



中华人民共和国国家标准

GB/T 27532—2024

代替 GB/T 27532—2011

犬瘟热诊断技术

Diagnostic techniques for canine distemper

2024-11-28 发布

2025-06-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 生物安全措施 2

6 临床诊断 2

7 样品采集、处理与保存..... 3

8 胶体金免疫层析法 4

9 病毒分离鉴定 4

10 免疫过氧化物酶单层试验(IPMA) 5

11 免疫酶组织化学试验..... 7

12 RT-PCR 8

13 荧光 RT-PCR 10

14 综合判定 12

附录 A（规范性） 试剂溶液的配制 13

附录 B（资料性） RT-PCR、荧光 RT-PCR 引物和探针序列 15

附录 C（资料性） 犬瘟热病毒 RT-PCR 反应产物电泳图..... 16

附录 D（资料性） 犬瘟热病毒荧光 RT-PCR 扩增曲线图..... 17

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 27532—2011《犬瘟热诊断技术》，与 GB/T 27532—2011 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了缩略语(见第 4 章)；
- 增加了生物安全措施(见第 5 章)；
- 增加了流行病学(见 6.1)；
- 增加了胶体金免疫层析法(见第 8 章)；
- 增加了荧光 RT-PCR(见第 13 章)；
- 增加了综合判定(见第 14 章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：青岛农业大学、青岛海华生物集团股份有限公司、逢时(青岛)海洋科技有限公司、中国动物卫生与流行病学中心、河北北方学院、山东省农业科学院、青岛市城阳区农业农村服务中心、青岛巴特菲科技发展有限公司、青岛市动物疫病预防控制中心、上海海关动植物与食品检验检疫技术中心、重庆市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：单虎、张洪亮、刘刚、宋晓明、马清霞、王媛媛、李一飞、张瑞华、黄兵、肖颖、杨瑞梅、黄娟、周芳、徐超、李彦、林佳旭、李明义、于永乐、秦志华、李健、李桂梅、段笑笑、邴啟政、刘丽蓉、李然栋、王建琳、温建新、秦晓冰、马晶、杨珍。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2011 年首次发布为 GB/T 27532—2011；
- 本次为第一次修订。



引 言

犬瘟热(canine distemper,CD)是由犬瘟热病毒(canine distemper virus,CDV)引起的犬科、鼬科、部分浣熊科和猫科动物的一种急性、高度接触性传染病,发病早期体温呈双相热型,随后以支气管炎、卡他性肺炎、胃肠炎为特征,后期可见有神经症状如痉挛、抽搐等,部分病例可出现鼻部和脚垫高度角质化、龟裂。犬科动物感染后病死率为30%~80%,雪貂的病死率可达100%。我国农业农村部将其列为三类动物疫病。

犬瘟热病毒属于副黏病毒科(*Paramyxoviridae*)、麻疹病毒属(*Morbillivirus*),是一种单链RNA病毒,目前只有一种血清型。

犬瘟热病毒的宿主广泛,犬科(犬、狐、貉、狼等)、鼬科(水貂、雪貂、鼬等)、部分浣熊科(浣熊、白鼻熊等)和猫科(虎、豹、狮)动物均易感,且幼龄动物比成年动物更易感,一般在断奶后2周~3周容易发病。

犬瘟热病毒会引起动物消化、呼吸和神经系统等多系统病症,病毒的来源、数量、毒力强弱和患病动物免疫力不同,引起的临床症状不同。该病容易与上呼吸道感染、犬传染性肝炎、犬冠状病毒感染等疾病相混淆,需要结合临床诊断和实验室检测进行确诊。

犬瘟热诊断技术

1 范围

本文件描述了犬瘟热的临床诊断、胶体金免疫层析法、病毒分离鉴定、免疫过氧化物酶单层试验、免疫酶组织化学、RT-PCR、荧光 RT-PCR 等方法。

本文件适用于犬瘟热的诊断和监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BHQ: 黑洞淬灭剂 (black hole quencher)

CD: 犬瘟热 (canine distemper)

CDV: 犬瘟热病毒 (canine distemper virus)

CPE: 细胞病变效应 (cytopathic effect)

Ct: 循环阈值 (cycle threshold)

DAB: 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine)

DEPC: 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate)

DMEM: dulbecco's 改良 eagle 培养基 (dulbecco's modified eagle medium)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)

HRP: 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase)

IPMA: 免疫过氧化物酶单层试验 (immunoperoxidase monolayer assay)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline)

RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)

RT-PCR: 反转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction)

5 生物安全措施

进行样品采集、处理及保存等操作时按照 NY/T 541 的规定执行。本文件中涉及的实验室生物安全操作按照 GB 19489 的规定执行。

6 临床诊断

6.1 流行病学

6.1.1 犬科、鼬科、部分浣熊科和猫科动物,如犬、狐、貉、狼、水貂、浣熊、虎、狮等动物均易感染 CDV。不同年龄、性别及品种的易感动物均可感染,断奶后 2 周~3 周的幼龄动物最易感。

