

# 《牛地方流行性白血病病毒检测鉴定方法—PCR 方法》编制说明

## 一、工作简况

### (一) 任务来源

#### 1 任务来源

本项目由农业部提出，国家标准化管理委员会列为 2009 年第一批国家标准制修订计划，并由全国动物卫生标准化技术委员会将此项目任务落实到 XXXX 组织编制，项目编号为 20090474-T-326。

#### 2 任务背景

牛地方流行性白血病（Enzootic Bovine Leukosis, EBL）是由牛白血病病毒（Bovine Leukemia Virus, BLV）所引起的以淋巴细胞持续性增生为特征的一种具有传染性的肿瘤性疾病。本病几乎遍布全世界各养牛国家，在某些牛群中血清阳性率高达60%，成为影响世界养牛业发展的重要传染病之一。根据流行病学和病原的不同可分为地方流行型和散发型，其中牛地方流行性白血病（EBL）是由牛白血病病毒引起的牛的一种慢性肿瘤性传染病，以淋巴细胞持续性增生为特征。最早于1871年发现于德国，随后，相继在欧洲、南北美洲和亚洲、澳洲的一些国家发生，现在几乎已遍布世界各地。1974年我国首次发现本病，继而在安徽、江苏、陕西、北京、辽宁、黑龙江、江西等省市均有发生。

该病是世界动物卫生组织（Office International Des Epizooties, OIE）规定的必报疫病，也是我国《一、二、三类动物疫病病种名录》

和《中华人民共和国进境动物检疫疫病名录》中的二类动物疫病。目前，此病尚无有效的疫苗，快速准确的诊断是控制EBL流行的前提。我国目前仅有检验检疫行业发布了相关检测标准，如《牛地方流行性白血病聚合酶链反应操作规程》(SN/T 1917-2007, 由本实验室起草)、《牛地方流行性白血病检疫技术规范》(SN/T1315-2010, 涉及病原分离鉴定、间接酶联免疫吸附试验、阻断酶联免疫吸附试验和核酸检测，琼脂凝胶免疫扩散试验等方法，其中PCR方法指定采用SN/T1917-2007的方法)。本标准的制定，为我国各级实验室开展EBL的检测和鉴定提供了标准化的检测程序。

## **(二) 起草单位**

略

## **(三) 主要工作过程**

### **1、起草阶段**

在计划下达之后，起草单位根据计划任务书的内容，修改采用OIE《Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals》(2010版)第2.4.11章PCR检测方法，经试验验证，编制了标准草案。2011年初，OIE发布了新版《陆生动物疾病诊断试验和疫苗手册》征求意见稿，并在世界范围内征求意见，拟对2010版《陆生动物疾病诊断试验和疫苗手册》(以下简称《手册》)进行修订，其中第2.4.11章有关BLV PCR检测方法的技术内容将进行较大修改。经全国动物卫生标准化技术委员会同意，本项目完成时间推迟至2012版《手册》发布之后。2011年12月，2012版《手册》发布。2012~2013年，起

草单位根据 2012 版《手册》修改内容，进行了方法验证，重新起草了标准草案，并编写了《编制说明》。

## 2、征求意见阶段

### （1）技术性复核

2015年底，华中农业大学动物医学院、武汉动物疫病预防控制中心、河南科技大学动物科技学院根据起草单位提供的标准草案和复核作业指导书，对本项目进行了技术性复核。三家单位能够按照标准草案开展检测工作，检测结果符合预期。

### （2）征求意见

2016年初，项目组将标准征求意见稿、编制说明发送到吉林出入境检验检疫局检验检疫技术中心、北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心、厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心、华中农业大学、福建省动物疫病预防控制中心、湖南农业大学动物医学院、武汉市动物疾病预防控制中心、广州机场出入境检验检疫局、河南科技大学动物科技学院、江苏出入境检验检疫局动植物检测中心等10家单位征求意见，收到回函10家，共提出意见和建议48条。起草单位逐条进行了梳理，采纳了意见和建议36条，并根据意见和建议对征求意见稿和编制说明进行了修改和修正；未采纳意见12条，未采纳意见主要集中在标准名称、引用标准、以及OIE2012版《手册》第2.4.11章中未涉及的内容。

## 3、送审阶段

2017年初，项目组向全国动物卫生标准化技术委员会提交了标准送审稿、编制说明、征求意见汇总表等材料。全国动物卫生标准化技术委员会就送审稿、编制说明、征求意见汇总表等材料提出了11条修

改要求，项目组按要求对送审稿、编制说明、征求意见汇总表等进行修改和调整。

## 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

#### 1、先进性原则

本标准修改采用的是世界动物卫生组织 2012 版《陆生动物疾病诊断试验和疫苗手册》第 2.4.11 章 B.1. b) 套式 PCR 方法（2016 版《手册》章节号修订为第 2.4.10 章 B.1.2，但技术内容为与 2012 版一致），该套式 PCR 检测方法是世界动物卫生组织唯一认定的 BLV 的 PCR 检测方法，也是国际贸易推荐的检测方法之一。

