

猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Detection methods of real-time RT-PCR for Porcine reproductive and
respiratory syndrome virus

地方标准信息服务平台

2019 - 09 - 11 发布

2019 - 12 - 11 实施

福建省市场监督管理局

发布

地方标准信息平台

福建省地方标准

猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

DB35/T 1852—2019

*

2019 年 9 月第一版 2019 年 9 月第一次印刷

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 缩略语 1

4 疾病概述 1

5 实验室诊断 2

6 综合判定 4

附录 A（规范性附录） 试剂的配制 5

附录 B（资料性附录） 扩增产物参考基因序列 6

地方标准信息服务平台

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由福州海关提出并归口。

本标准起草单位：福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心、深圳市易瑞生物技术有限公司、厦门瑞德利校准检测技术有限公司、东莞市中鼎检测技术有限公司、深圳市中鼎检测技术有限公司。

本标准主要起草人：郑腾、张体银、朱海、杨荣淇、付辉、张险朋、柯丽群、张志灯、林杰、林季敏、王武军、唐寰宇、张婷、白泉阳。

地方标准信息服务平台

猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪繁殖与呼吸综合征病毒实时荧光RT-PCR检测方法。
本标准适用于猪繁殖与呼吸综合征病毒的流行病学调查、监测和诊断。

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。
Ct值: 循环阈值 (Cycle Threshold)
DEPC: 焦碳酸二乙酯 (Diethy Pyrocarbonate)
PRRS: 猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome)
PRRSV: 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus)
RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)
RT-PCR: 反转录聚合酶链式反应 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

4 疾病概述

4.1 病原

PRRS是PRRSV引起的猪的一种高度传染性疾病, 又称“猪蓝耳病”。PRRSV为动脉炎病毒属的成员, 是一种有囊膜的单股正链RNA病毒, 病毒粒子呈球型, 直径为55 nm~60 nm。病毒有2个血清型, 即美洲型和欧洲型, 我国分离到的毒株为美洲型。病毒对酸、碱都较敏感, 尤其很不耐碱, 一般的消毒剂对其都有作用, 但在空气中可以保持3周左右的感染力。

4.2 流行病学

PRRSV可感染各种品种、不同年龄和用途的猪, 以妊娠母猪和1月龄以内的仔猪最易感。患病猪和带毒猪是本病的重要传染源。主要传播途径是接触感染、空气传播, 也可通过胎盘垂直传播。持续性感染是PRRSV流行病学的重要特征。PRRSV可在感染猪体内存在很长时间。猪在感染病毒后2~14周均可通过接触将病毒传播给其它易感猪。

4.3 临床诊断

妊娠后3个月的母猪如果感染PRRSV,则会表现流产、早产、胎儿自溶和木乃伊等典型特征。出生前后感染PRRSV的新生仔猪,呼吸困难、急促,同时出现眼周及眼睑水肿,结膜炎,蓝耳,食欲不振,发热,皮肤红斑,腹泻,震颤,毛发粗乱,厌食和神经症状。断乳仔猪感染PRRSV的典型临床症状表现为发热、肺炎、昏睡及精神萎靡,如果伴发细菌感染,则死亡率显著升高。

5 实验室诊断

5.1 设备、材料和试剂

5.1.1 设备

- 5.1.1.1 台式冷冻高速离心机(转速至少达到 12 000 r/min 以上)。
- 5.1.1.2 微量可调移液器(100 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、2 μL ~20 μL 、0.5 μL ~10 μL)。
- 5.1.1.3 冰箱(2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 和-20 $^{\circ}\text{C}$)。
- 5.1.1.4 荧光定量 PCR 仪。

5.1.2 材料和试剂

- 5.1.2.1 试验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格要求。
- 5.1.2.2 焦炭酸二乙酯处理水(DEPC 水)。
- 5.1.2.3 Trizol。
- 5.1.2.4 三氯甲烷。
- 5.1.2.5 异丙醇。
- 5.1.2.6 无水乙醇。
- 5.1.2.7 2 $\times$ Taq PCR Master Mix。
- 5.1.2.8 荧光 RT-PCR 检测用引物和探针序列为:
 - a) PRRSV-F 5'-CACTACGGTCAACGGCACATT-3';
 - b) PRRSV-R 5'-GCATATTGACAAGGTTTACCACTCC-3';
 - c) PRRSV-P FAM-CTTTCTGCCACCCAACACGAGGCTT-MGB。扩增片段约99 bp,用水溶解至10 $\mu\text{mol/L}$ 后,保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。
- 5.1.2.9 质控物质:阳性对照为含 PRRSV 基因目的片段的质粒 DNA;阴性对照为不含 PRRSV 基因的质粒 DNA 或含非 PRRSV 基因的质粒 DNA;DEPC 水为空白对照。

