

团 体 标 准

T/CVMA 171—2024

猪圆环病毒 1 型、2 型、3 型三重荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for detection of porcine circovirus type1, 2 and 3

2024-7-4 发布

2024-7-4 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA
全国动物疫病预防控制中心

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由洛阳现代生物技术研究院有限公司提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防与控制中心、洛阳现代生物技术研究院有限公司、云南省畜牧兽医科学院、青海省动物疫病预防控制中心、新疆生产建设兵团畜牧兽医工作站、洛阳莱普生信息科技有限公司、北京农学院。

本文件起草人：郎洪武、王传彬、孙雨、朱鹤然、顾小雪、师丽刚、刘颖昶、徐琦、毕一鸣、蔡金山、阚威、苏贵成、林元清、李静、郑思思、王德迪、胡冬梅、姬萌萌。

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

猪圆环病毒 1 型、2 型、3 型三重荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件描述了猪圆环病毒1型、2型、3型三重荧光PCR检测方法的试剂与材料、仪器与设备、实验前准备、操作步骤、结果判定等内容。

本文件适用于猪血液、肺、扁桃体或脑等病灶组织及环境样品中猪圆环病毒1型、2型、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，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 35901 猪圆环病毒2型荧光PCR检测方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

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。

实时荧光PCR：实时荧光聚合酶链式反应（Real-time Polymerase Chain Reaction）

Ct值：每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值所经历的循环数（Cycle threshold）

CY5：花菁染料（Cyanine dye）

DNA：脱氧核糖核苷酸（Deoxyribonucleic acid）

FAM：6-羧基荧光素（6-carboxyfluorescein）

PCV1：猪圆环病毒1型（Porcine circovirus type 1）

PCV2：猪圆环病毒2型（Porcine circovirus type 2）

PCV3：猪圆环病毒3型（Porcine circovirus type 3）

VIC：绿色荧光蛋白（green fluorescent protein）

5 试剂和耗材

5.1 核酸提取试剂

选取商品化的病毒DNA提取试剂盒进行猪圆环病毒DNA提取。也可按照GB/T 35901进行猪圆环病毒DNA提取。

5.2 荧光 PCR 扩增试剂

选取商品化的PCR扩增预混试剂。

5.3 阴性对照和阳性对照

5.3.1 阳性对照的制备按照附录 A。

5.3.2 阴性对照为无核酸酶水。

5.4 引物探针

引物和探针名称序列按照附录B。

5.5 其他试剂

无水乙醇、无核酸酶水、生理盐水。

6 仪器与耗材

6.1 多通道实时荧光 PCR 仪。

6.2 电子天平。

6.3 恒温水浴锅。

6.4 高速冷冻离心机：离心速度可达 12000 r/min 以上。

6.5 1.5 mL 灭菌离心管。

6.6 组织研磨器。

6.7 -20 °C冰箱和 4 °C~8 °C冰箱。

6.8 涡旋振荡仪。

6.9 手动单道移液器（1 μL-10 μL、5 μL -50 μL、20 μL-200 μL）。

6.10 高压灭菌器。

7 实验前准备

7.1 样品的采集

猪血液、肺、扁桃体或脑等病灶组织及环境样品的采集按照NY/T 541相关条款执行。

7.2 样品的保存及运输

采集或处理好的样品在2 °C~8 °C条件下保存应不超过24 h；如需长期保存，应置于-80 °C保存，避免反复冻融（冻融不超过3次），样品采用低温保存运输。

7.3 样品的处理

7.3.1 全血和环境样品

血液或环境样品混匀后，转入1.5 mL灭菌离心管中，直接用于核酸提取或4 °C保存备用。

7.3.2 猪肺、扁桃体或脑等病灶组织样品

将采集的肺、扁桃体或脑等病灶组织及环境样品，称取样品约1 g，用手术剪剪碎混匀后取0.05 g于研磨器中研磨，加入1.5 mL生理盐水继续研磨，待匀浆后转至1.5 mL无菌离心管中，8000 r/min离心2 min，取上清液200 μl备用。

