

第十九章 T/CALAS 14—2017《实验动物 SPF 鸭 I 型鸭病毒性肝炎检测方法》实施指南

第一节 工作简况

本标准由中国实验动物学会提出，中国实验动物学会实验动物标准化技术委员会归口，根据中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会（以下简称专委会）有关文件及 GB/T 16733《国家标准制定程序的阶段划分及代码》和《采用快速程序制定国家标准的管理规定》的要求，结合实验动物 SPF 鸭 I 型病毒性肝炎（Duck virus hepatitis type I, DVH-1）检测方法，特制定本标准。本标准是在国家科技支撑计划“实验用动物病原分子生物学快速检测新技术研究与应用”（项目编号 2015BAI07B02）课题基础上制定而成的。由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所负责起草。

第二节 工作过程

2015 年 9 月，召开了本课题启动会和第一次研讨会。由课题负责人明确了各子课题的分工，就课题目标、研究内容、课题管理、经费使用、知识产权等几个方面提出了工作设想，并对各子课题的研究进度做出了安排。

2015 年 10 月，完成了对收集到的国内外相关标准及相关资料数据的整理、分析，为整理 DVH-1 检测方法提供基础参数。

2015 年 11 月，查找已经公布的 DHV-1（Duck hepatitis virus type I, DHV-1）的基因序列，设计引物，建立 RT-PCR 检测方法，并对方法进行验证。

2016 年 4 月，根据专家返回的修改意见和建议，对本研究稿进行逐条修改，并完成专家意见的汇总处理，拟提交给课题主持单位。

2016 年 10 月，本标准在中国实验动物学会广西年会上公开征求意见。

2016 年 11~12 月，由中国实验动物学会面向实验动物行业单位公开征求意见。

2017 年 1 月，起草小组整理汇总专家对本标准征求意见稿提出的问题，共收集意见或建议 18 个，编制组根据专家提出的修改意见和建议，采纳 16 个，未采纳 2 个。同时对标准格式进行了规范，最终形成标准送审稿。

2017 年 5 月，本标准经中国实验动物学会第六届理事会常务理事会第八次会议审议通过，批准发布，于 2017 年 5 月 19 日起正式实施。

第三节 编写背景

I 型鸭病毒性肝炎是雏鸭的一种急性、高度致死性的疾病，以肝炎为主要特征。主要侵害三周龄以内的雏鸭，死亡率高达 90%，1963 年我国首次报道以来，全国范围内分布广泛，是危害养鸭业的重要传染病之一。目前我国没有发布 DHV-1 检测方法的国家标准，只有农业行业标准 NY/T554—2002《鸭病毒性肝炎诊断技术》，已经颁布、执行了 15 年。

通过收集、整理和汇总国内外有关资料，参照 NY/T554—2002 和世界卫生组织（OIE）《陆生动物卫生法典》2.7.9，制订本团体标准。

第四节 编写原则

世界动物卫生组织公布的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》详细规定了鸭肝炎病毒的诊断方法。澳大利亚出口鸭种蛋需要检测的 8 种病原中也包括 DHV-1，采用 SN 血清中和试验的方法检测，与 OIE 规定的方法相同。结合我国农业行业标准 NY/T554—2002《鸭病毒性肝炎诊断技术》，及 OIE 规定 DHV-1 检测方法和我国国情，制定本团体标准。

第五节 内容解读

本标准中规定的检测 DHV-1 的检测方法包括 3 部分：病原学检测、免疫学检测和 RT-PCR 检测。内容如下。

一、病原学检测试验

用下列一种或多种方法鉴定。

（一）雏鸭接种试验

将待检物皮下或肌肉接种 1~7 日龄易感 SPF 雏鸭，出现特征性的临床症状，通常在接毒后 24h 内死亡。剖检可见肝脏肿大、有点状或斑状出血，也可能伴有明显的脾肿大、肾肿胀和肾血管出血。肝脏病变的特点是肝细胞广泛坏死和胆管增生，不同程度的细胞炎症反应和出血。

