

ICS 65.020.30

CCS B44

备案号

DB42/XXXXX.1-2022

DB42

湖北省地方标准

DB42/XXXXX-2022

实验用猫

第1部分：微生物学等级及监测

Experimental cat

Part 1: Microbiological standards and surveillance

(讨论稿)

2022-XX-XX 发布

2022-XX-XX 实施

湖北省市场监督管理局 发布

目 次

前言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
3.1 实验用猫	1
3.2 普通级猫	1
3.3 无特定病原体级猫	1
4 等级分类	2
5 微生物学等级及控制指标	2
5.1 外观指标	2
5.2 微生物指标	2
5.3 检测项目分类	2
6 检测程序	2
7 检测方法	3
8 检测规则	4
8.1 检测频率	4
8.2 抽样	4
8.3 样本要求	4
9 结果判定	4
10 判定结论	4
附录 A（规范性） 猫泛白细胞减少症病毒 PCR 检测方法	5
A.1 待测样本 DNA 的提取与保存	5
A.2 PCR 反应引物	5
A.3 对照设立	5
A.4 PCR 反应体系及条件	5
A.5 PCR 产物	5
A.6 结果判定	6
附录 B（规范性） 猫疱疹病毒 I 型 PCR 检测方法	7
B.1 待测样本 DNA 的提取与保存	7
B.2 PCR 反应引物	7
B.3 对照设立	7
B.4 PCR 反应体系及条件	7
B.5 PCR 产物	7

B. 6 结果判定	8
附录 C (规范性) 猫疱疹病毒 I 型荧光 PCR 检测方法	9
C. 1 待测样本 DNA 的提取与保存	9
C. 2 荧光 PCR 反应引物及探针	9
C. 3 对照设立	9
C. 4 PCR 反应体系及条件	9
C. 5 结果判定	9
附录 D (规范性) 猫杯状病毒 RT-PCR 检测方法	10
D. 1 病毒 RNA 的提取	10
D. 2 PCR 反应引物	10
D. 3 反转录	10
D. 4 PCR 反应条件	10
D. 5 PCR 产物	10
D. 6 结果判定	10
附录 E (规范性) 猫狂犬病病毒巢式 RT-PCR 检测方法	12
E. 1 病毒 RNA 的提取	12
E. 2 PCR 反应引物	12
E. 3 反转录	12
E. 4 PCR 反应条件	12
E. 5 PCR 产物	12
E. 6 结果判定	13
附录 F (规范性) 猫传染性腹膜炎病毒 RT-PCR 检测方法	14
F. 1 病毒 RNA 的提取	14
F. 2 PCR 反应引物	14
F. 3 逆转录	14
F. 4. PCR 反应体系	14
F. 5 PCR 反应条件	14
F. 6 PCR 产物	14
F. 7 结果判定	15
附录 G (规范性) 猫免疫缺陷病毒 RT-PCR 检测方法	16
G. 1 待测样本 RNA 的提取与保存	16
G. 2 对照设立	16
G. 3 逆转录	16
G. 4 PCR 反应引物	16
G. 5 PCR 反应体系及条件	16
G. 8 结果判定	17
附录 H (规范性) 猫白血病病毒 RT-PCR 检测方法	18
H. 1 病毒 RNA 的提取	18

H. 2 对照设立	18
H. 3 逆转录	18
H. 4 PCR 反应引物.....	18
H. 6 PCR 反应条件.....	18
H. 7 PCR 产物.....	18
H. 8 结果判定	19

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：

本文件主要起草人：

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微生物学等级及监测的术语和定义、等级分类、检测要求、检测程序、检测方法、检测规则、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/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 14926.14 实验动物 金黄色葡萄球菌检测方法
- GB/T 14926.46 实验动物 钩端螺旋体检测方法
- GB/T 14926.50 实验动物 实验动物酶联免疫吸附试验
- GB/T 14926.56 实验动物 狂犬病病毒检测方法
- 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

