

《猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法》

（征求意见稿）

编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

根据全国动物防疫工作的需要,农业部将《猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法》(项目编号:20130480-T-326)列入2013年国家标准制定和修订计划。

（二）起草单位

军事医学科学院军事兽医研究所与中国兽医药品监察所共同起草。

（三）主要工作过程

1. 起草阶段

本项目从2013年1月启动,以《欧盟猪瘟实验室诊断技术手册》(2002/106/EC)中的猪瘟病毒反转录聚合酶链式反应(RT-nPCR)检测方法为基础,通过对我国猪瘟高发省份的动物防疫机构进行实地调研,综合考量猪瘟检测能力和设施设备,在方法优化和长期应用的基础上,制定了满足OIE和欧盟推荐标准的、符合我国实际情况的、能够规范、快捷、准确地用于猪瘟诊断和监测的猪瘟病毒RT-nPCR检测方法和判定标准规程。

2. 征求意见阶段

标准草案初步制定后,按照相关要求,对其进行了征求意见和技术复核。选取重庆市动物疫病预防控制中心、广西省兽医研究所、吉林农业大学、吉林大学、广西大学、湖南农业大学、华南农业大学、中国农业科学院哈尔滨兽医

研究所、中国农业科学院兰州兽医研究所、中国农业科学院上海兽医研究所等 10 家从事猪瘟防控及科研的单位对标准草案进行了征求意见，其中 7 家单位对标准征求意见稿提出了修改意见。除征求意见外，由上述重庆市动物疫病预防控制中心、广西省兽医研究所、广西大学、湖南农业大学及中国农业科学院哈尔滨兽医研究所等 5 家单位对本方法进行了技术复核，验证该规程的实用性和可操作性。5 家单位使用该方法分别对标准起草单位提供的 10 份样品进行检测，各单位检测结果与实际情况符合率均为 100%。征求意见单位及复核单位均认为该方法操作步骤简便易行，标准规程措辞严谨、指导性强，全部同意将该方法作为猪瘟诊断的国家标准。同时，标准起草单位针对征求意见单位和技术复核单位对标准规程提出的修改意见，对标准进行了进一步的完善。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

(一) 标准的编写

本标准依据 GB/T1.1—2009《标准化工作导则》编写。

(二) 提出本标准的依据

猪瘟(Classical Swine Fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)引起的猪的高度致死性、接触性传染病，被 OIE 列为法定报告疫病。虽然猪瘟兔化弱毒疫苗的广泛应用有效地防制了 CSF 大流行和急性发生，但我国各地区猪瘟仍时有发生，而且表现为典型猪瘟和非典型猪瘟共存、持续感染与隐性感染共存、免疫失败等现象。我国猪瘟的流行严重阻碍生猪产业的健康发展，给防制工作带来了巨大挑战。

猪瘟病毒套式 RT-PCR 方法 (RT-nPCR) 作为一种猪瘟实验室诊断技术，具有高度灵敏性和特异性，是 OIE 和欧盟推荐的一种重要病原学检测技术。《欧盟

猪瘟实验室诊断技术手册》(2002/106/EC)(以下简称《手册》)推荐的猪瘟病毒特异性套式 RT-PCR 引物可扩增 CSFV E2 基因中 272 个碱基区域,目前该方法在我国及国际猪瘟诊断及分子流行病学研究领域被广泛采用,但《手册》未对该方法标准化操作进行描述。猪瘟实验室诊断既是动物个体确诊的依据,也是群体猪瘟流行病学调查的重要数据来源。根据《国家中长期动物疫病防治规划(2012~2020 年)》的要求,各省市动物疫病预防控制部门需要长期开展猪瘟监测工作,在此基础上开展猪瘟的净化。因此,制定简便可行的猪瘟病毒检测标准,为我国猪瘟的诊断和监测提供操作依据,对我国猪瘟防控工作具有十分重要的意义。为适应我国猪瘟诊断的需求并和国际通用标准接轨,特制定基于欧盟推荐引物的猪瘟病毒 RT-nPCR 检测技术标准。

