荧光素（6-Hexachlorofluorescein）
BHQ：荧光淬灭基团

5 仪器和设备

多通道荧光PCR仪、生物安全柜、冰箱（2℃～6℃和-20℃）、台式冷冻离心机、组织匀浆机、漩涡器、移液器及吸头（至少包括10μL、200μL和1000μL三个量程）。

6 试剂和材料

6.1 病毒总核酸提取试剂TIANamp Virus DNA/RNA Kit或者其他等效核酸提取试剂。

6.2 Path-ID™ Multiplex one-step RT-PCR kit或者其他等效多重荧光RT-PCR试剂。

6.3 无水乙醇（分析纯）和75%乙醇（用新开启的分析纯无水乙醇和DEPC处理水配制）及实验用水按照GB/T 6682《分析实验室用水规格和试验方法》规定使用，-20 ℃ 预冷。

6.4 阳性对照

动物A型流感病毒体外转录的非感染性RNA片段、北美种和欧洲种猪繁殖与呼吸综合征病毒体外转录的非感染性RNA片段,片段序列见附录A。

6.5 阴性对照

动物A型流感病毒阴性样品、北美种和欧洲种猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性样品。

6.6 引物和探针序列

引物和探针序列见附录B。

7 病料采集和处理

病料采集和处理，请遵照NY/T 541《动物疫病实验室检验采样方法》有关规定进行操作。

8 病毒总核酸的提取

见附录C。

9 荧光RT-PCR反应

9.1 多重荧光RT-PCR反应体系

多重荧光RT-PCR反应体系配制见表1。

表1 一步法多重荧光RT-PCR反应体系（总体积20uL）

中国兽医协会 CVMA

混合液组份	体积（uL）	终浓度（nM）
2×Multiplex RT-PCR 缓冲液	10	1×
Multiplex 酶混合液	1	1×
引物混合物	1.6	400
PRRSV-NA 探针（FAM 标记）	0.4	200
AIV-A 探针（Cy5 标记）	0.4	200
PRRSV-EU 探针（Hex 标记）	0.4	200
病毒总核酸	5	
DEPC 水补至总体积至	20	

注：1. 引物混合物指的是3种病原的所有引物； 2. 此反应体积以Path-IDTM Multiplex one-step RT-PCR kit为例，如果使用其他等效试剂，请遵照试剂说明书配制。

将混合液充分混合后，最后加入模板，简短离心，按照下列反应程序，进行一步法荧光RT-PCR反应。

9.2 荧光 RT-PCR 反应程序

荧光RT-PCR反应程序见表2。

表 2 荧光 RT-PCR 反应程序

48℃	10min	
95℃	10min	
5℃	15sec	44 个循环
60℃	45sec	

9.3 结果描述及判定

9.3.1 质控标准

所有阳性对照（FAM、Cy5和Hex）均有S形扩增曲线，阴性对照（FAM、Cy5和Hex）均无扩增曲线且Ct≥40或者无值。

满足此条件，视为此次试验有效。

9.3.2 结果判断和鉴别

有扩增曲线，且Ct≤35，判定为核酸检测阳性；

有扩增曲线，但35<Ct<40，属于疑似区间，需要重新确认，建议使用单荧光RT-PCR方法确认；如果Ct值仍然<40，则判定为核酸检测阳性，如果Ct值≥40或者无Ct值，判定为核酸检测阴性。

没有扩增曲线，或者Ct≥40，判定核酸检测阴性。

中国兽医协会 CVMA

FAM阳性荧光信号表示PRRSV-NA核酸检测阳性，Cy5阳性荧光信号表示AIV-A核酸检测阳性，Hex阳性荧光信号表示PRRSV-EU核酸检测阳性；两种阳性荧光信号表示对应的其中两种病毒核酸检测阳性，三种阳性荧光信号表示AIV-A、PRRSV-NA和PRRSV-EU三种病毒核酸检测阳性。

10 生物安全要求

样品处理和核酸提取以及废弃物处理按照GB 19489《实验室生物安全通用要求》规定，在相应等级的生物安全实验室或者生物安全柜中进行，并做好个人防护。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A
（资料性附录）
病原基因参考序列

