

第八章 T/CALAS 68—2019《实验动物 犬腺病毒检测方法》实施指南

第一节 工作简况

本标准由中国实验动物学会立项资助，起草单位为中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

第二节 工作过程

技术标准是现代经济社会活动的依据。实验动物标准化建设一直是实验动物学科发展的重点。为进一步完善实验动物标准体系建设，2018年1月8日，全国实验动物标准化技术委员会秘书处面向各有关专家或单位征集实验动物立项建议。

我们在执行国家重点研发计划项目子课题项目“SPF犬传染性肝炎等发病模型的建立及评价/2017YFD050160501”过程中，建立了犬传染性肝炎病原犬腺病毒1型的病原学检测方法。据此，我们积极响应，根据实际研究情况，筹建了标准起草组，成员由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所韩凌霞和陈洪岩、中国农业科学院吉林特产研究所胡博，以及公安部警犬基地的刘占斌组成，于2018年2月28日向秘书处提交了2份实验动物标准提案表，分别是《实验动物犬瘟热病毒实时荧光定量PCR检验方法》和《实验动物SPF犬腺病毒I型检测技术》。本标准适用于实验犬犬腺病毒I型的检测，主要技术内容为建立犬传染性肝炎的实时荧光定量PCR检测方法，包括病毒基因组的提取、引物和探针的设计、PCR反应体系、反应程序和结果判定。

2018年4月4日，收到秘书处对标准立项提案的立项通知，并认为：①鉴于现行关于实验犬的国家标准未规定SPF级，同时为日后将团体标准整合为国家标准，应保证与国家标准的一致性，建议将《实验动物SPF犬腺病毒I型检测技术》题目更改为《实验动物 犬腺病毒I型检测技术》；②应标明提交的标准是否引用国际标准或国外标准，是否涉及专利问题；③若仅为荧光定量检测方法，建议将《实验动物 SPF犬腺病毒I型检测技术》题目改为《实验动物 犬腺病毒I型荧光定量PCR检测技术》。起草组根据团体标准编写要求，编制了标准初稿，增加了常规PCR检测技术，将标准名称改为《实验动物 犬腺病毒PCR检测方法》，于5月4日将有关材料回复给秘书处。

2018年6月，通过咨询专家对犬腺病毒PCR检测方法标准框架及指标内容的建议和意见，并且结合我们查阅的资料和研究结果，确定了标准框架及指标内容。

2018年7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。

2018年7月26日,获得秘书处邮件通知,提案《实验动物 SPF 犬腺病毒 I 型检测技术》已成功在中国实验动物学会实验动物标准化专业技术委员会立项,正式进入标准起草阶段,组建标准起草工作组,起草标准征求意见稿,于2018年8月6日前将标准征求意见稿及其《编制说明》提交到秘书处。

2018年8~10月,对标准技术开展了验证工作,分别将标准方法发给相关单位。有3个单位同意进行技术验证,并提供了验证报告,分别是中国农业科学院吉林特产研究所经济动物疫病研究室、吉林大学和哈尔滨国生生物科技股份有限公司。根据标准提出的方法,均能获得一致的结果。2018年10月26日,向秘书处提交了3份验证报告。

2019年2月26日,黑龙江省实验动物专业标准化技术委员会组织专家在哈尔滨市召开了公开意见征求会议,与会专家听取了标准起草人的汇报,并进行了质疑,经认真讨论,提出意见如下。

(1) 本标准定的实验动物犬腺病毒(CAV)检测方法技术标准,符合我国实验动物学科发展和行业需求,为加强实验动物犬的疫病检测提供了技术保障,具有重要的现实意义。

(2) 建议在标准的“适用”部分增加PCR检测方法对“CAV2的鉴别”检测,以及“利用特异性阳性抗体针对病料感染细胞的间接免疫荧光检测”。

(3) 删除抗凝血中具体的抗凝剂描述。

(4) “IFA检测样品的制备”中将“适量疑似CAV-1感染的病死犬的腹腔淋巴结”改为将“适量经PCR检测CAV-1核酸阳性的病死犬的腹腔淋巴结”。

(5) 规范“间接免疫荧光检测”的字体格式。

2019年5月29日,秘书处返回对报审稿的审查意见,认为:①该标准涉及三种检测方法的结果判断,与名称有冲突;②作为实验动物,只要有腺病毒就不合格,因此如果免疫荧光和普通PCR检测到已有腺病毒,没必要开展RT-PCR;③需规范离心速度、温度等的表达;④可考虑对扩增序列进行测序,验证被检样品是否含有CAV-1或CAV-2,至少是对代表性扩增样品进行测序验证。起草组经过研究,接受了秘书处的建议,进行了修改,形成报批稿,于6月23日提交《实验动物 犬腺病毒检测方法》报批稿。

