**农业行业标准《猫嵌杯病毒感染诊断技术》编制说明**

# （一）、工作简况

## 1、任务来源

标准编制单位根据行业发展需要提出行业标准制定申请，本标准的制订申请通过了农业农村部农产品质量安全中心组织的专家评审，并在《关于下达 2023 年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函〔2023〕51 号）通知中公布，项目编号NYB-23094。由上海市动物疫病预防控制中心负责制定。项目名称为《猫嵌杯病毒感染诊断技术》。

## 2、制定背景

猫嵌杯病毒(Feline calicivirus, FCV) 是引起猫科动物的一种急性、高传染性的病原。在猫科动物中广泛的流行，且呈世界性分布，现已从世界上许多国家和地区的猫和猎豹中分离到。我国猫、猎豹和老虎之间也存在着猫嵌杯病毒感染，该病毒对猫以及珍稀野生动物的健康造成了很大的威胁。目前，猫嵌杯病毒感染被列为三类动物疫病。尽管有针对预防FCV 的疫苗（猫三联疫苗）已普遍在幼猫中使用，但仍存在一些免疫失败的报道。主要因为病毒易变异，而且对环境适应性很强，使多数免疫动物呈现出亚临床感染症状和持续感染症状，并可持续向外排毒。为了避免可能造成的严重后果，建立该病的诊断方法，用于感染动物的诊断尤为重要，也为有效控制该病的传播提供了有力的技术支持。目前，国内尚未有该病毒诊断的国家标准、行业标准和地方标准。因此，及时建立猫嵌杯病毒感染的诊断技术意义重大。

## 3、起草单位和主要起草人及其所做的工作

## 4、主要工作过程

要按标准各阶段为单位分别编写。列出各阶段的关键内容。征求意见、审查阶段的主要内容要详细给出。征求意见要对征求对象的代表性、回复情况、意见处理情况进行总结说明。

**1）起草阶段**

标准起草工作组认真学习了GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》相关内容，结合标准制定工作程序的各个环节，进行了深入探讨和研究，制定了标准编制工作计划、编写大纲，明确任务分工及工作进度。

标准起草工作组经过技术咨询、调研，收集、整理和分析有关资料，并结合诊断技术研制方法、应用现状和发展趋势等，形成《猫嵌杯病毒感染诊断技术》国家标准草案。

**2）征求意见阶段**

2023年8月1日~10月12日，起草工作组邀请来自于中国农业科学院上海兽医研究所、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心、华中农业大学动物医学院、河南农业大学动物医学院、中国动物疫病预防控制中心、河南省动物疫病预防控制中心、重庆市动物疫病预防控制中心、北京市标准化研究、芭比堂（北京）国际动物医疗中心、湖南冠牧生物科技有限公司、上海市奉贤区生态养殖服务中心、上海市嘉定区农业技术推广服务中心、宁波海关技术中心、上海蛮蛮生物科技有限公司、湖南源流检测技术有限公司、上海慕宠宠物医院有限公司、上海市浦东新区周家渡街道旺佳宠物诊所、上海航厚宠物诊所有限公司、上海睿金宠物诊所等的20位专家进行函审，共收到相关建议和意见139条。采纳137条，不采纳2条，其中1条为标准题目，需要审定会讨论。另一条为“待细胞长至60%～70%铺满底部时备用”中将“60%～70%”删去，删除后与本意不相符，故不采纳。结合征求意见和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标准》对征求意见稿进行了相应的修改，形成送审稿，报全国动物卫生标委会审查。

**3）审查阶段**（未经审查的不写本部分）

**4）报批阶段**（未报批的不写本部分）

# （二）行业标准编制原则、主要内容及其确定依据，修订行业标准时，还包括修订前后技术内容的对比

## 1、标准编写原则

（1）、标准编制遵循“先进性、实用性、统一性、规范性”的原则，注重标准的通用性、适用性和可操作性，同时符合我国国情。

（2）、标准编制格式符合GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》的要求。

## 2、主要内容及其确定依据

本标准在前期工作积累的基础上，确定了临床诊断的标准。结合国内最新的科研成果和不同机构的诊断和检测能力，最终确定了临床诊断、病毒分离、反转录多酶恒温快速扩增侧向层析试纸条（RT-MIRA-LFD）、荧光RT-RAA方法、普通RT-PCR、实时荧光RT-PCR（Real-time RT-PCR）和间接ELISA抗体检测试验等方法作为本标准的主要技术依据，完全满足了不同级别和不同层次的实验室开展各种诊断和检测等目的的要求，具有广泛的适用性、实用性和可操作性。

## 3、新旧标准对比（适用于修订标准的情况）

不适用。

## （三）试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

**1、试验验证的分析**

FCV是猫和其它猫科动物的重要病原体，且该病毒不断发生变异，致死率非常高，容易传染，伴随着人们生活水平的提高，养猫的数量也在与日俱增，猫在人们的日常生活更加被重视，而对疾病的诊断也日益重要，因此迫切需要建立有效且快速的诊断方法，以便为前期的预防和后期的治疗提供依据。项目组进行了以下试验。

**（1）、猫嵌杯病毒分离培养**

1.1 培养细胞系的筛选

参考猫嵌杯病毒分离鉴定的相关文献，对8种候选细胞系进行筛选，包括：PK-15（猪肾细胞）、DF1（鸡成纤维细胞）、BHK-21（乳仓鼠肾细胞）、Vero-E6（非洲绿猴肾细胞）、MARC-145（猴胚胎肾上皮细胞）、F81（猫肾细胞）、CRFK（猫肾细胞）、MDCK（犬肾细胞）。

1. 1.2 FCV分离株（已鉴定，毒株号：FCV-SH202101）接种候选细胞

将FCV分离株分别接种至长成单层的候选细胞，同时将加有DMEM维持液的候选细胞作阴性对照，接种量为所加维持液量的1/10，37 ℃恒温箱内吸附1 h，加入含2%胎牛血清的DMEM维持液，置37 ℃、5% CO2培养箱中培养，逐日观察细胞病变。

1.3 细胞病变结果

接种24 h后，F81细胞和CRFK细胞出现圆缩、聚集、拉网、脱落等现象，判定FCV感染后能导致细胞病变的出现，其余6株细胞PK-15、DF1、BHK-21、Vero-E6、MARC-145、MDCK均未出现圆缩、聚集、拉网、脱落等现象，判定FCV感染后不能导致细胞病变的出现（见图1-1）。

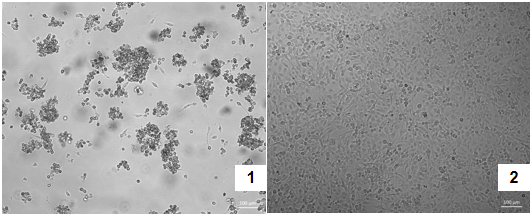
1. 接种FCV-SH202101的F81细胞；2. 阴性对照

图1-1 接种FCV-SH202101 24 h后F81细胞病变结果

1.4 灵敏度试验

为了分析病毒分离鉴定方法的灵敏度，采用10倍稀释FCV-SH202101株（107.73 TCID50/mL、106.73 TCID50/mL、105.73 TCID50/mL、104.73 TCID50/mL、103.73 TCID50/mL、102.73 TCID50/mL、101.73 TCID50/mL、100.73 TCID50/mL、10-0.23 TCID50/mL、10-1.23 TCID50/mL）分别接种F81细胞，接种24 h~72 h后，如细胞出现圆缩、聚集、拉网、脱落等现象，可判定阳性；如第一次接种未出现细胞病变，应将细胞培养物冻融三次后盲传三代，如仍无细胞病变，判为阴性。

灵敏度的实验结果：FCV病毒分离鉴定方法最低检出限为10-0.23 TCID50/mL，荧光RT-PCR最低检出限是100.73 TCID50/mL，结果表明病毒分离鉴定方法具有较高的灵敏度，可以满足检测较低含量猫嵌杯病毒活病毒的要求。其中107.73 TCID50/mL、106.73 TCID50/mL、105.73 TCID50/mL、104.73 TCID50/mL、103.73 TCID50/mL浓度接种F81细胞第一代培养物即出现细胞病变，102.73 TCID50/mL、101.73 TCID50/mL浓度接种F81细胞第二代培养物出现细胞病变，100.73 TCID50/mL、10-0.23TCID50/mL浓度接种F81细胞第三代培养物才出现细胞病变。研究表明，病毒分离鉴定方法的灵敏度能达到10-0.23 TCID50/mL，符合FCV检测要求。

1.5 特异性试验

为了验证病毒分离鉴定方法的特异性，将已分离鉴定毒株或ATCC标准毒株分别接种F81细胞，包括：FCV（猫嵌杯病毒，毒株号：FCV-SH202101）、FHV-1（猫疱疹病毒1型，毒株号：FHV-1/cat/Shanghai/01/2014）、FPV（猫细小病毒，毒株号：FPV-SH202101）、FIPV（猫传染性腹膜炎病毒，毒株号：VR-990）、FIV（猫免疫缺陷病毒，毒株号：VR-1312）、CPV（犬细小病毒，毒株号：CPV-SH201801）、CDV（犬瘟热病毒，毒株号：CDV-SH201901）、CAV-1（犬腺病毒1型，毒株号：VR-293）、CAV-2（犬腺病毒2型，毒株号：VR-800）。接种24 h~72 h后，如细胞出现圆缩、聚集、拉网、脱落等现象，做进一步鉴定；如第一次接种未出现细胞病变，应将细胞培养物冻融三次后盲传三代，如仍无细胞病变，判为阴性。

FCV鉴定方法：吸取50 μL上述细胞培养液，猫三联疫苗作阳性对照，DMEM细胞培养液作阴性对照，提取总RNA。应用猫嵌杯病毒RT-PCR检测试剂盒（购自上海尔创生物技术有限公司，批号为：EC20210601），按照试剂盒方法进行FCV荧光RT-PCR检测。

细胞病变结果：FCV、FHV-1、FPV、CPV接种F81细胞后，出现了细胞病变；FIPV、FIV、CDV、CAV-1、CAV-2接种F81细胞后，第一代未出现细胞病变，盲传三代后也未出现细胞病变。

FCV鉴定结果：将出现细胞病变的FCV、FHV-1、FPV、CPV细胞培养液进行荧光RT-PCR检测，只有FCV培养液出现阳性曲线，其余均为阴性（见图1-2），试剂盒阳性对照、试剂盒阴性对照和DMEM培养液阴性对照均成立。病毒分离鉴定方法的特异性好，符合FCV检测要求。

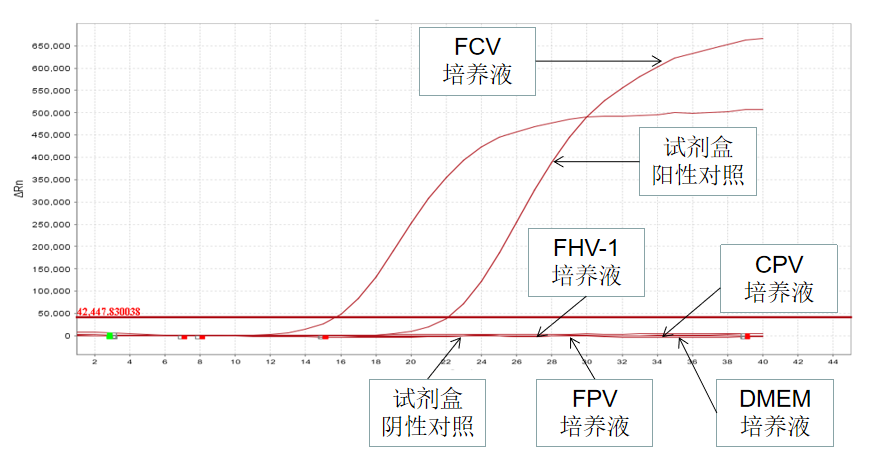


图1-2 FCV、FHV-1、FPV、CPV细胞培养液FCV检测结果

1.6临床样品检测

按照标准方法，于上海地区宠物医院采集临床样本60份。采用病毒分离鉴定方法和直接猫嵌杯病毒RT-PCR检测试剂盒方法进行检测，比较这两种方法的检测结果，根据公式分析两种方法的敏感度、特异性和总符合率。

