



中华人民共和国国家标准

GB/T 22332—2008

鸭病毒性肠炎诊断技术

Diagnostic techniques for duck virus enteritis

2008-08-22 发布

2008-12-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准部分技术采用 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2004)推荐的试验方法,并把具体操作程序予以细化。

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归口。

本标准起草单位:华南农业大学、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:郭霄峰、廖明、洪洁心。

鸭病毒性肠炎诊断技术

1 范围

本标准规定了鸭病毒性肠炎病毒(DVEV)分离和鉴定及聚合酶链式反应(PCR)试验的诊断技术要求。

本标准适用于鸭病毒性肠炎的诊断。

2 临床症状和病理变化

家养的鸭和雏鸭从7日龄至成年均可感染发病。在易感鸭群,初始症状通常为突发持续性高死亡现象,产蛋量明显下降。由于感染毒的毒种、年龄、性别以及病毒毒力的不同,暴发鸭病毒性肠炎(DVE)后临床症状、剖检病变有很大的差异。种鸭的临床症状为流泪、怕光、烦躁、缺乏食欲、共济失调、水样腹泻和流鼻涕。通常病鸭羽毛蓬乱,肛门粘有秽物。病鸭借助翅膀支撑方能保持平衡,整个外观虚弱、精神沉郁。但2周~7周龄鸭中损失比成鸭低,其症状为脱水、体重下降,喙呈蓝色,肛门染有血迹。

剖检时发现,死亡的鸭并不消瘦。性成熟的公鸭的阴茎可能脱垂。性成熟母鸭的卵巢滤泡出血。特征性大体病变为血管受损,带有组织出血和体腔游离血液。消化道粘膜表面有环状出血和白喉样损坏,淋巴样器官萎缩,实质器官呈退行性病变为特征。国内北京鸭的特征性病变是血管及内脏器官损伤,消化道上皮细胞出现嗜酸性核内包涵体和胞浆内包涵体。

3 病毒分离

3.1 材料准备

3.1.1 病料的采集:一般应在感染初期或发病急性期从濒死期禽或活禽采取。濒死期禽采集肝、脾、脑等组织样品。活禽用无菌的棉拭子涂拭泄殖腔。带有分泌物的棉拭子放入每毫升含有1 000 IU青霉素,1 000 μg链霉素,0.1%~0.2%的磷酸盐缓冲液(PBS)中。送检病料应置于50%的甘油生理盐水中。

3.1.2 病料的保存:采集的病料若在48 h内处理,可于4℃保存;否则应放-20℃以下保存(-70℃贮存最好)。

3.1.3 病料的处理:将棉拭子充分捻动、捻干后除去拭子。样品液经3 000 r/min 4℃离心30 min,取上清液作为接种材料。组织样品先用pH7.2~7.6的PBS制成5倍~10倍乳剂,3 000 r/min 4℃离心30 min,取上清液作为接种材料。为防止细菌污染,可在样品液中加入青霉素(1 000 IU/mL),链霉素(1 000 μg/mL),卡那霉素(1 000 μg/mL),37℃温箱中作用30 min。进行无菌检验。

3.1.4 鸭胚:10日~11日龄的非DVE疫苗免疫鸭胚。

3.2 实验操作

3.2.1 胚胎接种:取经处理并且无菌检验合格的样品,以0.2 mL/胚的量经绒毛尿囊膜接种10日~11日龄的非DVE疫苗免疫的鸭胚,每个样品接种4个~5个胚,于38℃~38.5℃恒温箱中孵育。72 h前每天照胚1次~2次,以后每天照胚5次。弃去72 h前死亡的胚胎,冻存72 h~120 h内的死胚或活胚。

3.2.2 病毒收获:无菌收取72 h~120 h内的死胚或活胚的绒毛尿囊膜和尿囊液,-20℃保存备用。

3.2.3 如第一代分离结果为阴性,需盲传三代。

4 PCR

4.1 引物

P1:GAG CGT ATT TAG TAG AAA CTG C(上游)

P2:TGA ATG TTG TGA TTG TTC(下游)

4.2 病毒核酸的抽提

4.2.1 组织样品用 pH7.2~7.6 的 PBS 制成 5 倍~10 倍乳剂,3 000 r/min 4 °C 离心 30 min,上清液作为待检材料。

4.2.2 取一支 1.5 mL 的指形管,加入 400 μ L 待检胚液或 4.2.1 上清液和 30 μ L(20 mg/mL)核糖核酸酶,混匀后,室温下作用 20 min。

4.2.3 加 43 μ L 10% 的十二烷基磺酸钠溶液和 5 μ L(10 mg/mL)蛋白酶 K,42 °C 水浴温育过夜。

4.2.4 加等量的 Tris-盐酸饱和酚(pH7.6),充分混匀,12 000 r/min 离心 5 min,小心吸出上层水相于另一个指形管中。

4.2.5 加等量的酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1),充分混匀,12 000 r/min 离心 5 min,小心吸出上层水相于另一个指形管中。

4.2.6 加 1/10 体积 3 mol/L 的乙酸钠(pH5.4),2.5 倍体积预冷的无水乙醇,15 000 r/min 离心 20 min,弃去乙醇,沉淀用 75% 的乙醇洗涤一次,真空干燥。用 20 μ L 灭菌双蒸水溶解沉淀,-20 °C 保存备用。

4.3 操作程序

取一支 0.5 mL 的指形管,依次加入下列试剂:2.5 μ L 10 \times 的 PCR 缓冲液,1.0 μ L 上游引物,1.0 μ L 下游引物,0.5 μ L dNTP,1.0 μ L 病毒核酸,18.5 μ L 灭菌双蒸水,0.5 μ L *Taq* DNA 酶。于 PCR 仪中运行:94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,25 个循环,72 °C 8 min。同时设立阳性和阴性对照。

4.4 PCR 产物的检测

反应结束后,PCR 产物于 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳,每个样品的加样量为 5 μ L~10 μ L,同时以 100 bp DNA 分子质量标准物为参照。50 V 恒压电泳 40 min,于紫外灯下观察。

4.5 结果的判定

阳性对照在 416 bp 处有一条特异的 DNA 条带,阴性对照没有目的带,证明本实验成立。待检样品在相同位置有 DNA 带,判为阳性,否则为阴性。