6.1.2 该病传染源主要为发病动物和隐性带毒动物。

6.1.3 CDV 主要通过呼吸道和消化道传播。发病动物和隐性带毒动物可通过鼻液、泪液、唾液、尿液以及呼出的气体排出大量 CDV。该病一年四季均可发生,以冬、春季多发。

6.2 临床症状

6.2.1 发病动物体温呈双相热型。

6.2.2 呼吸道型:主要表现为打喷嚏、咳嗽和呼吸困难;流清鼻涕至脓性鼻汁,眼角有脓性眼屎,伴有结膜炎或角膜炎、角膜溃疡、浑浊等症状,甚至失明。

6.2.3 消化道型:主要表现为呕吐和腹泻;排便从干燥发展到腹泻,甚至出现水样便,严重时粪便中混有血液,出现煤焦油状黑褐色血样便。

6.2.4 神经型:出现头、颈、四肢抽搐,步态不稳、站姿异常、共济失调等症状。

6.2.5 皮肤型:下腹部、大腿内侧可见米粒或豆粒大小的丘疹,随着病情发展水疱型丘疹转为化脓性丘疹;伴有脚垫、鼻部角质化。

6.3 病理变化

6.3.1 剖检病理变化

6.3.1.1 肝脏肿大,质地变脆,表面有出血点及灰白色坏死灶;脾脏肿大坏死,质地变脆,有出血点,局部淤血;肺脏有出血点,肺泡壁毛细血管淤血;肾脏肿大,质地变软,表面有出血点;消化道中胃肠黏膜有弥漫性出血点,水肿并伴有糜烂或溃疡灶;心脏内膜有出血点。

6.3.1.2 中枢神经系统的病变包括脑膜充血,脑室扩张和因脑水肿所致的脑脊液增加。

6.3.1.3 新生幼龄动物感染 CDV 表现为胸腺萎缩。

6.3.2 组织病理变化

6.3.2.1 CDV 可在黏膜上皮细胞、网状细胞、白细胞、神经胶质细胞和神经元中形成嗜酸性包涵体,直径 $1\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$ 。

6.3.2.2 出现神经症状的动物可见神经元变性以及胶质细胞增生等。

6.4 结果判定

6.4.1 符合 6.1 中描述的 2 个及以上的流行病学特征,且出现 6.2 中 2 个及以上的临床症状,或可观察到 6.3 中任一剖检病理变化或任一组织病理变化,可初步判为疑似 CD。

6.4.2 疑似病例确诊应采集样品,按照第 9 章~第 13 章中的实验室方法进行检测。

7 样品采集、处理与保存

7.1 采样器材

组织研磨器、医用剪刀、解剖刀、穿刺针、医用注射器(2 mL、5 mL)及真空采血管、真空采血管(含 EDTA 抗凝剂)、无菌棉签拭子、样品保存管、离心管(1.5 mL、10 mL)、工作服、一次性手套、采样记录单、记号笔、防水标签、自封袋、冰袋等。

7.2 试剂

7.2.1 0.01 mol/L pH7.4 PBS,按照附录 A 中 A.1 配制。

7.2.2 青链霉素贮存液,按照 A.2 配制。

7.2.3 10%中性福尔马林固定液,按照 A.3 配制。

7.2.4 98%(体积分数)甲酸:避光密封保存。

7.3 样品采集与处理

7.3.1 血液样品

用一次性采血针采集全血或用含有 EDTA 抗凝剂的真空采血管,在动物的前、后肢皮下静脉采血。非抗凝血待凝固后分离血清,抗凝血可离心分离出血浆。用于 CDV 的胶体金免疫层析法、RT-PCR、荧光 RT-PCR 检测。

7.3.2 口眼鼻分泌物和粪便样品

用无菌棉签拭子取样,轻轻刮取双侧眼结膜分泌物;或蘸取鼻液、口咽分泌物;或在直肠末端旋转三圈或取少量粪便样品。将上述拭子放入含有 1 mL PBS(其中每 100 mL PBS 中加入 0.2 mL 青链霉素贮存液)的样品保存管中,搅拌片刻后,掰断拭子尾部,拧紧盖子。3 000 r/min 离心 20 min 后,取上清液,待检。用于 CDV 的胶体金免疫层析法、病毒分离鉴定、IPMA、RT-PCR、荧光 RT-PCR 检测。

7.3.3 组织样品

用无菌剪刀采集新鲜的肝、脾、肺等组织。立即进行固定,将组织切成约为 2 cm×2 cm×1 cm 大小,置于 10%中性福尔马林固定液中固定 4 d,然后置于新的 10%中性福尔马林固定液中固定 2 d。将上述组织块切成约为 3 mm~5 mm 厚,置于 98%甲酸中作用 1 h,用流动的自来水冲洗 20 min,最后置于新的 10%中性福尔马林固定液中固定 3 h。固定后,立即冷藏运输至实验室,用于 CDV 的免疫组织化学检测。

用无菌剪刀采集新鲜的肝、脾、肺等组织,取 2 g 组织样品剪碎后加入 10 mL PBS(其中每 100 mL PBS 中加入 0.2 mL 青链霉素贮存液)充分研磨,制成组织悬液。用腰椎穿刺法采集脑脊液,在动物背部腰椎区域用穿刺针进行穿刺,当针头刺穿动物的蛛网膜下腔且出现落空感时,停止进针并连接医用注射器,采集 2 mL~3 mL 动物脑脊液。将组织悬液和脑脊液,3 000 r/min 离心 20 min 后,取上清液,待检。用于 CDV 的病毒分离鉴定、IPMA、RT-PCR、荧光 RT-PCR 检测。

