

四川省地方标准

普通级实验用猫 微生物学监测

Conventional experimental cat—Pathogenic surveillance

汇报人：周紫峒

17702810886

主要起草人：周紫峒 陈兵、邹弈星、王敬东、姚凌云、彭广能、荣祖元、黎家敏

目录

CONTENTS

- ▷ 前言
- ▷ 范围、规范性引用文件、术语和定义
- ▷ 检测要求
- ▷ 检测程序
- ▷ 检测方法
- ▷ 结果判定
- ▷ 检测结论

第一部分



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。
- 本文件由四川省科学技术厅提出、归口并解释。

- 本文件起草单位：四川省农村科技发展中心、四川农业大学、四川省药品检验研究院。
- 本文件主要起草人：周紫峒、陈兵、邹弈星、王敬东、姚凌云、彭广能、荣祖元、黎家敏。
- 本文件首次发布。

第二部分

范围、规范性
引用文件、术
语和定义



研究目标

- 本文件规定了普通级实验用猫微生物学监测的检测要求、检测程序、检测方法、检测规则、结果判定和检测结论的要求。
- 本文件适用于普通级实验用猫的微生物学监测。

研究目标

- GB/T 14926.50 实验动物 酶联免疫吸附试验
- NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法
- NY/T 564 猪巴氏杆菌病诊断技术

➤ 实验用猫

经人工饲育，对其携带的微生物和寄生虫实行控制，来源清楚，用于科学研究、教学、生产和检验检测以及其他科学实验的猫。

➤ 普通级实验用猫

不携带所规定的重要人兽共患病病原和猫烈性传染病病原的实验用猫。

第三部分

检测要求



➤ 普通级实验用猫临床观察应符合下列要求：

- (1) 被毛整齐平整不粗乱；
- (2) 头、尾、躯干、四肢正常无缺损；
- (3) 眼、鼻、口、耳、肛门、泌尿生殖器开口清洁，没有异常分泌物；
- (4) 行走正常；
- (5) 粘膜颜色正常。



微生物	检测要求
猫泛白细胞减少症病毒	▲
猫疱疹病毒I型	▲
猫杯状病毒	▲
猫狂犬病病毒	▲
猫白血病病毒	●
沙门氏菌	●
皮肤病原真菌	○
猫传染性腹膜炎病毒	○
多杀巴斯德杆菌	○