5.2 样品的采集、处理、存放和运输

5.2.1 样品采集和前处理过程的注意事项

采样及样品前处理过程中样品不得交叉污染,应戴一次性手套、口罩和帽子,采样工具使用前先消毒处理。

5.2.2 样品的采集和前处理

5.2.2.1 棉拭子样品

采样时将棉拭子探入鼻腔来回刮取3~5次，取鼻腔分泌物；将棉拭子探入肛门旋转并沾取粪便；将鼻腔拭子和肛门拭子一起放入盛有1.0 mL拭子悬液（符合附录A中A.1的规定）的无菌Eppendorf管中，4℃下5 000 r/min离心10 min，取上清液备用。

5.2.2.2 组织样品

采集有明显病变的淋巴结、扁桃体、肺、脾、肾、胸腺等组织样品，无菌取0.5 g样品研磨后，加0.3 mL~0.5 mL的组织悬液（符合附录A中A.2的规定）进行匀浆混匀，转入无菌Eppendorf管中，4℃下5 000 r/min离心10 min，取上清液备用。

5.2.2.3 血清样品

取耳静脉或前腔静脉血3 mL~5 mL，待析出血清后，直接吸取血清备用。

5.3 病毒 RNA 的提取

在实验室操作过程中首先应严格遵守GB 19489的要求。分别取200 μL待检样品，加入1 mL Trizol试剂，用移液器充分吹打10~20次，室温放置5 min；加入200 μL三氯甲烷，旋涡振荡30 s混匀，室温放置15 min；4℃下12 000 r/min离心15 min；取上层水相加入等体积异丙醇，上下颠倒数次混匀，-20℃放置20 min；4℃下12 000 r/min离心15 min；弃上清液，沉淀用1 mL 75%乙醇清洗；10 000 r/min离心10 min，弃上清液，沉淀室温干燥5 min；加20 μL DEPC水溶解RNA沉淀。-20℃冰箱保存备用，RNA溶液应避免反复冻融，并尽快用于检测。空白对照、阴性对照和阳性对照进行同步操作。

RNA提取也可采用等效的商品化RNA提取试剂盒。

5.4 实时荧光 RT-PCR 扩增

5.4.1 反应体系

在0.2 mL PCR反应管中分别加入如下试剂：2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL；10 μmol/L的正向引物、反向引物和探针各0.5 μL；模板RNA 5 μL，随后加DEPC水至总体积25 μL，混匀，瞬时离心5 s。

5.4.2 反应程序

将PCR反应管放入荧光定量PCR仪，扩增反应条件设定：50℃逆转录15 min；94℃预变性3 min；之后94℃变性10 s，60℃退火30 s，共40个循环；后4℃保温。同时设立阳性、阴性对照和空白对照。

5.4.3 结果判定

综合分析仪器给出的各项结果，基线以仪器给出的默认值作为参考，阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为准，具体根据仪器噪音情况进行调整，选择FAM通道进行分析。

阳性对照样品有对数扩增曲线，而且Ct值≤30；阴性对照和空白对照无扩增曲线，而且Ct值>40或未检出，二者均成立才可判定试验成立。

检验样本Ct值≤35时，报告为猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性。

检验样本35<Ct值≤40时，重复一次，如果Ct值仍然≤40，并且曲线有明显的对数增长期，报告为猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性，否则报告为猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性。

样本Ct值为零或Ct值>40时，报告未检出猪繁殖与呼吸综合征病毒。

5.4.4 测序

需要时可以对RT-PCR产物进行测序，参考序列参见附录B，同源性应达到98%以上。

6 综合判定

经实时荧光RT-PCR检测为阳性，若出现临床症状，可判定患有猪繁殖与呼吸综合征；若无临床症状，判定为PRRSV携带者。

仅有临床症状，但实时荧光RT-PCR检测为阴性则不能称患有猪繁殖与呼吸综合征，应进一步做其他病检查。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 拭子悬液

在0.01 mol/L PBS中添加青霉素（10 000 IU/mL）、链霉素（10 mg/mL）、庆大霉素（250 pg/mL）和制霉菌素（5 000 IU/mL），调节pH至7.2~7.4。

A.2 组织悬液

在0.01 mol/L PBS中添加青霉素（2 000 IU/mL）、链霉素（2 mg/mL）、庆大霉素（50 pg/mL）和制霉菌素（1 000 IU/mL），调节pH至7.2~7.4。

地方标准信息服务平台

附 录 B
(资料性附录)
扩增产物参考基因序列

CACTACGGTCAACGGCACATTGGTGCCCGGGTTGAAAAGCCTCGTGTTGGGTGGCAGAAAAGCTGTTAAGCAGGGAGTGGTAAAC
CTTGTTAAATATGC

地方标准信息服务平台