

鹦鹉热衣原体超快速荧光 PCR 检测技术规范

编制说明

一、任务来源（包括目的意义）

鹦鹉热衣原体（*Chlamydia psittaci*, Cps）是一种重要的世界性人兽共患病原体，超过 467 种鸟类和许多非鸟类家畜以及啮齿类动物都易感 Cps，同时也可实现人际传播，造成重大的经济损失和公共卫生危害。Cps 感染动物后，能引起肺炎、结膜炎等一系列病变，并可造成母畜流产和幼仔存活率降低。人主要通过直接接触携带病原体的鸟类或禽类或间接接触受感染鸟类的呼吸道分泌物、干粪便的气溶胶或羽毛粉尘引起感染，感染后可导致严重疾病，包括肺炎、急性呼吸窘迫综合征、脓毒症、脓毒性休克和多器官系统衰竭，甚至死亡。与其他衣原体相比，Cps 致病性更强，死亡率更高。在 Cps 感染早期，临床症状与流感、伤寒、粟粒性肺结核、传染性单核细胞增多症相似；当肺炎症状明显时，又与支原体肺炎、细菌性肺炎、病毒性肺炎、肺结核等疾病症状相似。极具迷惑性的临床特征，导致该病容易被忽略，常常导致严重的后果。

近几年伴随我国鸟类宠物热的兴起，人禽共居现象日益增多，国内多地出现人感染 Cps 病例，危重病例时有发生。坚持“人病兽防，关口前移”的原则，从源头前端阻断 Cps 的传播路径具有重要的公共卫生意义，才能更好的维护畜牧业生产安全、公共卫生安全和国家生物安全。Cps 的检测方法包括病原学检测、血清学检测和分子生物学检测。病原学检测由于 Cps 分离培养周期长、难度大且存在一定的生物安全风险，2018 年开始世界动物卫生组织便不再将 Cps 分离培养作为首选检测方法。而血清学检测如免疫荧光、补体结合试验、ELISA 等存在检测时间长、特异性低和灵敏度不足等缺点。随着分子生物学技术的发展，分子生物学技术以其快速、准确、便捷的特点脱颖而出，成为 Cps 临床检测的首选方法，其中，超快速荧光 PCR 检测方法是一种基于快速温控模块技术（升降温速率 40 °C/s 以上），结合快速启动酶及高特异性预混反应体系所构建的高效核酸扩增检测方法，可在 8~15 min 内完成 45 个循环反应，实现在 30 min 内完成对临床样品的核酸提取和检测，成为疾病爆发检测场景中不可缺少的一环，因此，东莞市动物疫病预防控制中心提出《鹦鹉热衣原体超快速荧光 PCR 检测技术规范》的团体标准立项申请。目前，经专家研讨，立项标准符合国家政策，申报的团体标准满足立项条件，同意该标准立项。

二、起草工作简要过程（含主要参加单位及工作组成员）

1、标准起草阶段

为制定本标准，本项目组织有关技术人员参阅技术专著、国家、地方标准等大量文献，并进行了预讨论工作。本项目主要开展 Cps 超快速荧光 PCR 试验方法各项参数的验证，包括了方法的特异性、敏感性、重复性和临床样品的验证。本研究使用的试剂均为同批次制品或者产品，尽可能确保了各要素效价的稳定性和一致性，保证了试验体系的稳定。2025 年 7 月，我们初步完成了标准的修订并送交同行专家审定。

2、标准参与单位和参与人员

文件起草单位包括东莞市动物疫病预防控制中心、广东省动物疫病预防控制中心、超快生物技术（广州）有限公司、广东省疾病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、广东省农业科学院动物卫生研究所、深圳市动植物疫病预防控制中心、海南省疾病预防控制中心、广

州国家实验室、东莞市洪梅镇农业技术服务中心、东莞市东坑镇农业技术服务中心等多家单位联合起草。

本文件起草人为张险朋、叶健、刘雪怡、管知深、李柏生、吴新伟、曹兰、柯艳坤、徐振娜、洪伟彬、陈晶、李丹丹、李小军、张远龙、卢受昇、徐强、韩霄、林仰孝、卢伟昌、李敏、钟群芳、谭铭光、林梦哲等。