3 术语和定义

GB/T 14922.1 界定的以及下列术语和定义适用于本标准。

3.1 实验用猫

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 普通级猫

不携带重要人兽共患病和猫烈性传染病病原的实验用猫，简称普通猫。

用于猫病研究及生物制品研发、生产与检验等的猫，除符合前款各项规定外，还应无特别规定的特异性病原和抗体，并符合特别规定的有关要求。

3.3 无特定病原体级猫

除普通猫应排除的病原外，不携带主要潜在感染或条件致病和对科学实验干扰大的病原的实验用猫，简称无特定病原体猫。

用于猫病研究、生物制品研发、生产与检验及生物反应器等实验用猫，除符合前款各项规定外，还应无特别规定的特异性病原和抗体，并符合特别规定的有关要求。

4 等级分类

按微生物学与寄生虫学等级分类，实验用猫分为普通级、无特定病原体级。

5 微生物学等级及控制指标

5.1 外观指标

实验用猫应外观健康，无异常。

5.2 微生物指标

参考 GB 14922.2 中对猫以外的实验动物微生物控制及检测指标的规定，并参照猫微生物流行病学调查情况，以及《中华人民共和国药典》、《中华人民共和国兽药典》，各等级实验猫微生物指标见表 1。

表 1 实验用猫微生物检测项目

等级	微生物	检测要求
普通级	猫泛白细胞减少症病毒 <i>Feline panleukopenia virus</i>	必须检测，可免疫
	猫疱疹病毒 I 型 <i>Feline herpesvirus type 1</i>	
	猫杯状病毒 <i>Feline calicivirus</i>	
	猫狂犬病病毒 <i>Feline rabies virus</i>	
	沙门氏菌 <i>Salmonella spp.</i>	必须检测
	致病性钩端螺旋体 <i>Leptospira</i>	必要时检测
皮肤病原真菌 <i>Pathogenic dermal fungi</i>		
无特定病原	猫传染性腹膜炎病毒 <i>Feline infectious peritonitis virus</i>	必须检测
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	
	猫免疫缺陷病毒 <i>Feline immunodeficiency virus</i>	必要时检测
	猫白血病病毒 <i>Feline leukemia virus</i>	

5.3 检测项目分类

5.3.1 必须检测项目：指在进行实验用猫质量评价时必须检测的项目，普通级可免疫项目，无特定病原体级不能免疫。

5.3.2 必要时检测项目：指从省外或国外引进实验用猫时；怀疑有流行感染时；申请生产许可证或实验特殊需要时必须检测的项目。普通级猫中的必要时检测项目，在无特定病原体猫中为必须检测项目。

6 检测程序

检测程序见图 1。



图 1 实验用猫微生物学检测采样程序

7 检测方法

检测方法见表 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 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 B、附录 C 方法检测
猫杯状病毒	抗体按GB/T 14926.50检测 核酸按附录 D 方法检测
猫狂犬病毒	抗体按GB/T 14926.50检测 核酸按附录 E 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
致病性钩端螺旋体	按GB/T 14926.46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 F 方法检测
猫免疫缺陷病毒	抗体按GB/T 14926.50检测 抗原按附录 G 方法检测
猫白血病病毒	抗体按GB/T 14926.50检测 抗原按附录 H 方法检测
金黄色葡萄球菌	按GB/T 14926.14 检测

8 检测规则

8.1 检测频率

每三个月至少检测一次。

8.2 抽样

8.2.1 方式

选择三月龄以上的实验用猫用于检测(也可根据需求抽样), 随机抽样。

8.2.2 数量

根据实验用猫群体大小, 抽样数量见表 3。

表 3 抽样数量

群体大小(只)	抽样数量
小于 100	不少于 5 只
100~500	不少于 10 只
大于 500	不少于 15 只

8.2.3 方法

8.2.3.1 采样方法按照 NY/T 541 规定进行。

8.2.3.2 可按病毒、细菌、真菌、寄生虫检测要求联合采样。

8.2.3.3 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。

8.2.3.4 检测金黄色葡萄球菌时, 参照 GB 19489 的要求实施。

8.3 样本要求

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

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, 血清抗体阴性或抗原检测阴性判为合格。

10 判定结论

在检测的各等级动物中, 如有某项指标不符合该等级标准指标要求, 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

采用普通PCR方法，扩增猫泛白细胞减少症病毒VP2基因片段，用于猫泛白细胞减少症病毒的检测。

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 VP 2 基因序列设计

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

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 PCR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 PCR反应条件

