

# 团 体 标 准

T/ CVMA XXXXX—XXXX  
代替 Q/

## 鸽疱疹病毒感染诊断技术规范

### Technical Specifications for Diagnosis of Pigeon Herpesvirus Infection

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

## 目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 缩略语.....	1
5 诊断依据.....	1
6 诊断原则.....	2
7 诊断判定.....	2
附录 A（规范性附录） 鸽疱疹病毒分离培养.....	3
附录 C（规范性附录） 核酸检测方法.....	5
附录 D（资料性附录） 引物序列.....	7
附录 E（资料性附录） 溶液配制.....	8

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、东莞源和生物技术有限公司

本文件主要起草人：汤新明、梁琳、崔尚金、梁瑞英、刘昕、金京勋

中国兽医协会  
CVMA

# 鸽疱疹病毒感染诊断技术规范

## 1 范围

本文件规定了鸽疱疹病毒感染引起的的流行病学、临床症状、病理变化等临床诊断，样品采集与处理、病原分离鉴定等实验室诊断的技术要求和操作规范。

本文件适用于鸽疱疹病毒的核酸、抗体的检测。

## 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19289 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范动物检疫

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范。

## 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。

**PHV-1:** 鸽疱疹病毒（Pigeon Hepesvirus I）

**CPE:** 致细胞病变效应（Cytopathic Effect）

**FBS:** 胎牛血清（Fetal Bovine Serum）

**CEF:** 鸡胚成纤维细胞(Chicken-embryo Fibroblasts)

**PBS:** 磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffer Saline）

**PCR:** 聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

## 5 诊断依据

### 5.1 病原学

鸽疱疹病毒（Pigeon herpesvirus I, PHV-I）又称哥伦比亚疱疹病 I 型（Columbid herpesvirus I, CoHV-1），是禽疱疹病毒科、 $\alpha$  疱疹病毒亚科、马立克氏病毒属的一员，为有囊膜的线性双链 DNA 病毒，具有典型的病毒粒子结构。

### 5.2 流行病学

鸽子是 PHV-I 的自然宿主，有报道长尾小鸚鵡能够感染，鸡、鸭、金丝雀对 PHV 有抵抗力。鸽自然感染表现为精神萎靡，采食下降，以结膜炎和鼻炎为特征。病毒主要通过直接接触，空气尘埃或粪便污染的水与食物传播，目前认为 PHV-I 感染不经蛋垂直传播。感染鸽群中的成年鸽为无症状的病毒携带者，其中有些鸽时而排毒。在繁殖季节和幼鸽育雏期间绝大多数隐性感染的成年鸽在其咽喉部可再次排毒，因此，常在孵育后不久可将该病直接传染给幼鸽，然而此时的幼鸽靠卵黄中的母源抗体可获得保护，而且大多成为无症状的病毒携带者。该病毒呈世界性分布，英国、前捷克斯洛伐克、澳大利亚、比利时、匈牙利、德国、法国和意大利等国家均已分离到该病毒。在美国也发现有 PHV-1 的感染，欧洲大部分鸽均感染了该病毒，该病毒在我国也已经广泛传播。

### 5.3 临床症状

#### 5.3.1 急性病例

病鸽常打喷嚏、结膜炎、鼻腔内充满黏液，肉髯由正常的白色变为灰黄色，口腔、咽、喉黏膜充血，严重的病例还可见口腔粘膜表面有坏死病灶和小溃疡灶。咽部粘膜可能覆盖几层白喉性薄膜。

#### 5.3.2 慢性非典型病例

慢性病例常继发其他病原菌感染，病鸽表现精神沉郁、呼吸困难、食欲不振，在继发支原体或细菌感染时，引发严重的鼻窦炎及呼吸困难。

### 5.4 病理变化

5.4.1 剖检鼻腔、副鼻窦、气管、支气管内由有黄色分泌物。

5.4.2 局部感染病例，可见咽部和唾液腺、复层鳞状上皮有局灶性坏死。病灶内细胞呈现不同阶段的变性坏死。大病灶可能延伸形成溃疡。喉和气管的上皮也具有相似的病变。全身性感染的鸽子发生肝炎，气管内充满干酪样物质，有些病例表现为气囊炎和心包炎。

