|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 11.220 |
| CCS | B 41 |

|  |
| --- |
| NY |

中华人民共和国农业行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

猫嵌杯病毒感染诊断技术

Diagnostic techniques for feline calicivirus infection

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中华人民共和国农业农村部  发布

目  次

[前言 Ⅲ](#_Toc13182)

[1 范围 1](#_Toc30808)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc3643)

[3 术语和定义 1](#_Toc1706)

[4 缩略语 1](#_Toc30920)

[5 临床诊断 2](#_Toc13084)

[5.1 流行病学 2](#_Toc10571)

[5.2 临床症状 2](#_Toc12347)

[5.3 病理变化 2](#_Toc1907)

[5.4 结果判定 2](#_Toc21547)

[6 样品采集、保存、运输和处理 2](#_Toc5246)

[6.1 总则 2](#_Toc1090)

[6.2 试剂 2](#_Toc30253)

[6.3 采样用具 3](#_Toc30594)

[6.4 样品采集 3](#_Toc20971)

[6.5 样品保存与运输 3](#_Toc349)

[6.6 样品处理 3](#_Toc14854)

[7 病毒分离与鉴定 4](#_Toc15802)

[7.1 试剂 4](#_Toc16841)

[7.2 仪器设备 4](#_Toc22517)

[7.3 操作方法 4](#_Toc31230)

[7.4 病毒鉴定 5](#_Toc20620)

[7.5 结果判定 5](#_Toc13903)

[8 反转录多酶恒温快速扩增侧向层析试纸条（RT-MIRA-LFD） 5](#_Toc30159)

[8.1 试剂 5](#_Toc18662)

[8.2 仪器设备 6](#_Toc5178)

[8.3 操作方法 6](#_Toc23659)

[8.4 结果判定 6](#_Toc11934)

[9 荧光RT-RAA方法 6](#_Toc9955)

[9.1 试剂 6](#_Toc8610)

[9.2 仪器设备 7](#_Toc6301)

[9.3 操作方法 7](#_Toc17652)

[9.4 结果判定 7](#_Toc14151)

[10 普通RT-PCR方法 7](#_Toc6661)

[10.1 试剂 8](#_Toc8090)

[10.2 仪器设备 8](#_Toc16380)

[10.3 操作方法 8](#_Toc11034)

[10.4 结果判定 8](#_Toc27211)

[11 实时荧光RT-PCR方法 9](#_Toc14249)

[11.1 试剂 9](#_Toc2579)

[11.2 仪器设备 9](#_Toc31026)

[11.3 操作方法 9](#_Toc13830)

[11.4 结果判定 9](#_Toc5140)

[12 间接ELISA抗体检测方法 10](#_Toc25600)

[12.1 试剂 10](#_Toc440)

[12.2 仪器设备 10](#_Toc30047)

[12.3 操作方法 10](#_Toc22803)

[12.4 结果判定 11](#_Toc1194)

[13 综合判定 11](#_Toc2392)

[13.1 疑似 11](#_Toc13495)

[13.2 确诊 11](#_Toc964)

[附录A （规范性） 试剂配制 1](#_Toc16541)2

[附录B （规范性） 核酸提取 1](#_Toc30011)4

[附录C （规范性） 重组FCV VP1蛋白的制备 1](#_Toc13191)5

[附录D （资料性） 主要临床症状和CPE参考图 1](#_Toc25364)6

[附录E （资料性） FCV 普通RT-PCR扩增核酸片段参考序列 1](#_Toc31215)7

[附录F （资料性） 典型扩增曲线示意图 1](#_Toc19037)8

1. 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。

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农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会（SAC/TC181）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

猫嵌杯病毒感染诊断技术

* 1. 范围

本文件规定了猫嵌杯病毒感染的临床诊断，样品采集、保存、运输和处理，以及病毒分离与鉴定、反转录多酶恒温快速扩增-侧向层析试纸条（RT-MIRA-LFD）、荧光RAA方法、普通RT-PCR方法、实时荧光RT-PCR方法、间接ELISA抗体检测方法等实验室检测的技术要求和综合判定。

本文件适用于猫嵌杯病毒感染的检测和诊断。

* 1. 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 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

* 1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

* 1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

实时荧光RT-PCR：实时荧光反转录聚合酶链式反应（Real-time reverse transcription polymerase chain reaction）

BHQ1：无荧光淬灭基团（Black hole quencher-1）

BSA：牛血清白蛋白（Bovine albumin）

CPE：细胞病变（Cytopathic effect）

*Ct*值：每个反应管内的荧光信号量达到设定的阈值所经历的循环数（Cycle threshold）

DEPC：焦碳酸二乙酯（Diethyl pyrocarbonate）

DMEM：杜氏改良Eagle培养基（Dulbecco's modified eagle medium）

EDTA：乙二胺四乙酸（Ethylenediaminetetraacetic acid）

ELISA：酶联免疫吸附测定（Enzyme linked immunosorbent assay）

F81：猫肾传代细胞系（Feline kidney-81 cell line）

FAM：6-羧基荧光素（6-carboxyfluorescein）

FCV：猫嵌杯病毒 （Feline calicivirus）

HRP：辣根过氧化物酶（Horseradish peroxidase）

OD：光密度（Optical density）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate-buffered saline buffer）

pH：酸碱值（Pondus hydrogenii）

RNA：核糖核酸（Ribonucleic acid）

RT-MIRA-LFD：反转录多酶恒温快速扩增-侧向层析试纸条（Reverse transcription multienzyme isothermal rapid amplification with a lateral flow dipstick）