A1 AIV-A-M 基因参考序列

atgagtcttc taaccgaggt cgaaacgtat gttctctcta tcgttccgtc aggccccctc aaagccgaga tagcgcagag actcgaagat gtgtttgcag ggaaaaacac cgatcttgaa gcactcatgg aatggttaaa gacaagacca atcctgtcac ctctgactaa ggggatttta ggatttgtgt tcacgctcac cgtgcccagt gagcgaggac tgcagcgtag acgctttgtc cagaatgccc taaatgggaa tggtgatccg aacaacatgg acaaagcggt caaactgtac agaaaactta aaagggaaat aacattccac ggggccaaag aagtagcgct cagttactct gctggtgcac ttgccagttg catgggcctc atatacaaca gaatggggac tgtcaccgct gaggtggcct ttggtctagt atgcgcaacc tgtgaacaaa ttgctgattc ccagcatcga tctcatagac aaatggtgac aacaaccaat ccactaatca ggcatgagaa cagaatggta ctagccagca caacagctaa agccatggaa caaatggctg gatcaagtga acaagcagca gaggctatgg aggttgctag ccaggctaga caaatggtac aggcaatgag aacaattggg actcacccta gttccagtgc tggtctaaaa gatgatcttc ttgaaaatct acaggcctat cagaaacgaa tgggagtgca aatgcaacga ttcaagtgat cctctcattg ctgccgcaag catcattggg attttgcacc tgatattgtg gattcttgat cgtctttttt tcaaatgcat ttaccatcac tttaaatatg gtcgaaaaag agggccttct acggaaggag tgccggagtc catgagggaa gaatatcggc agaaacagca gagtgctgtg gatgttgacg atggtcattt tgtcaacata gtgctagagt aa

A2 PRRSV-NA 基因 N 参考序列

atgccaaata acaacggcaa gcagcaaaag aaaaagaagg ggaatggcca gccagtcaat cagctgtgcc aaatgctggg taagatcatc gcccaacaaa accagtccag aggcaaggga ccggggaaga aaaataggaa gaaaaacccg gagaagcccc atttccctct agcgactgaa gatgacgtca ggcatcactt tacccctagt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcgatccag actgccttca atcagggcgc tggaacttgt gccctgtcag attcagggag gataagttac actgtggagt ttagtttgcc gacgcaacat actgtgcgtc tgatccgcgc cacagcatca ccctcagcgt ga

A3 PRRSV-EU 基因 N 参考序列

atggccggta aaaaccagag ccagaagaaa aagaaaagta cagctccgat ggggaatggc cagccagtca atcaactgtg ccagttgctg ggtgcaatga taaagtccca gcgccagcaa cctaggggag gacaggccaa

中国兽医协会 CVMA

aaagaaaaag cctgagaagc cacattttcc cctggctgct gaagatgaca tccggcacca cctcacccag actgaacgct ccctctgctt gcaatcgatc cagacggctt tcaatcaagg cgcaggaact gcgtcgcttt catccagtgg gaaggtcagt tttcaggttg agttcatgct gccggttgct catacagtgc gcctgattcg cgtgacttct acatccgcca gtcagggtgc aagttaa

中国兽医协会
CVMA

附　录　B
（资料性附录）
附表：引物和探针序列

病毒 Virus	靶基因 Target gene	引物/探针 Primers/probes	序列（5‘→3‘） Sequences（5‘→3‘）
北美种猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV-NA）	*N* 基因	FP1	CCAGCCWGTCAATCAGCTGT
		FP2	CCAGCCGGTCAATCAGCT
		FP3	CCAGCCAGTCAACCAGCT
		RP1	GGCTTCTCCGGGTTTTTCTTY
		RP2	GGCTTCTCCGGGCTTTTCT
		RP3	GGGCTTCTCCGGGTTTTTATTC
		Probe1	FAM-CGGTCCCTTGCCTCTGGAC-BHQ1
		Probe2	FAM-CCGGTCCCTTRCCTCTRGACT-BHQ1
欧洲种猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV-EU）	*N* 基因	FP1	CCAGCCAGTCAATCAACTGTG
		FP2	GCCAGTCAGTCAATCAACTGTG
		FP3	CCAGCCAGTCAATCAGCTGT
		FP4	GCCAGTCAGTCAATCAGCTGT
		RP1	TCATCTTCWGCAGCCAGGG
		RP2	TCATCTTCAGCAGCCAAGGG
		RP3	TCATCTTCAGCAGCTAGGGGA
		RP4	TCATCTTCAGCAGCTAAGGGAAA
		RP5	TCATCTTCAGCGGCCAGG
		Probe1	HEX-TGATRAARTCCCAGCGCCAGC-BHQ1
		Probe2	HEX-ATGATAAGGTCCCAGCGCCAG-BHQ1
动物A型流感病毒（AIV-A）	*M* 基因	FP1	CCTGTCACCTCTGACTAAGGG
		FP2	ATCCTGTCACCTCTGACTAAAGG
		FP3	ATCTTGTCACCTCTGACTAAGGG
		FP4	CCTGTCACCTCTGACCAAGG
		RP1	CGTCTACGCTGCAGTCCTC
		RP2	CGTCTACGCTGWAGTCCTCG
		RP3	CGTCTACGTTGCAGTCCTCG
		Probe	Cy5-ACGCTCACCGTGCCSAG-BHQ2