7.4 样品保存

采集的样品应保存于 4℃条件下,用于病毒分离的样品应在 48 h 内运至实验室。不能立即进行检测的样品应保存于-20℃冰箱,长期保存应置于-70℃冰箱。

8 胶体金免疫层析法

8.1 器材与试剂

CDV 胶体金抗原检测卡。

8.2 样品处理

8.2.1 血液样品

将 7.3.1 中采集到的血清或血浆 1 滴~2 滴(约 20 μL ~40 μL)与样品稀释液混合,置于样品保存管中,待检。

8.2.2 口眼鼻分泌物和粪便样品

将 7.3.2 中采集到的棉签拭子放入样品稀释液中,振荡混匀,使样品充分溶解,静置 10 min 使大颗粒沉降到样品保存管底部,取上层液体,待检。

8.3 操作方法

8.3.1 用配套的滴管吸取 3 滴~4 滴(约 60 μL ~80 μL)待检样品,缓慢滴加入样品孔中,当看到红色液体在试纸条上移动时,放慢加样速度,整个加样过程控制在 1 min 内完成。

8.3.2 加样完成后,将试纸条平放在桌面上,静置 10 min 后,在 20 min 内判读结果。

8.4 结果判定

8.4.1 对照线(C)显示红色,则试验成立,结果有效。

8.4.2 对照线(C)和检测线(T)均显色,判为疑似 CDV 阳性,需要采用第 9 章~第 13 章中任何一项方法进行确诊。

8.4.3 仅有对照线(C)显色,判为 CDV 阴性。

9 病毒分离鉴定

9.1 器材

9.1.1 冰箱(4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-70 $^{\circ}\text{C}$)。

9.1.2 二氧化碳培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$)。

9.1.3 II 级生物安全柜。

9.1.4 倒置显微镜。

9.1.5 电子天平:精度 0.1 mg。

9.1.6 微量可调移液器(100 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、1 μL ~20 μL)。

9.1.7 细胞培养瓶(25 cm^2 或 75 cm^2 等)。

9.1.8 0.22 μm 微孔滤器。

9.2 试剂

9.2.1 试验用水,符合 GB/T 6682 的规定。

9.2.2 PBS,按照 A.1 配制。

9.2.3 DMEM 培养液,按照 A.4 配制。

9.2.4 新生牛血清。

9.2.5 Vero 细胞(非洲绿猴肾细胞)。

9.3 操作方法

9.3.1 细胞培养

在 25 cm² 细胞培养瓶中加入 6 mL 含 5% 新生牛血清的 DMEM 培养液培养 Vero 细胞,将细胞培养瓶置于 37 ℃、5%(体积分数)二氧化碳培养箱中培养 12 h~24 h,然后在倒置显微镜下观察到细胞生长至单层且能达到 80%~90% 密度时,可进行待检样品接种。

9.3.2 样品接种

弃掉细胞培养液,贴近细胞培养瓶侧壁缓慢加入 3 mL PBS 轻柔漂洗 3 次后,取 7.3.2 或 7.3.3 中处理好的样品上清液 1 mL,经 0.22 μm 微孔滤器过滤,接种于 Vero 细胞,置于 37 ℃、5%(体积分数)二氧化碳培养箱中吸附 1 h(每 15 min 轻柔晃动细胞瓶 5 s),弃掉样品上清液并加入 6 mL 含 2% 新生牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 ℃、5%(体积分数)二氧化碳培养箱中继续培养,每天在倒置显微镜下观察细胞状态并记录细胞病变结果,连续观察 2 d~4 d。

9.3.3 病毒培养

CDV 在 Vero 细胞上,一般培养 2 d~4 d 后,出现细胞变圆、胞浆内颗粒变性和空泡形成的情况,随后形成合胞体,并在胞浆中出现包涵体等 CPE。如果样品初次接种 Vero 细胞,培养 4 d 后无 CPE,应取 1 mL 细胞培养瓶中的细胞培养液,移入新的细胞培养瓶内(第 2 代),置于 37 ℃、5%(体积分数)二氧化碳培养箱中培养 4 d,每天在倒置显微镜下观察细胞状态并记录细胞病变结果,是否出现 CPE。无 CPE 的样品培养物应盲传 3 代。

9.3.4 病毒鉴定

对初次接种样品或盲传 3 代后出现 CPE 的培养物,将细胞培养瓶用封口膜封住瓶口后放入 -70 ℃ 冰箱中,反复冻融两次后,取细胞培养液置于 10 mL 离心管中,4 ℃ 3 000 r/min 离心 20 min 后,取上清液待检。采用第 10 章、第 12 章、第 13 章中任何一项方法,进行 CDV 鉴定。

9.4 结果判定

9.4.1 初次接种样品或盲传 3 代后出现 CPE,并经过第 10 章、第 12 章、第 13 章中任何一项方法,检测结果为阳性,判为 CDV 分离阳性。

9.4.2 初次接种样品和盲传 3 代后均未出现 CPE,或出现 CPE 但经过第 10 章、第 12 章、第 13 章中任何一项方法,检测结果为阴性,判为 CDV 分离阴性。

10 免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)

