



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 27532—2011

---

## 犬瘟热诊断技术

Diagnostic techniques for canine distemper

2011-11-21 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:青岛农业大学动物科技学院、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:单虎、黄娟、熊炜、温建新、秦晓冰、朱来华、宫文妮、袁小远、孙园园、马晶。

# 犬瘟热诊断技术

## 1 范围

本标准规定了犬瘟热的临床诊断、犬瘟热病毒的病原分离、免疫酶检测、免疫组织化学检测、RT-PCR 检测的操作方法。

本标准适用于犬瘟热的鉴定及其流行病学调查、诊断和监测。其中病毒分离、免疫酶检测、免疫组织化学检测、RT-PCR 检测适用于犬瘟热的病原诊断。

## 2 试剂和材料

- 2.1 改良最低要素营养液(DMEM)培养基:配方参见附录 A。
- 2.2 非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞)。
- 2.3 磷酸盐缓冲液(PBS):配制参见附录 A。
- 2.4 青霉素、链霉素:配方参见附录 A。
- 2.5 CDV 阳性血清:中和抗体效价 1 : 1 024。
- 2.6 CDV 阴性血清:无 CDV 感染的犬血清。
- 2.7 酶结合物:HRP 标记的葡萄球菌 A 蛋白(SPA)。
- 2.8 底物溶液:配制参见附录 A。
- 2.9 过氧化氢甲醇溶液:配制参见附录 A。
- 2.10 盐酸酒精溶液:配制参见附录 A。
- 2.11 胰蛋白酶溶液:配制参见附录 A。
- 2.12 Taq 酶及 10 倍 Taq 酶反应缓冲液:Taq 酶浓度为 5 U/ $\mu$ L, -20 °C 保存。
- 2.13 逆转录酶及 10 倍逆转录酶反应缓冲液:逆转录酶浓度为 50 U/ $\mu$ L, -20 °C 保存。
- 2.14 RNA 酶抑制剂(40 U/ $\mu$ L): -20 °C 保存。
- 2.15 dNTP:含 dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 10 mmol/L, -20 °C 保存。
- 2.16 引物:浓度为 20  $\mu$ 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'。
- 2.17 随机引物:含有 9 个碱基的随机序列引物,浓度为 50  $\mu$ mol/L, -20 °C 保存。
- 2.18 DEPC 水:自配(参见附录 A),或购买商品化 DEPC 水。
- 2.19 Trizol 试剂:4 °C 保存。
- 2.20 异丙醇:使用前预冷至 -20 °C。
- 2.21 75%乙醇:用新开启的无水乙醇和 DEPC 水配制,使用前预冷至 -20 °C。
- 2.22 1.5 mL 无 RNA 酶的 Eppendorf 管。
- 2.23 0.2 mL 无 RNA 酶的 PCR 薄壁管。

## 3 器材和设备

- 3.1 细胞培养瓶(中号瓶)。
- 3.2 二氧化碳培养箱。
- 3.3 恒温水浴箱(5 °C ~ 100 °C)。
- 3.4 普通光学显微镜。

- 3.5 0.45 μm 微孔滤膜。
- 3.6 离心机。
- 3.7 PCR 扩增仪。
- 3.8 水平电泳仪。
- 3.9 40 个小孔的室玻片。
- 3.10 冷冻切片机。
- 3.11 高速台式冷冻离心机,可控温至 4 ℃、离心速度可达 12 000g 以上。
- 3.12 凝胶成像系统。

## 4 临床检查

### 4.1 临床症状

- 4.1.1 病犬体温升高至 40 ℃以上,鼻流清涕至脓性鼻汁,脓性眼屎,有咳嗽、呼吸急促等肺炎症状。
- 4.1.2 腹下可见米粒大丘疹。
- 4.1.3 病后期 CDV 侵害大脑时则出现神经症状,头、颈、四肢抽搐。

### 4.2 病理变化

- 4.2.1 新生幼犬感染 CDV 表现胸腺萎缩;成年犬多表现结膜炎、鼻炎、气管支气管炎和卡他性肠炎。
- 4.2.2 表现神经症状的犬可见鼻和脚垫的皮肤角化病。
- 4.2.3 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。
- 4.2.4 犬瘟热病毒的包涵体呈嗜酸性,位于胞浆内,直径 1 μm~5 μm,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发现,核内包涵体多位于被覆上皮细胞、腺上皮细胞和神经节细胞。