94℃预变性5min，94℃变性30s，55℃退火30s，72℃延伸1min，72℃彻底延伸10min；第2到第4步35个循环。

A.5 PCR产物

A.5.1 产物大小

301bp。

A.5.2 产物参考序列

AGTTCAACAAGATAAAAGACGTGGTGTAACTCAAATGGGAAATACAGACTATATTACTGAAGCTACTATTATGAGACCAGCTGAG
GTTGGTTATAGTGACCATATTATTCTTTGAAGCGTCTACACAAGGGCCATTAACACCTATTGCAGCAGGACGGGGGGAGCGCA
AACAGATGAAAATCAAGCAGCAGATGGTGTCCAAGATATGCATTTGGTAGACAACATGGTCAAAAACTACTACAACAGGAGAAACAC
CTGAGAGATTTACATATATAGCACATCAAGATACAGGA。

A. 6 结果判定

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

附 录 B
(规范性)
猫疱疹病毒 I 型 PCR 检测方法

采用普通 PCR 方法，扩增猫疱疹病毒 I 型 tk 基因片段，用于猫疱疹病毒 I 型的检测。

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 PCR反应引物

根据 tk 基因序列设计

上游引物序列（5' -3'）：GACGTGGTGAATTATCAGC

下游引物序列（5' -3'）：CAACTAGATTTCCACCAGGA

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 PCR反应体系及条件

B. 4. 1 PCR反应体系

25μL体系：包括2×tag酶12.5μL、上下游引物（10μM）各1μL，模板DNA 1μL，用灭菌双蒸水补齐。

B. 4. 2 PCR反应条件

94℃预变性5min，94℃变性30s，52℃退火30s，72℃延伸1min，72℃彻底延伸10min；第2到第4步35个循环。

B. 5 PCR产物

B. 5. 1 产物大小

288bp。

B. 5. 2 产物参考序列

GACGTGGTGAATTATCAGCTGAAGATGCTGCCTATATCACCGCCCACTATCAAGCAAGATTTGCCGCACCATACCTTCTTTTACA
TTCCAGACTATCCACAATAACAGGATATCAGAAAGTTGTATGTGAGGAACACCCCGACGTGACCCTAATCATAGATAGACACCCCTCTCG
CCTCTCTGGTCTGTTTCCCACTCGCAAGATATTTTGTGGGTGATATGACTCTGGGTCTGTACTTAGTCTAATGGCAACACTTCCACGA
GAACCTCCTGGTGAAATCTAGTTG。

B. 6 结果判定

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

附 录 C

(规范性)

猫疱疹病毒 I 型荧光 PCR 检测方法

采用荧光 PCR 方法, 扩增猫疱疹病毒 I 型 tk 基因片段, 用于猫疱疹病毒 I 型的检测。

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 荧光PCR反应引物及探针

根据tk基因序列设计

上游引物序列 (5' -3') : GACGTGGTGAATTATCAG

下游引物序列 (5' -3') : CCTGTTATTGTGGATAGTC

探针 (5' -3') : (FAM) AGATGCTGCCTATATCACCGCC(BHQ1)

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 荧光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。

C. 4. 2 荧光PCR反应条件

95℃预变性2min, 95℃变性15s, 50℃退火30s (荧光信号采集); 第2到第3步40个循环。

C. 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 D

(规范性)