最终经过多次修改,形成《实验动物 犬腺病毒检测方法》报批稿、编制说明和征求意见表。

第三节 编写背景

实验动物犬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,在基础医学、药物安全评价等方面的应用也十分广泛。

犬腺病毒属于腺病毒科哺乳动物腺病毒属,呈二十面体立体对称,直径70~90nm,为无囊膜双股DNA病毒。犬腺病毒分为I型(CAV-1)和II型(CAV-2):CAV-1主要引起犬和其他犬科动物的犬传染性肝炎(infectious canine hepatitis, ICH);CAV-2主要引起幼犬呼吸道疾病和肠炎,致病性较弱。ICH是一种急性、败血性传染病,临床上以黄疸、贫

血、角膜混浊、体温升高为主要特征，主要发生于犬，也可发生于其他犬科动物。国家标准 GB 14922.2—2011“实验动物 微生物学等级及监测”将 ICH 列为普通级实验犬的必须检测项目，但要求免疫。

CAV-1 和 CAV-2 具有相同的补体结合抗原，但其生化特性和核酸同源性不同，通过血凝抑制与中和实验可以区别。实践中多采用 CAV-2 作为疫苗免疫保护 CAV-1 感染。实验动物犬的生产单位通常都会免疫 CAV-2 疫苗。CAV-1 可凝集豚鼠、鸡和人 O 型血红细胞。

国家标准 GB 14926.58—2008“犬传染性肝炎检测方法”规定了 CAV-1 的检测方法和试剂，适用于 CAV-1 的检测。该标准根据免疫学原理，采样 CAV-1 抗原检测犬血清中的 ICH 抗体，或根据在一定的条件下，CAV-1 能凝集人 O 型红细胞的能力可被特异性抗体所抑制的原理，来检测被检犬血清中的特异性抗体。推荐使用酶联免疫吸附试验和血凝抑制试验，用于检测普通级犬是否群体免疫合格，或者 SPF 级犬是否被野毒感染。该方法只能用于判定犬感染史，两种方法均不适合用来区分阳性抗体是来自 CAV-2 免疫还是 CAV-1 野毒感染，亦不适合对实验动物犬的病原学质量控制。

本标准建立的犬腺病毒检测技术，包括对粪便、肛拭子和咽拭子进行鉴别 PCR 检测，在此基础上，再将 PCR 含量高的组织制备成悬液，接种传代细胞系犬肾上皮细胞 MDCK，利用病毒阳性血清进行间接免疫荧光（IFA）验证。

本标准是对现行犬传染性肝炎病毒抗体检测标准的补充。

第四节 编制原则

（1）目的性：本标准适用于实验动物犬腺病毒的检测，包括常规 PCR 和 IFA 检测。

（2）可证实性：本标准的主要技术指标来自标准起草人正式发表的科技论文，以及对登录的所有 CAV 序列的比对，经过了对病毒感染细胞培养物、病毒人工感染犬和现地病料的检测，能够获得正确的结果。

（3）最大自由度原则：本标准只是规定了实验动物犬腺病毒的 PCR 检测所需的引物和关键程序，对基因组提取、电泳条件等不直接影响结果的内容，未做过细要求。

（4）对实验动物进行微生物学质量监测时，选用的方法优先考虑特异性，特异性比敏感性更重要。

第五节 内容解读

一、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（MDCK）检测被检犬血清中犬腺病毒特异性抗体的间接免疫荧光检测。

二、规范性引用文件

下列文件对于本文件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。

GB/T 14926.58	《实验动物传染性犬肝炎病毒检测方法》
GB 19489	《实验室生物安全通用要求》
NY/T 541	《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》
NY/T 683	《犬传染性肝炎诊断技术》
SN/T 4749	《犬传染性肝炎检疫技术规范》

