

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 554—2023

代替 NY/T 554—2002

鸭甲型病毒性肝炎1型和3型诊断技术

Diagnostic techniques for duck A viral hepatitis 1 and 3

2023-02-17 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



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 NY/T 554—2002《鸭病毒性肝炎诊断技术》，与 NY/T 554—2002 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了临床症状和病理变化(见第 5 章)；
- b) 增加了病毒的分离(见第 6 章)；
- c) 增加了 DHAV-1 和 DHAV-3 RT-PCR(见第 7 章)；
- d) 增加了 DHAV-1 和 DHAV-3 RT-qPCR(见第 8 章)；
- e) 增加了 DHAV-1 病毒中和试验(见第 9 章)；
- f) 增加了 DHAV-1 血清中和试验(见第 9 章)；
- g) 增加了 DHAV-1 和 DHAV-3 抗体的胚胎中和试验(见第 10 章)；
- h) 删除了雏鸭接种/保护试验(见 2002 年版的第 2 章)；
- i) 删除了鸭(鸡)胚接种/中和试验(见 2002 年版的第 3 章)。

本文件推荐的临床症状和病理变化、病毒分离、RT-PCR、RT-qPCR、病毒中和试验、血清中和试验方法与 WOAHP 推荐的相应方法基本一致。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

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：华南农业大学、中国农业大学、山东省滨州畜牧兽医研究院。

本文件主要起草人：郭霄峰、罗均、张大丙、王笑言、沈志强、王文秀、王金良。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2002 首次发布为 NY/T 554—2002；

——本次为第一次修订。



鸭甲型病毒性肝炎 1 型和 3 型诊断技术

1 范围

本文件规定了鸭甲肝病毒 1 型和 3 型在鸭胚中的分离、RT-PCR 鉴定、RT-qPCR 鉴定；鸭甲肝病毒 1 型的微量中和试验鉴定、抗体的微量中和试验检测和胚胎中和试验方法；鸭甲肝病毒 3 抗体的胚胎中和试验方法。

本文件适用于鸭甲型病毒性肝炎 1 型和 3 型的诊断与检疫。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

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。

DHAV:鸭甲肝病毒(Duck Hepatitis A Virus)

DEF:鸭胚成纤维细胞 (Duck Embryo Fibroblasts)

DEL:鸭胚肝细胞 (Duck Embryo Liver Cells)

DEEC:鸭胚上皮细胞 (Duck Embryo Epithelial Cells)

CPE:细胞病变 (Cytopathic Effect)

DMEM:杜氏改良伊格尔培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

TCID₅₀:半数细胞培养感染量 (Median Tissue Culture Infective Dose)

W/V:重量体积比 (Weight/Volume)

RT-PCR:反转录-聚合酶链反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

PBS:磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Saline)

RT-qPCR:荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR)

5 临床诊断

5.1 临床症状

5.1.1 该病主要发生于 3 周龄以内的雏鸭,并且以 1 周龄内的雏鸭为主。感染鸭发病急、传播快、病死率高。

5.1.2 发病初期,病鸭精神萎靡,食欲减退或废绝,眼半闭呈昏睡状,头触地;12 h~24 h 后,病鸭出现神经症状,表现为运动失调、身体倒向一侧、两脚痉挛,死前头向背部扭曲,两腿伸直、向后张开,呈典型的角弓反张状。

5.1.3 最急性病鸭常未见任何异常而突然抽搐痉挛死亡。

5.2 病理变化

5.2.1 大体病变主要为肝脏肿大、质地易脆,表面呈黄红色或花斑状,并有特征性的点状出血或刷状出血。

5.2.2 多数病例可见胆囊肿胀、胆汁充盈,部分病例脾脏肿大。

5.2.3 急性病例的组织学病变表现为肝细胞坏死、变性和淋巴细胞浸润,慢性病例或耐过鸭常见不同程

度的空泡变性和淋巴细胞聚集。

5.3 结果判定

凡具有 5.1 临床症状和 5.2 病理变化的病鸭,初步判定为疑似鸭病毒性肝炎。

6 病毒分离

6.1 仪器设备

6.1.1 冷冻台式离心机。

6.1.2 照蛋器。

6.1.3 恒温培养箱。

6.1.4 1 mL 注射器及针头。

6.1.5 手术剪。

6.1.6 镊子。

6.1.7 研钵。

6.2 耗材

0.22 μm 细菌滤器。

6.3 试剂

6.3.1 青霉素。

6.3.2 链霉素。

6.3.3 卡那霉素。

6.3.4 PBS 溶液,按照附录 A 的规定配制。

6.3.5 50%甘油生理盐水。

6.4 胚胎

10 日龄~12 日龄 DHAV-1 或 DHAV-3 抗体阴性鸭胚。

6.5 样品采集

6.5.1 采集感染初期或发病急性期病鸭的肝脏。

6.5.2 送检病料置于灭菌的 50%甘油生理盐水中。

6.6 样品保存

6.6.1 采集的样品若在 48 h 内处理,可于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

6.6.2 或尽快置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存(-70 $^{\circ}\text{C}$ 储存最好)。

