

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4660—2025

猫嵌杯病毒感染诊断技术

Diagnostic techniques for feline calicivirus infection

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



目 次

前言 II

引言 III

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 临床诊断 1

6 样品采集、保存、运输和处理 2

7 病毒分离与鉴定 4

8 荧光 RT-RAA 5

9 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 6

10 实时荧光 RT-PCR 7

11 综合判定 8

附录 A(资料性) 主要临床症状和 CPE 参考图 9

附录 B(规范性) 试剂配制 10

附录 C(资料性) FCV RT-PCR 检测示意图 11

附录 D(资料性) FCV 实时荧光 RT-PCR 检测示意图 12

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/TC 181)归口。

本文件起草单位：上海市动物疫病预防控制中心、中国农业科学院上海兽医研究所、青岛农业大学、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、派菲尔德(上海)宠物有限公司、上海基灵生物科技有限公司。

本文件主要起草人：赵洪进、杨德全、刘光清、单虎、梁瑞英、王建、刘健、杨显超、李鑫、孟春春、夏炉明、鞠厚斌、葛菲菲、沈海潇、龚国华、陶田谷晟、张洪亮、汤新明、白艺兰、牛光斌、李杰、梁琳。



引 言

猫嵌杯病毒感染(feline calicivirus infection)是由猫嵌杯病毒(feline calicivirus, FCV)感染猫科动物引起的以结膜炎、口腔溃疡和上呼吸道炎症等为主要特征的一种急性、高度接触性呼吸道传染病。我国农业农村部将其列为三类动物疫病。

猫嵌杯病毒主要感染猫科动物,如猫、虎、狮和猎豹等。患病动物和隐性带毒动物是主要传染源。主要经呼吸道和消化道传播,被污染的水、食物、笼具、垫料、环境和带毒的动物等均可成为主要的传播媒介。

猫嵌杯病毒属于杯状病毒科(*Caliciviridae*)水疱疹病毒属(*Vesivirus*),目前只有一个血清型,但毒力、抗原性和遗传性差异很大。引起的疾病除了具有典型的呼吸道症状外,还能引起致死性全身性疾病(virulent systemic disease, VSD)和流行性出血热样疾病,呈现出不同的临床症状。猫嵌杯病毒感染与其他呼吸道传染病,如猫疱疹病毒 1 型感染、猫衣原体病、猫支原体病、支气管败血波氏杆菌病等在临床上很难区别,必须通过病原学和分子生物学等实验室方法才能确诊。

本文件建立了猫嵌杯病毒感染的诊断方法,从临床诊断、病毒学、分子生物学等方面全面制定了猫嵌杯病毒的诊断方法,适用于猫嵌杯病毒感染的检测和诊断。

猫嵌杯病毒感染诊断技术

1 范围

本文件描述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、荧光 RT-RAA、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和实时荧光 RT-PCR 等实验室诊断方法。

本文件适用于猫嵌杯病毒感染的检测和诊断。

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)适用本文件。

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

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。

BHQ1:黑洞淬灭剂 1(black hole quencher-1)

CPE:细胞病变(cytopathic effect)

Ct 值:阈值循环数(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)

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)

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-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:半数组织培养感染剂量(median tissue culture infective dose)

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

5 临床诊断

5.1 流行病学

5.1.1 常见的猫科动物,如猫、虎、狮和猎豹等均易感,幼龄动物最易感。

5.1.2 传染源主要为患病动物和隐性带毒动物,主要经呼吸道和消化道传播,被污染的水、食物、笼具、垫料、环境和带毒的动物等均可成为传播媒介。

5.1.3 一年四季均可发生,春秋季节多发。

5.2 临床症状

5.2.1 精神沉郁,反应迟钝;轻度跛行;出现反复吞咽动作、进食困难、发热($39.5^{\circ}\text{C}\sim 40.5^{\circ}\text{C}$)、打喷嚏,呼吸困难等呼吸道症状。

5.2.2 眼鼻分泌物增多、口腔溃疡及大量流涎(见附录 A 中的 A.1),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(见 A.2)。

