

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4466—2016

国境口岸中东呼吸综合征冠状病毒 实时荧光 RT-PCR 检测方法

Detection method for *Middle east respiratory syndrome coronavirus*
(MERS-CoV) using real-time qRT-PCR at frontier port

2016-03-09 发布

2016-10-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：周冬根、王燕、翟敏、李红、郑剑宁、胡孔新、施惠祥、裘炯良、卢岳云、阮晨、孙学婷。

国境口岸中东呼吸综合征冠状病毒 实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了中东呼吸综合征冠状病毒的实时荧光 RT-PCR 检测方法,包括检测对象、标本采集和处理、检测程序、结果判定及表述。

本标准适用于对出入境人员疑似感染中东呼吸综合征冠状病毒的实验室检测。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

WS 233 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

WHO 中东呼吸综合征冠状病毒实验室检测推荐方案(2014 版)[Laboratory Testing for Middle East Respiratory, Interim recommendations(revised), September 2014]

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

中东呼吸综合征冠状病毒 *Middle east respiratory syndrome coronavirus; MERS-CoV*

2012 年在中东地区新发现的一种冠状病毒,属于冠状病毒科和冠状病毒属,为分节段的正链 RNA 病毒,主要编码 upE、ORF1a、RNP 等几种蛋白基因。该病毒引起严重急性呼吸道感染症状,严重程度类似 SARS,临床主要表现为发热、咳嗽、呼吸急促和呼吸困难。

4 检测对象

疑似感染中东呼吸综合征冠状病毒的出入境人员。

5 实验室生物安全要求

5.1 实验室应遵循 GB 19489 和 WS 233 对生物安全 2 级(BSL-2)实验室的生物安全要求。

5.2 使用过的实验用品应遵照 GB 19489 对废弃物的处理要求进行无害化处理。

6 仪器和设备

本方法使用的主要仪器如下:

——荧光定量 PCR 仪;

- 生物安全柜；
- 普通冰箱；
- $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱；
- 普通台式离心机；
- 高速冷冻离心机(转速可达 $20\,000\text{ g}$)；
- 微量可调移液器($10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $1\,000\text{ }\mu\text{L}$)及配套带滤芯吸头；
- 离心管(1.5 mL)；
- 涡旋振荡器。

7 试剂

7.1 核酸提取试剂

用病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Kit,德国 Qiagen 公司产品¹⁾,详见说明书。或采用具有类似功能的核酸提取试剂进行核酸提取。

7.2 荧光 RT-PCR 试剂

用 AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit,美国 Life Technologies 公司产品¹⁾,详见说明书。或采用具有类似功能的反应试剂进行配制。

7.3 DEPC 水

DEPC 处理过的不含 RNA 酶的水。

7.4 实时荧光 RT-PCR 检测引物和探针

针对中东呼吸综合征病毒以及人核糖核酶 P 基因核苷酸高度保守区进行设计,引物和探针序列见表 1。

表 1 中东呼吸综合征冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测的引物和探针

引物/探针名称	序列(5'-3')	靶标基因
upE-FP	GCAACGCGCGATTTCAGTT	upE
upE-RP	GCCTCTACACGGGACCCATA	
upE-PP	FAM-CTCTTCACATAATCGCCCCGAGCTCG-BHQ1	
NP-FP	GGCACTGAGGACCCACGTT	NP
NP-RP	TTGCGACATACCCATAAAAAGCA	
NP-PP	HEX-CCCCAAATTGCTGAGCTTGCTCCTACA-BHQ2	
RNP-FP	CTGTTTGGGCTCTCTGAAAGTG	RNase P
RNP-RP	AGAAGCGCTGCTCGGCA	
RNP-PP	CY5-CGCCAAGGCTGCGGTGTCCACC-BHQ2	

1) 给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

8 检测程序

8.1 样品类型

采集疑似人员的上呼吸道标本,包括鼻拭子、咽拭子、鼻咽抽取物及漱口液等,也可采集下呼吸道标本,包括痰液、气管吸取物、肺洗液及肺组织标本等。也可采集疑似人员的血清样本、尿液样本等,具体可参考《WHO 中东呼吸综合征冠状病毒实验室检测推荐方案(2014 版)》。

标本应保存在 4℃ 条件下,24 h 内运送至实验室;未能 24 h 内送至实验室的,应置-70℃ 或以下保存。

8.2 核酸提取

样本核酸提取按照试剂盒相关操作说明进行 RNA 核酸提取。

8.3 阳性对照、阴性对照和空白对照设置

阳性对照可为中东呼吸综合征冠状病毒核酸,也可为根据中东呼吸综合征冠状病毒目标扩增核苷酸序列体外合成的 RNA 片段(参见附录 A);阴性对照为不含中东呼吸综合征冠状病毒核酸的标本;空白对照为 DEPC 水。