#### 2、实用性原则

PCR 检测技术是目前被广泛使用的一种快速诊断技术，在动物疫病、物种鉴别、食品检验等很多领域被得到了很好的应用，技术成熟度高，试剂商业化程度高，运行成本较低，便于基层实验室的推广和使用。本标准采用的是套式 PCR 方法，便于各级实验室应用。

#### 3、科学性原则

牛地方流行性白血病检测方法主要包括病毒分离、PCR 方法、ELISA 等，对于有母源抗体的病例、散发性及传染性淋巴瘤的肿瘤组织、可疑肿瘤组织、新近感染尚未产生抗体应答且 ELISA 检测呈现弱阳性病例等，该检测方法具有明显的诊断优势，是 ELISA 检测方法的有效补充。

#### 4、统一性原则

标准文本的编写严格按照 GB/T1.1 和 GB/T 20001.4 等要求进行，

做到了标准结构、文本等的统一。

## **(二) 提出本标准的依据**

PCR 方法是 OIE《手册》推荐的牛地方流行性白血病病原的检测方法之一。在各种 BLV 的 PCR 检测方法中，套式 PCR 是快而敏感的方法。

目前，我国还没有发布有关牛地方流行性白血病病毒 PCR 检测方法的国家标准，该标准的制定，对于我国有关单位开展牛地方流行性白血病的快速检测提供了技术手段。

## **(三) 制定本标准的基础**

标准起草单位具有丰富的牛地方流行性白血病检测技术研究经验，主持完成质检总局科技项目 1 项：《牛常见病毒性传染病定性及定量 PCR 检测方法研究及试剂盒的研制》（项目编号 2005IK049）、主持完成江苏出入境检验检疫科技项目 1 项：《牛白血病重组 gp51-ELISA 试剂盒的研制》（项目编号 2005KJ01）、制定检验检疫行业标准 1 项：《牛地方流行性白血病聚合酶链式反应操作规程》（SN/T 1917-2007），在国内核心期刊和内部刊物上发表相关论文多篇：《地方流行性牛白血病间接 gp51\_ELISA 抗体检测试剂盒的研制》（中国兽医学报，2009 年第 11 期）、《牛白血病病毒 env（gp51）基因的克隆和原核表达及间接 ELISA 抗体检测》（畜牧兽医学报，2009 年第 4 期）、《从血凝块中提取 DNA 的快捷方法》（畜牧与兽医，2008 年第 10 期）、《牛常见病毒性传染病定性及定量 PCR 检测方法及检测试剂盒研制》（中国微生物学会 2008 年学术年会《论文摘要集》）等。

项目组人员长期从事动物疫病的实验室检测工作，具有较好的工作基础，拥有研究员 1 人、副高级职称 2 人。近年来主持和参与完成质检总局和江苏局有关科研制标项目 10 余项，其中国家标准 2 项、行业标准 2 项，获得质检总局科技兴检一等奖 1 项、二等奖 4 项。实验室拥有全自动核酸提取仪、梯度 PCR 仪、凝胶成像系统、冷冻离心机等成套的分子生物学实验仪器设备，可开展病原的分子生物学检测和鉴定。实验室具有病毒分离检测室 1 间、PCR 检测室 1 间，整体布局合理。具有三废处理设施和安全措施，并制定了严格的病原微生物安全操作规程，能够合理使用并有效控制病原的扩散。

#### **（四） 实验内容**

本标准修改采用 OIE2012 版《陆生动物诊断试验及疫苗标准手册》第 2.4.11 章的 BLV PCR 检测方法。完成了如下实验内容：

1 根据手册中的参考文献，对手册中提到但未明确基因序列的 mimics（内对照）进行制备，对内对照最佳工作浓度（量）进行了确定；

2 对两种套式 PCR 方法的灵敏度、重复性和特异性分别进行试验确认。

#### **（五） 实际应用效果**

经 3 家单位的技术复核，本标准方法能够用于相关样品中 BLV 的检测和鉴定。同时，起草单位制定的检验检疫行业标准《牛地方流

行性白血病聚合酶链式反应操作规程》(SN/T 1917-2007, 该标准等同采用 OIE 《陆生动物诊断试验及疫苗标准手册》PCR 检测方法), 已用于数十万头进境奶牛 EBL 的辅助检测, 对于防止 EBL 通过进境奶牛进入我国并传播提供了有力保障。

