



中华人民共和国国家标准

GB/T 27533—2024

代替 GB/T 27533—2011

犬细小病毒病诊断技术

Diagnostic techniques for canine parvovirus disease

2024-12-31 发布

2025-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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 1

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 血凝与血凝抑制试验(HA/HI) 5

11 PCR 6

12 荧光 PCR 8

13 综合判定 9

附录 A (规范性) 试剂溶液的配制 10

附录 B (资料性) PCR、荧光 PCR 引物和探针序列 11

附录 C (资料性) 犬细小病毒 PCR 反应产物电泳图 12

附录 D (资料性) 犬细小病毒荧光 PCR 扩增曲线图 13



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 27533—2011《犬细小病毒病诊断技术》，与 GB/T 27533—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)；
- 增加了血常规检查(见 6.3)；
- 增加了胶体金免疫层析法(见第 8 章)；
- 增加了荧光 PCR(见第 12 章)；
- 增加了综合判定(见第 13 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、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、青岛海华生物集团股份有限公司、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、长春西诺生物科技有限公司、山东省动物疫病预防与控制中心、上海海关动植物与食品检验检疫技术中心、青岛巴特菲科技发展有限公司、重庆市动物疫病预防控制中心、淄博市张店区畜牧渔业服务中心。

本文件主要起草人：张洪亮、单虎、马清霞、苏红、李一飞、刘刚、张瑞华、肖颖、朱伟民、宋晓明、杨瑞梅、孙圣福、周芳、夏振强、徐超、林佳旭、黄兵、于永乐、黄娟、秦志华、栾伟丽、李明义、李桂梅、刘丽蓉、李健、马凤龙、张传美、李然栋、温建新、秦晓冰、马晶。

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 27533—2011；
- 本次为第一次修订。

引 言

犬细小病毒病(canine parvovirus disease,CP)是由犬细小病毒(canine parvovirus,CPV)感染引起的犬科和鼬科动物的一种传染病。该病以剧烈呕吐、出血性肠炎、白细胞显著减少以及心肌炎为主要特征,分为肠炎型和心肌炎型两种类型,50%以上的临床病例为肠炎和心肌炎混合型。我国将其列为三类动物疫病。

犬细小病毒属于细小病毒科(*Parvoviridae*),细小病毒属(*Parvovirus*),是一种无包膜单链 DNA 病毒。CPV 与猫泛白细胞减少症病毒(FPLV)、水貂肠炎病毒(MEV)等细小病毒的核苷酸同源性超过 98%。对不同分离株的基因序列分析发现,CPV 易通过抗原漂移产生新的突变株,有 4 个亚型:CPV-2、CPV-2a、CPV-2b 和 CPV-2c。CPV 能凝集恒河猴、仓鼠、猪、马和猫的红细胞,不能凝集人、牛、羊、兔、鼠和鸡红细胞,所以血凝特异性也是鉴定该病毒的参考指标之一。该病容易与犬瘟热、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。



犬细小病毒病诊断技术

1 范围

本文件描述了犬细小病毒病的临床诊断、样品采集、处理与保存以及胶体金免疫层析法、病毒分离鉴定、血凝与血凝抑制试验、PCR、荧光 PCR 等方法。

本文件适用于犬细小病毒病的诊断和监测。

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)

CP: 犬细小病毒病 (canine parvovirus disease)

CPE: 细胞病变效应 (cytopathic effect)

CPV: 犬细小病毒 (canine parvovirus)

Ct: 循环阈值 (cycle threshold)

DEPC: 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate)

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

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxyribonucleoside triphosphate)

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

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)

HAU: 血凝单位 (hemagglutination unit)

PBS: 磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffered saline)

PCR: 聚合酶链式反应 (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 CPV 主要感染犬,也可见于狐、狼、貂等其他犬科动物和鼬科动物。不同年龄、性别及品种的犬均可感染,其中 2 月龄~6 月龄的幼犬最易感,纯种犬发病率、病死率均高于杂交犬。

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 CPV 主要通过消化道传播,分泌物、排泄物中含有大量病毒。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 潜伏期为 1 周~2 周,病初食欲减退或废绝,表现为迅速消瘦,倦卧不起,目光呆滞,眼窝下陷,腹围紧缩,机体脱水,皮肤干燥,皮肤弹性降低。