各检测方法之间，敏感度、特异性和符合率的计算公式为：

敏感度=（真阳性数）/（真阳性数+假阴性数）；

特异性=（真阴性数）/（真阴性数+假阳性数）；

总符合率=（真阳性数+真阴性数）/（被检总数）。

结果如下表1-1所示，与猫嵌杯病毒RT-PCR检测试剂盒方法相比，病毒分离鉴定方法敏感度高达100%，特异性为100%，而RT-PCR检测试剂盒方法的敏感度为72%，特异性为83.33%，两种方法的总符合率为88.33%，因此病毒分离鉴定方法适用于实验室检测猫嵌杯病毒。

表1-1 实际样品检测结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样本 | 总数 | 病毒分离鉴定 | | | | 试剂盒法 | |
| 细胞病变 | | 荧光RT-PCR检测 | |
| 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 |
| 第一代培养物 | 60 | 20 | 40 | 20 | 40 | 18 | 42 |
| 第二代培养物 | 4 | 36 | 4 | 36 |
| 第三代培养物 | 1 | 35 | 1 | 35 |
| 合计 | 60 | 25 | 35 | 25 | 35 | 18 | 42 |

**（2）、反转录多酶恒温快速扩增侧向层析试纸条（RT-MIRA-LFD）方法的建立**

2.1引物设计

本标准中的检测方法根据FCV的VP1基因进行引物设计：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。

2.2反应体系的建立

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。

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。然后放入恒温金属浴中，42 ℃孵育10 min。

2.3结果显示和判定

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。

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。

2.4特异性试验

用已优化的反应体系及扩增条件，用猫嵌杯病毒疫苗、狂犬病病毒疫苗、猫疱疹病毒、猫细小病毒、猫传染性腹膜炎病毒阳性样品、犬流感病毒和犬瘟热病毒疫苗进行RT-MIRA-LFD，以确定此方法的特异性。

当进行RT-MIRA-LFD，待检样品为FCV疫苗毒时，能得到特异性扩增曲线，狂犬病病毒等其他6种病毒均未出现特异性扩增（图2-1）。

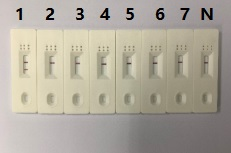


图2-1 特异性试验（N：阴性对照，1：猫嵌杯病毒疫苗，2：狂犬病病毒疫苗，3：猫疱疹病毒，4：猫细小病毒，5：猫传染性腹膜炎病毒阳性样品，6：犬流感病毒，7：犬瘟热病毒疫苗）

2.5敏感性试验

分别将FCV阳性质粒DNA用分光光度计测定浓度后，用DEPC-H2O对质粒标准品做10倍系列稀释，使每5 μL检测用量中的拷贝数分别为2.3×104、2.3×103、2.3×102、2.3×101、2.3×100、2.3×10-1 、2.3×10-2拷贝/μL进行RT-MIRA-LFD扩增。RT-MIRA-LFD 反应体系以及反应条件同特异性试验中所示。

当进行RT-MIRA-LFD，对质粒标准品做10倍系列稀释，能得到特异性扩增曲线，RT-MIRA-LFD方法的最低检测限约为2.3×102拷贝/μL（图2-2）。

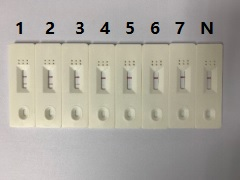


图2-2 敏感性试验（N：阴性对照，1~7：2.3×104、2.3×103、2.3×102、2.3×101、2.3×100 、2.3×10-1、2.3×10-2拷贝/μL）

2.6重复性试验

选取浓度为2.3×104、2.3×103、2.3×102拷贝/μLFCV阳性质粒进行重复性试验，将三个梯度与阴性对照进行检测，重复三次。

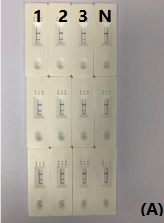


图2-3重复性试验（N：阴性对照，1~3：2.3×104、2.3×103、2.3×102拷贝/μL）

结果显示（图2-3），本方法的重复性好。

2.7临床样品检测

对临床上采集的18份经荧光RT-PCR确认结果的猫样品（鼻咽拭子9份，肛门拭子5份，血液4份）进行RT-MIRA-LFD检测，结果显示（图2-3）13份样品为阳性，5份样品为阴性。荧光RT-PCR检测结果（表2-1）为13份阳性，5份阴性。本标准检测方法的检测结果与荧光RT-PCR检测结果阳性符合率为100%，阴性符合率为100%。

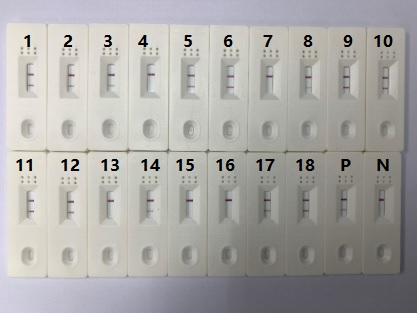


图2-4临床样品检测结果（N：阴性对照，P：阳性对照，1~18：分别为临床样品）

表2-1荧光PCR检测结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 结果 | | 样品编号 | 结果 | |
| 荧光PCR | RT-MIRA-LFD | 荧光PCR | RT-MIRA-LFD |
| 1 | 阳性 | 阳性 | 10 | 阳性 | 阳性 |
| 2 | 阳性 | 阳性 | 11 | 阳性 | 阳性 |
| 3 | 阳性 | 阳性 | 12 | 阳性 | 阳性 |
| 4 | 阴性 | 阴性 | 13 | 阴性 | 阴性 |
| 5 | 阳性 | 阳性 | 14 | 阳性 | 阳性 |
| 6 | 阳性 | 阳性 | 15 | 阴性 | 阴性 |
| 7 | 阴性 | 阴性 | 16 | 阴性 | 阴性 |
| 8 | 阳性 | 阳性 | 17 | 阳性 | 阳性 |
| 9 | 阳性 | 阳性 | 18 | 阳性 | 阳性 |

**（3）、猫嵌杯病毒荧光RT-RAA试验方法的建立**

3.1标准DNA的制备

针对猫嵌杯病毒保守基因（Urbana株，登录号为NC\_001481.2，全长7 683 bp），筛选出其中一段基因片段（5 274位至5 506位），命名为猫嵌杯病毒标准DNA，序列如下：

5’-gcatgaccgccctacactgtgatgtgttcgaagtttgagcatgtgctcaacctgcgctaacgtgcttaaatattataattgggacccccacttcaaattagtgatcaatcctaacaaattcttgtccataggtttctgtgataatccacttatgtgctgttatcctgaattgctccctgaattcggaaccgtatgggattgcgaccagtccccacttcaaatttatcttgagt-3’。

3.2 引物对和探针

依据该猫嵌杯病毒标准DNA设计3对RT-RAA引物对，见表3-1。(NCBI Reference Sequence: NC\_001481.2)

表3-1 FCV的RT-RAA引物序列

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 引物对 | 序列 (5'->3') | 起始位置 | 终止位置 | 长度（bp） |
| 1 | FCV1F | GCATGACCGCCCTACACTGTGATGTGTTCG | 5274 | 5303 | 233 |
| FCV1R | ACTCAAGATAAATTTGAAGCGGGGACTGGT | 5477 | 5506 |
| 2 | FCV2F | CTACACTGTGATGTGTTCGAAGTTTGAGCA | 5285 | 5315 | 190 |
| FCV2R | CAATCCCATACGGTTCCGAATTCAGGGAGC | 5434 | 5474 |
| 3 | FCV3F | CTCAACCTGCGCTAACGTGCTTAAATATTAC | 5319 | 5350 | 134 |
| FCV3R | CAGGGAGCAATTCAGGATAACAGCACATAAGT | 5420 | 5452 |

设计的用于结合猫嵌杯病毒荧光RT-RAA扩增产物的探针（FCV Probe），序列如下：5’-CTTCAAATTAGTGATCAATCCTAACAAAT/dT-FAM//idSpacer//dT-BHQ1/TGTCCATAGGTTTC-C3 Spacer-3’（位置5 363-5 409）。

3.3 检测体系的建立

猫嵌杯病毒荧光RT-RAA检测体系（50 μL）包括：正向引物（如表1所示），浓度10 μM，体积2 μL；反向引物（如表1所示），浓度10μM，体积2 μL；探针（FCV Probe），浓度10μM，体积0.6 μL；实时荧光RT-RAA扩增体系，体积20 μL；20%聚乙二醇，12.5 μL；镁离子（醋酸镁），浓度280 mM，体积2.5 μL；ddH2O，体积8.4 μL；待检样本核酸，体积2 μL。

3.4 最佳引物对的筛选

应用荧光RT-RAA检测方法对3对引物序列实施检测，验证3对引物和探针的特异性和敏感性，筛选出最佳引物对。

在相同的检测体系中，应用不同的引物对进行荧光RT-RAA检测，检测结果见图3-1。研究结果表明引物对FCV1F/FCV1R、FCV2F/FCV2R、FCV3F/FCV3R和探针FCV Probe的曲线特异性和敏感性均较好，符合荧光RT-RAA检测体系要求。结合猫嵌杯病毒普通RT-RAA引物对筛选结果，最终确定引物对FCV1F/FCV1R为FCV荧光RT-RAA检测方法的引物。

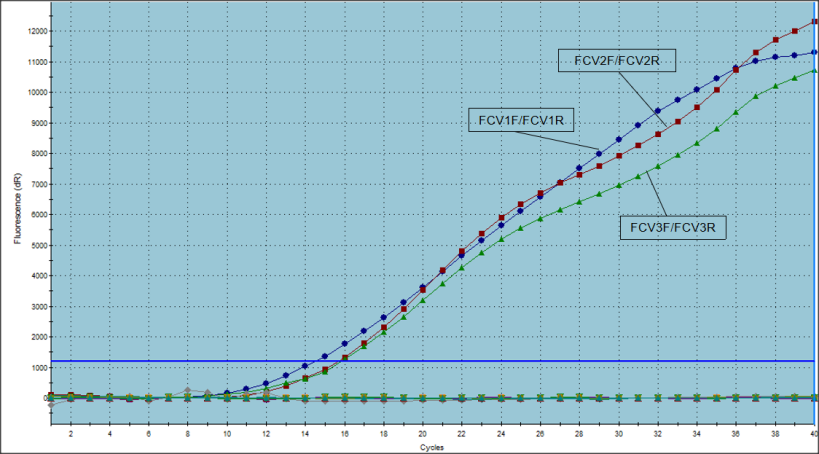


图3-1 不同引物对荧光RT-RAA检测结果

3.5 敏感性试验

合成猫嵌杯病毒标准DNA，并插入到pUC57载体中，构建猫嵌杯病毒的标准模板质粒DNA，命名为FCV\_pUC57，继而转化入E. coli大肠杆菌内。猫嵌杯病毒标准DNA在添加了200 μg/mL（终浓度）氨苄青霉素的LB培养基中，37℃培养8 h后，按照Magen磁珠法抽提试剂盒（Magen，产品编号：Md5416-01）说明书进行质粒提取。通过超微量分光光度计测得提取的FCV\_pUC57浓度为2.5 ng/mL，根据公式 (质粒拷贝数 copies/μL) = (6.02×1023 copies/μL) × (质粒浓度 g/μL)/(2 943×660 g/mol)计算出FCV\_pUC57拷贝数浓度为7.7×105 copies/μL。

将FCV\_pUC57进行10倍梯度稀释，制备浓度从7.7×105 copies/μL到7.7×10-1 copies/μL的系列浓度的标准模板质粒DNA，将其作为模板DNA（待测样品）进行敏感性验证。