5.2.3 高致病性毒株感染可致猫科动物出现 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,黄疸和肺炎等全身性症状,甚至能够导致患病动物死亡。

5.3 病理变化

5.3.1 四肢关节偶见急性滑膜炎,滑膜增厚,关节液增多。

5.3.2 肺腹缘暗红色实变,增生性间质性肺炎。

5.3.3 支气管和细支气管内充满含有蛋白质的液体。

5.3.4 全身性感染病例,可见不同部位的病变,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,凝血异常,肺水肿,肝脏、脾脏和胰腺坏死等其他病理变化。

5.4 鉴别诊断

猫嵌杯病毒感染与猫疱疹病毒 I 型感染、猫衣原体病、猫支原体病、支气管败血波氏杆菌病的临床症状相似:

- a) 猫嵌杯病毒感染以口腔溃疡、上呼吸道症状为主;
- b) 猫疱疹病毒 I 型感染主要表现为咳嗽、打喷嚏、鼻脓性分泌物等上呼吸道症状与结膜炎、溃疡性角膜炎、溃疡性眼周皮肤炎等眼部症状;
- c) 猫衣原体病主要表现为结膜充血、水肿、浆液性眼分泌物等典型眼部症状;
- d) 猫支原体病主要表现为结膜炎、上呼吸道症状和慢性支气管炎等为主要症状;
- e) 支气管败血波氏杆菌病主要表现为鼻炎、支气管肺炎以及脓疱型肺炎。

在临床实践中,很难根据临床症状进行区分,应依靠实验室诊断进行鉴别。

5.5 结果判定

符合 5.1 中描述的流行病学特征,且出现 5.2 中 2 种及以上的临床症状,同时可观察到 5.3 中描述的任一病理变化,可判定为猫嵌杯病毒感染疑似病例;疑似病例可采用实验室检测方法确诊。

6 样品采集、保存、运输和处理

6.1 总则

样品采集宜在发病初期、选择具有典型临床症状的动物进行,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。

6.2 试剂

6.2.1 0.01 mol/L PBS($\text{pH } 7.4$):配制方法按附录 B 中的 B.1 的规定执行。

6.2.2 50% 甘油磷酸缓冲液($\text{pH } 7.4$):配制方法按 B.2 的规定执行。

6.2.3 DMEM 高糖培养基:配制方法按 B.3 的规定执行。

6.2.4 青霉素,浓度为 $10\ 000\text{ U/mL}$ 。

6.2.5 链霉素,浓度为 $10\ 000\ \mu\text{g/mL}$ 。

6.3 采样用具

6.3.1 无菌剪刀。

6.3.2 无菌镊子。

6.3.3 无菌采样拭子。

- 6.3.4 无菌采血器或静脉采血针。
- 6.3.5 含 EDTA 抗凝剂的真空采血管。
- 6.3.6 样品保存管。
- 6.3.7 无菌离心管。
- 6.3.8 组织匀浆器或研磨器。
- 6.3.9 冷冻离心机。
- 6.3.10 振荡器。
- 6.3.11 0.22 μm 针头式滤器。

6.4 样品采集

6.4.1 全血样品采集

压迫动物肘部前臂头静脉或颈静脉近心端(气管的背外侧,胸腔入口处)或后肢内侧隐静脉,使静脉充血扩张,绷紧静脉两侧皮肤,静脉采血针头斜面朝上、呈 15°角沿静脉的走向刺入静脉血管,见有血液流出时,接入含 EDTA 抗凝剂的真空采血管采集 1 mL 血液,充分混匀后编号备用。

6.4.2 血清样品采集

压迫动物肘部前臂头静脉或颈静脉近心端(气管的背外侧,胸腔入口处)或后肢内侧隐静脉,使静脉充血扩张,绷紧静脉两侧皮肤,无菌采血器针头斜面朝上、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。

6.4.3 组织样品采集

用无菌剪刀、镊子分别采集约 2 cm×2 cm 大小的病死动物肺脏、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。