6.7 样品处理

6.7.1 组织样品于研钵中研磨后加入 5 倍~10 倍 pH 7.2~7.4 的 PBS 溶液,制成组织悬浮液。然后 3 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min,取上清液作为接种材料。

6.7.2 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 $\mu\text{g/mL}$ 和卡那霉素 1 000 $\mu\text{g/mL}$,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中作用 30 min。或采用 0.22 μm 细菌滤器对上述病料样品液作滤过除菌。

6.7.3 对处理的样品作无菌检验。

6.8 鸭胚接种

6.8.1 取已处理并且无菌检验合格的样品,经尿囊腔接种 10 日龄~12 日龄的非免疫鸭胚,每枚鸭胚接种 0.2 mL 病毒液,每个样品接种 4 枚~5 枚鸭胚。将已接种病毒的鸭胚置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育。

6.8.2 弃去接种后 24 h 内死亡的鸭胚。对 24 h 内未死亡的鸭胚,每间隔 6 h 观察胚胎的死亡情况。收集 24 h~96 h 死亡鸭胚,放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置 4 h~12 h,待鸭胚血管收缩,进行鸭胚剖检。

6.9 胚胎病变

胚胎大体病变为发育迟滞、全身皮下出血、腹部和后肢水肿。胚肝呈黄红色、肿胀,并可能有坏死灶。

6.10 病毒收获

无菌收取 24 h~96 h 内的死胚或活胚的尿囊液和肝脏, -20 ℃ 保存备用。

7 RT-PCR 检测

7.1 仪器

7.1.1 冷冻离心机。

7.1.2 凝胶成像系统。

7.1.3 PCR 仪。

7.2 耗材

7.2.1 RNase-Free 离心管。

7.2.2 0.2 mL 的指形管。

7.2.3 1.5 mL 的指形管。

7.3 试剂

7.3.1 DHAV-1 上下游引物。

7.3.2 DHAV-3 上下游引物。

7.3.3 RNA 抽提试剂盒。

7.3.4 逆转录酶。

7.3.5 dNTPs。

7.3.6 *Taq* DNA 酶。

7.3.7 琼脂糖。

7.3.8 1 000 bp DNA Ladder。

7.3.9 PBS 溶液,按照附录 A 中 A.1 的规定配制。

7.3.10 氯仿。

7.3.11 70% 的乙醇。

7.3.12 RNase-Free ddH₂O。

7.3.13 阳性核酸对照。

7.3.14 阴性核酸对照。

7.4 DHAV 的检测

7.4.1 引物

DHAV-1 F: AAG AAG GAG AAA ATY(C 或 T) AAG GAA GG;

DHAV-1 R: TTG ATG TCA TAG CCC AAS(C 或 G) ACA GC;

扩增 3D 基因片段,长度为 467 bp。

DHAV-3 F: TGG CTA TTG ACT TTG GCT T;

DHAV-3 R: TGT TAT GGA CTG GAA CCA CT;

扩增 5'UTR 区域,扩增长度为 292 bp。

7.4.2 病料的处理

以无菌术式收集病鸭的肝脏,或胚胎的肝脏、尿囊液。肝脏样品在组织研磨器中研磨成乳糜状,加 PBS 制成 10%(W/V)悬浮液。肝脏悬浮液或尿囊液经 12 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min,取上清液备用。

7.4.3 病毒核酸的抽提

7.4.3.1 用 RNA 抽提试剂盒提取病毒的 RNA。取 250 μL 尿囊液或肝组织研磨上清液于一新的 RNase-Free 离心管中,加入 750 μL 裂解液,剧烈振荡,室温下静置 5 min。

7.4.3.2 随后加 200 μL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温下放置 2 min。

7.4.3.3 12 000 r/min 4 ℃离心 15 min,取上清液于另一支离心管中。加入等体积的 70%乙醇,混匀。再将溶液转移到吸附柱中。

7.4.3.4 12 000 r/min 4 ℃离心 60 s,弃掉滤液(溶液较多的情况下,可多次进行)。向吸附柱中加入 350 μ L 去蛋白溶液,12 000 r/min 4 ℃离心 60 s,弃掉滤液。