6.2.2 心肌炎型:主要表现为呻吟、干咳,黏膜发绀,呼吸极度困难,心有杂音,心跳加快,常在数小时内死亡。

6.2.3 肠炎型:首先出现呕吐,呕吐出白色泡沫或黄色液体;继而腹泻,粪便稀薄且恶臭,呈喷射状剧烈腹泻,粪便呈红色,混有大量黏液或假膜;后期排番茄汁样稀便,并有特殊的腥臭味;脱水,很快休克。

6.3 血常规检查

白细胞总数明显减少,多数在 $5 \times 10^9/L$ 以下,少数在 $2 \times 10^9/L$ 以下,当白细胞在 $2 \times 10^9/L$ 以下,则预后不良。如果继发细菌感染,白细胞总数可增高。

6.4 病理变化

6.4.1 剖检病理变化

6.4.1.1 心肌炎型:病变主要见于肺脏和心脏。肺脏水肿,局灶性充血、出血,肺表面色彩斑驳,呈斑块形状。心脏高度扩张、水肿,表面有出血斑点。心房和心室内有瘀血块,心肌松弛无力、无弹性、有出血性斑纹。

6.4.1.2 肠炎型:病变主要见于小肠的空肠、回肠,肠道内有酱油色液体,小肠壁变厚。浆膜暗红色,黏膜坏死、脱落、绒毛萎缩。肠系膜淋巴结充血、出血、肿胀。

6.4.2 组织病理变化

6.4.2.1 心肌炎型:心肌和心内膜有非化脓性坏死灶,肌纤维变性、坏死,受损的心肌细胞中常有嗜酸性核内包涵体。

6.4.2.2 肠炎型:空肠、回肠黏膜上皮细胞变性、坏死、脱落,有些变性或完整的上皮细胞内含有嗜酸性核内包涵体。绒毛萎缩,隐窝肿大、充满炎性渗出物。肠腺消失,残存腺体扩张,内含坏死的细胞碎片。

6.5 结果判定

6.5.1 对于发病动物,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,或出现 6.3 中血常规结果,可判为疑似 CP;对于病死动物可进一步进行病理学检查,观察到 6.4 中描述的任一剖检病理变化或任一组织病理变化,可判为疑似 CP。

6.5.2 疑似病例应采集相应样品,按照第 9 章~第 12 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

7.1.1 器械

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)、无菌棉签拭子等。

7.1.2 容器

样品保存管、离心管(1.5 mL、10 mL)、自封袋等。



7.1.3 采样试剂

7.1.3.1 0.01 mol/L pH7.4 PBS,按照附录 A 中 A.1 配制。

7.1.3.2 青链霉素贮存液,按照 A.2 配制。

7.1.4 个人防护用品

工作服、一次性手套等。

7.1.5 采样记录用品

采样记录单、记号笔、防水标签等。

7.2 样品采集与处理

7.2.1 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 CPV 的胶体金免疫层析法、血凝与血凝抑制试验、PCR、荧光 PCR 检测。

7.2.2 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 CPV 的胶体金免疫层析法、病毒分离鉴定、血凝与血凝抑制试验、PCR、荧光 PCR 检测。

7.2.3 组织样品

用无菌剪刀采集 2 g 小肠等组织,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。3 000 r/min 离心 20 min 后,取上清液,待检。用于 CPV 的病毒分离鉴定、血凝与血凝抑制试验、PCR、荧光 PCR 检测。

7.3 样品保存

采集的样品应在 4 ℃ 条件下保存,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

CPV 胶体金抗原检测卡。

8.2 样品处理

8.2.1 血液样品

将 7.2.1 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,置于样品处理管中,待检。

8.2.2 口眼鼻分泌物和粪便样品

将 7.2.2 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 使大颗粒沉降至试管底部,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,缓慢滴加至样品孔中,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 CPV 阳性,需用采用第 9 章~第 12 章中的任一方法进行确诊。

8.4.3 仅有对照线(C)显色,判为 CPV 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 倒置显微镜。