文件起草的具体分工如下：

张险朋：项目负责人，负责标准的立项、整体方案确立及宣贯，负责标准的审阅、项目申报建议及相关技术文件的校订；

叶健：负责标准中方法建立、实验数据分析起草，负责各版本标准稿的讨论和修订工作及征求意见后的修改工作；

刘雪怡、徐振娜、洪伟彬：负责标准中部分实验室方法的建立、优化及验证；

李柏生、吴新伟、曹兰、柯艳坤：负责标准中部分方法的起草、验证；

管知深、谭铭光、林梦哲：负责仪器设备的验证、负责耗材的选择；

陈晶、李丹丹、徐强、韩霄、林仰孝、卢伟昌、李敏、钟群芳：负责部分标准方法的验证及检测方法的推广应用；

李小军、张远龙、卢受昇：负责标准文本质量的整体把握。

三、编写原则和确定标准主要内容的依据

（一）框架的确定

根据 Cps 超快速荧光 PCR 检测技术规范的要求，结合标准撰写格式确定标准的框架为适用范围、规范性引用文件、术语和定义、缩略语、仪器设备、试剂和耗材、采样与前处理、样品及细菌核酸的提取、荧光 PCR 检测、结果判定。

（二）标准的编写原则

1. 标准引用

检测样品的采集和用水方面引用了已经发布的国家标准 GB 19489-2008 《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》和行业标准 NY/T 541-2016 《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》。

2. 实际科研和检测工作经验

标准编写人员为张险朋、叶健、刘雪怡、管知深、李柏生、吴新伟、曹兰、柯艳坤、徐振娜、洪伟彬、陈晶、李丹丹、李小军、张远龙、卢受昇、徐强、韩霄、林仰孝、卢伟昌、李敏、钟群芳、谭铭光、林梦哲等，多年来一直从事人畜共患病的流行病学研究和疫病防控工作，在本标准的编写过程中，结合实验室的实际工作经验，对试验操作的具体细节进行编写。

项目组在人畜共患病检测方面具有丰富的经验，在 Cps 诊断方面开展了大量的研究工作，东莞市动物疫病预防控制中心在 2003 年通过了中国合格评定国家认可委员会（CNAS）认可，2023 年被认定为“东莞市人兽共患病重点实验室”，连续 5 年通过了全国水产技术推广总站组织的水生动物防疫系统实验室检测能力验证，每年平均检测动物样品近 10 万份，监测项目 70 多个。目前已建立了 Cps 超快速荧光 PCR 检测技术，并应用于临床样品的检测，在 Cps 快速诊断方面发挥了重要作用。主持制定行业标准《鹦鹉热诊断技术》NY/T 4646-2025，论文《禽衣原体病实验室诊断技术研究进展》在 2022 年 12 月发表于《中国动物检疫》。

（三）主要内容及其确定依据

1 材料与方法

1.1材 料

1.1.1 仪器设备

核酸提取仪（广州达安基因股份有限公司）；超快速荧光 PCR 仪（超快生物技术（广州）有限公司）；生物安全柜（ESCO，广州合众生物科技股份有限公司）。

1.1.2 试剂材料与菌株

5×PCR Buffer、快速启动酶、dNTP 购自超快生物技术（广州）有限公司；核酸提取试剂购自广州达安基因股份有限公司；Cps 荧光 PCR 检测试剂盒购自深圳市莱孚生物科技有限公司；大肠杆菌 0157、沙门氏菌均由本实验室分离鉴定保存；禽流感病毒 H5/H7/H9 亚型抗原、新城疫病毒抗原购自哈尔滨维科生物技术有限公司；100 份 Cps 临床样本由本实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 引物、探针设计

根据 NCBI 收录的 Cps OmpA 基因序列（GenBank 登录号：MK751471.1）设计引物和探针，Cps-P 的 5′ 端标记 FAM 荧光报告基团，3′ 端标记 MGB 淬灭基团，详见表 1；内参引物探针参考文献内源性内参引物探针序列，探针 5′ 端标记 CY5 荧光报告基团，3′ 端标记 BHQ2 淬灭基团，详见表 1。所有引物、探针均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

表 1 设计的引物和探针

引物、探针名称	序列（5′ -3′ ）
Cps-F	CGCTTACGGAAGGCATAT
Cps-R	TGGAAGATCGGTAGAGATTG
Cps-P	FAM-ATGCAGCCTTCCTAGCCTTAAACA-MGB
β -actin-F	AGTCCGCCTAGAAGCATTTG
β -actin-R	TGTCCACCTTCCAGCAGATG
β -actin-P	CY5-AGTCCGGCCCCTCCATCGTCCA-BHQ2