7.4.3.5 向吸附柱中加入 500 μ L 漂洗液,静置 2 min。12 000 r/min 4 ℃离心 60 s,弃掉滤液(重复 1 次)。

7.4.3.6 12 000 r/min 4 ℃离心 2 min,弃掉滤液,室温静置数分钟,以彻底晾干漂洗液。

7.4.3.7 将吸附柱转移到一个新的 RNase-Free 离心管中,加入 30 μ L~50 μ L RNase-Free ddH₂O,静置 2 min。

7.4.3.8 12 000 r/min 4 ℃离心 2 min,收集含 RNA 的滤液。获得的 RNA 溶液保存于-20 ℃或者直接用于 RT-PCR。

7.4.4 RT-PCR 扩增

7.4.4.1 一步法 RT-PCR。取 2 支 0.2 mL 的指形管,一管加入 DHAV-1 上下游引物(DHAV-1 F 和 DHAV-1 R)各 10 pmol,另一管加入 DHAV-3 上下游引物(DHAV-3 F 和 DHAV-3 R)各 10 pmol。随后分别在两管中依次加入下列试剂,总体积为 20 μ L:

- a) 模板,提取样品的总 RNA 5 μ L;
- b) 逆转录酶,1 μ L;
- c) 10 mmol/L dNTPs,2 μ L;
- d) *Taq* DNA 酶,2 μ L;
- e) 10 \times RT-PCR 缓冲液,2 μ L;
- f) RNase-Free ddH₂O 至 20 μ L。

7.4.4.2 于 PCR 仪中扩增:45 ℃反转录 30 min;94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 20 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共进行 40 个循环;72 ℃再延伸 5 min。同时,设立 DHAV-1 和 DHAV-3 阳性以及阴性对照。

7.4.4.3 反应结束后电泳检测。

7.4.5 PCR 产物的电泳检测

反应结束后,取 5 μ L~10 μ L PCR 产物于 1.2%~1.5%的琼脂糖凝胶中电泳,同时以 1 000 bp DNA Ladder 为参照。电泳条件为 50 V 恒压、电泳 40 min。电泳结束后,将凝胶于紫外灯下观察。

7.4.6 结果判定

7.4.6.1 DHAV-1 阳性对照在 467 bp 处有一条特异的 DNA 条带,或者 DHAV-3 阳性对照在 292 bp 处有一条特异性条带,阴性对照没有目的带,判定试验成立。

7.4.6.2 待检样品在 467 bp 位置有 DNA 带,判定为 DHAV-1 阳性,否则为阴性。

7.4.6.3 待检样品在 292 bp 位置处有条带,判定为 DHAV-3 阳性,否则为阴性。

7.4.6.4 如同一待检样品均可扩增出 467 bp 和 292 bp 的条带,阴性无条带,则判定为 DHAV-1 和 DHAV-3 混合感染。

8 RT-qPCR 检测

8.1 仪器

8.1.1 冷冻离心机。

8.1.2 恒温水浴箱。

8.1.3 荧光定量 PCR 仪。

8.2 耗材

8.2.1 RNase-Free 离心管。

8.2.2 0.2 mL 的指形管。

8.2.3 1.5 mL 的指形管。

8.3 试剂

8.3.1 DHAV-1 上下游引物或 DHAV-3 上下游引物。

8.3.2 RNA 抽提试剂盒。

8.3.3 逆转录酶。

8.3.4 dNTPs。

8.3.5 *Taq* DNA 酶。

8.3.6 RNA 酶抑制剂。

8.3.7 PBS 溶液,按照附录 A 中 A.1 的规定配制。

8.3.8 氯仿。

8.3.9 70% 的乙醇。

8.3.10 RNase-Free ddH₂O。

8.3.11 SYBR Green Master Mix。

8.3.12 阳性核酸对照。

8.3.13 阴性核酸对照。

8.4 DHAV 检测

8.4.1 引物

qDHAV-1F:TGGTCGAGTCCCATACACTATAA;

qDHAV-1R:GCCACACTTTCCACTGCCCCTA;

扩增长度 153 bp。

qDHAV-3F:TGGTCGAGTCCCATACACTATAA;

qDHAV-3R:CTCGGCACAGGATCCAATAATC;

扩增长度 106 bp。

8.4.2 病料处理

以无菌术式收集病鸭的肝脏,或胚胎的肝脏、尿囊液。肝脏样品在组织研磨器中研磨成乳糜状,加 PBS 制成 10% (W/V) 悬浮液。肝脏悬浮液或尿囊液经 12 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min,取上清液备用。

8.4.3 病毒核酸的抽提

8.4.3.1 用 RNA 抽提试剂盒提取病毒的 RNA。取 250 μL 尿囊液或肝组织研磨上清液于一新的 RNase-Free 离心管中,加入 750 μL 裂解液,剧烈振荡,室温下静置 5 min。

