《猪塞尼卡谷病毒的检测 重组酶恒温扩增法》地方标准编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

《猪塞尼卡谷病毒的检测 重组酶恒温扩增法》为山东省市场监督管理局《关于下达2020年山东省地方标准制订项目计划的通知》的任务之一。本文件由山东省畜牧兽医局提出并组织实施，由山东省畜牧业标准化技术委员会归口，由山东师范大学组织起草。

（二）起草单位和主要起草人信息

起草单位信息表

顺序	单位名称	统一社会信用代码	所在地	联系人	联系电话
1	山东师范大学	1237000049557382XT	济南市	曾庆良	0531-86180015
2	山东师大瑞柏生物科技有限公司	91370100MA953QUF9T	济南市	陈蕾	15806620006
3	招远市动物疫病预防控制中心	12370685493571054B	招远市	苏兴海	13361308096
4	济南市农业科学研究院	12370100689845547 9	济南市	李波	15553105257
5	滨州市环境保护科学技术研究所	12371600F50480670B	滨州市	刘姝	0543-3157158
6	临朐县政务服务中心	12370724MB2881411W	潍坊市	刘晶	（0536）3356628
7	桂林市临桂区动物疫病预防控制中心	12450322677712026B	桂林市	莫建新	13877323766
8	安普未来（常州）生物科技有限公司	91320412MA24U74R38	常州市	宋江华	15958215004

起草人信息表

顺序	姓名	身份证号	所在地	所在单位	联系电话
1	陈蕾	370283198505055229	济南市	山东师范大学/山东师大瑞柏生物科技有限公司	15806620006
2	于观留	150204198806050636	济南市	山东师范大学	15706419681
3	苏兴海	370624197501032617	招远市	招远市动物疫病预防控制中心	13361308096
4	吕政印	371202197509137414	济南市	济南市农业科学研究院	13031767809
5	李现胜	370724197409264795	潍坊市	临朐县政务服务中心	13562673951
6	刘姝	372301198501100021	滨州市	滨州市环境保护科学技术研究所	18005438077
7	廖炳次	450322197607010513	桂林市	桂林市临桂区动物疫病预防控制中心	13878320386
8	杨桂文	370102196705252996	济南市	山东师范大学	13356661922
9	刘国宪	130406198204090331	常州市	安普未来（常州）生物科技有限公司	13810919601

（三）起草过程

1 起草单位和主要起草人任务分工

人员	分工
陈蕾	负责与标准相关材料的收集整理，标准草案的起草，征求意见后标准修改等工作
于观留	负责标准的申报，征求意见的发起，专家审查会议的组织等工作
苏兴海、吕政印	检测引物和探针的设计及筛选
廖炳次、刘国宪	检测方法特异性和敏感性分析
李现胜、刘姝	组织样本和环境样本的收集

2 起草过程

2021 年 1 月-2021 年 5 月：成立标准起草组，召开项目协调会，明确标准各项指标，分解检验测试等各项任务，并

制定具体工作进度计划。

2021 年 6 月-2021 年 7 月：召开标准起草组会议，进行阶段性总结，针对存在问题研究解决对策，对标准部分内容进行调整，安排比对试验，确定试验任务。

2021 年 8 月-2021 年 9 月：对具体实验、实验数据进行整理和汇总。

2021 年 9 月-2021 年 10 月：对实验进行验证，并拟定《塞尼卡谷病毒的恒温扩增检测技术规范》草案。

2021 年 10 月-2021 年 12 月：对形成的草案进行征求意见，共对 30 个单位或者专家发送了“地方标准草案征求意见稿”，收到“地方标准草案征求意见稿”后，回函的单位或专家数：30 个。收到“地方标准草案征求意见稿”后，回函并有建议或意见的单位或专家数：30 个。

