**团体标准《十足目虹彩病毒1检测 荧光定量PCR法》**

**（征求意见稿）编制说明**

**一、任务来源和起草单位**

根据《广西标准化协会关于下达2021年第三十八批团体标准制修订项目计划的通知》（桂标协〔2021〕99号）文件精神，由广西水产科学研究院提出申报的团体标准《十足目虹彩病毒1检测 荧光定量PCR法》（项目编号2021-3801）已获立项。该团体标准由广西水产科学研究院提出、由广西水产技术推广站和广西水产科学研究院共同起草。

**二、标准制定的目的和意义**

2019年3月，国际病毒分类委员会（ICTV）根据虹彩病毒工作组已报道的研究结果，在虹彩病毒科中添加额外的一个属，将其命名为十足目虹彩病毒属(Decapodiridovirus)；虾血细胞虹彩病毒（shrimp iridescent virus，SHIV）和红螯螯虾虹彩病毒（Cheraxquadricarinatus iridovirus，CQIV）被确认为同一个种的两个病毒株，该病毒种被正式命名为十足目虹彩病毒1 (Decapod iridescent virus 1，DIV1)，即DIV1是十足目虹彩病毒属发现的第一个种。DIV1是近年新发现并鉴定的一种新型虹彩病毒，可感染凡纳滨对虾、罗氏沼虾、红螯螯虾、中国对虾等多种经济养殖虾类并可引起大规模死亡，也可感染浮游生物、河虾、鲫、螺蛳以及河蟹等常见水生生物成为传染源传播病毒。DIV1具多种易感宿主的特性使其更易于传播流行，已引起我国多个地区的养殖虾类暴发疫病大批死亡。鉴于DIV1引起的虾虹彩病毒病（DIV1D）的严重危害性，我国从2017年起已将DIV1D纳入《国家水生动物疫病监测计划》，近几年监测结果显示，我国沿海多省市的监测样品检出阳性，检出品种包括凡纳滨对虾、罗氏沼虾、中国对虾、红螯螯虾和克氏原螯虾等我国主要养殖虾品种，表明DIV1已成为中国虾类养殖业面临的新威胁。因此，建立一种快速且准确的DIV1定量检测方法，应用于虾苗检疫、亲虾筛选及成虾养殖疫情监测，为DIV1更敏感、高效检测提供技术参考标准。

目前国际动物卫生组织(OIE)和国内均没有TaqMan-MGB荧光定量PCR检测十足目虹彩病毒的相关标准发布。荧光定量 PCR 是在 PCR 反应体系中加入荧光标记物，利用仪器通过荧光强度的检测对 PCR 扩增产物进行定量，其检测和分析过程在密闭的单管里由机器自动完成，可克服目前农业农村部在DIV1D监测计划中推荐采用的套式PCR法操作繁琐、检测时间长、不可定量等缺点，并以其速度快、灵敏度高、特异性强、自动化程度高、能定量检测病原体感染的强弱等优点而被广泛应用于病原体检测，被认为是实验室检测病原体最理想的方法；而TaqMan-MGB探针则是荧光定量PCR使用的一种荧光探针，其3′端的淬灭基团为不发光的MGB(Minor Groove Binder)结合物，可实现高Tm值的探针长度缩短易于与模板退火而利于提高方法的灵敏度，且探针3′端不发光的淬灭基团与5′端报告基团在空间的位置更接近，使荧光本底降低、实验结果分辨率更高，因此TaqMan-MGB探针凭借其技术优势在人及动植物各种病原体的定量检测中得到了广泛应用。TaqMan-MGB探针荧光定量PCR不仅能发挥荧光定量PCR的优势而克服套式PCR的缺点，其探针的MGB基团相对于TaqMan探针还有利于提高方法的灵敏度，非常适用于对灵敏度要求高的病原体定量检测。鉴于此，非常有必要将荧光定量PCR纳入DIV1的检测标准中，对有效防控DIV1引起的病毒病具有重要意义。