6.4.4 眼分泌物拭子样品采集

用无菌采样拭子轻轻搔刮双侧眼结膜(来回滑动 3 次),刮取分泌物,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。

6.4.5 鼻咽拭子样品采集

把无菌采样拭子浸润到生理盐水中,然后通过鼻腔缓慢地插入到鼻咽部位,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。

6.4.6 细胞培养物

细胞培养物反复冻融 3 次,第三次解冻后,将细胞培养物置于无菌离心管中并编号。

6.5 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℃及以下的超低温冰箱。

6.6 样品处理

6.6.1 全血样品处理

将全血样品分装于无菌离心管中,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。

6.6.2 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。

6.6.3 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,加入终浓度为 1 000 U/mL 的青霉素、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素,DMEM 高糖培养基制备成 10%组织匀浆液。反复冻融 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。

6.6.4 眼分泌物拭子和鼻咽拭子处理

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 针头式滤器过滤除菌,用于病毒分离和核酸检测。

6.6.5 细胞培养物处理

4 000 r/min 4 ℃离心 10 min,取上清液,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。

7 病毒分离与鉴定

7.1 试剂

7.1.1 DMEM 高糖培养基。

7.1.2 胎牛血清。

7.1.3 F81 细胞。

7.1.4 0.25%胰酶:配制方法按 B.4 的规定执行。

7.1.5 细胞生长液:配制方法按 B.5 的规定执行。

7.1.6 细胞维持液:配制方法按 B.6 的规定执行。

7.2 仪器设备

7.2.1 CO₂培养箱。

7.2.2 高速冷冻离心机。

7.2.3 II 级生物安全柜。

7.2.4 倒置显微镜。

7.2.5 微量移液器(量程:20 μL~200 μL 和 100 μL~1 000 μL)。

7.2.6 细胞培养瓶。

7.2.7 血细胞计数板。

7.2.8 0.22 μm 针头式滤器。

7.3 操作方法

7.3.1 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,血细胞计数板计数,调整细胞浓度至 2×10^6 个/mL,分装于细胞培养瓶,制备细胞单层,待细胞长至 60%~70%时备用。

7.3.2 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 6.6.1、6.6.3、6.6.4、6.6.5 样品于细胞培养瓶中,置于 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。均置于 37 ℃含 5% CO₂ 培养箱中培养。

7.3.3 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,在倒置显微镜下观察主要呈细胞圆缩、聚集,最后溶解脱落,见附录 A.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。

7.3.4 盲传

若接种细胞第一代 72 h 后未出现 CPE,收获细胞培养液,冻融 3 次后,按照 7.3.2 所述方法进行盲传三代。

7.4 病毒鉴定

对出现 CPE 的细胞培养液,选用本文件第 8 章、第 9 章和第 10 章中规定的任一方法进行核酸鉴定。

7.5 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。细胞盲传三代未见 CPE,且经 7.4 所述方法检测阴性者,判为病毒分离阴性。

8 荧光 RT-RAA

8.1 试剂

8.1.1 DEPC 水:配制方法按 B.7 的规定执行。

8.1.2 商品化病毒 RNA 提取试剂盒。

8.1.3 阳性对照为含 10^4 TCID₅₀/mL 的 FCV 细胞培养物,用终浓度为 0.2% 的甲醛溶液 37 °C 灭活 48 h;阴性对照为 F81 正常细胞对照。

8.1.4 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)。

8.1.5 RT-RAA 预混液(商品化)。

8.1.6 乙酸镁(280 mmol/L)。

8.1.6 荧光 RT-RAA 检测所需引物和探针:

上游引物 F1:5'-GCATGACCGCCCTACACTGTGATGTGTTCG-3';

下游引物 R1:5'-ACTCAAGATAAATTTGAAGCGGGGACTGGT-3';

探针 P1: 5'-CTTCAAATTAGTGATCAATCCTAACAAAT [FAM-dT] [idSpacer] [BHQ1-dT] TGTCCATAGGTTTC-3' C3 Spacer。