10.1 器材



10.1.1 冰箱(4 ℃、-20 ℃、-70 ℃)。

10.1.2 二氧化碳培养箱(37 ℃)。

10.1.3 II 级生物安全柜。

10.1.4 恒温培养箱(5 ℃~100 ℃)。

10.1.5 倒置显微镜。

10.1.6 96 孔细胞培养板。

10.1.7 0.22 μm 微孔滤器。

10.2 试剂

10.2.1 PBS,按照 A.1 配制。

10.2.2 DMEM 培养液,按照 A.4 配制。

10.2.3 4%多聚甲醛:4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

10.2.4 80%冷丙酮,按照 A.5 配制。

10.2.5 CDV 阳性血清:商品化阳性血清或具有同等效力的阳性血清,使用前稀释至工作浓度。

10.2.6 CDV 阴性血清:无 CDV 抗体血清。

10.2.7 酶结合物:HRP 标记的葡萄球菌 A 蛋白(SPA),使用前稀释至工作浓度。

10.2.8 DAB 显色液,按照 A.6 配制。

10.2.9 新生牛血清。

10.2.10 Vero 细胞(非洲绿猴肾细胞)。

10.3 操作方法

10.3.1 将 Vero 细胞稀释至 1×10^5 个细胞/mL,在 96 孔细胞培养板每孔中加入 0.1 mL 细胞稀释液及 0.1 mL 含 5%新生牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%(体积分数)二氧化碳培养箱中培养 12 h~24 h。

10.3.2 弃掉细胞培养液,PBS 漂洗 3 次。

10.3.3 取 0.1 mL CDV 分离毒株接种于细胞孔中,作为阳性对照;取 0.1 mL DMEM 培养液加入细胞孔中,作为阴性对照;取 7.3.2 或 7.3.3 中处理好的待检样品 0.1 mL,经 0.22 μm 微孔滤器过滤,接种于细胞孔中;每孔加入 0.1 mL 含 5%新生牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%(体积分数)二氧化碳培养箱中培养 2 d~4 d,或培养至阳性对照细胞孔中细胞病变达到 50%时。

10.3.4 弃掉细胞培养液,PBS 漂洗 3 次,每次 2 min~3 min,在吸水纸上轻轻拍干。

10.3.5 每孔滴加预冷的 4%多聚甲醛或 80%冷丙酮并完全覆盖细胞培养板底部,室温(约 20 $^{\circ}\text{C}$)固定 40 min。

10.3.6 弃掉多聚甲醛或冷丙酮,PBS 漂洗 1 次,每次 2 min~3 min,在吸水纸上轻轻拍干。

10.3.7 将稀释后的阳性及阴性血清分别滴加到阳性对照细胞孔、阴性对照细胞孔及待检样品细胞孔中,置于湿盒内,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 40 min~60 min。

10.3.8 弃掉细胞孔中血清,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,在吸水纸上轻轻拍干。

10.3.9 每孔滴加稀释的酶结合物并完全覆盖细胞培养板底部,置于湿盒内,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 40 min~60 min。

10.3.10 弃掉细胞孔中酶结合物,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,在吸水纸上轻轻拍干。

10.3.11 每孔滴加新鲜配制的 DAB 显色液并完全覆盖细胞培养板底部,室温(约 20 $^{\circ}\text{C}$)避光显色 5 min~15 min。

10.3.12 弃掉细胞孔中 DAB 显色液,加入蒸馏水充分洗涤以终止反应。

10.3.13 在吸水纸上轻轻拍干后,在倒置显微镜下,观察判定结果。

10.4 结果判定

10.4.1 若 CDV 阴性血清与正常细胞和 CDV 分离毒株感染细胞反应均无色,则阴性对照成立;若 CDV 阳性血清与正常细胞反应无色,与 CDV 分离毒株感染细胞反应呈棕黄色或棕褐色,则阳性对照成立。