如图3-2所示，当模板浓度为7.7×100 copies/μL时，荧光曲线仍有上升，则该方法检测猫嵌杯病毒最低拷贝数可以达到15.4。

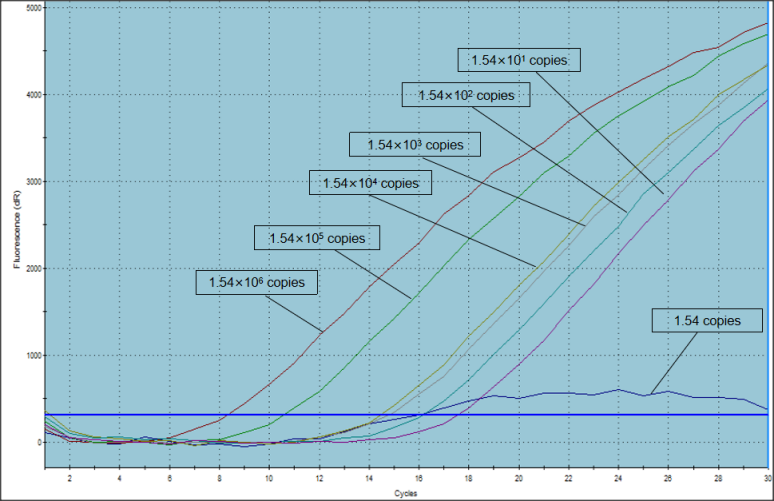


图3-2 荧光RT-RAA敏感性检测结果

3.6 特异性试验

将猫嵌杯病毒、猫疱疹病毒1型、猫传染性腹膜炎病毒、猫细小病毒、猫波氏杆菌和F81细胞的核酸进行特异性验证。同时设FCV\_pUC57为阳性对照，pUC57为阴性对照。

如图3-3所示，猫嵌杯病毒与其他病原体并无交叉反应，特异性较好。

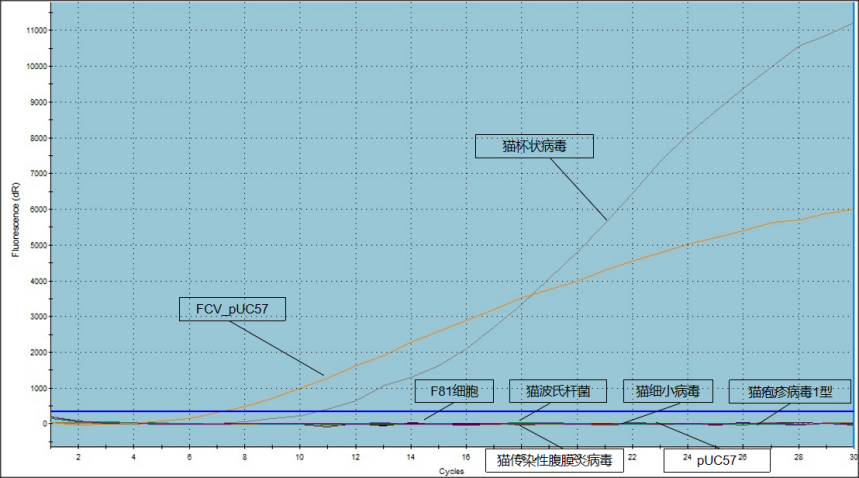


图3-3 荧光RT-RAA特异性检测结果

3.7 重复性试验

将5份猫嵌杯病毒阳性质控样品（P1~P5）和4份阴性质控样品（N1~N4）采用3批试剂盒，每批3个试剂盒进行3次重复检测。

对3批次3个试剂盒进行3次重复检测，结果显示本方法批内和批间具有较好的重复性（表3-2），检测结果符合批间差要求。

表3-2 批间和批内重复性结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 批1 | | | 批2 | | | 批3 | | |
| 第一次 | 第二次 | 第三次 | 第一次 | 第二次 | 第三次 | 第一次 | 第二次 | 第三次 |
| P1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| P2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| P3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| P4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| P5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| N1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| N2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| N3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| N4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

3.8 符合率验证

分别按照本标准方法和猫嵌杯病毒荧光RT-PCR试剂盒方法（[上海尔创生物科技有限公司](https://www.caasbuy.com/platform/shop.lf?shopid=18732)，产品编号：EC20210617-04）对48份临床样品进行核酸快速检测，验证猫嵌杯病毒荧光RT-RAA和荧光RT-PCR方法的符合率。

对48份临床样品猫嵌杯病毒检测结果进行分析，其中20份为猫嵌杯病毒阳性样品，有28份为猫嵌杯病毒阴性样品。如表3-3所示，20份阳性检测结果与荧光定量PCR检测一致，28份阴性样品检测结果与荧光RT-PCR检测一致，而本标准检测方法的检测结果与荧光RT-PCR检测结果阳性符合率为100%，阴性符合率为100%。

表3-3荧光RT-RAA和荧光RT-PCR方法的临床样本检测结果比对

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | 荧光RT-PCR | | 荧光RT-RAA性能指标 | |
| 阳性样本（份） | 阴性样本（份） | 阳性符合率（%） | 阴性符合率（%） |
| 荧光RT-RAA | 阳性样本 | 20 | 0 | 100% | 100% |
| 阴性样本 | 0 | 28 |
| 合计 | 20 | 28 |

**（4）、普通RT-PCR方法的建立**

4.1引物

本标准中的检测方法根据FCV的VP1基因参见文章进行引物合成（Ohe K, Sakai S, Sunaga F, *et al*. Detection of feline calicivirus(FCV) from vaccinated cats and phylogenetic analysis of its capsid genes. Veterinary research communications, 2006(30):293-305.）：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。

4.2反应体系的建立

按照如下表4-1反应体系配制RT-PCR反应溶液，同时设立阳性和阴性对照。

表4-1 RT-PCR反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 加入体积（μL） |
| 2×one step Buffer（Dye Plus） | 25 |
| PrimeScript 1 Step Enzyme Mix | 2 |
| 上游引物F（20 μM） | 1 |
| 下游引物R（20 μM） | 1 |
| DEPC水 | 16 |
| 核酸 | 5 |
| 总体积 | 50 |

4.3反应程序的设置和结果判定

程序设置：按照如下表4-2程序，将表4-1中配制的反应体系在普通PCR仪上进行扩增。将扩增产物在2%琼脂糖凝胶上电泳，观察扩增产物特异性扩增条带。

表4-2 RT-PCR反应程序

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 程序 | 温度 | 时间 | 循环数 |
| 反转录 | 50 ℃ | 30 min | 1 |
| 预变性 | 94 ℃ | 5 min | 1 |
| 变性 | 94 ℃ | 45 s | 35 |
| 退火 | 50 ℃ | 60 s |
| 延伸 | 72 ℃ | 60 s |
| 末次延伸 | 72 ℃ | 10 min | 1 |
| 保温 | 4 ℃ | ∞ |  |

结果判定：在阳性对照出现955 bp的特异性扩增条带，阴性对照无此扩增条带时判定结果。被检样品出现955 bp的特异性扩增条带，判定为FCV核酸阳性，否则，判定为FCV核酸阴性。

4.4特异性试验

用已优化的反应体系及扩增条件，用猫嵌杯病毒疫苗、狂犬病病毒疫苗、猫疱疹病毒、猫细小病毒、猫传染性腹膜炎病毒阳性样品、犬流感病毒和犬瘟热病毒疫苗进行普通RT-PCR，以确定此方法的特异性。

当进行普通RT-PCR扩增，待检样品为FCV疫苗毒时，能得到特异性扩增曲线，狂犬病病毒等其他6种病毒均未出现特异性扩增（图4-1）。

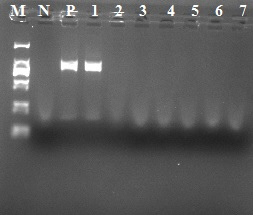


图4-1 特异性试验（M:DL Marker2000，N：阴性对照，P：阳性对照，1：猫嵌杯病毒疫苗，2：狂犬病病毒疫苗，3：猫疱疹病毒，4：猫细小病毒，5：猫传染性腹膜炎病毒阳性样品，6：犬流感病毒，7：犬瘟热病毒疫苗）

4.5敏感性试验

分别将FCV阳性质粒DNA用分光光度计测定浓度后，用DEPC-H2O对质粒标准品做10倍系列稀释，使每5 μL检测用量中的拷贝数分别为2.5×105、2.5×104、2.5×103、2.5×102、2.5×101、2.5×100 、2.5×10-1拷贝/μL进行普通RT-PCR扩增。普通RT-PCR 反应体系以及反应条件同特异性试验中所示。

当进行普通RT-PCR扩增，对质粒标准品做10倍系列稀释，能得到特异性扩增曲线，普通RT-PCR方法的最低检测限约为2.5×102拷贝/μL（图4-2）。

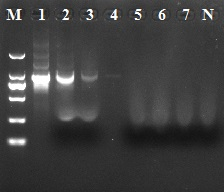


图4-2 敏感性试验（M:DL Marker2000，N：阴性对照，1~7：2.5×105、2.5×104、2.5×103、2.5×102、2.5×101、2.5×100 、2.5×10-1拷贝/μL）

4.6临床发病病例

对本标准建立的荧光RT-PCR方法检测阳性的6例病猫样品（鼻咽拭子4份，肛门拭子2份）进行普通RT-PCR检测，结果显示（图4-3）均为阳性，符合率为100%。

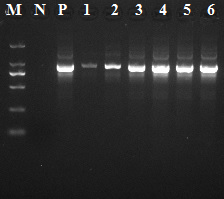


图4-3 临床病例检测（M:DL Marker2000，N：阴性对照，P：阳性对照，1~6：分别为临床发病猫样品）

**（5）、猫嵌杯病毒实时荧光RT-PCR试验方法的建立**

5.1 引物探针设计：

根据GenBank中登录的具有代表性的FCV全基因组序列 ，应用DNAMAN生物分析软件进行比对分析，找到保守区域ORF1设计特异性探针，应用Primer 3.0在线软件，在探针靶位置两侧分别设计引物和探针，如图5-1。探针5’端用FAM荧光基团标记，3’端用用BHQ1淬灭基团标记。探针和引物由上海桑尼生物技术有限公司合成、标记。

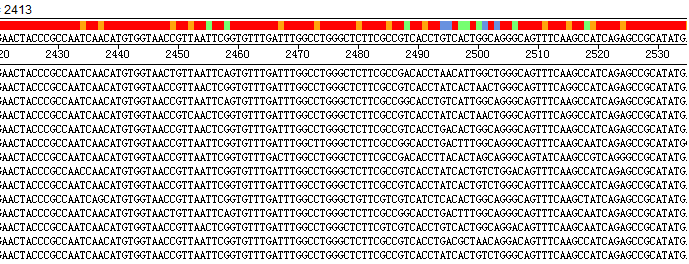


图5-1 ORF1保守区域引物和探针位置

5.2 反应体系的优化

5.2.1反应体系与扩增条件

反应体系如表5-1所示。参考TaKaRa One Step PrimeScriptTM RT-PCR Kit试剂盒说明书进行。扩增条件：42 ℃10 min；94 ℃15 min；95 ℃15 s，60 ℃45 s，40个循环。

表5-1 反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| 组份 | 体积 |
| 2×One Step RT-PCR BufferⅢ | 12.5 μL |
| 5U/μL TaKaRa Ex TaqTM HS | 0.5 μL |
| PrimeScriptTM RT Enzyme MixⅡ | 0.5 μL |
| 10 μM 上游引物 | 0.5 μL |
| 10 μM 下游引物 | 0.5 μL |
| 10 μM探针 | 1.0 μL |
| 10 ng Total RNA | 3 μL |
| ddH2O | 6.5 μL |
| Total | 25 μL |