1.2.2 重组质粒的构建

按照表 2 的反应体系和程序，扩增 Cps OmpA 基因序列片段，将扩增产物进行胶回收和双酶切后，连接至 pUC57 载体上，再转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中，得到重组质粒，提取重组质粒进行 PCR 检测和测序，鉴定为 pUC57-OmpA 重组质粒，质粒浓度约为 3.702×10⁹ copies/μL。

表 2 重组质粒构建的反应体系和程序

反应体系		反应程序			
组分	使用量	步骤	温度(℃ (	时间	循环数(次)
DNA 模板	1 μ g	预变性	98	2min	1
2×Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix1	25 μ L	变性	98	10s	35

Cps-F	2.5 μL	退火	65	15s	
Cps-R	2.5 μL	延伸	72	90s	
5×SuperFi™ GC Enhancer	10 μL	终延伸	72	5min	1
Nuclease-Free Water	Up to 50 μL	保存	4	Hold	1

1.2.3 核酸提取

按照广州达安基因股份有限公司《核酸提取或纯化说明书》（磁珠法）操作提取核酸。

1.2.4 反应体系的优化

对 Cps 超快速荧光 PCR 反应体系的引物探针浓度和退火温度进行优化。引物与探针初始浓度为 10 μmol/L, 引物探针浓度优化设置如表 3, 退火温度设置为 53℃, 55℃, 56℃, 58℃, 60℃。

表 3 Cps 超快速荧光 PCR 引物探针浓度优化

组合	上下游引物 使用量（μL）	探针 使用量（μL）
1	各 5	2.5
2	各 4	2
3	各 3	1.5
4	各 2	1

1.2.4 超快速荧光PCR反应体系和程序

优化后的超快速荧光 PCR 反应体系和程序如表 4 和表 5 所示。

表 4 经优化的 Cps 超快速荧光 PCR 反应体系

组分	使用量（μL）
5×PCR Buffer	10
dNTP	0.8
快速启动聚合酶（5 U/μL）	4
Cps-F（10 μmol/L）	5
Cps-R（10 μmol/L）	5
Cps-P（10 μmol/L）	2.5
β-actin-F（10 μmol/L）	2
β-actin-R（10 μmol/L）	2
β-actin-P（10 μmol/L）	1

Cps 重组质粒	8
内参	2
DEPC H ₂ O	7.7

表 5 Cps 超快速荧光 PCR 反应程序

步骤	温度（℃）	时间（s）	循环（次）
预变性	95	60	1
变性	95	1	45
退火延伸	60	6	

1.2.5 灵敏度试验和标准曲线绘制

将原始浓度为 3.702×10^9 copies/ μL 的 Cps 重组质粒进行 10 倍比稀释，稀释 7 个梯度，稀释浓度为表 6 所示，每个梯度重复检测 3 次，以 100%检出作为最低检出限，并绘制标准曲线。

表 6 Cps 重组质粒标准品的稀释浓度

稀释倍数	稀释浓度（copies/ μL ）
10^{-2}	3.702×10^7
10^{-3}	3.702×10^6
10^{-4}	3.702×10^5
10^{-5}	3.702×10^4
10^{-6}	3.702×10^3
10^{-7}	3.702×10^2
10^{-8}	3.702×10^1

1.2.6 特异性试验

提取大肠杆菌 0157、沙门氏菌、禽流感病毒 H5/H7/H9 亚型抗原、新城疫病毒抗原的核酸，使用建立的 Cps 超快速荧光 PCR 方法进行扩增，评价其特异性。

1.2.7 重复性试验

将 Cps 重组质粒分别稀释 102 倍，104 倍，106 倍进行检测，每个梯度重复检测 5 次，根据 CT 值计算变异系数，评价重复性。

1.2.8 临床样本检测

100 份临床样本，包括 50 份喉拭子、50 份泄殖腔拭子。进行核酸提取后，分别用超快速荧光 PCR 方法与荧光 PCR 方法检测，比较两种方法的符合率。

2 结果

2.1 反应体系的优化

对 Cps 超快速荧光 PCR 的反应体系进行引物探针、温度的优化, 以达到反应扩增效率最大化, 结果如图 1 和图 2 显示, 当反应体系温度为 60℃、引物探针添加量为 5/5/2.5 时, 反应体系达到最佳状态。

