

DB42

湖北省地方标准

DB42/T 2246.1—2024

实验用猫 第1部分：微生物学等级及监测

Experimental cat—
Part 1: Microbiological standards and monitoring

地方标准信息服务平台

2024-05-14 发布

2024-07-14 实施

湖北省市场监督管理局 发布

目 次

前言	III
引言	V
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 等级分类	1
5 微生物学等级及控制指标	2
6 监测程序	3
7 监测方法	3
8 监测规则	4
9 结果判定	5
10 判定结论	5
附录 A（规范性） 猫泛白细胞减少症病毒 PCR 检测方法	6
附录 B（规范性） 猫泛白细胞减少症病毒荧光定量 PCR 检测方法	7
附录 C（规范性） 猫疱疹病毒 I 型 PCR 检测方法	8
附录 D（规范性） 猫疱疹病毒 I 型荧光定量 PCR 检测方法	9
附录 E（规范性） 猫杯状病毒 RT-PCR 逆转录检测方法	10
附录 F（规范性） 猫杯状病毒 RT-荧光定量 PCR 逆转录检测方法	11
附录 G（规范性） 猫狂犬病病毒巢式 RT-PCR 逆转录检测方法	13
附录 H（规范性） 猫传染性腹膜炎病毒 RT-PCR 逆转录检测方法	14
附录 I（规范性） 猫传染性腹膜炎病毒 RT-荧光定量 PCR 逆转录检测方法	15
附录 J（规范性） 猫免疫缺陷病毒 RT-PCR 逆转录检测方法	17
附录 K（规范性） 猫免疫缺陷病毒 RT-荧光定量 PCR 逆转录检测方法	18
附录 L（规范性） 猫白血病病毒 RT-PCR 逆转录检测方法	20
附录 M（规范性） 猫白血病病毒 RT-荧光定量 PCR 逆转录检测方法	21

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。

本文件是DB42/T 2246《实验用猫》的第1部分。DB42/T 2246已发布以下部分：

- 第1部分：微生物学等级及监测；
- 第2部分：寄生虫学等级及监测；
- 第3部分：饲养与管理。

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。

本文件由湖北省疾病预防控制中心提出。

本文件由湖北省科学技术厅归口。

本文件起草单位：湖北省疾病预防控制中心、华中农业大学、武汉科前生物股份有限公司、湖北省药品监督检验研究院、国药集团动物保健股份有限公司、湖北逸挚诚生物科技有限公司。

本文件主要起草人：杨文祥、胡长敏、樊柏林、王利霞、王平、蒋明璇、何开勇、程敏华、王启明、黎炎梅、张金明、王一茹、陈平平、杨祖丽、杨倩、谭无双、吴璇。

本文件为首次发布。

本文件实施应用中的疑问，可咨询湖北省科学技术厅基础研究处，联系电话：027-87135809，邮箱：1592769467@qq.com；对本文件的有关修改意见，请反馈至湖北省疾病预防控制中心，电话：027-87528205，邮箱：ywx_21@qq.com。

地方标准信息服务平台

引 言

实验动物是生命科学研究活的“精密仪器”和科技创新的重要支撑材料，是推动生物医药、医疗健康、现代农业高质量发展等强省战略落地的基础条件。实验用猫是我省重要的实验动物资源，广泛应用于健康医疗、生物医药、食品药品等研究和产业研发领域。湖北省科技厅作为实验动物主管部门，通过行政许可制度，依法指导实验动物产业有序发展。目前，实验动物国家、行业标准中均没有实验用猫质量技术标准，其他省市标准由于自然条件限制无法在省内直接使用。我省实验用猫面临质量技术标准缺乏的问题日益突出，不利于政府部门行政审批和监管工作的实施，也不利于我省生物医药领域科学研究、产品效验、鉴定测试等活动开展，并且存在疫病防控、生物安全等隐患。该标准将为我省颁发实验用猫生产及使用许可奠定基础，也将为规范实验用猫生产使用和其支撑的研发活动、推动生物医药和医疗技术等相关产业发展、保障公共安全等提供技术保障。

DB42/T 2246《实验用猫》旨在建立实验用猫微生物学等级及监测、寄生虫学等级及监测以及饲养与管理规范，由三个部分构成。

- 第1部分：微生物学等级及监测。目的在于规定实验用猫的等级分类、微生物等级及控制指标、监测程序、监测方法、监测规则、结果判定、判定结论等要求。
- 第2部分：寄生虫学等级及监测。目的在于规定实验用猫的等级分类、寄生虫学等级及控制指标、监测程序、监测方法、监测规则、结果判定、判定结论等要求。
- 第3部分：饲养与管理。目的在于规定实验用猫的环境与设施、人员、饲养条件、清洁卫生、饲养管理、繁殖、疾病监测、动物运输、废弃物处理等要求。