三、样品处理

（一）采样前准备

有关动物采集的实验室风险按照 GB 19489 执行。

采样工具和器械的准备参照 NY/T 541 5.2 “采样工具和器械”，取样工具应洁净、干燥，经过灭菌处理，或采用一次性注射器。收集样品的试管或离心管也应是无菌。样品的保存方式依类型而定，无论是磷酸盐缓冲液（PBS）还是生理盐水，均应经过高压灭菌或 0.22 μm 滤器过滤。

（二）拭子的采集

犬的咽拭子和鼻拭子按照 NY/T 541 “6.4 猪鼻腔拭子和家禽咽喉拭子样品”的规定采集。具体操作如下：取无菌棉签，插入犬鼻腔 2cm ~ 3cm，轻轻擦拭并缓慢旋转 2 圈 ~ 3 圈，确定蘸取了鼻腔分泌物后，立即将拭子浸入 PBS 中，密封低温保存。

肛拭子按照 NY/T 541 6.8.2 “肛拭子样品”的规定采集。具体操作如下：将无菌棉拭子插入犬的肛门中，旋转 2 周 ~ 3 周，刮取直肠黏液或粪便，放入 PBS 中，4℃ 下保存运输。

（三）血清的采集

采血部位参照 NY/T 541 6.1.1.2 的规定，在犬的前肢隐静脉或颈静脉采血。采血方法按照 NY/T 541 6.1.2.7 的规定，压迫犬肘部，使前臂头静脉怒张，绷紧头静脉两侧皮肤，采样针头斜面朝上，呈 15°角由远心端向近心端刺入静脉血管，有血液回流后，缓慢抽取血液接入抗凝剂管。按照 NY/T 541 6.1.3.3 “血清样品”的规定，制备并储存血清。

（四）采样后处理

样品采集结束后，所用到的锐器（如针头）和产生的废物处理应参照 GB/T 19489 第 7.19 条“废物处置”的规定进行。

（五）PCR 检测

1. 引物设计

在病毒的早期转录区选择 E3 基因的保守序列区域作为引物，可以利用 PCR 的扩增产物大小将 CAV-1 和 CAV-2 明显区分：CAV-1 为 520bp，CAV-2 为 1030bp。引物序列为：P1：5'-CGCGCTGAACATTACTACCTTGTC-3'，P2：5'-CCTAGAGCACTTCGTGTCCGCTT-3'。参照 SN/T 4749 7 “DNA 抽提”制备犬样品中的 DNA；或者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。

2. PCR 反应体系

模板 1 μ L, DNA 聚合酶 1 μ L, P1 和 P2 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 62 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 70s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。设立阳性对照和阴性对照, 阳性对照为 CAV-1 病毒培养液或阳性组织, 阴性对照为无菌水。

3. 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. 结果判定

在对照成立的前提下:

(1) 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;

(2) 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;

(3) 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;

(4) 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。

(六) IFA 检测

1. 阳性血清、阴性血清和病毒感染细胞的制备

按照 GB/T 14926.58 中 4.1.3 的规定, CAV 阳性血清为犬传染性自然感染犬血清或实验感染血清; 阴性血清为无犬传染性肝炎感染、未经免疫的犬血清。

按照 NY/T 683 3.2 “操作方法” 的规定制备 CAV 感染 MDCK 细胞。用含 8% 新生牛血清的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 MDCK 细胞, 每 3 天~4 天传代一次, 至细胞长成单层时, 用 0.1mL 处理好的组织悬液接种, 37 $^{\circ}$ C 吸附 1h。加入无血清 DMEM 继续培养 3 天~4 天。当细胞出现增大变圆、折光性增强、聚集成葡萄串状特征性病变。弃培养液, 沿孔壁缓慢加入 PBS, 静置漂洗细胞, 漂洗 2 次。加入 4% 多聚甲醛, 室温固定 15min。