注1：▲必检项目，指在进行实验用猫质量评价时应检测的项目，可以免疫。

注2：●必检项目，指在进行实验用猫质量评价时应检测的项目，要求阴性。

注3：○必要时检测项目，指申请生产许可证、引进实验用猫或怀疑本病流行等必要时要求检测的项目。

粪便及乳汁都可以传播FeLV...
唾液最常见、血液、眼鼻分泌物、



水盆 食盆
公用猫砂盆



可能

传播途径

互相舔舐毛发



打闹撕咬



猫泛白细胞减少症病毒



猫疱疹病毒I型



猫杯状病毒



狂犬病人



猫白血病



沙门菌



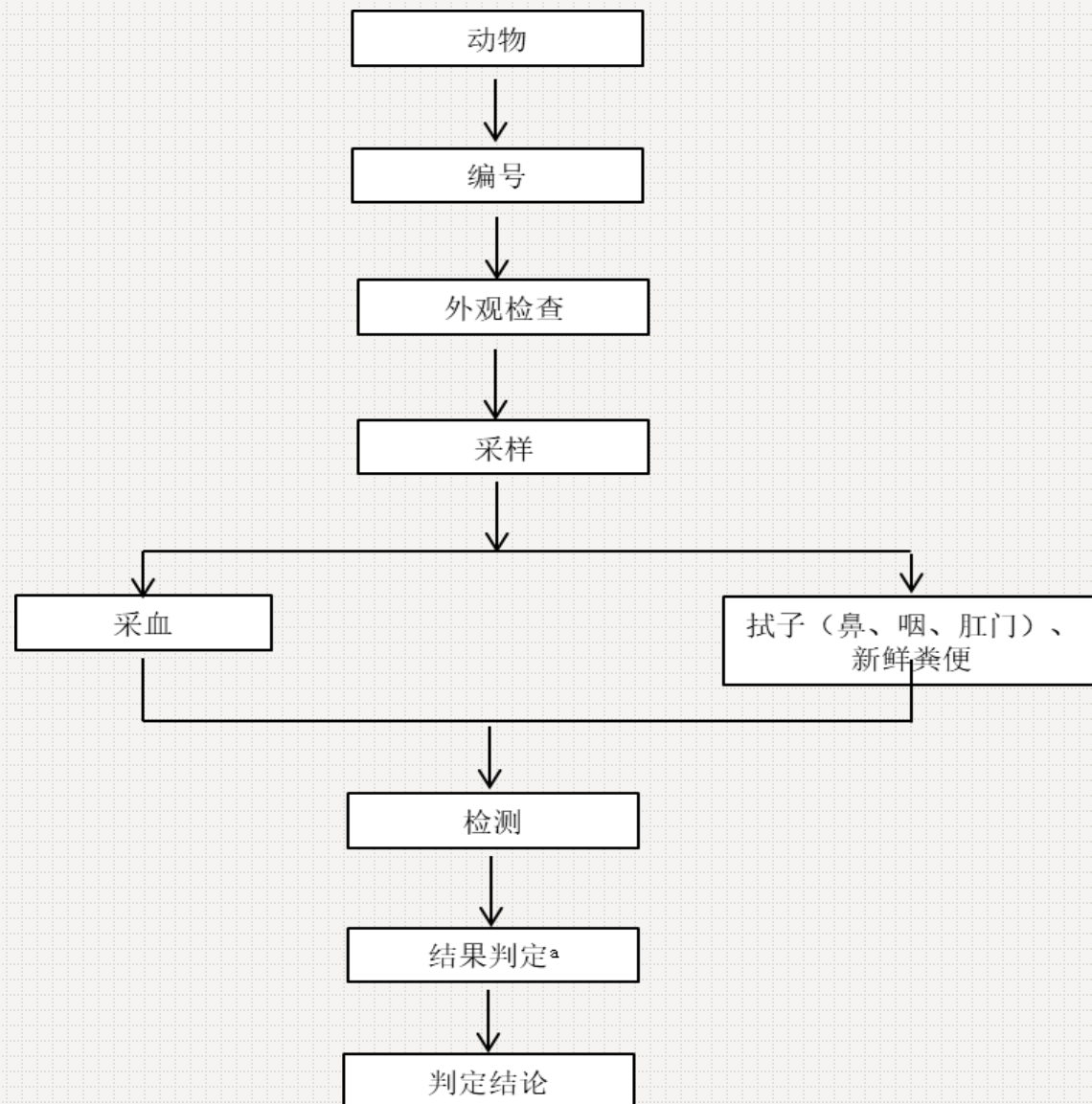
猫真菌性皮肤病（猫藓）



第四部分

检测程序





第五部分

检测方法



普通级实验用猫微生物学检测方法

微生物	检测方法	适用范围
猫泛白细胞减少症病毒	GB/T 14926. 50	抗体检测
	应符合附录A的规定	核酸检测
猫疱疹病毒I型	GB/T 14926. 50	抗体检测
	应符合附录B的规定	核酸检测
猫杯状病毒	GB/T 14926. 50	抗体检测
	应符合附录C的规定	核酸检测
猫狂犬病病毒	GB/T 14926. 50	抗体检测
	应符合附录D的规定	核酸检测
猫白血病毒	应符合附录E的规定	核酸检测
沙门氏菌	应符合附录F的规定	核酸检测
皮肤病原真菌	应符合附录G的规定	核酸检测
猫传染性腹膜炎病毒	应符合附录H的规定	核酸检测
多杀巴斯德杆菌	NY/T 564	核酸检测

注：猫泛白细胞减少症病毒、猫疱疹病毒I型、猫杯状病毒、猫狂犬病病毒为免疫要求项目，应按照本标准中“抗体检测”要求，检测70%以上的抗体合格率，在发现疑似症状时应使用本标准中“核酸检测”要求，判定阴性以排除。