**三、标准的编制过程**

1、成立编制工作小组。团体标准《十足目虹彩病毒1检测 荧光定量PCR法》项目任务下达后，广西水产科学研究院会同广西水产技术推广站成立了此标准编制工作组，制订了编制总体工作方案及进度安排，确定了标准中主要内容草案，明确了任务分工及工作技术路线。

2、资料收集、方法建立。确定编制工作小组后即展开调查研究，收集资料，包括国内、区内已颁布的相关标准、国内公开发表的相关技术性资料。查阅是否有相关的荧光定量PCR方法应用于虾十足目虹彩病毒1的检测，经综合分析研判，编制人员根据分工，采购试剂、设计引物探针、结合项目组开展的相关科研和检测工作基础，广泛从虾场收集十足目虹彩病毒1病原，初步建立十足目虹彩病毒1荧光定量PCR方法。

3、优化方法，形成征求意见稿。标准起草小组成员在前期研究工作以及初步建立的方法上，将试剂浓度、各反应条件进行优化、改进，筛选最佳反应程序，建立标准的荧光定量PCR方法，制定荧光定量PCR检测技术的操作规程，标准起草小组根据国家标准化相关法律、法规要求，参考国内相关文献资料以及技术标准资料进行编写起草标准文稿。经两家起草单位工作人员讨论修改，最终完成《十足目虹彩病毒1检测 荧光定量PCR法》团体标准的征求意见稿。

**四、标准编制原则**

1、实用性原则

本文件是在充分查阅和收集相关资料文献，在国家标准、行业标准和地方标准尚未有荧光定量PCR法检测十足目虹彩病毒1的情况下制定的，荧光定量PCR方法在病原检测中应用广泛成熟。本标准已经过反复试验研究，对于样品的检测，特异性、敏感性、操作简便性优于普通的PCR方法，广西是对虾养殖大区，其他养殖的虾还有罗氏沼虾、克氏原鳌虾、澳洲小龙虾，这些品种均对虹彩病毒易感。因此，制定十足目虹彩病毒1的荧光定量PCR的检测标准非常必要和实用，是广西虾养殖业疫病防控和可持续发展的需要。

2、协调性原则

本文件在编写过程中注意了与虾虹彩病毒检测相关法律法规、标准的协调问题，在内容上与现行法律法规、标准协调一致。

3、规范性原则

本文件严格按照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》的要求和规定编写本文件的内容，保证标准的编写质量。

4、前瞻性原则

本文件在兼顾荧光定量PCR检测十足目虹彩病毒1的同时，还考虑到了病毒可能变异及检测方法发展的趋势和需要，在标准中体现了个别特色性、前瞻性和先进性条款，作为该病原检测技术发展的指导。

**五、标准主要内容及依据**

团体标准《十足目虹彩病毒1检测 荧光定量PCR法》主要章节内容包括：试剂与材料、仪器设备、操作方法及结果判定；主要依据来源为长期从事的病原分子生物学技术检验及参照的相关技术标准。

**1. 试剂与材料**

试剂和材料是此检测方法的必备品，根据所使用的试剂和材料详细列出使用到的试剂、主要仪器设备和耗材。

1.1 一般要求

所用试剂如无特殊说明均为分析纯试剂；试验用水应符合GB/T 6682-2008 一级水的要求。

此条款针对试剂纯度级别、试验用水要求。

1.2 引物与TaqMan-MGB探针

上游引物DIV1-qF1、下游引物DIV1-qR1、TaqMan-MGB探针DIV1-qP1根据寡核苷酸序列人工合成，扩增167bp的目的片段。使用浓度均为10 μmol/L。使用前按本标准要求先用灭菌DEPC水稀释，稀释后分装成小量置于-20℃保存备用，避免反复冻融。