（二）鸭（鸡）胚接种试验

将待检物作系列稀释后，接种于 10~14 日龄 SPF 鸭胚或 8~10 日龄 SPF 鸡胚的尿囊腔内。鸭胚于 24~72h 后死亡，鸡胚通常在接种后 5~8d 发生死亡。胚胎的眼观病变为发育阻滞，全身皮下出血，伴有腹部和后肢部的严重水肿。胚肝呈红黄色肿胀并有坏死灶。死亡时间较长的胚胎中，尿囊液明显变绿，肝脏病变和发育阻滞会更明显。

（三）细胞接种试验

将待检物接种于敏感的原代鸭胚肝细胞（DEL），引起的典型细胞病变为细胞变圆坏死，形成直径为 1mm 的蚀斑。

二、免疫学检测试验

采用下列一种或多种方法鉴定。

(一) 雏鸭保护试验

用 1~2mL 特异性高免血清或特异性卵黄抗体,经皮下注射接种易感的 1~7 日龄雏鸭进行被动免疫。24h 后,用至少 $10^{3.0}$ LD₅₀ 的病毒分离物经肌肉或皮下接种病毒。对照组雏鸭用同样的方式接种病毒。如被动免疫的鸭 80%~100% 存活而对照鸭 80%~100% 死亡,即可证明分离毒为 DHV-1 型。

(二) 母源抗体保护试验

用至少 $10^{3.0}$ LD₅₀ 的病毒分离物经肌肉或皮下注射接种 1~7 日龄易感雏鸭和含 DHV-1 型母源抗体的雏鸭,如易感鸭 80%~100% 死亡,而含母源抗体的雏鸭有 80%~100% 存活,即可证明分离毒为 DHV-1 型。

三、RT-PCR 检测方法

(一) 引物

P1: 5'-AGCTTAAGGCCCGGTGCCCCGTTCT-3' (上游)

P2: 5'-GGTAGGGTAGGGAATAGTAAAGTAA-3' (下游)

(二) 样品的处理

组织样品用 pH7.2~7.6 的 PBS 稀释 5~10 倍,3000r/min 4℃ 离心 30min,上清液作为待检材料。

每次检测设立阳性对照和阴性对照。

阳性对照为接种了 DHV-1 72~96h 的 SPF 鸭胚 (或鸡胚) 尿囊液;阴性对照为健康 SPF 鸭 (或鸡) 胚尿囊液。

(三) 样品的处理 RNA 提取

按照 RNA 提取试剂盒说明书,提取样品和对照的 RNA。提取的 RNA 应立即进行检测,否则应于超低温保存。

(四) 样品的处理 RT-PCR 反应

按照一步法 RT-PCR 试剂盒说明书,配制 RT-PCR 反应体系,设定反应条件。第一步 RT;第二步灭活反转录酶;第三步 PCR,反应条件:45℃ 15~30min,94℃ 2~5min,94℃ 30s,58℃ 45s,72℃ 45s,35 个循环,72℃ 5min。

(五) 样品的处理 PCR 产物检测

反应结束后,PCR 产物于 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳。每个样品的加样量为 5~10μL,同时以 DNA 分子质量标准物为参照。50V 恒压电泳 40min,置紫外灯下观察。

(六) 样品的处理结果判定

阳性对照在 399bp 处有一条特异的 DNA 条带,阴性对照没有条带,证明本实验成立。待检样品在相同位置出现 DNA 条带,判为阳性,否则为阴性。

以上 3 部分检测方法,病原学检测和免疫学检测种方法均引自 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》2.7.9 部分,同时病原学方法中第 1 和 2 部分雏鸭接种和鸭 (鸡) 胚接种

方法和免疫学检测方法中的第1种雏鸭保护试验方法也参照了中华人民共和国农业行业标准 NY/T554—2002, 简化了该行业标准的操作步骤, 详细描述了结果判定部分。病原学方法中第3种方法细胞接种试验和免疫学检测方法中的第2种母源抗体保护试验是新增加的内容。由于有些情况下在动物本体操作相对困难, 易感细胞操作相对容易, 所以本标准增加了 DHV-1 的易感原代鸭胚肝细胞 (DEL) 接种试验。