5.2.2 探针引物浓度的优化

以0.24 µM~0.80 µM（以0.08 µM递增）的引物浓度和0.16 µM~0.48 µM（以0.08 µM递增）的探针浓度组合，进行荧光RT-PCR，以选择最佳引物和探针浓度。扩增条件同5.2.1，反应体系如表5-2所示：

结果显示，以0.24 µM的引物浓度和0.48 µM的探针浓度为最佳组合。

表5-2 探针引物浓度的优化

|  |  |
| --- | --- |
| 组份 | 体积 |
| 2×One Step RT-PCR BufferⅢ | 12.5 μL |
| 5U/μL TaKaRa Ex TaqTM HS | 0.5 μL |
| PrimeScriptTM RT Enzyme MixⅡ | 0.5 μL |
| 10 μM上游引物 | X1 μL |
| 10 μM下游引物 | X2 μL |
| 10 μM探针 | Y μL |
| 10 ngTotal RNA | 3 μL |
| ddH2O | 8.5-X1-X2-Y μL |
| Total | 25 μL |

5.2.3 退火温度的优化

以55 ℃、58 ℃、60 ℃、62 ℃为退火温度进行荧光RT-PCR，选择最佳退火温度及有效扩增温度范围。扩增条件：42 ℃10 min；94 ℃15 min；95 ℃15 s，55 ℃/58 ℃/60 ℃/62 ℃45 s，40个循环。反应体系如表5-3所示：

表5-3 退火温度的优化

|  |  |
| --- | --- |
| 组份 | 体积 |
| 2×One Step RT-PCR BufferⅢ | 12.5 μL |
| 5U/μL TaKaRa Ex TaqTM HS | 0.5 μL |
| PrimeScriptTM RT Enzyme MixⅡ | 0.5 μL |
| 10 μM 上游引物 | 0.5 μL |
| 10 μM下游引物 | 0.5 μL |
| 10 μM探针 | 1.0 μL |
| 10 ngTotal RNA | 3.0 μL |
| ddH2O | 6.5 μL |
| Total | 25 μL |

结果显示，以42 ℃10 min；94 ℃15 min；95 ℃15 s，60 ℃45 s，40个循环的扩增条件最佳。

5.3 标准曲线的制备

荧光 PCR标准曲线的制备：将FCV标准品为DNA模板，用分光光度计测定浓度后，用DEPC-H2O对质粒标准品做10倍系列稀释，使每5 μL 检测用量中的拷贝数分别为7.6×107、7.6×106、7.6×105、7.6×104、7.6×103 拷贝/μL，设置3个重复，进行扩增，反应结束后，利用ViiA 7荧光PCR分析软件自动得到标准曲线。

根据Ct值及其对应标准品浓度做标准曲线，出现典型的S型扩增曲线，指数区较明显，标准品起始模板浓度与Ct值呈现具有良好的线性范围，斜率等于-3.523，相关系数R2为0.998（见图5-2和图5-3）。根据Ct值和标准曲线即可获得样品浓度。

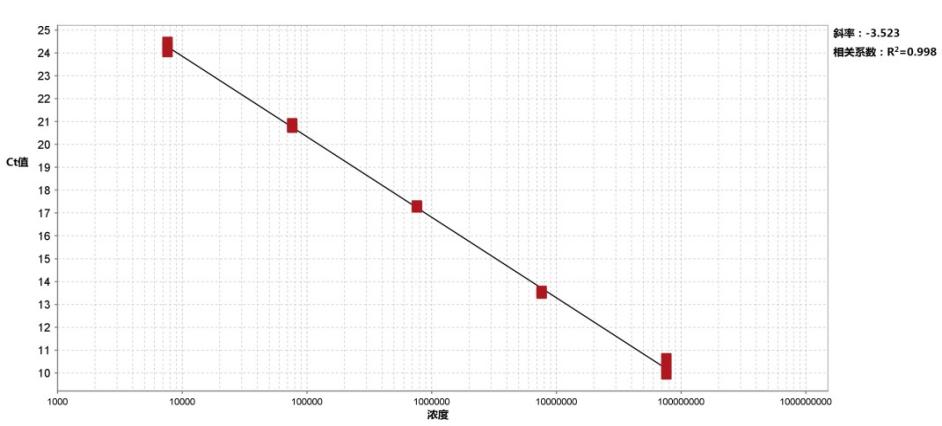
****

图5-2检测FCV的荧光RT-PCR的扩增曲线结果

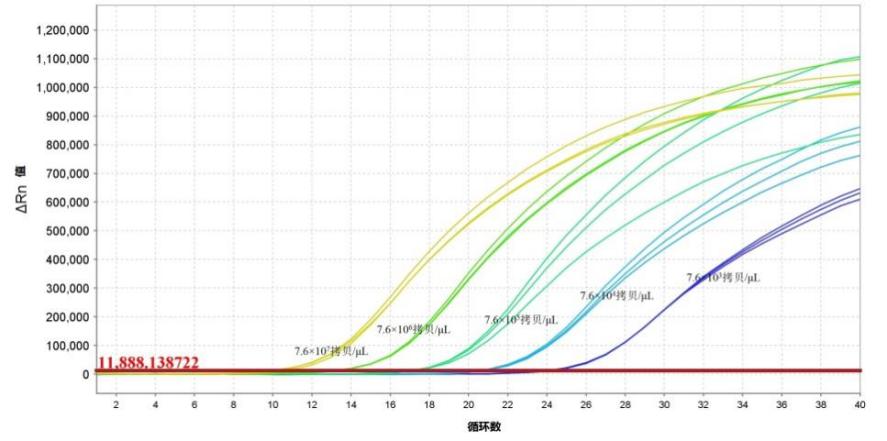
****

图5-3检测FCV的荧光RT-PCR的标准曲线结果

5.4. 方法评价

5.4. 1特异性试验

根据上述优化的反应体系及扩增条件，用猫嵌杯病毒疫苗、狂犬病病毒疫苗、猫疱疹病毒、猫细小病毒、猫传染性腹膜炎病毒阳性样品、犬流感病毒和犬瘟热病毒疫苗进行实时荧光RT-PCR，以确定此方法的特异性。

当进行实时荧光RT-PCR扩增，待检样品为FCV疫苗毒时，能得到特异性扩增曲线，狂犬病病毒等其他6种病毒均未出现特异性扩增（图5-4）。

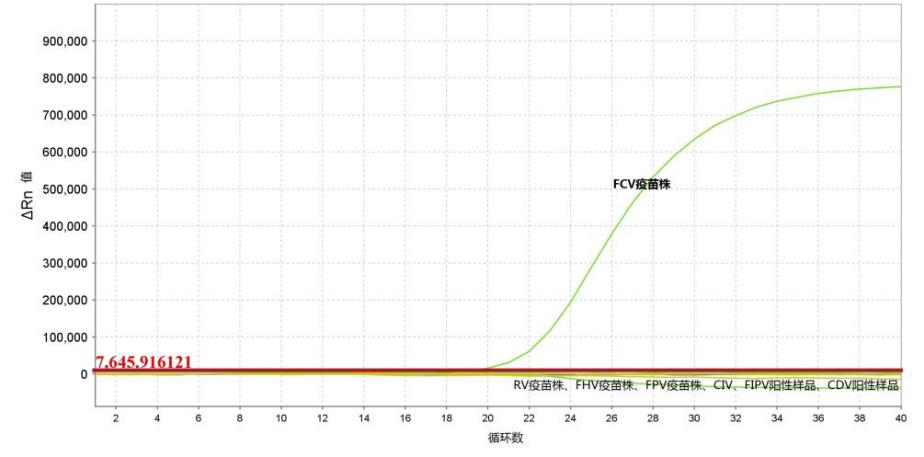


图5-4检测FCV的荧光RT-PCR的特异性试验结果

5.4.2 重复性试验

应用实时荧光RT-PCR方法对5个10倍连续稀释的FCV标准品(7.6×107 copies/μL)的RNA分别进行5次重复检测，以确定此方法的批内重复性；连续5天对同样的稀释样品进行实时荧光RT-PCR检测，以确定此方法的批间重复性。

荧光RT-PCR方法检测组内重复性及组间重复性（见表5-4），组内变异系数为0.45%，组间变异系数为1.51%，组内及组间变异系数都小于3%，在合理的范围内，说明本检测方法具有良好的稳定性。

表5-4 荧光RT-PCR重复性检测结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 重复性 | 质粒拷贝数  （拷贝/μL） | Ct值 | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 平均值 | SD | CV |
| 组内 | 7.6×107 | 16.31 | 16.22 | 16.29 | 16.11 | 16.18 | 16.22 | 0.073 | 0.45% |
| 组间 | 7.6×107 | 16.52 | 16.36 | 16.21 | 16.67 | 15.96 | 16.34 | 0.246 | 1.51% |

5.4.3敏感性试验

分别将FCV阳性质粒DNA用分光光度计测定浓度后，用DEPC-H2O对质粒标准品做10倍系列稀释，使每5 μL检测用量中的拷贝数分别为7.6×106、7.6×105、7.6×104、7.6×103、7.6×102、7.6×101、7.6×100 、7.6×10-1拷贝/μL进行荧光RT-PCR扩增。荧光RT-PCR 反应体系以及反应条件同特异性试验中所示。

当进行实时荧光RT-PCR扩增，对质粒标准品做10倍系列稀释，能得到特异性扩增曲线，荧光RT-PCR方法的最低检测限约为7.6×100拷贝/μL（图5-5）。

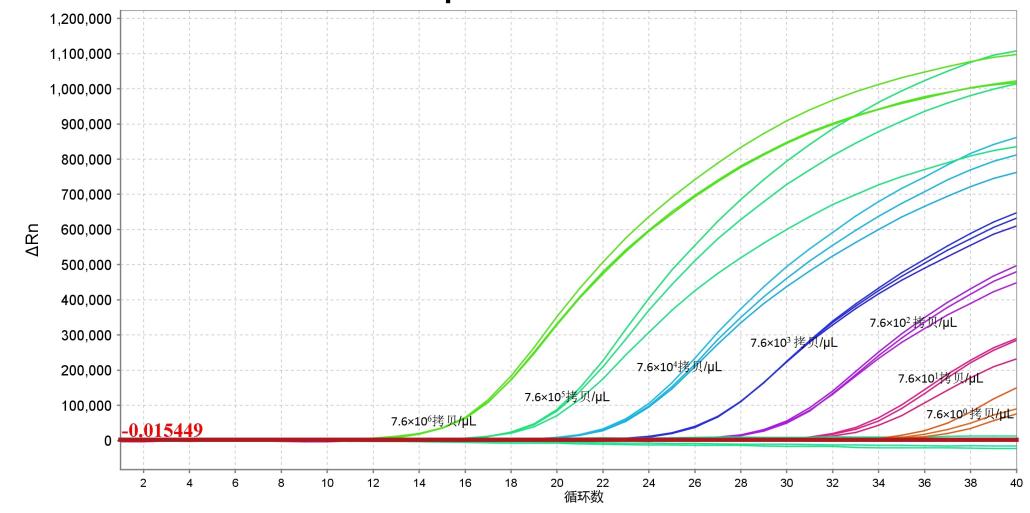


图5-5检测FCV的荧光RT-PCR的敏感性试验结果

5.5 猫嵌杯病毒实时荧光RT-PCR试验方法的临床应用

5.5.1 临床发病病例

于2018年7月～2020年6月采集接诊的患猫鼻咽拭子、肛拭子、血液、血清等样品，运用本标准建立的荧光RT-PCR方法对13例病猫的临床病例共29份样品（鼻咽拭子13份，肛门拭子8份，全血5份，血清3份）进行检测，结果显示阳性样本7份，阴性样本22份。其中，鼻咽拭子FCV的阳性率为46.2%（6/13），肛拭子FCV的阳性率为12.5%（1/8），血液FCV的阳性率为20%（1/5），血清为阴性。

5.5.2 猫科动物

为了解上海某动物园中流浪猫和猫科动物FCV的感染情况，于2019年12月份至2020年1月份，收集来自上海某动物园的猫科动物样品144份，运用本研究建立的荧光RT-PCR方法进行检测，结果检测到20份FCV阳性样品，如下表所示。