委托山东省动物疫病预防与控制中心、山东省农业科学院畜牧兽医研究所、山东省农业科学院家禽研究所对标准草案中的标准技术指标进行验证，验证结果一致。

2022 年 1 月-2022 年 3 月：根据意见对草案进行修改，整理相关材料，申请审查。

2022 年 3 月-2022 年 12 月：根据审查意见对草案进行修改。

2023 年 2 月-2023 年 4 月：山东省畜牧兽医局组织有关专家对该地方标准的标准送审稿和编制说明进行了会审。审

查委员会听取了标准编制情况汇报，对标准文本进行了逐章、逐条审查，对标准编制说明等进行了审查。标准编制小组认真审阅，采纳了审查委员的意见和建议，并根据审查意见进行修改形成报批稿。

二、地方标准制定目的和意义

2002 年，塞尼卡谷病毒（SVV）首次在美国被报道，病毒被发现于 PER.C6 细胞培养物中，被认为是细胞培养基的污染物。2007 年 SVV 被发现是引起加拿大发生的猪原发性水泡病(PIVD)的致病病原。2015 年以后，在美国、巴西等多国均发现 SVV 感染导致猪发生 PIVD 的临床病例，进一步确定了 SVV 的致病性。

猪感染 SVV 后通常表现为急性、自限性水疱症状。临床表现为采食量下降，之后鼻吻突处出现水疱性病变，可见 1 个或多个大小不一、充满液体的囊泡，囊泡破裂后发展成溃疡病变，在感染后 10~15 d 形成厚痂。水疱性及溃疡性病变也可出现于蹄冠部趾间裂和冠状带周围，导致边缘上皮疏松坏死，严重者跛行，站立困难。有些母猪腹部和乳房部出现红色斑点，或伴有发热和厌食症状，甚至发烧（39.5~40.5 ℃），部分跛行的母猪体温可达 41.0℃。新生仔猪体态虚弱，嗜睡，不愿吸乳，并出现急性死亡，在蹄掌部可见部分化脓性小泡。

塞尼卡谷作为一种新发传染病，不仅能引起猪只的死

亡，带来经济损失，同时还会导致与口蹄疫（FMD）等水疱性疫病极为相似的临床症状，造成确诊困难。山东省已于2022年8月通过了全省域免疫无口蹄疫区和无高致病性禽流感区的国家评估，成为全国首个“双病”无疫省，水疱性疫病的精准诊断对于FMD的日常监测至关重要。因此开发快速、灵敏、方便的现场诊断方法，制定SVV诊断的相关标准对于SVV的防控及FMD的准确诊断变得尤为重要，对猪场SVV的诊断和FMD的净化具有重要意义。

三、地方标准编制原则、主要技术内容和确定依据

（一）地方标准编制原则

本标准内容的选取、格式等严格按照 GB/T 1.1《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》的要求，充分调研最新技术水平及当前市场情况，认真分析所涉及领域的标准化需求，以“科学性、一致性、适用性和先进性”为基本原则，以保证SVV的精准、快速检测为目标进行编写，力求结构严谨，文字简洁易懂，逻辑清晰，引用文件规范、准确，易于理解和应用。现确定编制原则如下。

1. 科学性

本标准编制内容是以大量的国内外SVV检测方法为基础，通过大量的实验数据对比分析进行编写。制定本标准时充分考虑了标准的可操作性，制定过程中搜集相关资料，进行严格的比对分析，保证本规范科学可行，简单易行，便于

操作。并且委托山东省动物疫病预防与控制中心、山东省农业科学院畜牧兽医研究所、山东省农业科学院家禽研究所对标准草案中的标准技术指标进行验证，验证结果一致。

2. 一致性原则

按照“制修订的标准应与国家现行的法律法规保持相对的高度协调性”的原则，在本标准制定过程中，与国家现行的法律法规保持了高度的一致。

3. 适用性原则

按照“制修订的标准应适用于行业的发展和生产实际，为标准具有广泛的参考性和实用性奠定基础”的基本原则，在本标准制定过程中，充分调查并广泛征求了不同类型企事业单位如大专院校、科研机构及生产企业的专家的意见，在综合分析、集体讨论的基础上，进行修改、充实和完善，因此，本标准具有很强的适用性。