RT-PCR：反转录聚合酶链式反应（Reverse transcription polymerase chain reaction）

RT-RAA：反转录重组酶介导的等温核酸扩增技术（Reverse transcription recombinase aided amplification）

TCID50：半数细胞感染量（Median tissue culture infective dose）

TMB：四甲基联苯胺（3,3’,5,5’-tetramethylbenzidine）

VSD：致死性全身性疾病（Virulent systemic disease）

VS-FCV：强毒性全身性猫嵌杯病毒（Virulent systemic strains of feline calicivirus

* 1. 临床诊断
     1. 流行病学
        1. FCV可感染猫以及野生猫科动物，各年龄段均可感染。
        2. 该病的传染源主要是患病猫和隐性带毒猫。患病猫在急性期可随眼鼻分泌物和排泄物排出大量病毒，污染笼具、地面等，也可直接传给易感猫。隐性带毒猫一般由急性病例发展而来，虽然临床症状消失，但可长期间歇性排毒，严重危害公共健康。
        3. FCV主要在感染动物的口腔和呼吸道内增殖，健康猫通常通过直接接触患病猫或带毒猫的分泌物或受污染的食物、饮水等而感染。
        4. FCV在环境中持续存在1个月之久，典型的潜伏期为3d～4d，在此期间可发生短暂的病毒血症。
     2. 临床症状
        1. 精神沉郁，反应迟钝，进食困难，发热（39.5℃～40.5℃），打喷嚏，呼吸困难，有呼吸道症状。
        2. 眼鼻分泌物增多、口腔溃疡及大量流涎，口腔溃疡是FCV感染的最显著的特征，嘴唇、舌和硬腭、腭中裂周围明显出现大面积的溃疡，参见附录D.1、D.2。
        3. VS-FCV感染可致猫出现VSD，临床不仅表现为严重高热、呼吸困难等上呼吸道症状，而且会出现面部及四肢水肿，面部、足部及耳部溃疡及脱毛，出血，跛行，黄疸等全身性症状，甚至能够导致患猫死亡。
     3. 病理变化

当病猫出现下列之一或全部剖检变化时，可作为初步诊断的依据之一：

1. 四肢关节偶见急性滑膜炎，滑膜增厚，关节液增多。
2. 肺腹缘暗红色实变，增生性间质性肺炎。支气管和细支气管内充满含有蛋白质的液体。
3. 全身性感染病例，可见全身不同部位的病变，包括皮下水肿；口腔、鼻腔、耳鼓和脚掌等部位有不同程度的溃疡；支气管肺炎；肝脏、脾脏和胰腺坏死等其他病理变化。
   * 1. 结果判定

若符合5.1，且符合5.2、5.3之一的，可判定为FCV感染疑似病例；疑似病例可采用实验室检测方法确诊。

* 1. 样品采集、保存、运输和处理
     1. 总则

样品采集宜在发病初期、选择具有典型临床症状的猫进行，采样过程中应避免交叉污染，样品采集、保存、运输和处理应符合GB 19489和NY/T 541的要求。

* + 1. 试剂
       1. 0.01 mol/L PBS（pH7.4）：配制方法按附录A.1。

50%甘油磷酸缓冲液（pH 7.4）：配制方法按附录 A.2

* + - 1. DMEM高糖培养基。
      2. 青霉素，浓度为100 000 IU/mL。
      3. 链霉素，浓度为100 mg/mL。
    1. 采样用具
       1. 无菌剪刀。
       2. 无菌镊子。
       3. 无菌采样拭子。
       4. 无菌采血器或一次性使用静脉采血针。
       5. 含EDTA抗凝剂的真空采血管。
       6. 样品保存管。
       7. 无菌离心管。
       8. 组织匀浆器或研磨器。
       9. 冷冻离心机。
       10. 振荡器。
       11. 0.22 μm针头式滤器。
    2. 样品采集
       1. 全血样品采集

压迫猫肘部使前臂头静脉怒张，绷紧头静脉两侧皮肤，采样针头斜面朝上、呈15°角由远心端向近心端刺入静脉血管，见有血液流出时，接入真空采血管（含EDTA抗凝剂）采集1 mL血液，充分混匀后编号备用。

* + - 1. 血清样品采集

压迫猫肘部使前臂头静脉怒张，绷紧头静脉两侧皮肤，采样针头斜面朝上、呈15°角由远心端向近心端刺入静脉血管，见有血液流出时，缓慢抽取1 mL血液，编号备用。

* + - 1. 组织样品采集

用无菌剪刀、镊子分别采集约2 cm×2cm大小的病死猫肺脏、肝脏、脾脏和胰腺等以上器官有病变和正常组织交接处的组织，置于无菌离心管中并编号。

* + - 1. 眼分泌物拭子样品采集

眼结膜表面用拭子轻轻擦拭后，置于装有1 mL 50%甘油磷酸盐缓冲液的样品保存管中并编号。

* + - 1. 鼻咽拭子样品采集

把拭子浸润到生理盐水中，然后通过鼻腔缓慢的插入到鼻咽部位，在受到阻力以后停留数秒，轻轻旋转，将拭子取出置于装有1 mL 50%甘油磷酸盐缓冲液的样品保存管中并编号。

