



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX
代替 GB/T 14926.58-2008

实验动物 传染性犬肝炎病毒检测方法

Laboratory animal —Method for examination of Infectious Canine
Hepatitis Virus

（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

5 主要试剂与器材 1

6 检测方法 3

7 结果判定 3

8 结果报告 3

附录 A（规范性） 传染性犬肝炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法 4

表 1 2

表 A.1 实时荧光定量 PCR 参考反应体系 4

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。

本文件代替 GB/T 14926.58—2008《实验动物 传染性犬肝炎病毒检测方法》。本文件与 GB/T 14926.58—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了范围（见第1章，GB/T 14926.58—2008 第1章）；
- b) 更改了规范性引用文件（见第2章，GB/T 14926.58—2008 第2章）；
- c) 增加了术语（见第3章）；
- d) 增加了核酸检测方法，包括核酸检测原理、核酸检测用主要试剂与器材、核酸检测方法、核酸检测结果判定（见4.2、5.1.7~5.1.11、5.2.3~5.2.8、6.2.3、7.4）；
- e) 增加了样本采集及处理条款（见6.1）；
- f) 在结果判定中将“基础级”改为“普通级”（见第7章）；
- g) 增加了传染性犬肝炎病毒核酸检测具体操作方法（见附录A）。

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。

本文件由中华人民共和国科学技术部提出。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC 281）归口。

本文件起草单位：北京维通利华实验动物技术有限公司、中国医学科学院医学实验动物研究所、上海实验动物研究中心、赣南创新与转化医学研究院、华南农业大学、中国食品药品检定所、四川省药品检验研究院（四川省医疗器械检测中心、四川养麝研究所）、南方医院实验动物中心、军事科学院军事医学研究院。

本标准起草人：申屠芬琴、韩雪、魏博、孙奉玉、向志光、佟巍、张云科、郭智、魏晓锋、万娟、余文兰、刘忠华、李晓波、黎家敏、弓莉、范薇。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——2001年首次发布 GB/T 14926.58—2001，2008年第一次修订。

——本次修订为第二次修订。

实验动物 传染性犬肝炎病毒检测方法

1 范围

本文件规定了传染性犬肝炎病毒（ICHV）的检测方法、试剂等。

本文件适用于传染性犬肝炎病毒（ICHV）抗体和核酸的检测。

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。

GB/T 14926.42 实验动物 细菌学检测 标本采集

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

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 ICHV 抗原检测犬血清中 ICHV 抗体；或根据 ICHV 在一定的条件下，能凝集人“O”型红细胞，这种凝集红细胞的能力可被特异性抗体所抑制的原理，检测犬血清中的 ICHV 抗体。

4.2 核酸检测原理

根据分子生物学原理，采用 ICHV 病毒特异性引物和荧光探针，通过实时荧光定量 PCR（qPCR）扩增样本中 ICHV 靶标核酸片段来检测样品中是否存在 ICHV 核酸。

5 主要试剂与器材

5.1 主要试剂

5.1.1 ELISA 抗原

5.1.1.1 特异性抗原

用 ICHV 感染犬肾细胞（MDCK 细胞），接种 3 d~4 d 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 抗原。

5.1.1.2 正常抗原

MDCK 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

ICHV 接种 MDCK 细胞，培养 3 d~4 d，当病变达+++ ~ ++++时用收获培养物。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

ICHV 实验感染或自然感染的犬血清。

5.1.4 阴性血清

无 ICHV 感染、未经免疫的犬血清。

5.1.5 酶结合物

辣根过氧化物酶标记羊或兔抗犬 IgG 抗体。

5.1.6 人“O”型红细胞。

5.1.7 核酸提取试剂盒。

5.1.8 探针法荧光 PCR 反应液。

5.1.9 qPCR 阴性对照

不含有 ICHV DNA 的样本（可以是正常样本或正常培养物）。

5.1.10 qPCR 阳性对照

来源明确的含有 ICHV 的样本或细胞培养物。

5.1.11 引物和探针

根据序列（见表 1）合成引物和探针，引物和探针加入灭菌去离子水配制成 10 μmol/L 储备液，-20℃保存。

表 1 ICHV qPCR 扩增引物和探针序列

表 1

引物和探针名称	引物和探针序列（5' →3' ）	产物大小/bp
正向引物	GTATGATTCCCCACGGCAC	138
反向引物	ATAATGGGAGCACTTTTGCAGAG	
探针	FAM-CCAGCCATAGTCCCATGGACCAGT-BHQ-1	
注：探针也能选用具有与 FAM 和 BHQ-1 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 主要器材