4. 先进性原则

在本标准制订过程中，按照“先进、适用和可操作”的原则，在检索国内外相关标准、文献的基础上，以前期研究数据为基础，然后结合后期试验验证，达到科学性与实用性的有机统一，以确保本标准的适度先进性。本标准编制内容通过自行设计特异性的引物探针，提取病毒 DNA 后利用 RPA 荧光法检测 SVV，该快速诊断方法与现有技术相比具有很强的特异性、敏感性、重复性，且与荧光定量 PCR 法的敏

感性一致，比普通 PCR 法高 1000 倍，且大大缩短了检测时间，具有快速和可操作性强的特点。

（二）主要技术内容和确定依据

本标准根据 GenBank 中已经发表的 SVV 的全基因组序列设计 RPA 法所需的特异性引物及荧光探针，经过筛选后确定最优的特异性引物及探针，建立了针对 SVV 的 RPA 检测方法。研究结果表明该方法具有良好的特异性，与 FMDV、PRRSV、CSFV、PEDV、TGEV 均无交叉反应；敏感性试验检测下限为单拷贝/μL，与荧光定量 PCR 灵敏度一致，优于普通 PCR 的灵敏度 1000 倍；对批内重复性试验和批间重复性试验检测结果进行统计学分析，结果表明批内重复性试验和批间重复性试验的变异系数均小于 5%。对临床样本检测，RPA 法也具有较好的敏感性。本标准所建立的检测方法敏感性高、特异性强、具有稳定的可重复性，可用于对 SVV 临床感染率的调查、定量检测及后期研究。

1. 引物及探针的选择

引物探针序列如表 1 所示：

表 1. RPA 引物序列

引物	序列
SVV-RPA F	TTCTAAAGCGCAAATTCGTCCAAAACAACGAC
SVV-RPA R	CCAGAATGTTGAGCCAACATAGAAACAGATTGC
SVV-RPA P	TAAAGAATTTGGAAGCCATGCTCTCCTACTTC-[FAM-dT]-A-THF-C-[BHQ1-dT]-AGGAACACTACTCG

重组酶恒温扩增（Recombinase Polymerase

Amplification，RPA）的引物长度比常规 PCR 要长一点，在 RPA 反应中单链结合蛋白与双链 DNA 的结合需要长度为 30~35bp 以上的核苷酸才能完成。引物的 GC 含量在应占 30%~70%，在 5'端的 3~5 个核苷酸尽可能减少 G 的出现；在 3'端的 3-5 个核苷酸应有 G、C 出现，以连续多个出现为宜。探针的序列应不与特异性引物识别位点重合，长度为 46-52nt，探针共有四个修饰位点：距离 5'端≥35nt 的中部位置标记一个 THF，作为核酸外切酶的识别位点，THF 上游标记一个荧光基团，下游标记一个淬灭基团，两个基团间距为 2-4nt，THF 距离 3'末端≥15nt。