8.2 仪器设备

8.2.1 高速冷冻离心机。

8.2.2 振荡器。

8.2.3 微量移液器(量程:0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL 和 100 μL~1 000 μL)。

8.2.4 冰箱(2 °C~8 °C 和 -20 °C 以下)。

8.2.5 荧光 PCR 仪。

8.3 操作方法

8.3.1 核酸提取

采用商品化病毒 RNA 提取试剂盒提取各类样品中的病毒 RNA;也可采用等效 RNA 提取方法,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。

8.3.2 核酸扩增

8.3.2.1 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。按 $n+1$ (n 为待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和)配制反应液,充分混匀后分装,每个反应管 45.5 μL。

8.3.2.2 加样

将 45.5 μL 荧光 RT-RAA 反应液分别加入 RT-RAA 荧光基础反应单元管中,再分别加入已制备好的 RNA 溶液 2 μL,将 2.5 μL 乙酸镁(反应催化剂)加在反应单元管盖上,密封反应单元管,放入振荡器混匀。

8.3.2.3 荧光 RT-RAA 反应

将上述加样后的反应单元管放入荧光 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 °C 60 s,1 个循环;39 °C 30 s,30 个循环,每次循环时收集荧光信号。

8.4 结果判定

8.4.1 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 C_t 值 ≤ 20 。阴性对照无荧光对数增长,相应的无报告 C_t 值。阳性对照和阴性对照同时成立可判定试验有效,否则试验无效。

8.4.2 结果描述及判定

符合 8.4.1 的条件,被检样品 C_t 值 ≤ 28 且出现特异性扩增曲线,则判为 FCV 核酸阳性;当无 C_t 值或无荧光对数增长,则判为 FCV 核酸阴性; $28 < C_t$ 值 < 30 且出现特异性扩增曲线,则判为可疑,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。

9 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

9.1 试剂

9.1.1 $2\times$ one step Buffer(Dye Plus)。

9.1.2 PrimeScript 1 Step Enzyme Mix。

9.1.3 $50\times$ TAE 缓冲液。

9.1.4 琼脂糖。

9.1.5 DNA Marker:分子大小范围为 100 bp~2 000 bp。

9.1.6 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。

9.1.7 其余试剂同 8.1.1~8.1.3。

9.2 仪器设备

9.2.1 PCR 扩增仪。

9.2.2 电泳仪。

9.2.3 电泳槽。

9.2.4 紫外凝胶成像仪。

9.2.5 其余仪器设备同 8.2.2~8.2.4。

9.3 操作方法

9.3.1 核酸提取

同 8.3.1。

9.3.2 核酸扩增

9.3.2.1 RT-PCR 反应体系配制

每个检测反应体系需要 45 μ L RT-PCR 反应液,包含 $2\times$ One Step Buffer(Dye Plus)25 μ L、PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L、DEPC 水 16 μ L。按 $n+1$ (n 为待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和)配制反应液,充分混匀后分装,每个反应管 45 μ L。

9.3.2.2 加样

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 μ L,使每管总体积达到 50 μ L,记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后,500 r/min 离心 30 s。

9.3.2.3 RT-PCR 反应

将反应管放入 PCR 扩增仪中,按照下列程序进行扩增:50 $^{\circ}$ C 反转录 30 min;94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,50 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 退火 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。

9.3.3 PCR 扩增产物电泳

取 8 μ L PCR 扩增产物加入到 $1\times$ TAE 缓冲液配制的 1.5% 琼脂糖凝胶中,以 5 V/cm 电压电泳 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。

9.4 结果判定

9.4.1 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,同时阴性对照无此扩增条带(参见附录 C)。

9.4.2 结果描述及判定

符合 9.4.1 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。

10 实时荧光 RT-PCR

10.1 试剂

10.1.1 $2\times$ One Step RT-PCR Buffer。

10.1.2 PrimeScript RT Enzyme Mix II。

10.1.3 TaKaRa Ex Taq HS(5 U/ μ L)。

10.1.4 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'-GGCTCTGATDGCTTGAACTG-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。