* + - 1. 细胞培养物

细胞培养物反复冻融3次，第3次解冻后，将细胞培养物置于无菌离心管中并编号。

* + 1. 样品保存与运输

采集的样品应放入主容器密封后，采用保温箱加冰袋或干冰密封，应在8 h之内送到实验室。上述采集的样品可立即用于检测。不能立即检测的样品，在2℃～8℃下保存不超过24 h，若需长期保存，应放置于≤-70℃的超低温冰箱，避免反复冻融，冻融不超过3次。

* + 1. 样品处理
       1. 全血样品处理

将全血样品分装无菌离心管中，8 000 r/min，4℃离心5 min，取上清液，置于另一无菌离心管中，编号，用于病毒分离和核酸检测。

* + - 1. 血清样品处理

应将血样室温下倾斜30°静置2 h～4 h，待血液凝固有血清析出时，取血清于无菌离心管中，用于抗体检测。

* + - 1. 组织样品处理

取适量组织样品置于组织匀浆器或研磨器中充分研磨，按1︰4（m：v）加入终浓度为4000 IU/mL的青霉素、4 mg/mL的链霉素，DMEM高糖培养基制备成组织匀浆液。反复冻融2次～3次，10 000 r/min，4℃离心10 min，取上清，用直径0.22 μm针头式滤器过滤除菌，用于病毒分离和核酸检测。

* + - 1. 眼分泌物拭子和鼻咽拭子样品

将眼分泌物拭子或鼻咽拭子样品在振荡器上充分混合后，将拭子中的液体挤出后弃去拭子。3 000 r/min，4℃离心5 min，取上清液，用直径0.22 μm滤器过滤除菌，用于病毒分离和核酸检测。

* + - 1. 细胞培养物

4 000 r/min，4℃离心10 min，取上清液，用直径0.22 μm滤器过滤除菌，用于病毒分离和核酸检测。

* 1. 病毒分离与鉴定
     1. 试剂
        1. DMEM高糖培养基。
        2. 胎牛血清。
        3. F81细胞。
        4. 0.25 %胰酶溶液：配制方法按附录A.3。
        5. 细胞生长液：配制方法按附录A.4。
        6. 细胞维持液：配制方法按附录A.5。
     2. 仪器设备
        1. 二氧化碳恒温培养箱。
        2. 高速冷冻离心机。
        3. 生物安全柜。
        4. 普通光学显微镜。
        5. 微量移液器（量程：20 µL～200 µL和200 µL～1 000 µL）。
        6. 细胞培养瓶。
        7. 细胞计数器。
        8. 0.22 μm针头式滤器。
     3. 操作方法
        1. 细胞的制备

分离病毒前24 h～36 h制备细胞。用0.25 %胰酶消化处于对数生长期的F81细胞单层，将所得细胞悬液以1 500 r/min离心5 min，并用细胞生长液将细胞重悬，细胞计数器计数，调整细胞浓度至2×106 个/mL，分装细胞培养瓶，制备细胞单层，待细胞长至60 %～70 %时备用。

* + - 1. 接种细胞

每份样品接种3瓶细胞，另设细胞对照2瓶。弃去7.3.1中的细胞培养液上清，按细胞培养液1/10体积加入处理后的全血或组织或眼分泌物拭子或鼻咽拭子或细胞培养物样品于细胞培养瓶中，置37℃含5% CO2培养箱中吸附1 h，补加细胞维持液。细胞对照瓶不接种样品，弃去培养液后，加入等量细胞维持液。均置37℃含5% CO2培养箱中培养。

* + - 1. 观察和记录

若被检样品中有FCV，通常在接种24 h～48 h后可出现CPE，主要呈细胞圆缩、聚集，最后溶解脱落，参见附录D.3。对照细胞单层应完好，细胞形态基本正常或稍有衰老。收获细胞培养液，用于病毒鉴定。

* + - 1. 盲传

若接种细胞第1代72 h后未出现CPE，收获细胞培养液，冻融3次后，按照7.3.2所述方法进行盲传3代。

* + 1. 病毒鉴定

对出现CPE的细胞培养液，选用第8章（RT-MIRA-LFD）、第9章（荧光RT-RAA方法）、第10章（普通RT-PCR方法）、第11章（实时荧光RT-PCR方法）进行核酸鉴定。

* + 1. 结果判定

出现CPE的细胞培养液，7.4所述方法任一项检测阳性者，判为病毒分离阳性。细胞盲传3代未见CPE，且经7.4所述方法检测阴性者，判为病毒分离阴性。

* 1. 反转录多酶恒温快速扩增侧向层析试纸条（RT-MIRA-LFD）
     1. 试剂
        1. 总则：除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合GB/T 6682的要求，所有试剂均用无RNA酶的容器分装。
        2. TRIzol：2℃～8℃保存。
        3. 氯仿：2℃～8℃保存。
        4. 异丙醇：-20℃预冷。
        5. DEPC水：配制方法按附录A.6。
        6. 75% 乙醇：用新开启的无水乙醇和DEPC水配制，-20℃预冷。
        7. 阳性对照为含104 TCID50/mL的FCV细胞培养物，用终浓度为0.2 %的甲醛溶液37℃灭活48 h；阴性对照为正常的F81传代细胞培养液。
        8. RT-MIRA基础反应单元（含重组酶、单链结合蛋白和DNA聚合酶的冻干粉）（商品化）。
        9. RT-MIRA预混液（商品化）。
        10. 乙酸镁（280mmol/L）。
        11. 试纸条（商品化）。
        12. RT-MIRA检测所需引物和探针：