中国兽医协会 CVMA

附 录 C
（资料性附录）
病毒核酸提取步骤

1. Carrier RNA 溶液的配制

1.1 Carrier RNA储存液配制

向装有310 μg Carrier RNA冻干粉的管子中加入310 μL RNase-Free ddH2O，将Carrier RNA彻底溶解，得到终浓度为1 μg/μL的溶液，并分装、置于-20 ℃储存。

1.2 Carrier RNA工作液配制

根据样品数量计算所需缓冲液GB和Carrier RNA溶液的体积 （计算公式如下1和2），将缓冲液GB与Carrier RNA溶液颠倒混匀，即得到Carrier RNA工作液；为避免溶液出现起泡现象，请勿使用涡旋振荡。

公式（1）$y = n \times m$

公式（1）中：y为需要加入缓冲液GB的体积（mL）；
n为同时提取的样品个数；
m=0.22mL。

公式（2）$z = y \times x$

公式（2）中：z为需要加入Carrier RNA溶液的体积（μL）；
y为需要加入缓冲液GB的体积（mL）；
x=28 μL/mL。

2. 操作步骤

2.1 用移液器将 20 μL Proteinase K 加入一个干净的 1.5 mL 离心管中。

2.2 向离心管中加入 200 μL 血浆/血清/病毒培养液或 25 mg 组织匀浆（样品需平衡至室温），如果样本体积小于 200 μL，可加入 0.9% NaCl 溶液补充。

2.3 加入 200 μL Carrier RNA 工作液，盖上管盖，涡旋振荡 15 sec 混匀。

2.4 56℃孵育 15 min，简短离心，收集附着在管壁及管盖的液体。

2.5 加入 250 μL 无水乙醇，涡旋振荡 15 sec，彻底混匀，在室温（15℃-25℃）放置 5 min。

2.6 简短离心，收集附着在管壁及管盖的液体。

2.7 将离心管中的溶液和絮状沉淀全部转移至 RNase-Free 吸附柱 CR2（吸附柱放在收集管中），盖上管盖， 6,000×g 离心 1 min，弃收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

2.8 小心打开吸附柱盖子，加入 500 μL 溶液 GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），盖上管盖，6,000×g 离心 1 min，弃收集管中的废液，将吸附柱放回收集管。

中国兽医协会 CVMA

2.9　小心打开吸附柱盖子，加入 600 μL 溶液 PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），盖上管盖，静置 2 min， 6,000×g 离心 1 min，弃收集管中的废液，将吸附柱放回收集管。

2.10　重复步骤 2.9。

2.11　小心打开吸附柱盖子，加入 500 μL 无水乙醇，盖上管盖， 6,000×g 离心 1 min，弃收集管中的废液。

2.12　将吸附柱放回收集管中，13,400×g 离心 3 min，使吸附膜完全变干，弃收集管中的废液。

2.13　将吸附柱放入一个新的 RNase-Free 离心管（1.5 ml）中，小心打开吸附柱的盖子，室温放置 3 min，使吸附膜完全变干。向吸附膜的中间部位悬空滴加 20-150 μL RNase-Free ddH20，盖上盖子，室温放置 5 min。

2.14　13,400×g 离心 1 min，收集到的即为病毒总核酸（DNA 或 RNA）。

注：上述提取步骤以TIANamp Virus DNA/RNA Kit为例，如果使用其他等效核酸提取试剂，请遵照试剂盒使用说明书操作。

中国兽医协会
CVMA