2. IFA 检测

IFA 检测步骤, 参照 GB/T 17999.10 4 “操作程序” 进行。弃去固定液, 同法用 PBS 漂洗细胞。以 1:50 稀释的被检犬血清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 45min; 以 1:200 稀释的 FITC 标记兔抗犬 IgG 为二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。一抗和二抗作用后均用 PBS 彻底漂洗, 置荧光显微镜下观察。设阳性血清和阴性血清作为对照。

3. 结果判定

CAV-1 感染 MDCK 细胞中, 加入阳性血清, 细胞内可见清晰的黄绿色荧光; 加入阴性血清, 细胞内无荧光。正常 MDCK 中, 加入阳性血清, 细胞内无荧光。在以上条件成立的基础上, 加入待检血清, 细胞内可见清晰的绿色荧光, 则判定被检犬血清为 CAV-1 或 CAV-2 抗体阳性。

(七) 综合判定

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。

第六节 分析报告

一、ICH 自然感染过程及大体病变

根据文献, ICHV 自然感染犬的过程是: 病毒自然通过口咽部进入机体, 首先侵入扁桃体, 进而扩散到局部淋巴结和淋巴管中增殖。病毒从淋巴导管进入血液循环导致犬的病毒血症, 后感染其他组织, 使受累组织器官的血管内皮细胞, 尤其是肝脏损伤, 最后经口鼻分泌物或排泄物排毒。在病程的急性阶段, 病毒分布在病犬的全身各组织。有时在恢复期可见角膜混浊, 俗称“蓝眼”。尿中排毒可达 180 天~270 天。CAV-1 和 CAV-2 在体内的组织嗜性不同: CAV-1 倾向于肝细胞和脑、肾、眼等的内皮细胞, 引起肝炎、肾炎、脑炎和结膜炎等; 而 CAV-2 则多倾向于呼吸道、消化道黏膜上皮细胞, 引起喉气管炎或消化道方面的疾病。

二、PCR 方法的验证

(一) PCR 方法被检样品的选择

起草组利用 CAV-1 强毒腿部肌肉注射 3 只 60 日龄普通级比格犬, PCR 检测结果表明, 攻毒后 3 天血液呈阳性, 11 天口腔黏膜阳性, 13 天尿液阳性, 因此本标准中将 PCR 检测的组织规定为血液、口腔黏膜/咽拭子和尿样。攻毒后 11 天结束实验, 利用本标准建立的 PCR 法对咽拭子、口腔黏膜、胸腺、扁桃体、脑干、颌下淋巴结、腹腔淋巴结、肠淋巴结、肝脏、膀胱、脾、肾、新、盲肠、空肠等多种组织检测, 结果腹腔淋巴结中的病毒含量最高。在感染早期, 有个别犬的血液样品中扩增出了 CAV-2 型特异性条带, 经序列测定得到验证, 说明实验幼犬体内还存留有 CAV-2 活疫苗病毒。

(二) IFA 方法的验证

IFA 检测结果表明, 不同稀释度的阳性血清呈现不同强度的特异性荧光, 阴性对照未显示。为了便于判定 IFA 效价, 可以将不同强度的荧光反应划分为五个等级, 如图 1 所示。

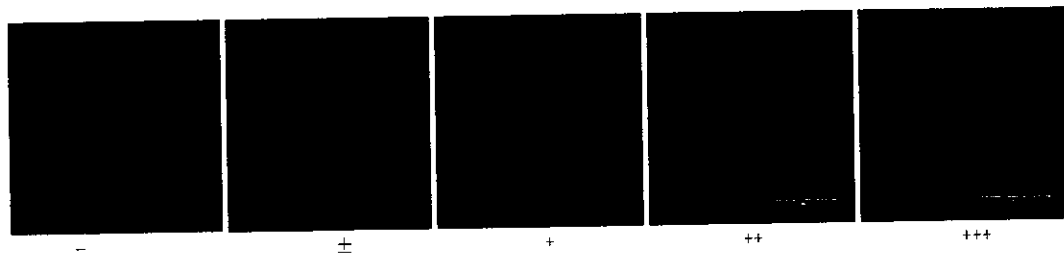


图 1 CAV-1 感染 MDCK 检测犬血清抗体的 IFA 结果

对实验犬人工感染 CAV-1 强毒,依据建立的 IFA 方法检测血清抗体,以荧光强度达+++判为强阳性。按 10 倍、20 倍、40 倍、80 倍、160 倍和 320 倍稀释,结果表明有 2 只实验犬在感染 CAV-1 时即存在效价为 1:100~1:200 的 IFA 血清抗体,疑似来自亲代免疫 CAV-2 活疫苗导致的母源抗体;无 IFA 抗体的犬在接种 CAV-1 强毒后 6 天,效价达到 1:300,之后逐渐下降。实验结果见图 2,表明该技术可用于实验动物犬的 CAV-1 或 CAV-2 抗体检测。

