

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 67—2019

实验动物 犬瘟热病毒检测方法

Laboratory animals - Detection method for canine distemper virus

2019-07-10 发布

2019-08-01 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。

本标准附录为规范性附录。

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：中国农业科学院特产研究所、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人：史宁、胡博、王洋、闫喜军、韩凌霞、陈洪岩。

实验动物 犬瘟热病毒检测方法

1 范围

本标准规定了实验动物犬瘟热病毒的检疫技术规范，包括犬瘟热病毒的间接免疫荧光技术、PCR 检测和实时荧光定量 PCR 检测方法。

本标准适用于实验动物犬瘟热病毒的间接免疫荧光检测技术、PCR 检测和实时荧光定量 PCR 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，仅所注日期的版本适用于本文件。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。

中华人民共和国农业部公告第 302 号 兽医实验室生物安全技术管理规范

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本标准。

3.1

犬瘟热病毒 Canine Distemper Virus, CDV

属于副黏病毒科麻疹病毒属，可引起犬科、鼬科等出现发热、流泪、流鼻涕、呕吐、腹泻等症状。

3.2

Ct 值 Ct value

达到阈值的循环数（cycle threshold）。

4 主要仪器与试剂

4.1 试剂和材料

除非另有说明，在检测中所有试剂均为分析纯；所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

4.1.1 Trizol：RNA 抽提试剂。

4.1.2 氯仿：常温保存。

4.1.3 异丙醇：常温保存。

4.1.4 DEPC 水：去离子水中加入 0.1% 焦碳酸二乙酯（DEPC），37℃ 作用 1 h， $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ ，高压灭菌 15 min。

4.1.5 75% 乙醇：用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制，使用前 -20°C 预冷。

4.1.6 RNA 酶抑制剂（30 U/ μL ）。

4.1.7 2×PCR buffer(2mmol/L pH 8.3 Tris-HCl, 10mmol/L KCl, 0.5mmol/L dNTP, 0.3mmol/L MgCl₂)。

4.1.8 用于 PCR 及 RT-PCR 反应的引物浓度为 10μmol/L, 探针浓度为 5μmol/L, 其序列如下:

PCR-F: 5'-GCTCAGCTAGTGTGTCAGAAATAG-3'

PCR-R: 5'-TGATTCATCGAGATCCTGAGA-3'

RT-F: 5'-TGGGAATATTTGGGGCAACA-3'

RT-R: 5'-ATGAACCCACGGTGATTTGTTAT-3'

TaqMan 探针 P: 5'-HEX-CAAGTTGAAGAGGTGATAC-MGB-3'

4.1.9 反转录酶: Superscript III 反转录酶 (200U/μL)

4.1.10 DNA 聚合酶: HS Taq DNA 聚合酶 (5U/μL)

4.2 仪器

4.2.1 高速台式冷冻离心机: 最大离心力可达 12 000g。

4.2.2 超低温冰箱。

4.2.3 荧光 PCR 检测仪。

4.2.4 组织匀浆器。

4.2.5 微量移液器。

5 样品的采集

5.1 采样注意事项

采样及样品前处理过程中须戴一次性手套, 样本不得交叉污染。

5.2 采样方法

5.2.1 活体样品

采集被检存活犬的眼、鼻、肛拭子样本, 置于离心管中, 加入适量 1×生理盐水, 振荡混匀, 室温 3000g 离心 5min; 取上清液转入离心管中编号备用。

5.2.2 内脏样品

采集 100g 病死犬的脏器 (肠系淋巴结、肺脏、气管), 装入无菌一次性样品收集袋或其他灭菌容器, 编号, 送实验室。取 50mg ~ 100mg 待检样品, 加入 5 倍体积 (*m:V*) 的 DEPC 水, 于研钵或组织匀浆器中充分研磨, 3000g 离心 15min, 取上清液转入离心管中编号备用。

5.2.3 抗凝血

无菌注射器采血, 注入 EDTA 抗凝管中, 充分混匀后编号备用。

5.3 存放与运送

采集或处理的样品在 2℃ ~ 8℃ 条件下保存应不超过 24h; 若需长期保存, 应在超低温状态下保存, 避免反复冻融 (不超过 3 次)。采集的样品密封后, 应采用冷链运输, 在 6h ~ 8h 之内运送到实验室。按照《兽医实验室生物安全技术管理规范》进行样品的生物安全标识。