### 4.3 判定

若临床症状符合 4.1.1 或 4.1.3 且出现 4.2.4 的病理变化,则可判定疑似犬瘟热,其他临床症状和病理变化可作为参考指标;疑似病例可采用病毒分离、免疫酶检测、免疫组织化学检测和 RT-PCR 检测等方法确诊。

## 5 病毒分离

### 5.1 样品采集和处理

- 5.1.1 活犬可采集泪液、鼻液、唾液、粪便,病死犬可采集肝、脾、肺等组织器官。
- 5.1.2 上述样品用无血清 DMEM 制成 20% 组织悬液,10 000 r/min 离心 20 min,取上清液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液用于 CDV 分离。

### 5.2 操作方法

#### 5.2.1 细胞培养

用含 8% 新生牛血清的 DMEM 培养基在细胞培养瓶(中号瓶)培养 Vero 细胞,置 37 ℃ 二氧化碳培养箱,单层细胞长至 80%~90% 时,接种样品上清。

#### 5.2.2 病料接种

取 0.1 mL 处理好的样品上清接种 Vero 细胞,置 37 ℃ 二氧化碳培养箱吸附 1 h,加入无血清 DMEM 继续培养 5 d~7 d,观察结果。

### 5.3 结果判定

若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 CDV 病原分离阴性。若 Vero 细胞培养 4 d~5 d 出现细胞病变(如细胞变圆、胞浆内颗粒变性和空泡形成,随后形成合胞体,并在胞浆中出现包涵体),可用免疫酶检测、免疫组织化学检测和 RT-PCR 三种方法之一进行确诊。

## 6 免疫酶检测

### 6.1 操作方法

6.1.1 将 CDV 标准株和待鉴定的样品分别接种 Vero 细胞,接种后 5 d~7 d,病变达 50%~75%时,用胰蛋白酶消化分散感染细胞,PBS 液洗涤 3 次后,稀释至  $1 \times 10^5$  个/mL 细胞。取有 40 个小孔的室玻片,每孔滴加 10  $\mu$ L。室温自然干燥后,冷丙酮(4  $^{\circ}$ C)固定 10 min。密封包装,置 -20  $^{\circ}$ C 备用。

6.1.2 取出室玻片,室温干燥后,每份 10 倍稀释的 CDV 阳性血清和阴性血清,每份血清滴加到两个病毒细胞孔和一个正常细胞孔,置湿盒内,置恒温水浴箱 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

6.1.3 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,室温干燥。

6.1.4 滴加 1:100 稀释的酶结合物,置湿盒内,用恒温水浴箱 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

6.1.5 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。

6.1.6 将室玻片放入底物溶液中,室温下显色 5 min~10 min。PBS 漂洗 2 次,再用蒸馏水漂洗 1 次。

6.1.7 吹干后,在普通光学显微镜下观察,判定结果。

### 6.2 结果判定

6.2.1 若 CDV 阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均无色,且 CDV 阳性血清与正常细胞反应无色,与 CDV 标准毒株感染细胞反应呈棕黄色或棕褐色,则判定阴、阳性对照成立。

6.2.2 在符合 6.2.1 的条件下,待鉴定病毒感染细胞与 CDV 阳性血清和阴性血清反应均呈无色,判为 CDV 阴性,相应动物犬瘟热感染阴性。

6.2.3 在符合 6.2.1 的条件下,待鉴定病毒感染细胞与阴性血清反应呈无色,而与 CDV 阳性血清反应呈棕黄色或棕褐色,判为 CDV 阳性,相应动物犬瘟热感染阳性。

## 7 免疫组织化学检测

### 7.1 样品处理

对疑似 CD 的病死犬或扑杀犬,立即采集肺、脾、胸腺、淋巴结和脑等组织,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。

### 7.2 操作方法

7.2.1 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(切片应用白胶或铬矾明胶做粘合剂,以防脱)。