第六部分

检测规则



检测规则

- 检测频率：

每6个月应至少检测1次

- 采样：

选择6月龄以上实验用猫随机抽样

检测规则

- 采样：

普通级实验用猫抽样数量应符合下表要求

普通级实验用猫采样数量

群体数量	采样数量
$\leq 100^a$	应不少于10
100~500	应不少于20
≥ 500	应不少于30

a: 群体数量低于10只时，应全部采样

检测规则

- 方法：

- (1) 可按微生物、寄生虫采样要求联合采样。

- (2) 采样方法按照NY/T 541进行

- 送检要求：

样本应有明显标识，写明样品名称、品种、品系、等级、数量及检测项目等内容，由专人按照生物样本包装和运输方式送达实验室。

第七部分

结果判定



- 抗体检查：

（1）免疫项目，免疫密度应达到100%，免疫抗体合格率 $\geq 70\%$ ，
判为合格。

（2）非免疫项目，血清抗体阴性，判为合格。

- 抗原和核酸检查：

未见阳性结果，判为合格。

第八部分

检测结论



上述各项指标均合格，应判定为实验用猫符合普通级标准要求；
有任一指标不合格，应判定实验用猫不符合普通级标准要求。

附录 A



A

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。

猫泛白细胞减少症病毒PCR检测方法

(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。

(2) PCR反应引物

根据vp2基因序列设计

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

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

(3) 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

①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。

②阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

③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。

猫泛白细胞减少症病毒PCR检测方法

(4) PCR反应体系及条件

① PCR反应体系

20 μ L体系包括10 $\times$ PCR buffer (含Mg²⁺) 2 μ L, dNTP (2.5mM) 1.6 μ L, 上下游引物 (10 μ M) 各1 μ L, Taq酶 (5U/ μ L) 0.5 μ L, 模板DNA 2 μ L, 最后用灭菌双蒸水补齐。

② PCR反应条件

94 $^{\circ}$ C预变性5min; 94 $^{\circ}$ C变性30s, 55 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C延伸1min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10min。

(5) PCR产物

①产物大小：401bp。

②产物参考序列

```
CGTCTACTCAGCCACCAACTAAAGTTTATAATAATGATTTAACTGCATCATTGATGGTTGCATTAGATAGTAAT  
AATACTATGCCATTTACTCCAGCAGCTATGAGATCTGAGACATTGGGTTTTTATCCATGGAAACCAACCATACC  
AACTCCATGGAGATATTATTTTCAATGGGATAGAACATTAATACCATCTCATACTGGAAGTAGTGGCACACCAA  
CAAATGTATATCATGGTACAGATCCAGATGATGTTCAATTTTATACTATTGAAAATTCTGTACCAGTACACTTA  
CTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAGGAACATTTTTTTTTTGATTGTAAACCATGTAGACTAACACATACATG  
GCAAACAAATAGAGCATTGGGCTTACCACCA。
```

(6) 结果判定

阳性对照出现401bp的目的片段，阴性对照无条带，实验判定成立；待检样品出现401bp目的片段，判定猫泛白细胞减少症病毒阳性；未出现401bp目的片段，判定猫泛白细胞减少症病毒阴性。

附录B



B

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。

猫疱疹病毒I型PCR检测方法

(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。

(2) PCR反应引物

根据tk基因序列设计

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

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

(3) 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

①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。

②阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

③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。

(4) PCR反应体系及条件

① PCR反应体系

20 μ L体系包括10 $\times$ PCR buffer (含Mg²⁺) 2 μ L, dNTP (2.5mM) 1.6 μ L, 上下游引物 (10 μ M) 各1 μ L, Taq酶 (5U/ μ L) 0.5 μ L, 模板DNA 2 μ L, 最后用灭菌双蒸水补齐。

② PCR反应条件

94 $^{\circ}$ C预变性5min; 94 $^{\circ}$ C变性30s, 54 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C延伸1min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸5min。