8.4.3.2 随后加 200 μL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温下放置 2 min。

8.4.3.3 12 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min,取上清液,加入等体积的 70% 乙醇,混匀。将溶液转移到吸附柱中。

8.4.3.4 12 000 r/min 4 ℃ 离心 60 s,弃掉滤液(溶液较多的情况下,可多次进行)。向吸附柱中加入 350 μL 去蛋白溶液,12 000 r/min 4 ℃ 离心 60 s,弃掉滤液。

8.4.3.5 向吸附柱中加入 500 μL 漂洗液,静置 2 min,12 000 r/min 4 ℃ 离心 60 s,弃掉滤液(重复 1 次)。

8.4.3.6 12 000 r/min 4 ℃ 离心 2 min,弃掉滤液,室温静置数分钟,以彻底晾干漂洗液。

8.4.3.7 将吸附柱转移到一个新的 RNase-Free 离心管中,加入 30 μL~50 μL RNase-Free ddH₂O,静置 2 min。

8.4.3.8 12 000 r/min,4 ℃ 离心 2 min,收集含 RNA 的滤液。获得的 RNA 溶液保存于一 20 ℃ 或者直接用于 qPCR。

8.4.4 RT-qPCR 扩增

8.4.4.1 取 2 支 0.2 mL 的指形管,分别加入 RNA 5 μL 和 qDHAV-1、qDHAV-3 下游引物(10 mmol/

L)各 2 μ L,混匀,先置 70 $^{\circ}$ C 加热 5 min,再冰浴 3 min。

8.4.4.2 在上述混合液加入下列试剂,总体积为 25 μ L:

- a) dNTP Mix(10 mmol/L),5 μ L;
- b) M-MLV RT 5 \times Reaction Buffer,5 μ L;
- c) M-MLV 反转录酶,0.5 μ L;
- d) RNase 抑制剂,0.5 μ L ;
- e) RNase-Free ddH₂O,7 μ L,混匀。

8.4.4.3 置 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h,在 94 $^{\circ}$ C 条件下灭活 5 min,获得 DHAV-1 和 DHAV-3 的 cDNA。

8.4.4.4 取 2 支 0.2 mL 的指形管,其中一管加入 DHAV-1 cDNA 2 μ L,qDHAV-1 上下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L);另一管加入 DHAV-3 cDNA 2 μ L,qDHAV-3 上下游引物各 1 μ L(10 μ mol/L);再于每支指形管中加入 SYBR Green Master Mix 预混液 10 μ L 和 ddH₂O 6 μ L,混匀。

8.4.4.5 在荧光定量 PCR 仪中运行扩增:在 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;以 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s;运行 40 个循环。

8.4.4.6 溶解曲线程序为:95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s;以 0.3 $^{\circ}$ C/5 s 的速度,从 60 $^{\circ}$ C 升至 95 $^{\circ}$ C,在 95 $^{\circ}$ C 维持 15 s。

8.4.5 结果判定

8.4.5.1 阴性对照无 C_t 值,无扩增曲线(见附录 E 中的 E.1);阳性对照 C_t 值 \leq 35,扩增曲线拐点清楚,指数期明显(见 E.2);溶解曲线呈单一峰(见 E.3),判定试验成立。

8.4.5.2 待检样品无 C_t 值,无扩增曲线,判定为 DHAV-1 或 DHAV-3 阴性。

8.4.5.3 待检样品以 qDHAV-1-F: TGGTCGAGTCCCATACACTATAA; qDHAV-1-R: GCCA-CACTTTCCACTGCCCCTA 为引物,样品 C_t 值 \leq 35,有特定的扩增曲线,判定为 DHAV-1 阳性。

8.4.5.4 待检样品以 qDHAV-3-F: TGGTCGAGTCCCATACACTATAA; qDHAV-3-R: CTCGGCA-CAGGATCCAATAATC 为引物,样品 C_t 值 \leq 35,有特定的扩增曲线,判定为 DHAV-3 阳性。

8.4.5.5 C_t 值 $>$ 35 的样品需复检,重复后若无 C_t 值,判定为阴性;否则,判定为阳性。

9 DHAV-1 微量中和试验

9.1 固定血清检测病毒

9.1.1 病毒及血清

9.1.1.1 待检 DHAV-1 病毒。

9.1.1.2 DHAV-1 阳性血清。

9.1.1.3 DHAV-1 阴性血清。

9.1.1.4 鸡血清。

9.1.2 耗材

96 孔细胞培养板。

9.1.3 胚胎和细胞

9.1.3.1 17 日龄或 12 日龄 DHAV-1 抗体阴性鸭胚。

9.1.3.2 DEL,按照附录 B 的规定制备。

9.1.3.3 DEF,按照附录 C 的规定制备。

9.1.3.4 DEEC,按照附录 D 的规定制备。

9.1.4 试剂

9.1.4.1 DMEM 培养基。

9.1.4.2 营养液,按照附录 A 中 A.2 的规定配制。

9.1.4.3 维持液,按照附录 A 中 A.3 的规定配制。

9.1.5 病毒中和试验

9.1.5.1 用 DMEM 培养基将待检病毒样品作 $10^{-11} \sim 10^{-1}$ 倍比稀释,然后分别与等体积的阳性血清、阴性血清混合,37℃作用 60 min。