10.4.2 在阴、阳性对照成立条件下,样品接种细胞与 CDV 阳性血清和阴性血清反应均呈无色,判为 CDV 阴性。

10.4.3 在阴、阳性对照成立条件下,样品接种细胞与 CDV 阴性血清反应呈无色,与 CDV 阳性血清反应呈棕黄色或棕褐色,判为 CDV 阳性。

11 免疫酶组织化学试验

11.1 器材

11.1.1 冰箱(4℃、-20℃、-70℃)。

11.1.2 恒温培养箱(5℃~100℃)。

11.1.3 石蜡组织切片机。

11.1.4 组织脱水机。

11.1.5 包埋机。

11.1.6 普通光学显微镜。

11.2 试剂

11.2.1 PBS,按照 A.1 配制。

11.2.2 DAB 显色液,按照 A.6 配制。

11.2.3 不同体积分数乙醇溶液,按照 A.7 配制。

11.2.4 三氯甲烷:4℃保存。

11.2.5 二甲苯:避光密封保存。

11.2.6 软蜡:熔点 56℃。

11.2.7 硬蜡:熔点 60℃。

11.2.8 胰蛋白酶溶液(0.5%),按照 A.8 配制。

11.2.9 过氧化氢甲醇溶液(3%),按照 A.9 配制。

11.2.10 5%牛血清白蛋白(BSA),按照 A.10 配制。

11.2.11 CDV 单克隆抗体:商品化单克隆抗体或具有同等效力的一抗,使用前稀释至工作浓度。

11.2.12 CDV 阴性血清:无 CDV 抗体血清。

11.2.13 酶标二抗:商品化 HRP 标记的二抗,使用前稀释至工作浓度。

11.3 操作方法

11.3.1 设置 CDV 阳性和阴性对照组织切片。

11.3.2 按照如下步骤制备石蜡切片。

- a) 脱甲醛:将 7.3.3 中固定好的待检组织样品放入染色缸中,用缓慢流动的自来水漂洗 24 h。
- b) 脱水:将组织样品放入染色缸中,依次按照以下梯度浸泡脱水,放入 75%(体积分数)乙醇溶液 2 h,85%(体积分数)乙醇溶液 2 h,95%(体积分数)乙醇溶液 2 h,然后再放入新的 95%(体积分数)乙醇溶液 2 h,放入无水乙醇 2 h,最后放入新的无水乙醇 2 h。
- c) 透明:将组织样品放入三氯甲烷中浸泡 2.5 h 或二甲苯中浸泡 20 min,然后放入新的三氯甲烷中浸泡 3 h 或新的二甲苯中浸泡 10 min。
- d) 浸蜡:在 60℃条件下,将组织样品在软蜡中浸泡 40 min,再放入新的软蜡中浸泡 1 h,最后在硬蜡中浸泡 1 h。
- e) 包埋:将熔化的新硬蜡倒入包埋模具中,倒满后放入浸蜡处理过的组织样品,做好标记。
- f) 切片:石蜡组织切成 5 μm 厚的薄片,用防脱片剂处理过的载玻片贴片,载玻片上做好标记。

g) 烤片:室温下晾干后,50℃烘烤4 h以上,制成石蜡切片。

11.3.3 脱蜡和脱二甲苯:将11.3.2中制备的待检组织切片与阴、阳性对照切片依次放入以下试剂中,放入二甲苯10 min,新的二甲苯10 min,无水乙醇2 min,新的无水乙醇2 min,95%(体积分数)乙醇溶液2 min,新的95%(体积分数)乙醇溶液2 min,85%(体积分数)乙醇溶液2 min,75%(体积分数)乙醇溶液2 min,最后蒸馏水冲洗2 min。

11.3.4 第一次漂洗:将玻片置于PBS中(溶液没过组织),漂洗3次,每次5 min。

11.3.5 胰蛋白酶消化:在玻片上滴加胰蛋白酶溶液并完全覆盖组织,置于湿盒内,在37℃恒温培养箱中孵育15 min,以便充分暴露抗原。

11.3.6 同11.3.4进行第二次漂洗。

11.3.7 去内源酶:在玻片上滴加过氧化氢甲醇溶液并完全覆盖组织,置于湿盒内,室温孵育5 min~10 min。

11.3.8 同11.3.4进行第三次漂洗。

11.3.9 封闭:在玻片上滴加5%牛血清白蛋白并完全覆盖组织,置于湿盒内,室温孵育20 min~30 min。

11.3.10 一抗作用:弃去牛血清白蛋白,用吸水纸吸干组织周围液体,将稀释的CDV单克隆抗体和阴性血清分别滴加到正常组织石蜡切片、CDV感染阳性组织石蜡切片及待检组织石蜡切片上并完全覆盖组织,置于湿盒内,在37℃恒温培养箱中孵育2 h或4℃过夜(12 h以上)。

11.3.11 同11.3.4进行第四次漂洗。

11.3.12 酶标二抗作用:用吸水纸吸干组织周围液体,在玻片上滴加稀释的商品化HRP标记的二抗并完全覆盖组织,置于湿盒内,室温孵育30 min~60 min。

11.3.13 同11.3.4进行第五次漂洗。

11.3.14 DAB显色:用吸水纸吸干组织周围液体,在玻片上滴加新鲜配制的DAB显色液并完全覆盖组织,置于湿盒内,室温避光显色5 min~15 min。

11.3.15 漂洗:将玻片置于蒸馏水中(溶液没过组织),漂洗3次,每次5 min,充分洗涤以终止反应。

11.3.16 苏木素复染:玻片置于苏木素染液中染色3 min~5 min后,在蒸馏水中漂洗5 min。

11.3.17 封片:75%(体积分数)乙醇溶液3 min,85%(体积分数)乙醇溶液3 min,90%(体积分数)乙醇溶液3 min,95%(体积分数)乙醇溶液3 min,100%(体积分数)乙醇溶液3 min,二甲苯Ⅰ3 min,二甲苯Ⅱ3 min,用中性树胶封片。

11.3.18 观察:在普通光学显微镜下观察有无黄色或棕黄色着染,及其存在部位。

11.4 结果判定

11.4.1 若CDV阴性血清与阴性对照和CDV阳性对照作用后均无着染;CDV阳性血清与阴性对照作用无着染,与CDV阳性对照作用后呈本底清晰,细胞浆内呈现黄色或棕黄色着染,则试验成立。