(5) PCR产物

①产物大小：409bp。

②产物参考序列

```
GCGGATTACACCACCACTCTCGATTGGATTGTATTGCGCGAGCTTGGTAATATTAGCAGCCAGAACAGAAATGT  
TACTCGTAAGCATCTGCGGGGGTAACTAGTAACTCCCAAATTCTCAGACCGCGCTGCGCGATAAATGCCAAT  
ATGGGTATTAGAGTGAGCTTCTCCCCCCTGGTGGTAGAATCTTGGTTATTAAACCCACAGAATCTGTTAATTG  
TTTCAAACCCTCACGACGTTGAATGTCTTTACTAGTTGTATCATATTTTTTTGAAAAACGACACGTTTTTCA  
GCTCAATTAGAAAACATATACCACCCCCTTCTCCCTCAAATTGTATAGTACATACACAATCAGGT  
CGGCGACGACCCAAGTTAACCTCACATGCTAGGTACACGCCCTTAGCCTTT。
```


(6) 结果判定

阳性对照出现409bp的目的片段，阴性对照无条带，实验判定成立；待检样品出现409bp目的片段时，判定猫疱疹病毒I型阳性；未出现409bp目的片段时，判定猫疱疹病毒I型阴性。

附录C



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。

猫杯状病毒RT-PCR检测方法

(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。

(2) PCR反应引物

上游引物序列 (5' -3') : AACCTGCGCTAACGTGCTT

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

(3) 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

①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。

②阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

③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。

(4) 反转录

使用反转录试剂盒对所提RNA进行反转录，制备cDNA。

(5) 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。

(6) PCR产物

①产物大小：926bp。

②产物参考序列

```
AACCTGCGCTAACGTGCTTAAATACTATGATTGGGATCCCACATCAGATTGGTTATCAACCCCAATAAATTTCTTCCTATTGGTTTCTGTGATAATCCTCTAATG
TGTTGCTACCCAGAATTGCTCCCAGAATTCGGAAGTGTGTGGGATTGTGATCAATCCCAGTCAAATCTACCTGGAGTCAATCCTTGGTGATGATGAATGGGCTT
CAACTTACGATGCCATTGACCCTGTTGTTCCACCAATGCACTGGGACGATGCAGGCAAGATCTTCCAACCTCACCTGGAGTTCTGATGCATTTTCTAATAAATGA
AGTTGCAAAGGGCTGGGATCCAAGTTTGCCATCCTTCCGTTTGAAGCAGATGACGGATCCATAACCACACCTGAACAGGGTACTGCGGTTGGTGGCGTCATTGCC
CAACCCAGCGCTCAAATGTCGGCAGCTGCAGACATGGCATCTGGTAAGAGTGTTGACTCTGAGTGGGAGGAATTCTTTTCCTTCCATACTAGTGTCAACTGGAGCA
CAACTGAAACACAAGGAAAGATTCTGTTCAAACAGTCACTGGGACCCCTTCTCAACCCCTTACCTTGAACACTTATCTAAACTCTATGTTGCTTGGTCAGGCTCTAT
AGATGTTAGGTTTTCTATCTCTGGTTCTGGTGTCTTTGGGGGAAAAGTACCGCAATAGTTGTCCCACCTGGTGTGATCCTGTCCAAAGCACTTCCATGCTACAA
TACCCTCATGTGTTGTTTGATGCTCGACAGGTTGAACCAAGTGATCTTTTCTCTCCCTGATCTGAGGAATTCATATATCACCTCATATCTGATACTGATACTACAT
CTCTGGTAATAATGGTTTACAATGATCTTATTAACCCCTATGCAAATGAAGCTAACTCTTCTGGGTGTATTGTCACTG。
```

(7) 结果判定

阳性对照出现926bp的目的片段，阴性对照无条带，实验判定成立；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D



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。

猫狂犬病病毒巢式RT-PCR检测方法

(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。

猫狂犬病病毒巢式RT-PCR检测方法

(2) PCR反应引物

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

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)

