ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 278—2025

猪流感病毒与北美株和欧洲株猪繁殖与呼吸综合征病毒三重荧光 RT-PCR 检测方法

Triplex real time RT-PCR detection method for Swine influenza virus、North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus

中国兽医协会 CVMA

2025－8－13 发布　　2025－8－13 实施

中国兽医协会　　发布

中国兽医协会
CVMA

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专利的责任。

本标准由中国海关科学技术研究中心提出。

本标准由中国兽医协会归口。

本标准起草单位：中国海关科学技术研究中心、中国动物疫病预防控制中心、成都海关技术中心、沈阳海关技术中心、长沙海关技术中心。

本标准主要起草人：王素秋、史喜菊、白子龙、杜思乐、周智、高志强、耿庆华、林华、汪琳、张伟、蒲静、赵相鹏、张小寒、邓丛良、刘全国、徐立伟、禹思宇。

中国兽医协会 CVMA

中国兽医协会
CVMA

猪流感病毒与北美株和欧洲株猪繁殖与呼吸综合征病毒三重荧光RT-PCR检测方法

1 范围

本文件规定了猪流感病毒与北美株和欧洲株猪繁殖与呼吸综合征病毒三重荧光RT-PCR检测方法操作规程。

本文件适用于猪流感病毒与北美株和欧洲株猪繁殖与呼吸综合征病毒的鉴别检测。

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 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

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。

BHQ：黑洞淬灭基团（Black Hole Quencher）

Cy5：花青素5（Cyanine5）

DEPC：焦碳酸二乙酯（Diethyl pyrocarbonate）

FAM：6-羧基荧光素（6-Carboxyfluorescein）

HEX：六氯-6-甲基荧光素（6-Hexachlorofluorescein）

PRRSV-EU：欧洲株猪繁殖与呼吸综合征病毒（European Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus）

PRRSV-NA：北美株猪繁殖与呼吸综合征病毒（North American Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome Virus）

SIV：猪流感病毒（Swine Influenza Virus）

5 仪器与设备

5.1 多通道荧光 PCR 仪。

中国兽医协会 CVMA

5.2 生物安全柜。

5.3 冰箱（2 ℃～6 ℃和－20 ℃）。

5.4 台式冷冻离心机。

5.5 组织匀浆机。

5.6 水浴锅或金属浴仪。

5.7 漩涡器。

5.8 可调单道移液器（0.2 μL～2 μL、1 μL～10 μL、10 μL～100 μL、20 μL～200 μL 和 100 μL～1000 μL）。

6 试剂和耗材

6.1 试剂

6.1.1 除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 的要求。所有试剂均用无核酸酶的容器分装。

6.1.2 商品化病毒总核酸提取试剂盒或其他病毒核酸提取试剂。

6.1.3 商品化荧光 RT-PCR 试剂盒：含一步法荧光 RT-PCR 反应混合液，反转录酶、DNA 聚合酶等。

6.1.4 无水乙醇。

6.1.5 75 %乙醇。

6.2 阳性对照

猪流感病毒体外转录的非感染性 RNA 片段、北美株和欧洲株猪繁殖与呼吸综合征病毒体外转录的非感染性 RNA 片段，片段序列见附录 A。也可以使用其他经过确认的阳性质控品。