表5-5流浪猫和猫科动物FCV的感染情况

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 动物种类 | 动物数量 | 样品种类 | | | FCV荧光RT-PCR检测结果 | | |
| 鼻拭子 | 肛拭子 | 粪便 | 鼻拭子 | 肛拭子 | 粪便 |
| 流浪猫 | 57 | 57 | 57 | / | 13/57 | 5/57 | / |
| 华南虎 | 11 | 1 | 1 | 10 | 0/1 | 0/1 | 0/10 |
| 美洲狮 | 4 | / | / | 4 | / | / | 0/4 |
| 金钱豹 | 3 | / | / | 3 | / | / | 0/3 |
| 豹猫 | 2 | / | / | 2 | / | / | 1/2 |
| 薮猫 | 2 | / | / | 2 | / | / | 0/2 |
| 狞猫 | 3 | / | / | 3 | / | / | 0/3 |
| 猞猁 | 4 | / | / | 4 | / | / | 1/4 |
| 合计 | 86 | 58 | 58 | 28 | 13/58 | 5/58 | 2/28 |

**（6）、间接ELISA方法的建立及优化**

6.1 阴阳性血清的制备

阳性血清的制备：选取2只1岁龄的免疫健康猫，接种妙三多的三联灭活疫苗，采取颈部皮下注射。每2周接种一次，接种6次后，经全病毒间接ELISA方法和Biogal生产的猫三联抗体检测试剂盒双向验证血清为阳性后，大量静脉采血，作为猫阳性血清样本。阴性血清为本实验室保存。

6.2 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6-1所示命名为△FCV VP1，送往苏州金唯智生物科技有限公司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 送上海桑尼生物科技有限公司进行测序，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6-1 FCV VP1基因B细胞表位串联表达

（1）引物的合成与PCR扩增

根据优化后的△FCV VP1序列，使用DNAStar 软件设计该序列的特异性扩增引物F2、R2，扩增片段约为1000bp，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成序列如表6-1所示：

表 6-1 PCR 引物

|  |  |
| --- | --- |
| 引物名称Primer name | 序列Sequence |
| F2 | ATGGATGACGGCAGCATTACC |
| R2 | TCACATGTTGCTACGGATGTTGC |

以优化后的△FCV VP1序列为模板进行PCR扩增，扩增体系为20μL，体系组成如表6-2所示。

PCR 反应程序为：95℃预变性 3 min；95℃变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，32 个循环；72℃终延伸 5 min，反应完成后用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

表 6-2 PCR 反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| 组分Component | 体积Volume |
| Green Taq Mix | 10μL |
| 上游引物 | 1μL |
| 下游引物 | 1μL |
| 模板DNA | 1μL |
| dd H2O | 7μL |

（2）转化

将公司合成的质粒取1μL加入到从-80℃取出的已融化的克隆菌E.coli DH5α中（转化的每步操作均在超净台进行），冰上静置30 min；42℃水浴锅热休克 45 s，立即冰上静置2min；补加 700 μL 无抗的LB 液体培养基，37℃振荡培养 1 h。吸取 100 μL 培养物涂布于含氨苄青霉素的 LB平板，37℃培养 12~16 h。挑取单个菌落接种于 5 mL 含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，37℃振荡培养 14 h。按操作说明书，用南京诺唯赞生物技术公司质粒小量提取试剂盒提取质粒。

（3）质粒的提取

具体的操作步骤如下：

1、取 5 mL 37℃振荡培养 14 h菌液，从试管转移入15mL的离心管内，12000 rpm 离心 10 min，弃培养基，并在纸上吸尽残留的液体；

2、在含有菌体的离心管中加入 250 μL 的 Buffer P1 溶液（已加入 RNA 酶），涡旋振荡混匀，离心1min ，用移液枪转移至1.5mL的EP管中，再次混匀至无肉眼可见的菌体团块；

3、向1.5mL的EP管中加入250 μL 的 Buffer P2 溶液，温和上下颠倒混匀 6~8次，充分裂解菌体，至溶液由粘稠变为清亮，且带有一些白色的絮状沉淀，12000 rpm 离心 10 min，从离心机中轻轻取出；

4、提前将FastPure DNA Mini Columns吸附柱置于Collection Tube 2 mL，然后用移液枪上清液缓慢地移动至吸附柱中，12000 rpm，离心 45 s，将滤液重新加入到吸附柱中重复2-3次后，弃掉滤液；

5、加入 600 μL Buffer PW2 至吸附柱中，12000 rpm 离心 1 min，弃滤液，重复步骤7，3次；

6、12000 rpm，离心 2 min，倒掉收集管中的滤液，室温放置2min，挥发残留的乙醇；

7、将吸附柱放入另一高压灭菌的1.5mL的EP管中，加入提前在55℃预热的 Elution Buffer 50μL，室温放置2min，12000 rpm 离心 1 min，收集管中 Elution Buffer，反复洗脱2-3次。

8、测浓度，置于-20℃冰箱贮存备用。

（4）酶切鉴定

使用序列合成时所选择的两个限制性内切酶，酶切进行鉴定，体系为50μL，反应组成如下：

表 6-3 限制性内切酶双酶切反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| 组分Component | 体积Volume |
| DNA | 1μg |
| 10×rCutSmart Buffer | 5μL(1×) |
| *BamHI* | 1μL(20units) |
| *EcoRI* | 1μL(20units) |
| Nuclease-free Water | to 50μL |

37℃水浴锅中2-4h，用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。

6.3 重组蛋白的表达、鉴定、纯化、浓度测定

（1）重组蛋白的表达

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 450nm值为0.5（0.4-0.6 左右）时，加入IPTG于16 ℃ 诱导表达 24 h，12000rmp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4h后，煮蛋白胶进行脱色，检测重组蛋白的表达情况及可溶性。

（2）重组蛋白的鉴定

具体操作步骤如下：

1、取适量蛋白样，加入5×SDS PAGE Loading Buffer，100℃金属浴煮样10min；

2、再次离心取上清进行SDS PAGE电泳（先阳极滤纸再加硝酸纤维素膜铺胶滤纸再阴极，注意每层之间不能有气泡），然后80V 30min,再调120V 90min；

3、5%的脱脂乳用TBST配制，37℃ 2 h，TBST洗三次，每次10min；

4、一抗（1：1000）用等量的一抗/二抗稀释液和PBS混合，抗体以1：1000进行稀释，4℃孵育过夜，TBST洗三次，每次10 min；

5、二抗（1：10 000）用5%的脱脂乳以1：10 000稀释，室温孵育45-60 min,，TBST洗三次，每次10min；

6、显色（A液和B液1：1配制，避光）。

（3）重组蛋白的纯化

蛋白的纯化按照碧云天生产的耐变性剂型BeyoGold™ His-tag Purification Resin试剂盒的蛋白纯化方法进行，具体操作步骤如下所示：

1、培养500 mL的菌体，10 000 rmp离心10 min，用PBS重悬菌体再次离心，重复两次后，按照每500mL 表达菌加入 40ml 变性裂解液的比例加入裂解液，充分重悬；

2、菌体冰上超声裂解细菌。将40 mL重悬后的菌体分装入2个50 mL的离心管，每管20 mL进行超声，超声功率200-300W，每次超声处理5s，每次间隔9s，共超声处理20min；

3、4ºC 10,000g离心20-30min，收集细菌裂解液上清并置于冰水浴或冰上。可以取20μL上清留作后续检测用；

4、取适8mL的50% BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)，4ºC离心(2000g×30s)弃去储存液，向凝胶中加入一个柱体积的变性裂解液混匀以平衡凝胶，4ºC离心(2000g×30s)弃去液体，再重复平衡1-2次，弃去液体，加入40mL细菌裂解液上清。4ºC在侧摆摇床上缓慢摇动4h；

5、将裂解液和BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型)的混合物装入适当的空柱管中，将纯化柱底部的盖子打开，在重力作用下使柱内液体流出，收集约20µl穿流液作后续分析用；

6、洗柱5次，每次加入0.5-1ml裂解液，每次均收集约20µl穿柱的裂解液用于后续的分析检测用；

7、再次洗柱5次，每次加入0.5-1ml变性洗涤液，每次均收集约20µl穿柱的洗涤液用于后续的分析检测用；

8、洗脱目的蛋白8次，每次用0.5ml变性洗脱液。将每次的洗脱液分别收集到不同的离心管中，收集获得的洗脱液即为纯化的His标签蛋白样品。

（4）重组蛋白浓度的测定

纯化后的蛋白利用碧云天BCA蛋白浓度测定试剂盒测定浓度后分装，置于-80℃冻存，具体操作步骤如下：

1、蛋白质标准品的制备：首先取0.8mL蛋白质标准配制液加到一支20mg BSA的管中，待其完全溶解之后配制成25mg/mL的蛋白质标准溶液。配制后可以马上使用，或者置于-20ºC长期保存；

2、根据所测样品的数量，取适量25mg/mL蛋白质标准液，用PBS稀释至终浓度为0.5mg/mL备用，配制后可以马上使用，或者置于-20ºC长期保存；

3、BCA工作液的制备：根据需测浓度样品的数量，按A液：B液比例50:1制备，涡旋震荡混匀；

4、样品浓度的测定：将标准品按0、1、2、4、8、12、16、20µL加到96孔板的标准品孔中，对应的PBS补足到20µL，即20、19、18、16、12、8、4、0µL，等同于标准品浓度分别为0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/mL，设置三个复孔；

5、取被检样品7µL，加63µL的PBS，即将样品稀释10倍，涡旋震荡混匀，取20µL到96孔板中，设置三个复孔；

6、每个孔加入200µL BCA工作液，在37ºC恒温箱中放置30min左右；

7、用酶标仪测定A562波长的吸光度；

8、根据标准曲线和使用的样品体积计算出样品的蛋白浓度。

6.4间接ELISA方法的建立及优化

（1）抗原最适包被浓度和血清最适稀释度的选择

采用棋盘式方法，横排选择抗体稀释度（1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 000、1:1 200、1:1 400、1:1 600）），纵排选择抗原浓度（1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL 、8 μg/mL ），每组3个重复孔，取平均值。测定OD450nm值，并选出标准阳性血清 OD450nm值接近1，同时标准阳性血清∶标准阴性血清的比值（P/N）最大，此时判定为抗原包被浓度和标准血清最佳稀释度。

（2）最佳包被条件的确定

用最佳抗原浓度包被酶标板，包被条件为室温作用1h再4℃过夜、室温作用 2h再4℃过夜、37℃作用1h再4℃过夜、37℃作用 2h再4℃过夜、直接4℃作用过夜，每组3个重复孔，最后测定OD450值，优化抗原包被时间。

（3）最佳封闭液的确定

选用5%脱脂乳、10%脱脂乳、5%BSA、10%BSA、5%明胶、10%明胶作为封闭液，其他条件固定不变，进行ELISA 检测，每组3个重复孔，最后测定OD450值，优化最佳封闭液。

（4）最佳封闭时间的确定

加入封闭液后，反应时间设为60min、90min、120min，进行ELISA 检测，每组3个重复孔，最后测定OD450值，优化封闭反应时间。

（5）血清最佳反应时间

加入血清后，反应时间为30min、60min、90min，进行ELISA 检测，每组3个重复孔，最后测定OD450值，优化血清反应时间。

（6）酶标二抗的最佳稀释度的确定

最佳抗原浓度包被酶标板和标准阴阳性血清最佳的稀释度，按照上述的过程，HRP标记的抗猫IgG分别按1∶5 000、1∶10 000、1∶15 000、1：20 000稀释，每组3个重复孔。 最后测定OD450值，筛选出最佳HRP标记的抗猫IgG反应浓度。

（7）酶标二抗的最佳作用时间的确定

其他条件固定不变，加入HRP标记的抗猫IgG后，设置3个反应时间，分别为30 min、60 min和90 min，每组3个重复孔，最后测定OD450值，优化最佳HRP标记抗猫IgG的反应时间。

