猪瘟病毒野生株和疫苗株荧光 RT-PCR 鉴别方法的建立

余以刚[1]，黄韵[1]，陶文扬[1]，章丽[1]，吴晖[1]，肖性龙[1]，赖富饶[1]，杨锡洪[2]
（1. 华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）（2. 广东温氏佳润食品有限公司，广东云浮 527400）

摘要：为了建立猪瘟病毒野生株和疫苗株荧光 RT-PCR 鉴别方法，设计了 1 对通用引物和 2 条特异性 MGB 探针。此外，为防止假阴性结果出现，制备了假病毒用于全程检测监控。测试了本方法的特异性，灵敏度，重复性等技术指标。结果显示，在选定的猪病相关病毒组内特异性符合率达 100%；对野毒株和疫苗株的检测灵敏度分别达到 1 $TCID_{50}$/mL 和 0.1 $TCID_{50}$/mL；重复性实验表明组内和组间变异系数均在 0.7~2.2%之间。临床比对试验结果显示，荧光 RT-PCR 对猪肉、脾脏和血液病料进行猪瘟野毒检测的阳性率分别为 66.7%、60.0%、77.8%，而传统方法的阳性率分别为 52.4%、40.0%、50.0%；检出率比传统方法要高。此外，临床试验样本中，PCR 抑制物在猪肉、脾脏和血液病料中存在的比例分别为 9.5%、10.0%和 5.6%，显示了假病毒作为内标对 PCR 检测监控的重要作用。

关键词：猪瘟病毒；猪瘟弱毒疫苗株；荧光 RT-PCR；假病毒；检测；荧光
文章篇号：1673-9078(2013)8-1978-1983

Development of Real-time RT-PCR using MGB Fluorescence Probe for Differentiation of Wild-type and Vaccine Strains of Classical Swine Fever Virus

YU Yi-gang[1], HUANG Yun[1], TAO Wen-yang[1], ZHANG Li[1], WU Hui[1], XIAO Xing-long[1], LAI Fu-rao[1], YANG Xi-hong[2]
(1.College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.Guangdong Wen's Caren Food Co., Ltd., Yunfu 527400, China)

Abstract: In order to the develop multiples real-time PCR for detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of classical swine fever virus, a pair of common primers and two differently-labeled specific MGB Fluorescence probes were designed against conserved domain of the 5'-UTR of wild-type viruses and C-strain vaccine. Moreover, in order to prevent the false negative result, pseudovirus was prepared for monitoring. The multiples real-time PCR method showed 100% specificity for the selected panel with the sensitivity being of 1 $TCID_{50}$/mL for wild-type virus and 0.1 $TCID_{50}$/mL for C-strain vaccine. The reproducibility experiments showed that the variation coefficients (%CV) of intra-assay and inter-assay ranged from 0.7% to 2.2%. By using this method, CSFV RNA was detected in specimens of meat, spleen and blood with positive rates of 66.7%, 60.0% and 77.8%, respectively, while the positive rates obtained by using the standard assay was 52.4%, 40.0% and 50.0%, respectively. The result statistics showed the existence of PCR inhibitos in the clinical specimens and specimens with inhibition ratio being of 5.6~10.0%, indicating the importance of pseudovirus as IAC when PCR was used to detect the RNA of wild-type viruses and C-strain vaccine.

Key words: Viruses; C-strain vaccine; Polymerase chain reaction; pseudovirus; detection; fluorescence

收稿日期：2013-04-11
基金项目：国家自然科学基金青年科学基金资助项目(31101279)；教育部高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题（20110172120034）；广东省科技计划资助项目(2011B020314004)；广东省省部产学研结合项目（2012B091100113）；广东省天然产物绿色加工与产品安全重点实验室开放课题(201101)
通讯作者：肖性龙（1977-），主要从事食品安全与检测研究

猪瘟（Hog Cholera，Classical Swine Fever）是由猪瘟病毒（Classical Swine Fever Virus, Hog Cholera Virus）引起的一种高度接触性传染病，被世界动物卫生组织（OIE）列为须报告的动物疫病。近年来，我国猪瘟的流行和发病特点发生了很大变化，呈非典型化态势，临床上主要表现为隐性带毒和慢性感染，其症状主要有内脏器官多发性出血、梗塞和坏死，死亡