6.3 阴性对照

猪流感病毒阴性样品、北美株和欧洲株猪繁殖与呼吸综合征病毒阴性样品。

6.4 引物和探针序列

引物和探针序列见附录 B。

7 生物安全要求

样品处理和核酸提取以及废弃物处理按照GB 19489规定，在相应等级的生物安全实验室或者生物安全柜中进行，并做好个人防护。

8 样品采集和处理

病料采集和处理应按照NY/T 541有关规定进行，可以采集动物血液、组织、鼻拭子和肛拭子等。

9 病毒核酸提取

病毒核酸提取见附录C。

9.1 样品采集

按照NY/T 541规定进行样品的采集和处理。无菌注射器静脉采血，不少于2 mL，用自然析出法分离血清后，置于无菌血清管中。血清清亮，无溶血，无污染。

9.2 血清样品的保存与运输

按照 NY/T 541 规定进行血清样品的存放与运输。血清样品置 2 ℃～8 ℃条件下保存。若超过一周检测，置于- 20 ℃以下冷冻保存。

10 荧光RT-PCR反应

10.1 荧光 RT-PCR 反应体系

多重荧光RT-PCR反应体系组成见附录D.1。单重荧光RT-PCR反应体系组成见附录D.2。

10.2 荧光 RT-PCR 反应程序

荧光 RT-PCR 反应程序见附录 D.3。

10.3 结果描述及判定

10.3.1 试验成立条件

所有阳性对照（FAM、Cy5和HEX）均出现S形扩增曲线且Ct值≤30，阴性对照和空白对照（FAM、Cy5和HEX）均无扩增曲线且Ct≥40或者无值。满足此条件，视为此次试验有效。

10.3.2 结果判定和鉴别

10.3.2.1 有典型扩增曲线且 Ct≤35，判定为核酸检测阳性；

10.3.2.2 有扩增曲线但 35 < Ct < 40，属于疑似区间，需要重新确认，建议使用单重荧光 RT-PCR 方法确认；如果 Ct 值仍然< 40，则判定为核酸检测阳性，如果 Ct 值≥40 或者无 Ct 值，判定为核酸检测阴性。

10.3.2.3 没有扩增曲线，或者 Ct≥40，判定为核酸检测阴性。

10.3.2.4 FAM 阳性荧光信号表示 PRRSV-NA 核酸检测阳性，Cy5 阳性荧光信号表示 SIV 核酸检测阳性，HEX 阳性荧光信号表示 PRRSV-EU 核酸检测阳性；两种阳性荧光信号表示对应的其中两种病毒核酸检测阳性，三种阳性荧光信号表示 SIV、PRRSV-NA 和 PRRSV-EU 三种病毒核酸检测阳性，结果鉴别见表 1。

表 1 结果鉴别

荧光信号阴阳性	病毒核酸检测结果
FAM（ + ）	PRRSV-NA 核酸检测阳性
Cy5（ + ）	SIV 核酸检测阳性

中国兽医协会 CVMA

HEX（+）	PRRSV-EU 核酸检测阳性
FAM（+）Cy5（+）	PRRSV-NA 和 SIV 核酸检测阳性
FAM（+）HEX（+）	PRRSV-NA 和 PRRSV-EU 核酸检测阳性
Cy5（+）HEX（+）	SIV 和 PRRSV-EU 核酸检测阳性
FAM（+）Cy5（+）HEX（+）	PRRSV-NA、SIV 和 PRRSV-EU 核酸检测阳性