11.4.2 在试验成立条件下,被检组织与CDV阳性血清作用后本底清晰,组织内无黄色或棕黄色着染,判为CDV阴性。

11.4.3 在试验成立条件下,被检组织与CDV阳性血清作用后本底清晰,组织内呈黄色或棕黄色着染,判为CDV阳性。

12 RT-PCR

12.1 器材

12.1.1 冰箱(4℃、-20℃、-70℃)。

12.1.2 PCR仪。

12.1.3 高速冷冻离心机(4℃、离心速度 12 000 r/min 以上)。

12.1.4 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

12.1.5 凝胶成像系统。

12.1.6 微量可调移液器(100 μ L~1 000 μ L、20 μ L~200 μ L、1 μ L~20 μ L)。

12.1.7 无 RNA 酶离心管与带滤芯吸头。

12.2 试剂

12.2.1 Trizol 试剂:RNA 提取试剂,2℃~8℃保存,也可用商品化 RNA 提取试剂盒,或其他等效 RNA 提取试剂和方法,如自动化核酸提取仪和其他配套核酸抽提试剂进行核酸提取。

12.2.2 三氯甲烷:4℃保存。

12.2.3 异丙醇:使用前预冷至-20℃。

12.2.4 DEPC 水(0.1%),按照 A.11 配制。

12.2.5 75%(体积分数)乙醇:用新开启的无水乙醇 75 mL 加 25 mL DEPC 水配制成 75%(体积分数)乙醇溶液,使用前预冷至-20℃。

12.2.6 RT-PCR 相关试剂:可选择商品化试剂盒,操作步骤按照说明书进行。

12.2.7 10×RT-PCR Buffer:反应缓冲液,MgCl₂,dNTP Mix。

12.2.8 RT Enzyme Mix:逆转录酶,RNase 抑制剂,Taq 酶。

12.2.9 5×TBE 电泳缓冲液,按照 A.12 配制。

12.3 CDV 阴性对照制备

用 DEPC 水作为 CDV 阴性对照。

12.4 CDV 阳性对照制备

用 CDV 细胞培养物作为 CDV 阳性对照。

12.5 操作方法

12.5.1 引物设计

用于检测 CDV 的引物序列见附录 B 中 B.1。

12.5.2 RNA 提取

12.5.2.1 取 1.5 mL 无 RNA 酶离心管,按照样本数量编号,每管加入 750 μ L Trizol 试剂后,分别加入 7.3 中处理好的待检样品上清液、CDV 阴性对照及 CDV 阳性对照 250 μ L,用带滤芯吸头充分吹打 20 次~30 次,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。

12.5.2.2 取上清液(至少 500 μ L)至新的 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中,每管加入 150 μ L 三氯甲烷,于混匀器上混匀 15 s,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min。

12.5.2.3 取上清液至新的 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中,每管加入 500 μ L 异丙醇,颠倒数次混合均匀,冰上静置 10 min,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。

12.5.2.4 小心弃掉上清液,倒置在干净的吸水纸上晾干水分,沉淀用 1 mL DEPC 水配制的 75%(体积分数)乙醇清洗;4℃ 8 000 r/min 离心 10 min。

12.5.2.5 小心弃掉上清液,倒置在干净的吸水纸上室温自然干燥 10 min,加入 20 μ L DEPC 水溶解 RNA 沉淀。

12.5.2.6 置于冰上备用,并于 2 h 内进行 RT-PCR 扩增,超过 2 h 应置于-70℃冰箱中保存。

12.5.2.7 可使用等效的商品化试剂盒进行 RNA 提取。

12.5.3 RT-PCR 反应体系

RT-PCR 反应体系按照表 1。

表 1 RT-PCR 反应体系(总体积为 20 μL)

序号	试剂	体积/μL
1	10×RT-PCR Buffer	2
2	RT Enzyme Mix	0.4
3	上游引物(CDVF,20 μmol/L)	0.5
4	下游引物(CDVR,20 μmol/L)	0.5
5	RNA 模板	5
6	DEPC 水	11.6

12.5.4 反应程序

将 PCR 管置 PCR 仪上按如下程序扩增:42 ℃ 反转录 30 min;94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,进行 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 3 min。

12.5.5 琼脂糖凝胶电泳

用 TBE 电泳缓冲液配制 1.5% 的琼脂糖凝胶平板,将凝胶平板放入水平电泳槽中,使电泳缓冲液刚好没过胶面,将 10 μL PCR 产物和 2 μL 加样缓冲液(6×)混匀后缓慢加入样品孔中。电泳时应设立 DNA 标准分子量对照。在 120 V、90 mA 条件下电泳约 30 min,电泳结束后,用凝胶成像系统观察结果。

12.6 结果判定

12.6.1 CDV 阳性对照样品扩增出大小为 455 bp 的核酸片段,且阴性对照样品无扩增条带,则阴、阳性对照成立;否则试验结果无效,电泳图见附录 C。

12.6.2 在阴、阳性对照成立条件下,若待检样品扩增出大小为 455 bp 的核酸片段,判为 CDV 核酸阳性;若待检样品无扩增条带或扩增条带大小不为 455 bp,判为 CDV 核酸阴性。

13 荧光 RT-PCR

13.1 器材

13.1.1 冰箱(4 ℃、-20 ℃、-70 ℃)。

13.1.2 荧光 PCR 仪。

13.1.3 高速冷冻离心机(4 ℃、离心速度 12 000 r/min 以上)。

13.1.4 微量可调移液器(100 μL~1 000 μL、20 μL~200 μL、1 μL~20 μL)。

13.1.5 无 RNA 酶离心管与带滤芯吸头。

13.2 试剂

- 13.2.1 DEPC 水(0.1%),按照 A.11 配制。
- 13.2.2 10×RT-PCR Buffer:反应缓冲液,MgCl₂,dNTP Mix。
- 13.2.3 RT Enzyme Mix:逆转录酶,RNase 抑制剂,Taq 酶。

13.3 操作方法

13.3.1 引物和探针设计

用于检测 CDV 的引物和探针序列见 B.2。

13.3.2 RNA 提取

 操作步骤同 12.5.2。

13.3.3 荧光 RT-PCR 反应体系

荧光 RT-PCR 反应体系按照表 2。

表 2 荧光 RT-PCR 反应体系(总体积为 20 μL)

序号	试剂	体积/μL
1	10×RT-PCR Buffer	2
2	RT Enzyme Mix	0.4
3	上游引物(Primer F,10 μmol/L)	0.5
4	下游引物(Primer R,10 μmol/L)	0.5
5	Primer P(5 μmol/L)	0.5
6	RNA 模板	5
7	DEPC 水	11.1