针对目的基因片段，本试验设计了三对引物及探针，分别进行 RPA 荧光法反应，筛选最优的引物探针。（图 1、2）

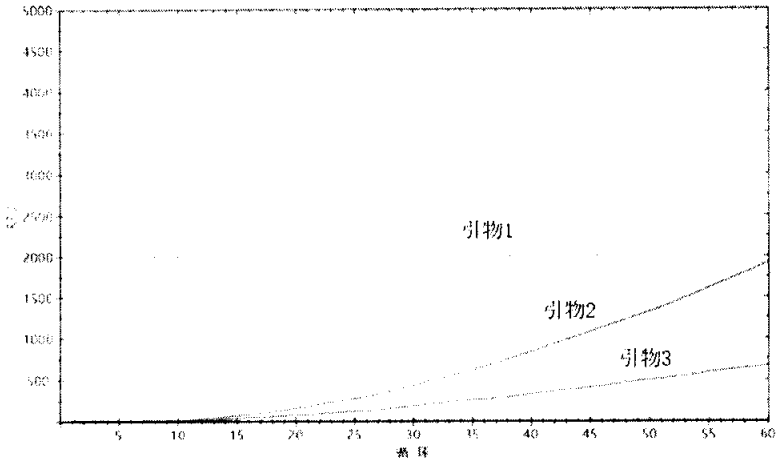


图 1. 特异性引物的筛选

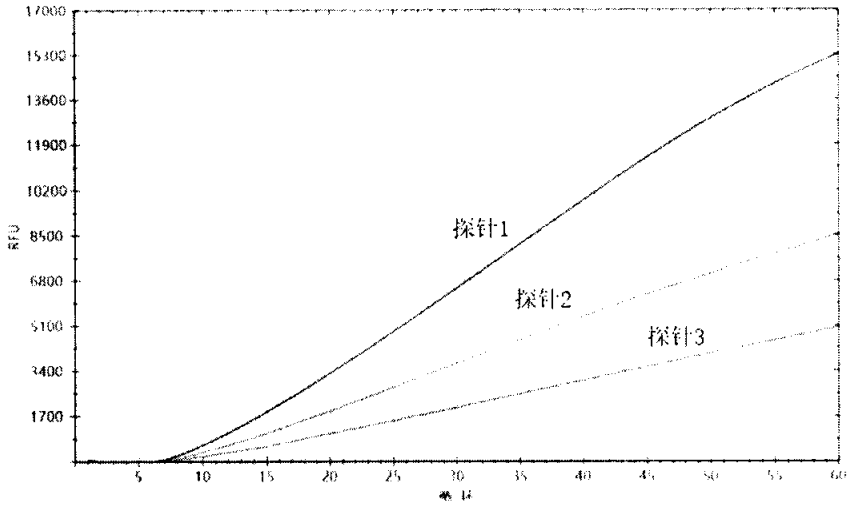
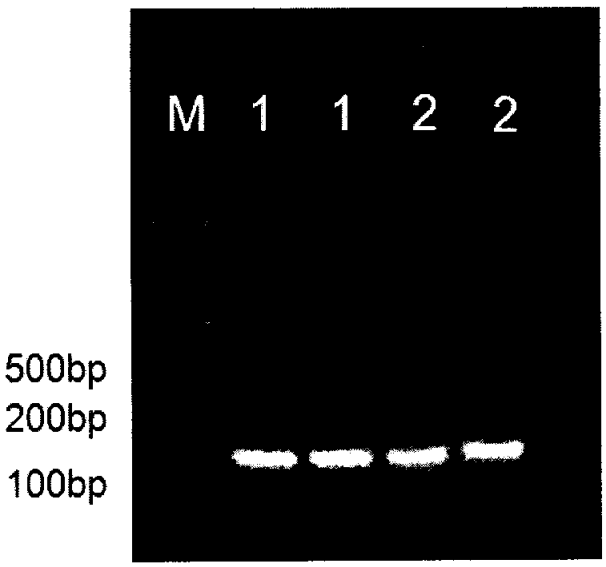


图 2. 荧光探针的筛选

用上述筛选出的最优引物对阳性质粒进行 PCR 扩增，得到一条 148 bp 左右的 DNA 片段（图 3）。送生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定，测定结果与目的片段序列完全一致。



M：DNA Marker DL2000；1：重组质粒；2：连接前 PCR 产物

图 3. RPA 扩增目的条带

2. 最佳反应体系和反应条件的确定

多次试验比对确定最佳反应体系为：50μL 体系，其中

DEPC 水 25.4 μL 、恒温扩增试剂 15μL（A buffer 12.5 μL、B buffer 2.5 μL）、上下游引物（终浓度 10 μM）各 2 μL、探针（终浓度 10 μM）0.6 μL、模板 5 μL、。RPA 荧光法反应条件为：39℃ 1 min，39℃ 30s，40 个循环。