率甚高，是造成畜牧业重大经济损失的主要传染病之一[1]。

根据第八次国际病毒分类委员会报告：牛病毒性腹泻病毒-2（BVDV-2）、牛病毒性腹泻病毒-1（BVDV-1）、羊边界病病毒（BDV）和长颈鹿病毒也属于瘟病毒属，且与CSFV存在血清学交叉反应，对猪瘟的诊断造成了一定干扰[1~2]。猪瘟兔化弱毒疫苗（HCLV）在我国的大规模应用，对控制猪瘟起到了非常重要的作用，但同时也给CSFV野毒感染猪和疫苗接种猪的鉴别诊断带来较大困难。猪瘟的传统诊断方法包括动物接种试验、病毒分离培养、免疫荧光试验、抗原捕捉ELISA等[3]。这些方法在敏感性、特异性、时效性等方面都存在各自的不足，尤其不适于CSFV野毒感染的早期快速诊断。为了弥补这些不足，本研究依据猪瘟病毒（CSFV）高度保守的5’非编码区（UTR）[3]建立了一种基于MGB探针的实时荧光RT-PCR鉴别方法。同时为了防止假阴性结果出现，本研究制备了假病毒用于全程检测监控。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 病毒样本

猪瘟病毒由湖南检疫局提供，其它与猪致病性有关的病毒提供单位见表2；临床检测采用的80份疑似猪瘟病料样本在湖南各地收集的；猪瘟兔化弱毒疫苗购自广州永顺生物制药，PK-15细胞购自中国兽医药品监察所。

1.1.2 试剂及仪器

主要试剂：一步法RT-PCR试剂盒(大连宝生物)；Qiagen Viral RNA/DNA Extraction Kit（德国QIAGEN）；胎牛血清购自Hyclone；DMEM培养基购自Gibico；DEPC和Trizol购自广州英韦创津公司、氯仿、异丙醇、75%乙醇（DEPC处理）为广州威佳公司产品，用于制假病毒的PARN载体[4~6]由本实验室构建。

主要仪器：SANYO二氧化碳培养箱（日本三洋）；倒置显微镜（蔡司）；ABI 7500荧光定量PCR仪（ABI），Biophotometer分光光度计（Eppendorf），Sigma低温超速离心机（Sigma）。

1.2 实验方法

1.2.1 引物、探针的设计与合成

从GenBank上获得猪瘟病毒和兔化弱毒疫苗株（C株）5’-UTR序列，采用DNAStar软件进行同源比对分析后，利用Primer Express 3.0设计通用引物CSFV-F和CSFV-R,以及分别针对CSFV野毒特异性的MGB探针和兔化弱毒疫苗株特异的MGB探针，序列见表1。引物由大连宝生物公司合成，探针由美国应用生物系统公司合成。

表1 引物和探针序列

Table 1 Nucleotide sequences of primers and fluorogenic probes

引物或探针	序列(5’→3’)	Tm值/℃	定位[a]	大小/bp	GC含量/%	扩增片段/bp
CSFV-F	GGGCTAGCCATGCCCATAGTA	59.9	90~110	21	57	122
CSFV-R	GGCTTCTGCTCACGTCGAA	58.7	192~210	19	58	
CSFV-W-Pb	FAM-AGTCCCTCCGTTTGC-MGB	69.0	117~132	15	60	
CSFV-V-Pb	VIC-TCCCTCCGTTTTGC-MGB	68.0	117~130	14	57	132
Pb-IC	CY5-GAGCCTTCTCTCTGC-MGB	69.0		15	60	

注：a 参考基因组JQ268754.1（GenBank）。

1.2.2 假病毒(IAC)的设计和制备

为了防止假阴性的出现，设计并且制备了监控提取和反应的假病毒内标。所构建的内标核酸包含CSFV引物识别序列和特有的内标探针识别序列（表1）。内标的构建首先参照Malorny等[4]和Roesnstraus等[5]所发表的方法制备含122 bp内标探针识别序列的PARN-CSFV-IC重组质粒。将PARN-CSFV-IC重组质粒转化到BL21菌体中，IPTG诱导表达后制备含该片段的假病毒[6~7]。