### **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**

##### **1、内对照质粒的制备**

OIE2012 版《手册》第 2.4.11 章关于 BLV 核酸 PCR 检测方法提到使用内对照进行检测质量控制, 但未给出具体的核酸序列。为了便于本标准的使用, 项目组依据《手册》参考文献 Ballagi-Pordany & Belak (1996)中提到的方法, 优化设计了一段 702bp 的基因序列, 经克隆纯化作为内对照质粒(见标准草案附录 B)。经试验验证, 内对照质粒的最佳使用浓度为 10fg/mL, 即每 50 $\mu$ L 反应体系中内对照质粒的使用量约为 5 个拷贝。

##### **2、内对照质粒使用浓度对套式 PCR 方法一的影响**

经试验验证, 当反应管中 BLV 拷贝数远高于内对照拷贝数时, 仅 BLV 扩增出预期条带, 内对照不出现扩增条带; 当 BLV 拷贝数与内对照浓度相当或略高时, BLV 和内对照扩增条带同时出现; 当 BLV 拷贝数远低于内对照拷贝数或无 BLV 核酸时, BLV 不出现预期条带, 仅内对照出现预期条带。验证结果与参考文献结果一致。建议 50  $\mu$ L 反应体系内对照用量为 5~50 个拷贝。

### 3、两种套式 PCR 方法的灵敏度

项目组通过提取 BLV 持续感染 FLK 细胞培养物核酸，并定量，对两种方法的检测灵敏度进行了试验。经验证，套式 PCR 方法一检测灵敏度可达 6.875 ng/50 $\mu$ L，套式 PCR 方法二检测灵敏度可达 9.8ng/50 $\mu$ L。两种检测方法的灵敏度能够满足检测要求。

### 4、两种套式 PCR 方法的特异性试验

取实验室保存的赤羽病病毒（AKV）、牛病毒性腹泻病毒（BVDV）、牛传染性鼻气管炎病毒（IBRV）和大肠杆菌，进行特异性试验。经两种套式 PCR 方法检测，上述三种牛常见病毒病病原和一种牛体内常见细菌均未出现非特异性条带。说明该方法具有较高的特异性。

## （二）预期的经济效果

随着我国国内消费市场的不断发展，我国对乳制品和牛肉制品消费量越来越大，奶牛和肉牛养殖数量在不断增加。2015 年第六届中国奶业大会暨中国奶业展览会发布信息称：我国奶牛存栏 1460 万头，达到历史最高水平。据统计，我国肉牛现存栏 6840 万头，去年牛肉产量达到 689 万吨，跃居世界第三位，占到世界牛肉总产量的 10%。近年来，我国奶牛进口数量不断增加，据海关统计，2014 年中国奶牛进口量增长至 21.5 万头，较 2013 年增加 11.3 万头，同比增长 110.7%。随着与我国签订自由贸易协定的国家越来越多，国外优质奶牛、肉牛品种必将大量进入我国。随着国内肉牛和奶牛养殖量以及进口量的不断增加，牛地方流行性白血病的发生和传播风险必将不断增



大。

本标准的制定和实施,可用于国内该病的诊断和进出口贸易的检测,对于防治国内该病的发生和随国际贸易传入我国,具有广泛的应用价值。

#### **四、采用国际标准和国外先进标准的程度**

本标准草案是修改采用 OIE2012 版《陆生动物诊断试验和疫苗手册》第 2.4.11 章(2016 版调整为 2.4.10 章,除结构编排调整之外,技术内容未修订) BLV 核酸 PCR 检测方法,并根据手册中涉及参考文献描述的方法,对手册中部分内容进行细化。

#### **五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准为首次制定,与有关法律法规和强制性国家标准不产生冲突。本标准的制定,对于更好的贯彻和执行《中华人民共和国动物防疫法》、《中华人民共和国动物检疫法》、《动物检疫管理办法》、《中华人民共和国进境动物检疫疫病名录》等法律法规以及相关强制性标准具有积极的作用。

#### **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**

BLV PCR 检测方法作为 OIE《陆生动物疾病诊断试验和疫苗手册》的推荐方法之一，在 EBL 的诊断中发挥的重要作用，促进了相关产品的国际贸易，该标准可作为推荐性国家标准。

## **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）**

1、标准的发布和实施应有 3 个月以上的过渡期。

## **九、废止现行有关标准的建议；**

本标准替代了 SN/T 1917-2007，建议废止该标准。

## **十、其他应予说明的事项。**

1、《陆生动物疾病诊断试验和疫苗手册》2010 版与 2012 版有关牛地方流行性白血病 PCR 检测方法的主要差别：

（1）、2012 版删除了核酸提取方法，改由检测实验室自主选择合适的提取方法。

（2）、增加了 Fechner et al. (1996) 建立的套式 PCR 检测方法。

2、2016 版《陆生动物疾病诊断试验和疫苗手册》有关牛地方流行性白血病的章节号调整为 2.4.10，文本结构重新进行了编排，但技术性内容仍未 2012 版内容。

起草单位：连云港出入境检验检疫局

起草日期：2017 年 4 月 28 日