（8）底物最佳反应时间的确定

加入底物（TMB）后，反应时间为10min、15min、20min ，进行 ELISA 检测，每组3个重复孔，最后测定OD450值，优化最佳的底物反应时间。

6.5 ELISA方法临界值的确定

用已经建立的ELISA方法检测采集的猫阴性血清标本10份，测得相应的阴性猫血清的OD450值。求得10份阴性血清OD450平均值和标准方差（x和s）。按照cut-off＝x＋3s，当OD450≥x＋3s，判断血清为阳性，若OD450＜x＋3s，判断血清为阴性。

6.6 特异性试验

用已建立的ELISA方法对猫细小病毒（FPV）阳性血清、猫疱疹病毒（FHV）阳性血清进行检测，以检测该方法的特异性。

6.7 敏感性试验

把猫嵌杯病毒标准阳性血清按照不同的13个浓度稀释，分别是1：20、1：40、1：80、1：160、1：320、1：640、1：1 280、1：2560、1：5120、1：10 240、1：20 480、1：40 960和81 920，采用已建立的 ELISA 方法进行测定。

6.8 重复性试验

利用建立好的FCV间接ELISA抗体检测方法检测4份不同的猫血清进行批间和批内的重复性检测，并计算变异系数。

6.9 临床血清样品的检测

利用建立好的FCV间接ELISA抗体检测方法对51份使用妙三多免疫的猫血清进行检测；从其中随机选择15份与Biogal和上海基灵公司研发的FCV检测试剂进行平行比较。

6.10 PCR与酶切鉴定

重组质粒pCold I △FCV VP1 由公司合成，质粒经PCR鉴定后如图2-2所示，转化入克隆菌，挑取单克隆，然后小提质粒，送往擎科生物进行测序，质粒测序结果表明，目的片段没有突变、移码，表明原核表达质粒构建正确，重组质粒命名为pCold I △FCV VP1，然后进行双酶切鉴定，pCold I △FCV VP1出现了预期大小约 5 400 bp的片段和1 000 bp左右的片段结果如图6-3所示。



1000bp

M 1

250bp

100bp

750bp

500bp

1000bp

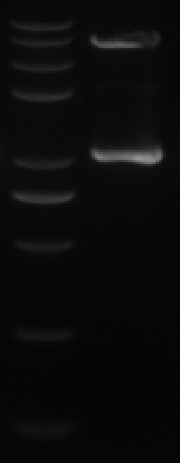
2000bp

1500bp

M:DL2000;1:重组质粒的PCR扩增产物

图6-2 pCold I △FCV VP1的PCR鉴定结果

M 1



1000bp

5400bp

1000bp

1000bp

750bp

500bp

250bp

5000bp

3000bp

2000bp

1000bp

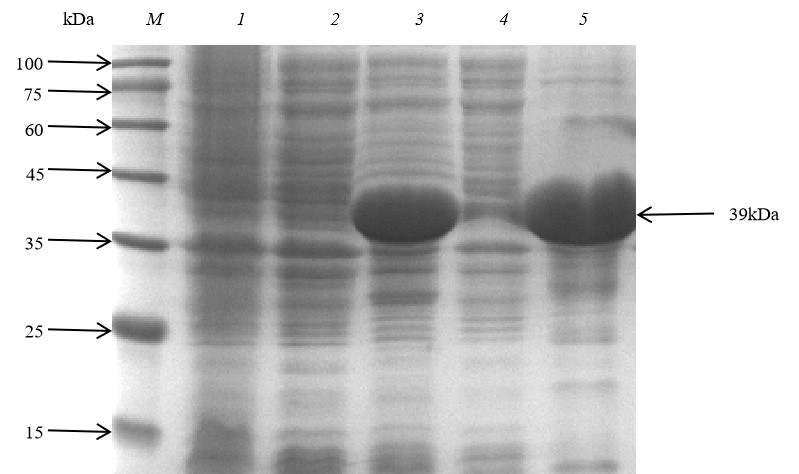
8000bp

M:DL8000;1:重组质粒的*Bam*H I和*Eco*R Ⅰ双酶切产物

图6-3 pCold I △FCV VP1的酶切鉴定结果

6.11 重组蛋白的表达、鉴定、纯化

将重组阳性菌加入IPTG诱导表达后，进行SDS-PAGE电泳，凝胶经考马斯亮蓝染色、脱色后显示的蛋白条带，与预期结果一致，且该蛋白以包涵体形式表达，如图6-4所示。用碧云天生产的BeyoGold™ His-tag Purification Resin试剂盒纯化蛋白，纯化结果如图6-5所示，由图可见纯化效果达95 %以上，并且通过western blot进行标签蛋白的验证正确如图6-6所示，用BCA法测定蛋白质量浓度为3.71 mg/mL，分装置于-80℃保存。



39kDa

45kDa

35kDa

25kDa

15kDa

100kDa

M 1 2 3 4 5

75kDa

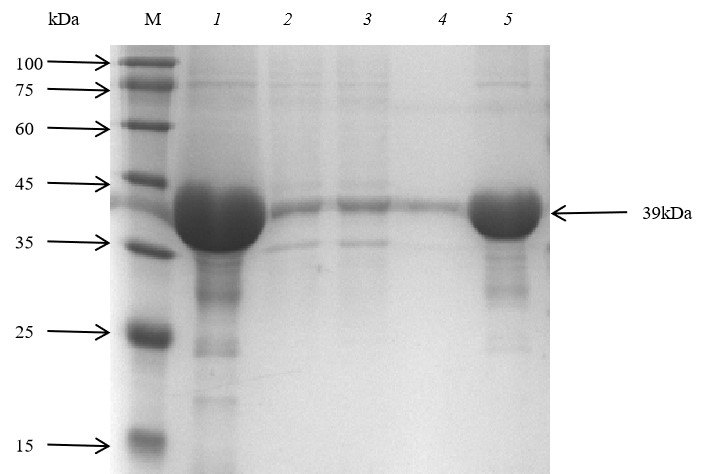
60kDa

M:预染的蛋白质分子质量标准；1：pCold I空质粒诱导后; 2: pCold I △FCV VP1未诱导; 3: pCold I △FCV VP1诱导后; 4: pCold I △FCV VP1诱导后上清液; 5: pCold I △FCV VP1诱导后沉淀

图6-4 pCold I △FCV VP1 基因融合表达蛋白的表达

M 1 2 3 4 5

100kDa



39kDa

25kDa

15kDa

45kDa

35kDa

75kDa

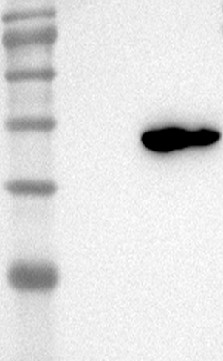
60kDa

M:预染的蛋白质分子质量标准; 1: pCold I △FCV VP1 诱导后沉淀; 2: pCold I △FCV VP1 穿流液; 3: pCold I △FCV VP1 洗涤液1; 4: pCold I △FCV VP1 洗脱液2; 5: pCold I △FCV VP1 纯化后蛋白

图6-5 pCold I △FCV VP1 基因融合表达蛋白的纯化

M 1 2

100kDa



45kDa

35kDa

25kDa

39kDa

75kDa

60kDa

M:预染的蛋白质分子质量标准；1：阴性对照；2：pCold I △FCV VP1 基因融合表达蛋白；

图6-6 pCold I △FCV VP1 基因融合表达蛋白的western blot验证

6.12最佳ELISA反应条件的确定

利用方阵滴定法，经间接ELISA反应条件的优化，结果显示，抗原蛋白最佳包被浓度为2 μg/mL，血清最佳稀释度为1∶1 000如表6-4所示；包被条件为4℃过夜包被如表6-5所示；最佳的封闭液为5%的脱脂乳如表6-6所示；最佳包被时间120min如表6-7所示；最佳血清作用时间60min如表6-8所示；酶标二抗的最佳工作浓度为1∶10 000如表6-9所示；酶标二抗的最佳作用时间为60 min如表6-10所示；底物最佳作用时间为15 min如表6-11所示。

表6-4 最佳抗原包被浓度与血清稀释度

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 抗原包被浓度(ug/mL) | 血清稀释度 | | | | | | | | |
|  | 1：100 | 1：200 | 1：400 | 1：800 | 1：1000 | 1：1200 | 1：1400 | 1：1600 |
| 1 | P | 2.155 | 2.005 | 2.021 | 2.091 | 1.564 | 1.486 | 1.444 | 1.459 |
| N | 1.022 | 0.768 | 0.559 | 0.412 | 0.122 | 0.109 | 0.098 | 0.122 |
| P/N | 2.108 | 2.609 | 3.618 | 5.074 | 12.855 | 13.633 | 14.688 | 11.956 |
| 2 | P | 2.009 | 1.985 | 1.982 | 2.074 | 1.594 | 1.487 | 1.497 | 1.512 |
| N | 1.063 | 0.825 | 0.588 | 0.452 | 0.181 | 0.142 | 0.145 | 0.156 |
| P/N | 1.891 | 2.406 | 3.370 | 4.588 | 8.823 | 10.496 | 10.324 | 9.711 |
| 4 | P | 1.924 | 1.839 | 1.814 | 1.881 | 1.659 | 1.583 | 1.603 | 1.611 |
| N | 0.757 | 0.543 | 0.305 | 0.218 | 0.273 | 0.234 | 0.187 | 0.209 |
| P/N | 2.542 | 3.389 | 5.940 | 8.647 | 6.086 | 6.773 | 8.588 | 7.722 |
| 8 | P | 1.829 | 1.814 | 1.793 | 1.832 | 1.635 | 1.598 | 1.600 | 1.648 |
| N | 0.600 | 0.519 | 0.318 | 0.199 | 0.235 | 0.222 | 0.209 | 0.212 |
| P/N | 3.047 | 3.497 | 5.639 | 9.206 | 6.946 | 7.211 | 7.665 | 7.784 |

表6-5 最佳抗原包被时间

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 包被条件 | 阳性血清 OD450nm | 阴性血清 OD450nm | P/N |
| 37℃1h 后 4℃过夜 | 1.583 | 0.264 | 5.995 |
| 37℃2h 后 4℃过夜 | 1.636 | 0.320 | 5.113 |
| 室温 1h 后 4℃过夜 | 1.523 | 0.254 | 5.988 |
| 室温 2h 后 4℃过夜 | 1.563 | 0.269 | 5.819 |
| 4℃过夜 | 1.658 | 0.220 | 7.548 |

表6-6 最佳封闭液

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 封闭液 |  | OD450 |  |  | OD450 |
| 5% 脱脂乳 | P | 1.542 | 10% 脱脂乳 | P | 1.514 |
| N | 0.209 | N | 0.238 |
| P/N | 7.378 | P/N | 6.372 |
| 5% BSA | P | 1.540 | 10% BSA | P | 1.476 |
| N | 0.299 | N | 0.356 |
| P/N | 5.153 | P/N | 4.148 |
| 5% 明胶 | P | 1.543 | 10% 明胶 | P | 1.507 |
| N | 0.225 | N | 0.234 |
| P/N | 6.866 | P/N | 6.430 |

表6-7 最佳封闭时间

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 封闭时间 |  | OD450 |
| 37℃ 60min | P | 1.492 |
| N | 0.236 |
| P/N | 6.331 |
| 37℃ 90min | P | 1.453 |
| N | 0.210 |
| P/N | 6.932 |
| 37℃ 120min | P | 1.488 |
| N | 0.202 |
| P/N | 7.382 |

表6-8 最佳血清作用时间

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 反应时间 | 阳性血清 OD450nm | 阴性血清 OD450nm | P/N |
| 60min | 1.453 | 0.186 | 7.812 |
| 90min | 1.591 | 0.191 | 8.328 |
| 120min | 1.621 | 0.271 | 5.978 |

