

# 团 体 标 准

T/ CVMA XXXXX—XXXX  
代替 Q/

## 鸽圆环病毒感染诊断技术规范

### Technical Specifications for Diagnosis of Pigeon Circovirus 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） 样品收集及处理.....	3
附录 B（规范性附录） 鸽圆环病毒聚合酶链式反应检测（PCR）.....	5
附录 C（规范性附录） 鸽圆环病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测.....	7
附录 D（资料性附录） 溶液配制.....	9

## 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

# 鸽圆环病毒感染诊断技术规范

## 1 范围

本文件规定了鸽圆环病毒感染引起的流行病学、临床症状、病理变化等临床诊断，样品采集与处理及实验室诊断技术要求和操作规范。

本文件适用于鸽圆环病毒的核酸、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

下列略语适用于本文件。

**EDTA:** 乙二胺四乙酸（Ethylene Diamine Tetraacetic Acid）

**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

鸽圆环病毒隶属于圆环病毒科，单股、负链环状 DNA 病毒，基因组大小为 2031~2039 nt。基因组包含 2 个主要的开放阅读框:ORF1 和 ORF2，分别编码复制相关蛋白（Rep）和唯一的结构蛋白（Cap）。

### 5.2 流行病学

鸽圆环病毒病暴发时，多数情况下表现为高发病率和低死亡率，死亡率在 1%~100%。12 月龄以下的青年鸽易感，4 月龄以下幼鸽最易感。主要通过鸽与鸽之间相互接触传播，也可经由污染的饲料、饮水、用具等引起鸽感染，种蛋也可传播该病。主要表现为感染鸽体弱，引起免疫抑制导致其他疫病发病率和死亡率升高。

### 5.3 临床症状

### 5.3.1 典型症状

死亡率取决于感染鸽的年龄及有无混合感染。感染的临床症状表现多样，大多数报道的临床症状为生长障碍和腹泻。病鸽典型症状为精神萎靡、缩颈、食欲减退、衰弱、消瘦而体重减轻、腹泻乃至呼吸困难等。

### 5.3.2 非典型症状

不典型发病，表现为翅膀、尾、羽毛进行性营养不良、大量脱落和喙变形的临床症状。

## 5.4 病理变化

5.4.1 鸽圆环病毒主要损害鸽法氏囊，可致患鸽法氏囊出现坏死、萎缩。有的损伤胸腺，病变呈深褐色。肝、肾肿大、变黄、质脆，胃肠道和肌肉由于贫血而苍白，并伴有点状出血。其他病理学变化包括坏死性喉气管炎、慢性支气管炎、坏死性肠炎、纤维素性肺泡炎、肝炎等。

5.4.2 组织病理学观察，可见初级和次级淋巴组织增生和坏死，有时可见脾脏淋巴滤泡增生，散在淋巴细胞不同程度的坏死。法氏囊细胞中可见胞浆和胞核包涵体，肠、支气管等相关淋巴组织及羽毛和羽毛囊上皮细胞中也可见到包涵体。病鸽骨髓、肝、胰、肾、肾上腺、甲状腺、睾丸、喙囊肌层中有淋巴细胞浸润。病毒感染不影响鸽血液中的红细胞数量、血红蛋白及总蛋白的含量，但白细胞数量变化较大。

## 5.5 实验室检测

5.5.1 鸽圆环病毒检测样品的采集与处理，具体操作参见附录 A。

5.5.2 鸽圆环病毒聚合酶链式反应检测（PCR），具体操作参见附录 B。

5.5.3 鸽圆环病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测，具体操作参见附录 C。

## 6 诊断原则

鸽圆环病毒感染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 鸽圆环病毒感染疑似病例

具备 5.3 或 5.4 中的任一项。

### 7.2 鸽圆环病毒感染确诊病例

5.5.2或5.5.3中核酸检测阳性的鸽圆环病毒疑似病例。

### 7.3 鸽圆环病毒感染排除病例

死亡病鸽的内脏（法氏囊、肝和脾）或粪便样品核酸检测阴性（5.5.2、5.5.3），并经至少两个实验室证实，可排除鸽圆环病毒。

**附 录 A**  
**（规范性附录）**  
**样品收集及处理**

### A.1 实验材料

#### A.1.1 仪器

台式离心机（最高离心速度不低于5000 r/min）、组织匀浆器、研钵、生物安全柜仪、涡旋混合振荡器、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。

#### A.1.2 耗材

离心管（1.5 mL、2 mL、15 mL、50 mL）、采样管（5 mL）、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 E.1

### A.2 样品处理

#### A.2.1 棉拭子采集

收集鸽肛拭子放入塑料自封袋，于保温箱中加冰袋，密封24 h内送至实验室。

#### A.2.2 组织采集

收集病死鸽的法氏囊、肝脏、脾脏、肺脏等样品；将采集后的棉拭子放入盛有1.0 mL PBS（配制方法见附录D.1）的1.5 mL的离心管，加盖，编号。

#### A.2.3 血液样品

无菌抽取血液，加入1/10的4% EDTA溶液，混匀置于保温箱中加冰袋，密封24 h内送至实验室。

### A.3 样品的处理

#### A.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。

#### A.3.2 组织的处理方法

取 100 mg 左右待检样品，按 1:5 倍体积加入 PBS，于研钵或组织匀浆器中充分研磨，1000 g 离心 15 min，取上清液，转入 1.5 mL 离心管中编号备用。