7.2.2 去内源酶:用过氧化氢甲醇溶液或盐酸酒精溶液 37  $^{\circ}$ C 作用 20 min。

7.2.3 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。

7.2.4 漂洗:PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。

7.2.5 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  $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 30 min。

7.2.6 加 10 倍稀释的 CDV 阳性血清或阴性血清,37  $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 1 h 或 37  $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 30 min 后 4  $^{\circ}$ C 过夜。

7.2.7 漂洗:PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。

7.2.8 加 1:100 稀释的酶结合物,37  $^{\circ}$ C 湿盒孵育 1 h。

7.2.9 漂洗:PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。

7.2.10 底物显色:新鲜配制的底物溶液显色 5 min~10 min 后漂洗。

7.2.11 从 90% 乙醇开始脱水、透明、封片、普通光学显微镜观察。

7.2.12 试验同时设阳性、阴性血清对照。

### 7.3 结果判定

7.3.1 被检组织与阴性血清作用后应无着染,若出现黄色或棕褐色着染,判定阴性对照不成立,应重复实验。

7.3.2 在符合 7.3.1 的条件下,被检组织与 CDV 阳性血清作用后本底清晰,细胞浆内呈现黄色或棕褐色着染,判为 CDV 阳性,相应动物犬瘟热感染阳性。

## 8 RT-PCR 检测

### 8.1 病料的采集及处理

采集的样品包括犬的泪液、鼻液、唾液、粪便及病死犬的肝、脾、肺等组织器官。将待检组织或粪便样品加等体积生理盐水研磨匀浆,3 000g 离心 15 min,收集上清液待检。口腔拭子、粪拭子用少量生理盐水浸润后,取上清液待检。经细胞病原分离培养的样品,收集细胞沉淀待检。CDV 阳性对照样品和阴性对照样品的同样处理。

### 8.2 RNA 抽提

分别取 100  $\mu$ L 待检样品、CDV 阳性样品和阴性样品的上清液各装入 1.5 mL 无 RNA 酶的 Eppendorf 管,加入 1 mL Trizol 试剂,用枪头充分吹打 20 次~30 次;13 000g 离心 15 min;取上层水相,加 500  $\mu$ L 异丙醇,颠倒数次混匀,-20  $^{\circ}$ C 放置 20 min;13 000g 离心 10 min;弃上清,沉淀用 1 mL DEPC 水配制的 75%乙醇清洗;8 000g 离心 10 min;弃上清,沉淀室温干燥 10 min;加 20  $\mu$ L DEPC 水溶解 RNA 沉淀。RNA 溶液在 2 h 内进行逆转录合成 cDNA 模板。另外,RNA 抽提也可采用市售的商品化 RNA 抽提试剂盒进行。

### 8.3 cDNA 模板制备

取 17  $\mu$ L RNA 溶液,加 10 倍逆转录酶浓缩缓冲液 2.5  $\mu$ L、dNTP 1.5  $\mu$ L、随机引物 2  $\mu$ L、RNA 酶抑制剂 1  $\mu$ L、逆转录酶 1  $\mu$ L,室温放置 10 min 后,置 PCR 仪上经 42  $^{\circ}$ C、60 min,70  $^{\circ}$ C、10 min。

### 8.4 PCR 检测

在 0.2 mL PCR 薄壁管中,按每个样品 10 倍 Taq 酶浓缩缓冲液 2.5  $\mu$ L、dNTP 0.5  $\mu$ L、Taq 酶 0.5  $\mu$ L、cDNA 模板 2  $\mu$ L、上游引物和下游引物(CDVF、CDVR)各 0.5  $\mu$ L、三蒸水 18.5  $\mu$ L,配制 PCR 检测体系。将 PCR 管置 PCR 仪上按如下程序扩增:首先 94  $^{\circ}$ C 变性 2 min;再 94  $^{\circ}$ C、30 s,55  $^{\circ}$ C、30 s,72  $^{\circ}$ C、40 s 进行 35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C、3 min。用 TBE 电泳缓冲液配制 1.5%的琼脂糖平板(含 0.5  $\mu$ g/mL EB,参见附录 A 中 A.11,将平板放入水平电泳仪,使电泳缓冲液刚好没过胶面,将 10  $\mu$ L PCR 产物和 2  $\mu$ L 加样缓冲液(6 $\times$ )混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照。5 V/cm 电泳约 30 min,当溴酚蓝到达底部时停止,用凝胶成像系统观察结果。