引物序列是PCR检测的核心，其使用浓度决定扩增效率，此条款给出引物序列及使用配制浓度、保存方法。

1.3 DNA抽提试剂

商品化DNA抽提试剂盒、异丙醇等多种DNA提取的相关试剂。

此条款在于说明DNA提取所用到的关键试剂，能达到同等效果的试剂或试剂盒均可选择。

1.4 仪器设备

定量PCR仪、组织匀浆机、冰箱、高压灭菌锅、离心机等仪器设备。

此条款列出所必备的仪器设备，可用不同品牌，但须满足试验需要。

1.5 耗材

微量移液器枪头、离心管、0.2mL PCR 管、塑料或乳胶手套等。

此条款列出所必备的耗材，均为一次性使用，避免交叉污染，可用不同品牌耗材，但须满足试验需要。

**2.操作方法**

具体规定了采样、样品前处理、对照样品的处理、DNA提取、荧光定量PCR加样体系。

2.1 采样

样品采集按SC/T 7103-2008（水生动物产地检疫采样技术规范）的规定执行。

采样数量和方法关乎检测结果的可靠性，此条款确定采样按照国标规定，减少漏检和假阴性可能。

2.2 样品前处理

虾样按不同规格取不同组织。其中，受精卵、幼体、仔虾采集整条虾作为样品，3cm以下幼虾采集除虾眼外整条虾作为样品，3cm以上虾采集鳃、肝胰腺作为样品。采集的样品用组织匀浆机匀浆，立即进行DNA提取操作或–80℃超低温冰箱保存。

此条款考虑到样品的处理方式影响最终检测结果，比如虾眼含有PCR抑制物，需去除；成虾的鳃和肝胰腺组织中病毒含量最高，选择含毒量高的组织检测，降低漏检风险，该条款根据其他标准中虾样品处理方法及文献报道确定。

2.3 对照样品的处理

阳性对照样品和阴性对照样品的采集和取样参照检测样品同时进行，将采集的虾组织样品匀浆后小量（30mg）分装于1.5 mL离心管后置于–80℃超低温冰箱保存备用。每次检测前各取出1管阳性对照和阴性对照样品，与待检样品进行后续操作。

此条款规定必须设置阳性、阴性对照同时进行荧光定量PCR检测，以评价试验有效性，依据标准试验设置对照。

2.4 DNA的提取

取30mg样品，按照商品化动物组织基因组DNA快速提取试剂盒说明书提取总DNA，最后加60 μL洗脱缓冲液溶解DNA，置于–20℃保存备用。

此条款确定取样量及DNA抽提方法，推荐采用试剂盒提取DNA，长期实验研究结果表明，试剂盒提取DNA操作更简便、DNA损失更少、纯度更高。

2.5 荧光定量PCR方法建立（此章节为补充此方法各指标的支撑数据图、表）

2.5.1 引物与TaqMan-MGB探针的设计与合成

虹彩病毒的主衣壳蛋白(major capsid protein，MCP)基因中含有许多高度保守的结构域，以DIV1的MCP基因为检测靶基因。采用Primer Express 3.0 软件按荧光定量PCR引物和MGB探针的设计原则，在MCP基因(KY681039)区域设计多组特异的扩增引物和TaqMan-MGB探针，其中探针的5′端标记荧光染料FAM、3′端标记MGB基团。

2.5.2 病原核酸的提取及重组质粒标准品的制备

取50mg阳性病料组织，按照动物组织基因组DNA快速提取试剂盒说明书，提取虾核酸DNA，加50 μL洗脱缓冲液(EB)溶解DNA，置于–20℃保存备用。制备了重组质粒标准品（pMD18-T-MCPDIV1 )；提取重组质粒DNA，用核酸蛋白分析仪测定其浓度并转换为拷贝数；将重组质粒DNA以10倍梯度稀释至1.0×101～1.0×109拷贝/μL作为标准品，–20℃保存备用。

PCR扩增DIV1的MCP基因，获得与预期目的片段大小一致的扩增条带(图1)。目的片段回收纯化后克隆入pMD18-T载体，重组质粒pMD18-T-MCPDIV1经PCR、测序鉴定，所得目的片段序列与GenBank上公布的MCP基因部分序列同源性为100%，说明目的基因片段正确连接入pMD18-T载体。取阳性克隆菌液提取质粒，测定浓度并转换为拷贝数，pMD18-T-MCPDIV1浓度为4.62×109 拷贝/μL，可满足标准品的要求。

