



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX
代替 GB/T 14926.57-2008

实验动物 犬细小病毒检测方法

Laboratory animal Method for examination of Canine Parvovirus

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2026-09-01）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

 4.1 抗体检测原理 1

 4.2 核酸检测原理 1

5 主要试剂和器材 2

 5.1 试剂 2

 5.2 器材 3

6 检测方法 3

 6.1 采用ELISA方法（见GB/T 14926.50）进行血清学检测。 3

 6.2 采用HAI方法（见GB/T 14926.54）进行血清学检测。 3

 6.3 采用实时荧光定量PCR方法进行CPV核酸检测，按照附录A操作。 3

7 结果判定 3

 7.1 抗体检测结果判定 3

 7.2 核酸检测结果判定 3

8 结果报告 3

附录 A（规范性） 犬细小病毒实时荧光定量 PCR 检测方法 4

 A.1 主要设备和材料 4

 A.2 试剂 4

 A.3 样本的采集 4

 A.4 样本运输和存放 5

 A.5 样本DNA提取 5

 A.6 实时荧光定量PCR 5

 A.7 结果判定 5

表 1 CPV 实时荧光定量 PCR 方法扩增引物和探针 2

表 A.1 实时荧光定量 PCR 反应体系配制表 5

表 A.2 实时荧光定量 PCR 反应参数 5

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。

本部分代替 GB/T 14926.57—2008《实验动物 犬细小病毒检测方法》，与 GB/T 14926.57—2008 相比，除结构调整和编辑行改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围（见第1章）
- b) 新增核酸检测规范性引用文件（见第2章）；
- c) 增加了核酸检测原理（见4.2），增加了核酸检测用主要试剂和器材（见5.1.7及5.2.2），增加了犬细小病毒核酸检测方法（见6.3）及其结果判定（见7.2）；
- d) 更改了 ELISA 抗原部分感染细胞的名称（见5.1.1、5.1.2, 2008年版的4.1.1、4.1.2），更改了抗体检测结果的判定（见7.1，2008年版的7.1、7.2、7.3）；
- e) 增加附录A，将犬细小病毒核酸检测方法所需的主要设备和材料、试剂、样本采集、样本DNA提取、实时荧光定量PCR反应体系和反应参数、结果判定等进行了规范（见附录A）。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会提出并技术归口。

本文件起草单位：清华大学、华南农业大学、北京维通利华实验动物技术有限公司、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、浙江中医药大学、中国药品检定研究院、苏州西山生物技术有限公司、广东省生物技术研究院（广东省实验动物监测中心）、中国医学科学院医学实验动物研究所。

本文件主要起草人：常在、刘苗苗、李思宇、李雯乔、唐倩倩、谢忠忱、刘忠华、申屠芬琴、秦彤、王德军、王吉、郭连香、王静、向志光。

本文件及其所代替标准的历次版本发布情况为：

——2001年08月首次发布为 GB/T 14926.57—2001，2008年第一次修订。

——本次修订为第二次修订

实验动物 犬细小病毒检测方法

1 范围

本文件描述了犬细小病毒（Canine Parvovirus, CPV）的检测方法。

本文件适用于犬及其相关产品、实验接种物、实验动物生产和使用环境样本中犬细小病毒的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

下列标准所包含的条文，通过在本部分中引用而构成本部分的条文。本部分引用的下列标准应同步最新版本。

GB/T 14926.50 实验动物 酶联免疫吸附试验

GB/T 14926.54 实验动物 血凝抑制试验

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

4.1 抗体检测原理

根据免疫学原理，采用 CPV 抗原检测犬血清中 CPV 抗体；或根据 CPV 在一定的条件下，能凝集猪或恒河猴的红细胞，这种凝集红细胞的能力可被特异性抗体所抑制的原理，检测犬血清中 CPV 抗体。

4.2 核酸检测原理

根据核酸检测原理，采用 CPV 保守序列设计合成一对特异性引物和一条特异性探针，建立实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time polymerase chain reaction, Q-PCR) 方法。利用建立的 Q-PCR 方法检测样本中是否含有 CPV 核酸。

5 主要试剂和器材

5.1 试剂

5.1.1 ELISA 抗原

5.1.1.1 特异性抗原

CPV 感染 FK81 细胞，接种 3~5d 后，当病变达+++~++++（-阴性；+轻；++中；+++重；++++严重，下同）时收获。冻融三次或超声波处理后，低速离心去除细胞碎片，上清液再经超速离心浓缩后制成 ELISA 包被抗原。

5.1.1.2 正常抗原

F81 细胞冻融破碎后，经低速离心去除细胞碎片而获得的上清液。

5.1.2 血凝素

CPV 接种 F81 细胞，培养 3~5d，当病变达+++~++++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。

5.1.3 阳性血清

CPV 实验感染或自然感染的犬等实验动物血清。

5.1.4 阴性血清

无 CPV 感染、未经免疫的犬等实验动物血清。

5.1.5 酶结合物

辣根过氧化物酶标记羊或兔抗犬等实验动物 IgG 抗体。

5.1.6 猪或恒河猴红细胞

5.1.7 引物和探针

根据表 1 的序列合成引物和探针，引物和探针加无 RNase 水或双蒸水分别配制成 100 μmol/L 储备液，-20° C 保存。

表 1 CPV 实时荧光定量 PCR 方法扩增引物和探针

引物和探针名称	引物和探针序列（5' -3' ）
正向引物	GGCCTGGGAACAGTCTTGAC
反向引物	GCGAAGATAAGCAGCGTAAGC
探针	FAM-CCAACTAACCCTTCTGACGCCGCTG-TAMRA