9.1.4 电子天平:精度 0.1 mg。

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

9.1.6 细胞培养瓶(25 cm^2 或 75 cm^2 等)。

9.1.7 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 DMEM 培养液,按照 A.3 配制。

9.2.3 新生牛血清。

9.2.4 FK81 细胞(猫肾细胞系)。

9.3 操作方法

9.3.1 细胞培养

用 6 mL 含 8% 新生牛血清的 DMEM 培养液在 25 cm² 细胞培养瓶中培养 FK81 细胞,置于 37 ℃、5% (体积分数) 二氧化碳培养箱中培养,可进行待检样品接种。

9.3.2 样品接种

采用同步接种方法,取 7.2.2 或 7.2.3 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 FK81 细胞,置于 37 ℃、5% (体积分数) 二氧化碳培养箱中培养,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 3 d~5 d。

9.3.3 病毒培养

CPV 在 FK81 细胞上培养,一般培养 3 d~5 d 后,出现细胞变圆、拉丝脱落等 CPE。如果样品初次接种 FK81 细胞,培养 5 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 5 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 5 代。

9.4 病毒鉴定

若细胞在初次接种样品或盲传 5 代后出现 CPE,将细胞培养瓶用封口膜封口后放入 -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 章中的任何一章描述的方法,进行 CPV 鉴定。

9.5 结果判定

9.5.1 初次接种样品或盲传 5 代后出现 CPE,并经第 10 章~第 12 章任一方法,检测结果为阳性,判为 CPV 分离阳性。

9.5.2 初次接种样品和盲传 5 代后均未出现 CPE,或出现 CPE 但经过第 10 章~第 12 章任一方法,检测结果为阴性,判为 CPV 分离阴性。

10 血凝与血凝抑制试验(HA/HI)

10.1 器材

10.1.1 冰箱(4 ℃、-20 ℃、-70 ℃)。

10.1.2 恒温培养箱(5 ℃~100 ℃)。

10.1.3 微型混合器。

10.1.4 96 孔 V 形微量反应板。

10.2 试剂

10.2.1 PBS,按照 A.1 配制。

10.2.2 1% 猪红细胞悬液,按照 A.4 配制。

10.2.3 CPV 标准阳性血清。

10.3 血凝试验(HA)

10.3.1 在 96 孔 V 形微量反应板上,第 1 孔~第 12 孔中加入 25 μL PBS。

10.3.2 取 7.2 中处理好的待检样品 25 μL 加入左侧第 1 孔,混合均匀后,吸出 25 μL 至第 2 孔,混合均匀后,吸出 25 μL 至第 3 孔,依次倍比稀释,至第 11 孔,混合均匀后,吸出 25 μL 弃掉,第 12 孔作为 PBS 对照孔。

10.3.3 每孔加 25 μL PBS。

10.3.4 由左至右依次向每孔加入 25 μL 1%猪红细胞悬液,置于微型混合器上振荡 10 s,使红细胞与待检样品充分混合,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 30 min~60 min,待 PBS 对照孔红细胞呈显著纽扣状时可观察结果。

10.3.5 结果判定:将 96 孔 V 形微量反应板倾斜,观察红细胞有无泪珠状流淌。以使红细胞 100%凝集(完全无泪珠状流淌)的最高稀释倍数作为该病毒的血凝效价,即一个血凝单位,判定待检样品的病毒血凝效价。

10.4 血凝抑制试验(HI)

10.4.1 根据 10.3.5 中测定的病毒血凝效价,配制 4 个血凝单位(4HAU)病毒液。若血凝的终点滴度为 1:256,则 $4\text{HAU}=256/4=64$ (即 1:64),即通过 1:64 稀释获得 4HAU 病毒液。

10.4.2 在 96 孔 V 形微量反应板上,第 1 孔~第 11 孔中各加入 25 μL PBS。在第 12 孔加入 50 μL PBS 作为红细胞对照。

10.4.3 取 25 μL CPV 阳性血清加入左侧第 1 孔,混合均匀后,吸出 25 μL 至第 2 孔,依此倍比稀释至第 10 孔,从第 10 孔中吸出 25 μL 弃掉。

10.4.4 第 1 孔~第 11 孔中加入 10.4.1 中配制的 4HAU 病毒液 25 μL ,置于微型混合器上振荡 10 s,混合均匀,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 60 min。第 11 孔作为 4HAU 病毒液对照。