地方标准信息服务平台

实验用猫

第1部分：微生物学等级及监测

1 范围

本文件规定了实验用猫的等级分类、微生物等级及控制指标、监测程序、监测方法、监测规则、结果判定、判定结论等。

本文件适用于实验用猫微生物学等级及监测。

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 14922 实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测
- GB/T 14926.1 实验动物 沙门菌检测方法
- GB/T 14926.4 实验动物 皮肤病原真菌检测方法
- GB/T 14926.5 实验动物 多杀巴斯德杆菌检测方法
- GB/T 14926.6 实验动物 支气管鲍特杆菌检测方法
- GB/T 14926.50-2001 实验动物 实验动物酶联免疫吸附试验
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- 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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验用猫 experimental cat

经人工饲养，对其携带的病原微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产和检定以及其它科学实验的猫。

3.2

普通级实验用猫 conventional (CV) experimental cat

不携带所规定的对动物和（或）人健康造成严重危害的人兽共患病原体 and 动物烈性传染病病原体的实验用猫。

3.3

无特定病原体级实验用猫 specific pathogen free (SPF) experimental cat

除普通级动物应排除的病原体外，不携带对动物健康危害大和（或）对科学研究干扰大的病原体的实验用猫。

4 等级分类

实验用猫按微生物与寄生虫控制等级分类，包括普通级实验用猫和无特定病原体级实验用猫。

5 微生物学等级及控制指标

5.1 外观指标

5.1.1 实验用猫应体态丰满、发育正常、毛浓密有光泽、眼睛明亮活泼、反应灵敏、食欲良好。

5.1.2 实验用猫外观检查参照下面的方法：

- a) 眼睛：瞳孔应清晰，眼睛无分泌物，眼睑无发炎；
- b) 耳：耳道无分泌物溢出，耳廓无缺陷。在安静状态下，对声响反应灵敏；
- c) 鼻：无浆液性、粘液性及脓性分泌物渗出；
- d) 口腔：口腔周围清洁干燥，无呕吐，无唾液、食物等；
- e) 皮肤：无创伤、脓疮、疥癣、湿疹；
- f) 四肢：无骨折、变形等现象；
- g) 肛门：无分泌物，附近被毛无污物。

5.2 微生物指标

普通级实验用猫和无特定病原体级实验用猫微生物检测项目按照表1的规定执行。

表1 实验用猫微生物检测项目

动物等级	微生物	检测要求
普通级	猫泛白细胞减少症病毒 Feline panleukopenia virus	▲
	猫疱疹病毒I型 Feline herpesvirus type 1	▲
	猫杯状病毒 Feline calicivirus	▲
	猫狂犬病病毒 Feline rabies virus	▲
	沙门氏菌 <i>Salmonella spp.</i>	●
	皮肤病原真菌 <i>Pathogenic dermal fungi</i>	○
无特定病原体级	猫泛白细胞减少症病毒 Feline panleukopenia virus	●
	猫疱疹病毒I型 Feline herpesvirus type 1	●
	猫杯状病毒 Feline calicivirus	●
	猫狂犬病病毒 Feline rabies virus	●
	猫传染性腹膜炎病毒 Feline infectious peritonitis virus	●
	猫免疫缺陷病毒 Feline immunodeficiency virus	●
	猫白血病病毒 Feline leukemia virus	○

表1 实验用猫微生物检测项目（续）

动物等级	微生物	检测要求
无特定病原体级	沙门氏菌 <i>Salmonella spp.</i>	●
	皮肤病原真菌 <i>Pathogenic dermal fungi</i>	○
	支气管鲍特杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	●
	多杀巴斯德杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>	●
注1：●必须检测项目，要求阴性。 注2：○必要时检测项目，要求阴性。 注3：▲必须检测项目，可以免疫。		