5.2.1 37℃恒温培养箱或水浴箱；

5.2.2 酶标仪；

5.2.3 生物安全柜；

5.2.4 实时荧光定量 PCR 仪；

5.2.5 涡旋振荡器；

5.2.6 匀浆器；

5.2.7 离心机；

5.2.8 其他器材：微量移液器、离心管等。

6 检测方法

6.1 样本的采集及处理

6.1.1 血清采集按照 GB/T 14926.42 操作。

6.1.2 粪便样本的采集按照附录 A 操作。

6.2 样本的检测方法

6.2.1 采用 ELISA 方法进行血清学检测，按照 GB/T 14926.50 操作。

6.2.2 采用血凝抑制试验（HAI）方法进行血清学检测，按照 GB/T 14926.54 操作。

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

7 结果判定

7.1 普通级犬，接种疫苗后，经 ELISA 检测抗体效价大于等于 1:160，或 HAI 检测抗体效价大于等于 1:16 判为合格。

7.2 SPF 级犬，不应进行疫苗接种，对血清学阳性检测结果，选用同一种方法或另一种方法重试，如为阳性则判为阳性。

7.3 普通级犬群体免疫抗体合格率：

免疫抗体合格率=（被检动物抗体阳性数/被检动物总数）×100%

普通级犬群体免疫合格率大于等于 70%以上可判为该犬群免疫合格。

7.4 对核酸阳性或可疑结果，用同一种方法重试，如仍为阳性或可疑，则判为传染性犬肝炎病毒（ICHV）阳性。

8 结果报告

根据判定结果，出具报告。

附 录 A

(规范性)

传染性犬肝炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法

A.1 样本的采集及处理

采样过程中样本不应交叉污染，采样及样本前处理过程中须戴一次性手套。

采集少量新鲜犬粪便，加入适量无菌磷酸盐缓冲液（PBS）或生理盐水，充分研磨匀浆，离心取上清至另一无菌离心管中，编号备用。

细胞培养物，可直接取待测细胞培养物于无菌离心管中，编号备用。

A.2 样本的运输和存放

采集或处理的样本在 2~8℃ 条件下保存应不超过 24 h，若需长期保存，应置于-70℃ 以下冰箱，但避免反复冻融（冻融不超过 3 次，长期保存不超过 2 年）。

A.3 样本 DNA 的提取

参照核酸提取试剂盒说明书进行阳性对照、阴性对照和样本 DNA 的提取。样本处理应在生物安全柜中进行，并避免气溶胶污染。提取后的 DNA 宜尽快进行下一步 PCR 反应，若暂时不能进行下一步，应于-70℃ 保存备用。

A.4 实时荧光定量 PCR 检测

A.4.1 实时荧光定量 PCR 反应体系

实时荧光定量 PCR 参考反应体系见表 A.1。反应液的配制在冰上操作，每次反应同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照，空白对照为不加 DNA 模板对照，即在反应中用水代替 DNA 模板。

表 A.1 实时荧光定量 PCR 参考反应体系

反应组分	用量/μL	终浓度
2×Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)	12.5	1×
正向引物 (10 μmol/L)	0.8	320 nmol/L
反向引物 (10 μmol/L)	0.8	320 nmol/L
探针 (10 μmol/L)	0.4	160 nmol/L
Rox (50×)	0.5	1×
DNA 模板	5	—
无 RNase 去离子水	5	—
总体积	25	—
注 1：试剂 Rox 只在具有 Rox 荧光校正通道的实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增时添加，否则用水补齐。		
注 2：使用其他等效的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒时，反应体系和反应参数将做相应调整。		

A.4.2 实时荧光定量 PCR 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	循环数	采集荧光信号
预变性	95℃	2 min	1	否
变性	95℃	10 s	40	
退火，延伸	60℃	35 s		
				是

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和扩增循环数（Ct 值）判定结果。

A.5 实时荧光定量 PCR 结果判定

A.5.1 结果分析和条件设定

直接读取检测结果，基线和阈值设定原则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本扩增曲线的最高点为准。

A.5.2 质控标准

A.5.2.1 空白对照无 Ct 值，并且无特异性荧光扩增曲线。

A.5.2.2 阴性对照无 Ct 值，并且无特异性荧光扩增曲线。

A.5.2.3 阳性对照 Ct 值≤35，并且有明显的特异性荧光扩增曲线，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.5.3 结果判定

A.5.3.1 质控成立条件下，待测样本无 Ct 值，无特异性扩增曲线，则判定样本 ICHV 核酸阴性。

A.5.3.2 质控成立条件下，待测样本 Ct 值≤35，且出现特异性扩增曲线，则判定样本 ICHV 核酸阳性。

A.5.3.3 质控成立条件下，待测样本 35 < Ct 值 < 40，且出现特异性扩增曲线，判为可疑，需复检，复检仍出现 35 < Ct 值 < 40，并且曲线有明显的对数增长期，则判定样本 ICHV 核酸阳性；否则判为阴性。

A.5.4 序列测定

必要时，可取阳性 PCR 扩增产物进行序列测定，并与已公开发表的 ICHV 特异性片段序列进行同源性比对分析，以确证检测结果。