3. 敏感性试验

按上述优化的反应条件，选择 1.0×10^6、1.0×10^5、1.0×10^4、1.0×10^3、1.0×10^2、1.0×10^1、1.0×10^0 拷贝/μL 的 7 个浓度梯度的质粒作为模板，进行荧光定量 PCR，RPA 和 PCR 实验。

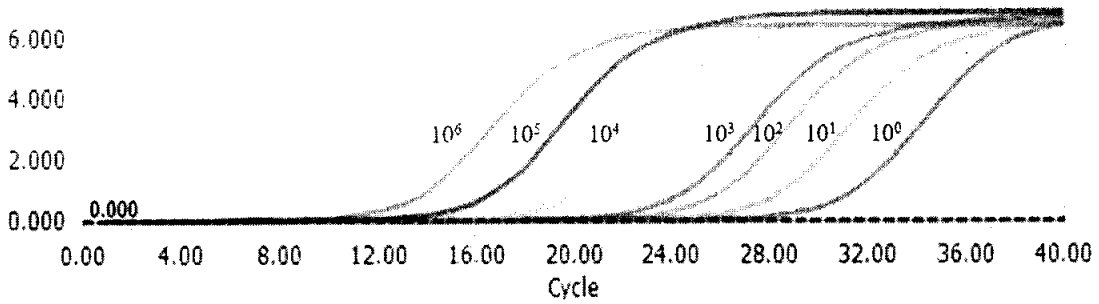


图 4. 荧光定量 PCR 扩增曲线（单位：拷贝/μL）

试验结果显示，荧光定量 PCR 和 RPA 荧光法能检测出的最低模板浓度为单拷贝/μL (图 4- 5)，而常规 PCR 能检出最低模板浓度为 1.0×10^3 拷贝/μL (图 6)，RPA 荧光法的敏感性与荧光定量 PCR 一致，比常规 PCR 高 1000 倍。除此之外 RPA 荧光法检测用时仅需 20min，且不需要复杂的变温步骤，在常温条件下即可进行反应，对检测设备要求低，可以实现养殖、运输、屠宰等生产过程中的即时检测。