13.3.4 反应程序

将 PCR 管置荧光 PCR 仪上按如下程序扩增:48 ℃反转录 10 min;95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 10 s,60 ℃退火延伸 30 s;进行 40 个循环,每个循环在 60 ℃收集 FAM 荧光。

13.4 结果判定

13.4.1 试验成立条件

- 13.4.1.1 阴性对照无 Ct 值或 Ct≥40,且无特定的 S 型扩增曲线。
- 13.4.1.2 阳性对照的 Ct<35,且出现特定的 S 型扩增曲线。
- 13.4.1.3 阴性对照和阳性对照同时满足以上条件可判定试验有效,否则试验无效。

13.4.2 结果描述与判定

- 13.4.2.1 无 Ct 值或 Ct≥40,且无特定的 S 型扩增曲线,判为 CDV 核酸阴性。
- 13.4.2.2 Ct≤38,且出现特定的 S 型扩增曲线,判为 CDV 核酸阳性,扩增曲线图见附录 D。

13.4.2.3 $38 < C_t < 40$ 且出现特定的 S 型扩增曲线,判为可疑。在排除样品或产物污染的可能性后,重新提取核酸检测,无 C_t 值或 $C_t \geq 40$ 且无特定的 S 型扩增曲线,判为 CDV 核酸阴性, $C_t < 40$ 且出现特定的 S 型扩增曲线,判为 CDV 核酸阳性。

14 综合判定

14.1 经过第 6 章临床诊断,判为疑似 CD;符合 6.2 其中一项的活体动物可采用第 8 章进行快速诊断,检测结果为阳性者,判为疑似 CD。

14.2 疑似 CD 病例按照第 9 章~第 13 章中任何一项方法检测结果为阳性,判为 CD 确诊病例。

14.3 对于无 6.2 中临床症状的动物,按照第 9 章~第 13 章中任何一项方法检测结果为阳性,若未接种过 CD 疫苗,判为 CDV 感染;若 2 周~3 周内接种过 CD 活疫苗,应进一步采用第 12 章方法进行检测并对扩增片段进行序列测定,以区分疫苗毒株或野毒株感染。



附 录 A
(规范性)
试剂溶液的配制

A.1 0.01 mol/L pH7.4 PBS

配制 0.01 mol/L pH7.4 PBS 所需试剂如下：

- 8 g 氯化钠；
- 0.2 g 氯化钾；
- 0.24 g 磷酸二氢钾；
- 1.44 g 磷酸氢二钠。

试剂加 800 mL 蒸馏水充分溶解，用浓盐酸调节 pH 至 7.4 后，加蒸馏水至 1 000 mL，高压灭菌，4 ℃ 保存备用。

A.2 青链霉素贮存液

取注射用青霉素和链霉素溶解于蒸馏水中，使每毫升含青霉素 50 000 U、链霉素 50 000 μg ，用 0.22 μm 微孔滤器过滤，-20 ℃ 保存备用。使用时，按 100 mL DMEM 培养液加 0.2 mL 青链霉素贮存液的比例，使最终浓度为青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg /mL。

A.3 10%中性福尔马林固定液

配制 10%中性福尔马林固定液所需试剂如下：

- 4.0 g 磷酸二氢钠；
- 6.5 g 磷酸氢二钠；
- 100 mL 甲醛；
- 900 mL 蒸馏水。

充分溶解混匀，室温保存备用。

A.4 DMEM 培养液

将 DMEM 粉剂 10 g，加入 950 mL 的 30 ℃ 蒸馏水中，边加边搅拌，加入 3.7 g 碳酸氢钠，充分溶解后，用 1 mol/L 氢氧化钠或盐酸将培养液 pH 调至 6.9~7.0 后，加蒸馏水至 1 000 mL。立即用 0.22 μm 的微孔滤器过滤，盖紧容器瓶塞，4 ℃ 保存备用。

A.5 80%冷丙酮

将 8 mL 丙酮与 2 mL 蒸馏水混匀，4 ℃ 保存备用。

A.6 DAB 显色液

先在 1 mL 蒸馏水中加入 50 μL DAB 试剂中的 A 液混匀，再加入 50 μL B 液和 50 μL C 液充分混匀使用，现用现配。

A.7 不同体积分数乙醇溶液

用纯化水和无水乙醇按比例配制成不同体积分数的乙醇溶液，室温保存备用。

A.8 胰蛋白酶溶液(0.5%)

配制胰蛋白酶溶液(0.5%)所需试剂如下:

——0.5 g 胰蛋白酶;

——100 mL PBS。

低温保存备用。使用时,用 PBS 稀释为 0.05%。

A.9 过氧化氢甲醇溶液(3%)

将 10 mL 30%过氧化氢与 90 mL 甲醇混匀,现用现配。

A.10 5%牛血清白蛋白(BSA)

称取 5 g BSA 粉末,将 BSA 粉末缓慢地加入 100 mL 生理盐水中,搅拌均匀,至 BSA 粉末完全溶解,4 ℃保存备用。

A.11 DEPC 水(0.1%)

在通风橱内,将 1 mL DEPC 加入 999 mL 双蒸水中,经剧烈振摇后,于室温静止 4 h 以上,使 DEPC 充分溶解。高压灭菌 121 ℃ 30 min 后,4 ℃保存备用。