8 操作步骤

8.1 病毒基因组提取

按照所选取的病毒DNA提取试剂盒说明书进行猪圆环病毒DNA提取。

8.2 实时荧光 PCR 扩增方法

配制猪圆环病毒1型、2型、3型三重实时荧光PCR扩增反应体系，见表1。

表1 扩增反应体系

试剂	终浓度 μmol/L	体积 μL
2 × One Step Q Probe Mix	/	12.5
PCV2-上游引物	0.16	0.4
PCV2-下游引物	0.16	0.4
PCV2-探针	0.12	0.3
PCV3-上游引物	0.12	0.3
PCV3-下游引物	0.12	0.3
PCV3-探针	0.12	0.3
PCV1-上游引物	0.12	0.3
PCV1-下游引物	0.12	0.3
PCV1-探针	0.12	0.3
DNA模板	/	5
-RNase-free ddH ₂ O	/	25

将表1中所有的试剂添加到PCR反应管后，充分混匀，做好标记。猪圆环病毒1型、2型、3型三重荧光PCR扩增所用荧光报告基团依次为CY5、FAM、VIC，淬灭基团选择None。在实时荧光PCR仪上按照表2所示程序进行扩增。

表2 猪圆环病毒1型、2型、3型三重荧光PCR反应程序

温度	条件	循环数
95 °C	2 min	1
95 °C	15 s	40
60 °C	35 s	

在每个循环的第二步（60 °C 35 s）采集荧光信号

注：ABI系列荧光定量PCR仪不选ROX校正。

9 结果判定

9.1 阈值设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。合理调整阈值线，不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

9.2 试验成立条件

9.2.1 阳性对照：FAM 通道、VIC 通道和 CY5 通道 Ct 值均 ≤ 30 ，且呈典型的 S 型曲线。

9.2.2 阴性对照：FAM 通道、VIC 通道和 CY5 通道 Ct 值均 > 38 或无 Ct 值，无典型的 S 型曲线。

9.2.3 9.2.1 和 9.2.2 要求须在同一次试验中同时满足，否则，本次试验无效，需重新进行。

9.3 判定标准

9.3.1 猪圆环病毒 1 型核酸检测判定（CY5 通道）

被检样本检测结果Ct值 ≤ 35 ，且曲线呈典型的S型曲线，判为猪圆环病毒1型核酸阳性。

被检样本检测结果Ct值 ≥ 38 或无Ct值，无典型的S型曲线，判为猪圆环病毒1型核酸阴性。

被检样本检测结果 $35 < \text{Ct值} < 38$ ，且曲线呈典型的S型曲线，判为可疑。需再进行1次复检，做3个重复，至少2个重复检测结果Ct值 < 38 ，且曲线呈典型的S型曲线，判为猪圆环病毒1型核酸阳性；否则判为阴性。

9.3.2 猪圆环病毒 2 型核酸检测判定（FAM 通道）

被检样本检测结果Ct值 ≤ 35 ，且曲线呈典型的S型曲线，判为猪圆环病毒2型核酸阳性。

被检样本检测结果Ct值 ≥ 38 或无Ct值，无典型的S型曲线，判为猪圆环病毒2型核酸阴性。

被检样本检测结果 $35 < \text{Ct值} < 38$ ，且曲线呈典型的S型曲线，判为可疑。需再进行1次复检，做3个重复，至少2个重复检测结果Ct值 < 38 ，且曲线呈明显指数增长，判为猪圆环病毒2型核酸阳性；否则判为阴性。