另外本标准增加 RT-PCR 检测方法, 也包括在 OIE《陆生动物卫生法典》相应的方法中。传统的检测技术已不能满足实验动物质量检测需求。随着分子生物学的迅速发展, 以 PCR 技术为基础的各种分子生物学诊断技术成为病毒感染诊断的重要手段。PCR 病原检测方法具有特异性强、敏感度高、诊断快速等传统诊断方法所无法比拟的优点。PCR 方法已经成为多种病原国家标准中的检测方法。本标准中 RT-PCR 方法是根据 NCBI 中公布的 I 型鸭肝炎病毒的保守基因序列设计引物并合成, 按照 RNAiso Plus 试剂说明书提取 I 型鸭肝炎病毒 RNA, 反转录后, 进行 PCR。确定了该方法的特异性好, 敏感性高。本标准中采用一步法试剂盒在同一个 PCR 管中进行反转录和 PCR 反应, 大大节省了操作时间, 节省了人力物力。这一标准的制定, 对 SPF 鸭 DHV-1 日常监测、流行病学调查及临床诊断都具有重要的实用意义。

第六节 分析报告

本标准的第3部分 RT-PCR 方法是根据 NCBI 中公布的 I 型鸭肝炎病毒的保守基因序列设计引物并合成, 建立 RT-PCR 检测方法, 摸索引物浓度、退火温度等反应条件, 确定该方法的特异性好, 敏感性高, 对 I 型鸭肝炎病毒的最低检出量为 5.3pg。应用该方法检测临床样本, 与病毒分离的结果一致。具体技术内容确定说明如下:

一、主要试剂和材料

无菌 PBS。

RNAisoplus 提取试剂。

RNA 一步法反转录试剂盒。

DL2000 DNA Marker。

阳性对照: 接种了 DHV-1 72~96h 的 SPF 鸭胚 (或鸡胚) 尿囊液。

阴性对照为健康 SPF 鸭 (或鸡) 胚尿囊液。

二、引物设计

根据 NCBI 中公布的 DHV-1 保守基因序列设计引物 (表 1), 并由博仕生物公司合成。

表 1 引物信息

引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物大小 (bp)
DHV-1 F	5' AGCTTAAGGCCCGGTGCCCGTTCT 3'	399
DHV-1 R	5' GGTAGGGTAGGGAATAGTAAAGTAA3	

三、病毒 RNA 的提取

按照商品化 RNAiso Plus 提取试剂盒说明书,提取接种了 DHV-1 72~96h 的 SPF 鸭胚(或鸡胚)尿囊液 RNA。

四、RT-PCR 反应条件的优化

按照商品化一步法 RT-PCR 试剂盒说明书,配制 RT-PCR 反应体系,设定反应条件。第一步 RT;第二步灭活反转录酶;第三步 PCR。DHV-1 的 RNA 1.0 μ L 作为模板,引物浓度为 10 μ mol/ μ L,分别加入 0.3~1 μ L 进行引物浓度优化,最后用 DEPC 水补足至 20.0 μ L。反应程序为:45 $^{\circ}$ C 30min,94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,退火温度在 53~61 $^{\circ}$ C 范围内进行优化,72 $^{\circ}$ C 1min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳并用紫外灯扫描拍照。

经过对 RT-PCR 的引物浓度、退火温度反应条件的优化,如图所示最终选择上下游引物各 0.7 μ L,RT-PCR 反应中引物的最佳浓度均为 0.35 μ mol/L (图 1),PCR 最佳退火温度为 58 $^{\circ}$ C (图 2)。PCR 的最佳反应程序为 45 $^{\circ}$ C 30min,94 $^{\circ}$ C 2min;94 $^{\circ}$ C 1min,58 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 40s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min,4 $^{\circ}$ C 结束反应。

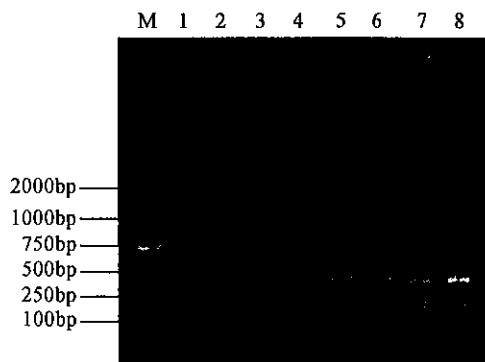


图 1 引物浓度优化

M: DL2000 DNA Marker; 1: 0.3 μ L; 2: 0.4 μ L; 3: 0.5 μ L;
4: 0.6 μ L; 5: 0.7 μ L; 6: 0.8 μ L; 7: 0.9 μ L; 8: 1.0 μ L