6 监测程序

监测程序见图 1。

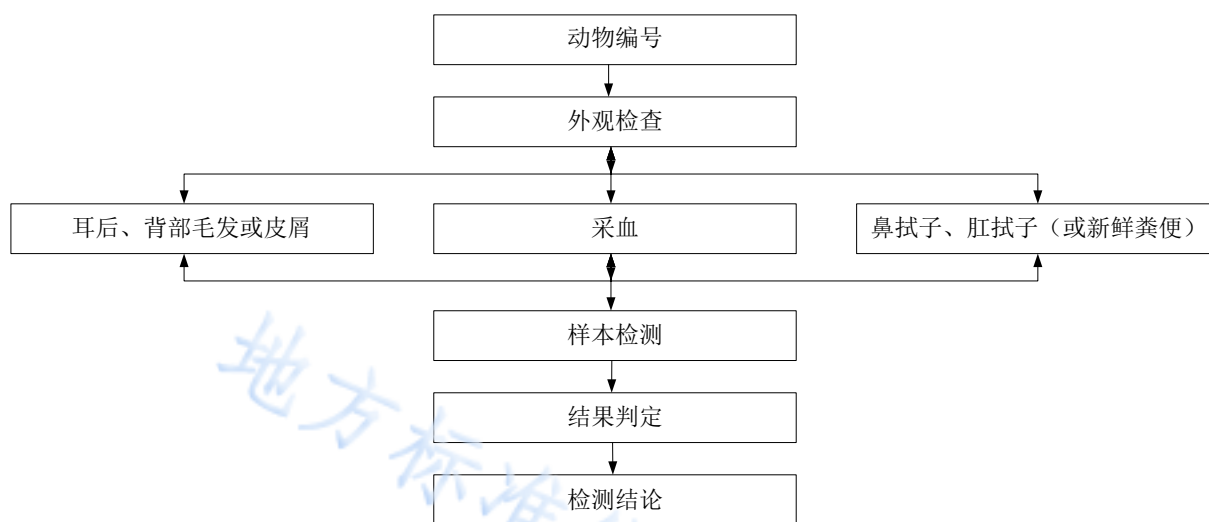


图1 实验用猫微生物学监测程序

7 监测方法

监测方法见表 2。

表2 实验用猫微生物检测方法

病原	检测方法
猫泛白细胞减少症病毒	抗体按GB/T 14926.50检测 核酸按附录 A、附录 B 方法检测
猫疱疹病毒1型	抗体按GB/T 14926.50检测 核酸按附录 C、附录 D 方法检测
猫杯状病毒	抗体按GB/T 14926.50检测 核酸按附录 E、附录 F 方法检测
猫狂犬病毒	抗体按GB/T 14926.50检测 核酸按附录 G 方法检测
沙门氏菌	按GB/T 14926.1检测
皮肤病原真菌	按GB/T 14926.4检测
猫传染性腹膜炎病毒	抗体按GB/T 14926.50检测 核酸按附录 H、附录 I 方法检测
猫免疫缺陷病毒	抗体按GB/T 14926.50检测 核酸按附录 J、附录 K 方法检测
猫白血病病毒	抗体按GB/T 14926.50检测 核酸按附录 L、附录 M 方法检测
支气管鲍特杆菌	按GB/T 14926.6检测
多杀巴斯德杆菌	按GB/T 14926.5检测

8 监测规则

8.1 监测频率

每三个月至少监测一次。

8.2 取样要求

8.2.1 应选择成年动物用于检测。

8.2.2 取样数量：每个实验用猫生产繁殖单元，根据动物多少，取样数量见表 3。

表3 实验用猫不同繁殖群体取样数量

群体大小（只）	抽样数量
<100	不少于 5 只
100~500	不少于 10 只
>500	不少于 20 只

8.3 取样、送检

8.3.1 采样方法按照 GB 14922、GB 19489、NY/T 541 规定进行。

8.3.2 可按病毒、细菌、真菌、寄生虫检测要求联合采样。

8.3.3 检测结果存疑，需要进一步确诊时，应结合临床症状和前期检测结果，按照表2 中的要求采集动物组织或特定样本，以做进一步检测。

8.3.4 样本要求有明显标识，写明检品名称、动物品种、等级、数量及检测项目等内容，安全送达实验室。

8.4 检测项目分类

8.4.1 必须检测项目：指在进行实验用猫质量评价、等级确定时必须检测的项目。

8.4.2 必要时检测项目：指相关行政部门要求时、本病流行时、进出口时，或特定实验要求时需要检测的项目。

9 结果判定

免疫项目，群体免疫合格率大于等于70%，判为合格。

非免疫项目，血清抗体阴性或核酸检测阴性判为合格。

10 判定结论

在监测的各等级动物中，如有某项指标不符合该等级标准指标，则判为不符合该等级标准。

附录 A
(规范性)

猫泛白细胞减少症病毒 PCR 检测方法

A.1 待测样本 DNA 的提取与保存

将样本按照DNA提取试剂盒的操作说明提取DNA，冻存于-70℃冰箱备用。

A.2 PCR 反应引物

根据vp2基因序列 (GenBank:AF015223) 设计:

