

# T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 685—2024

## 污水中猪蓝耳病病毒的检测 实时荧光 RT-qPCR 法

Real-time RT-qPCR for detection of porcine reproductive and respiratory  
syndrome virus in wastewater

2024 - 03 - 05发布

2024 - 03 - 11实施

广西标准化协会 发 布



## 前 言

本文件参照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。

本文件由广西农业职业技术大学提出并宣贯。

本文件由广西标准化协会归口。

本文件起草单位：南宁壮博生物科技有限公司、广西扬翔股份有限公司、金陵农牧集团有限公司、巨星农牧有限公司、深圳市京基智农时代股份有限公司、济凡生物科技（常州）有限公司、广西农业职业技术大学。

本文件主要起草人：林晓、余腾、陈俭、曾南方、伍少钦、张瑞竹、林鑫、覃军、王丽、钱平、李健、郭增良、黄震、杨亮、邝贞结、张伟超、殷玉鹏、罗莹盈、凌伟航、冯文春、侯宏波、龚小鹏、陈品、黄越、蒙兰飞、陈来运、韩典霖、陆金、高福明、陈斌、俸祥仁、王树艳、李凤梅、谢江、陈海云、郑凤鸣。



# 污水中猪蓝耳病病毒的检测 实时荧光 RT-qPCR 法

## 1 范围

本文件界定了污水中猪蓝耳病病毒的检测实时荧光RT-qPCR法涉及的术语和定义，描述了污水中猪蓝耳病病毒实时荧光RT-qPCR的检测方法。

本文件适用于污水中猪蓝耳病病毒的检测。

## 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

DB45/T 921 猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒的检测 多重反转录聚合酶链反应法

## 3 术语和定义

DB45/T 921界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**富集浓缩试剂** enrichment and concentration reagent

富含聚乙二醇（PEG）的试剂，用于对大体积生活污水或其他水体样品中病原体的核酸片段进行浓缩富集。

## 4 原理

向污水中加入富集浓缩试剂，富集浓缩试剂可使病毒颗粒快速形成多聚体，通过离心作用将水溶液与病毒颗粒多聚体分开，收集病毒颗粒多聚体形成的沉淀。采用柱提法或磁珠法提取核酸和实时荧光RT-qPCR法来检测猪蓝耳病病毒。

## 5 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682 中三级水的要求。

5.1 乙醇：75%。

5.2 磷酸盐缓冲液：1 mol/L，pH 值 7.2。

5.3 富集浓缩试剂盒。

5.4 病毒核酸提取试剂盒。

5.5 猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光定量 PCR 检测试剂盒。

5.6 离心管：1.5 mL、50 mL。

5.7 移液器：10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 mL，带滤芯。

5.8 无菌聚乙烯瓶。

注：可使用商品化试剂盒。

## 6 仪器设备

6.1 低温冰箱：-20  $^{\circ}$ C。

6.2 高速冷冻离心机：可控温至-4  $^{\circ}$ C，离心速度为 13 000 r/min。

- 6.3 振荡混匀器。
- 6.4 实时荧光 PCR 扩增仪。
- 6.5 二级生物安全柜。

## 7 试验步骤

### 7.1 样品采集与处理

#### 7.1.1 样品采集

7.1.1.1 根据采样场所排水系统分布情况,选取污水排水口、内部污水管网汇集处等关键位置,对未经消杀处理的污水进行采样。

7.1.1.2 用无菌聚乙烯瓶采集样品,体积为 200 mL~300 mL。

#### 7.1.2 样品贮运

7.1.2.1 样品采集后并标记标签,应在现场使用 75%乙醇对采样瓶外表面喷洒或擦拭进行消毒,并及时将样品送至实验室,运输过程中样品温度保持在 0℃~4℃。

7.1.2.2 实验室接到样品后宜在 48 h 内进行检测。如未及时检测,应将样品置于-4℃条件下保存。

#### 7.1.3 样品处理

7.1.3.1 将样品混合均匀,取同一场各 3 管 40 mL 的样品分别置于 3 个 50 mL 离心管中,在-4℃、2500 r/min 的条件下离心 30 min。剩余样品作为备份。

7.1.3.2 将 7.1.3.1 中所得上清液分别转移至富集浓缩试剂盒提供的预混试剂离心管中,使用振荡混匀器震荡 30 min,充分混合均匀。

7.1.3.3 在-4℃、12 000 r/min 的条件下离心 120 min,离心机降速时不应使用制动力。将离心管从离心机上取出,完全倾倒离心管中的上清液并弃除。在相同条件下再次离心 5 min,将离心管从离心机上取出,用移液器从每个离心管中吸出上清液,移液器吸头不应接触沉淀物。

7.1.3.4 将 200 μL 磷酸盐缓冲液(5.2)加入至离心管中,使用移液器反复吹吸沉淀,形成混悬液,同一场 3 管混悬液合为 1 管。

7.1.3.5 将混悬液转移至 1.5 mL 离心管中,于-4℃~0℃条件下保存,并于 24 h 内完成核酸提取和扩增。

### 7.2 核酸提取

在二级生物安全柜中打开装有混悬液的离心管,按照商品化病毒核酸提取试剂盒说明,取适量混悬液进行核酸提取,提取完成后应立即封盖并进行实时荧光 RT-qPCR 检测。剩余的混悬液和核酸提取样品应于-4℃条件下保存。

### 7.3 核酸扩增

采用实时荧光 PCR 扩增仪,按照商品化猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书的规定进行核酸扩增。每个核酸样品设置 3 个平行。

## 8 结果评价

### 8.1 结果成立条件

阳性对照 FAM 通道与 VIC 通道 Ct 值均 <35 且出现典型 S 型扩增曲线。阴性对照应无 Ct 值,试验结果有效;否则应重新进行试验。

### 8.2 阳性结果评价

8.2.1 FAM 通道 Ct 值 ≤38 且出现典型 S 型扩增曲线,判定为病毒核酸阳性。

8.2.2 FAM 通道 Ct 值 38<Ct≤45,判定为可疑,应对样品进行复测,若复测结果 Ct 值仍在 38~45 之间有明显指数增长,则判定为病毒核酸阳性。

### 8.3 阴性结果评价

8.3.1 FAM 通道无 Ct 值，同时 VIC 通道 Ct 值 $<38$ ，判定为病毒核酸阴性。

8.3.2 FAM 通道无 Ct 值，同时 VIC 通道 Ct 值 $>38$  或无 Ct 值，则检测结果无效，应对样品进行复测。

### 8.4 检出限

污水中猪蓝耳病病毒的检测实时荧光RT-qPCR法检出限为10 copies/ $\mu$ L。

## 9 生物安全措施

应符合GB 19489的规定。



中华人民共和国团体标准

污水中猪蓝耳病病毒的检测 实时荧光RT-qPCR法

T/GXAS 685—2024

广西标准化协会统一印制

版权专有 侵权必究