10.4.5 由左至右依次向每孔加入 25 μL 1%猪红细胞悬液,置于微型混合器上振荡 10 s,混合均匀,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 30 min~60 min,待第 11 孔 4HAU 病毒液对照孔出现红细胞 100%凝集时可观察结果。

10.4.6 结果判定:将 96 孔 V 形微量反应板倾斜,观察 4HAU 病毒液血凝性是否被 CPV 阳性血清特异性抑制,红细胞有无泪珠状流淌。当 4HAU 病毒液对照孔红细胞完全凝集,PBS 对照孔红细胞呈现泪珠状流淌,则试验成立。

能被 CPV 阳性血清抑制血凝者,判为 CPV 阳性;不能被 CPV 阳性血清抑制血凝者,判为 CPV 阴性。

11 PCR

11.1 器材

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

11.1.2 PCR 仪。

11.1.3 高速冷冻离心机(4 $^{\circ}\text{C}$ 、离心速度 12 000 r/min 以上)。

11.1.4 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

11.1.5 凝胶成像系统。

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

11.1.7 无 DNA 酶离心管与带滤芯吸头。

11.2 试剂

11.2.1 DNAiso Reagent 试剂:DNA 提取试剂,也可用商品化 DNA 提取试剂盒,或其他等效 DNA 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。

- 11.2.2 无水乙醇。
- 11.2.3 DEPC 水(0.1%),按照 A.5 配制。
- 11.2.4 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。
- 11.2.5 *Taq* 酶及 10 倍 *Taq* 酶反应缓冲液:*Taq* 酶浓度为 5 U/ μ L,−20 ℃ 保存。
- 11.2.6 dNTP:含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L,−20 ℃ 保存。
- 11.2.7 5×TBE 电泳缓冲液,按照 A.6 配制。

11.3 CPV 阴性对照制备

用 DEPC 水作为 CPV 阴性对照。

11.4 CPV 阳性对照制备

用 CPV 的细胞培养物作为 CPV 阳性对照。

11.5 操作方法

11.5.1 引物设计

用于检测 CPV 的引物序列见附录 B 中 B.1。

11.5.2 DNA 提取

- 11.5.2.1 取 7.2 中处理好的待检样品上清液 500 μ L 置于 1.5 mL 无 DNA 酶离心管中,加入 500 μ L DNAiso Reagent 试剂,颠倒混匀 6 次~8 次,静置约 10 min 后,12 000 r/min 离心 10 min。
- 11.5.2.2 取上清液(至少 500 μ L)至新的 1.5 mL 无 DNA 酶离心管中,每管加入 400 μ L 无水乙醇,颠倒混匀 6 次~8 次,4 000 r/min 离心 2 min。
- 11.5.2.3 小心弃掉上清液,加入 1 mL 75%(体积分数)乙醇溶液,颠倒混匀 6 次~8 次,12 000 r/min 离心 5 min。
- 11.5.2.4 小心弃掉上清液,倒置在干净的吸水纸上晾干水分,加入 20 μ L DEPC 水溶解 DNA 沉淀。−20 ℃ 冰箱中保存备用。
- 11.5.2.5 可以使用等效的商品化试剂盒进行 DNA 提取。

11.5.3 PCR 扩增体系

PCR 反应体系见表 1。

表 1 PCR 反应体系(总体积为 20 μ L)

序号	试剂	体积/ μ L
1	10 倍 <i>Taq</i> 酶反应缓冲液	2.5
2	dNTP	0.5
3	<i>Taq</i> 酶	0.5
4	上游引物(CPVF,20 μ mol/L)	0.5
5	下游引物(CPVR,20 μ mol/L)	0.5
6	DNA 模板	2
7	DEPC 水	13.5

11.5.4 反应程序

将 PCR 管置 PCR 仪上按如下程序扩增: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;72 ℃延伸 3 min。

11.5.5 琼脂糖凝胶电泳

11.5.5.1 用 TBE 电泳缓冲液配制 1.5%的琼脂糖平板,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 μ L PCR 产物和 2 μ L 加样缓冲液(6 $\times$),混匀后加入样品孔。