上游引物F1：5’-TGATAGTGTTAGGTTGGATGAACTACCCGC-3’

下游引物R1：[5’biotin]-CCATCCAGTGTCTCAGCATAGCAGGAATTT-3’

探针P1：

[5’FAM]-TGATTTGGCCTGGGCTCTTCGCCGTCACCT[THF]TCACTAACTGGGCAG-3’C3spacer

* + 1. 仪器设备
       1. 恒温金属浴。
       2. 高速冷冻离心机。
       3. 振荡器。
       4. 微量移液器（量程：0.5 µL～10 µL、2 µL～20 µL、20 µL～200 µL和200 µL～1 000 µL）。
       5. 冰箱（2℃～8℃和-20℃以下）。
    2. 操作方法
       1. 核酸提取

TRIzol法抽提核酸见附录B。也可采用等效RNA提取试剂或方法，如采用自动化核酸提取仪和配套核酸提取试剂进行核酸提取。

* + - 1. RT-MIRA
         1. RT-MIRA反应体系配制

每个检测反应体系需要45.5 µL RT-MIRA反应液，包含RT-MIRA预混液 29.4 µL、上下游引物（10 μmol/L）各4 µL、探针（10 μmol/L）1.2 µL、DEPC水6.9 µL。根据附录B.1中提到的n值，按n+1配制反应液，充分混匀后分装，每个反应管45.5 µL。

* + - * 1. 加样

将45.5 µL RT-MIRA反应液加入RT-MIRA基础反应单元管中，再加入2 µL 样品RNA模板；将2.5µL乙酸镁（反应催化剂）加在反应单元管盖上，密封反应管，放入振荡器混匀。

* + - * 1. RT-MIRA反应

将8.3.2.3中加样后的反应管放入恒温金属浴中，42 ℃孵育10 min。

* + - 1. 扩增产物试纸条检测

取10 µL RT-MIRA扩增产物加入含有190 μL DEPC水的离心管中，混匀后，取50 μL加入试纸条的加样孔中，置于室温5 min，读取结果。

* + 1. 结果判定
       1. 试验成立的条件

在试纸条标记“C”的位置出现一条红色的条带，判定试验结果成立，否则判定试验结果不成立。

* + - 1. 结果描述及判定

被检样品出现两条肉眼可见红色条带，一条位于标记“C”的位置，另一条位于标记“T”的位置，则判为FCV核酸阳性；只出现一条肉眼可见红色条带，位于标记“C”的位置，而在标记“T”的位置无红色条带，则判为FCV核酸阴性。

* 1. 荧光RT-RAA方法
     1. 试剂
        1. RT-RAA荧光基础反应单元（含重组酶、单链结合蛋白和DNA聚合酶的冻干粉）（商品化）。
        2. RT-RAA预混液（商品化）。
        3. 乙酸镁（280mmol/L）。
        4. 实时荧光RT-RAA检测所需引物和探针：

上游引物F4：5’-GCATGACCGCCCTACACTGTGATGTGTTCG-3’

下游引物R4：5’-ACTCAAGATAAATTTGAAGCGGGGACTGGT-3’

探针P4：

5’-CTTCAAATTAGTGATCAATCCTAACAAAT[FAM-dT][idSpacer][BHQ1-dT]TGTCCATAGGTTTC-3’C3 Spacer。

* + - 1. 其余试剂同8.1.2～8.1.7。
    1. 仪器设备
       1. 荧光PCR仪，也可采用等效的荧光检测仪。
       2. 其余仪器设备同8.2.2～8.2.5。
    2. 操作方法
       1. 核酸提取

见8.3.1。

* + - 1. 荧光RT-RAA
         1. 荧光RT-RAA反应体系配制

每个检测反应体系需要45.5 µL荧光RT-RAA反应液，包含RT-RAA预混液 32.5 µL、上下游引物（10 μmol/L）各2 µL、探针（10 μmol/L）0.6 µL、DEPC水8.4 µL。根据附录B.1中提到的n值，按n+1配制反应液，充分混匀后分装，每个反应管45.5 µL。转移反应管至样本制备区。

* + - * 1. 加样

将45.5 µL荧光RT-RAA反应液加入RT-RAA荧光基础反应单元管中，再加入2 µL 样品RNA模板；将2.5µL乙酸镁（反应催化剂）加在反应单元管盖上，密封反应管，放入恒温震荡混匀仪混匀，转移至扩增区。

* + - * 1. 荧光RT-RAA反应

将9.3.2.3中加样后的反应管放入荧光PCR仪中，编辑样品表后，选定FAM作为报告基团，淬灭基团选none，反应参数设置如下：39 ℃，60 s，1个循环；39 ℃，30 s，30个循环，每次循环时收集荧光信号。

* + 1. 结果判定
       1. 试验成立的条件

阳性对照有荧光对数增长，且荧光通道出现特异性的扩增曲线，相应的*Ct*值≤20。阴性对照无荧光对数增长，相应的无报告*Ct*值。阴性对照和阳性对照要求需在同一次试验中同时满足，否则，本次试验无效，需重新进行。

* + - 1. 结果描述及判定

符合11.4.1的条件，被检样品*Ct*值≤28且出现特异性扩增曲线，则判为FCV核酸阳性；当无*Ct*值或无荧光对数增长，则判为FCV核酸阴性；28＜*Ct*值≤30且出现特异性扩增曲线，则判为疑似，需要重新检测。如复检后仍出现上述结果的，判为阳性，否则判为阴性。

