

**中华人民共和国农业行业标准**

NY/T 683—2003

---

**犬传染性肝炎诊断技术**

**Diagnostic techniques for infectious canine hepatitis**

2003-07-30 发布

2003-10-01 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出并归口。

本标准起草单位：农业部兽医诊断中心。

本标准主要起草人：田克恭、王宏伟、遇秀玲、陈西钊、王传彬、杨秀勇。

# 犬传染性肝炎诊断技术

## 1 范围

本标准规定了犬传染性肝炎(ICH)的临床诊断、犬传染性肝炎病毒(ICHV)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。

本标准适用于犬传染性肝炎的诊断。

## 2 临床诊断要点

### 2.1 临床症状

最急性病例,患犬在呕吐、腹痛和腹泻等症状出现后数小时内死亡。急性型病例,患犬体温呈马鞍型升高,精神抑郁,食欲废绝,渴欲增加,呕吐,腹泻,粪中带血。亚急性病例,特征性症状是患犬角膜一过性混浊,即“蓝眼”病,有的出现溃疡。慢性病例多发于老疫区或疫病流行后期,患犬多不死亡,可以自愈。

### 2.2 病理变化

病犬主要表现全身性败血症变化。在实质器官、浆膜、粘膜上可见大小、数量不等的出血斑点。肝肿大,呈斑驳状,表面有纤维素附着。胆囊壁水肿增厚,灰白色,半透明,胆囊浆膜被覆纤维素性渗出物,胆囊的变化具有一定的诊断意义。

## 3 病毒分离与鉴定

### 3.1 材料准备

#### 3.1.1 试剂

- 3.1.1.1 改良最低要素营养液(DMEM)培养基,配方见第 A.1 章。
- 3.1.1.2 犬肾传代细胞(MDCK 细胞)。
- 3.1.1.3 标准阳性血清:ICHV 单克隆抗体,中和抗体效价 1:1024。
- 3.1.1.4 标准阴性血清:无 ICHV 感染的犬血清。
- 3.1.1.5 新生牛血清,青霉素,链霉素。

#### 3.1.2 器材

- a) 细胞培养瓶;
- b) 吸管;
- c) 二氧化碳培养箱;
- d) 37℃ 恒温水浴箱;
- e) 普通冰箱及低温冰箱;
- f) 离心机及离心管;
- g) 研磨器械;
- h) 普通光学显微镜;
- i) 微量加样器,容量 5  $\mu\text{L}$ ~50  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ ;
- j) 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜。

#### 3.1.3 样品

ICHV 存在于病犬扁桃体、肝脏、脾脏等组织器官中。无菌采集这些器官用无血清 DMEM 制成 20%组织悬液,3 000 r/min 离心 30 min。取上清 10 000 r/min 离心 20 min,取上清用于 ICHV 分离。

## 3.2 操作方法

### 3.2.1 细胞培养

用含8%新生牛血清的DMEM培养基,在37℃培养MDCK细胞。每3d~4d传代一次,细胞长成单层时,用于ICHV分离。

### 3.2.2 病料接种

将0.1 mL处理好的组织悬液接种MDCK细胞,37℃吸附1h,加入无血清DMEM继续培养3d~5d,观察结果。

### 3.2.3 结果观察

ICHV感染MDCK细胞3d~5d表现为细胞增大变圆、变亮、折光性增强、聚集成葡萄串状。若第一次接种未出现细胞病变,应将细胞培养物冻融后盲传三代。如仍无细胞病变,则判为ICHV检测阴性。

### 3.2.4 ICHV的鉴定

将出现细胞病变的细胞培养物,用1%人“O”型红细胞进行血凝试验,血凝试验阳性者,再用ICHV单克隆抗体进行血凝抑制试验,鉴定毒株。

## 4 酶联免疫吸附试验

### 4.1 材料准备

#### 4.1.1 试剂

- 4.1.1.1 ELISA抗原包被板。
- 4.1.1.2 标准阳性血清:用ICHV抗原免疫犬获得的血清。
- 4.1.1.3 标准阴性血清:无ICHV感染的犬血清。
- 4.1.1.4 酶结合物:辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗犬IgG。
- 4.1.1.5 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见第A.2章。
- 4.1.1.6 洗涤液:配制见第A.3章。
- 4.1.1.7 样品稀释液:配制见第A.4章。
- 4.1.1.8 底物溶液:配制见第A.6章。
- 4.1.1.9 终止液:配制见第A.7章。