11.5.5.2 电泳时应设立 DNA 分子质量标准对照。

11.5.5.3 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。

11.6 结果判定

11.6.1 CPV 阳性对照样品扩增出大小为 559 bp 的核酸片段,且阴性对照样品无扩增条带,判定阴、阳性对照成立;否则试验结果无效,电泳图见附录 C。

11.6.2 在阴、阳性对照成立条件下,若待检样品扩增出大小为 559 bp 的核酸片段,判为 CPV 核酸阳性;若待检样品无扩增条带或扩增条带大小不为 559 bp,判为 CPV 核酸阴性。

12 荧光 PCR

12.1 器材

12.1.1 冰箱(4 ℃、-20 ℃、-70 ℃)。

12.1.2 荧光 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 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)。

12.1.5 无 DNA 酶离心管与带滤芯吸头。

12.2 试剂

12.2.1 DEPC 水(0.1%),按照 A.5 配制。

12.2.2 Premix Ex Taq (Probe qPCR)(2 $\times$):反应缓冲液、MgCl₂、dNTP Mix、Taq 酶。

12.3 操作方法

12.3.1 引物和探针设计

用于检测 CPV 的引物和探针序列见 B.2。

12.3.2 DNA 提取

操作步骤同 11.5.2。

12.3.3 荧光 PCR 反应体系

荧光 PCR 反应体系见表 2。

表 2 荧光 PCR 反应体系(总体积为 20 μL)

序号	试剂	体积/μL
1	Premix Ex Taq(Probe qPCR)(2×)	10
2	上游引物(Primer F,10 μmol/L)	0.5
3	下游引物(Primer R,10 μmol/L)	0.5
4	Primer P(10 μmol/L)	0.5
5	DNA 模板	5
6	DEPC 水	3.5

12.3.4 反应程序

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

12.4 结果判定

12.4.1 试验成立条件

- 12.4.1.1 阴性对照无 Ct 值或 $Ct \geq 40$,且无特定的 S 型扩增曲线。
- 12.4.1.2 阳性对照的 $Ct < 35$,且出现特定的 S 型扩增曲线。
- 12.4.1.3 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。

12.4.2 结果描述及判定

- 12.4.2.1 无 Ct 值或 $Ct \geq 40$,且无特定的 S 型扩增曲线,判为 CPV 核酸阴性。
- 12.4.2.2 $Ct \leq 38$,且出现特定的 S 型扩增曲线,判为 CPV 核酸阳性,扩增曲线图见附录 D。
- 12.4.2.3 $38 < Ct < 40$ 且出现特定的 S 型扩增曲线,判为可疑。在排除样本或产物污染的可能性后,重新提取核酸检测,无 Ct 值或 $Ct \geq 40$ 且无特定的 S 型扩增曲线,判为 CPV 核酸阴性, $Ct < 40$ 且出现特定的 S 型扩增曲线,判为 CPV 核酸阳性。

13 综合判定

- 13.1 经过第 6 章临床诊断,判为疑似 CP;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 CP。
- 13.2 疑似 CP 病例按照第 9 章~第 12 章中的其中一项方法检测结果为阳性,判为 CP 确诊病例。
- 13.3 若未出现 6.2 临床症状,但按照第 9 章~第 12 章中的其中一项方法检测结果为阳性,判为 CPV 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 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 微孔滤器过滤，盖紧容器瓶塞，4 ℃ 保存备用。

A.4 1%猪红细胞悬液

用真空采血管(含 EDTA 抗凝剂)在猪前腔静脉采血，采集到的猪红细胞置于 10 倍体积的阿氏液中(含 8.0 g/L 柠檬酸钠、0.55 g/L 柠檬酸、20.5 g/L 葡萄糖、4.2 g/L 氯化钠)，1 000 r/min 离心 10 min，弃上清。

加入 5 倍体积的 PBS 清洗，充分混匀后，1 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，洗涤 3 次~4 次。

洗涤后用 PBS 配制成 1% (体积分数) 的红细胞悬液。制备好后最好立即使用，暂时不用可放置 4 ℃ 冰箱保存。

A.5 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.6 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)

PCR、荧光 PCR 引物和探针序列

B.1 PCR 引物序列

引物浓度:20 μmol/L,其序列如下:
上游引物(CPVF):5'-GAA TCT GCT ACT CAG CCA CCA AC-3';
下游引物(CPVR):5'-GTG CAC TAT AAC CAA CCT CAG C-3'。