1.2.3 病毒核酸的提取

剪取小块病料样本至1.5 mL研钵中，加100 μL PBS，用研磨棒充分磨碎样本。再加入500 μL PBS振荡30 s，12000 r/min离心10 min，转移上清至无菌离心管。取20 μL上清至1.5 mL离心管中，加入80 μL PBS制成样本粗提液；将病料粗提液和病毒细胞培养物RNA的提取分别按Qian Viral RNA/DNA Extraction Kit操作说明书进行。每份样品均加入1 μL假病毒参与样品核酸的提取，假病毒的加入不会影响RT-PCR扩增过程[8]。

1.2.4 荧光RT-PCR的建立和优化

荧光RT-PCR的反应体系参照TaKaRa One Step RNA PCR Kit说明书配置，RT-PCR反应体系中包括

2.5 μL 10×buffer，0.5 μL Taq polymerase(5 U/μL)，0.5 μL reverse transcriptase （5 U/μL），2.5 μL RNase inhibitor（40 U/μL），2.5 μL dNTP(10 mM)，将表 1 中的通用引物和 3 条 MGB 探针同时加入 25 μL 的反应体系中，模板上样 10 μL，其余用 DEPC 水补齐，于 ABI 7500 荧光 PCR 仪进行实时 PCR 扩增，对荧光 RT-PCR 的程序进行优化，同时对反应体系中的引物和探针浓度进行筛选，以获得最低的 CT 值和较高的荧光强度增加值（△Rn）。

1.2.5 荧光 RT-PCR 的灵敏度

将猪瘟样本（经测序证实）中分离出的猪瘟病毒和兔化弱毒疫苗株病毒一同利用 PK-15 细胞在含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基中进行增殖，先用含 50 μg/mL 的正大酶素的DMEM 培养基 1 h 后换新鲜培养基在 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养 24 h 后收集细胞，利用 96 孔板测定 CSFV 和兔化弱毒疫苗株病毒的病毒滴度，按 Reed-Muench 氏法[9]计算 $TCID_{50}$。将病毒培养液进行 10 倍系列稀释 (0.1~10^5 $TCID_{50}$/mL)，经 Qiagen Viral RNA/DNA Extraction Kit 抽提核酸后进行荧光 RT-PCR 检测，重复 3 次，确定最低的检测灵敏度。

1.2.6 荧光 RT-PCR 的特异性

利用建立起的荧光 RT-PCR 法分别对 29 株与猪致病性相关的病毒和购买的兔化弱毒疫苗株进行检测，验证其特异性。

1.2.7 荧光 RT-PCR 的重复性

通过对十倍系列稀释 CSFV 和 C-strain vaccine 的细胞培养液（10^4~10^{-1} $TCID_{50}$/mL）每个梯度同时重复检测 4 次后统计 CT 值，然后计算对 CSFV 和 C-strain vaccine 组内检测的变异系数；组间荧光 RT-PCR 的重复性是通过对十倍系列稀释的 CSFV 和 C-strain vaccine 的细胞培养液（10^4~10^{-1} $TCID_{50}$/mL）每天检测一次，连续检测 4 d，然后统计 CT 值，计算对 CSFV 和 C-strain vaccine 组间检测的变异系数。用组内组间检测的变异系数测试本方法的重复性。

1.2.8 临床试验

利用所建立的实时荧光 RT-PCR 法对 80 份临床疑似阳性病料进行检测，包括 42 份猪肉、10 份猪脾脏和 18 份血液病料；同时利用病毒分离、中和试验、IFA 进行病毒血清型分型以及测序等传统方法对这些临床疑似样本进行检测；对荧光 RT-PCR 方法和传统方法检测进行比较。

