

团 体 标 准

T/CVMA 279—2025

猪伪狂犬病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型三重荧光 PCR 检测方法

Triplex real time PCR detection method for porcine pseudorabies virus,
porcine parvovirus and porcine circovirus type 2

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、沈阳海关技术中心、中国动物疫病预防控制中心、成都海关技术中心、长沙海关技术中心。

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

中国兽医协会
CVMA

猪伪狂犬病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型三重荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了猪伪狂犬病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒2型三重荧光PCR检测方法操作规程。
本文件适用于猪伪狂犬病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒2型的鉴别检测。

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）
PCV-2：猪圆环病毒2型（Porcine Circovirus type 2）
PRV：猪伪狂犬病毒（Porcine Pseudorabies Virus）
PPV：猪细小病毒（Porcine Parvovirus）

5 仪器与设备

5.1 多通道荧光 PCR 仪。

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 多重荧光定量 PCR 试剂。

6.1.4 无水乙醇。

6.1.5 75 %乙醇。

6.2 阳性对照

含猪伪狂犬病毒（PRV）gE 基因的体外重组质粒、含猪细小病毒（PPV）NS1 基因的体外重组质粒、含猪圆环病毒 2 型（PCV-2）ORF2 基因的体外重组质粒，序列片段序列见附录 A。也可以使用其他经过确认的阳性质控品。

6.3 阴性对照

猪伪狂犬病毒阴性样品、猪细小病毒阴性样品和猪圆环病毒2型阴性样品。

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

样品采集和处理应按照 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。

10 荧光PCR反应

10.1 荧光 PCR 反应体系

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

10.2 荧光 PCR 反应程序

荧光 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 $Ct \leq 30$ ，阴性对照和空白对照（FAM、Cy5和HEX）均无扩增曲线且 $Ct \geq 40$ 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 $Ct \leq 35$ ，判定为核酸检测阳性；

10.3.2.2 有典型扩增曲线，但 $35 < Ct < 40$ ，属于疑似区间，需要重新确认，建议使用单荧光 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 $Ct \geq 40$ ，判定核酸检测阴性。

10.3.2.4 FAM 阳性荧光信号表示 PCV-2 核酸检测阳性，Cy5 阳性荧光信号表示 PRV 核酸检测阳性，HEX 阳性荧光信号表示 PPV 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 PCV-2、PRV 和 PPV 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 (+)	PCV-2 核酸检测阳性
Cy5 (+)	PRV 核酸检测阳性
HEX (+)	PPV 核酸检测阳性
FAM (+) Cy5 (+)	PCV-2 和 PRV 核酸检测阳性
FAM (+) HEX (+)	PCV-2 和 PPV 核酸检测阳性
Cy5 (+) HEX (+)	PRV 和 PPV 核酸检测阳性
FAM (+) Cy5 (+) HEX (+)	PCV-2、PRV 和 PPV 核酸检测阳性

附 录 A
(资料性)
病原基因参考序列

A. 1 PRV-gE基因参考序列 (GenBank Accession No.OP879553.1)

5'-GGCCACGCCAACGACACGGGCCTCTACACGCTGCACGACGCCTCGGGGCCGCGGGCCGT
GTTCTTTGTGGCGGTGGGCGACCGGCCGCCGCGCGGACCCGGTGGGCCCCGCGCGCCACGAG
CCCCGCTTCCACGCGCTCGGCTTCCACTCGCAGCTCTTCTCGCCCCGGGGACACGTTCGACCTGATG
CCGCGCGTGGTCTCGGACATGGGCGACTCGCGCGAGAACTTTACCGCCACGCTGGACTGGTACTA
CGCGCGCGCGCCCCCG**CGGTGCCTGCTGTACTACGTGTACGAGCCCTGCATCTACACCCGCGC**
GCGCCCGAGTGCCTGCGCCCGGTGGACCCGGCGTGCAGCTTCACCTCGCCGGCGCGCGCGCG
CTGGTGGCGCGCCG-3'

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

A. 2 PPV-NS1 基因参考序列 (GenBank Accession No.AY583318.1)

5'-AAAGACCAGAACATACACAACCAATAAGAGACAGAATGTTAAACATAAACCTAACCAGA
AAACTGCCAGGTGATTTTGGACTTTTAGAAGAACTGAATGGCCACTAATATGTGCTTGGTTGGT
AAAGAAAGGTTACCAAGCAACAATGGCTAGCTATATGCATCATTGGGGAAATGTACCTGATTGG
TCAGAAAAATGGGAGGAGCCAAAAATGCAACCCCAATAAATACACCAACAGACTCTCAGATTT
CCACATCAGTGAAAACCTTCGCCAGCGGACAACAACACTACGCAGCAACTCCAATACAGGAGGACCT
GGATTTAGCTTTAGCCTTGGAGCCGTGG**AGCGAGCCAACAACCAACTTTCACCAACCTGCACT**
TAACTCCAACACCGCCAGATTCAGCAATACGGACACCAAGTCCAACTTGGTCGGAAATAGAAACC
GACATAAGAGCCTGCTTTGGTGAAAACCTGTGCACCCACAACAACCTTGAATAA-3'