B.2 荧光 PCR 引物和探针序列

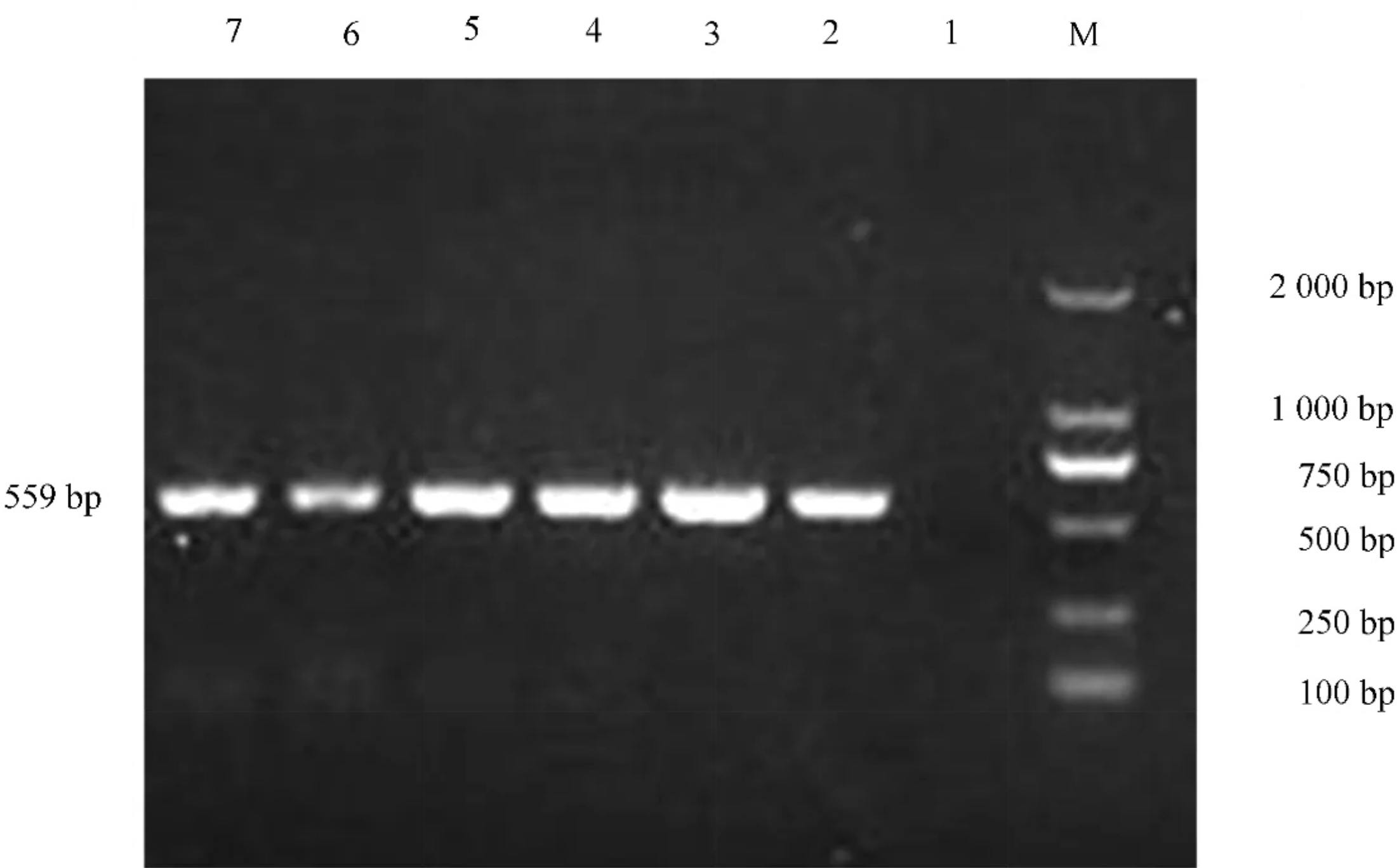
采用 TaqMan 探针法。
上游引物(Primer F):5'- GACAATCTTGCACCAATGAG-3';
下游引物(Primer R):5'- CCAGATCCTGTAGCTCTTTC-3';
Primer P:5'-(FAM)TGGAGCAGTTCAACCAGACGG(BHQ1)-3'。



附 录 C
(资料性)