注：探针也可选用具有与 FAM 和 TAMRA 荧光基团相同检测效果的其他合适的荧光报告基团和荧光淬灭基团组合。

5.2 器材

5.2.1 抗体检测器材

5.2.1.1 酶标仪

5.2.1.2 37℃培养箱或水浴箱

5.2.1.3 4℃冰箱

5.2.2 核酸检测器材

核酸检测方法相关器材按照附录 A 准备。

6 检测方法

6.1 采用 ELISA 方法（见 GB/T 14926.50）进行血清学检测。

6.2 采用 HAI 方法（见 GB/T 14926.54）进行血清学检测。

6.3 采用实时荧光定量 PCR 方法进行 CPV 核酸检测，按照附录 A 操作。

7 结果判定

7.1 抗体检测结果判定

对阳性检测结果，选用同一种方法或另一种方法重试。如为阳性则判为阳性。

7.2 核酸检测结果判定

对阳性或可疑结果，用同一种方法重试，如仍为阳性或可疑，则判为阳性。

8 结果报告

根据判定结果，作出报告。

附录 A

(规范性)

犬细小病毒实时荧光定量 PCR 检测方法

A.1 主要设备和材料

A.1.1 荧光定量 PCR 仪

A.1.2 高速冷冻离心机

A.1.3 台式离心机

A.1.4 恒温孵育器/恒温水浴槽

A.1.5 漩涡振荡器

A.1.6 研磨仪

A.1.7 -80 ° C 冰箱, -20 ° C 冰箱, 2~8 ° C 冰箱。

A.1.8 微量移液器(10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L,)。

A.1.9 无 DNase 的离心管(1.5 mL、2 mL、5 mL、15 mL), 无 DNase 的吸头(10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L), 无 DNase 的 PCR 扩增反应管。

A.2 试剂

A.2.1 商品化 DNA 抽提试剂盒或等效试剂。

A.2.2 荧光定量 PCR 试剂盒或等效试剂盒。

A.2.3 引物和探针: 根据表 1 的序列合成引物和探针, 引物和探针加无 DNase 水分别配制成 100 μ mol/L 储备液, 使用前将储备液配置成 10 μ mol/L 工作液, -20° C 保存。

A.3 样本的采集

A.3.1 脏器组织

将活体动物安乐死后剖检, 无菌采集动物的肠道、脾脏、淋巴结等组织, 剪取适量待检样品于无菌离心管。

A.3.2 盲肠内容物或粪便

无菌采集动物盲肠内容物、粪便或肛拭子, 取适量待检样品于无菌离心管中。

A.3.3 实验接种物

直接取适量待测细胞培养物、肿瘤组织等待测实验接种物于无菌离心管中。

A.3.4 实验动物环境样本

取适量实验动物饲料或垫料置于无菌样品袋中。

取适量实验动物饮水直接转移到无菌离心管中。

用无菌拭子拭取实验动物环境中的待测位置后装入无菌离心管中。

A.4 样本运输和存放

样本采集后应密封、加冰并尽快运送到检测实验室。在 2~8℃ 条件下暂存应不超过 24h，若不能立即检测应-20℃ 保存，若需长期保存，须置于-80℃ 冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过 3 次）。

A.5 样本 DNA 提取

使用试剂盒或其他等效产品提取 DNA。DNA 的提取操作应在生物安全柜中进行，避免气溶胶污染。制备好的 DNA 应尽快进行下一步反应，若暂时不能进行，应于-80℃ 冰箱保存备用。

A.6 实时荧光定量 PCR

A.6.1 反应体系

实时荧光定量 PCR 反应体系见表 A.1。每次反应同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

表 A.1 实时荧光定量 PCR 反应体系配制表

反应组分	用量	终浓度
Mix	12.5 μL	1×
上游引物	0.5 μL	0.2 μM
下游引物	0.5 μL	0.2 μM
探针	0.5 μL	0.2 μM
DNA 模版	2 μL	
无 DNase 水	9 μL	
总体积	25 μL	

A.6.2 反应参数

实时荧光定量 PCR 反应参数见表 A.2。

表 A.2 实时荧光定量 PCR 反应参数

步骤	温度/℃	时间	采集荧光信号	循环数
防污染处理	37	2min	否	1
预变性	95	30sec	否	1
变性	95	10sec	否	40
退火，延伸	60	30sec	是	

注：可使用其他等效的一步法或两步法实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒进行，反应体系和反应参数可进行相应调整。试验结束后，根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

A.7 结果判定

A.7.1 结果分析和条件设定

直接读取检测 Ct 值，基线和阈值设定原则上根据仪器的噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

A. 7. 2 质控标准

A. 7. 2. 1 空白对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，一直为水平线。

A. 7. 2. 2 阴性对照无 Ct 值，并且无荧光扩增曲线，一直为水平线。

A. 7. 2. 3 阳性对照 Ct 值应 ≤ 37 ，并且有明显的荧光扩增曲线，则表明反应体系运行正常，否则此次试验无效，需重新进行实时荧光定量 PCR 扩增。

A. 7. 3 结果判定

A. 7. 3. 1 质控成立条件下，若待检测样本无荧光扩增曲线，则判定为阴性；

A. 7. 3. 2 质控成立条件下，若待检测样本有荧光扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 37 时，则判定为阳性；

A. 7. 3. 3 质控成立条件下，若待检测样本有荧光扩增曲线， $37 < \text{Ct 值} \leq 40$ ，则判定为可疑，需复检，复检仍出现 $37 < \text{Ct 值} \leq 40$ ，并且曲线有明显的对数增长期，则判定样品 CPV 核酸阳性；否则判定为 CPV 核酸阴性。

A. 7. 4 序列测定

必要时，可取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定，序列结果与已公开发表的犬细小病毒特异性片段序列进行比对，以验证检测结果。