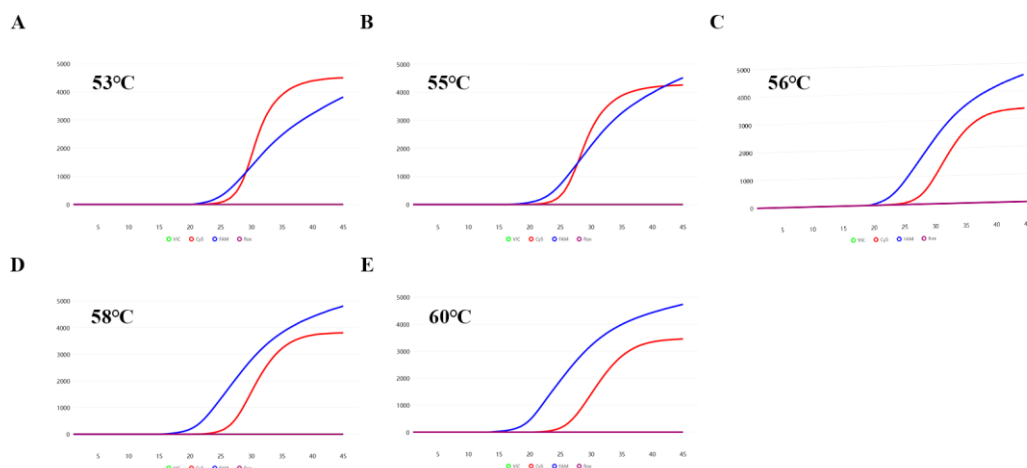


图 1 Cps 超快速荧光 PCR 温度优化

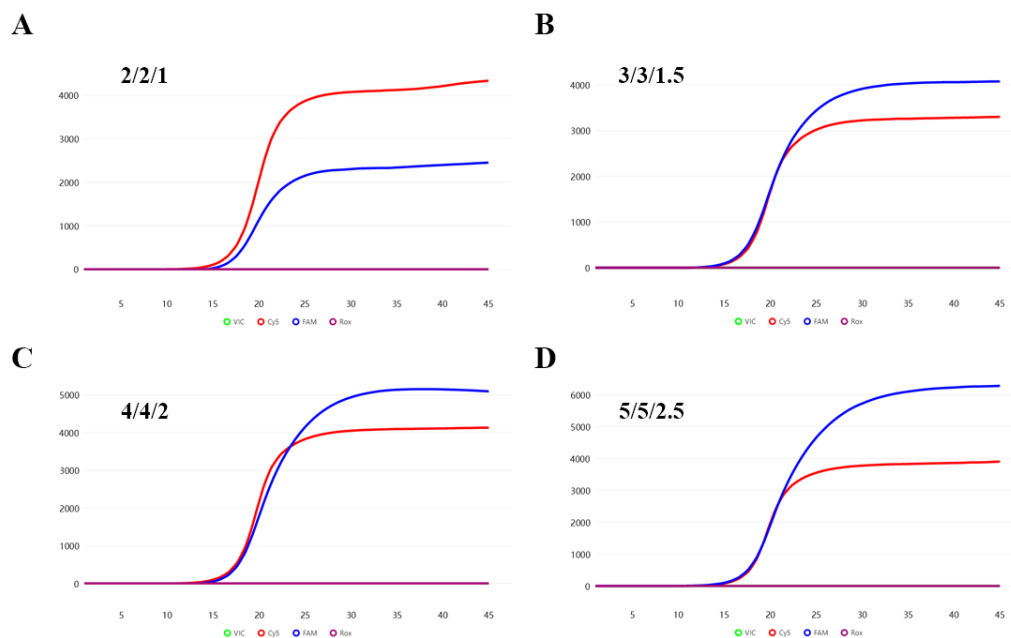


图 2 Cps 超快速荧光 PCR 引物探针浓度优化

2.2 标准曲线绘制

将 Cps 重组质粒进行 10 倍比稀释, 浓度分别为 $3.702 \times 10^1 \sim 3.702 \times 10^7$ copies/ μL , 根据 Ct 值平均值绘制标准曲线, 各稀释浓度的扩增曲线见图 1。循环阈值与质粒浓度拷贝数的常用对数关系为 $Y = -3.2761x + 40.056$, 标准曲线 $R^2 = 0.9998$, $R^2 > 0.98$, 说明该方法具有较