- a) 上游引物序列 (5' -3'): AGTTCAACAAGATAAAAGAC;
- b) 下游引物序列 (5' -3'): TCCTGTATCTTGATGTGCTA。

A.3 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照: 取已知阳性的同类样品作为阳性对照, 也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照: 取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照: 在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为空白对照。

A.4 PCR 反应体系及条件

A.4.1 反应体系

25 μ L体系: 包括2 \times tag酶12.5 μ L, 上下游引物 (10 μ M) 各1 μ L, 模板DNA 1 μ L, 用灭菌双蒸水补齐。

A.4.2 反应条件

94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 72℃继续延伸5 min; 第2到第4步35个循环。

A.5 PCR 产物大小

301 bp。

A.6 结果判定

阳性对照出现301 bp的目的片段, 阴性对照无条带, 实验成立; 待检样品出现301 bp目的片段, 判定猫泛白细胞减少症病毒阳性; 未出现301 bp目的片段, 判定猫泛白细胞减少症病毒阴性。

附录 B

(规范性)

猫泛白细胞减少症病毒荧光定量 PCR 检测方法

B.1 待测样本 DNA 的提取与保存

将样本按照DNA提取试剂盒的操作说明提取DNA，冻存于-70℃冰箱备用。

B.2 荧光定量 PCR 反应引物

根据vp2基因序列 (GenBank:AF015223) 设计:

- a) 上游引物序列 (5' -3'): GGTGAAAGGTAAATTAGTA;
- b) 下游引物序列 (5' -3'): GGTACATAGTTAAATTGGTTATC;
- c) 探针序列 (5' -3'): (FAM) ACTAAGAGCATCTCATACTTGAATCC (BHQ1)。

B.3 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照: 取已知阳性的同类样品作为阳性对照, 也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照: 取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照: 在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为空白对照。

B.4 荧光定量 PCR 反应体系及条件

B.4.1 反应体系

20 μL 体系: 包括2 \times AceQ qPCR Probe Master Mix 10 μL , 上下游引物 (10 μM) 各0.3 μL , 探针 (10 μM) 0.3 μL , 模板DNA 1 μL , 用灭菌双蒸水补齐。

B.4.2 反应条件

95℃预变性2 min, 95℃变性15 s, 54℃退火30 s (荧光信号采集); 第2到第3步40个循环。

B.5 结果判定

阳性对照Ct值 \leq 35, 有明显荧光扩增曲线, 阴性对照无Ct值, 并且无荧光扩增曲线, 试验有效; 待检样品有荧光扩增曲线, 且Ct值 \leq 35, 判定猫疱疹病毒I型阳性; 待检样品无荧光扩增曲线, 或Ct值 $>$ 35, 判定猫疱疹病毒I型阴性。

附录 C
(规范性)

猫疱疹病毒 I 型 PCR 检测方法

C.1 待测样本 DNA 的提取与保存

将样本按照DNA提取试剂盒的操作说明提取DNA，冻存于-70℃冰箱备用。

C.2 PCR 反应引物

根据UL23基因序列 (GenBank:FJ478159.2) 设计:

- a) 上游引物序列 (5' -3'): GACGTGGTGAATTATCAGC;
- b) 下游引物序列 (5' -3'): CAACTAGATTTCACCAGGA。

C.3 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照: 取已知阳性的同类样品作为阳性对照, 也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照: 取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照: 在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为空白对照。

C.4 PCR 反应体系及条件

C.4.1 反应体系

25 μ L体系: 包括2 \times tag酶12.5 μ L, 上下游引物 (10 μ M) 各1 μ L, 模板DNA 1 μ L, 用灭菌双蒸水补齐。

C.4.2 反应条件

94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 52℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 72℃继续延伸5 min; 第2到第4步35个循环。

C.5 PCR 产物大小

288 bp。

C.6 结果判定

阳性对照出现288 bp的目的片段, 阴性对照无条带, 实验成立; 待检样品出现288 bp目的片段时, 判定猫疱疹病毒I型阳性; 未出现288 bp目的片段时, 判定猫疱疹病毒I型阴性。

附录 D

(规范性)

猫疱疹病毒 I 型荧光定量 PCR 检测方法

D.1 待测样本 DNA 的提取与保存

将样本按照DNA提取试剂盒的操作说明提取DNA，冻存于-70℃冰箱备用。

D.2 荧光定量 PCR 反应引物

根据UL23基因序列 (GenBank:FJ478159.2) 设计:

- a) 上游引物序列 (5' -3'): GACGTGGTGAATTATCAG;
- b) 下游引物序列 (5' -3'): CCTGTTATTGTGGATAGTC;
- c) 探针序列 (5' -3'): (FAM) AGATGCTGCCTATATCACCGCC (BHQ1)。