表6-9 最佳二抗稀释倍数

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 二抗稀释倍数 |  | OD450nm |
| 1:5000 | P | 2.687 |
| N | 0.504 |
| P/N | 5.327 |
| 1:10 000 | P | 1.556 |
| N | 0.206 |
| P/N | 7.553 |
| 1:15 000 | P | 0.999 |
| N | 0.155 |
| P/N | 6.467 |
| 1:20 000 | P | 0.852 |
| N | 0.13 |
| P/N | 6.551 |

表6-10 酶标二抗最佳反应时间

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 反应时间 | 阳性血清 OD450nm | 阴性血清 OD450nm | P/N |
| 30min | 1.251 | 0.183 | 6.833 |
| 60min | 1.640 | 0.224 | 7.321 |
| 90min | 2.032 | 0.303 | 6.713 |

表6-11 底物最佳反应时间

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 反应时间 | 阳性血清 OD450nm | 阴性血清 OD450nm | P/N |
| 10min | 1.473 | 0.202 | 7.292 |
| 15min | 1.524 | 0.197 | 7.723 |
| 20min | 1.553 | 0.245 | 6.345 |

6.13阴性临界值的确定

选取10份没有感染FCV的阴性血清，利用己建立的FCV间接ELISA抗体检测方法对其进行检测，结果根据表6-12所示，10份阴性血清‾*x*为0.173，s为0.056。按照cut-off＝‾*x*＋3*s*=0.341、cut-off＝‾*x*＋2*s*=0.285，当待检样品*OD450*值≥0.341时，则判定为阳性；若待检样品OD450值<0.285时，则判定为阴性。

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。

表6-12 10份阴性血清的 ELISA 检测结果

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 血清编号  Serum number | OD450nm  OD450nm | 血清编号  Serum number | OD450nm |
| D2 | 0.161 | D14 | 0.218 |
| D7 | 0.120 | D17 | 0.235 |
| D8 | 0.128 | Z9 | 0.234 |
| D9 | 0.109 | J3 | 0.084 |
| D11 | 0.227 | J6 | 0.210 |

6.14特异性试验

运用建立好的FCV间接ELISA抗体检测方法分别对FPV和FHV病原的阳性血清进行检测，同时设置阴阳性对照。结果根据表2-13所示，在阴阳性对照成立的情况下的FPV和FHV病原阳性血清经该方法检测的*OD450*值均小于0.341，判定为阴性，说明建立的FCV间接ELISA抗体检测方法不与下列病原血清发生反应，具有较好的特异性。

表6-13 间接 ELISA 的特异性试验结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 参考血清  Reference serum | FPV | FHV-1 | 阳性血清  Positive serum | 阴性血清  Negative serum |
| OD450nm | 0.216 | 0.197 | 1.518 | 0.202 |
| 结果判定  Judgment results | - | - | + | - |

6.15敏感性试验

利用本实验建立的FCV间接ELISA抗体检测方法对不同稀释度的FCV阳性血清进行检测，结果根据表6-14所示，该方法对FCV阳性血清的最低检测稀释度为1:40 960时到达临界值，表明本试验建立的检测方法敏感性较高。

表6-14 间接 ELISA 的敏感性试验

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 阳性血清稀释度  Positive serum ratio | | | | | | | | |
| 1：320 | 1：640 | 1：1 280 | 1：2 560 | 1:5 120 | 1:10 240 | 1:20 480 | 1:40 960 | 1:81  920 |
| OD450 | 1.608 | 1.487 | 1.531 | 1.515 | 1.150 | 0.860 | 0.474 | 0.233 | 0.116 |
| 结果判定 | + | + | + | + | + | + | + | - | - |

6.16重复性试验

利用建立好的FCV间接ELISA抗体检测方法检测4份不同的猫血清进行批间和批内的重复性检测，并计算变异系数。结果根据表6-15、6-16所示，4份样品的批内批间变异系数均小于5％，说明该方法批内重复性良好。

表6-15 批内重复性试验结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 血清编号  Serum number | 批内重复  Intra-assay repeatability | | | 平均值  ‾x | 标准方差  s | 变异系数/%  CV |
| J1 | 1.462 | 1.459 | 1.487 | 1.469 | 0.013 | 0.855 |
| J2 | 1.155 | 1.158 | 1.199 | 1.171 | 0.020 | 1.715 |
| J3 | 1.544 | 1.485 | 1.527 | 1.519 | 0.025 | 1.633 |
| J4 | 1.709 | 1.710 | 1.711 | 1.710 | 0.001 | 0.049 |

表6-16 批间重复性试验结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 血清编号  Serum number | 批间重复  Inter-assay repeatability | | | 平均值  ‾*x* | 标准方差  *s* | 变异系数/%  *CV* |
| J4 | 1.477 | 1.503 | 1.466 | 1.482 | 0.016 | 1.047 |
| J5 | 1.167 | 1.137 | 1.157 | 1.154 | 0.012 | 1.082 |
| J7 | 1.561 | 1.519 | 1.546 | 1.542 | 0.017 | 1.127 |
| J8 | 1.682 | 1.710 | 1.696 | 1.696 | 0.011 | 0.674 |

2.6符合率试验

利用建立好的FCV间接ELISA抗体检测方法对51份使用妙三多免疫的猫血清进行检测，猫血清样本背景信息如表6-17所示，检测结果如表6-18所示，其中3份为阴性，阴性样品的检出率为6 %。48份为阳性，阳性样品的检出率为94 %。从其中随机选择15份与Biogal和上海基灵公司研发的FCV检测试剂进行平行比较结果如表6-19所示，对与Biogal和上海基灵公司研发的FCV检测试剂的检测结果进行分析符合率为100 %如表6-20所示。

表6-17 猫血清样本信息

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 猫编号 | 月龄 | 品种 | 采样时间 | 接种次数 | 接种剂量 | 接种时间 |
| 1 | 6 | 金渐层 | 2021.10.15 | 3次 | 1mL/次 | 2021.06.29/2021.07.20/2021.08.20 |
| 2 | 9 | 金渐层 | 2021.10.15 | 3次 | 1mL/次 | 2021.03.20/2021.04.10/2021.05.01 |
| 3 | 4.5 | 缅姻 | 2021.10.15 | 3次 | 1mL/次 | 2021.07.24/2021.08.14/2021.09.04 |
| 4 | 4.5 | 银渐层 | 2021.10.15 | 2次 | 1mL/次 | 2021.08.02/2021.08.23 |
| 5 | 4 | 美短起司矮脚 | 2021.10.15 | 3次 | 1mL/次 | 2021.08.04/2021.09.13/2021.10.04 |
| 6 | 5.5 | 美短虎斑矮脚 | 2021.10.15 | 3次 | 1mL/次 | 2021.07.07/2021.07.28/2021.08.18 |
| 7 | 3.5 | 布偶 | 2021.10.15 | 2次 | 1mL/次 | 2021.09.06/2021.09.27 |
| 8 | 3 | 布偶 | 2021.10.15 | 1次 | 1mL/次 | 2021.09.17 |
| 9 | 3 | 布偶 | 2021.10.15 | 1次 | 1mL/次 | 2021.09.17 |
| 10 | 6 | 银渐层 | 2021.10.15 | 3次 | 1mL/次 | 2021.06.20/2021.07.11/2021.08.01 |
| 11 | 3.5 | 布偶 | 2021.10.15 | 2次 | 1mL/次 | 2021.09.06/2021.09.27 |
| 12 | 4 | 德文 | 2021.10.15 | 2次 | 1mL/次 | 2021.08.26/2021.09.16 |
| 13 | 9 | 金渐层 | 2021.10.15 | 3次 | 1mL/次 | 2021.03.20/2021.04.10/2021.05.01 |
| 14 | 12 | 英短/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.1.20/2021.2.10/  2021.3.3 |
| 15 | 11 | 乳白/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.2.3/2021.2.24/  2021.3.17 |
| 16 | 11 | 蓝白/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.2.27/2021.3.30/  2021.4.10 |
| 17 | 11 | 银渐层/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.2.20/2021.3.13/  2021.4.4 |
| 18 | 11 | 蓝猫母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.2.15/2021.3.8/  2021.3.29 |
| 19 | 12 | 蓝猫母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.1.11/2021.2.1/  2021.2.22 |
| 20 | 12 | 蓝猫公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.1.5/2021.1.26/  2021.2.16 |
| 21 | 12 | 银渐层/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.1.18/2021.2.8/  2021.3.1 |
| 22 | 12 | 银渐层/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.1.18/2021.2.8/  2021.3.1 |
| 23 | 12 | 银渐层/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.1.18/2021.2.8/  2021.3.1 |
| 24 | 12 | 金渐层/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.1.3/2021.1.24/  2021.2.14 |
| 25 | 12 | 银渐层/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.1.15/2021.2.4/  2021.2.25 |
| 26 | 12 | 英短母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2020.12.25/2021.1.15/  2021.2.5 |
| 27 | 12 | 蓝白/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.1.4/2021.1.25/  2021.2.15 |
| 28 | 11 | 银渐层/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.2.7/2021.2.28/  2021.3.21 |
| 29 | 12 | 蓝猫/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.1.11/2021.2.1/  2021.2.22 |
| 30 | 11 | 蓝猫/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.2.5/2021.2.26/  2021.3.19 |
| 31 | 11 | 蓝猫/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.2.5/2021.2.26/  2021.3.19 |
| 32 | 6 | 蓝猫/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.8.2/2021.8.23/  2021.9.12 |
| 33 | 6 | 金渐层/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.8.10/2021.8.31/  2021.9.21 |
| 34 | 6 | 蓝白/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.7.25/2021.8.15/  2021.9.5 |
| 35 | 6 | 蓝白/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.7.25/2021.8.15/  2021.9.5 |
| 36 | 6 | 英短/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.8.9/2021.8.30/  2021.9.20 |
| 37 | 5 | 银渐层/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.9.2/2021.9.23/  2021.10.14 |
| 38 | 5 | 英短/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.9.5/2021.9.26/  2021.10.17 |
| 39 | 5 | 银渐层/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.9.2/2021.9.23/  2021.10.14 |
| 40 | 4 | 蓝白/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.10.4/2021.10.25/  2021.11.15 |
| 41 | 4 | 银渐层/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.10.1/2021.10.22/  2021.11.12 |
| 42 | 5 | 银渐层/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.9.10/2021.10.1/  2021.10.22 |
| 43 | 5 | 蓝白/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.9.13/2021.10.4/  2021.10.25 |
| 44 | 5 | 银渐层/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.9.10/2021.10.1/  2021.10.22 |
| 45 | 4 | 蓝猫/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.10.5/2021.10.26/  2021.11.16 |
| 46 | 4 | 蓝猫/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.10.5/2021.10.26/  2021.11.16 |
| 47 | 5 | 蓝白/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.9.9/2021.9.30/  2021.10.21 |
| 48 | 5 | 蓝白/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.9.6/2021.9.27/  2021.10.18 |
| 49 | 5 | 蓝白/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.9.6/2021.9.27/  2021.10.18 |
| 50 | 5 | 蓝白/公 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.9.12/2021.10.3/  2021.10.24 |
| 51 | 6 | 蓝白/母 | 2021.11.28 | 3次 | 1mL/次 | 2021.8.13/2021.9.3/  2021.9.24 |