10.1.5 其余试剂同 8.1.1~8.1.3。

10.2 仪器设备

同 8.2.1~8.2.5。

10.3 操作方法

10.3.1 核酸提取

同 8.3.1。

10.3.2 核酸扩增

10.3.2.1 实时荧光 RT-PCR 反应体系配制

每个检测反应体系需要 22 μ L 荧光 RT-PCR 反应液,包含 $2\times$ One Step RT-PCR Buffer 12.5 μ L、Ex Taq HS(5 U/ μ L)0.5 μ L、PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.5 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L、探针(10 μ mol/L)1 μ L、DEPC 水 6.5 μ L。按 $n+1$ (n 为待检样品、阳性对照和阴性对照的份数总和)配制反应液,充分混匀后分装,每个反应管 22 μ L。

10.3.2.2 加样

在已分装有荧光 RT-PCR 反应液的反应管分别加入已制备好的 RNA 溶液 3 μ L,使每管总体积达到 25 μ L,记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后,500 r/min 离心 30 s。

10.3.2.3 实时荧光 RT-PCR 反应

将上述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 $^{\circ}$ C 10 min,94 $^{\circ}$ C 15 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,在每个循环第二步(60 $^{\circ}$ C 45 s)收集荧光信号,共 40 个循环。

10.4 结果判定

10.4.1 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声情况进行调整。

10.4.2 试验成立的条件

阳性对照 C_t 值 ≤ 30 ,并出现典型扩增曲线(见附录 D)。阴性对照无 C_t 值并且无典型扩增曲线。阳性对照和阴性对照同时成立可判定试验有效,否则试验无效。

10.4.3 结果描述及判定

符合 10.4.2 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; $35 < \text{Ct 值} < 40$ 且出现特异性扩增曲线,则判为可疑,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。

11 综合判定

11.1 临床判定为疑似病例的易感动物,经本文件第 8 章、第 9 章和第 10 章中规定的任一方法,检测为 FCV 核酸阳性的,判定为猫嵌杯病毒感染确诊病例。

11.2 临床无明显特异症状的易感动物,经本文件第 8 章、第 9 章和第 10 章中规定的任一方法,检测为 FCV 阳性的,应经本文件第 7 章分离出病毒方可判定为猫嵌杯病毒感染。

附 录 A
(资料性)
主要临床症状和 CPE 参考图

主要临床症状见图 A.1 和图 A.2。



图 A.1 眼鼻分泌物增多、口腔大量流涎



图 A.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。
病毒分离与鉴定时,病毒接种细胞出现病变见图 A.3。

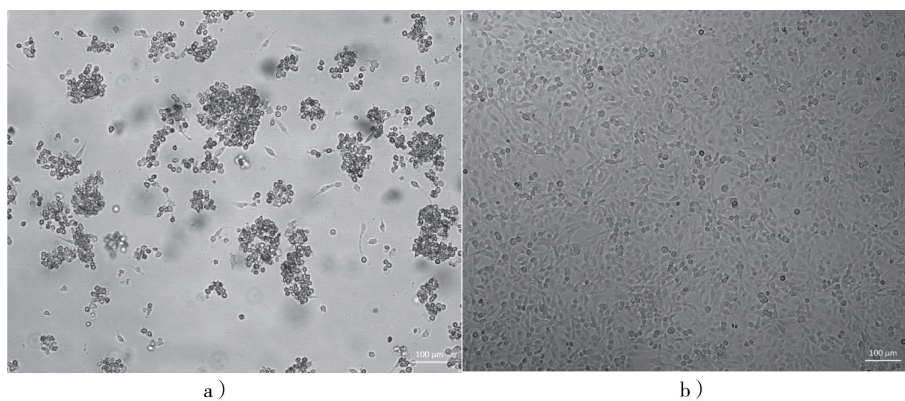


图 A.3 F81 细胞接种 FCV 24 h 后的 CPE(a) 和阴性对照(b)

附 录 B

(规范性)

试 剂 配 制

B.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(Na_2HPO_4)、0.27 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),加蒸馏水溶解,调整 pH 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。