2 结果与讨论

2.1 荧光 RT-PCR 的优化

优化结果表明，在 25 μL 反应体系中，扩增效果最好的引物探针浓度为：1.0 μL CSFV-F（10 μmol/L），1.2 μL CSFV- R（10 μmol/L），0.6 μL CSFV-W-Pb（10 μmol/L），0.5 μL CSFV-V-Pb（10 μmol/L），0.5 μL-IC-Pb（10 μmol/L）。优化后的反应程序如下：50 ℃ 20 min，95 ℃ 3 min；95 ℃ 10 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ l min 重复 5 个循环；95 ℃ 10 s，65 ℃ 40 s 重复 40 个循环；5 个预循环后开始收集荧光（65 ℃）。

2.2 荧光 RT-PCR 的灵敏度

将已测定病毒滴度的猪瘟病毒和兔化弱毒疫苗株细胞培养液进行 10 倍系列稀释 (0.1~10^5 $TCID_{50}$/mL)，抽提核酸后进行荧光 RT-PCR 检测。结果显示，该方法检测猪瘟病毒和兔化弱毒疫苗株病毒的灵敏度分别达到 1 $TCID_{50}$/mL 和 0.1 $TCID_{50}$/mL。

表 2 猪瘟病毒野生株和疫苗株的荧光 RT-PCR 特异性实验

Table 2 Specificity of real-time RT-PCR for wild-type and vaccine viruses of CSFV[a]

基因	病毒株[b]（原始编号）	来源	结果[c]
Pestivirus	Classical Swine Fever Virus(CSFV)HNCIQ3-125	HuNan,2004	+
	Classical Swine Fever Virus(CSFV)HNCIQ3-121	HuNan,2005	+
	Classical swine fever virus vaccine	Guangzhou,2008	+
	Bovine viral diarrhea virus(BVDV)LNCIQm31	LiaoNing,2005	-
	Bovine viral diarrhea virus(BVDV)SHCDC0260	Shanghai,2005	-
	Bovine viral diarrhea virus(BVDV)SHCDC0317	Shanghai,2005	-
Arterivirus	Highly virulent Chinese-type PRRSV ADCPC 101	ChongQing,2006	
	Highly virulent Chinese-type PRRSV ADCPC 123	ChongQing,2006	
	Highly virulent Chinese-type PRRSV ADCPC 131	ChongQing,2006	
	Highly virulent Chinese-type PRRSV ADCPC 145	ChongQing,2006	

转下页

接上页

	Highly virulent Chinese-type PRRSV ADCPC 152	ChongQing,2006	-
	Normal PRRSV ADCPC 1001	ChongQin g,2001	-
	Normal PRRSV ADCPC 1120	ChongQing,2003	-
	Normal PRRSV ADCPC 1321	ChongQing,2004	-
	Normal PRRSV ADCPC 1542	ChongQing,2005	-
Parvovirus	Porcine parvovirus(PPV)SZCIQ 0138	ShenZheng,2004	-
	Porcine parvovirus(PPV)SZCIQ 0219	ShenZheng,2004	-
Varicellovirus	Porcine pseudorabies virus(PRV)GZCDC 0564	Guangdong,2004	-
	Porcine pseudorabies virus(PRV)GZCDC 0958	Guangdong,2004	-
	Porcine pseudorabies virus(PRV)ADCPC1983	Sichuan,2005	-
Coronavirus	Transmissible gastroenteritis virus(TGEV)GZCDC 0874	Guangzhong,2006	-
	Transmissible gastroenteritis virus(TGEV)GZCDC 0368	Guangzhong,2006	-
	Transmissible gastroenteritis virus(TGEV) HNCIQ 7-303	HuNan,2005	-
Circovirus	Porcine circovirus 2(PCV-2)SZCIQ0165	ShenZheng,2005	-
	Porcine circovirus 2(PCV-2)LNCIQ404	LiaoNing,2005	-
Enterovirus	Swine Vesicular Disease Virus(SVDV)SZCDC 035 8	ShengZheng,2004	-
	Swine Vesicular Disease Virus(SVDV)ADCPC397	Chongqing,2005	