9.1.5.2 将病毒血清混合液转入已长成单层并已弃去营养液的 DEL 或 DEF 或 DEEC 96 孔板中,每孔 50 μL 。加入含 2% 鸡血清的维持液,每孔 50 μL ,每个稀释度重复 4 孔。最后一列 4 孔作为空白对照。

9.1.5.3 将细胞板置于 37℃ 5% CO_2 的细胞培养箱内继续培养 3 d~5 d,观察 CPE。CPE 特征为细胞变圆并坏死。按 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID_{50} 。

9.1.6 结果判定

9.1.6.1 空白对照孔未出现 CPE,判定试验成立。

9.1.6.2 阳性血清试验组的 $\text{TCID}_{50} \geq$ 阴性血清试验组的 TCID_{50} 100 倍时,判定待检样品为 DHAV-1 阳性。

9.2 固定病毒检测血清

9.2.1 病毒及血清

9.2.1.1 DHAV-1。

9.2.1.2 DHAV-1 阳性血清。

9.2.1.3 DHAV-1 阴性血清。

9.2.1.4 待检血清。

9.2.1.5 鸡血清。

9.2.2 胚胎和细胞

9.2.2.1 17 日龄或 12 日龄 DHAV-1 抗体阴性鸭胚。

9.2.2.2 DEL,按照附录 B 的规定制备。

9.2.2.3 DEF,按照附录 C 的规定制备。

9.2.2.4 DEEC,按照附录 D 的规定制备。

9.2.3 耗材

96 孔细胞培养板。

9.2.4 试剂

9.2.4.1 DMEM 培养基。

9.2.4.2 营养液,按照附录 A 中 A.2 的规定配制。

9.2.4.3 维持液,按照附录 A 中 A.3 的规定配制。

9.2.5 病毒 TCID_{50} 的滴定

9.2.5.1 用 DMEM 培养基将 DHAV-1 病毒作 $10^{-11} \sim 10^{-1}$ 倍比稀释,取适宜稀释度病毒液接种于已弃去培养液并长满 DEL 或 DEF 或 DEEC 细胞的 96 孔板中,每孔 50 μL ,每个稀释度重复 4 孔。最后一列的 4 孔作为空白对照。

9.2.5.2 将细胞板置于 37℃ 作用 1 h,然后加入含 2% 鸡血清的细胞维持液,每孔 50 μL 。将细胞板置于 37℃ 5% CO_2 培养箱内继续培养 3 d~5 d,按 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID_{50} 。

9.2.6 血清中和试验

9.2.6.1 将待测血清样品置于 56℃ 水浴锅内灭活 30 min,然后用 DMEM 培养基将其作 2 倍系列稀释。

9.2.6.2 将 $2^1 \sim 2^{10}$ 系列稀释的血清样品、DHAV-1 阳性血清、阴性血清分别与等体积 100 TCID_{50} DHAV-1 病毒混合,37℃作用 60 min。

9.2.6.3 将病毒与血清的混合液转入到已长成单层并已弃去营养液的 DEL 或 DEF 或 DEEC 96 孔板中,每孔 50 μL ,同时加入含 2% 鸡血清的维持液,每孔 50 μL 。每个稀释度的血清样品重复 4 孔,阳性、阴