猫杯状猫狂犬病病毒巢式RT-PCR检测方法

(3) 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

①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。

②阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

③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。

猫狂犬病病毒巢式RT-PCR检测方法

(4) 反转录

使用反转录试剂盒对所提RNA进行反转录，制备cDNA。

(5) PCR反应条件

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。

(5) PCR反应条件

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。

(6) PCR产物

①产物大小：239bp。

②产物参考序列

```
CAAGATGTGCGCTAACTGGAGTACCATCCCGAACTTTAGATTCTTAGCTGGAACCTACGACATGTTTTTCTCTC  
GGATTGAGCATTTGTACTCAGCTATAAGAGTGGGCACAGTTGTCACTGCTTATGAAGACTGCTCAGGGTTGGTA  
TCGTTCACAGGGTTCATAAAGCAAATAAATCTCACCGCGAGAGAGGCAATCCTATATTTCTTCCACAAGAACTT  
TGAGGAAGAAATAAGAA。
```

(6) 结果判定

阳性对照出现239bp的目的片段，阴性对照无条带，实验判定成立；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E



猫白血病病毒巢式RT-PCR检测方法

采用巢式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。

猫白血病毒巢式RT-PCR检测方法

(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于-70℃保存、备用。

(2) PCR反应引物

① 第一次反应引物

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

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

猫白血病毒巢式RT-PCR检测方法

(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于-70℃保存、备用。

(2) PCR反应引物

②第二次反应引物

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

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

猫白血病病毒巢式RT-PCR检测方法

(3) 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

①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。

②阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

③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。

猫白血病病毒巢式RT-PCR检测方法

(4) 反转录

使用反转录试剂盒对所提RNA进行反转录，制备cDNA。

(5) PCR反应条件

① 第一次反应条件

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45s，58℃退火30s，72℃延伸1min，
35个循环；72℃延伸7min。

(5) PCR反应条件

② 第二次反应条件

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45s，58℃退火30s，72℃延伸1min，35个循环；72℃延伸7min。

猫白血病病毒巢式RT-PCR检测方法

(6) PCR产物

①产物大小：601bp。

②产物参考序列

```
GCTCCCCAGTTGACCAGAGTTGACCTTCCGCCTCATTTAACTAACCAATCCCATGCCTCTCGCTTCTGTACGCGCGCTT
TCTGCTATAAAACGAGCCATCAGCCCCAACGGGCGCGCAAGTCTTTGCTGAGACTTGACCGCCCCGGGTACCCGTGTACGA
ATAAACCTCTTGCCGATTGCATCTGACTCGTGGTCTCGGTGTTCCGTGGGCGCGGGGCCTCATCGCCGAGGAAGACCCAGTT
CGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATAGAGACCCCCAACCCCGGGACCACCGACCCACCATCAGGAGGTAAGCT
GGCCGGCGACCATATCTGTTGTCCTTGTATAAGTGTCTCTGTCAATTGATCTGATTTTGGCGGTGGGATCGAAGGAGCTGAC
GAGCTCGTACTTCGCCCCCGCAACCCTGGAAGACGTTCCACGGGTGTCTGATGTCTGGAGCCTCTAGTGGGACAGCCATTGG
GGCTCATCTGTTTGGGGTCTCACCTGAATACAGGGTGTTGATCGGAGACGAGGGAGCCGGACCCTCAAAGTCTCTTTCTGAG
GTTTCATTTTTCGGTTTGGTACCGAAGC。
```

(7) 结果判定

阳性对照出现601bp的目的片段，阴性对照无条带，实验判定成立；待检样品出现601bp目的片段时，判定猫白血病病毒阳性；未出现601bp目的片段时，判定猫白血病病毒阴性。