B.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。

B.3 DMEM 高糖培养基

量取去离子水 950 mL,置于适宜的容器中。将 DMEM 粉剂 10 g 加于 30℃ 的去离子水中,边加边搅拌。每 1 000 mL 培养液加 3.7 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)。加去离子水至 1 000 mL,用 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)或盐酸(HCl)将培养液 pH 调至 7.2。在过滤之前应盖紧容器瓶塞。立即用孔径 0.22 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌,4 ℃ 保存备用。

B.4 0.25% 胰酶

称取 0.25 g 胰酶溶解于 100 mL DMEM 高糖培养基后过滤除菌,−20 ℃ 保存备用。

B.5 细胞生长液

取 900 mL 的 DMEM 高糖培养基加 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 U/mL,链霉素至终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,4 ℃ 保存备用。

B.6 细胞维持液

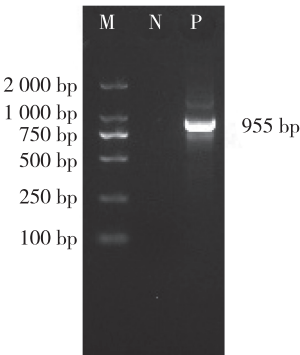
取 980 mL 的 DMEM 高糖培养基加 20 mL 的灭活胎牛血清混合,配制成 1 000 mL 的溶液,加入青霉素至终浓度 100 U/mL,链霉素至终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,4 ℃ 保存备用。

B.7 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。

附 录 C
(资料性)
FCV RT-PCR 检测示意

FCV RT-PCR 检测示意图 C.1。



标引序号说明：
M——DNA 分子量标准(DL 2 000 DNA Marker)；
N——FCV 阴性对照；
P——FCV 阳性对照。

图 C.1 FCV RT-PCR 检测阴、阳性示意

附 录 D
(资料性)

FCV 实时荧光 RT-PCR 检测示意

FCV 实时荧光 RT-PCR 检测阴、阳性示意图见图 D. 1。

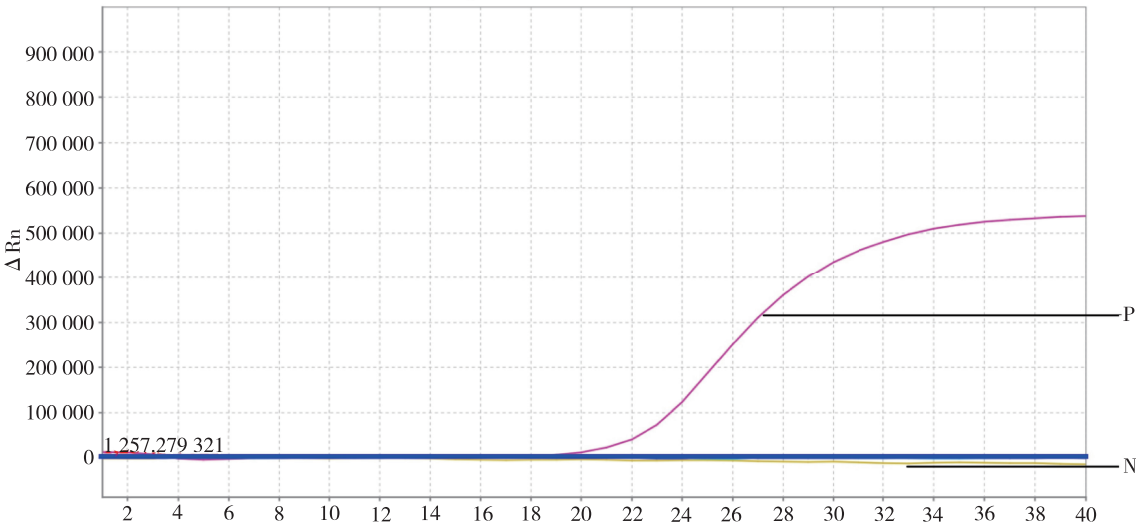


图 D. 5 FCV 实时荧光 RT-PCR 检测示意