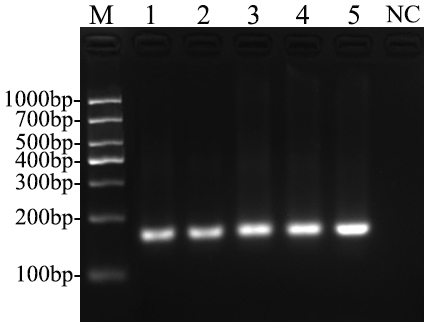


图1 DIV1-MCP基因的PCR扩增及pMD18-T-MCPDIV1的PCR鉴定结果

M: DL1000 DNA Marker; 1-2: DIV1-MCP基因; 3-5: pMD18-T-MCPDIV1; NC:阴性对照

2.5.3 荧光定量PCR反应条件的优化

以3个梯度(1.0×109、1.0×105、1.0×101拷贝/μL)的标准品DNA为模板，按试剂说明书在56～64℃范围内，以1℃的梯度进行荧光定量PCR扩增，以获得较低阈值循环数(Ct)值和较高的相对荧光强度增加值(ΔRn)时的退火温度为最佳。

以3个梯度(1.0×109、1.0×105、1.0×101拷贝/μL)的标准品DNA为模板，采用引物不同终浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 μmol/L)与探针不同终浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μmol/L)组合进行荧光定量PCR，以获得较低的Ct值和较高的ΔRn时的引物和探针浓度组合为最佳。

经比较不同退火温度及不同引物和探针浓度组合的扩增效果，最终确定反应体系为：Probe qPCR Mix (2×) 10μL，ROX Reference Dye Ⅱ 0.2 μL，上下游引物DIV1--qF1/qR1 (10 μmol/L)均为0.4μL，探针DIV1-qP1 (5 μmol/L)为1.2μL，模板2μL，用灭菌ddH2O补足至20 μL。反应条件为：95℃预变性30s；95℃变性5s，58℃退火并延伸45s，扩增40个循环；在58℃结束时收集荧光信号。

2.5.4 标准曲线的建立及敏感性试验

以10个梯度(1.0×109～1.0×100拷贝/μL)的标准品DNA为模板，用优化后的荧光定量PCR方法进行检测；利用数据分析软件进行分析，建立起始模板拷贝数(X)的对数与Ct值(Y)之间的标准曲线和标准方程，并根据各标准品DNA的扩增结果来判断该方法的定量范围和敏感性。结果显示(图2)，高浓度标准品(1.0×109～1.0×104拷贝/μL)的扩增曲线呈明显的“S”型，低浓度标准品(1.0×103～1.0×101拷贝/μL)的扩增曲线因未达扩增平台期呈半“S”型，各梯度标准品扩增曲线重复性好、荧光强度增量明显、间距均匀；标准品浓度为1.0×109～1.0×101拷贝/μL时，分析建立的标准曲线的线性关系好(图3)，标准曲线方程为Y=-3.249\*LOG(X)+38.98，Eff.(扩增效率)和RSq(相关系数方值)分别为103.1%和1.000。结果表明，建立的荧光定量PCR方法对标准品的扩增效率高，起始模板浓度范围为2.0×109～2.0×101拷贝/反应时，构建的标准曲线能够准确地反映目的产物的扩增，可用于定量分析。

经数据分析软件分析，标准品DNA为20拷贝/反应时，3个重复的Ct值分别为34.91、35.04、35.04，仍有明显的扩增曲线(图2)，且重复性好；标准品DNA为2拷贝/反应时，3个重复的Ct值分别为37.47、38.85、38.98，重复性差。因此，该方法的灵敏度约为20个拷贝/反应。为保证检测结果的准确性，应用该方法时建议以Ct值35为界限，若检测样品的Ct值小于或等于35，且有扩增曲线，则判为DIV1阳性；Ct值大于35，且有扩增曲线，则重复1次，如结果一致，判为DIV1阳性；Ct值大于35，重复结果未出现扩增曲线，判为DIV1阴性。