(三) 制定本标准的基础

军事兽医研究所和中国兽医药品监察所经过十多年的优化,目前已经形成了标准化的猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法。中国兽医药品监察所国家猪瘟参考实验室采用该方法参与农业部组织的猪瘟病原检测技术比对试验证实,该方法是目前国内猪瘟检测技术中最敏感、特异和准确的方法。军事兽医研究所和中国兽医药品监察所自 2009 年以来,多次参加欧盟猪瘟参考实验室举办的全球猪瘟诊断实验室技术比对试验,比对试验结果表明,建立的 RT-nPCR 方法检测结果准确率 100%,已达到国际参考实验室水平。

在《欧盟猪瘟实验室诊断技术手册》(2002/106/EC)和 OIE《陆生动物诊断试验及疫苗手册》中均提及可以采用 RT-PCR 方法进行猪瘟病毒核酸检测,但两个《手册》均未对 RT-PCR 方法标准化操作进行描述。鉴于该 RT-nPCR 方法已成为欧盟成员国大多数实验室猪瘟诊断的常规技术,为实现我国猪瘟检测技术与

国际接轨，促进猪瘟诊断方法的标准化，标准起草单位在上述基础上，将该 RT-nPCR 方法制定为国家标准。本标准设置的主要技术参数、技术内容包括：（1）样品的采集和处理；（2）核酸提取；（3）反转录和套式 PCR 方法。

（四）实验内容

1. 实验原理

RT-PCR是以RNA为模板，高效灵敏地获得DNA扩增产物的方法。它由两个步骤组成，一是反转录（RT）；另一是PCR。采用Trizol方法提取RNA，获得总RNA后，即可进行RT-PCR。首先，在反转录酶作用下将RNA反转录成cDNA第一链，即以随机六聚寡核苷酸为引物与RNA杂交，然后由反转录酶催化合成相应互补的cDNA链。以该cDNA第一链为模板，可进行PCR扩增。根据靶基因设计用于PCR扩增的基因特异上下游引物，基因特异的上游引物与cDNA第一链退火，在DNA聚合酶作用下合成cDNA第二链。再以cDNA第一链和第二链为模板，用基因特异的上下游引物PCR扩增获得大量的cDNA。套式RT-PCR（RT-nPCR）又称巢式RT-PCR，即使用两对PCR引物扩增目的片段。以第一对RT-PCR引物扩增的片段为模板，第二对引物结合在第一次PCR产物内部，使得第二次PCR扩增片段短于第一次扩增片段。套式RT-PCR的优势在于，如果第一次扩增产生了错误片段，则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低。因此，套式PCR的扩增特异性高。同时，通过两次PCR反应，显著地提高了PCR检测的灵敏度。

2. 实验步骤

（1）样品的采集和处理

猪活体扁桃体样品或血液、病死或扑杀猪的组织 and 脏器、猪排泄物等样品的采集和处理是进行猪瘟病毒核酸检测的第一个步骤，保证所采集待检样品的质量

是进行有效核酸检测的重要基础。本标准规范了不同样品的采集和处理方法，以保证采集和处理后的样品可以直接地、有效地应用于核酸提取。由于样品保存和运输不当而影响检测结果的情况比较常见，因此，本标准对样品的保存与运输等过程也进行了详细的阐述，避免由于样品质量问题影响检测结果。

（2）核酸提取

本标准规定的核酸提取方法——Trizol 法是总 RNA 提取的基本方法，该方法易于操作，核酸提取效率高。所需的 Trizol、氯仿、异丙醇和乙醇等试剂易于获得，Trizol 法核酸提取的价格较商品化试剂盒便宜，特别适用于基层单位使用。