* 1. 普通RT-PCR方法
     1. 试剂
        1. 2×one step Buffer（Dye Plus）。
        2. PrimeScript 1 Step Enzyme Mix。
        3. 50×TAE缓冲液。
        4. 琼脂糖：国产或进口的低熔点琼脂糖。
        5. DNA Marker：分子大小范围为100 bp～2 000 bp。
        6. 普通RT-PCR检测所需引物：

上游引物F2：5’-CACSTTATGTCYGACACTGA-3’

下游引物R2：5’-CTRGADGTRTGCARRATTT-3’

其中，S、Y、R、D为简并碱基，S对应G/C，Y对应C/T，R对应A/G，D对应A/G/T。

* + - 1. 其余试剂同8.1.2～8.1.7。
    1. 仪器设备
       1. 普通PCR仪。
       2. 电泳仪。
       3. 电泳槽。
       4. 紫外凝胶成像仪。
       5. 其余仪器设备同8.2.2～8.2.5。
    2. 操作方法
       1. 核酸提取

同8.3.1。

* + - 1. RT-PCR
         1. RT-PCR反应体系配制

在试剂储存和准备区进行。每个检测反应体系需要45 µL RT-PCR反应液，包含2×One Step Buffer （Dye Plus）25 µL、PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 µL、上下游引物（10 μmol/L）各1 µL、DEPC水16 µL。根据附录B.1中提到的n值，按n+1配制反应液，充分混匀后分装，每个反应管45 µL。转移反应管至样本制备区。

* + - * 1. 加样

在样本制备区进行。在已分装有PCR反应液的反应管中分别加入已制备好的RNA溶液5 µL，使每管总体积达到50 µL，记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后，500 r/min离心30 s。转移至扩增区。

* + - * 1. RT-PCR反应

在扩增区进行。将反应管放入PCR扩增仪中，按照下列程序进行扩增：50℃反转录30 min；94℃预变性5 min；94℃变性45 s，50℃退火1 min，72℃退火1 min，共35个循环；72℃终延伸10 min。

* + - 1. PCR扩增产物电泳

在产物分析区进行。取8 µL PCR扩增产物加入到1×TAE缓冲液配制的2%琼脂糖凝胶中，电泳30 min～40 min。电泳结束后，将琼脂糖凝胶置于紫外凝胶成像仪中观察结果。

* + 1. 结果判定
       1. 试验成立的条件

阳性对照应有大小为955 bp的特异性扩增条带，参见附录E，同时阴性对照无此扩增条带。

* + - 1. 结果描述及判定

符合10.4.1的条件，被检样品有大小为955 bp的特异性扩增条带，且与阳性对照条带分子量大小相符，则判为FCV核酸阳性；被检样品无特异性的扩增条带，则判为FCV核酸阴性。

* 1. 实时荧光RT-PCR方法
     1. 试剂
        1. 2×One Step RT-PCR Buffer。
        2. PrimeScript RT Enzyme Mix II。
        3. TaKaRa Ex Taq HS（5U/μL）。
        4. 实时荧光RT-PCR检测所需引物和探针：

上游引物F3：5’-ccgttaaYtcRgtgtttgatttg-3’

下游引物R3：5’-GGCTCTGATDGCTTGAAACTG-3’

探针P3：5’-FAM-CCTGGGCTCTTCGCCGTCACC-BHQ1-3’

其中，Y、R、D为简并碱基，Y对应C/T，R对应A/G，D对应A/G/T。

* + - 1. 其余试剂同8.1.2～8.1.7。
    1. 仪器设备
       1. 荧光PCR仪。
       2. 其余仪器设备同8.2.2～8.2.5。
    2. 操作方法
       1. 核酸提取

同8.3.1。

* + - 1. 实时荧光RT-PCR
         1. 实时荧光RT-PCR反应体系配制

在试剂储存和准备区进行。每个检测反应体系需要22 µL荧光RT-PCR反应液，包含2×One Step RT-PCR Buffer 12.5 µL、TaKaRa Ex *Taq* HS（5U/μL）0.5 µL、PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.5 µL、上下游引物（10 μmol/L）各0.5 µL、探针（10 μmol/L）1 µL、DEPC水6.5 µL。根据附录B.1中提到的n值，按n+1配制反应液，充分混匀后分装，每个反应管22 µL。转移反应管至样本制备区。

* + - * 1. 加样

在样本制备区进行。在上述11.3.2.1的反应管中分别加入附录B.1中制备的RNA溶液3 µL，使每管总体积达到25 µL，记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后，500 r/min离心30 s。转移至扩增区。

* + - * 1. 实时荧光RT-PCR反应

在扩增区进行。将11.3.2.2中加样后的反应管放入荧光PCR仪中，编辑样品表后，选定FAM作为报告基团，淬灭基团选none，反应参数设置如下：42℃ 10 min，94℃ 15 min；95℃ 15 s，60℃ 45 s，在每个循环第二步（60℃ 45 s）收集荧光信号，共40个循环。

* + 1. 结果判定
       1. 结果分析条件设定

阈值设定原则：阈值线设定于刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

* + - 1. 试验成立的条件

阳性对照*Ct*值≤30，并出现典型扩增曲线（参见附录F）。阴性对照无*Ct*值并且无典型扩增曲线。阴性对照和阳性对照应在同一次试验中同时满足，否则，本次试验无效，需重新进行。