6 间接免疫荧光技术

6.1 样品处理

血液涂片: 无菌采取适量经 PCR 检测 CDV 阳性的犬静脉末端血, 直接涂片, 室温条

件下自然干燥。

组织涂片：无菌采集适量经 PCR 检测 CDV 阳性的死亡动物脏器组织，制成涂片。

6.2 操作方法

将血液涂片、组织涂片用-20℃预冷的丙酮固定 10min，然后用 PBS 浸泡 5min，置于 37℃、40min，干燥。滴加稀释成适当工作浓度的 CDV 单克隆抗体，置于 37℃、30min。PBS 漂洗 3 次，每次 5min；再用蒸馏水浸泡 1min，自然干燥或风干。滴加稀释成适当工作浓度的免疫荧光抗体，37℃平放湿盒中 30min，取出。PBS 漂洗 3 次，每次 5min；再用蒸馏水浸泡 1min，脱盐。吹干后，用盖玻片及碳酸缓冲甘油封好载玻片。立即用荧光显微镜观察。测定待检样品时，每次试验同时设病毒对照和阴性对照。

6.3 结果判定

病毒对照的单个或成团细胞的细胞质内出现弥漫或颗粒型的特异性苹果绿色荧光信号，阴性对照无特异性苹果绿色荧光信号，则试验成立，可进行结果判定。

疑似样品载玻片，单个或成团细胞的细胞质内出现弥漫或颗粒型的特异性苹果绿色荧光信号，细胞核染成暗黑色，判为阳性。

疑似样品载玻片，单个或成团细胞的细胞质染成橘红色或无特异性暗黄色，无特异性苹果绿色荧光信号，细胞核呈暗黑色，判为阴性。

7 PCR 检测

7.1 核酸提取

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。

7.2 扩增体系的配制

按表 1 所示配制每个样本的测试反应体系，配制完毕的反应液应尽量避免产生气泡，盖紧盖，瞬时离心，放入 PCR 检测仪内。

表 1 样品反应体系配制表

体系组分	用量
2×PCR buffer	10.0μL
PCR-F、PCR-R	各 1μL
RNA	2.0μL
Superscript III 反转录酶	0.5μL
Taq DNA 聚合酶	0.5μL
水	5μL
总量	20μL

7.3 PCR 扩增

将 7.2 中离心后的 PCR 管放入 PCR 检测仪内，记录样品摆放顺序。设定反应条件：

①反转录：50℃、20min；②预变性：95℃、5min；③PCR 扩增：95℃、30s，52℃、30s，

72℃、45s, 35 个循环; ④延伸: 72℃、10min。

7.4 结果判定

7.4.1 质控标准

7.4.1.1 阴性对照无扩增条带。

7.4.1.2 阳性对照可扩增出大小为 712bp 的核酸条带。

7.4.2 结果描述及判定

在符合质控标准的前提下, 待检测样品扩增出大小为 712bp 的核酸片段, 则初步判定犬瘟热病毒核酸阳性; 若待检样品无扩增条带或扩增条带大小不为 712bp, 则判定犬瘟热病毒核酸阴性。

8 实时荧光 RT-PCR 检测

8.1 扩增体系的配制

按表 2 所示配制每个样本的测试反应体系, 配制完毕的反应液应尽量避免产生气泡, 盖紧盖, 瞬时离心, 放入荧光 PCR 检测仪内。

表 2 样品反应体系配制表

体系组分	用量
2×PCR buffer	10.0μL
上、下游引物	各 0.4μL
RNA	2.0μL
探针 P	0.4μL
Superscript III 反转录酶	0.4μL
HS Taq DNA 聚合酶	0.5μL
水	5.9μL
总量	20μL

8.2 荧光 RT-PCR 扩增

将 8.1 中离心后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内, 记录样品摆放顺序。设定反应条件: ①反转录: 50℃、20min; ②预变性: 95℃、30s; ③PCR 扩增: 95℃、5s, 55℃、15s, 72℃、10s, 40 个循环。

8.3 结果判定

8.3.1 阈值设定

试验检测结束后, 根据收集的荧光曲线和 Ct 值直接读取检测结果, Ct 值为每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整, 以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

8.3.2 质控标准

8.3.2.1 阴性对照无 Ct 值, 且无典型扩增曲线。

8.3.2.2 阳性对照的 Ct 值应 <30.0, 并出现典型的扩增曲线。

8.3.3 结果描述及判定

8.3.3.1 阴性

无 Ct 值并且无典型的扩增曲线，表示样品中无 CDV 核酸。

8.3.3.2 阳性

Ct 值 ≤ 34.0 ，且出现典型的扩增曲线，表示样品中存在 CDV 核酸。

8.3.3.3 可疑

Ct 值 > 34.0 ，且出现典型扩增曲线的样本建议重复试验，重复试验结果出现 Ct 值 ≤ 34.0 和典型扩增曲线者为阳性，否则为阴性。