好的线性关系。

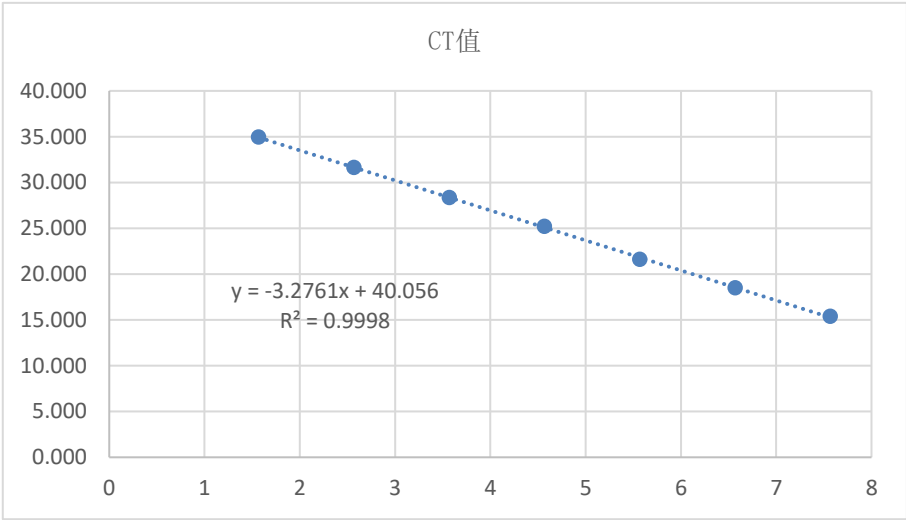


图 3 Cps 超快速荧光 PCR 标准曲线图

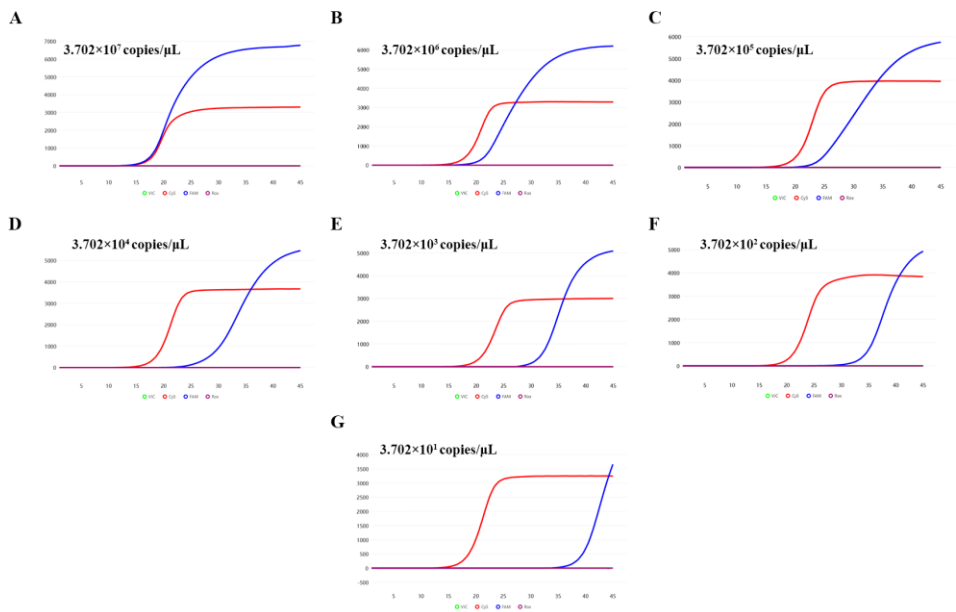
2.3 灵敏度试验结果

将 Cps 重组质粒 10 倍比稀释 7 个梯度后，浓度分别为 $3.702 \times 10^7 \sim 3.702 \times 10^1$ copies/μL，扩增结果见表 7，扩增曲线见图 4。在 Cps 重组质粒浓度为 3.702×10^1 copies/μL 时，能够 100% 检出，将该方法的灵敏度定为 3.702×10^1 copies/μL。

表 7 Cps 超快速荧光 PCR 灵敏度试验结果

质粒浓度 (copies/μL)	Ct 平均值		检出率
	Cps 重组质粒	内参	
3.702×10^7	15.385	14.804	100%
3.702×10^6	18.505	15.067	100%
3.702×10^5	21.613	15.515	100%
3.702×10^4	25.188	15.260	100%
3.702×10^3	28.347	15.313	100%
3.702×10^2	31.628	15.487	100%
3.702×10^1	34.969	15.465	100%

注：“—”代表未完全检测到 Cps 重组质粒，故无法计算该结果。



注：蓝色曲线（FAM）为 Cps 重组质粒的扩增曲线，红色曲线（Cy5）为内参的扩增曲线。

图 4 Cps 超快速荧光 PCR 扩增曲线图

2.4 特异性试验结果

对大肠杆菌 0157、沙门氏菌、禽流感病毒 H5/H7/H9 亚型抗原、新城疫病毒抗原核酸进行扩增，以无核酸酶水为阴性对照。仅有 Cps 抗原核酸能有扩增曲线，其余病原核酸样本和无核酸酶水均未检出，说明该方法对 Cps 具有较好的特异性。