### A.3.3 血液样品

充分混匀，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24 h内送达）送实验室进行检测。采集或处理的样品在 2~8℃条件下保存应不超过24 h；若需长期保存，应放置-70℃冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过3次）。

中国兽医协会  
CVMA

**附 录 B**  
**（规范性附录）**  
**鸽圆环病毒聚合酶链式反应检测（PCR）**

**B. 1 实验材料****B. 2 仪器**

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. 3 试剂**

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

**B. 4 引物序列**

F: 5' - GTGAGATATACGTCAAGTATGGGC-3'  
R: 5' - TACTTCCTGGTGGTCGTAGC-3'

**B. 5 阴阳性对照**

由于鸽圆环病毒无法细胞培养或鸡胚培养，因此无尚未实现病毒的体外培养。只能通过已构建的阳性质粒DNA模板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. 6 操作步骤****B. 6. 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。

**B. 6. 2 PCR反应**

反应体系：

病毒核酸提取物：1 μl；

F: 0.5 μl；

R: 0.5 μl；

2×Taq Plus PCR Master Mix: 10 μl；

ddH<sub>2</sub>O: 8 μl。

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

#### B. 6.3 PCR产物检测

反应结束后, PCR 产物于 2%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 30 min, 凝胶成像系统观察。

#### B. 6.4 结果判定

#### B. 6.5 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 (178 bp), 实验有效。否则, 此次实验视为无效。

#### B. 6.6 PCR检测结果判定

阳性对照、阴性对照成立。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 (规范性附录)

### 鸽圆环病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测

#### C.1 实验材料

##### C.1.1 仪器

微量移液器、台式低温高速离心机、生物安全柜；荧光定量PCR仪。

##### C.1.2 试剂

SYBR 2×qPCR Master Mix: SYBR®Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 反应的专用试剂，为 PCR Buffer、dNTP、RNaseH、HS Taq 酶以及 SYBR® Green I 染料的预混液。

##### C.1.3 引物序列

F: 5'- GTGAGATATACGTCAAGTATGGGC-3'

R: 5'- TACTTCCTGGTGGTCGTAGC- 3'

##### C.1.4 阴阳性对照

由于鸽圆环病毒无法细胞培养或鸡胚培养，尚未实现病毒的体外培养。只能通过已构建的阳性质粒DNA模板作为阳性对照或已知的阳性样品作为，以不加DNA模板的样品作为阴性对照。

##### C.1.5 操作步骤

###### C.1.5.1 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。

###### C.1.5.2 扩增体系的配制

配制rep基因扩增反应液，设实时荧光 PCR 反应数为n，其中n为待检样品数+阳性管数+阴性管数，每个样本检测反应体系配制见表 1，向每个荧光 PCR 管或孔中分装 24μL 的反应体系。

表1 每个样品反应体系配置表

体系组分	用量	终浓度
SYBR 2×qPCR Master Mix	12 μL	1×
上游引物F	0.2 μL	0.2 μmol/L
下游引物R	0.2 μL	0.2 μmol/L
灭菌双蒸水	11.6 μL	—
总量	24 μL	—

###### C.1.5.3 加样

在样本处理区进行。在各设定的荧光PCR管中加入1  $\mu$ L DNA溶液。盖紧管盖，除气泡、离心。

#### C.1.5.4 荧光 PCR 扩增检测

rep基因扩增反应条件为：

- a) 95℃预变性30 s；
- b) 95℃变性5 s，
- c) 55℃退火 20 s，
- d) 72℃延伸 20 s

步骤b) 到d) 40 个循环。

荧光信号收集设置在每次循环的退火延伸时进行；在扩增反应结束后，分析熔解曲线。

#### C.1.5.5 结果判定

##### C.1.5.5.1 阈值设定

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值直接读取检测结果，Ct 值为每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

##### C.1.5.5.2 质控标准

阴性对照无Ct值，且无典型扩增曲线；或阴性对照Ct值 $>35.0$ ，出现扩增曲线，但rep基因熔解曲线于88℃左右未出现明显的峰值。

阳性对照Ct值 $<30.0$ ，并出现典型的扩增曲线，rep基因熔解曲线于88℃左右出现明显的峰值，否则，此次试验视为无效。

##### C.1.5.5.3 结果描述及判定

**阴性**：无Ct值并且无典型的扩增曲线；或阴性对照Ct值 $>35.0$ ，出现扩增曲线，但rep基因熔解曲线于88℃左右未出现明显的峰值，表示样品中无圆环病毒核酸。

**阳性**：Ct 值 $\leq 30.0$ ，出现典型的扩增曲线，且rep基因熔解曲线于88℃左右出现明显的峰值，表示样品中存在圆环病毒核酸。

**可疑**：30.0 $<$ Ct 值 $<35.0$ ，且出现扩增曲线的样本判定为可疑。可疑样本进行双孔重复试验，若任一孔或两孔重复试验结果为阳性者判为阳性，否则为阴性。

附 录 D  
(资料性附录)  
溶液配制

D.1 PBS配方

D.1.1 A液

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

D.1.2 B液

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

D.1.3 30.01 mol/L pH 7.2 PBS 的配制

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

D.1.4 40.01 mol/L pH 7.2 PBS（含牛血清白蛋白、青霉素和链霉素）的配制

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

D.2 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 12 h，分装，121℃ 高压灭菌 30 min，冷却后冷藏备。

---