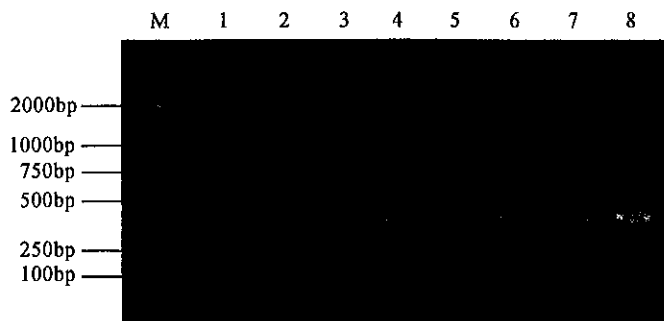


图 2 退火温度优化

M: DL2000 DNA Marker; 1: 53 $^{\circ}$ C; 2: 54 $^{\circ}$ C; 3: 55 $^{\circ}$ C;
4: 56 $^{\circ}$ C; 5: 57 $^{\circ}$ C; 6: 58 $^{\circ}$ C; 7: 59 $^{\circ}$ C; 8: 60 $^{\circ}$ C

五、敏感性试验

提取的 DHV-1 RNA 测核酸浓度 $530\text{ng}/\mu\text{L}$ ，将其稀释到 $5.3\text{ng}/\mu\text{L}$ 作为模板，再进行 10 倍倍比稀释，同时设立阴性对照，进行一步法 RT-PCR 扩增，对该方法的敏感性进行检测。经过敏感性测定，该二重 PCR 最低能检 5.3pg I 型鸭肝炎病毒（图 3）。

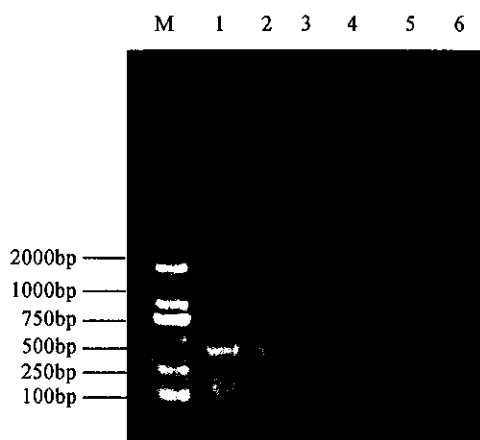


图 3 敏感性试验

M: DL2000 DNA Marker 1: 5.3ng ; 2: 530pg ; 3: 53pg ; 4: 5.3pg ; 5: 0.53pg ; 6: 阴性对照

六、特异性试验

为检测其特异性，将鸭病中常见的 DHV-1、DEV、AIV、ARV、REV、EDSV、GPV、MDPV 和 NDV 的核酸作为模板在建立的一步法 RT-PCR 体系中扩增，并设立阴性对照，结果如图所示（图 4），DHV-1 条带为 399bp ，与设计大小相符；而 DEV、AIV、ARV、REV、EDSV、GPV、MDPV 和 NDV 病毒均无扩增。