#### 4.1.2 器材

- a) 酶联检测仪;
- b) 微量加样器,容量50 μL~200 μL;
- c) 37℃恒温培养箱。

#### 4.1.3 样品

采集被检犬血液,分离血清。血清应新鲜、透明、不溶血、无污染,密装于灭菌小瓶内,4℃或-30℃保存或立即送检。试验前将被检血清统一编号,并用样品稀释液作1:160倍稀释。

### 4.2 操作方法

- 4.2.1 试验设阴性对照、阳性对照各两孔和空白对照一孔。
- 4.2.2 在微孔反应板孔中加入1:160稀释的待检血清、阴性对照血清、阳性对照血清各100 μL,充分混匀后,置37℃作用20 min。
- 4.2.3 弃去各孔中液体、甩干。每孔加满洗涤液漂洗三次,每次2 min,甩干。
- 4.2.4 每孔加入酶结合物100 μL,置37℃作用20 min。
- 4.2.5 重复4.2.3。
- 4.2.6 每孔加入底物液100 μL,置37℃避光显色10 min。
- 4.2.7 每孔加入终止液50 μL,置酶联检测仪于450 nm波长测定各孔吸光度(OD)值。

### 4.3 结果判定

- 4.3.1 阳性对照血清 OD 值 $\geq 0.8$ ;阴性对照血清 OD 值 $\leq 0.1$ ,试验成立。
- 4.3.2 若阴性对照 OD 均值—空白对照 OD 值小于 0.03,按 0.03 计算。
- 4.3.3 临界值的计算:临界值=0.17+(阴性血清对照孔 OD 均值—空白对照孔 OD 值)。
- 4.3.4 待检样本的 OD 值—空白对照 OD 值所得的差 $\geq$ 临界值,即判为 ICHV 抗体具有保护效价;小于临界值,即判为 ICHV 抗体未达到保护效价。

## 5 免疫酶组织化学法

### 5.1 材料准备

#### 5.1.1 试剂

- 5.1.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见第 A.2 章。
- 5.1.1.2 标准阳性血清:ICHV 单克隆抗体,中和抗体效价 1:1024。
- 5.1.1.3 标准阴性血清:无 ICHV 感染的犬血清。
- 5.1.1.4 酶结合物:HRP 标记的 SPA。
- 5.1.1.5 底物溶液:配制见第 A.8 章。
- 5.1.1.6 过氧化氢甲醇溶液:配制见第 A.9 章。
- 5.1.1.7 盐酸酒精溶液:配制见第 A.10 章。
- 5.1.1.8 胰蛋白酶溶液:配制见第 A.11 章。

#### 5.1.2 器材

- a) 普通光学显微镜;
- b) 微量加样器,容量 50  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ ;
- c) 石蜡切片机或冷冻切片机;
- d) 载玻片及盖玻片;
- e) 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱或水浴箱。

#### 5.1.3 样品

对疑似 ICHV 的病死犬或扑杀犬,立即采集肝、扁桃体等组织数小块,置冰瓶内立即送检。不能立即送检者,将组织块切成 1 cm $\times$ 1 cm 左右大小,置体积分数为 10%的福尔马林溶液中固定,保存,送检。