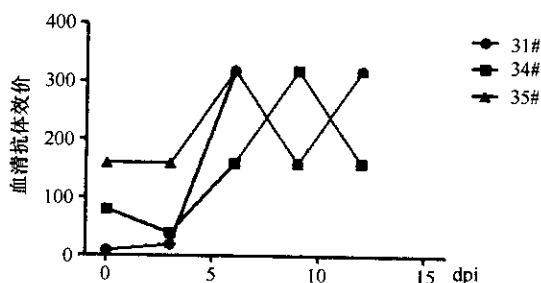


图 2 3 只攻毒犬血清中的 IFA 抗体效价动态变化

第七节 国内外同类标准分析

一、与 NY/T 683—2003 的比较

现行农业行业标准 NY/T 683—2003《犬传染性肝炎诊断技术》于 2003 年 10 月 1 日开始实施。该标准规定了犬传染性肝炎的临床诊断、病毒的分离与鉴定、酶联免疫吸附试验和免疫酶组织化学方法等诊断技术,适用于犬传染性肝炎的诊断。该标准描述了 ICH 的临床症状、病理变化、病毒分离、ELISA 抗体检测方法及免疫酶组织化学抗原检测法。这些方法虽然经典,但耗时长、技术要求高,在分子生物学技术已成熟和普及的当下,已不太适合。而该标准对于免疫 CAV-2 的实验动物犬群或个体的检测不合适。

二、与 GB 14926.58—2008 的比较

现行国家标准 GB 14926.58—2008《实验动物传染性犬肝炎病毒检测方法》于 2009 年 3 月 1 日开始实施,规定了 ICHV 的检测方法和试剂,适用于 ICHV 的检测。采用 ICHV 感染 MDCK 细胞的培养物作为 ELISA 抗原,用 ELISA 方法检测抗体;或者将细胞培养物超声波破碎后的上清液作为血凝素,进行血凝抑制实验,检测犬的抗体效价。由于 CAV-1 和 CAV-2 有血清学交叉反应,该方法无法区分抗体阳性被检测犬是来自母源抗体还是野毒感染。

三、与 SN/T 4749—2017 的比较

现行我国出入境检验检疫行业标准 SN/T 4749—2017《犬传染性肝炎检疫技术规范》于 2017 年 12 月 1 日开始实施。该标准规定了犬传染性肝炎 PCR 和定量 PCR 检测的操作方法,适用于犬传染性肝炎流行病学调查、诊断、检疫和监测。该技术建立的 ICHV 的 PCR

和定量 PCR 方法能检测出被检犬是否体内含有 CAV-1 核酸,但对是否存在活疫苗 CAV-2,以及血清学抗体应答等方面没有涉及。

四、与国际标准的比较

关于国际标准,尚未查到各国针对 ICH 或 ICHV 的规范类标准。在世界动物卫生组织(OIE)上也未明确规定对 ICH 或 ICHV 的检测技术。

第八节 与法律法规、标准的关系

本技术在执行过程中,涉及从活体动物采样,存在生物安全隐患,尤其在识别出有高等级生物安全风险时,相应操作应符合国家强制性标准 GB 19489《实验室 生物安全通用要求》。涉及的样品采样、保存和运输等环节,应符合农业部的推荐标准 NY/T 541《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》。本标准与其他的现行法律、法规和强制性标准不存在冲突。

第九节 重大分歧意见的处理经过和依据

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与研讨),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

PCR 方法虽然具有操作简便、速度快、特异性强等优点,但是容易出现假阳性;IFA 方法需要有荧光显微镜和较强的经验,建议作为推荐性条款。

第十一节 标准实施要求和措施

建议由中国实验动物学会及其各专业委员会和工作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。