附录F



沙门氏菌荧光定量PCR检测方法

采用荧光PCR方法，扩增沙门氏菌DNA片段，用于猫沙门氏菌的检测。

沙门氏菌荧光定量PCR检测方法

(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。

(2) 荧光PCR引物及探针

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

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

探针 (5' -3') :FAM-CAGCCGCTCAGTATTG-NFQ

(3) 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

①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。

②阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

③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。

沙门氏菌荧光定量PCR检测方法

(4) 荧光PCR反应体系及条件

① 荧光PCR反应体系

20 μ L体系包括2 $\times$ Mix buffer 10 μ L, 引物探针混合液1 μ L, 模板DNA 2 μ L, 最后用灭菌双蒸水补齐。

② 荧光PCR反应条件

95 $^{\circ}$ C预变性10min; 95 $^{\circ}$ C变性15s, 60 $^{\circ}$ C延伸1min, 40个循环。

(5) 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，实验判定成立；

待检样品有荧光扩增曲线，且Ct值 ≤ 35 ，判定沙门氏菌阳性；

待检样品无荧光扩增曲线，或Ct值 > 35 ，判定沙门氏菌阴性。

附录G



皮肤病原真菌多重PCR检测方法

采用多重PCR方法，扩增皮肤病原真菌DNA片段，用于猫皮肤病原真菌的检测。

皮肤病原真菌多重PCR检测方法

(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。

(2) PCR引物

被检病原	引物序列 (5'-3')	目的基因	片段长度 (bp)
石膏样毛癣菌 (须毛癣菌)	TAGGGCCAAACGT CCGTCA	ITS1~ITS2	146
	GGTCCAGCGTTTA GCCACTAA		
石膏样小孢子菌	GACAATCAACTCC CTGGAT	ITS1~ITS2	390
	GTCCTAGAGGCGT TGGTT		
犬小孢子菌	TGCGGAAGGATC ATTAACG	ITS1~ITS2	290
	CTCGCTCAGACGG TATGT		

(3) 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

①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。

②阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

③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。

皮肤病原真菌多重PCR检测方法

(4) PCR反应体系及条件

① PCR反应体系

20 μ L体系包括10 $\times$ PCR buffer (含Mg²⁺) 2 μ L, dNTP (2.5mM) 1.6 μ L, 所有引物 (10 μ M) 各0.5 μ L, Taq酶 (5U/ μ L) 0.5 μ L, 模板DNA1 μ L, 最后用灭菌双蒸水补齐。

② PCR反应条件

94 $^{\circ}$ C预变性3min; 94 $^{\circ}$ C变性30s, 60 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C延伸45s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C7min。

(5) 结果判定

阳性对照出现146bp、290bp和390bp目的片段，阴性对照无条带，实验判定成立；待检样品出现任一目的片段时，判定皮肤病原真菌阳性；未出现目的片段时，判定皮肤病原真菌阴性。

附录H





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。



猫传染性腹膜炎病毒RT-PCR检测方法

(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于-70℃保存、备用。

(2) PCR引物

上游引物序列 (5' -3') : GTGATGCTATCATGACTAG

下游引物序列 (5' -3') : CACCATTACAACCTTCTAA

(3) 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

①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。

②阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

③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。

(4) 反转录

使用反转录试剂盒对所提RNA进行反转录，制备cDNA。

(5) PCR反应条件

以制备的cDNA为模板，进行第PCR反应，条件如下：

95℃预变性5min；95℃变性30s，48℃退火35s，72℃延伸45s，
30个循环；72℃延伸5min。

(6) PCR产物

①大小：417bp

②产物参考序列

GTGATGCTATCATGACTAGGTGTCTTGCTATATATGATTGTTTTGTCAAACGTGTAGATTGGTCCA
TTGTGTACCCTTTTATTGAAAATGAAGAGAAGATCAATAAAGCTGGTCGCATTGTACAATCACA
TGTCATGAGAGCTGCTCTTAAAGTTTTCAACCCTGCTGCAATTCACGATGTTGGTAATCCAAAA
GGTATTCGTTGTGCTGCGACACCCATACCGTGGTTTTTGTTATGACCGTGATCCTATTAATAACAA
TGTTAGATGTCTGGAGTATGATTACATGGTACATGGACAAATGAATGGTTTAATGTTGTTTTGGA
ATTGTAACGTAGACATGTACCCAGAGTTCTCAATTGTCTGTAGATTTGATACTCGGACCCGCTCA
AAATTGTCATTAGAAGGTTGTAATGGTG。

(7) 结果判定

阳性对照出现417bp的目的片段，阴性对照无条带，实验判定成立；待检样品出现417bp目的片段时，判定猫传染性腹膜炎病毒阳性；未出现417bp目的片段时，判定猫传染性腹膜炎病毒阴性。