9.3.3 猪圆环病毒 3 型核酸检测判定（VIC 通道）

被检样本检测结果Ct值 ≤ 35 ，且曲线呈典型的S型曲线，判为猪圆环病毒3型核酸阳性。

被检样本检测结果Ct值 ≥ 38 或无Ct值，无典型的S型曲线，判为猪圆环病毒3型核酸阴性。

被检样本检测结果 $35 < \text{Ct值} < 38$ ，且曲线呈典型的S型曲线，判为可疑。需再进行1次复检，做3个重复，至少2个重复检测结果Ct值 < 38 ，且曲线呈典型的S型曲线，判为猪圆环病毒3型核酸阳性；否则判为阴性。

9.3.4 多通道结果描述与判定

多通道结果描述与判定见表3。

表 3 结果描述与判定

FAM 通道	VIC 通道	CY5 通道	结果描述与判定
阳性	阳性	阳性	样本同时含有猪圆环病毒1、2、3型核酸，
阳性	阴性	阳性	样本同时含有猪圆环病毒1、2型核酸，不含3型核酸
阳性	阳性	阴性	样本同时含有猪圆环病毒2、3型核酸，不含1型核酸
阴性	阳性	阳性	样本同时含有猪圆环病毒1、3型核酸，不含2型核酸
阴性	阴性	阴性	样本不含有猪圆环病毒1、2、3型核酸

附录 A
(规范性)
阳性对照和阴性对照

A.1 阳性对照核酸序列

A.1.1 PCV1型序列: GTTCCCTGTAACGTATGTGAGAAATTTCCGCGGGCTGGCTGAACTTTTGAAA
GTGAGCGGGAAGATGCAGCAGCGTGATTGGAAGACAGCTGTA

A.1.2 PCV2型序列: TGATTACCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTCAAATCTGTCCCA
GCTGTAGAAGCTCTCTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAA

A.1.3 PCV3型序列: AAAGTGGTATCCCATTATGGATGCTCCGCACCGTGTGAGTGGATAACCGGGC
AGTGGATGATGAAGCGGCCCTCGTGTTTTGATGCCGCAGGACGGGGACTGGATAACTGAGTTTTGT
GGTGCTACGAGTGTCTGAAGATAAGGACTTTTATTGTCATCCTATTCTAGGTCCGGAGGGAAAGC
CCGAAACACAGGTGGTGTTTTAC

A.2 阳性对照

将A.1中阳性对照序列,人工合成含有PCV-1、PCV-2、PCV-3目标基因的片段,将合成的基因序列连接到pUC18载体中,制成阳性质粒pUC-PCV-1/2/3,将阳性质粒稀释到 10^4 copies/ μ L,作为阳性对照。

附录 B
(规范性)
引物和探针

引物、探针的名称与序列见表B.1

表 B.1 引物、探针的名称与序列

序号	名称	序列	引物长度	引物浓度	TM值 / °C	GC%
1	PCV2上游引物	5'-TGATTACCAGTAATCAG RCCCC-3'	22	10 μmol/L	55	47.7
2	PCV2下游引物	5'-AGTAAACCTCCGATARA CAGAT-3'	22	10 μmol/L	51	38.6
3	PCV2探针	5'-FAM-ACTCCTCAAATCCT GTCCCAGCTGTAGA-BHQ1- 3'	28	10 μmol/L	62.8	50
4	PCV3上游引物	5'-AAGTGGTATCCCATTAT GGATGCTC-3'	25	10 μmol/L	56.3	44
5	PCV3下游引物	5'-GGACACTCGTAGCACCA CAAAA-3'	22	10 μmol/L	57.6	50
6	PCV3探针	5'-VIC-CCGTGTGAGTGGAT ATACCGGGCAG-BHQ1-3'	25	10 μmol/L	64.08	60
7	PCV1上游引物	5'-CCCTGTAACGTWTG TSA GTAATTT-3'	24	10 μmol/L	52.26	37.5
8	PCV1下游引物	5'-CTTCCAATCACGCTKCT GAAT-3'	21	10 μmol/L	54.15	45.2
9	PCV1探针	5'-CY5-TCCCGCTGCCTTTC AAAAGTTCAGCC-BHQ2-3'	26	10 μmol/L	64.5	53.8