

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 14—2017

实验动物 SPF 鸭 I 型鸭病毒性肝炎 检测方法

Laboratory animal - Detection method for duck virus hepatitis type I of SPF ducks

2017-05-18 发布

2017-05-18 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编写。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本标准起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国食品药品检定研究院。

本标准主要起草人：韩凌霞、赵丽丽、陈洪岩、贺争鸣。

实验动物 SPF 鸭 I 型鸭病毒性肝炎检测方法

1 范围

本标准规定了实验动物 SPF 鸭 I 型鸭病毒性肝炎的雏鸭接种 / 保护试验、鸭（鸡）胚接种 / 中和试验和 RT-PCR 试验的技术要求。

本标准适用于实验动物 SPF 鸭 I 型鸭病毒性肝炎的诊断及检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是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。

NY/T554—2002 《鸭病毒性肝炎诊断技术》

OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》2.7.9

GB19489—2008 《实验室生物安全通用要求》

3 术语和定义

I 型鸭病毒性肝炎 duck virus hepatitis, DVH

由 I 型鸭肝炎病毒引起雏鸭的一种急性、高度致死性的疾病，以肝炎为其主要特征。主要侵害 3 周龄以内的雏鸭，死亡率高达 90%，是危害养鸭业最为主要的传染病之一。

4 材料准备

4.1.1 研钵或平皿，玻璃匀浆器。

4.1.2 1mL 和 5mL 注射器及针头。

4.1.3 0.22μm 微孔滤膜。

4.1.4 离心管、手术剪刀和手术镊子。

4.1.5 0.85% 生理盐水：在使用前加入青霉素和链霉素，使其最终浓度分别为 2000IU/mL 和 2000μg/mL。

4.1.6 DHV-I 高免血清，或 DHV-I 特异性卵黄抗体。

4.1.7 1~7 日龄易感 SPF 雏鸭；含 DHV-I 型母源抗体的雏鸭；SPF 鸭胚或 SPF 鸡胚。

4.1.8 病料处理

a) 在无菌室内超净台上无菌采取数例病鸭的肝脏组织 10g，于研钵或平皿中剪碎，用玻璃匀浆器制备组织匀浆，按 1:10 (*m/V*) 加入生理盐水。将匀浆液移至离心管中，3000r/min 离心 10min。弃去上层脂肪，抽取中间清亮液体，再经过 0.22μm 的灭菌微孔滤膜过滤，收集滤液，作为病料样品直接接种；或于 -20℃ 保存待检，保存期不超过 12 个月。

b) 涉及生物安全的操作, 遵循生物安全相关规定, 按《实验室生物安全通用要求》规定执行。

5 病原学检测试验 (用下列一种或多种方法鉴定)

5.1 把待检物皮下或肌肉接种的 1~7 日龄易感 SPF 雏鸭, 出现特征性的临床症状, 于接毒后 18~48h 出现死亡, 通常在 24h 内死亡。剖检可见病变主要发生在肝脏, 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。肝脏显微病变的特点是肝细胞广泛坏死和胆管增生, 不同程度的细胞炎性反应和出血。

5.2 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 5~8 天发生死亡。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。

5.3 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。

6 免疫学检测试验

采用下列一种或多种方法:

6.1 用 1~2mL 特异性高免血清或特异性卵黄抗体, 皮下接种易感的 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攻毒。未免疫对照组雏鸭同样攻毒。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-I 型。

6.2 用至少 $10^{3.0}$ LD₅₀ 的病毒分离物肌肉或皮下注射易感的 1~7 日龄雏鸭和含 DHV-I 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-I 型。

7 RT-PCR 检测方法

7.1 引物

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

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

7.2 样品的处理

组织样品用 pH 7.2~7.6 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-I 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。

7.3 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。

7.4 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。

7.5 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 5~10 μ L, 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。

7.6 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。