性和空白对照各设置 2 孔。

9.2.6.4 将细胞板置于 37 ℃ 5% CO₂ 的细胞培养箱内继续培养 5 d, 观察 CPE。

9.2.7 结果判定

9.2.7.1 阳性和空白对照孔未出现 CPE, 而阴性对照孔出现 CPE, 判定试验成立。

9.2.7.2 血清的中和效价为完全抑制细胞发生病变的最高血清稀释度。抗体中和效价 $\geq 1:16$ 的血清判定为 DHAV-1 中和抗体阳性。

9.2.7.3 抗体中和效价 $\leq 1:16$ 的血清判定为 DHAV-1 中和抗体阴性。

10 胚胎中和试验检测 DHAV-1 或 DHAV-3 中和抗体

10.1 仪器设备

10.1.1 冷冻台式离心机。

10.1.2 恒温培养箱。

10.1.3 1 mL 注射器及针头。

10.2 病毒及血清

10.2.1 DHAV-1。

10.2.2 DHAV-3。

10.2.3 DHAV-1 阳性血清。

10.2.4 DHAV-1 阴性血清。

10.2.5 DHAV-3 阳性血清。

10.2.6 DHAV-3 阴性血清。

10.2.6 待检血清。

10.3 胚胎

10.3.1 9 日龄~10 日龄 SPF 鸡胚。

10.3.2 10 日龄~12 日龄 DHAV-1 或 DHAV-3 抗体阴性鸭胚。

10.4 试剂

10.4.1 PBS 溶液, 按照附录 A 中 A.1 的规定配制。

10.4.2 青霉素。

10.4.3 链霉素。

10.5 中和试验

10.5.1 以 pH 7.2~7.4 的 PBS 溶液将青霉素和链霉素分别稀释至 2 000 IU/mL 和 2 000 μ g/mL。

10.5.2 将 DHAV-1 或 DHAV-3 病毒液按 8:1:1 的体积比与青霉素和链霉素混合, 备用。

10.5.3 将 DHAV-1 与等体积的待检血清、DHAV-1 阳性血清、DHAV-1 阴性血清混合, 置于 37 ℃ 温箱中作用 30 min。

10.5.4 或将 DHAV-3 与等体积的待检血清、DHAV-3 阳性血清、DHAV-3 阴性血清混合, 置于 37 ℃ 温箱中作用 30 min。

10.5.5 以每枚胚 0.2 mL 病毒血清混合液经尿囊腔接种 9 日龄~10 日龄 SPF 鸡胚或 10 日龄~12 日龄的非免疫鸭胚, 每个样品接种 4 枚~5 枚胚。于 37 ℃ 恒温培养箱中孵育。

10.5.6 弃去接种后 24 h 内死亡的胚胎。24 h 后每间隔 6 h 观察胚胎的死亡情况, 收集 24 h~96 h 死亡的胚胎, 放入 4 ℃ 冰箱中静置 4 h~12 h, 待胚胎血管收缩, 进行剖检。

10.6 结果判定

10.6.1 阳性血清对照组的胚胎未发生死亡, 胚体无病变; 而阴性血清对照组胚胎发生死亡, 胚胎发育迟滞、全身皮下出血、腹部和后肢部水肿。胚肝呈黄红色、肿胀并可能有坏死灶, 判定试验成立。

10.6.2 在 DHAV-1 与待检血清混合的试验组中,如未发生胚胎死亡,胚体无病变,判定为待检测血清 DHAV-1 抗体阳性。

10.6.3 在 DHAV-1 与待检血清混合的试验组中,如胚胎发生死亡,胚胎发育迟滞、全身皮下出血、腹部和后肢部水肿,胚肝呈黄红色、肿胀并可能有坏死灶,判定为待检测血清 DHAV-1 抗体阴性。

10.6.4 在 DHAV-3 与待检血清混合的试验组中,如未发生胚胎死亡,胚体无病变,判定为待检测血清 DHAV-3 抗体阳性。

10.6.5 在 DHAV-3 与待检血清混合的试验组中,如胚胎发生死亡,胚胎发育迟滞、全身皮下出血、腹部和后肢部水肿,胚肝呈黄红色、肿胀并可能有坏死灶,判定为待检测血清 DHAV-3 抗体阴性。

11 综合判定

11.1 凡具有 5.1 临床症状和 5.2 病理变化,并且 RT-PCR 后约 467 bp 处有一条特异的 DNA 条带,判定为鸭甲型病毒性肝炎 1 型。

11.2 凡具有 5.1 临床症状和 5.2 病理变化,微量中和试验病毒阳性,判定为鸭甲型病毒性肝炎 1 型。

11.3 凡具有 5.1 临床症状、5.2 病理变化,待检样品以 qDHAV-1-F:TGGTCGAGTCCCATACAC-TATAA,qDHAV-1-R:GCCACACTTTCCACTGCCCCTA 为引物,样品 C_t 值 ≤ 35 ,有特定的扩增曲线,判定为鸭甲型病毒性肝炎 1 型。

11.4 凡具有 5.1 临床症状、5.2 病理变化,并且 RT-PCR 后 292 bp 处有一条特异的 DNA 条带,判定为鸭甲型病毒性肝炎 3 型。

11.5 凡具有 5.1 的临床症状、5.2 病理变化,待检样品以 qDHAV-3-F:TGGTCGAGTCCCATACAC-TATAA,qDHAV-3-R:CTCGGCACAGGATCCAATAATC 为引物,样品 C_t 值 ≤ 35 ,有特定的扩增曲线,判定为鸭甲型病毒性肝炎 3 型。