注：下划线部分为连入pMD-18T载体的PPV-NS1基因目标检测片段，黑体为引物序列，斜体为探针序列。

A. 3 PCV-2 ORF2 基因参考序列 (GenBank Accession No.KY388468.1)

5'-TCTGAATTGTACATACATGGTTAC**ACGGATATTGTATTCTGGTCGTATATACTGTTTTC**
GAACGCAGTGCCGAGGCCTACGTGGTCTACATTTCCAGCAGTTTGTAGTCTCAGCCACAGCTGAT
TTCTTTTGTGTGTTGGTTGGAAGTAATCAATAGTGGAATCTAGGACAGGTTTGGGGGTAAAGT
AGCGGGAGTGGTAGGAGAAGGGCTGGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACATAGGGGTC
ATAGGTGAGGGCTGTGGCCTTTGTTACAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCACTGGAGCCCACTC
CCCTGTCACCTGGGTGATCGGGGAGCAGGGCCAGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAG
TATTCAAAGGGCACAGAGCGGGGTTTGAGCCCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGA
ATCTCATCATGTCCACCGCCCAGGAGGGCGTTTTGACTGTGGTTCGCTTGATAGTATATCCGAAG
GTGCGGGAGAGGCGGGTGTGAAGATGCCATTTTCTCTTCTCCAGCGGTAACGGTGGCGGGGGTG
GACGAGCCAGGGGCGGCGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTGTCTTCTCTC
CGGTAACGCCTCCTTGGATACGTCAT-3'

注：下划线部分为连入pMD-18T载体的PCV-2 ORF2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
伪狂犬病毒 PRV	<i>gE</i>	FP1	CGGTGCCTGCTGTACTACG
		RP1	GGCGAGGTGAAGCTGCA
		Probe1	Cy5-CGAGCCCTGCATCTACCACC-BHQ2
猪细小病毒 PPV	<i>NS1</i>	FP1	AGCGAGCCAACAACACCA
		RP1	CACCAAAGCAGGCTCTTATGTC
		Probe1	HEX-ACCAACCTGCACTTAACTCCAACA-BHQ1
猪圆环病毒2型 PCV-2	<i>ORF2</i>	FP1	ACGGATATTGTAKTCCTGGTCGT
		RP1	CTTCCAACCMAAYAACAAAAGRAATCA
		RP2	ACTTCCAACCAAATAACAAAAGAAATCAG
		RP3	CCAACCAAACAACAAAAGAAACCA
		Probe1	FAM-CAGTGCCGAGGCCTACGTG-BHQ1
		Probe2	FAM-CAGTGCCGAGGCCTACRTG-BHQ1

附 录 C
(资料性)
病毒核酸提取步骤

C.1 病毒核酸提取步骤

C.1.1 用移液器将 20 μL Proteinase K 加入一个干净的 1.5 mL 离心管中。

C.1.2 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.1.3 加入 200 μL Carrier RNA 工作液, 盖上管盖, 涡旋振荡 15 s 混匀。

C.1.4 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 简短离心, 收集附着在管壁及管盖的液体。

C.1.5 加入 250 μL 无水乙醇, 涡旋振荡 15 s, 彻底混匀, 在室温(15 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$) 放置 5 min。

C.1.6 简短离心, 收集附着在管壁及管盖的液体。

C.1.7 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, 6000 g 离心 1 min, 弃收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

C.1.8 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。

C.1.9 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, 6000 g 离心 1 min, 弃收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管。

C.1.10 重复步骤 1.9。

C.1.11 小心打开吸附柱盖子, 加入 500 μL 无水乙醇, 盖上管盖, 6000 g 离心 1 min, 弃收集管中的废液。

C.1.12 将吸附柱放回收集管中, 13400 g 离心 3 min, 使吸附膜完全变干, 弃收集管中的废液。

C.1.13 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 ddH₂O, 盖上盖子, 室温放置 5 min。

C.1.14 13400 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。

附录 D

(资料性)

一步法荧光 PCR 反应体系和反应程序

D.1 一步法三重荧光PCR反应体系

一步法三重荧光 PCR 反应体系见表 D.1。

表D.1 一步法三重荧光PCR反应体系 (20 μ L)

混合液组分	体积 (μ L)	终浓度 (μ M)
2×IQ Powermix PCR 缓冲液	10	1×
引物混合物	0.8	400
PCV-2 探针 (FAM 标记)	0.4	200
PRV 探针 (Cy5 标记)	0.4	200
PPV 探针 (Hex 标记)	0.4	200
病毒总核酸	5	
DEPC 水补至总体积至	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IQ Powermix PCR kit为例，也可以使用其他等效的多重荧光PCR试剂，请遵照试剂说明书配制。

D.2 一步法单重荧光PCR反应体系

一步法单重荧光 PCR 反应体系见表 D.2。

表D.2 一步法单重荧光PCR反应体系 (20 μ L)

混合液组分	体积 (μ L)	终浓度 (nM)
2×IQ Powermix PCR 缓冲液	10	1×
上下游引物	0.8	400
探针	0.4	200
病毒总核酸	5	
DEPC 水补至总体积至	20	

注：此反应体积以IQ Powermix PCR kit为例，也可以使用其他等效的多重荧光PCR试剂，请遵照试剂说明书配制。

D.3 一步法荧光PCR反应程序

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

表D.3 一步法荧光PCR反应程序

温度	反应时间	循环数
95 $^{\circ}$ C	5 min	1
95 $^{\circ}$ C	15 s	44
60 $^{\circ}$ C	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PCR反应。

中国兽医协会
CVMA