

ICS 11.220

B 41

团 体 标 准

T/CVMA X7—2019

塞内卡病毒荧光 RT-PCR 检测方法

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

(征求意见稿)

2019 - XX - XX 发布

2019-XX-XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2009 的规则起草。

本标准不涉及相关专利。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：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。

本标准起草人：张志、李阳、孙学强、刘爽、徐烽晔、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

塞内卡病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了塞内卡病毒实时荧光RT-PCR检测的技术要求。

本标准适用于塞内卡病毒的核酸检测。

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。凡是注明日期的引用文件，仅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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.1 SVA: 塞内卡病毒 (Senecavirus A)

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

3.3 Ct (或Cp) 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 (Threshold cycle)

3.4 FAM: 羧基荧光素 (Carboxyfluorescein)

4 仪器设备

4.1 荧光 PCR 检测仪。

4.2 台式冷冻离心机: 可控温至 4℃、离心速度可达 12000r/min 以上。

4.3 普通冰箱: 2℃~8℃。

4.4 普通冰柜: -20℃以下。

4.5 超低温冰箱: 可控温至-70℃以下。

4.6 微量移液器: 0.1 μL~2.5 μL、1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL, 并配备与移液器匹配的吸头。

4.7 高压灭菌锅。

5 试剂和耗材

5.1 试剂

5.1.1 RNA 提取试剂盒

5.1.2 SVA 检测引物和 Taqman 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-3' BHQ1

5.1.3 阳性对照: 灭活的 SVA 病毒培养物或体外转录的 cDNA。

5.1.4 阴性对照: 为已知 SVA 阴性的猪的组织悬液。

5.2 耗材

5.2.1 1.5mL 离心管。

5.2.2 0.2mLPCR 薄壁管或八联管。

5.2.3 10-200 μ L 带滤芯吸头。

6 样品的采集、保存和运输

6.1 样品的采集

6.1.1 水泡液采集

典型临床发病动物水泡液用灭菌注射器吸出后装入样品保存管,加青链霉素各1 000IU/mL, 加盖封口, 冷冻保存。

6.1.2 水泡皮采集

用灭菌剪刀剪取水泡皮适量(1g~2g)装入样品保存管,加50%甘油-PBS保存液,使保存液液面没过样品, 加盖封口, 冷冻保存。

6.1.3 全血或血清采集

屠宰场猪的全血或血清直接用离心管接管取不少于5mL, 猪场猪只用无菌注射器抽取静脉血不少于5mL, 室温或37℃放置自然凝集20min~30min, 2 000r/min~3 000 r/min离心10min, 吸取上清液到新的离心管内备用。

6.1.4 组织样品采集

取猪扁桃体、脾脏、淋巴结等主要脏器适量(5g~10g)装入灭菌15mL样品管中, 编号, 备用。

6.2 样品的保存

上述采集的样品可立即用于检测, 不能立即检测的样品, 在2℃~8℃条件下不超过24h, -20℃可以短期保存, -70℃以下可以长期保存。

6.3 样品的运输

样品的运输必须采用低温保存进行运输, 并在规定温度下的保存期内送达。

7 实时荧光 RT-PCR 操作程序

7.1 样品RNA提取

用商品化的RNA提取试剂盒提取样品的RNA, 备用。提取的RNA应立即进行实时荧光RT-PCR扩增, 如在4℃保存, 不宜超过8h, 如需长期保存, 应放置在-70℃中冰箱中。

7.2 反应体系的配置

在反应配置区进行。每个检测反应体系使用18 μ L的实时荧光RT-PCR反应液, 分别加入制备的RNA溶液2 μ L, 使每管总体积达到20 μ L, 编号, 拧紧管盖后, 500 r/min离心30s。

7.3 实时荧光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°C反转录15min, 95°C变性3min, 然后40个循环(95°C 10s, 60°C 20s), 60°C采集信号。

8 结果判定

8.1 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。

8.2 质量控制

读取每个样品的Ct值, 标准阳性对照有特异性扩增曲线而且Ct值 ≤ 30 , 标准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。

8.3 结果描述及判定

8.3.1 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。

8.3.2 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。

8.3.3 被检样品有特异性扩增曲线, 而且 $35 < \text{Ct值} \leq 37$, 判定为可疑, 可疑样品重新检测。如重复后仍然 $35 < \text{Ct值} \leq 37$, 且扩增曲线均为典型的S型曲线, 报告为SVA核酸阳性; 如重复后Ct值 ≤ 35 , 报告为SVA核酸阳性; 如重复后仍然Ct值 > 37 , 报告为SVA核酸阴性。