猫杯状病毒 RT-PCR 检测方法

采用RT-PCR方法，特异性扩增猫杯状病毒片段，用于猫杯状病毒的检测。

D.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于-70℃保存、备用。

D.2 PCR反应引物

上游引物序列（5' -3'）：AACCTGCGCTAACGTGCTT

下游引物序列（5' -3'）：CAGTGACAATACCCCAGAA

D.3 反转录

使用反转录试剂盒对所提RNA进行反转录，制备cDNA。

D.4 PCR反应条件

95℃预变性5min；95℃变性30s，55℃退火40s，72℃延伸1min，30个循环；72℃延伸2min。

D.5 PCR产物

D.5.1 产物大小

926bp。

D.5.2 产物参考序列

AACCTGCGCTAACGTGCTTAAATACTATGATTGGGATCCCCACATCAGATTGGTTATCAACCCCAATAAAATTTCTTCTATTGGT
TTCTGTGATAATCCTCTAATGTGTTGCTACCCAGAATTGCTCCCAGAATTCGGAAGTGTGTGGGATTGTGATCAATCCCCACTGCAAAT
CTACCTGGAGTCAATCCTTGGTGATGATGAATGGGCTTCAACTTACGATGCCATTGACCCTGTTGTTCCACCAATGCACTGGGACGATG
CAGGCAAGATCTTCCAACCTACCCTGGAGTTCTGATGCATTTTCTAATAAATGAAGTTGCAAAGGGCTGGGATCCAAGTTTGCCATCC
TTCCGTTTGAAGCAGATGACGGATCCATAACCACACCTGAACAGGGTACTGCGGTTGGTGGCGTCATTGCCCAACCCAGCGCTCAAAT
GTCGGCAGCTGCAGACATGGCATCTGGTAAGAGTGTGACTCTGAGTGGGAGGAATTCTTTTCTTCCATACTAGTGTCAACTGGAGCA
CAACTGAAACACAAGGAAAGATTCTGTTCAAACAGTCACTGGGACCCCTTCTCAACCCCTTACCTTGAACACTTATCTAAACTCTATGTT
GCTTGGTCAGGCTCTATAGATGTTAGGTTTCTATCTCTGGTCTGGTGTCTTTGGGGGAAACTAGCCGCAATAGTTGCCACCTGG
TGTCGATCCTGTCAAAGCACTTCCATGCTACAATACCCCTCATGTGTTGTTGATGCTCGACAGGTTGAACCAAGTATCTTTTCTCTCC
CTGATCTGAGGAATCACTATATCACCTCATATCTGATACTGATACTACATCTCTGGTAATAATGGTTTACAATGATCTTATTAACCC
TATGCAAATGAAGCTAACTCTTCTGGGTGATTGTCAGT。

D.6 结果判定

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

附录 E
(规范性)

猫狂犬病病毒巢式 RT-PCR 检测方法

采用巢式RT-PCR方法，扩增猫狂犬病病毒片段，用于猫狂犬病病毒的检测。

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于-70℃保存、备用。

E.2 PCR反应引物

E.2.1 第一次反应引物

上游引物序列（5' -3'）：GTGTAACACCTCTACAATGG

下游引物序列（5' -3'）：ACAGTCTCYTCNGCCATCT

E.2.2 第二次反应引物

上游引物序列（5' -3'）：CAAGATGTGYGCYAAYTGGAG

下游引物序列（5' -3'）：AGCCCTGGTTCGAACATTCT

（简并引物，其中Y=C/T，N=A/C/G/T）

E.3 反转录

使用反转录试剂盒对所提RNA进行反转录，制备cDNA。

E.4 PCR反应条件

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

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

E.5 PCR产物

E.5.1 产物大小

239bp。

E.5.2 产物参考序列

CAAGATGTGCGCTAACTGGAGTACCATCCCGAACTTTAGATTCTTAGCTGGAACCTACGACATGTTTTCTCTCGGATTGAGCAT
TTGTACTCAGCTATAAGAGTGGGCACAGTTGTCAGTCTTATGAAGACTGCTCAGGGTTGGTATCGTTCACAGGGTTCATAAAGCAAAT
AAATCTCACCGCGAGAGAGGCAATCCTATATTTCTCCACAAGAAGCTTTGAGGAAGAAATAAGAA。

E.6 结果判定

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

附录 F

(规范性)