注：a ADCPC：重庆动物疾病控制预防中心；LNCIQ：辽宁检疫局；SZCIQ：深圳检疫局；HNCIQ：湖南验检疫局；SHCDC：上海疾病控制与预防中心；GZCDC：广州疾病控制与预防中心；SZCDC，深圳疾病控制与预防中心；b 病毒类型经血清学试验或病毒分离试验确定，CSFV 经测序确定；c RT-PCR 结果：+为阳性；-为阴性。

表 3 荧光 RT-PCR 法组内和组间检测的重复性

Table 3 Intra-and inter-assay reproducibility of real-time RT-PCR

样品浓度 (TCID50/mL)	重复(Ct 值)								Ct 平均值(S.D[a])		变异系数 CV/%[b]	
	1		2		3		4					
	野生	疫苗株	野生	疫苗株	野生	疫苗株	野生	疫苗株	野生	疫苗株	野生	疫苗株
组内分析												
104	18.05	19.31	18.85	19.07	18.81	19.85	18.70	19.12	18.6(0.37)	19.3(0.36)	1.3	1.8
103	22.41	23.80	22.12	24.01	22.35	23.64	22.13	23.02	22.5(0.15)	23.6(0.43)	0.7	0.8
102	25.85	28.00	25.60	27.00	25.48	27.82	25.54	27.81	25.6(0.16)	27.7(0.45)	1.5	1.8
101	29.00	31.12	28.69	32.07	28.56	31.93	29.10	32.65	28.8(0.25)	31.9(0.63)	1.9	2.2
1	32.20	34.65	32.00	34.83	32.45	35.00	32.48	35.79	32.3(0.23)	35.1(0.50)	1.1	1.5
0.1	35.71	NDc	36.23	ND	37.31	ND	36.57	ND	36.5(0.67)	ND	1.8	ND
组间分析												
104	18.50	20.04	19.00	19.57	18.68	20.20	18.90	19.85	18.8(0.22)	19.9(0.41)	1.6	1.2
103	22.02	23.56	22.73	23.89	22.50	24.24	23.00	24.50	22.6(0.42)	24.0(0.21)	1.7	0.9
102	26.00	27.15	26.18	26.98	26.50	27.00	26.40	27.40	26.3(0.22)	27.1(0.19)	1.2	1.3
101	28.50	31.15	29.00	31.26	29.23	31.50	30.01	31.96	29.2(0.63)	31.5(0.36)	1.7	1.3
1	32.43	36.10	33.23	35.11	32.89	34.85	32.57	36.41	32.8(0.36)	35.6(0.75)	1.2	2.0
0.1	37.18	ND	36.92	ND	36.24	ND	36.31	ND	36.7(0.46)	ND	1.4	ND

注：a 标准偏差；b 变异系数：Coefficient of variation=S.D./Ct mean；c 检测阴性。

2.3 荧光 RT-PCR 的特异性

利用建立的荧光 RT-PCR 反应体系分别对 29 株不同的猪病相关病毒和购买的 1 株兔化弱毒株进行检测，结果表明，2 株猪瘟病毒和 1 株兔化弱毒疫苗株均出现相应的特异性荧光扩增曲线，呈阳性反应。而其它 27 株与猪致病性相关的病毒均没有阳性信号产生（表 2），在所选的病毒库中，特异性为 100%，没

有交叉反应出现。

2.4 临床试验

临床试验结果见表 4。对 80 份临床疑似阳性样品，包括 42 份猪肉、10 份猪脾脏和 18 份血液病料，利用荧光 RT-PCR 和传统方法进行检测。结果显示荧光 RT-PCR 对猪肉、脾脏和血液病料进行猪瘟野毒检测的阳性率分别为 66.7%、60.0%、77.8%，而传统方法的阳性率分别为 52.4%、40.0%、50.0%；80 份疑似样本中均未检出疫苗株。检验数据显示荧光 RT-PCR 的检测阳性率都明显比传统检测方法的要高，而且荧光 RT-PCR 阳性结果与测序结果一致。