D.3 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照: 取已知阳性的同类样品作为阳性对照, 也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照: 取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照: 在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为空白对照。

D.4 荧光定量 PCR 反应体系及条件

D.4.1 反应体系

20 μL 体系: 包括2 \times AceQ qPCR Probe Master Mix 10 μL , 上下游引物 (10 μM) 各0.3 μL , 探针 (10 μM) 0.3 μL , 模板DNA 1 μL , 用灭菌双蒸水补齐。

D.4.2 反应条件

95℃预变性2 min, 95℃变性15 s, 54℃退火30 s (荧光信号采集); 第2到第3步40个循环。

D.5 结果判定

阳性对照Ct值 \leq 35, 有明显荧光扩增曲线, 阴性对照无Ct值, 并且无荧光扩增曲线, 试验有效; 待检样品有荧光扩增曲线, 且Ct值 \leq 35, 判定猫疱疹病毒I型阳性; 待检样品无荧光扩增曲线, 或Ct值 $>$ 35, 判定猫疱疹病毒I型阴性。

附录 E
(规范性)

猫杯状病毒 RT-PCR 逆转录检测方法

E.1 病毒 RNA 的提取

按照病毒RNA提取试剂盒操作方法进行，提取的RNA冻存于-70℃冰箱备用。

E.2 PCR 反应引物

根据ORF2基因序列 (GenBank: MZ712023) 设计:

- a) 上游引物序列 (5' -3'): AACCTGCGCTAACGTGCTT;
- b) 下游引物序列 (5' -3'): CAGTGACAATACACCCAGAA。

E.3 逆转录反应体系及条件

E.3.1 反应体系

50 μL体系: 包括2×One Step Mix (Dye Plus) 25 μL, One Step Enzyme Mix 2.5 μL, 上下游引物 (10 μM) 各2 μL, 模板RNA 3 μL, 用RNase-free ddH₂O补齐。

E.3.2 反应条件

50℃逆转录30 min, 94℃预变性3 min, 94℃变性30 min, 55℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 72℃继续延伸7 min; 第3到第5步35个循环。

E.4 PCR 产物大小

926 bp。

E.5 结果判定

阳性对照出现926 bp的目的片段, 阴性对照无条带, 实验成立; 待检样品出现926 bp目的片段时, 判定猫杯状病毒阳性; 未出现926 bp目的片段时, 判定猫杯状病毒阴性。

附录 F (规范性)

猫杯状病毒 RT-荧光定量 PCR 逆转录检测方法

F.1 待测样本 RNA 的提取与保存

按照病毒RNA提取试剂盒操作方法进行，提取的RNA测完浓度后冻存于-70℃冰箱备用。

F.2 荧光定量 PCR 反应引物

根据VP1基因序列 (GenBank:KM111171) 设计：

- a) 上游引物序列 (5' -3')：GATGCTAGAAACACCAAC；
- b) 下游引物序列 (5' -3')：CCTGATTCTTTTGCTGTC；
- c) 探针序列 (5' -3')：(FAM) ATCCTTCAGAATCAATGCCTATATCAA (BHQ1)。

F.3 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为空白对照。

F.4 逆转录反应体系及条件

F.4.1 反应体系 (建议根据所用逆转录商品化试剂盒说明书使用)

16 μL 体系：包括4 \times gDNA wiper Mix 4 μL ，Oligo (dT) 23VN (50 μM) 1 μL ，Random hexamers (50 ng/ μL) 1 μL ，模板RNA 500 ng，用RNase-free ddH₂O补齐。

20 μL 体系：包括16 μL 混合液，10 \times RT Mix 2 μL ，HiScript II Enzyme Mix 2 μL 。

F.4.2 反应条件 (建议根据所用逆转录商品化试剂盒说明书使用)

16 μL 体系反应条件：42℃反应2 min。

20 μL 体系反应条件：50℃反应15 min，85℃反应2 min。

F.5 荧光定量 PCR 反应体系及条件

F.5.1 反应体系

20 μL 体系：包括2 \times AceQ qPCR Probe Master Mix 10 μL ，上下游引物 (10 μM) 各0.3 μL ，探针 (10 μM) 0.3 μL ，模板DNA 1 μL ，用灭菌双蒸水补齐。