猫传染性腹膜炎病毒 RT-PCR 检测方法

采用RT-PCR方法，扩增猫传染性腹膜炎病毒片段，用于猫传染性腹膜炎病毒的检测。

F.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于-70℃保存、备用。

F.2 PCR反应引物

上游引物序列（5' -3'）：GGCAACCCGATGTTTAAACTGG

下游引物序列（5' -3'）：CACTAGATCCAGACGTTAGCTC

F.3 逆转录

F.3.1 逆转录体系

16 μL基因组DNA去除体系包括：4×gDNA wiper Mix 4 μL，模板RNA 500 μg，RNase-free ddH₂O补足16 μL。

逆转录反应体系：5×HiScript III qRT SuperMix 4 μL，16 μL基因组DNA去除反应液。

F.3.2 逆转录反应条件

37℃ 15 min，85℃ 5 s。

F.4. PCR反应体系

25μL体系：包括2×tag酶12.5μL、上下游引物（10μM）各1μL，模板DNA 1μL，用灭菌双蒸水补齐。

F.5 PCR反应条件

以cDNA为模板，进行第PCR反应，条件如下：

94℃预变性5min，94℃变性30s，60℃退火30s，72℃延伸1min，72℃彻底延伸10min；第2到第4步35个循环。

F.6 PCR产物

F.6.1 产物大小

223bp。

F.6.2 产物参考序列

GGCAACCCGATGTTTAAAACTGGTCTTTCCGAGGAATTACCGGTCATCGCGCTGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGT
AATAGGAGGTACAAGCAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAG
ATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAAGAGCTAACGTCTGGATCTAGTG。

F.7 结果判定

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

附录 G

(规范性)

猫免疫缺陷病毒 RT-PCR 检测方法

G.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 °C冰箱备用。

G.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。

G.3 逆转录

G.3.1 逆转录体系

16 μL基因组DNA去除体系包括：4×gDNA wiper Mix 4 μL，模板RNA 500 μg，RNase-free ddH₂O补足16 μL。

逆转录反应体系：5×HiScript III qRT SuperMix 4 μL，16 μL基因组DNA去除反应液。

G.3.2 逆转录反应条件

37°C 15 min，85°C 5 s。

G.4 PCR反应引物

上游引物序列（5'-3'）：ACTGAGAAAGGAGCAGAGGTC

下游引物序列（5'-3'）：CTGGTCCCGCATTATTCTCC

G.5 PCR反应体系及条件

G.5.1 PCR反应体系

25μL体系：包括2×tag酶12.5μL、上下游引物（10μM）各1μL，模板DNA 1μL，用灭菌双蒸水补齐。

G.5.2 PCR反应条件

以cDNA为模板，进行第PCR反应，条件如下：

94°C 预变性5min，94°C 变性30s，55°C 退火30s，72°C 延伸1min，72°C 彻底延伸10min；第2到第4步35个循环。

G.6 产物大小

172bp。

G.7 产物参考序列

ACTGAGAAAGGAGCAGAGGTCCAATTGGGACTACCTCATCCTGCCGTTTACAAATGAAAAACAAGTAACAGTATTAGATATAG
GGGATGCATATTTACCATTCCCCTTGATCCAGATTATGCTCCTTATACAGCATTACTTTACCTAGGAAGAATAATGCGGGACCAG。

G.8 结果判定

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

附录 H

(规范性)

猫白血病病毒 RT-PCR 检测方法

采用RT-PCR方法，扩增猫白血病病毒片段，用于猫白血病病毒的检测。

H.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于-70℃保存、备用。

H.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。

H.3 逆转录

H.3.1 逆转录体系

16 μL基因组DNA去除体系包括：4×gDNA wiper Mix 4 μL，模板RNA 500 μg，RNase-free ddH₂O补足16 μL。

逆转录反应体系：5×HiScript III qRT SuperMix 4 μL，16 μL基因组DNA去除反应液。

H.3.2 逆转录反应条件

37℃ 15 min，85℃ 5 s。

H.4 PCR反应引物

上游引物序列（5' -3'）：TGTTGCCCTCATGTTGGGAG

下游引物序列（5' -3'）：CTGTGTGCATGGCCATTTGT

H.5 PCR反应体系

25μL体系：包括2×tag酶12.5μL、上下游引物（10μM）各1μL，模板DNA 1μL，用灭菌双蒸水补齐。

H.6 PCR反应条件

以cDNA为模板，进行第PCR反应，条件如下：

94℃预变性5min，94℃变性30s，58℃退火30s，72℃延伸1min，72℃彻底延伸10min；第2到第4步35个循环。

H.7 PCR产物

H. 7. 1 产物大小

119bp。

H. 7. 2 产物参考序列

TGTTGCCCTCATGTTGGGAGGACTCACTGTAGGGGGCATAGCCGCGGGGTCGGGACAGGGACTAAAGCCCTCCTGAAACAGCC
CAGTTTAGACA ACTACAAATGGCCATGCACACAG。

H. 8 结果判定

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