

团 体 标 准

T/CVMA X13—2020

猫疱疹病毒荧光定量 PCR 检测方法

Rapid Detection of Feline Herpes virus

By Fluorescent Quantitative PCR

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上

2020 - XX - XX 发布

2020 - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由青岛农业大学提出。

本标准由中国兽医协会归口。

本标准起草单位：青岛农业大学，中国动物卫生与流行病学中心（后面继续增加）

本标准主要起草人：单虎，倪彬砚（后面继续增加）

中国兽医协会
CVMA

猫疱疹病毒荧光定量PCR检测方法

1 范围

本标准规定了猫疱疹病毒荧光定量PCR检测方法的缩略语、材料、操作步骤和结果判定。

本标准适用于猫、老虎等猫科动物的疱疹病毒的实验室诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

qPCR: 荧光定量PCR (Fluorescent quantitative polymerase chain reaction)。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)。

4 材料

4.1 仪器设备

4.1.1 高速冷冻离心机，12 000 r/min 以上。

4.1.2 荧光定量 PCR 仪。

4.1.3 高压蒸汽灭菌器。

4.1.4 干热箱。

4.1.5 冰箱，-20 ℃。

4.2 器械与耗材

4.2.1 医用棉签。

4.2.2 离心管, 1.5 mL, 15 mL, 50 mL。

4.2.3 0.22 μm 过滤器。

4.2.4 移液器, 0.1-2.5 μL, 0.5-10 μL, 1-100 μL, 100-1000 μL。

4.2.5 枪头, 10 μL, 200 μL, 1 000 μL。

4.3 试剂

4.3.1 DNA 提取试剂盒。

4.3.2 一步法 RT-PCR 试剂盒 (探针法)。

4.3.3 灭菌双蒸水, 除有特殊说明外, 所有实验用试剂均为分析纯, 实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

4.4 引物

4.4.1 试验中所用引物及探针见表1。

表1 引物及探针序列

病毒	引物名称	序列 (5' → 3')
猫疱疹病毒	FHV F	CAGGATATCAGAAAGTTGTATGTGAGGAA
	FHV R	GGCGAGAGGGTGTCTATCTAGATT
	Probe	(FAM) CACCCCGACGTGACCC (NFQ)

5. 操作步骤

5.1 采样器具前处理

5.1.1 医用棉签经 121 ± 2℃ 高压蒸汽灭菌 15min。

5.1.2 离心管、枪头经 121℃ ± 2℃ 高压蒸汽灭菌 15min

5.2 样品的采集和处理

除有特殊说明外, 所有实验用样本采集、保存与运输应符合 NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范。

采集宠物猫的口腔或鼻腔分泌物, 加入样品 10% 体积的 PBS 稀释, 过 0.22 μm 过滤器, 收集滤液, 8000g 离心 10min, 取上清液待检。

5.3 DNA 抽提

使用 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA 后, 置于 -20 °C 冰箱备用。

5.4 反应体系

5.4.1 猫疱疹病毒荧光定量 PCR 反应体系见表 2。

表 2 反应体系

试剂名称	加入量
2X One Step RT-qPCR Buffer (Probe)	25 μ L
Pro TaqHS DNA Polymerase (5U/ μ l)	1 μ L
FHV F	1 μ L
FHV R	1 μ L
Probe	2 μ L
DNA模板	5 μ L
双蒸水	15 μ L
总体系	50 μ L

5.4.2 以去离子水 (DW) 为阴性对照, 以阳性对照品DNA为阳性对照。

5.5 反应程序

5.5.1 猫疱疹病毒荧光定量PCR反应条件见表3。

表3 反应条件

温度	时间	循环数
42 $^{\circ}$ C	5min	1
95 $^{\circ}$ C	30sec	1
95 $^{\circ}$ C	5sec	40
60 $^{\circ}$ C	30sec	

6 结果判定

6.1 阈值设定

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值直接读取检测结果，Ct值为每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

6.2 质控标准

阴性对照无Ct值，且无典型扩增曲线；或阴性对照Ct值 >35.0 ，出现扩增曲线，熔解曲线于 80°C 以上未出现明显的峰值。阳性对照Ct值 <30.0 ，并出现典型的扩增曲线，熔解曲线于 80°C 以上出现明显的峰值。否则，此次试验视为无效。

6.3 阴性

无Ct值并且无典型的扩增曲线；或阴性对照Ct值 >35.0 ，出现扩增曲线，熔解曲线于 80°C 以上未出现明显的峰值，表示样品中无FHV核酸。

6.4 阳性

Ct值 ≤ 35.0 ，出现典型的扩增曲线，且熔解曲线于 80°C 以上出现明显的峰值，表示样品中存在FCV核酸。

6.5 可疑

$30.0 < \text{Ct值} < 35.0$ ，且出现扩增曲线的样本判定为可疑。可疑样本进行双孔重复试验，若任一孔或两孔重复试验结果为阳性者判为阳性，否则为阴性。