表 4 80 份临床疑似阳性样本检测结果

Table 4 Detection results of 80 suspected positive samples

实时荧光 PCR/测序 [a] /标准化验 [b]	猪肉(42)		脾脏(10)		血液(18)	
	野生	疫苗株	野生	疫苗株	野生	疫苗株
Positive/positive/ positive	20	0	4	0	9	0
Negative/negative/ positive c	2	0	0	0	0	0
Positive/negative/positive	0	0	0	0	0	0
Negative/positive/positive	0	0	0	0	0	0
positive/positive/negative	8	0	2	0	5	0
negative/negative/negatived	8(2)	0	4(1)	0	4(1)	0
Positive/negative/negative	0	0	0	0	0	0
Negative/positive/negative	0	0	0	0	0	0
Positive rate/%	71.4	0	70.0	0	83.3	0
Real-time PCR positive rate/%	66.7	0	60.0	0	77.8	0
Common assay positive rate /%	52.4	0	40.0	0	50.0	0
Inhibition rate/%	9.5	0	10.0	0	5.6	0

注释：a 荧光定量PCR扩增产物测序；b 病毒分离和基于中和试验和IFA试验的血清分型鉴定；c PCR失败；d 括号中的样本为受抑制的样本；e 抑制率＝(c+d)/样本总数。

临床试验数据统计表明利用传统方法和荧光 RT-PCR 方法进行检测均存在假阴性现象，荧光 RT-PCR 检测方法在猪肉、脾脏和血液病料中的抑制率分别为 9.5%、10.0%和 5.6%（见表 4）。假阴性的出现表明，在对猪瘟野生型和疫苗株 RNA 进行检测时，引入假病毒对检测进行全程监控是非常有必要的。

近年来，我国猪瘟的发病特点和流行发生了很大变化，临床表现趋于复杂化，出现了所谓“非典型猪瘟”、“温和型猪瘟”和“带毒母猪综合征”，在病理剖检上也常常与典型猪瘟的病理变化不同，这给兽医临床诊断带来了很大困难。猪瘟病毒的检测方法主要有病毒分离、荧光抗体法、动物接种、间接血凝试验、血清中和试验、酶联免疫吸附试验（ELISA）和反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）等。病毒分离和动物接种法存在检测周期长、操作步骤繁琐、检测率低等不足；抗原抗体反应检测方法则有敏感度不高、不能对早期感染猪进行准确诊断的局限。此外，由于我国目前普遍实施兔化弱毒疫苗株免疫接种，使得野毒感染猪与免疫接种猪不易区分。

随着 CSFV 分子生物学研究的深入，及 CSFV 不同分离毒株和疫苗株基因全序列的陆续发表，PCR 技术及其衍生的相关技术被越来越多地用于 CSFV 的检测。吴鑫等建立了 CSFV 一步法 RT-PCR 检测方法，以 CSFV Shimen 株 E2 基因为检测对象，但 CSFV 强毒和疫苗毒在该区段的差异性有限，存在检测猪瘟疫苗免疫猪时出现假阳性的可能；在 CSFV 鉴别检测方面的研究资料较少，主要是应用套式 RT-PCR 和实时荧光定量 RT-PCR 来鉴别检测 CSFV 强毒与疫苗毒，也有用多重 RT-PCR 检测 CSFV 和其他瘟病毒的报道。李艳等、鲁建民等分别建立了鉴别 CSFV 强、弱毒的套式 RT-PCR 方法。Immanuel 等、Huang 等分别建立了鉴别检测 CSFV 强毒株和弱毒疫苗株的实时 RT-PCT 方法，具有较高的敏感性和特异性，但也存在检测成本高，需要后续操作等不足，限制了其大规模流行病学检测的应用。而在本研究中，为了简化猪瘟病毒简化方法，我们基于疫苗株在 5’-UTR 区域富含 T 的插入序列设计 MGB 探针建立了一种一步法单管荧光 RT-PCR 检测技术，可同时检测和鉴别猪瘟病毒野毒株和疫苗株。

