

ICS 11.220

B 41

团 体 标 准

T/CVMA X8—2019

猪圆环病毒 3 型荧光 PCR 检测方法

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

(征求意见稿)

2019 - XX - XX 发布

2019-XX-XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2009 的规则起草。

本标准不涉及有关专利。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：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。

本标准起草人：张志、李阳、孙学强、刘爽、徐烽晔、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

本标准规定了猪圆环病毒3型实时荧光PCR检测的技术要求。

本标准适用于猪圆环病毒3型的核酸检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，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/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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

3.2 实时荧光PCR: 实时荧光反转录聚合酶链式反应 (Real-time PCR)

3.3 Ct (或Cp) 值: 每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数 (Threshold cycle)

3.4 FAM: 羧基荧光素 (Carboxyfluorescein)

4 仪器设备

4.1 荧光 PCR 检测仪。

4.2 台式冷冻离心机: 可控温至 4℃、离心速度可达 12000r/min 以上。

4.3 普通冰箱: 2℃~8℃。

4.4 普通冰柜: -20℃以下。

4.5 超低温冰箱: 可控温至-70℃以下。

4.6 微量移液器: 0.1 μL~2.5 μL、1 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL, 并配备与移液器匹配的吸头。

4.7 高压灭菌锅。

5 试剂和耗材

5.1 试剂

5.1.1 DNA 提取试剂盒

5.1.2 PCV 3 检测引物和 Taqman 荧光探针, 序列如下:

上游引物qPCV3-F: 5'-CGGAGACGTCGGGAAATCTG-3';

下游引物qPCV3-R: 5'-CCCCGTGGCTTGAAATAC-3';

荧光探针qPCV3-Probe: 5'FAM-CACCCCGCAAAAATCAGCAAACC-3' BHQ1。

5.1.3 阳性对照: 体外转录的 PCV 3 阳性质粒 DNA。

5.1.4 阴性对照: 为已知 PCV 3 阴性的猪组织悬液。

5.2 耗材

5.2.1 1.5mL 离心管。

5.2.2 0.2mLPCR 薄壁管或八联管。

5.2.3 10-200 μ L 带滤芯吸头。

6 样品的采集、保存和运输

6.1 样品的采集

取猪抗凝全血、扁桃体、脾脏、淋巴结等主要脏器适量 (5g~10g) 装入灭菌15mL样品管中, 编号, 备用。

6.2 样品的保存

上述采集的样品可立即用于检测, 不能立即检测的样品, 在2℃~8℃条件下不超过24h, -20℃可以短期保存, -70℃以下可以长期保存。

6.3 样品的运输

样品的运输必须采用低温保存进行运输, 并在规定温度下的保存期内送达。

7 实时荧光 PCR 操作程序

7.1 样品DNA提取

用商品化的DNA提取试剂盒提取样品的DNA, 备用。提取的DNA应立即进行实时荧光PCR扩增, 如在4℃保存, 不宜超过8h, 如需长期保存, 应放置在-20℃或-70℃冰箱中。

7.2 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 μ L的实时荧光RT-PCR反应液, 分别加入制备的RNA溶液2 μ L, 使每管总体积达到20 μ L, 编号, 拧紧管盖后, 500 r/min离心30s。

7.3 实时荧光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3min, 然后40个循环 (95℃ 8s, 60℃15s), 60℃采集信号。

8 结果判定

8.1 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, 以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增的最高点为准。

8.2 质量控制

读取每个样品的Ct值, 标准阳性对照有特异性扩增曲线而且Ct值 \leq 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。

8.3 结果描述及判定

8.3.1 被检样品有特异性扩增曲线, 而且Ct值 \leq 35, 判定为PCV 3核酸阳性。

8.3.2 被检样品无特异性扩增曲线或者Ct值 >37 ，判定为PCV 3核酸阴性。

8.3.3 被检样品有特异性扩增曲线，而且 $35 < \text{Ct值} \leq 37$ ，判定为可疑，可疑样品重新检测。如重复后仍然 $35 < \text{Ct值} \leq 37$ ，且扩增曲线均为典型的S型曲线，报告为PCV 3核酸阳性；如重复后Ct值 ≤ 35 ，报告为PCV 3核酸阳性；如重复后仍然Ct值 >37 ，报告为PCV 3核酸阴性。

中国兽医协会
CVMA