

称猪病毒性、传染性疾病综合诊断与防疫技术推广应用

一、成果简介

（一）项目来源

本项目为黑龙江省科技厅重点科技示范推广项目。项目编号：TC10B0701；项目执行时间：2010.10-2012.12；项目验收时间：2014.8.29。

（二）技术原理及性能指标

本项目主要集成基因组制备技术、cDNA 合成技术和 PCR 技术制备出能够检测猪瘟病毒、猪细小病毒和猪伪狂犬病毒的三重 PCR 检测试剂盒。试剂盒稳定性：在-20℃条件下可以稳定保存半年以上；特异性：能够准确地鉴别猪瘟病毒、猪细小病毒和猪伪狂犬病毒，特异性达 90%以上；敏感性：试剂盒对猪瘟病毒、猪细小病毒和猪伪狂犬病毒检测可以达到基因 ng 水平。

（三）技术的创造性与先进性

在国内首次开发出用于检测猪瘟病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒感染的三重 PCR 检测试剂盒。该技术可以从基因 ng 水平对猪瘟病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒进行鉴别诊断。该方法敏感度高，特异性强，适合于疾病的快速诊断。最大特点是能够在同一批次试验中同时检测三种病原，不但可以降低诊断成本，也节省了操作时间，特别是形成试剂盒以后，其操作程序标准化可以降低污染机率进一步缩短工作时间。本产品形成以后为猪繁殖障碍性疾病诊断和进一步的净化计划提供了有力的保障。同时，在试剂盒组装过程中，把试剂盒分成盒体和盒盖，盒体内设有衬垫，衬垫上设有放置诊断试剂药品的容器孔，所述的盒体内部设置有隔板，隔板将盒体内分为低温区域和常温区域，其中，低温区域内壁上套装有保温泡沫板，并且在该区域内装有制冷剂。使得不影响常温区域的药品正常使用的同时又使低温区域的药品处于低温的状态，延长了使用时间，为获得更准确的诊断结果提供了保障。

（四）技术的成熟程度，适用范围和安全性

本项目已经少量装配成多重 PCR 检测试剂盒,在黑龙江省内 10 余个规模化猪场和养殖合作社以及大庆市、安达市、肇东市和绥化市等地区的 200 余个散养户中示范应用,检测样本 750 多份。应用过程中与国内外同类产品进行比较研究,特异性与单重 PCR 检测试剂盒特异性符合率 100%,与已知样本符合率 100%;经改进后的试剂盒最佳退火温度为 56.2℃,敏感性达到单重 PCR 检测水平,稳定性实验结果表明,保存 8 个月内可以对猪瘟、猪细小病毒病和猪伪狂犬进行有效鉴别诊断。本试剂盒可用于包括种猪在内的各年龄段猪只猪瘟、猪细小病毒病和伪狂犬的诊断,可应用与感染各个阶段。但是,对这三重 PCR 检测试剂盒的组装技术需要进一步熟化,实现规模化、商品化的推广应用。

二、合作方式

合作或其它方式。

三、市场前景分析

繁殖障碍性疾病是困扰养猪业发展的一个主要原因之一,通过检疫淘汰潜伏感染猪是净化疾病提高猪群质量的主要手段,也是将来猪群疫病净化的一个主要手段,因此开发有效的检测技术是实现这一目标的前提。我国是世界上最大的养猪生产国,我国猪肉产量约占世界猪肉总产量的 1/2,猪业也是我国畜牧业的重要组成部分,是肉制品的主要来源。2014 年 1 月存栏量 4.6 亿头,母猪 46000 万头,黑龙江省是我国养猪大省,是目前我国出口猪肉的主要省份之一,因此提高我省的养猪水平,提高市场竞争力是主要任务,为该项目的推广提供了广阔的前景。

四、工艺技术

介绍成果所采用的技术以及该技术在国内外的先进性(技术和设备是已有还是需要引进)。

本项目主要采用聚合酶链式反应(PCR)技术,在国内首次开发出用于检测猪瘟病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒感染的三重 PCR 检测试剂盒。该技术可以从基因 ng 水平对猪瘟病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒进行鉴别诊断。该方

法敏感度高，特异性强，适合于疾病的快速诊断。最大特点是能够在同一批次试验中同时检测三种病原，不但可以降低诊断成本，也节省了操作时间，特别是形成试剂盒以后，其操作程序标准化可以降低污染机率进一步缩短工作时间。本产品形成以后为猪繁殖障碍性疾病诊断和进一步的净化计划提供了有力的保障。

在该项目的实施过程中，我们不断地总结积累经验，不断创新，降低产品的生产成本，提高产品的有效性，简化操作程序，使产品更易于推广应用。我们引入了新型快捷 cDNA 合成试剂盒 Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix（包括反转录酶、反转录酶抑制剂、反转录 Buffer 和 dNTPs 等）不仅减少了加样次数而且使 cDNA 合成仅需 30min，比传统方法更节省时间，Quick Taq HS DyeMix，本品为预混了 Taq DNA Polymerase、PCR 用反应 Buffer、dNTP Mixture 和电泳染料（BPB）的 2×预混 PCR 试剂。操作时只要将其分装到离心管中，加入模板 DNA 和引物，即可进行 PCR，反应溶液可直接用于电泳分析，不用另加上样液。使得操作过程比原来的方法更节省时间，而且可以最大程度上降低因操作造成的污染，此外，通过在 Master Mix 中预混抗 Taq 抗体，通过热启动法，大幅提高了特异性及高效率的扩增。经验证新试剂的引入并未影响试剂盒的敏感性、特异性、重复性和稳定性。

技术已经成熟，主要应用设备是 PCR 仪，在目前情况下设备数量不足，需呀进一步补充，以便本技术大面积推广应用。

五、经济效益分析

介绍成果的计划总投资，固定资产投资，流动资金投入。达产后，年销售收入、利润、税金以及投资回收期。

本项目开发出的 CSFV、PRV 和 PPV 多重 PCR 试剂盒投入生产以后，每种试剂盒按年生产 100 万头份计算，按每头份利润 5 元计算，可以创造直接经济价值 500 万元，而且可以带动相关行业的发展。另外，该产品推广应用以后可以早期诊断淘汰病猪和制定防控计划，可以提高猪群质量，增加仔猪成活率，降低治

疗费用、饲养成本、人工费和固定资产折旧费等，而且可以加快养猪业的发展，增强在国际市场上的竞争力。若按胎均产健子数提高0.5头，断奶仔猪成活率提高5%，保育期成活率提高到6%，每头猪按照效益150元计算，一个年出栏40万头猪每年可增收600万元。可见本项目的实施可以创造巨大的经济和社会效益，具有广阔的应用前景。