### 5.2 操作方法

- 5.2.1 新鲜组织按常规方法制备冰冻切片。冰冻切片风干后用丙酮固定 10 min~15 min;新鲜组织或固定组织按常规方法制备石蜡切片,常规脱蜡至 PBS(切片应用白胶或铬矾明胶做粘合剂,以防脱片)。
- 5.2.2 去内源酶:用过氧化氢甲醇溶液或盐酸酒精溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 20 min。
- 5.2.3 胰蛋白酶消化:室温下,用胰蛋白酶溶液消化处理 2 min,以便充分暴露抗原。
- 5.2.4 漂洗:PBS 漂洗三次,每次 5 min。
- 5.2.5 封闭:滴加体积分数为 5%的新生牛血清或 1:10 稀释的正常马血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中作用 30 min。
- 5.2.6 加适当稀释的标准阳性血清或标准阴性血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中作用 1 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中作用 30 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。
- 5.2.7 漂洗同 5.2.4。
- 5.2.8 加适当稀释的酶结合物,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒作用 1 h。
- 5.2.9 漂洗同 5.2.4。
- 5.2.10 底物显色:新鲜配制的底物溶液显色 5 min~10 min 后,用 PBS 漂洗两次,去离子水漂洗一次。
- 5.2.11 衬染:苏木素或甲基绿衬染细胞核或细胞质。
- 5.2.12 从 90%乙醇开始脱水、透明、封片、普通光学显微镜观察。

5.2.13 试验同时设阳性对照和阴性对照。

### 5.3 结果判定

阳性和阴性对照片本底清晰,背景无非特异着染,阳性对照组织细胞胞浆呈黄色至棕褐色着染,试验成立;被检组织细胞胞浆、偶见胞核呈黄色至棕褐色着染,即可判为 ICHV 抗原阳性。

## 6 综合判定

当在临床上怀疑有 ICHV 感染时,可根据实际情况在上述方法中选一种或两种方法进行确诊。对于未接种过 ICHV 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 ICHV 感染犬。对于接种过 ICHV 疫苗的犬,当病毒分离鉴定试验为阳性结果时,可最终判定为 ICHV 感染犬;当采用酶联免疫吸附试验检测血清抗体呈现阳性结果时,可判为 ICHV 抗体具有保护效价;呈现阴性结果时,可判为 ICHV 抗体未达到保护效价。

**附 录 A**  
(规范性附录)  
试剂的配制

**A. 1 DMEM(高糖)培养液**

A. 1.1 量取去离子水 950 mL,置于适宜的容器中。

A. 1.2 将 DMEM 粉剂 10 g 加于 30℃ 的去离子水中,边加边搅拌。

A. 1.3 每 1 000 mL 培养液加 3.7 g 碳酸氢钠。

A. 1.4 加去离子水至 1 000 mL,用 1 mol/L 氢氧化钠或盐酸将培养液 pH 值调至 pH6.9~7.0,盖紧容器瓶塞。

A. 1.5 立即用孔径 0.45 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌,4℃ 冰箱保存备用。

**A. 2 磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L pH7.4)**

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
磷酸二氢钾	0.2 g
十二水磷酸氢二钠	2.83 g
蒸馏水	加至 1 000 mL

**A. 3 洗涤液**

PBS	1 000 mL
吐温-20	0.5 mL

**A. 4 样品稀释液**

含体积分数为 10% 新生牛血清的洗涤液。

**A. 5 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH5.0)**

柠檬酸	3.26 g
十二水磷酸氢二钠	12.9 g
蒸馏水	700 mL

**A. 6 ELISA 底物溶液**

用二甲基亚砜将 3'3'5'5'-四甲基联苯胺(TMB)配成 1% 浓度,4℃ 保存。使用时按下列配方配制底物溶液。

磷酸盐-柠檬酸缓冲液	9.9 mL
1%3'3'5'5'-四甲基联苯胺	0.1 mL
30% 双氧水	1 μL

**A. 7 终止液(2 mol/L 硫酸)**

硫酸	58 mL
蒸馏水	442 mL

**A. 8 免疫酶组织化学底物溶液**

3,3-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)	40 mg
PBS	100 mL
丙酮	5 mL
30%过氧化氢	0.1 mL

滤纸过滤后使用,现用现配。

**A. 9 过氧化氢甲醇溶液(0.3%)**

30%过氧化氢	1 mL
甲醇	99 mL

现用现配。

**A. 10 盐酸酒精溶液(1%)**

盐酸	1 mL
70%乙醇	99 mL

**A. 11 胰蛋白酶溶液(0.5%)**

胰蛋白酶	0.5 g
PBS	100 mL

低温保存。使用时,用 PBS 稀释为 0.05%。

---