F.5.2 反应条件

95℃预变性2 min，95℃变性15 s，54℃退火30 s (荧光信号采集)；第2到第3步40个循环。

F.6 结果判定

阳性对照Ct值 ≤ 35 ，有明显荧光扩增曲线，阴性对照无Ct值，并且无荧光扩增曲线，试验有效；待检样品有荧光扩增曲线，且Ct值 ≤ 35 ，判定猫疱疹病毒I型阳性；待检样品无荧光扩增曲线，或Ct值 > 35 ，判定猫疱疹病毒I型阴性。

地方标准信息服务平台

附录 G

(规范性)

猫狂犬病病毒巢式 RT-PCR 逆转录检测方法

G.1 病毒 RNA 的提取

按照病毒RNA提取试剂盒操作方法进行，提取的RNA冻存于-70℃冰箱备用。

G.2 PCR 反应引物

第一次反应引物：

a) 上游引物序列 (5' -3')：GTGTAACACCTCTACAATGG；

b) 下游引物序列 (5' -3')：ACAGTCTCYTCNGCCATCT。

第二次反应引物：

a) 上游引物序列 (5' -3')：CAAGATGTGYGCYAAYTGGAG

b) 下游引物序列 (5' -3')：AGCCCTGGTTCGAACATTCT

(简并引物，其中Y=C/T, N=A/C/G/T)

G.3 逆转录

使用逆转录试剂盒对所提RNA进行逆转录，制备cDNA。

G.4 PCR 反应条件

G.4.1 第一次PCR反应条件

以制备的cDNA为模板，进行第一次PCR反应，条件如下。

95℃预变性5 min；95℃变性30 s，56℃退火30 s，72℃延伸30 s，30个循环；72℃延伸2 min。

G.4.2 第二次PCR反应的条件

以第一次PCR产物为模板，进行第二次PCR反应，条件如下。

95℃预变性5 min；95℃变性30 s，56℃退火30 s，72℃延伸30 s，30个循环；72℃延伸2 min。

G.5 PCR 产物大小

239 bp。

G.6 结果判定

阳性对照出现239 bp的目的片段，阴性对照无条带，实验成立；待检样品出现239 bp目的片段时，判定猫狂犬病病毒阳性；未出现239 bp目的片段时，判定猫狂犬病病毒阴性。

附录 H
(规范性)

猫传染性腹膜炎病毒 RT-PCR 逆转录检测方法

H.1 病毒 RNA 的提取

按照病毒RNA提取试剂盒操作方式进行，提取的RNA冻存于-70℃冰箱备用。

H.2 PCR 反应引物

根据3' UTR基因序列 (GenBank:GQ233036) 设计:

- a) 上游引物序列 (5' -3'): GGCAACCCGATGTTTAAACTGG;
- b) 下游引物序列 (5' -3'): CACTAGATCCAGACGTTAGCTC。

H.3 逆转录反应体系及条件

H.3.1 反应体系

50 μL体系: 包括2×One Step Mix (Dye Plus) 25 μL, One Step Enzyme Mix 2.5 μL, 上下游引物 (10 μM) 各2 μL, 模板RNA 3 μL, 用RNase-free ddH₂O补齐。

H.3.2 反应条件

50℃逆转录30 min, 94℃预变性3 min, 94℃变性30 min, 55℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 72℃继续延伸7 min; 第3到第5步35个循环。

H.4 PCR 产物大小

223 bp。

H.5 结果判定

阳性对照出现223 bp的目的片段, 阴性对照无条带, 实验成立; 待检样品出现223 bp目的片段时, 判定猫传染性腹膜炎病毒阳性; 未出现223 bp目的片段时, 判定猫传染性腹膜炎病毒阴性。

附录 I (规范性)

猫传染性腹膜炎病毒 RT-荧光定量 PCR 逆转录检测方法

1.1 待测样本 RNA 的提取与保存

按照病毒RNA提取试剂盒操作方法进行，提取的RNA测完浓度后冻存于-70℃冰箱备用。

1.2 荧光定量 PCR 反应引物

根据3' UTR基因序列 (GenBank:GQ233036) 设计：

- a) 上游引物序列 (5' -3')：TTGGCAATGCTAGATTTAGTA；
- b) 下游引物序列 (5' -3')：TCCAGACGTTAGCTCTTC；
- c) 探针序列 (5' -3')：(FAM) TCCGCTATGACGAGCCAACA (BHQ1)。

1.3 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为空白对照。

1.4 逆转录反应体系及条件

1.4.1 反应体系 (建议根据所用逆转录商品化试剂盒说明书使用)

16 μL 体系：包括4 \times gDNA wiper Mix 4 μL ，Oligo (dT) 23VN (50 μM) 1 μL ，Random hexamers (50 ng/ μL) 1 μL ，模板RNA 500 ng，用RNase-free ddH₂O补齐。

