

第七章 T/CALAS 67—2019《实验动物 犬瘟热病毒检测方法》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技术归口，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，结合实验动物专业具体情况，特制定本工作程序。由中国农业科学院特产研究所和中国农业科学院哈尔滨兽医研究所负责起草，主要起草人史宁、胡博、王洋、闫喜军、韩凌霞、陈洪岩。

第二节 工作过程

2018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。

2018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，为整理实验犬微生物学监测提供基础参数。

2019年3月，通过 E-mail 方式和当面请教的方式向实验动物研究相关领域的专家征求对研究稿及其编写说明的修改意见。

2019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。

2019年5月，由全国实验动物标准化技术委员会审查通过。

2019年6月形成报批稿，2019年7月由中国实验动物学会发布。

第三节 编写背景

比格犬（Beagle 犬）是国际医学、生物学界公认的标准实验用犬，具有性情温顺、体型均一、遗传性状稳定、适应力强、实验结果重复性好等优点，已广泛应用于犬及重要人畜共患病研究、相关疫苗研发及评价，同时在基础医学、药物安全评价等方面的应用也十分广泛。由犬瘟热病毒（CDV）引起的犬瘟热（canine distemper, CD）为一种多种动物共

患的急性、高度接触性传染病，可感染犬科、鼬科等十几个科属 70 多种动物，动物感染死亡率可达 30%~80%，该病对实验动物事业造成较大威胁。实时荧光定量 PCR 特异性强、重复性好，其灵敏度可以达到常规 RT-PCR 技术的 10 000 倍。本标准的制定为实验用犬的健康提供基础，为试验结果及其产品质量和稳定性提供保障，进而满足生命科学研究的需要，为医疗、医药行业服务。

本项目由中国农业科学院特产研究所主持承担并完成。

第四节 编写原则

本部分以国家标准《犬瘟热诊断技术》和农业标准《犬瘟热诊断技术》为依据，收集、整理国内外相关组织、地方和行业有关实验动物病源检测方法，以及在迄今为止国内外研究机构发表的以实验用犬作为实验材料开展的病源检测研究基础上制定的。

第五节 内容解读

本标准中规定的检测 CDV 的方法包括 3 部分：间接免疫荧光检测、PCR 检测和实时荧光定量 PCR 检测。具体内容如下。

一、间接免疫荧光检测

（一）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。

（二）操作方法

将血液涂片用-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。

（三）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。

二、PCR 检测

(一) 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。

(二) 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。引物工作浓度均为 10pmol/μL。

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
SuperscriptIII 反转录酶	0.5μL
Taq DNA 聚合酶	0.5μL
水	5μL
总量	20μL

(三) PCR 扩增

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。

(四) 结果判定

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; 若待检样品无大小为 712bp 的特异性扩增条带, 则判定犬瘟热病毒核酸阴性。

三、实时荧光定量 PCR 检测

(一) 引物和探针

F: 5'-TGGGAATATTTGGGGCAACA-3'

R: 5'-ATGAACCCACGGTGATTTGTTAT-3'

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

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。引物工作浓度均为 10pmol/μL。

(二) 实时荧光定量 PCR 扩增

将离心后的 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。

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
SuperscriptIII 反转录酶	0.4μL
HS Taq DNA 聚合酶	0.5μL
水	5.9μL
总量	20μL

(三) 结果判定

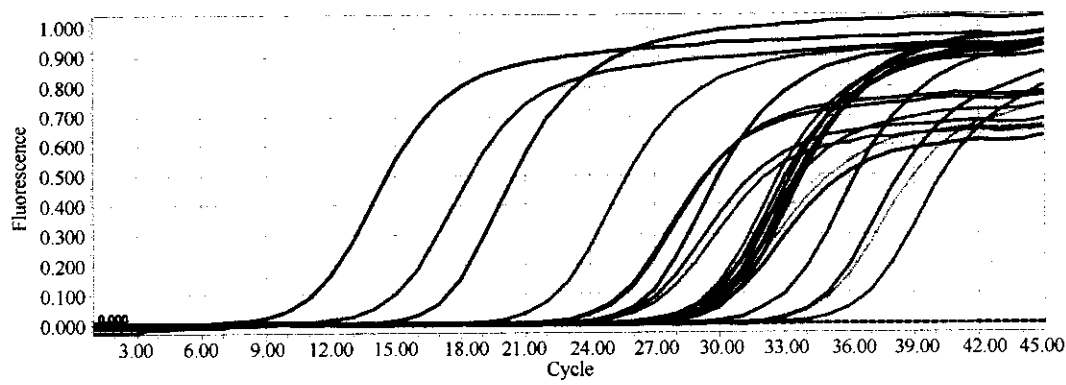
无 Ct 值并且无典型的扩增曲线，表示样品中无 CDV 核酸。Ct 值 ≤ 34.0 ，且出现典型的扩增曲线，表示样品中存在 CDV 核酸；Ct 值 > 34.0 ，且出现典型扩增曲线的样本，建议重复试验，重复试验结果出现 Ct 值 ≤ 34.0 和典型扩增曲线者为阳性，否则为阴性。