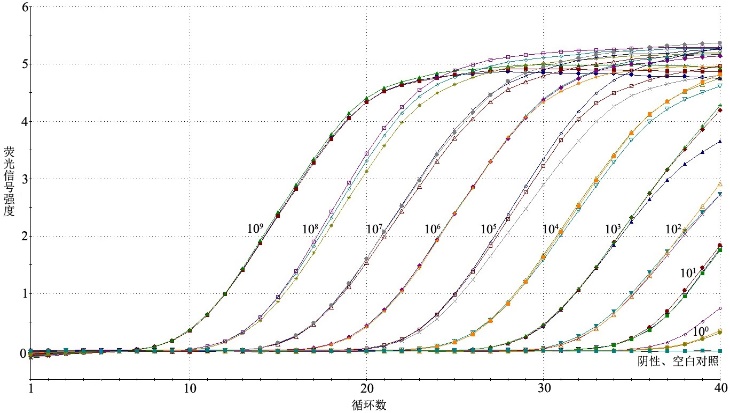
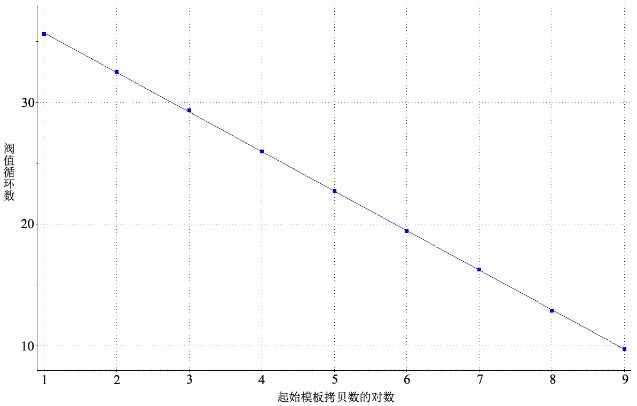
 

图2 标准品(1.0×109 ~1.0×100 拷贝/μL)荧光定量PCR扩增曲线 图3 荧光定量PCR检测DIV1的标准曲线

2.5.5 特异性试验

分别以DIV1、WSSV、IHHNV、EHP和 VpAHPND的核酸DNA为模板，用优化后的荧光定量PCR 方法进行检测，评价方法的特异性。结果(图4)，只有DIV1出现扩增曲线，Ct值分别为15.78、15.82、15.84、，判为阳性；而其他病原均未出现扩增曲线，判为阴性。说明本研究建立的荧光定量PCR对DIV1的检测具有很好的特异性。

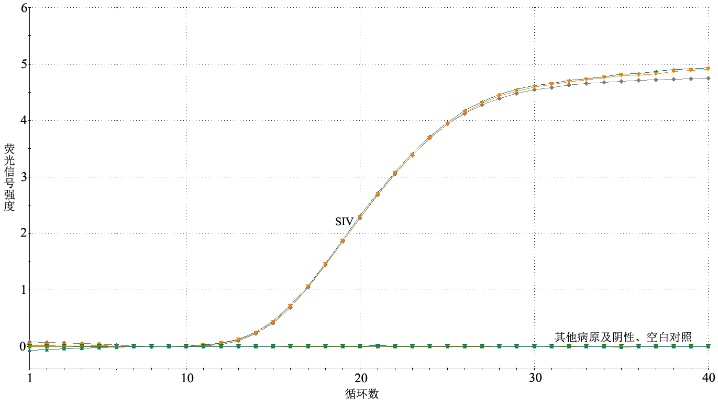


图4荧光定量PCR的特异性检测

2.5.6 重复性试验

选取3个梯度(1.0×107、1.0×106、1.0×105拷贝/μL)的标准品DNA为模板，在间隔第7天和第14天分别进行重复试验，每个梯度做3个平行，记录各次试验的Ct值，经过数据分析得到组内及组间的变异系数，检测标准品的稳定性及方法的重现性。变异系数(CV)=标准偏差(SD)/平均数(X)。1.0×107、1.0×106、1.0×105拷贝/μL 3组标准品的重复性试验结果见表2，组内的实验变异系数为0.27%～0.54%，组间实验变异系数为0.61%～0.95%，表明该方法的重复性和重现性都很好，结果稳定可靠；同时说明本研究制备的重组质粒DNA稳定性好，可作为标准品和阳性对照使用。