中国兽医协会 CVMA

附 录 A
（资料性）
病原基因参考序列

A.1 SIV-M基因参考序列（GenBank Accession No.GQ422388.1）

5'-ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTATGTTCTCTCTATCGTTCCGTCAGGCCCCCTCA
AAGCCGAGATAGCGCAGAGACTCGAAGATGTGTTTGCAGGGAAAAACACCGATCTTGAAGCACT
CATGGAATGGTTAAAGACAAGACCA**ATCCTGTCACCTCTGACTAAGGG**GATTTTAGGATTTGT
GTC*ACGCTCACCGTGCCCAG*TGAG**CGAGGACTGCAGCGTAGACG**CTTTGTCCAGAATGCCCTAA
ATGGGAATGGTGATCCGAACAACATGGACAAAGCGGTCAAACTGTACAGAAAACTTAAAAGGG
AAATAACATTCCACGGGGCCAAAGAAGTAGCGCTCAGTTACTCTGCTGGTGCACTTGCCAGTTGC
ATGGGCCTCATATACAACAGAATGGGGACTGTCACCGCTGAGGTGGCCTTTGGTCTAGTATGCGC
AACCTGTGAACAAATTGCTGATTCCCAGCATCGATCTCATAGACAAATGGTGACAACAACCAATC
CACTAATCAGGCATGAGAACAGAATGGTACTAGCCAGCACAACAGCTAAAGCCATGGAACAAAT
GGCTGGATCAAGTGAACAAGCAGCAGAGGCTATGGAGGTTGCTAGCCAGGCTAGACAAATGGTA
CAGGCAATGAGAACAATTGGGACTCACCCTAGTTCCAGTGCTGGTCTAAAAGATGATCTTCTTGA
AAATCTACAGGCCTATCAGAAACGAATGGGAGTGCAAATGCAACGATTCAAGTGATCCTCTCATT
GCTGCCGCAAGCATCATTGGGATTTTGCACCTGATATTGTGGATTCTTGATCGTCTTTTTTTCAAA
TGCATTTACCATCACTTTAAATATGGTCGAAAAAGAGGGCCTTCTACGGAAGGAGTGCCGGAGTC
CATGAGGGAAGAATATCGGCAGAAACAGCAGAGTGCTGTGGATGTTGACGATGGTCATTT
TGTCAACATAGTGCTAGAGTAA-3′

注：下划线部分为连入pMD-18T载体的SIV-M基因目标检测片段，黑体为引物序列，斜体为探针序列。

A.2 PRRSV-NA株N基因参考序列（GenBank Accession No.FJ800696.1）

5‘-ATGCCAAATAACAACGGCAAGCAGCAAAAGAAAAAGAAGGGGAATGG**CCAGCCAGTCA**
ATCAGCTGTGCCAAATGCTGGGTAAGATCATCGCCCAACAAAACC*AGTCCAGAGGCAAGGGACC*
*GGG*GAAGAAAAATAGGA**AGAAAAACCCGGAGAAGCCC**CATTTCCCTCTAGCGACTGAAGATGA
CGTCAGGCATCACTTTACCCCTAGTGAGCGGCAATTGTGTCTGTCGTCGATCCAGACTGCCTTCA
ATCAGGGCGCTGGAACTTGTGCCCTGTCAGATTCAGGGAGGATAAGTTACACTGTGGAGTTTAGT
TTGCCGACGCAACATACTGTGCGTCTGATCCGCGCCACAGCATCACCCTCAGCGTGA-3′

注：下划线部分为连入pMD-18T载体的PRRSV-NA株N基因目标检测片段，黑体为引物序列，斜体为探针序列。

A.3 PRRSV-EU株N基因参考序列（GenBank Accession No.Z92534.1）

5‘-ATGGCCGGTAAAAACCAGAGCCAGAAGAAAAAGAAAAGTACAGCTCCGATGGGGAATG
GCCAGCCAGTCAATCAACTGTGCCAGTTGCTGGGTGCA*ATGATAAAGTCCCAGCGCCAGC*AACCT
AGGGGAGGACAGGCCAAAAAGAAAAAGCCTGAGAAGCCACAT**TTTCCCCTGGCTGCTGAAGA**
TGACATCCGGCACCACCTCACCCAGACTGAACGCTCCCTCTGCTTGCAATCGATCCAGACGGCTT
TCAATCAAGGCGCAGGAACTGCGTCGCTTTCATCCAGTGGGAAGGTCAGTTTTCAGGTTGAGTTC
ATGCTGCCGGTTGCTCATACAGTGCGCCTGATTCGCGTGACTTCTACATCCGCCAGTCAGGGTGC
AAGTTAA-3′