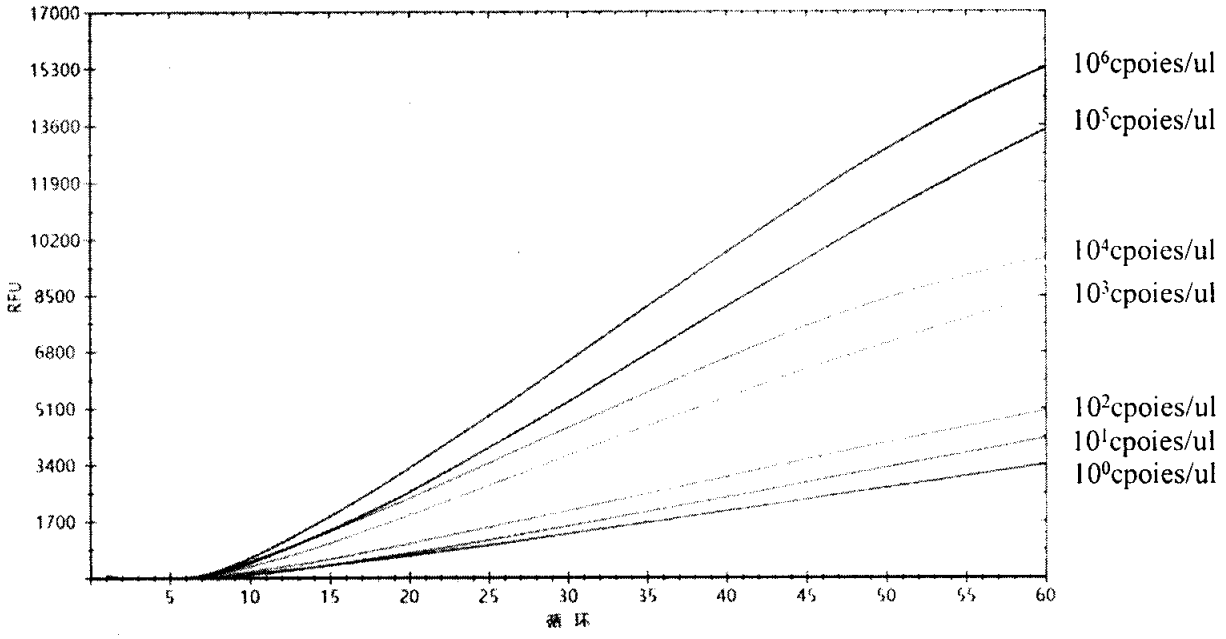
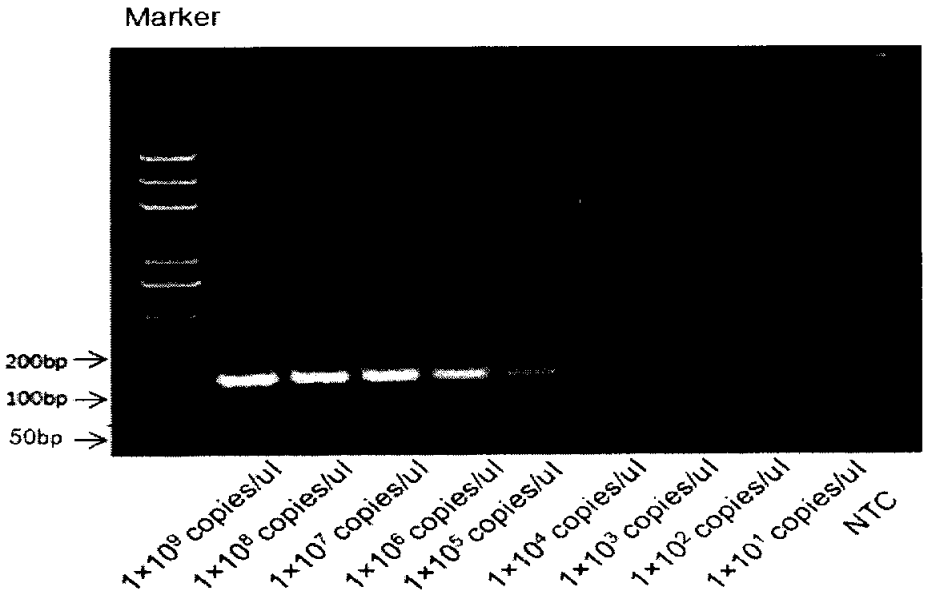