20 μL 体系：包括16 μL 混合液，10 \times RT Mix 2 μL ，HiScript II Enzyme Mix 2 μL 。

1.4.2 反应条件 (建议根据所用逆转录商品化试剂盒说明书使用)

16 μL 体系反应条件：42℃反应2 min。

20 μL 体系反应条件：50℃反应15 min，85℃反应2 min。

1.5 荧光定量 PCR 反应体系及条件

1.5.1 反应体系

20 μL 体系：包括2 \times AceQ qPCR Probe Master Mix 10 μL 、上下游引物 (10 μM) 各0.3 μL ，探针 (10 μM) 0.3 μL ，模板DNA 1 μL ，用灭菌双蒸水补齐。

1.5.2 反应条件

95℃预变性2 min，95℃变性15 s，58℃退火30 s (荧光信号采集)；第2到第3步40个循环。

1.6 结果判定

阳性对照Ct值 ≤ 35 ，有明显荧光扩增曲线，阴性对照无Ct值，并且无荧光扩增曲线，试验有效；待检样品有荧光扩增曲线，且Ct值 ≤ 35 ，判定猫疱疹病毒I型阳性；待检样品无荧光扩增曲线，或Ct值 > 35 ，判定猫疱疹病毒I型阴性。

地方标准信息服务平台

附录 J

(规范性)

猫免疫缺陷病毒 RT-PCR 逆转录检测方法

J.1 待测样本 RNA 的提取与保存

将样本按照RNA 提取试剂盒的操作说明提取RNA，冻存于-70℃冰箱备用。

J.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

J.3 PCR 反应引物

根据Pol基因序列（GenBank:MF352016）设计：

a) 上游引物序列（5' -3'）：ACTGAGAAAGGAGCAGAGGTC；

b) 下游引物序列（5' -3'）：CTGGTCCCGCATTATTCTTCC。

J.4 逆转录反应体系及条件

J.4.1 反应体系

50 μL体系：包括2×One Step Mix (Dye Plus) 25 μL，One Step Enzyme Mix 2.5 μL，上下游引物（10 μM）各2 μL，模板RNA 3 μL，用RNase-free ddH₂O补齐。

J.4.2 反应条件

50℃逆转录30 min，94℃预变性3 min，94℃变性30 min，55℃退火30 s，72℃延伸30 s，72℃继续延伸7 min；第3到第5步35个循环。

J.5 PCR 产物大小

172 bp。

J.6 结果判定

阳性对照出现172 bp的目的片段，阴性对照无条带，实验成立；待检样品出现172 bp目的片段时，判定猫传染性腹膜炎病毒阳性；未出现172 bp目的片段时，判定猫传染性腹膜炎病毒阴性。

附录 K
(规范性)

猫免疫缺陷病毒 RT-荧光定量 PCR 逆转录检测方法

K.1 待测样本 RNA 的提取与保存

按照病毒RNA提取试剂盒操作方法进行，提取的RNA测完浓度后冻存于-70℃冰箱备用。

K.2 荧光定量 PCR 反应引物

根据Pol基因序列 (GenBank:MF352016) 设计：

- a) 上游引物序列 (5' -3') : CCAGATTATGCTCCTTATAC;
- b) 下游引物序列 (5' -3') : CCTGTGGTAAACTACAC;
- c) 探针序列 (5' -3') : (FAM) TTCTTCCTGGTCCCGCATTATTCT (BHQ1) 。

K.3 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为空白对照。

K.4 逆转录反应体系及条件

K.4.1 反应体系 (建议根据所用逆转录商品化试剂盒说明书使用)

16 μ L体系：包括4 \times gDNA wiper Mix 4 μ L, Oligo (dT) 23VN (50 μ M) 1 μ L, Ramdon hexamers (50 ng/ μ L) 1 μ L, 模板RNA 500 ng, 用RNase-free ddH₂O补齐。

20 μ L体系：包括16 μ L混合液, 10 \times RT Mix 2 μ L, HiScript II Enzyme Mix 2 μ L。

K.4.2 反应条件 (建议根据所用逆转录商品化试剂盒说明书使用)

16 μ L体系反应条件：42℃反应2 min。

20 μ L体系反应条件：50℃反应15 min, 85℃反应2 min。

K.5 荧光定量 PCR 反应体系及条件

K.5.1 荧光定量PCR反应体系

20 μ L体系：包括2 \times AceQ qPCR Probe Master Mix 10 μ L、上下游引物 (10 μ M) 各0.3 μ L, 探针 (10 μ M) 0.3 μ L, 模板DNA 1 μ L, 用灭菌双蒸水补齐。