表2 DIV1荧光定量PCR重复试验结果

**Table2 Results of repeatability test of the real-time PCR for DIV1**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 标准品拷贝数 | 组内试验 | | | | | | 组间试验 | |
| 第1天 | | 第7天 | | 第14天 | | Ct±SD | CV(﹪) |
| Ct±SD | CV(﹪) | Ct±SD | CV(﹪) | Ct±SD | CV(﹪) |
| 1×107 | 15.67±0.06 | 0.36 | 15.88±0.07 | 0.45 | 15.96±0.06 | 0.38 | 15.84±0.15 | 0.95 |
| 1×106 | 18.82±0.05 | 0.27 | 18.96±0.07 | 0.37 | 19.05±0.09 | 0.49 | 18.94±0.12 | 0.61 |
| 1×105 | 22.12±0.09 | 0.41 | 22.31±0.08 | 0.34 | 22.39±0.12 | 0.54 | 22.27±0.14 | 0.62 |

2.5.7 荧光定量PCR法与套式PCR法的敏感性比较

提取DIV1阳性病料组织的阳性DNA以10倍梯度稀释(100～10-6)，取2μL各梯度DNA为模板同时进行荧光定量PCR法和套式PCR法检测(农业部DIV1D监测计划推荐方法)，比较它们的敏感性。采用荧光定量PCR法和套式PCR法分别对10倍梯度稀释的DIV1阳性DNA(100～10-5)进行检测，结果(图5、6)显示，荧光定量PCR法和套式PCR法均可检测到10-4稀释度的阳性DNA，即荧光定量PCR法的敏感度可达到套式PCR法的敏感度。

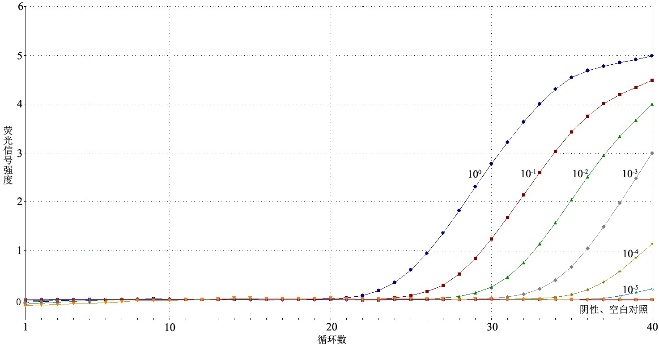
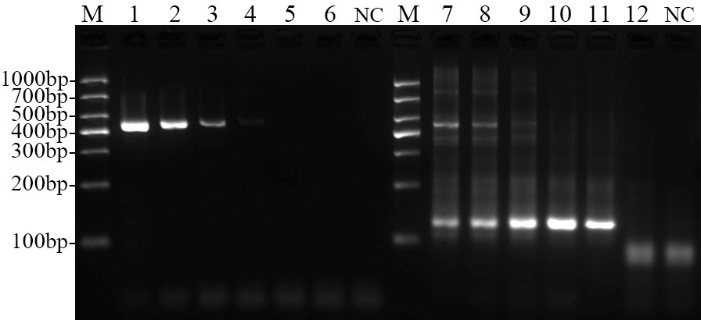
 

图5 荧光定量PCR法对临床样品的敏感性 图6 套式PCR法的对临床样品的敏感性

Fig.5 Sensitivity of the real-time PCR for DIV1 from clinical samples Fig.6 Sensitivity of the nested PCR for DIV1 from clinical samples