图 5. 敏感性试验（单位：拷贝/μL）



M： DNA Marker DL 2000

图 6. 普通 PCR 敏感性试验（单位：拷贝/μL）

4 特异性试验

以 FMDV（口蹄疫病毒）、PRRSV（猪繁殖与呼吸综合征病毒）、CSFV（猪瘟病毒）、PEDV（猪流行性腹泻病毒）、

TGEV（猪传染性胃肠炎病毒）的 DNA 为模板进行 RPA 检测，检测结果均为阴性，说明本检测方法特异性良好。

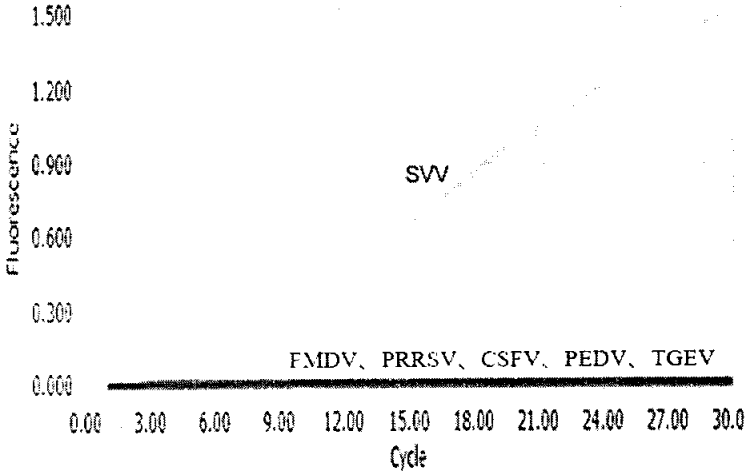


图 7. 特异性试验

5 重复性试验

为验证 RPA 荧光法检测结果的可重复性，选取 10^3、10^2、10^1 倍稀释的 SVV 质粒样本，以 50μL 体系连续进行 3 次扩增反应，不同浓度梯度下的 3 次重复实验的扩增曲线几乎完全重合（图 8）。对批内重复性试验和批间重复性试验检测结果进行统计学分析，结果表明批内重复性试验和批间重复性试验的变异系数均小于 5%，说明该方法具有良好的重复性与稳定性(表 2、表 3)。

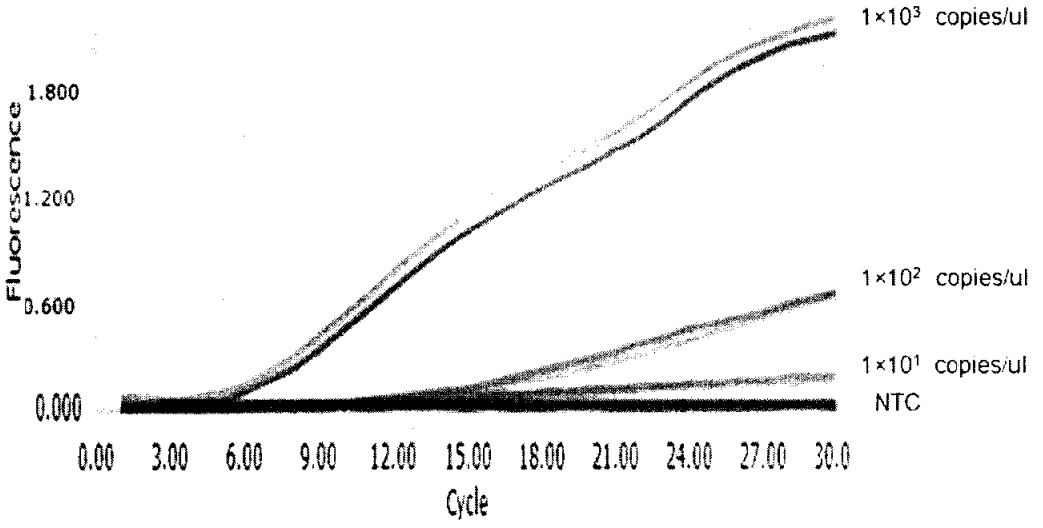


图 8. 重复性试验

表 2　RPA 荧光法的批内重复性试验结果

样品	3 次重复性试验的 Ct 值				变异系数%
	1	2	3	平均值±标准差	
1.0×10^8	2.68	2.72	2.86	2.75±0.077	2.8
1.0×10^6	9.68	9.78	9.39	9.62±0.165	1.71
1.0×10^4	16.84	16.93	16.41	16.73±0.227	1.36

表 3　RPA 荧光法的批间内重复性试验结果

样品	3 次重复性试验的 Ct 值				变异系数%
	1	2	3	平均值±标准差	
1	10.94	10.58	10.27	10.6±0.274	2.58
2	10.41	10.69	10.53	10.54±0.115	1.09
3	10.75	10.43	10.88	10.69±0.189	1.76