K.5.2 荧光定量PCR反应条件

95℃预变性2 min, 95℃变性15 s, 56℃退火30 s (荧光信号采集)；第2到第3步40个循环。

K.6 结果判定

阳性对照Ct值 ≤ 35 ，有明显荧光扩增曲线，阴性对照无Ct值，并且无荧光扩增曲线，试验有效；待检样品有荧光扩增曲线，且Ct值 ≤ 35 ，判定猫疱疹病毒I型阳性；待检样品无荧光扩增曲线，或Ct值 > 35 ，判定猫疱疹病毒I型阴性。

地方标准信息服务平台

附录 L
(规范性)

猫白血病病毒 RT-PCR 逆转录检测方法

L.1 病毒 RNA 的提取

按照病毒RNA提取试剂盒操作方式进行，提取的RNA冻存于-70℃冰箱备用。

L.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

L.3 PCR 反应引物

根据Env基因序列 (GenBank:MW731550.1) 设计：

a) 上游引物序列 (5' -3')：TGTTGCCCTCATGTTGGGAG；

b) 下游引物序列 (5' -3')：CTGTGTGCATGGCCATTTGT。

L.4 逆转录反应体系及条件

L.4.1 反应体系

50 μL体系：包括2×One Step Mix (Dye Plus) 25 μL，One Step Enzyme Mix 2.5 μL，上下游引物 (10 μM) 各2 μL，模板RNA 3 μL，用RNase-free ddH₂O补齐。

L.4.2 反应条件

50℃逆转录30 min，94℃预变性3 min，94℃变性30 min，55℃退火30 s，72℃延伸30 s，72℃继续延伸7 min；第3到第5步35个循环。

L.5 PCR 产物大小

119 bp。

L.6 结果判定

阳性对照出现119 bp的目的片段，阴性对照无条带，实验成立；待检样品出现119 bp目的片段时，判定猫白血病病毒阳性；未出现119 bp目的片段时，判定猫白血病病毒阴性。

附录 M

(规范性)

猫白血病病毒 RT-荧光定量 PCR 逆转录检测方法

M.1 待测样本 RNA 的提取与保存

按照病毒RNA提取试剂盒操作方法进行，提取的RNA测完浓度后冻存于-70℃冰箱备用。

M.2 荧光定量 PCR 反应引物

根据Env基因序列 (GenBank:MW731550.1) 设计:

- a) 上游引物序列 (5' -3'): TTGGGAGGACTCACTGTA;
- b) 下游引物序列 (5' -3'): GCCATTGTAGTTGTCTAAAC;
- c) 探针序列 (5' -3'): (FAM) CTTTAGTCCCTGTCCCACCC (BHQ1)。

M.3 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照: 取已知阳性的同类样品作为阳性对照, 也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照: 取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照: 在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为空白对照。

M.4 逆转录反应体系及条件

M.4.1 反应体系 (建议根据所用逆转录商品化试剂盒说明书使用)

16 μL 体系: 包括4 \times gDNA wiper Mix 4 μL , Oligo (dT) 23VN (50 μM) 1 μL , Ramdon hexamers (50 ng/ μL) 1 μL , 模板RNA 500 ng, 用RNase-free ddH₂O补齐。

20 μL 体系: 包括16 μL 混合液, 10 \times RT Mix 2 μL , HiScript II Enzyme Mix 2 μL 。

M.4.2 反应条件 (建议根据所用逆转录商品化试剂盒说明书使用)

16 μL 体系反应条件: 42℃反应2 min。

20 μL 体系反应条件: 50℃反应15 min, 85℃反应2 min。

M.5 荧光定量 PCR 反应体系及条件

M.5.1 反应体系

20 μL 体系: 包括2 \times AceQ qPCR Probe Master Mix 10 μL 、上下游引物 (10 μM) 各0.3 μL , 探针 (10 μM) 0.3 μL , 模板DNA 1 μL , 用灭菌双蒸水补齐。

M.5.2 反应条件

95℃预变性2 min, 95℃变性15 s, 58℃退火30 s (荧光信号采集); 第2到第3步40个循环。

M.6 结果判定

阳性对照Ct值 ≤ 35 ，有明显荧光扩增曲线，阴性对照无Ct值，并且无荧光扩增曲线，试验有效；待检样品有荧光扩增曲线，且Ct值 ≤ 35 ，判定猫疱疹病毒I型阳性；待检样品无荧光扩增曲线，或Ct值 > 35 ，判定猫疱疹病毒I型阴性。

地方标准信息服务平台