* + - 1. 结果描述及判定

符合11.4.2的条件，被检样品*Ct*值≤35且出现特异性扩增曲线，则判为FCV核酸阳性；当无*Ct*值并且无典型扩增曲线，则判为FCV核酸阴性；35＜*Ct*值≤40且出现特异性扩增曲线，则判为疑似，需要重新检测。如复检后仍出现上述结果的，判为阳性，否则判为阴性。

* 1. 间接ELISA抗体检测方法
     1. 试剂
        1. 包被抗原：大肠杆菌表达的重组FCV VP1蛋白（见附录C）。
        2. 酶标抗体：HRP标记的山羊抗猫IgG（1 mg/mL）。
        3. 阴性对照：用FCV抗体效价为阴性的健康猫血清。
        4. 阳性对照：用FCV灭活疫苗免疫健康猫制备的高免血清，预先测定其抗体效价。
        5. 20×洗涤液：配制方法按附录A.7。
        6. 抗原包被液：配制方法按附录A.8。
        7. 封闭液：配制方法按附录A.9。
        8. 底物：配制方法按附录A.10。
        9. 终止液：配制方法按附录A.11。
        10. 样品稀释液：配制方法按附录A.12。
     2. 仪器设备
        1. 酶标仪。
        2. 恒温孵育箱。
        3. 洗板机。
        4. 微量移液器（量程：0.5 µL～10 µL、2 µL～20 µL、20 µL～200 µL和200 µL～1 000 µL）。
        5. 96孔酶标板。
        6. 贮液槽。
        7. 封板膜。
        8. 吸水纸。
     3. 操作方法
        1. 用包被缓冲液将FCV VP1重组蛋白稀释至终浓度2 μg/mL，每孔100 µL包被96孔酶标板，4℃孵育过夜。
        2. 20×洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释。每孔用稀释后的洗涤液清洗5次，洗涤液300 µL/孔，弃去反应孔中液体。按照300 µL/孔的量，加入封闭液，37℃封闭2 h。
        3. 用样品稀释液将待检样品做1：1 000稀释（即取1 µL待检样品加入到1 mL样品稀释液中），并充分混匀。
        4. 每次试验每板应设阳性对照、阴性对照各2孔。阳性对照、阴性对照直接使用，100 µL/孔。其余每孔加入稀释后血清样品100 µL。置室温孵育60 min。
        5. 弃去反应孔中液体，每孔用稀释后的洗涤液清洗5次，洗涤液300 µL/孔。用样品稀释液按1：10 000稀释酶标抗体，每孔加入100 µL，置室温孵育60 min。
        6. 弃去反应孔中液体，同上洗涤5次，拍干后每孔加底物100 µL，置室温避光作用15 min，每孔加入终止液50 µL，轻微震荡微孔板以混合均匀。
        7. 以空白孔调零，用酶标仪读取450 nm处的OD值。
     4. 结果判定
        1. 试验成立的条件

阴性对照平均OD450值＜0.285，阳性对照平均OD450值＞0.5，证明试验成立。否则试验结果无效，需重新试验。

* + - 1. 结果描述及判定
         1. 阴性

当待检样品OD450值＜0.285时，则判定为FCV抗体阴性。

* + - * 1. 阳性

当待检样品OD450值≥0.341时，则判定为FCV抗体阳性。

* + - * 1. 可疑

当待检样品OD450值介于0.285～0.341之间为可疑，可疑样品复测OD450值≥0.285，则判定为FCV抗体阳性。

* 1. 综合判定
     1. 疑似

符合5.4，判定为猫嵌杯病毒感染疑似病例。

* + 1. 确诊
       1. 符合13.1，且未免疫FCV疫苗的动物，按照本文件7、8、9、10、11和12中规定的任一方法，检测为阳性的，判定为猫嵌杯病毒感染。
       2. 符合13.1，且免疫FCV疫苗的动物，按照本文件7、8、9、10和11中规定的任一方法，检测为阳性的，判定为猫嵌杯病毒感染。

2. （规范性）  
   试剂配制

A.1 0.01 mol/L PBS（pH 7.4）

称取8.0 g氯化钠（NaCl）、0.20 g氯化钾（KCl）、1.42 g磷酸氢二钠（Na2HPO4）、0.27 g磷酸二氢钾（KH2PO4），加蒸馏水溶解，调整pH值至7.4，定容至1 000 mL，103 KPa高压蒸汽灭菌30 min，或过滤除菌，4℃保存备用。

A.2 50%甘油磷酸缓冲液（pH 7.4）

将0.01 mol/L PBS与纯甘油（分析纯）等量混合，调整pH至7.4，分装为小瓶，103 KPa高压蒸汽灭菌30 min，4℃保存备用。

A.3 0.25%胰酶

称取0.25 g胰酶溶解于100 mL DMEM营养液后过滤除菌，-20℃保存备用。

A.4 细胞营养液

取900 mL的DMEM营养液加100 mL的灭活胎牛血清混合，配制成1 000 mL的溶液，加入青霉素至终浓度100 IU/mL，链霉素至终浓度100 µg/mL，4℃保存备用。

A.5 细胞维持液

取980 mL的DMEM营养液加20 mL的灭活胎牛血清混合，配制成1 000 mL的溶液，加入青霉素至终浓度100 IU/mL，链霉素至终浓度100 µg/mL，4℃保存备用。