当在临床上怀疑有 CDV 感染时，可根据实际情况在上述方法中选一种或者两种方法进行确诊。对于未接种过 CDV 疫苗的犬，采用任何一种方法检测呈现阳性结果时，都可最终判定为 CDV 阳性。对于接种过 CDV 疫苗的犬，当间接免疫荧光检测为阳性结果时，可最终判定为 CDV 感染犬。

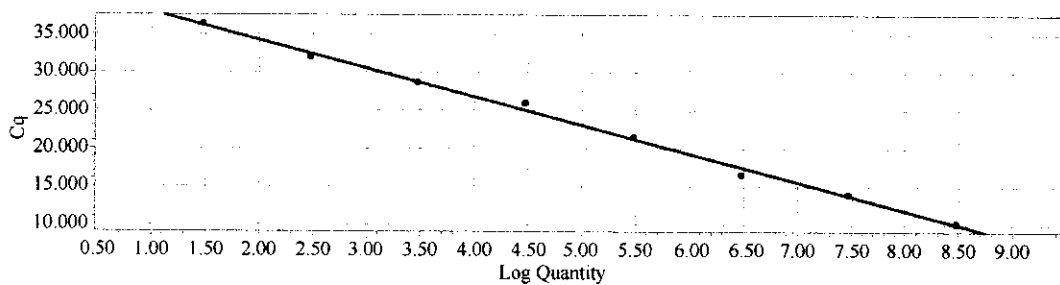
第六节 分 析 报 告

本标准的第 3 部分 RT-PCR 方法是根据 NCBI 中公布的犬瘟热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。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、扩增曲线



二、标准曲线



三、扩增结果

荧光基团	靶标	内容	样品编号	Cq 平均值	SQ 平均值
HEX		未知	1	24.60	3.78E×10 ⁴
HEX		未知	2	24.45	4.15E×10 ⁴
HEX		未知	3	28.56	3.32E×10 ³
HEX		未知	4	28.92	2.66E×10 ³
HEX		未知	5	26.45	1.21E×10 ⁴
HEX		未知	6	26.15	1.46E×10 ⁴
HEX		未知	7	29.38	2.01E×10 ³
HEX		未知	8	29.59	1.76E×10 ³
HEX		未知	9	29.82	1.50E×10 ³
HEX		未知	10	29.24	2.20E×10 ³
HEX		未知	11	29.48	1.85E×10 ³
HEX		未知	12	29.40	1.96E×10 ³
HEX		未知	13	28.75	2.96E×10 ³
HEX		未知	14	28.60	3.17E×10 ³
HEX		未知	15	33.93	1.22E×10 ²
HEX		未知	16	—	—
HEX		标准	10 ⁻¹	10.06	3.00E×10 ⁸
HEX		标准	10 ⁻²	13.88	3.00E×10 ⁷
HEX		标准	10 ⁻³	16.50	3.00E×10 ⁶
HEX		标准	10 ⁻⁴	21.44	3.00E×10 ⁵
HEX		标准	10 ⁻⁵	25.13	3.00E×10 ⁴
HEX		标准	10 ⁻⁶	28.56	3.00E×10 ³
HEX		标准	10 ⁻⁷	32.00	3.00E×10 ²
HEX		标准	10 ⁻⁸	36.45	3.00E×10 ¹
HEX		阴性对照		—	—

四、结果判定

样品 $Cq \leq 34.0$ 并出现特定的扩增曲线判定为阳性。待检的 16 份样品中, 有 15 份样品 $Cq \leq 34.0$ 判定为阳性; 其余 1 份无 Ct 值并且无典型的扩增曲线, 判定样品中无 CDV 核酸。

五、验证结论

送检的犬科粪便样品的检测值满足本标准范围。

第七节 国内外同类标准分析

我国现行国家标准中的检测方法只有病原分离、免疫酶法、间接免疫荧光（IFA）、普通的 RT-PCR 法等，暂时没有查到实时荧光定量 PCR 法。

第八节 与法律法规、标准关系

本部分参考国家标准《犬瘟热诊断技术》和农业标准《犬瘟热诊断技术》。

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及研讨），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

病原分离的方法需要的时间比较长；免疫酶法和间接免疫荧光法需要较昂贵的显微镜和有经验的实验人员，且该方法经验性较强，耗时长，难度相对较大，不易操作；普通的 RT-PCR 方法相比于另两种方法虽然具有操作简便、速度快、特异性强等优点，但是当病毒含量比较低时，会出现假阴性的结果，灵敏度比较低。而实时荧光定量 PCR 特异性强，重复性好，灵敏度高，其灵敏度可以达到常规 RT-PCR 技术的 10 000 倍。故建议定为推荐性条款。

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。

第十二节 本标准常见知识问答

无。

第十三节 其他说明事项

无。