

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 68—2019

实验动物 犬腺病毒检测方法

Laboratory animals - Detection method for canine adenovirus of canine

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、中国农业科学院特产研究所、中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所、公安部南昌警犬基地。

本标准主要起草人：韩凌霞、胡博、史宁、扈荣良、刘占斌、陈洪岩、叶俊华。

实验动物 犬腺病毒检测方法

1 范围

本标准规定了实验动物犬腺病毒的检测方法。

本标准适用于犬腺病毒 I 型和 II 型的 PCR 鉴别检测, 以及利用标准腺病毒 I 型接种犬肾细胞系 (MDCK) 后血清中犬腺病毒特异性抗体的间接免疫荧光检测。

2 术语和定义

2.1

犬腺病毒 I 型 Canine Adenovirus Type-1, CAV-1

属腺病毒科哺乳动物腺病毒属, 可引起犬的急性、败血性传染性肝炎。

2.2

犬腺病毒 II 型 Canine Adenovirus Type-1, CAV-2

属腺病毒科哺乳动物腺病毒属, 可引起犬的呼吸道炎症。

3 样品处理

3.1 PCR 检测样品的提取 (包括咽拭子、鼻拭子、肛拭子)

将放置有拭子样品的1.5mL EP管, 加入适量体积的0.1mol/L (pH7.2 ~ 7.6) 磷酸盐缓冲液 (PBS) 或0.9%生理盐水, 拭子充分浸透后, 将拭子尽力挤压管壁或充分振荡。弃掉拭子, 5000r/min离心5min, 取上清, -80℃备存, 或立即进入下一步骤。

3.2 血清

采集被检测犬的血液, 常规方法制备血清。-20℃备存。

4 PCR 检测

4.1 引物

针对CAV的E3区基因设计引物, CAV-2比CAV-1缺失500bp的片段。

P1: 5'-CGCGCTGAACATTACTACCTTGTC-3';

P2: 5'-CCTAGAGCACTTCGTGTCCGCTT-3'。

4.2 基因组 DNA 提取

按照商品化的基因组DNA提取试剂盒说明书, 提取样品中的基因组DNA。提取的DNA, 质量和浓度检测合格后, 作为PCR检测反应模板, 立即进行检测, 或于-20℃低温保存。

4.3 PCR 反应

PCR反应体系: 模板1μL, DNA聚合酶10μL, P1和P2 (10μmol/L) 各1μL, ddH₂O 7μL。反应条件: 95℃ 5 min; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 70 s, 35个循环; 72℃ 10 min。设立

阳性对照和阴性对照, 阳性对照为含有CAV-1 E3区的重组质粒, 或含CAV-1基因组的DNA样品, 阴性对照为无菌水。

4.4 电泳

反应结束后, 取5 μ L PCR产物与上样缓冲液混合, 以乙酸盐缓冲液为电泳缓冲液, 于1%的琼脂糖凝胶中电泳。同时以包含500bp和1000bp大小的适合的DNA分子质量标准物为参照。150V恒压电泳25min, 紫外灯下观察。

4.5 结果判定

在对照成立的前提下, 被检样品仅在508bp处出现一条特异的条带, 判定被检样品中可能含有CAV-1核酸; 被检样品仅在1030bp处出现一条特异的条带, 判定被检样品中可能含有CAV-2核酸; 被检样品同时在508bp和1030bp处各出现一条特异的条带, 判定被检样品中同时含有CAV-1和CAV-2核酸; 若无条带出现, 则样品中CAV-1和CAV-2核酸阴性。必要时, 对扩增产物进行序列测定验证。

5 间接免疫荧光检测 (IFA)

5.1 接种 MDCK 细胞

将犬肾细胞系 (MDCK) 接种在 96 孔细胞培养板上, 在 37℃ 和 5% 二氧化碳环境中培养至 80%, 标准 CAV-1 病毒接种 MDCK 细胞, 37℃ 感作 90 min。更换培养基为含 2% 新生牛血清的 DMEM 培养基维持培养, 72 h 后, 若特异性病变细胞达 60%, 停止培养。

5.2 IFA 检测

将出现病变达 60% 的细胞, 弃培养液, 沿孔壁缓慢加入 PBS, 静置漂洗细胞, 漂洗 2 次。加入 33% 丙酮水溶液, 室温固定 15min。弃去固定液, 同法用 PBS 漂洗细胞。加入 50 μ L 被检犬血清, 37℃ 孵育 45min。PBS 漂洗细胞 2 次, 每次 10min。加入 50 μ L FITC 标记兔抗犬 IgG, 37℃ 孵育 30 min。同上漂洗。置荧光显微镜下观察。设 PBS 为一抗的阴性对照。

5.3 结果判定

在 CAV-1 阳性犬血清可见清晰的绿色荧光颗粒, 在 PBS 对照中无荧光的前提下, 结果成立。待检血清与病毒接种细胞出现特异性的绿色荧光, 则判定被检犬有 CAV-1 或 CAV-2 感染史。

6 判定

PCR 结果为 CAV-1 阳性、IFA 结果阳性时, 判定被检犬为有 CAV-1 感染史, 且正在感染; PCR 结果为 CAV-2 阳性、IFA 结果阳性时, 判定被检犬为有 CAV-2 感染史, 且正在感染; PCR 结果为阴性、IFA 结果为阳性时, 判定被检犬有 CAV-1 和 (或) CAV-2 感染史。