注：下划线部分为连入 pMD-18T 载体的 PRRSV-EU 株 N 基因目标检测片段，黑体为引物序列，斜体为探针序列。

附 录 B
（资料性）
引物和探针序列

引物、探针的名称与序列见表B.1。

表B.1 引物和探针序列

病原	靶基因	引物和探针	序列
北美株猪繁殖与呼吸综合征病（PRRSV-NA）	*N*	FP1	CCAGCCWGTCAATCAGCTGT
		FP2	CCAGCCGGTCAATCAGCT
		FP3	CCAGCCAGTCAACCAGCT
		RP1	GGCTTCTCCGGGTTTTTCTTY
		RP2	GGCTTCTCCGGGCTTTTCT
		RP3	GGGCTTCTCCGGGTTTTTATTC
		Probe1	FAM-CGGTCCCTTGCCTCTGGAC-BHQ1
		Probe2	FAM-CCGGTCCCTTRCCTCTRGACT-BHQ1
欧洲株猪繁殖与呼吸综合征病（PRRSV-EU）	*N*	FP1	CCAGCCAGTCAATCAACTGTG
		FP2	GCCAGTCAGTCAATCAACTGTG
		FP3	CCAGCCAGTCAATCAGCTGT
		FP4	GCCAGTCAGTCAATCAGCTGT
		RP1	TCATCTTCWGCAGCCAGGG
		RP2	TCATCTTCAGCAGCCAAGGG
		RP3	TCATCTTCAGCAGCTAGGGGA
		RP4	TCATCTTCAGCAGCTAAGGGAAA
		RP5	TCATCTTCAGCGGCCAGG
		Probe1	HEX-TGATRAARTCCCAGCGCCAGC-BHQ1
		Probe2	HEX-ATGATAAGGTCCCAGCGCCAG-BHQ1
猪流感病毒（SIV）	*M*	FP1	CCTGTCACCTCTGACTAAGGG
		FP2	ATCCTGTCACCTCTGACTAAAGG
		FP3	ATCTTGTCACCTCTGACTAAGGG
		FP4	CCTGTCACCTCTGACCAAGG
		RP1	CGTCTACGCTGCAGTCCTC
		RP2	CGTCTACGCTGWAGTCCTCG
		RP3	CGTCTACGTTGCAGTCCTCG
		Probe	Cy5-ACGCTCACCGTGCCSAG-BHQ2

中国兽医协会 CVMA

附 录 C
（资料性）
病毒核酸提取步骤

C.1 Carrier RNA溶液的配制

C.1.1 Carrier RNA 储存液配制

向装有310 μg Carrier RNA冻干粉的管子中加入310 μL RNase-Free ddH_2O，将Carrier RNA彻底溶解，得到终浓度为1 μg/μL的溶液，并分装、置于－20 ℃储存。

C.1.2 Carrier RNA 工作液的配制

根据样品数量计算所需缓冲液GB和Carrier RNA溶液的体积，将缓冲液GB与Carrier RNA溶液颠倒混匀，即得到Carrier RNA工作液；为避免溶液出现起泡现象，请勿使用涡旋振荡。

缓冲液GB体积的计算见公式（1）：

$$y = m \times n \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

y——需要加入缓冲液 GB 的体积（mL）；

m—— 0.22 mL；

n——同时提取的样品个数。

Carrier RNA溶液体积的计算见公式（2）：

$$z = x \times y \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

z——需要加入 Carrier RNA 溶液的体积（μL）；

x—— 28 μL/mL；

y——需要加入缓冲液 GB 的体积（mL）。

C.2 操作步骤

C.2.1 用移液器将 20 μL Proteinase K 加入一个干净的 1.5 mL 离心管中。

C.2.2 向离心管中加入 200 μL 血浆/血清/病毒培养液或 25 mg 组织匀浆（样品需平衡至室温），如果样本体积小于 200 μL，可加入 0.9 % NaCl 溶液补充。

C.2.3 加入 200 μL Carrier RNA 工作液，盖上管盖，涡旋振荡 15 s 混匀。

C.2.4 56 ℃孵育 15 min，简短离心，收集附着在管壁及管盖的液体。

C.2.5 加入 250 μL 无水乙醇，涡旋振荡 15 s，彻底混匀，在室温（15 ℃～25 ℃）放置 5 min。

C.2.6 简短离心，收集附着在管壁及管盖的液体。

C.2.7 将离心管中的溶液和絮状沉淀全部转移至 RNase-Free 吸附柱 CR2（吸附柱放在收集管中），盖上管盖，6 000 g 离心 1 min，弃收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