A.6 DEPC水

将DEPC加入去离子水中至终浓度为0.1%（体积比），充分混合均匀后作用12 h，分装，103 KPa高压蒸汽灭菌30 min，4℃保存备用。

A.7 20×洗涤液

称取磷酸二氢钾（KH2PO4）0.2 g，十二水合磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O）2.9 g，氯化钠（NaCl）8.0 g，氯化钾（KCl）0.2 g，加蒸馏水定容至1 000 mL，最后加入0.5 mL吐温-20（Tween-20）。使用时将20×浓缩洗涤液用蒸馏水按1:19的比例混合即可。

A.8 包被液

称取碳酸钠（Na2CO3）1.59 g，碳酸氢钠（NaHCO3）2.93 g，加800 mL蒸馏水搅拌溶解，调整pH值至9.6，定容至1 000 mL，室温保存。

A.9 封闭液

在100 mL洗涤液中加入0.1 g牛血清白蛋白（BSA），现配现用。

A.10 底物溶液

A.10.1 pH 5.0碳酸盐-柠檬酸盐缓冲液

称取十二水合磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O）71.6 g，无水柠檬酸（C6H8O7 ）19.2 g加蒸馏水800 mL搅拌溶解，调整pH值至5.0，定容至1 000 mL。

A.10.2 四甲基联苯胺（TMB）母液

取0.20 g TMB溶解于100 mL无水乙醇中。-20℃保存。

A.10.3 0.75% H2O2

取30% H2O2 1.25 mL，加入蒸馏水，使总体积达到50 mL。

A.10.4 底物溶液（临用时配制）

取pH 5.0磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液9.5 mL，TMB母液0.5 mL，0.75% H2O2 42 μL混合均匀即可。此底物液对光敏感，应避免强光照射，现配现用。

A.11 终止液

将116 mL分析纯浓硫酸（H2SO4）缓慢加入到884 mL的蒸馏水中，混匀，室温保存。

A.12 样品稀释液

称取8.02 g氯化钠（NaCl）、0.20 g氯化钾（KCl）3.87 g十二水合磷酸氢二钠（Na2HPO4·12H2O）、0.16 g磷酸二氢钾（KH2PO4），加蒸馏水溶解，调整pH值至7.4，定容至1 000 mL，加入0.10 g 叠氮钠（NaN3）防腐（其终浓度为0.1 g/L），103 KPa高压蒸汽灭菌30 min，或过滤除菌，保存于4℃。

1. （规范性）  
   核酸提取
   1. 在样本制备区进行。
   2. 待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和用n表示，取n个灭菌1.5 mL离心管，逐管编号。
   3. 每管加入600 µL TRIzol。
   4. 每管对应编号分别加入200 µL待检样品、阳性对照和阴性对照，混匀。
   5. 每管加入200 µL氯仿，充分颠倒混匀。于4℃、12 000 r/min离心15 min。
   6. 新取n个灭菌的1.5 mL离心管，逐管编号，每管加入500 µL异丙醇（-20℃预冷）。
   7. 吸取B.5各管中的上清液500 µL，转移至B.1.6相应的离心管中，避免吸出中间层，颠倒混匀。
   8. 于4℃、12 000 r/min离心15 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。
   9. 每管加入600 µL 75% 乙醇（-20℃预冷），颠倒洗涤。
   10. 于4℃、12 000 r/min离心10 min，轻轻倒去上清，倒置于吸水纸上，沥干液体，不同样品应在吸水纸不同地方沥干。
   11. 4 000 r/min离心10 s，将管壁上的残余液体甩到管底部，用微量移液器将其吸干。注意一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面。
   12. 室温干燥3 min。
   13. 每管加入11 µL DEPC水，轻轻混匀，溶解管壁上的RNA，2 000 r/min离心5 s，获得RNA溶液，可直接用于检测或保存于-20℃备用。
2. （规范性）  
   重组FCV VP1蛋白的制备
   1. 重组表达质粒pCold I △FCV VP1的构建

将所选择的FCV不同毒株VP1蛋白共同的B细胞抗原表位，使用一个柔性linker序列串联起来如图C.1所示命名为△FCV VP1，进行大肠杆菌密码子优化，通过BamH I限制性酶切位点和EcoR I限制性酶切位点，合成至pCold I表达载体，将重组质粒pCold I △FCV VP1 送公司进行测序，测序正确后，通过双酶切鉴定重组质粒命名为pCold I △FCV VP1。

表位图片1

：Linker序列（GGGGS); ：B细胞表位对应的氨基酸区域

图C.1 FCV VP1基因B细胞表位串联表达

* 1. 重组蛋白的表达、鉴定、纯化、浓度测定

通过双酶切鉴定重组质粒正确后，转化至表达菌BL21感受态细胞中，37℃培养12～14h获得表达菌株。挑取单一菌落至5mL 含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，37℃振荡培养至对数生长期，使用分光光度计测定OD 450 nm值为0.5（0.4～0.6 左右）时，加入IPTG于16 ℃ 诱导表达 24 h，12 000 rmp离心，1：10加入PBS重悬菌体，超声破碎后离心，分为上清和沉淀，沉淀用相同量的PBS重悬，加入5×SDS PAGE Loading Buffer，100℃金属浴煮样10min，然后以SDS-PAGE电泳，用考马斯亮蓝进行染色，染色4 h后，煮蛋白胶进行脱色，检测重组蛋白的表达情况及可溶性。将重组蛋白转移至硝酸纤维素膜，经western blot鉴定，具有反应原性后进行纯化。将纯化的His标签蛋白利用商品化BCA蛋白浓度测定试剂盒测定浓度后分装，置于-80℃冻存。