6. 临床样品检测

对临床送检的 20 例具有塞尼卡谷疑似症状的猪进行常规 PCR、荧光定量 PCR 和 RPA 荧光法检测。试验结果显示，荧光定量PCR和RPA荧光法的敏感性一致，均优于常规PCR

法($p < 0.01$)。

表 4　三种检测方法比较结果

	常规 PCR	荧光定量 PCR	RPA-荧光法
SVV 阳性病例	10	16	16
阳性率(%)	50	80	80

7. 市面上常见厂家恒温扩增试剂盒对比试验

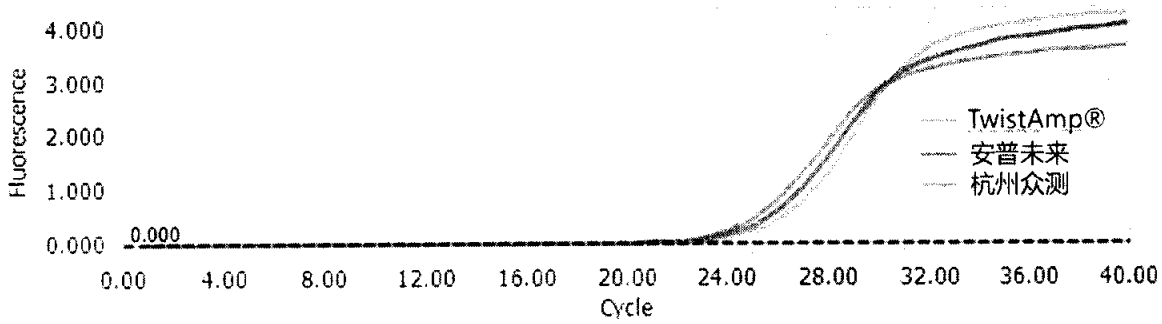


图 9. 三种恒温扩增试剂盒对比试验

选取了目前市面上常见的三家恒温扩增试剂的生产厂家进行了对比试验，试验结果表明三个厂家的恒温扩增试剂盒的扩增效果相近，检测结果一致，表明本检测方法稳定性良好，不受试剂生产厂家的影响。

四、与现行相关法律、行政法规和其他标准的关系

制定标准时严格按照国家有关生物制品与诊断试剂质量方面的法律法规要求，严格执行计量法、标准化法，其内容完全符合国家有关规定。本标准中不存在与现行法律、行政法规、强制性标准冲突或不协调的内容。

五、重大分歧意见的处理过程、处理意见及其依据

对标准制定过程中的重大分歧意见，我们广泛征求了农业高校、科研院所等30个单位或者专家的建议，依据测定结果和专家意见，综合形成对该标准重大分歧意见的处理。根据专家意见，将该地方标准的名称由《塞尼卡谷病毒的恒温扩增检测技术规范》更改为《猪塞尼卡谷病毒的检测 重组酶恒温扩增法》，并按照GB/T 1.1-2020要求，修改规范性引用的引导语、规范附录格式以及对计量单位进行规范书写等。

六、对地方标准自发布日期至实施日期之间的过渡期（以下简称过渡期）的建议

没有对过渡期的建议。

七、其他需要说明的内容

本标准起草时参考了中华人民共和国国家标准 GB/T 6682《分析实验室用水规格和试验方法》，DB37T4032-2020《非洲猪瘟恒温扩增检测技术规范》，DB37T4052-2020《小反刍兽疫恒温扩增检测技术规范》等，本标准与以上标准的一致性程度为非等效。根据审查会专家意见，将该地方标准的名称由《塞尼卡谷病毒的恒温扩增检测技术规范》更改为《猪塞尼卡谷病毒的检测 重组酶恒温扩增法》。

提出部门（盖章）

年　　月　　日