5.4.3 组织切片后于显微镜下观察，肝脏的许多细胞内有核内包涵体，上皮细胞内可见核内包涵体。

### 5.5 实验室检测

5.5.1 鸽疱疹病毒分离培养，具体操作参见附录 A。

5.5.2 鸽疱疹病毒核酸检测，具体操作参见附录 B。

## 6 诊断原则

鸽疱疹病毒病的诊断是以病原学检查为主，结合流行病学史、临床表现、病理变化等进行综合分析做出诊断。流行病学史和临床表现是该病诊断的重要依据，但不是必要条件，病理变化也只是辅助诊断依据。病例确诊需严格的病原学检测证据。

## 7 诊断判定

### 7.1 鸽疱疹病毒病疑似病例

具备 5.3 或 5.4 中的任一项。

## 7.2 鸽疱疹病毒病确诊病例

具备5.5中任何一项的鸽疱疹病毒疑似病例。

## 7.3 鸽疱疹病毒病排除病例

病毒分离鉴定阴性（5.5.1），患病鸽喉气管拭子、粪便或组织样品核酸检测阴性（5.5.2），并经至少两个实验室证实，可排除鸽疱疹病毒。

中国兽医协会  
CVMA

**附 录 A**  
**（规范性附录）**  
**鸽疱疹病毒分离培养**

## A.1 实验材料

### A.1.1 仪器

倒置显微镜、台式离心机（最高离心速度不低于 5000 r/min）、组织匀浆器、研钵、生物安全柜、细胞计数仪、涡旋混合振荡器、CO<sub>2</sub> 恒温培养箱（37℃±2℃）、冰箱（2℃~8℃、-20℃、-80℃）、高速台式冷冻离心机（最高离心速度不低于 12000 r/min）、单道（或多道）微量移液器（2.5μL、10μL、100μL、200μL、1000μL）。

### A.1.2 耗材

离心管（1.5 mL、2 mL、15 mL、50 mL）、采样管（5 mL）、细胞培养瓶（25 cm<sup>2</sup>、75cm<sup>2</sup>）、细胞培养板（96 孔、48 孔、24 孔、6 孔）、剪刀（含弯头剪刀）、镊子（含弯头镊子）、采样专用商品化棉拭子、一次性采血管（含针头）、注射器（1 mL、5 mL、10 mL）、标签、记号笔。

### A.1.3 试剂的准备

PBS: 配方见 D.1

细胞培养液于维持液: 配方见 D.2

DEPC 水: 配方见 D.3

### A.1.4 样品采集

#### A.1.4.1 血清

用无菌注射器直接采集血液至灭菌离心管或采用一次性采血管采集血液，分离血清，编号备用。

#### A.1.4.2 组织样品

无菌采集发病鸽的喉气管、肝脏、粪便等样品，将采集的样品装入无菌采样袋或其他灭菌容器，编号，立即在-20℃冻存。

#### A.1.4.3 口咽拭子

对疑似为急性感染期或持续感染的鸽，采集口咽拭子。将棉拭子深入口腔直到咽部来回擦拭 2 次~3 次并旋转，取分泌物；将采样后的拭子放入盛有 2.0mL PBS（配方见附录 A 的）的采样管中，编号备用。

### A.1.5 样品贮运

样品采集后置保温箱，加入预冷的冰袋，密封。样品的运输按照相关的运输要求包装，并以最快的方式（尽可能 24h 内送达）送实验室进行检测。

### A.1.6 样品处理

#### A.1.6.1 血清

无菌采血后，将样品管放于室温，静置 1 h，再于 4℃冰箱放置 1h 或过夜，2000 r/min 离心 5 min~10 min，无菌吸取上层血清，编号备用，将样品冻融 3 次后，2000 r/min 离心 5 min~10 min，无菌吸取上层血清（如怀疑可能污染时按总体积的 10%加入 10 000 U/mL 青霉素和链霉素的 PBS），编号备用。