A.12 5×TBE 电泳缓冲液

配制 5×TBE 电泳缓冲液所需试剂如下:

——54.0 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris);

——2.9 g 乙二胺四乙酸(EDTA);

——27.5 g 硼酸。

试剂加 800 mL 蒸馏水,用 5 mol/L 的盐酸调 pH 至 8.0 后,加蒸馏水至 1 000 mL。



附 录 B
(资料性)

RT-PCR、荧光 RT-PCR 引物和探针序列

B.1 RT-PCR 引物序列

引物浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$,其序列如下:

上游引物(CDVF):5'-CGA GTC TTT GAG ATA GGG TT -3';

下游引物(CDVR):5'-CCT CCA AAG GGT TCC CAT GA -3'。

B.2 荧光 RT-PCR 引物和探针序列

采用 *Taq*Man 探针法。其序列如下:

上游引物(Primer F):5'- AGCTAGTTTCATCTTAACTATCAAATT -3';

下游引物(Primer R):5'- TTA ACTCTCCGGA AACTCATGC -3';

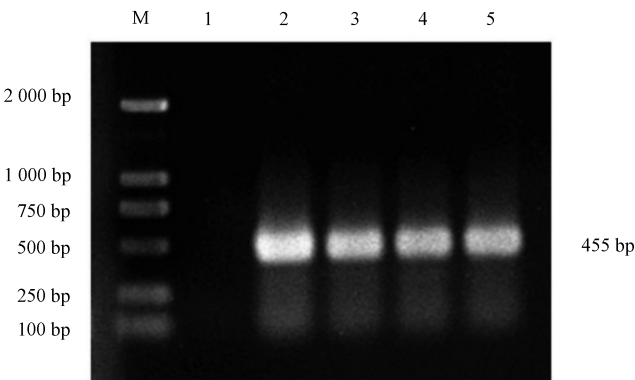
Primer P:5'-(FAM)ACCCRAGAGCCGGATACATAGTTTCAATGC(BHQ1)-3'。



附 录 C
(资料性)

犬瘟热病毒 RT-PCR 反应产物电泳图

犬瘟热病毒 RT-PCR 反应产物电泳结果如图 C.1 所示。



标引序号说明：

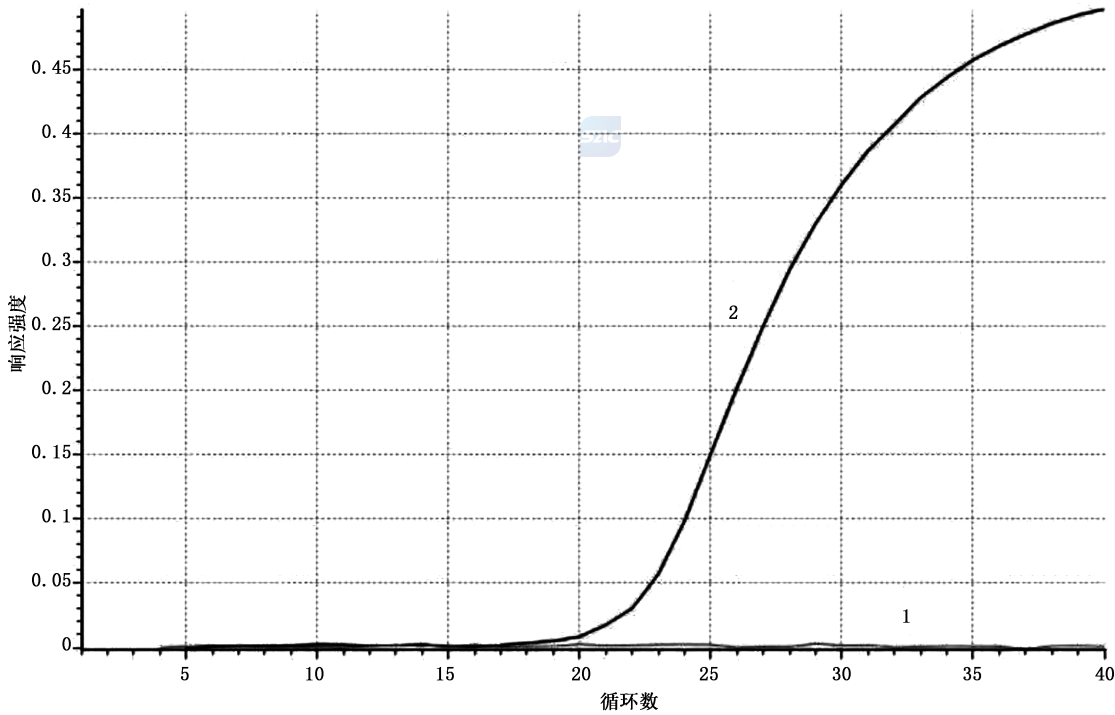
- M ——DNA 分子质量标准 DL2 000；
- 1 —— 阴性对照；
- 2 —— 阳性对照；
- 3、4、5 —— 阳性样品。

图 C.1 犬瘟热病毒 RT-PCR 电泳图

附 录 D
(资料性)

犬瘟热病毒荧光 RT-PCR 扩增曲线图

犬瘟热病毒荧光 RT-PCR 扩增曲线图如图 D.1 所示。



标引序号说明：
1—— 阴性对照；
2—— 阳性对照。

图 D.1 犬瘟热病毒荧光 RT-PCR 扩增曲线图