### 8.5 结果判定

8.5.1 经 RT-PCR 检测,CDV 阳性对照样品可扩增出大小为 455 bp 的核酸片段,且阴性对照样品无扩增条带,否则试验结果视为无效。

8.5.2 在符合 8.5.1 的条件下,若待检样品扩增出了大小为 455 bp 的核酸片段,则初步判定犬瘟热病毒核酸阳性;若待检样品无扩增条带或扩增条带大小不为 455 bp,则判定犬瘟热病毒核酸阴性。

8.5.3 待检样品扩增出的阳性基因片段应进行核酸序列测定,若其序列与提供的比对序列的同源性  $\geq 90\%$ ,则可确诊为犬瘟热病毒核酸阳性,否则判定犬瘟热病毒核酸阴性。

8.5.4 若犬瘟热病毒核酸阳性且病原分离也呈阳性,则可判定犬瘟热病毒感染阳性。

**附录 A**  
(资料性附录)  
**试剂及其配制**

**A.1 DMEM(高糖)培养液的配制**

量取去离子水 950 mL,置于适宜的容器中。将 DMEM 粉剂 10 g 加于 30 ℃ 的去离子水中,边加边搅拌。每 1 000 mL 培养液加 3.7 g 碳酸氢钠。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 6.9~7.0。在过滤之前应盖紧容器瓶塞。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 青霉素、链霉素**

取注射用青霉素和链霉素溶解于三蒸水中,使每毫升含青霉素、链霉素各 5 万单位(μg),除菌过滤,用时按 1 00 mL 1640-15 培养液加 0.2 mL,使青霉素、链霉素的最终浓度各为 100 单位(μg)。

**A.4 底物溶液**

3,3'-二胺基联苯胺盐酸盐(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.5 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.6 盐酸酒精溶液(1%)**

盐酸	1 mL
70%乙醇	99 mL

**A.7 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%。

**A.8 DEPC 溶液(0.1%)**

DEPC	1 mL
蒸馏水	加至 1 000 mL

磁力搅拌至溶解,高压灭菌 121 °C,30 min 后 4 °C 冰箱保存备用。

**A.9 生理盐水**

称取 9 g 无水氯化钠溶于 1 000 mL 去离子水中配成 0.9%生理盐水,121.3 °C 灭菌 15 min。

**A.10 5×TBE 电泳缓冲液**

每升三蒸水中加入三羟甲基氨基甲烷(Tris)54.0 g,乙二胺四乙酸(EDTA)2.9 mg,硼酸 27.5 g,用 5 mol/L 的盐酸调 pH 值至 8.0。

**A.11 EB 核酸染色剂**

在 10 mL 三蒸水中加入 100 mg 溴化乙锭(EB)配制成 10 mg/mL 的浓缩液。

**A.12 加样缓冲液(6×)**

每 100 mL 三蒸水中加入溴酚蓝 0.25 g 和蔗糖 40 g。



附 录 B

(资料性附录)

犬瘟热病毒 RT-PCR 扩增核酸片段参考序列

cgagtctttg agatagggtt catcaaacgg tggctgaatg acatgccatt  
actccagaca accaactata tggctctccc ggagaattct aaagctgagg  
tgtgtactat agcagtgggc gagctgacac tggcttcctt gtgtgtagat  
gagagcaccg tattattata tcatgacagc aatgggccac atgacagtgt  
tctagtagtg acgctgggaa tatttggggc aacaccgatg aatcaagtag  
aagaggtgat acctgtcgct catccatcag tagaaaagat acatatcaca  
aatcaccgtg gtttcataaa agattcagta gcaacctgga tggcctctgc  
attggtctct gagcaacaag aaggacaaaa aaattgtctg gattcggtt  
gtcaaagaaa atcctaccct atgtgcaacc aaacatcatg ggaaccctt  
ggagg

---