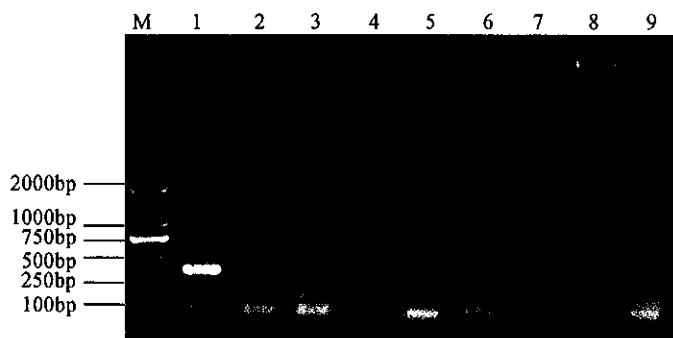


图 4 特异性试验

M: DL2000 DNA Marker 1: DHV-1; 2: DEV; 3: AIV; 4: ARV;
5: REV; 6: EDSV; 7: GPV; 8: MDPV; 9: NDV

七、临床样品的检测

(一) DHV-I 雏鸭感染模型的建立

将 35 只 3 日龄雏鸭分为实验组和对照组共计四个隔离器饲养,其中实验组有三个隔离器,每个隔离器饲养 10 只雏鸭。对照组一个隔离器饲养 5 只雏鸭。将实验组雏鸭经腿部肌肉注射 200 μ L DHV-1 尿囊液病毒(ELD₅₀为 10^{-4.7058}/0.2mL),对照组腿部同时注射 200 μ L 生理盐水。随时注意鸭舍的保温工作,用适合雏鸭生长的全价饲料进行饲养。

接种 DHV-1 后,前 12h 无接种鸭死亡,至 24h 大量雏鸭死亡,其余雏鸭也出现精神沉郁,缩脖,行动迟缓等症状,随后雏鸭陆续死亡,至 33h 全部死亡。死亡时均出现角弓反张典型的鸭肝炎症状。剖检可见肝脏出现明显的出血点和出血斑。显微镜下组织病理变化可见肝细胞空泡变性(脂肪变性),大量坏死,多量嗜酸性粒细胞浸润,法氏囊、胸腺、脾脏可见淋巴细胞轻度减少,少量巨噬细胞和嗜酸性粒细胞浸润。肾脏质局部可见较多嗜酸性粒细胞浸润。其余器官未见明显变化。

(二) 组织样品的处理和鸭胚接种试验

分别取每只接种鸭和对照组雏鸭肝脏 0.3g,置于 2mL EP 管中,加入小钢珠和 1.5mL 灭菌 PBS 缓冲液,用组织研磨仪进行研磨破碎,5000r/min 离心 10min,取组织上清液,用 0.22 μ m 滤器过滤除菌。将上清液各接种 1 枚 10 日龄 SPF 鸭胚,每个胚接种 200 μ L,用蜡封口,37℃温箱孵育。孵化期间每天照胚一次,观察记录鸭胚存活情况。24h 内死亡的鸭胚弃掉,24h 之后一旦发现死亡的鸭胚立即放入 -4℃。4 天后收取鸭胚尿囊液,同时观察胚体病变情况。接种后鸭胚全部死亡,死亡鸭胚胚体通红,出现出血,水肿等症状。对照组鸭胚全部存活,胚体正常。收取的鸭胚尿囊液用 RNAiso Plus 提取试剂盒提取病毒 RNA。存于 -80℃,备用。

(三) DHV-1 RT-PCR 方法检测人工感染检测中的应用

以提取的鸭胚尿囊液 DHV-1 的 RNA 作为模板,取 1 μ L,用建立的 RT-PCR 进行检测。30 枚接种 DHV-I 的鸭胚检测结果均为阳性,10 只对照组鸭胚尿囊液结果均为阴性,与接种鸭胚病毒分离结果一致。符合率为 100%。

第七节 国内外同类标准分析

本标准在编制过程中参照了 NY/T554—2002《鸭病毒性肝炎诊断技术》,该标准中的检测方法和 RT-PCR 方法也包括在 OIE《陆生动物卫生法典》相应的方法中。所以,本标准中参考的试验方法与国际接轨。

第八节 与法律法规、标准关系

本标准与我国现行法律法规不冲突,是农业行业标准 NY/T554—2002《鸭病毒性肝炎诊断技术》的补充和改进。

第九节 重大分歧的处理和依据

从标准结构框架和制定原则的确定、标准的引用、有关技术指标和参数的试验验证、主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见（通过函寄和会议形式多次咨询和研讨），均未出现重大意见分歧的情况。

第十节 作为推荐性标准的建议

本标准建议，DHV-1 的检测方法有多种，检测方法可根据需要依据推荐标准监测。

第十一节 标准实施要求和措施

建议由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会组织本标准的宣传、推广和实施监督。