表6-18猫血清样品二次检测结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样本编号 | 第一次OD450 | 第二次OD450 | 样本编号 | 第一次OD450 | 第二次OD450 |
| 1 | 1.772 | 1.568 | 27 | 1.361 | 1.432 |
| 2 | 1.562 | 1.575 | 28 | 1.419 | 1.569 |
| 3 | 1.711 | 1.481 | 29 | 1.321 | 1.138 |
| 4 | 1.740 | 1.500 | 30 | 1.466 | 1.515 |
| 5 | 0.879 | 0.768 | 31 | 1.439 | 1.572 |
| 6 | 0.745 | 0.757 | 32 | 1.385 | 1.366 |
| 7 | 0.138 | 0.329 | 33 | 1.472 | 1.579 |
| 8 | 0.117 | 0.206 | 34 | 1.474 | 1.365 |
| 9 | 0.128 | 0.246 | 35 | 1.449 | 1.284 |
| 10 | 1.461 | 1.229 | 36 | 1.495 | 1.344 |
| 11 | 0.934 | 0.766 | 37 | 1.495 | 1.332 |
| 12 | 1.960 | 1.473 | 38 | 1.595 | 1.658 |
| 13 | 0.456 | 0.622 | 39 | 1.270 | 0.884 |
| 14 | 1.481 | 1.514 | 40 | 1.265 | 1.135 |
| 15 | 1.523 | 1.436 | 41 | 1.455 | 1.568 |
| 16 | 1.541 | 1.387 | 42 | 1.644 | 1.573 |
| 17 | 1.545 | 1.463 | 43 | 1.374 | 1.186 |
| 18 | 1.591 | 1.654 | 44 | 1.523 | 1.346 |
| 19 | 1.545 | 1.437 | 45 | 1.758 | 1.722 |
| 20 | 1.580 | 1.623 | 46 | 1.455 | 1.631 |
| 21 | 1.751 | 1.688 | 47 | 1.564 | 1.345 |
| 22 | 1.268 | 1.124 | 48 | 1.685 | 1.726 |
| 23 | 1.402 | 1.369 | 49 | 1.420 | 1.358 |
| 24 | 1.501 | 1.587 | 50 | 1.634 | 1.433 |
| 25 | 1.500 | 1.668 | 51 | 1.386 | 1.237 |
| 26 | 1.458 | 1.256 |  |  |  |

表6-19建立的ELISA与Biogal和上海基灵公司研发的FCV检测试剂的检测结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | ELISA  数值 | 结果判 定 | 上海基灵  检测数值 | 上海基灵提示S值 | 结果判 定 | Biogal  提示S值 | 结 果  判 定 |
| 2 | 1.562 | 阳 | 1.78 | 6 | 阳 | 5 | 阳 |
| 7 | 0.329 | 阴 | 0.12 | 3 | 阴 | 1 | 阴 |
| 8 | 0.206 | 阴 | 0.13 | 3 | 阴 | 1 | 阴 |
| 14 | 1.481 | 阳 | 4.71 | 6 | 阳 | 5 | 阳 |
| 18 | 1.591 | 阳 | 6.09 | 6 | 阳 | 6 | 阳 |
| 21 | 1.751 | 阳 | 6.15 | 6 | 阳 | 5 | 阳 |
| 22 | 1.268 | 阳 | 2.96 | 6 | 阳 | 2 | 阳 |
| 29 | 1.321 | 阳 | 0.37 | 4 | 阳 | 3 | 阳 |
| 30 | 1.466 | 阳 | 9.42 | 6 | 阳 | 4 | 阳 |
| 32 | 1.385 | 阳 | 1.57 | 6 | 阳 | 3 | 阳 |
| 33 | 1.472 | 阳 | 3.02 | 6 | 阳 | 4 | 阳 |
| 36 | 1.495 | 阳 | 4.20 | 6 | 阳 | 4 | 阳 |
| 39 | 1.265 | 阳 | 0.46 | 4 | 阳 | 3 | 阳 |
| 45 | 1.758 | 阳 | 5.95 | 6 | 阳 | 5 | 阳 |
| 47 | 1.564 | 阳 | 6.00 | 6 | 阳 | 5 | 阳 |

ELISA测试结果参考区间：

≤0..342 S1-S2抗体水平低；0.342-1.260 S3抗体水平良好；

≥1.260 4-S5抗体水平高

上海基灵试剂测试结果参考区间：

≤0.15 S1-S3抗体水平低；0.15-0.5 S4抗体水平良好；

≥0.5 S5-S6抗体水平高

Biogal测试结果参考区间：

S1阴性；S2弱阳性；S3一般阳性；S4-S6 强阳性

表6-20符合率

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 上海基灵 | Biogal |
| ELISA | 100% | 100% |

**（7）、真实性验证**

选取行业内具有资质的3家实验室对本标准的方法进行验证，具体方案如下：

**行业标准**

**《猫嵌杯病毒感染诊断技术（征求意见稿）》验证实验方案**

**一、实验目的：**

采用普通RT-PCR、实时荧光RT-PCR和实时荧光RT-RAA检测方法分别对已知样品进行猫嵌杯病毒检测，以验证上述检测方法的真实性、准确性和再现性。

**二、实验仪器和材料：**

1、主要仪器：普通PCR仪、荧光PCR仪，由验证单位提供。

2、试剂：包括普通RT-PCR引物、荧光RT-PCR引物和探针、荧光RT-RAA引物和探针、扩增试剂等均由上海市动物疫病预防控制中心提供。

3、样品：10管，由上海市动物疫病预防控制中心提供。

4、其它试剂耗材：由验证单位提供。

**三、实验设计：**

上海市动物疫病预防控制中心提供样品10份，其中5份阳性，5份阴性，送至验证单位进行核酸检测。运输方式：用干冰保存运输。（验证单位收到样品后应检查外包装是否完好无损，检查完毕置于-20℃保存）

验证单位收到待测样品后，一周内完成样品的检测。对实验数据进行统计分析并将实验数据返回上海市动物疫病预防控制中心进行确认，最后由验证单位出具验证报告。

**四、实验方法：**

验证单位在检测样品时，应严格按照《猫嵌杯病毒感染诊断技术（征求意见稿）》中的步骤进行核酸提取并进行核酸检测。

1、普通RT-PCR扩增和电泳

体系配制：利用上海市动物疫病预防控制中心实验室提供的RT-PCR反应用引物和扩增反应用试剂，按照如下表1反应体系配制RT-PCR反应溶液，同时设立阳性和阴性对照。

表1 RT-PCR反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 加入体积（μL） |
| 2×one step Buffer（Dye Plus） | 25 |
| PrimeScript 1 Step Enzyme Mix | 2 |
| 上游引物F（20 μM） | 1 |
| 下游引物R（20 μM） | 1 |
| DEPC水 | 16 |
| 核酸 | 5 |
| 总体积 | 50 |

程序设置：按照如下表2程序，将表1中配制的反应体系在普通PCR仪上进行扩增。将扩增产物在2%琼脂糖凝胶上电泳，观察扩增产物特异性扩增条带。

表2 RT-PCR反应程序

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 程序 | 温度 | 时间 | 循环数 |
| 反转录 | 50 ℃ | 30 min | 1 |
| 预变性 | 94 ℃ | 5 min | 1 |
| 变性 | 94 ℃ | 45 s | 35 |
| 退火 | 50 ℃ | 60 s |
| 延伸 | 72 ℃ | 60 s |
| 末次延伸 | 72 ℃ | 10 min | 1 |
| 保温 | 4 ℃ | ∞ |  |

结果判定：在阳性对照出现955 bp的特异性扩增条带，阴性对照无此扩增条带时判定结果。被检样品出现955 bp的特异性扩增条带，判定为FCV核酸阳性，否则，判定为FCV核酸阴性。

2、实时荧光RT-PCR扩增

具体参见猫嵌杯病毒感染诊断技术（征求意见稿）进行操作。

3、实时荧光RT-RAA

体系配制：利用上海市动物疫病预防控制中心实验室提供的实时荧光RT-RAA反应用引物、探针和扩增反应用试剂，按照如下表3反应体系配制实时荧光RT-RAA反应溶液，同时设立阳性和阴性对照。

表3 实时荧光RT-RAA反应体系

| 试剂 | 加入体积（μL） |
| --- | --- |
| 实时荧光RT-RAA扩增预混液 | 20 |
| A缓冲液 | 12.5 |
| 正向引物FCV-F（10 μmol/L） | 2.0 |
| 反向引物FCV-R（10 μmol/L） | 2.0 |
| 探针FCV-P（10 μmol/L） | 0.6 |
| RNA模板 | 2.0 |
| B缓冲液 | 2.5 |
| 去离子水 | 8.4 |
| 合计 | 50 |

程序设置：按照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。设置报告荧光为FAM，采用其他报告荧光应按仪器说明设定对应通道；淬灭荧光设定为None，校准荧光设定为None。将表3中配制的反应体系在荧光PCR仪上进行扩增。

结果判定：阳性对照：有荧光对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值≤20.0。阴性对照：无荧光对数增长，相应的无报告Ct值。被检样品Ct值≤25，则判定为FCV核酸阳性。被检样品25＜Ct值≤30，则重复检测一次，如Ct值≤30，则判定为FCV核酸阳性。被检样品无报告Ct值或无荧光对数增长，则判定为FCV核酸阴性。

验证实验完毕后，将实验数据填写在下表4中。

表4 验证结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 普通RT-PCR | 实时荧光RT-PCR | | 实时荧光RT-RAA | |
| 结果 | Ct值 | 结果 | Ct值 | 结果 |
| 1 |  |  |  |  |  |
| 2 |  |  |  |  |  |
| 3 |  |  |  |  |  |
| 4 |  |  |  |  |  |
| 5 |  |  |  |  |  |
| 6 |  |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  |  |
| 8 |  |  |  |  |  |
| 9 |  |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  |  |

经浙江省动物疫病预防控制中心、河南省动物疫病预防控制中心和上海海关动植物与食品检验检疫技术中心3家实验室验证（见验证报告），本标准采用的的普通RT-PCR、实时荧光RT-PCR和RAA检测方法结果真实可靠，准确性 好，重现性好，各项检测性能指标符合检测标准技术要求。

**2、综述报告**

无。

**3、技术经济论证**

无。

**4、预期的经济效益、社会效益和生态效益**

按照标准编制的有关要求，起草小组对临床诊断及已发布的相关实验室诊断标准进行了梳理，完善了相应的检测方法，为开展猫嵌杯病毒感染的诊断、检测、监测和检疫提供了依据。通过本标准的实施，可实现早发现、早确诊、早治疗，最大程度地减少该病发生所造成的经济损失。本标准具有实用性和可操作性，发布后，每年可产生可观的经济效益和社会效益。同时也为猫嵌杯病毒的研究提供标准化的检测规程。

# （四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

（一）国内国际标准水平比较

国内国际均未见相似检测标准。

（二）国内国际标准比较试验

无。

# （五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

# 本标准是起草小组在查阅大量文献的基础上，结合最新的科研成果，最终确定了标准的各项技术参数。本标准方法为国内自行研制的方法，未采用国际标准。

# （六）与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准制定遵循GB/T1.1-2020、《中华人民共和国动物防疫法》、《GB/T18088-2000》、《GB 19489 实验室 生物安全通用要求》、《国家动物疫情测报体系管理规范》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》、《动物检疫管理办法》等相关法律、法规规定。

# （七）重大分歧意见的处理经过和依据

在本标准的制定过程中，相关专家没有提出重大分歧意见。

# （八）涉及专利的有关说明

本标准的内容不涉及专利。

# （九）实施标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

建议本标准为猫嵌杯病毒感染诊断的推荐性标准。该项技术标准的制定，试验数据充分，科学性强，并经过了大量实际应用，可作为推荐性国家标准在猫嵌杯病毒感染的诊断、检测和检疫等工作中进一步推广应用。

**①组织实施**

标准发布后，可通过相关部门组织宣贯，推荐给有相应检测设施和检测项目的国内各级实验室使用。

**②技术措施**

可以委托项目起草单位或其他相关单位组织技术培训的方式推广应用本检测标准。也可通过委托有资质的单位组织相关检测的能力验证活动，通过能力验证也就表明参试单位有能力开展相应检测项目。

**③过渡办法**

由于病毒分离、ELISA和荧光RT-PCR技术在国内已经比较成熟，应用单位只需要一定的培训即可掌握。因此可以预期，本标准一旦发布实施，很快即可实现平稳过渡。建议本标准自发布之日起实施。

# （十）其他应予说明的事项。

无。

标准起草组

2023年9月