C.2.8 小心打开吸附柱盖子，加入 500 μL 溶液 GD（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），盖上管盖，6 000 g 离心 1 min，弃收集管中的废液，将吸附柱放回收集管。

中国兽医协会 CVMA

C.2.9　小心打开吸附柱盖子，加入 600 μL 溶液 PW（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），盖上管盖，静置 2 min，6 000 g 离心 1 min，弃收集管中的废液，将吸附柱放回收集管。

C.2.10　重复步骤 2.9。

C.2.11　小心打开吸附柱盖子，加入 500 μL 无水乙醇，盖上管盖， 6 000 g 离心 1 min，弃收集管中的废液。

C.2.12　将吸附柱放回收集管中，13 400 g 离心 3 min，使吸附膜完全变干，弃收集管中的废液。

C.2.13　将吸附柱放入一个新的 RNase-Free 离心管（1.5 mL）中，小心打开吸附柱的盖子，室温放置 3 min，使吸附膜完全变干。向吸附膜的中间部位悬空滴加 20 ~ 150 μL RNase-Free ddH_2O，盖上盖子，室温放置 5 min。

C.2.14　13 400 g 离心 1 min，收集到的即为病毒总核酸（DNA 或 RNA）。

注：上述提取步骤以TIANamp Virus DNA/RNA Kit为例，也可以使用其他等效核酸提取试剂，请遵照试剂盒使用说明书操作。

中国兽医协会 CVMA

附 录 D
（资料性）
一步法荧光 RT-PCR 反应体系和反应程序

D.1 一步法三重荧光RT-PCR反应体系

一步法三重荧光 RT-PCR 反应体系见表 D.1。

表D.1 一步法三重荧光RT-PCR反应体系（20 μL）

混合液组分	体积（μL）	终浓度（μM）
2×Multiplex RT-PCR 缓冲液	10	1×
Multiplex 酶混合液	1	1×
引物混合物	1.6	400
PRRSV-NA 探针（FAM 标记）	0.4	200
AIV-A 探针（Cy5 标记）	0.4	200
PRRSV-EU 探针（Hex 标记）	0.4	200
病毒总核酸	5	
ddH_2O 补齐至总体积	20	

注：1.引物混合物指的是3种病原的所有引物等量混合物；2. 此反应体积以Path-IDTM Multiplex one-step RT-PCR kit为例，也可以使用其他等效的多重荧光RT-PCR试剂，请遵照试剂说明书配制。

D.2 一步法单重荧光RT-PCR反应体系

一步法单重荧光 RT-PCR 反应体系见表 D.2。

表D.2 一步法单重荧光RT-PCR反应体系（20 μL）

混合液组分	体积（μL）	终浓度（nM）
2×Multiplex RT-PCR 缓冲液	10	1×
Multiplex 酶混合液	1	1×
上下游引物	1.6	400
探针	0.4	200
病毒总核酸	5	
ddH_2O 补齐至总体积	20	

注：此反应体积以Path-IDTM Multiplex one-step RT-PCR kit为例，也可以使用其他等效的单重荧光RT-PCR试剂，请遵照试剂说明书配制。

D.3 一步法荧光RT-PCR反应程序

一步法三重荧光 RT-PCR 反应程序及一步法单重荧光 RT-PCR 反应程序见表 D.3。

中国兽医协会 CVMA

表D.3 一步法荧光RT-PCR反应程序

温度	反应时间	循环数
48 ℃	10 min	1
95 ℃	10 min	1
95 ℃	15 s	44
60 ℃	45 s	

注：将反应体系混合液充分混合后，最后加入模板，6000 g 离心1 min，按照以上反应程序，进行一步法荧光RT-PCR反应。

中国兽医协会 CVMA