#### A.1.6.2 组织样品

用无菌剪刀和镊子剪取待检样品 2.0g 于研钵或组织匀浆器中充分研磨，再加 10.0 mL PBS（含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素），编号备用。

#### A.1.6.3 口咽拭子

用含 10 000 U/mL 青霉素和链霉素的细胞培养液 4 倍稀释后，2000 r/min 离心 15 min 取上清液，编号备用。

#### A.1.7 样品存放

采集或处理好的样品在 2℃~8℃条件下保存不应超过 24 h；若需长期保存，应放置在-70℃以下保存，冻融不超过 3 次。

### A.3 病毒分离培养

#### A.3.1 实验步骤

##### A.3.1.1 制备单层细胞

将鸡胚成纤维细胞（CEF）传代细胞用 0.25%EDTA-胰酶消化液消化分散后，用细胞培养液分散为浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL ~  $2 \times 10^6$  个/mL，分装细胞培养瓶，37℃恒温培养箱 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 12h~24h，形成单层备用。

##### A.3.1.2 接种细胞

每份样品接种 2 瓶细胞，另设细胞对照两瓶。接种前，先弃去细胞培养瓶中的培养液，按最终细胞维持液体积的 10%加入已经处理好的样品，37℃吸附 1h，加细胞维持液（配方见 E.1）。细胞对照瓶不接种样品，弃去细胞培养液后加入等量细胞维持液，37℃恒温培养箱 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。

##### A.3.1.3 观察记录

每天观察并记录，如对照细胞层完好，接种病料的细胞出现 CPE，当出现 CPE 细胞达 70%以上时，取出置于-80℃备用。无 CPE 的细胞瓶于接种后 48 h~96 h，取出置于-70℃冻存备用。

##### A.3.1.4 盲传

将第 1 代无 CPE 细胞培养物冻融 3 次后混合，3000 r/min 离心 10 min，取上清液，按照 A.3.1.2 接种细胞，按照 A.3.1.3 观察记录，盲传第 2 代。此过程中若仍未观察到 CPE 则按同样方法盲传第 3 代，培养结束后无论是否出现 CPE 均收毒，取出置于-80℃备用。取第 3 代盲传培养物进行附录 B 检测。



**附 录 B**  
**(规范性附录)**  
**核酸检测方法**

## B.1 实验材料

### B.1.1 试剂或材料

病毒DNA提取试剂盒、1.0%琼脂糖凝胶、50×TAE缓冲液、DNA分子量标准（2K plus）、2×Taq Plus PCR Master Mix。

### B.1.2 仪器设备

微量移液器、台式低温高速离心机、生物安全柜；PCR仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统。

### B.1.3 样品处理

#### B.1.3.1 阴阳性对照

以病毒培养液或已知的阳性样品作为阳性对照，以不加DNA模板的样品作为阴性对照。

#### B.1.3.2 样品的采集与处理

##### B.1.3.2.1 棉拭子采集

将棉拭子深入咽喉、肛门或鼻眼转圈；将采集后的棉拭子放入盛有1.0 mL PBS（配制方法见附录E.1）的1.5 mL的离心管，加盖，编号。

##### B.1.3.2.2 组织采集

采集病死鸽的喉气管、肝脏等组织，装入一次性灭菌容器，编号。

##### B.1.3.2.3 样品储运

样品采集后放入塑料自封袋，于保温箱中加冰袋，密封24 h内送至实验室。

#### B.1.3.3 样品的处理

##### B.1.3.3.1 棉拭子处理方法

将装有棉拭子的离心管在混合器上充分混合后，用高压灭菌的镊子将拭子中的液体挤出，4℃条件下12000 r/min离心3 min，取上清液转入无菌的1.5 mL离心管中，编号备用。