3 结论

3.1 本研究通过对 GenBank 中登录的 CSFV 强毒和

弱毒株基因组序列进行比较分析，在 5’-UTR 区设计了检测 CSFV 基因组 RNA 的通用引物对，同时利用野生型和疫苗株基因组 5’-UTR 序列间的差异（突变株多了个碱基 A），设计了能分别针对 CSFV 强毒和弱毒的 2 条 MGB 水解探针，通过对退火温度、引物和 MGB 探针比例以及 Mg^{2+}浓度等进行优化，建立了一种能够鉴别 CSFV 野生和兔化弱毒疫苗的实时荧光定量 RT-PCR 方法，其中为了更好的鉴别野毒株和疫苗株，反应程序中退火以及延伸温度从常用的 60 ℃提高到 65 ℃。通过对现今我国流行的主要基因亚群 CSFV 野毒株与猪瘟兔化弱毒疫苗株的检测，证实该方法完全能区分 CSFV 野毒株和疫苗株，并且与其他瘟病毒和主要猪源病毒不发生非特异性反应。该方法经优化后可检测 1 $TCID_{50}$/mL 的猪瘟野毒和 0.1 $TCID_{50}$/mL 的兔化弱毒。接着对 29 株与猪致病性相关的病毒和 1 株购买的疫苗株进行检测，结果 2 株猪瘟病毒和 1 株购买的兔化弱毒疫苗株均呈相应的特异性荧光扩增曲线，而其它 27 株与猪致病性相关的病毒均没有荧光信号产生，为一平直线，判为阴性。结果表明，所设计的引物探针只对目的病毒特异，与其它检测对象无交叉反应。

3.2 本研究数据表明，对于一些含有 PCR 抑制因素的样来说，病毒分离方法也许是唯一的检测方法，本研究数据显示在猪肉、脾脏和血液病料中 PCR 的抑制率分别为 9.5%、10.0%和 5.6%，PCR 抑制发生的概率虽然比较低，但假阴性的出现表明内标对于 PCR 检测是非常重要的。另外，PCR 反应试剂（如酶、dNTP）偶然的变性失活或者人为的操作失误也能导致假阴性的产生，由于内标参与核酸提取和 RT-PCR 反应全过程，因而对于 PCR 反应试剂的有效性和实验人员操作的正确性都能起到有效的监控作用。

参考文献

[1] 孙世琪,靳野,郭慧琛,等.我国近期猪瘟分子流行病学动态[J].动物医学进展,2004,25(6):69-71

Sun S Q, Jin Y, Guo H C, et al. Study on Recent Dynamics of Molecular Epidemiology Classical swine fever virus in China [J]. Progress In Veterinary Medicine, 2004, 25(6): 69-71

[2] Moennig V. Introduction to classical swine fever virus,disease and control policy [J]. Vet Microbiol, 2000, 73(2-3):93-102

[3] Tu C C, Li Z J, Li H W, et al. Phylogenefic comparison of classical swine feverVirus in China [J]. Virus Res, 2001, 81 (2): 29-37

[4] Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, et al. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of Salmonella PCR: Towards an International Standard [J]. Applied and Encironmental Microbiology, 2003, 69(1): 290-296

[5] Rosenstraus M, Wang Z, Chang S Y, et al. An Internal Control for Routine Diagnostic PCR: Design, Propertie, and Effect on Clinical Performance [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(1): 191-197

[6] 肖性龙,余以刚,翟建新,等.含组氨酸纯化标签的假病毒表达载体的构建与应用[J].中国生物化学与分子生物学报,2011,27(7):85-90

Xiao X L, Yu Y G, Zhai J X, et al. Construction and Application of the Expressing Vector for His-tagged Armored Virus [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 27(7): 85-90

[7] Xiao X L, He Y Q, Yu Y G, et al. Simultaneous detection of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in clinical specimens by multiplex real-time PCR with an internal amplification control [J]. Arch Virol, 2009, 154(1): 121-125

[8] Xiao X L, Wu H, Li Y Y, et al. Simultaneous detection of enterovirus 70 and coxsackievirus A24 variant by multiplex real-time RT-PCR using an internal control [J]. Journal of Virological Methods, 2009, 159: 23-28

[9] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points [J]. American Journal of Epidemiology, 1938, 27: 709-716