2.5 重复性试验结果

分别计算 Cps 重组质粒稀释 10² 倍、10⁴ 倍、10⁶ 倍检测结果的 CV 值，结果如表 8 所示。CV 值分别为 0.37%、0.33%、0.39%，内参结果的 CV 值分别为 0.21%、0.57%、0.23%。所有结果的 CV 值均小于 1%，说明该方法具有非常好的重复性。

表 8 Cps 超快速荧光 PCR 重复性试验

稀释倍 数	Ct 值	内参 Ct 值	稀释倍 数	Ct 值	内参 Ct 值	稀释倍 数	Ct 值	内参 Ct 值
	15.278	14.767		21.621	15.512		28.307	15.342
	15.421	14.841		21.662	15.672		28.548	15.258
10 ² 倍	15.285	14.806	10 ⁴ 倍	21.716	15.585	10 ⁶ 倍	28.416	15.339
	15.382	14.784		21.641	15.657		28.228	15.311
	15.376	14.852		21.498	15.434		28.435	15.269
平均值	15.348	14.81	平均值	21.628	15.572	平均值	28.387	15.304
标准差	0.0568	0.032	标准差	0.072	0.089	标准差	0.110	0.035

CV 值	0.37%	0.21%	CV 值	0.33%	0.57%	CV 值	0.39%	0.23%
------	-------	-------	------	-------	-------	------	-------	-------

2.6 临床样品检测结果

分别用建立的 Cps 超快速荧光 PCR 方法与商品化 Cps 荧光 PCR 检测试剂盒检测 100 份经核酸提取的临床样本，两种方法的检出率均为 6%（6/100），符合率 100%。说明建立的 Cps 超快速荧光 PCR 方法适用于临床常规样本检测。

四、技术经济分析论证和预期的经济效益

本项目建立的 Cps 超快速荧光 PCR 方法，可以在 15 min 内完成 Cps 核酸检测，为预警和防控 Cps 病提供了新的技术手段。文本的发布将对畜牧业健康发展起到很大作用，同时也可以降低人感染的风险，保障公共卫生安全。

五、采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比

本文建立的 Cps 超快速荧光 PCR 方法为国内、外首创，未采用国际标准。

六、与现行法律、法规、政策及相关标准的协调性

与现行法律法规、强制性标准等上位标准关系没有冲突。国内发布团体标准 2 项：广西标准化协会发布《动物鹦鹉热衣原体实时荧光 PCR 检测方法》（T/GXAS 717-2024）、江苏省预防医学会发布《鹦鹉热衣原体环介导等温扩增（LAMP）检测方法》（T/JPMA 033-2025）。国内发布行业标准 3 项：全国动物卫生标准化技术委员会发布行业标准《鹦鹉热诊断技术》（NY/T 4646-2025）、国家认证认可监督管理委员会发布行业标准《鹦鹉热检疫技术规范》（SN/T 2846-2011）、全国动物防疫标准化技术委员会发布行业标准《动物衣原体病诊断技术》（NY/T 562-2015）。生物多样性与生态安全大数据平台发布《Compendium of Measures to Control Chlamydia psittaci Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 2017》提供控制 Cps 感染的标准化程序。NY/T 4646-2025、SN/T 2846-2011、NY/T 562-2015 主要规定 Cps 的临床诊断、样品采集与处理、病原分离鉴定传代培养技术、血清学诊断技术和实时荧光 PCR 方法的操作技术的要求，基本满足 Cps 的诊断与检测。T/GXAS 717-2024、T/JPMA 033-2025 规定 Cps 的实时荧光 PCR 和环介导等温扩增检测技术的规范，相较于两种检测方法，本标准建立的 Cps 超快速荧光 PCR 核心优势是快速性，荧光 PCR 反应仅需 15 min，加上样品前处理和核酸提取，可以在 30 min 内完成检测，同时兼具优异的重复性和特异性，适用于疫病爆发的检测场景，以快速控制疫情。

七、贯彻实施标准的措施和建议

本标准发布后，可以通过相关部门组织宣贯，推荐给有相应检测设施和检测项目的实验室使用，也可以委托项目起草单位或其他相关单位组织技术培训的方式推广应用本检测标准。

八、其它应予说明的事项

无。