8.4 实时荧光 RT-PCR 检测

8.4.1 实时荧光 RT-PCR 反应液准备

实时荧光 RT-PCR 反应体系采用以下参数配制:

反应组分	终浓度
2×RT-PCR 缓冲液	1×
upE-FP	0.4 μmol/L
upE-RP	0.4 μmol/L
upE-PP	0.2 μmol/L
NP-FP	0.4 μmol/L
NP-RP	0.4 μmol/L
NP-PP	0.2 μmol/L
RNP-FP	0.2 μmol/L
RNP-FP	0.2 μmol/L
RNP-FP	0.1 μmol/L
RT-PCR Enzyme Mix	1×
最终加入 RNA 模板 5.0 μL,并加水补足至 25 μL。	

8.4.2 扩增程序

程序设置以 ABI Prism 7500 fast 型全自动荧光定量 PCR 检测仪²⁾为例说明,荧光信号设置为:荧光报告基团为:FAM、HEX 及 CY5 通道,淬灭基团为 BHQ1、BHQ2,Passive Reference: NONE。荧光 RT-PCR 扩增程序按照表 2 中的程序进行设置,反应总体积为 25 μL。对于其他型号的荧光定量 PCR 仪应按实际机型进行反应程序设置,没有 ROX 荧光通道的荧光定量 PCR 仪,不进行 ROX 的设置。

2) 给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

表 2 样本反应扩增程序

步骤	反应温度	时间	是否采集荧光信号	循环数
逆转录	45 ℃	10 min	否	1
变性	95 ℃	15 min	否	1
扩增及荧光收集	95 ℃	15 s	否	40
	60 ℃	60 s	是	

9 结果判定及表述

9.1 荧光域值的设定

RT-PCR 反应完成后应设定荧光阈值以分析样品的 Ct 值。以 PCR 反应的前 3 个~15 个循环的荧光信号作为基线信号(噪音),Ct 值理论上定义为基线信号的标准偏差的 10 倍。在实际应用中可以根据仪器基线信号进行人工调整,设定原则是以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线(无规则的噪音线)的最高点,且不出现 Ct 值为准。

9.2 实时荧光 RT-PCR 反应的质量控制

- 对照反应结果应同时符合以下三个条件,否则此次取样或试验结果无效:
- 阳性对照 FAM 及 HEX 通道具有明显扩增曲线;
 - 阴性对照、空白对照均无扩增曲线;
 - 样本的 CY5 通道具有明显扩增曲线,若无明显扩增曲线,则此样本不合格,需重新采样检测。

9.3 实时荧光 RT-PCR 检测结果判定及表述

9.3.1 结果判定

- 当同时进行的阳性、阴性和空白对照实验结果正常,本方法检验结果判定如下:
- 检测样品 FAM 通道及 HEX 通道有明显的荧光增幅曲线,且 Ct 值≤35 时,判为阳性。
 - 检测样品 FAM 通道及 HEX 通道荧光增幅曲线的 Ct 值介于 35 和 40 之间时,建议采用浓缩方式处理核酸样本,再重新进行实时荧光 PCR 检测。若重新检测的 Ct 值有明显减少趋势,且曲线有明显的对数增长期,判为阳性,否则判为阴性。
 - 检测样品 FAM 通道及 HEX 通道,其中一个通道具有明显荧光增幅曲线,另一个通道无荧光增幅曲线,此类样本建议用其他方法进一步检测验证。
 - 检测样品 FAM 通道及 HEX 通道均无荧光增幅曲线,判为阴性。

9.3.2 结果表述

实时荧光 RT-PCR 检测阳性结果表示样本中东呼吸综合征冠状病毒核酸阳性,实时荧光 RT-PCR 检测阴性结果表示样本中东呼吸综合征冠状病毒核酸阴性。

附 录 A
(资料性附录)
阳性对照制备程序

将 upE 基因目标扩增序列与 NP 基因目标扩增序列通过一段结构为 TTTT 的 Spacer 连接,通过体外化学合成 DNA 片段,然后克隆于载体上,用转录试剂盒进行体外转录,形成 RNA 阳性对照模板。

序列片段:

TTTCGTGCCT	GCAACGCGCG	ATTCAGTTCC	TCTTCACATA	40
ATCGCCCCGA	GCTCGCTTAT	CGTTTAAGCA	GCTCTGCGCT	80
ACTATGGGTC	CCGTGTAGAG	GCTAATCCAT	AAACTCGGCA	120
CTGAGGACCC	ACGTTGGCCC	CAAATTGCTG	AGCTTGCTCC	160
TACAGCCAGT	GCTTTTATGG	GTATGTCGCA	ATTTAAACTT	200
TAGGCTTGCT	GTTTGGGCTC	TCTGAAAGTG	ACGCCAAGGC	240
TGCGGTGTCC	ACCAACTGCC	GAGCAGCGCT	TCTCCATGGA	280