11.6 凡满足 9.2.7.2 或 10.6.2 的条件,判定为 DHAV-1 中和抗体阳性。

11.7 凡满足 9.2.7.3 或 10.6.3 的条件,判定为 DHAV-1 中和抗体阴性。

11.8 凡满足 10.6.4 的条件,判定为 DHAV-3 中和抗体阳性。

11.9 凡满足 10.6.5 的条件,判定为 DHAV-3 中和抗体阴性。

附 录 A
(规范性)
试剂配制方法

A.1 PBS 缓冲液

配制 pH 7.4 PBS 缓冲液所需试剂如下：

- a) 0.2 g 的氯化钾；
- b) 8.0 g 的氯化钠；
- c) 0.27 g 的磷酸二氢钾；
- d) 3.58 g 的十二水合磷酸氢二钠。

以上试剂均为分析纯，溶解于适量双蒸水中，调 pH 至 7.2~7.4，用双蒸水定容至 1 000 mL，4 ℃ 保存。

A.2 营养液

在 900 mL 的 DMEM 培养基中加入 100 mL 胎牛血清，再加青霉素至终浓度 100 IU/mL。以 7% NaHCO_3 调 pH 至 7.2~7.4。

A.3 维持液

在 980 mL 的 DMEM 培养基中加入 20 mL 胎牛血清，再加青霉素至终浓度 100 IU/mL。以 7% NaHCO_3 调 pH 至 7.2~7.4。

附 录 B**(规范性)****鸭胚肝细胞(DEL)的制备**

B.1 将 17 日龄的鸭胚放入超净台内,气室朝上,先用碘酊消毒气室部位,后用酒精棉脱碘;敲开气室部的蛋壳,撕开蛋壳膜、尿囊膜及羊膜,用镊子轻轻取出鸭胚,放入无菌的平皿中。取出肝脏,弃胆囊,用 PBS 缓冲液清洗 3 次。

B.2 将肝脏转移到无菌的小烧杯中,剪碎;然后,用 PBS 缓冲液清洗 3 次。向肝脏碎片中加入 0.05% 胰酶(胰酶的量组织块的 3 倍~5 倍),然后置于 37 ℃ 水浴中 5 min ~10 min。

B.3 弃掉胰酶,用 DMEM 清洗 3 次,再用 2 mL DMEM 吹散组织块;然后,用 4 层无菌纱布或细胞筛过滤。

B.4 过滤后的细胞悬液 1 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清液。加少量 DMEM 培养液,轻轻吹散底部的细胞沉淀。

B.5 用计数板进行细胞计数,计数后的细胞按 4×10^5 个/mL 用 DMEM 培养液进行稀释。转入细胞瓶或细胞培养板中,放入 37 ℃ 5.0% CO₂ 培养箱中进行培养。

附 录 C

(规范性)

鸭胚成纤维细胞(DEF)的制备

C.1 将12日龄的鸭胚放入超净台内,气室朝上,先用碘酊消毒气室部位,后用酒精棉脱碘;敲开气室部的蛋壳,撕开蛋壳膜、尿囊膜及羊膜,用镊子轻轻取出鸭胚,放入无菌的平皿中。剪除头、四肢、内脏,用PBS缓冲液清洗3次。

C.2 将胚的胴体转移到无菌的小烧杯中,剪碎,然后用PBS缓冲液清洗3次。向胴体碎片中加入0.25%胰酶(胰酶的量组织块的3倍~5倍),然后置于37℃水浴中5 min~10 min。

C.3 弃掉胰酶,用DMEM清洗3次,再用2 mL DMEM吹散组织块;然后,用4层无菌纱布或细胞筛过滤。

C.4 过滤后的细胞悬液1 000 r/min离心10 min,弃掉上清液。加少量DMEM培养液,轻轻吹散底部的细胞沉淀。

C.5 用计数板进行细胞计数,计数后的细胞按 4×10^5 个/mL用DMEM培养液进行稀释。转入细胞瓶或细胞培养板中,放入37℃ 5.0% CO₂培养箱中进行培养。

附 录 D

(规范性)