（3）反转录和套式 PCR 方法

猪瘟病毒 RT-nPCR 方法包含内外套两对引物，外套引物由 J.P.Lowings 设计（Lowings, P.等，1994），这对引物能够扩增猪瘟病毒基因组部分 E1 和 E2 区域的 671 个碱基。为了增加 RT-PCR 扩增的灵敏度，J.P.Lowings 在外套引物的基础上设计了一对内套引物，扩增 E2 基因的 272 个碱基（Lowings, P.等，1996）。采用这两对引物的 RT-nPCR 方法也是欧盟成员国大多数实验室猪瘟诊断的常规技术。军事兽医研究所和中国兽医药品监察所采用该引物，经过反应体系和条件优化，建立了本标准的猪瘟病毒套式 RT-PCR 检测方法。除用于猪瘟诊断外，该方法 272 碱基的内套 PCR 扩增区域涵盖了用于猪瘟病毒基因分型的 190 碱基，因此内套 PCR 产物可直接进行基因序列测定，从而进行流行毒株进化与来源分析，对于猪瘟病毒分子流行病学研究和监测具有重要作用。

（五）实际应用效果

标准起草单位已将猪瘟病毒 RT-nPCR 方法应用于实验室日常猪瘟诊断和流行病学研究、监测。军事兽医研究所在“十一五”、“十二五”期间，利用该方法

检测样品 6000 余份，分离获得猪瘟病毒流行毒株 100 余株。中国兽医药品监察所国家猪瘟参考实验室以该方法作为猪瘟实验室诊断的常规方法，在临床样品检测、猪场猪瘟监测和净化中进行了广泛应用。自 2009 年以来，军事兽医研究所和中国兽医药品监察所多次参加由欧盟猪瘟参考实验室组织的猪瘟检测技术比对实验，采用本方法对测试盲样进行检测，历次检测的准确率均为 100%，比对实验结果证明该方法已达到了欧盟检测技术标准，处于国际先进水平。

三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

(一) 主要试验或验证的分析：

采用该方法参与农业部组织的猪瘟病原检测技术比对试验证实，该方法是目前国内猪瘟检测技术中最敏感、特异和准确的方法，其灵敏度可达 8.9×10^{-3} pg 核酸，对非典型猪瘟带毒猪的检测及猪瘟早期确诊具有重要意义。检测结果表明，该方法可检测出所有基因亚型的猪瘟病毒，且与猪繁殖与呼吸综合征病毒、口蹄疫病毒、猪伪狂犬病毒、猪圆环病毒、猪细小病毒、牛病毒性腹泻病毒等常见猪病病毒没有非特异性反应，具有良好的检测特异性。

根据制定国家标准的要求，选取重庆市动物疫病预防控制中心、广西省兽医研究所、广西大学、湖南农业大学及中国农业科学院哈尔滨兽医研究所等 5 家从事猪瘟科研和防控的省级动物疫控中心、科研院所、高校等不同性质的单位对本方法进行技术复核，充分验证猪瘟病毒套式 RT-PCR 方法标准在不同检测单位的适用性。

5 家单位使用该方法分别对标准起草单位提供的 10 份样品按照标准规程进行复核，其中 5 份样品为 CSFV 核酸阳性，5 份样品为阴性，阳性样品为不同

病毒含量的猪瘟流行毒株的细胞培养物。复核结果统计见表 1，各单位检测结果与实际情况均一致，表明该方法敏感度高，适用于我国猪瘟流行毒株的检测。同时，各单位在检测过程中，并没有出现假阳性或交叉污染的情况，方法显示了较好的特异性。标准征求意见结果表明，包括同时进行技术复核的 5 家单位在内共 10 家征求意见单位均认为该方法操作步骤简便易行，检测结果可靠，标准指导性强，全部同意将该方法列为猪瘟诊断的国家标准。

表 1 猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法复核结果汇总表

编号	单位名称	复核样品数量（份）		正确率
		阳性样品	阴性样品	
1	重庆市动物疫病预防控制中心	5	5	100%
2	广西省兽医研究所	5	5	100%
3	广西大学	5	5	100%
4	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所	5	5	100%
5	湖南农业大学	5	5	100%

（二）预期的经济效果

我国的生猪饲养量居世界首位，猪瘟又是我国养猪业的头号疫病，而当前非典型猪瘟流行普遍，与其他猪病混合感染现象日趋严重，仅通过临床症状和病理解剖进行诊断已经不能满足猪瘟防控的要求。实验室检测技术是畜禽疾病防控的重要手段，准确而快速的诊断是畜禽疾病控制的前提。因此，采用的诊断方法必须达到特异、敏感、快速、重复性好、结果易判定的标准。随着 PCR 技术的快速发展和兽医诊断实验室能力的提升，RT-PCR 技术已经在国内外广泛应用于