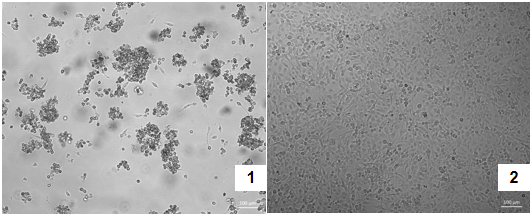
1. （资料性）  
   主要临床症状和CPE参考图



图D.1眼鼻分泌物增多、口腔大量流涎。



图D.2口腔溃疡是FCV感染的最显著的特征，嘴唇、舌和硬腭、腭中裂周围明显出现大面积的溃疡。



图D.3 1. 接种FCV的F81细胞CPE；2. 阴性对照

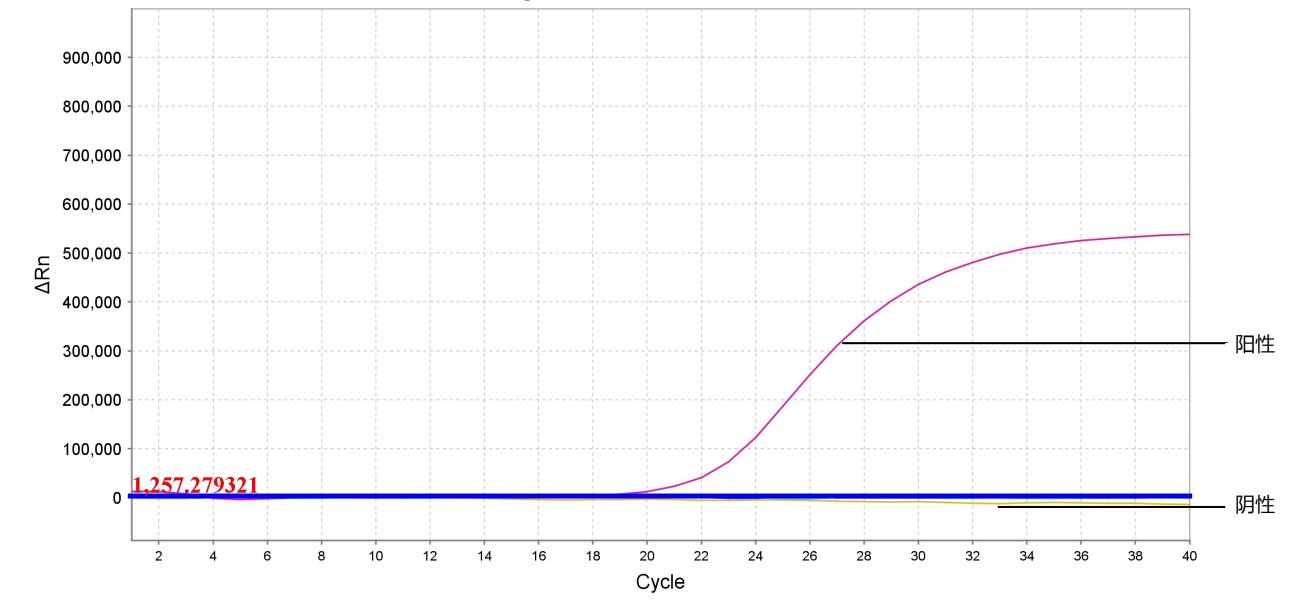
1. （资料性）  
   FCV 普通RT-PCR扩增核酸片段参考序列

**Cacgttatgtctgacactga**taccacgtctttggttattatggtgtataacgatctaatcaacccatatgctaatgactcaaactcttctgggtgtattgtcactgtagaaaccaaacctggacccgatttcaaattccacttgttgaaaccccctggttctgtgttaactcatggctcgattccttcggacctgatccccaaatcatcatccctttggattggtaatcgctactggactgacataaccgattttgtaattcgaccctttgtgttccaagcaaaccgtcatttcgactttaaccaagaaacagctggctggagcacaccaagattcaggcccatcaccattacaattagtgaaaagaatggttcaaagttaggaattggcgttgcaaccgattacattatcccagggattcctgatggctggccagatactacaattgctgataaattgattcccgcgggcgactattcaattaccacgggggaggggaatgacatcaaaacggctcaggcctatgacactgcagctgtggtaaagaacaccacaaatttccgagggatgtatatctgtggttcattgcaacgggcttggggcgataagaagatttcaaatactgccttcataaccaccgccatcagggacggcaacgaaatcaaaccatctaacacaattgacatgacaaagctcgccgtgtaccaagatactcatgtagggcaggaagtccaaacatctgatgacacgcttgccctccttggttacactgggattggcgaggaggcaattggctcaaatagggacagggtagtgcgcattagcgtgctaccagaagctggggcccgtggtggcaatcaccccatcttttacaaaaactcaattaaattgggctatgtaattagatctatcgatgtgttcaattctc**aaatcttgcacacatccag**

注：序列为FCV VP1基因片段，粗体为引物序列。

1. （资料性）  
   典型扩增曲线示意图

猫嵌杯病毒实时荧光RT-PCR检测方法阳性和阴性典型扩增曲线见图F.1。



图F.1猫嵌杯病毒实时荧光RT-PCR典型扩增曲线示意图