鸭胚上皮细胞系(DEEC)的制备

- D.1** 将长满 DEEC 的细胞培养瓶中的培养液弃去,加入无菌的 PBS 缓冲液轻摇 30 s,弃去上清液。
- D.2** 加入 2 mL 在 37 ℃预热的 EDTA-胰酶,温和地摇动细胞瓶 1 min,使 EDTA-胰酶均匀分布在整個细胞薄层,然后用移液管吸去 EDTA 胰酶。
- D.3** 重新加入 1 mL EDTA-胰酶使其分布在整個细胞薄层,于 37 ℃孵育细胞直至细胞从培养瓶表面分离(5 min~10 min),必要时摇动或吹打使细胞充分分离,然后加入 1 mL 胎牛血清灭活残余的胰酶。
- D.4** 加入 19 mL 配置好的含有 L-谷氨酰胺和 6%~10%胎牛血清的 D-DMEM 培养液,轻轻用移液管吹散细胞团。
- D.5** 每个 T25 培养瓶中加入 5 mL 4×10^5 个/mL 细胞悬液,于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱里培养细胞,2 d~3 d即可生长单层细胞。
- D.6** 细胞冻存步骤:常规方法冻存,按 1:4:5 配冻存液,即 1 份甘油、4 份血清和 5 份培养基。

附 录 E
(资料性)
荧光定量 PCR 曲线图

E. 1 荧光定量 PCR 阴性扩增曲线见图 E. 1。

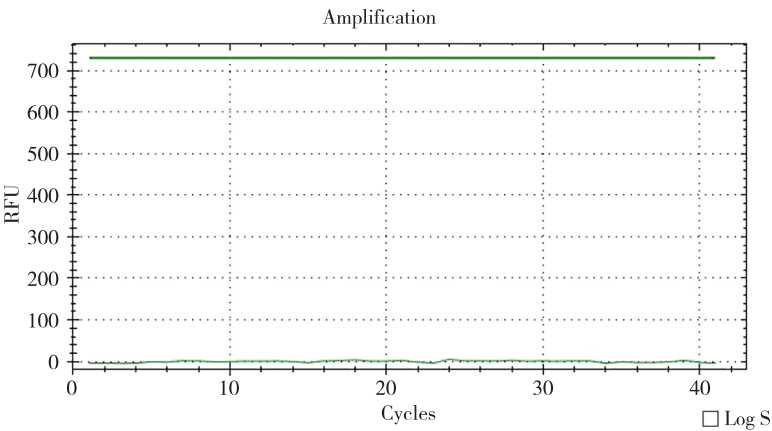


图 E. 1 荧光定量 PCR 阴性扩增曲线图

E. 2 荧光定量 PCR 阳性扩增曲线见图 E. 2。

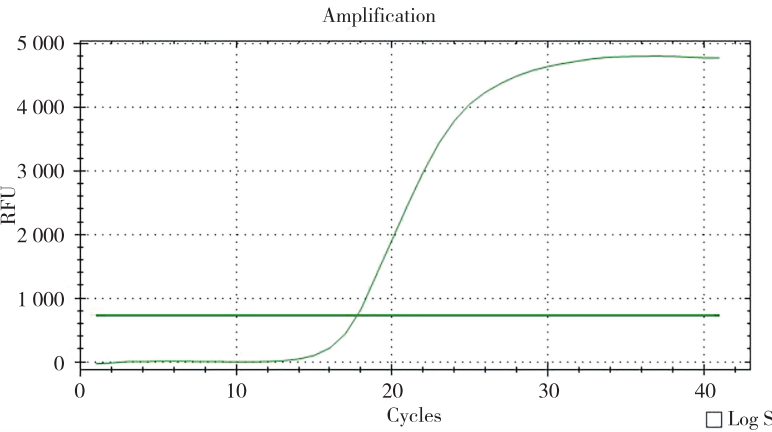


图 E. 2 荧光定量 PCR 阳性扩增曲线图

E. 3 荧光定量 PCR 溶解曲线见图 E. 3。

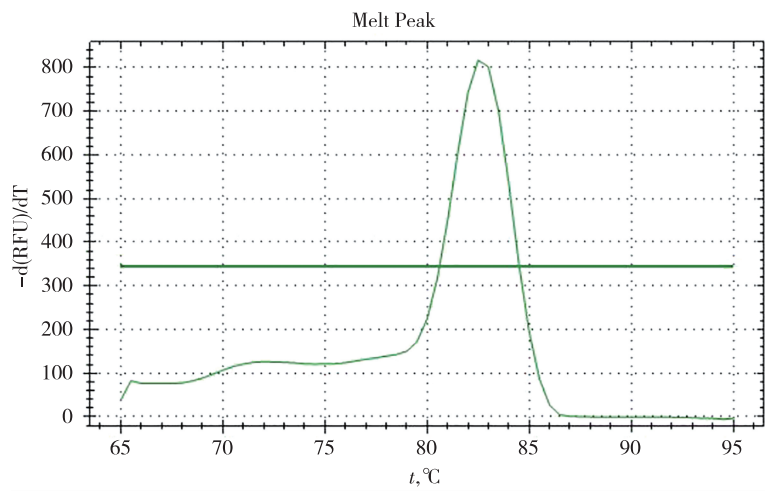


图 E. 3 荧光定量 PCR 溶解曲线图
