

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 27533—2011

GB/T 27533—2011

犬细小病毒病诊断技术

Diagnostic techniques for canine parvovirus disease

中华人民共和国
国家标准
犬细小病毒病诊断技术
GB/T 27533—2011

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2012年1月第一版 2012年1月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44043 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 27533-2011

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。

本标准主要起草人:单虎、温建新、熊炜、黄娟、秦晓冰、于鹏程。

附 录 A
(资料性附录)
试剂及其配制

A.1 0.9%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.2 1%猪红细胞液

1 mL 新鲜肝素抗凝猪血加入 9 mL 灭菌生理盐水制备而成。制备好后最好立即使用。暂时不用可放置 4 °C 冰箱保存。

A.3 CPV 细胞培养液

CPV 接种 FK81 细胞,培养 3 d~5 d,当病变达 60%~80%时收获。冻融三次或超声波处理后,低速离心去除细胞碎片,上清液分装后低温保存。

A.4 10%十二烷基硫酸钠(SDS)

在 90 mL 三蒸水中溶解 10 g 十二烷基硫酸钠(电泳级),加热至 60 °C 助溶,用盐酸调 pH 值至 7.8,加三蒸水定容至 100 mL。

A.5 蛋白酶 K 贮备液(20 mg/mL)

每升三蒸水中加入三羟甲基氨基甲烷(Tris)1.21 mg,乙二胺四乙酸(EDTA)1.86 mg,十二烷基硫酸钠(SDS)5 g,用盐酸调 pH 值至 7.8。取该溶液按每毫升加入 20 mg 蛋白酶 K,充分溶解后分装。

A.6 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.7 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.8 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。

犬细小病毒病诊断技术

1 范围

本标准规定了犬细小病毒病的临床检查、血凝与血凝抑制试验、PCR 检测的操作方法。

本标准适用于犬细小病毒病的鉴定及其流行病学调查、诊断和监测。其中病毒分离、血凝与血凝抑制试验、PCR 检测适用于犬细小病毒病的病原诊断。

2 试剂和材料

- 2.1 FK81 细胞(猫肾细胞)。
- 2.2 0.9%生理盐水:配制参见附录 A 中 A.1。
- 2.3 1%猪红细胞液:配制参见附录 A 中 A.2。
- 2.4 犬细小病毒阳性血清。
- 2.5 96 孔“v”形微量反应板。
- 2.6 Taq 酶及 10 倍 Taq 酶反应缓冲液:Taq 酶浓度为 5 U/ μ L, -20 °C 保存。
- 2.7 1.5 mL Eppendorf 管。
- 2.8 0.2 mL PCR 薄壁管。
- 2.9 dNTP:含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L, -20 °C 保存。
- 2.10 引物:浓度为 20 μ mol/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'。
- 2.11 10%十二烷基硫酸钠:配制参见附录 A。
- 2.12 蛋白酶 K 贮备液:配制参见附录 A 中 A.4。
- 2.13 5×TBE 电泳缓冲液:配制参见附录 A 中 A.6。

3 器材和设备

- 3.1 PCR 仪。
- 3.2 高速台式冷冻离心机:可控温至 4 °C、离心速度可达 12 000g 以上。
- 3.3 水平电泳仪。
- 3.4 凝胶成像系统。

4 临床检查

4.1 临床特征

- 4.1.1 潜伏期 1 周到 2 周,病初无任何症状,食欲减退或废绝,体温 40 °C 以上,粉红色黏稠血样物。
- 4.1.2 病犬先出现呕吐,呕吐出白色泡沫或黄色液体,继而腹泻,粪便稀薄而恶臭,剧烈的腹泻呈喷射状,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。
- 4.1.3 患犬迅速消瘦,倦卧不起,目光呆滞,眼窝下陷,腹围紧缩,机体脱水,皮肤干燥、弹性降低。

4.2 病理变化

- 4.2.1 心脏肿大呈灰黄色,切面外翻,质地松软,心肌有出血性斑纹。
- 4.2.2 肝脏肿大,包膜紧张,多呈黄褐色,质地松软有局灶性坏死,断面有豆蔻状花纹。
- 4.2.3 胃空虚,黏膜轻度潮红,附有大量黏液;小肠壁增厚,肠管变粗,肠腔狭窄,形成厚层黏膜皱褶,易