##### B.1.3.3.2 组织的处理方法

将所采集的组织置于洁净、灭菌并烘干的研钵中，称取组织按照质量体积比（1:5）加入样品保存液进行充分研磨，4℃条件下12000 r/min离心15 min。取上清转入无菌的1.5 mL的离心管备用，编号。

### B.1.4 操作步骤

#### B.1.4.1 样品DNA提取

宜选用商品化的病毒DNA提取试剂盒，也可采用其他等效的DNA提取方法。提取后利用分光光度计对DNA浓度进行检测，浓度合格方可进行后续试验。

#### B.1.4.2 PCR反应

反应管放入 PCR 检测仪内，记录反应管摆放顺序。

反应条件：

- a) 95℃ 预变性 3min;
- b) 98℃ 变性 10s;
- c) 56℃ 退火 15s;
- d) 72℃ 延伸 10s;
- e) 步骤 b) 到 d) 重复 30 次;
- f) 72℃ 终延伸 5min。

#### B.1.4.3 PCR产物检测

反应结束后，PCR 产物于 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳。每个样品的加样量为 5~10 $\mu$ L，同时以 DNA 分子质量标准为参照。110V 恒压电泳 30min，紫外灯下观察。

#### B.1.4.4 结果判定

##### B.1.4.4.1 质控标准

阴性对照处没有出现条带，阳性对照处有明显与预计大小相符的条带，实验有效。否则，此次实验视为无效。

##### B.1.4.4.2 PCR检测结果判定

阳性对照处有一条特异性的 DNA 条带。待检样品在相同位置出现 DNA 条带，判为阳性，否则为阴性。

附录 C  
(资料性附录)  
引物序列

C.1 引物

F:5'-CGCATGGTACTCGACAACGC-3'

R:5'-GTTCTGGGCAGTTGCTTCTCG-3'

C.2 反应体系

试剂	终浓度	体积
2×Taq 酶预混剂	\	10μL
F	0.5μmol/L	1μL
R	0.5μmol/L	1μL
DNA 模板	\	2μL
双蒸水	\	6μL
总体积	\	20μL

C.3 注意事项

在检测过程中，应严防不同样品间的交叉污染。在反应液分装过程中应避免产生气泡，上机前检查各反应管是否盖紧，以免泄露污染机器。

附录 D  
(资料性附录)  
溶液配制

### D.1 PBS配方

#### D.1.1 A液

0.2mol/L 磷酸二氢钠水溶液： $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  27.6g，溶于去离子水中，最后定容至 1000mL，备用。

#### D.1.2 B液

0.2mol/L 磷酸氢二钠水溶液： $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  53.6g (或  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.6g 或  $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  35.6g)，加去离子水溶解，最后定容至 1000mL，备用。

#### D.1.3 0.01mol/L, pH7.2 PBS的配制

取 A 液 14mL、B 液 36mL，加 NaCl 8.5g，用去离子水定容至 1000ml 经过滤除菌后，备用。

#### D.1.4 0.01mol/L, pH7.2 PBS (含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素)的配制

取 A 液 14mL、B 液 36mL，加 NaCl 8.5g，牛血清白蛋白 5g，用去离子水定容至 1000mL。经过滤除菌后，无菌条件下分别按 10000U/mL 加入青霉素和链霉素，备用。

### D.2 细胞培养液与细胞维持液

#### D.2.1 细胞培养液

Eagle's-MEM 培养液 87.5mL

FBS 10mL

7.5%碳酸氢钠 1.5mL

调节 pH 至 7.2~7.4，充分混匀，现配现用。

#### D.2.2 细胞维持液

Eagle's-MEM 培养液 95.5mL

FBS 2mL

7.5%碳酸氢钠 1.5mL

调节 pH 至 7.2~7.4，充分混匀，现配现用。

### D.3 DEPC水

将 DEPC 加入去离子水 (符合 GB/T6682 要求) 中至终浓度为 0.1% (体积分数)，充分混合均匀后作用 12h，分装，121℃ 高压灭菌 30min，冷却后冷藏备。