M: DL1000 DNA Marker; 1-6: 套式PCR法第一轮PCR产物;

7-12: 套式PCR法第二轮PCR产物; NC:阴性对照

**4. 结果判定**

4.1 定性检测

阳性对照Ct值小于35且出现S型扩增曲线，阴性对照和空白对照Ct 值不显示且未出现扩增曲线，实验有效；若检测样品的Ct值小于或等于35，且有扩增曲线，则判为DIV1 DNA阳性；Ct值大于35，且有扩增曲线，则重复1次，如结果一致，判为DIV1 DNA阳性；Ct值大于35，重复结果未出现扩增曲线，判为DIV1 DNA阴性。

此条款只针对于结果判定为阳性或阴性、无需定量病毒含量的样品。

4.2 定量检测

标准曲线的相关系数小于或等于-0.970，阳性对照Ct值小于35且出现S型扩增曲线，阴性对照和空白对照Ct值不显示且未出现扩增曲线，实验有效；检测样本中1×103拷贝/mg ≤ DIV1 DNA ≤ 1×108拷贝/mg，测定结果有效，可直接报告阳性及相应的拷贝量；检测样本中DIV1 DNA＞1×108拷贝/mg，即可直接报告为＞1×108拷贝/mg，也可用灭菌DEPC水10 倍梯度做相应稀释，使其拷贝量落在1×105～1×107拷贝/mg范围内再重新测定，测定结果应以稀释倍数进行校正；检测样本DIV1 DNA的拷贝量为1×101～1×103拷贝/mg时，建议对该样本进行双份重试，如双份样本重试结果仍在1×101～1×103拷贝/mg，则按实际值计算；如双份或一份重试结果＜1×101拷贝/mg，则判为DIV1 DNA阴性；Ct值不显示时或DIV1 DNA的拷贝量＜1×101拷贝/mg，该样本判为DIV1 DNA为阴性。

此条款将样品中可能检出的病毒量列出，以做出准确判定，依据多次试验结果所作规定，前期进行了重复性、稳定性、敏感性等试验，方法稳定、可靠、敏感性高，相对普通PCR操作更简便，交叉污染风险更小。结果判定中注明DIV1 DNA为阳性或阴性，DIV1 DNA阳性存在两种情况，一是DIV1活病毒感染中；一是曾受DIV1病毒感染，存在DNA，但不一定还存在DIV1活病毒，因此，此处结果判定为DNA核酸阳性或阴性，并非DIV1阳性或阴性。此条款中结果判定参考了《SC/T 7229-219 鲤浮肿病诊断规程》、《SC/T 1151.4-2011 虾黄头病毒检疫技术规范》等病原检测结果判定标准规定。

**六 国内外同类标准制修订情况**

经检索查阅，国内外DIV1快速检测技术如套式PCR、TaqMan探针定量PCR和LAMP等相继报道。水产行业标准《SC/T 7232-2020虾肝肠胞虫病诊断规程》于今年发布实施，但是其中的检测方法为套氏PCR，在实际检测工作中，套式PCR虽敏感性高，但需两轮PCR及电泳，操作繁琐，检测时间长且多次开盖容易交叉污染；TaqMan探针定量PCR由于探针长度太长，敏感性不够理想；LAMP灵敏、快速，但在实验室条件下易出现假阳性。鉴于上述现有DIV1检测方法在实际检测工作中存在的不足及TaqMan-MGB探针应用于定量PCR的优势，将TaqMan-MGB探针应用于DIV1的检测，必将有助于虾虹彩病毒病的快速诊断及有效防控。但迄今为止还未见应用TaqMan-MGB探针法检测DIV1的相关报道，国际(OIE)和国内亦未有检测十足目虹彩病毒DIV1的荧光定量PCR标准发布。

**七 重大分歧意见的处理经过和依据**

本标准研制过程中无重大分歧意见。

**八、自我承诺**

本标准内容与各项指标不低于强制性标准要求。

团体标准《十足目虹彩病毒1检测 荧光定量PCR法》

标准起草组

2022年10月15日