ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 19-2020

猪圆环病毒3型荧光PCR检测方法

Real-time PCR assay for detection of porcine circovirus type 3

中国兽医协会
CVMA

2020-12-22 发布　　2020-12-22 实施

中 国 兽 医 协 会　发 布

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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：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、中国兽医药品监察所。

本文件主要起草人：张志、孙学强、李阳、刘爽、徐烽烨、宫枫举、官丽娟、邵钰、李翠翠、李晓成、蒋文明、于晓慧、王琳、周晓翠、王团结。

中国兽医协会
CVMA

猪圆环病毒 3 型实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猪圆环病毒3型实时荧光PCR检测的技术要求。

本文件适用于猪圆环病毒3型的核酸检测。

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，注明日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注明日期的引用文件，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 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PCV 3：猪圆环病毒3型（porcine circovirus type 3）

荧光PCR：实时荧光聚合酶链式反应（Real-time PCR）

Ct：扩增循环次数（Threshold cycle）

FAM：羧基荧光素（Carboxyfluorescein）

5 仪器设备与耗材

5.1 荧光 PCR 检测仪

5.2 台式冷冻离心机（可控温至 4 ℃、离心速度可达 12000 r/min 以上）

5.3 冰箱（2 ℃~8 ℃、-20 ℃和-70 ℃三种）

5.4 微量移液器（0.1 μL~2.5 μL、1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL）及匹配的吸头

5.5 高压灭菌锅

5.6 耗材

5.6.1 1.5 mL 离心管

5.6.2 0.2 mL PCR 薄壁管或八联管

5.6.3 10 μL~200 μL 带滤芯吸头

中国兽医协会 CVMA

5.6.4　15 mL 样品保存管

6　试剂

6.1　病毒 DNA 提取试剂盒

6.2　PCV 3 检测引物和荧光探针，其序列如下：

上游引物qPCV3-F：5’-CGGAGACGKCGGGAAATCTG-3’；
下游引物qPCV3-R：5’-CCCCCGTGGCTTGAAATAC-3’；
荧光探针qPCV3-Probe：5’-FAM-CACCCCGCAAAAATCACGCAAACC-BHQ1-3'。

6.3　荧光 PCR 反应液

荧光PCR反应液的配制按照附录A配置，除另有规定外，所用生化试剂均为分析纯，试验用水符合GB/T 6682的要求。

6.4　阴性及阳性对照

阴性对照和阳性对照的制备方法，按照附录B配置。

7　样品的采集、保存和运输

7.1　样品的采集

样品的采集与运输按照NY/T 541的规定执行。可取猪的主要脏器（脾脏、扁桃体、淋巴结）、EDTA抗凝全血等适量（5 g~10 g）装入灭菌的15mL样品保存管中，编号，备用。优先使用组织样品，其次为抗凝血。

7.2　样品的保存

上述采集的样品可立即用于检测。如不能立即检测，样品保存在2 ℃~8 ℃条件下不超过24 h，-20 ℃下保存3个月，-70 ℃可以保存数年以上。

7.3　样品的运输

必须低温保存运输样品，且在规定温度下的保存期内送达和检测。

7.4　样品的处理

7.4.1　抗凝血液样品：无需进行处理，直接用于核酸提取。
7.4.2　组织样品：取1 g解冻的组织，剪碎，加入5mL PBS（0.01 M，pH 7.2）进行研磨，制备组织匀浆，8 000 r/min离心5 min，取上清用于后续的核酸提取。

8　荧光 PCR 操作程序

8.1　样品DNA提取

样品DNA提取在核酸提取区进行，分区要求和基因扩增见SN/T 1193，涉及的实验室生物安全管理要求见GB 19489。可用商品化的DNA提取试剂盒提取样品的DNA。提取的DNA应立即进行实时荧光PCR扩增；如DNA模板需在4 ℃保存，不宜超过24 h，或应置-20 ℃或-70 ℃保存。

8.2 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 μL的荧光PCR反应液，2 μL的引物混合液（含终浓度为0.5 μm的上下游引物和探针），再分别加入提取的DNA溶液5 μL，使每管总体积达到25 μL，编号，盖紧管盖，500 r/min 离心30 s。

8.3 荧光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：

95 ℃变性3 min，然后40个循环（95 ℃ 10 s，60 ℃ 15 s），并在循环反应中60 ℃采集FAM信号。

9 结果判定

9.1 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，以阈值线刚好超过阴性样品扩增的最高点为准。

9.2 质量控制

读取每个样品的Ct值。当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。

9.3 结果描述及判定

9.3.1 被检样品有特异性扩增曲线，而且Ct值≤37，判定为PCV-3核酸阳性。

9.3.2 被检样品无S型特异性扩增曲线，判定为PCV-3核酸阴性。

9.3.3 被检样品有S型特异性扩增曲线，而且37<Ct值＜40，判定为可疑，可疑样品重新检测。如重复检测后Ct值＜40，且扩增曲线为典型的S型特异性曲线，判定为PCV-3核酸阳性，否则判定为PCV-3核酸阴性。

10 注意事项

10.1 本方法使用国家农业行政主管部门批准的其他检测引物、探针时，应对检测程序和判定标准作相应调整。

10.2 本方法中的核酸提取可用酚-氯仿法，也可使用商品化的核酸提取试剂盒。

10.3 本方法使用过的实验器材和PCR反应管，禁止高温高压处理，应用2 %的84消毒液浸泡30 min后，再废弃处理。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（规范性）
荧光PCR反应液组成

荧光PCR反应液组成

1×荧光PCR反应液含：50 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.3），2.5 mmol/L $MgCl_2$，0.2 mmol/L dNTP mix，1U Taq酶，2 mmol/L DTT，5 %甘油，其余为无核酶水。

中国兽医协会
CVMA

附　录　B
（规范性）
阳性对照和阴性对照

B.1　阴性对照

取1 g健康猪的脾脏等组织样品，剪碎，加入5 mL PBS（0.01 M，pH7.2）进行研磨，制备组织匀浆，60 ℃水浴30 min，8 000 r/min离心5 min，取上清用孔径为0.22 μm的滤膜过滤后分装，即为阴性对照。

B.2　阳性对照

采用人工合成的方法合成一段含有PCV-3靶序列的核酸，该核酸序列为本文件6.2中上下游引物对应的核酸靶基因序列，将合成的序列连接到pUC18载体中，作为阳性对照。

其核酸序列为：cggagacggcgggaaatctgactgaagttgctgagaagatgcctgcagtatttatacgctatgggcggggtttgcgtgatttttgcggggtgatggggttgggtaaaccgcgtgattttaaaactgaagtttatgtttttattggtcctccaggttgcgggaaaacgcgggaagcttgtgcggatgcggctgcgcgggaattgcagttgtatttcaagccacgggggg。

中国兽医协会
CVMA