CSFV 核酸的检测，在准确性、特异性、灵敏性和快速方面与病毒分离法相比，均显示出极大优越性。目前，国内外不同实验室在 CSFV 基因组不同靶区建立了各自的 CSFV RT-PCR 检测方法，但都没有经过权威统一系统的对比评价，国际上也没有官方统一的 CSFV RT-PCR 检测方法。军事兽医研究所和中国兽药药品监察所采用《欧盟猪瘟实验室诊断技术手册》(2002/106/EC) 中推荐的猪瘟病毒特异性套式 RT-PCR 引物，建立了猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法，并起草了标准规程。本标准规程的发布实施，将为我国开展猪瘟早期和快速诊断、猪瘟监测、分子流行病学调查、猪瘟的净化提供标准技术方法，实现了我国与国际猪瘟检测技术的接轨，为我国的猪瘟检测结果获得国际贸易认可铺平了道路。将有利于我国猪瘟的控制和净化，从而减少疫情造成的经济损失。同时降低对居民身体健康和公共卫生安全的威胁，社会效益可观。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度

猪瘟是威胁世界养猪生产的一种重要传染病，各国政府高度重视该病的控制和检测技术的研究和规范。世界动物卫生组织 (OIE) 出版了《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2014)，发布了一系列猪瘟诊断标准方法。欧盟公布的《欧盟猪瘟控制措施》(2001) 对猪瘟的临床诊断进行了详细描述，还发布了《猪瘟诊断手册、诊断程序、采样方法和标准、实验室检测和确诊评估》(2002)，公布了《欧盟猪瘟实验室诊断手册》(2007)。OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》及《欧盟猪瘟实验室诊断手册》(2007) 均推荐将套式 RT-PCR 方法作为猪瘟的确诊方法，但对于猪瘟病毒核酸的 RT-PCR 检测目前尚未有国际标准。本标准规程起草过程中仅采用了《欧盟猪瘟实验室诊断技术手册》(2002/106/EC) 及 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》推荐的猪瘟病毒特异性套式 RT-PCR 引物，在此基

基础上,经过检测方法优化与大规模应用、国际比对试验评估,最终建立了包括核酸提取、样品采集与保存、反转录及套式 PCR 等技术内容的猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法技术标准。

五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

猪瘟诊断方法的现行国家标准为 2008 年颁布的《猪瘟诊断技术》(GB/T 16551-2008),该标准规定了猪瘟临床诊断、病理学诊断及实验室诊断方法的技术要求,其中包括猪瘟病毒套式反转录聚合酶链式反应(RT-nPCR)方法,但该方法在标准中并未给出 RT-PCR 引物序列这一关键、核心信息,不利于标准在检验、检疫或科研中的实际应用。此外,鉴于该方法在实际应用中的检测灵敏度低于本标准提出的 RT-PCR 方法,现行标准起草单位中国兽医药品监察所 OIE 猪瘟参考实验室在实际检测工作中已不再采用本方法。

本标准提出的套式 RT-PCR 方法与《猪瘟诊断技术》中套式反转录聚合酶链式反应的原理相同,但不是同一方法。与《猪瘟诊断技术》相比,本标准中的 RT-nPCR 方法基于欧盟推荐的、在国际猪瘟防控和研究领域被广泛采用的 RT-PCR 引物。本标准是《猪瘟诊断技术》标准中相应 RT-nPCR 方法的有益补充。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

无

七、标准性质(强制性,推荐性)的建议,特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

建议将《猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法》批为推荐性标准,以积累更多数据,为制定强制性国家标准做准备。

八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）

标准发布后，为了有效贯彻实施，建议农业部有关部门确定培训对象，拨专款，责成标准起草单位举办全国技术培训班，对有关技术人员进行相关技术强化操作培训，培训效果要达到：懂原理、操作熟练、判定准确，回单位基本能独立工作。

九、废止现行有关标准的建议；

无

十、其他应予说明的事项。

无