犬细小病毒 PCR 反应产物电泳图

犬细小病毒 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、6、7 ——临床阳性样品。

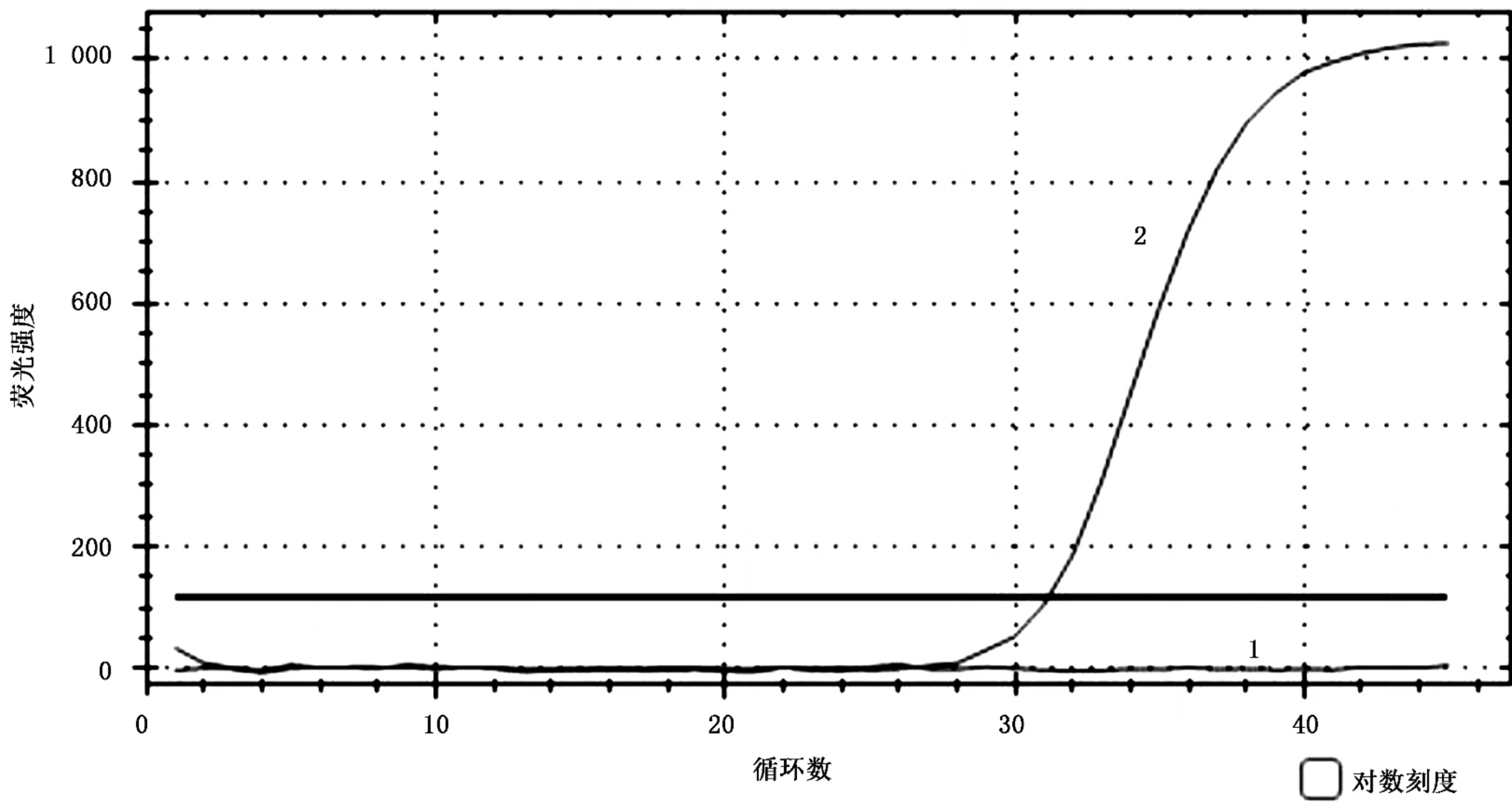
图 C.1 犬细小病毒 PCR 电泳图



附 录 D
(资料性)

犬细小病毒荧光 PCR 扩增曲线图

犬细小病毒荧光 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 犬细小病毒荧光 PCR 扩增曲线图