

# 团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

## 猫白血病诊断技术规范

Technical Specification for Diagnosis of Feline Leukemia

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(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。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会  
征求意见稿

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 缩略语 .....	2
5 临床诊断 .....	2
6 样品采集、保存与运输 .....	2
7 猫白血病病毒的 RT-PCR 检测 .....	3
8 荧光定量 PCR 检测 .....	4
9.诊断原则 .....	5
10.综合判定 .....	5
附录 A（资料性）骨髓穿刺方法 .....	6
附录 B（资料性）引物序列及 PCR 反应参数 .....	7
附录 C（资料性）溶液配方 .....	9
附录 D（资料性）标准阳性质粒核酸序列 .....	10

## 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。

本文件由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会  
征求意见稿

# 猫白血病诊断技术规范

## 1 范围

本文件规定了猫白血病的流行病学、临床症状的临床诊断，以及RT-PCR、荧光定量PCR等实验室诊断的技术要求和操作规范。

本文件适用于猫白血病的诊断。

## 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）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

GB 19489 实验室生物安全通用要求。

GB/T 27401 实验室质量控制规范动物检疫。

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

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**猫白血病病毒：Feline leukemia Virus, FeLV**

为逆转录病毒致肿瘤 RNA 病毒亚科成员之一，含有单股 RNA，通过逆转录酶的作用转录为 DNA，FeLV 可分为四个亚群：FeLV-A、FeLV-B、FeLV-C 和 FeLV-T。只有 FeLV-A 具有传染性和传播性。FeLV-B、FeLV-C 和 FeLV-T 虽不具有传播性，但感染 FeLV-A 的猫可通过突变及重新重组形成。FeLV-B 通常与恶性肿瘤，特别是淋巴瘤和白血病有关；FeLV-C 通常引起非再生性贫血；FeLV-T 对 T 淋巴细胞具有高度的细胞毒性，引起严重的免疫抑制。

### 3.2

**反转录聚合酶链式反应：reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR**

一种用于放大扩增特定的 RNA 片段的分子生物学技术。首先将 RNA 反转录为 cDNA，然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增的过程。

### 3.3

**实时荧光 RT-PCR：real-time RT-PCR**

整个 PCR 过程实时监测荧光信号累积的一种核酸扩增方法。

### 3.4

**Ct 值：Cycle threshold**

每个反应管内的荧光信号量达到设定的检测阈值所经历的循环数。

### 3.5

DEPC 水: diethyl pyrocarbonate

焦碳酸二乙酯 处理过并经高温高压 灭菌 的超纯水（一级水）。

## 4 缩略语

4.1 FeLV: 猫白血病病毒 (Feline leukaemia virus)

4.2 PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

4.3 TAE 缓冲液: 三羟甲基氨基甲烷(Tris base)、乙酸(acetic acid)和乙二胺四乙酸(EDTA)组成的缓冲液。

## 5 临床诊断

### 5.1 流行病学

全球流浪猫的白血病的流行率为 5%，非流浪猫本病流行率下降。

病毒可通过血液、鼻腔分泌物、粪便及乳汁传播，但唾液传播率最高；

目前情况下，大多数猫，通过社会活动，如共同进食、饮水、猫砂盆公用，也可通过咬伤、经胎盘或护理仔猫发生传播。妊娠期可通过激活潜伏感染而导致繁殖失败、流产或感染仔猫死亡；幼猫较成年猫易感染，无品种性别差异，但 50%以上的敏感成年猫仍会在接触到病毒后发生感染。

### 5.2 临床症状

猫感染FeLV后，根据所处环境和免疫状态，通常可分为三个阶段：顿挫性感染、退行性感染和进行性感染，临床症状差别较大，但常见症状包括呼吸困难、嗜睡、齿龈炎、口腔炎、厌食、失重、发热和难以愈合的脓肿。

FeLV感染后的临床症状取决于猫的年龄和免疫状态、病毒浓度、病毒的致病性。如果免疫反应不能清除病毒感染，在1~3天内发生病毒血症，猫淋巴结发生病变。

### 5.3 结果判定

出现5.1或5.2中的情况，初步判定为猫白血病临床疑似病例，需要进一步开展实验室诊断。

### 5.4 样品采集、保存与运输

### 5.5 样品采集

#### 5.5.1 血液

在病毒感染 1~3 天内，发生病毒血症，在血浆抗原中可检测到 P27 抗原。此阶段可用无菌注射器在猫前臂头静脉或颈静脉处直接采集 200~300  $\mu$ L 血液。抗凝血用含 EDTA 或肝素钠的抗凝管采集；用于血清分离的血液样品，每只采血量不少于 500  $\mu$ L，室温静置 30 min~1 h，放入离心机并配平，3000r/min，离心 30 min，用移液器取上层血清至做好标记的 EP 管，加盖封口。所有样品编号并填写相应采样单，

冷冻保存。

### 5.5.2 骨髓穿刺液

骨髓穿刺液是进行 FeLV 检测的最佳组织来源，有些猫在病毒血症发生后可清除，但原病毒 DNA 已经插入到骨髓干细胞，处于潜伏感染期，因此，采取血液检测时可能抗原检测结果为阴性。骨髓穿刺方法见附录 A，编号并填写相应采样单，冷冻保存。

## 5.6 样品保存及运输

血液样品或骨髓穿刺样品置于保温箱中，加入预冷的冰袋，宜在24h内送实验室。样品应尽快处理，在 2~8 °C条件下保存不超过24 h；长期保存应放置-70 °C以下保存。

## 6 猫白血病病毒的 RT-PCR 检测

### 6.1 仪器设备

- 6.1.1 PCR 扩增仪及配套反应管。
- 6.1.2 高速台式冷冻离心机（最高离心速度不低于 12000 r/min）。
- 6.1.3 生物安全柜。
- 6.1.4 微量移液器（2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL）及配套吸头与 1.5 mL 离心管。
- 6.1.5 电泳仪。
- 6.1.6 电泳槽。
- 6.1.7 紫外凝胶成像仪。

### 6.2 试剂

- 6.2.1 推荐的猫白血病 RT-PCR 引物序列，参见附录 B。
- 6.2.2 RT-PCR 反应液，配方参见附录 B。
- 6.2.3 无水乙醇。

### 6.3 RNA 提取

可选市售商品化 RNA 提取试剂盒，按说明书进行 RNA 提取即用或-80°C冻存备用。

### 6.4 反转录

按照反转录试剂盒说明，将提取的 RNA 反转录为 cDNA，所得到的 cDNA 放于-20°C保存备用或者直接用于之后的 PCR 反应。

### 6.5 PCR 扩增条件

配置 PCR 反应体系（20μL）：2×PCR Taq 酶 10μL，上游引物 pol\_F: 0.5μL，下游引物 pol\_R 0.5μL、蒸馏水 7μL、扩增模板 2μL，模板为 7.4 中相应的模板 cDNA 2μL，充分混匀后瞬时离心使液体全部聚集于管底。反应程序为 95°C预变性 5min，95°C 15s，56°C 15s，72°C 15s 共 35 个循环，最后 72°C 延伸 5min。反应结束后取出置于 4°C 保存（引物序列及反应体系见附录 B）。

#### 6.5.1 扩增产物电泳检测

取 1.0 g 琼脂糖加入 100 mL 核酸电泳缓冲液中加热至沸腾，充分溶化后冷却至 50 °C 左右，加入核酸染色剂 10  $\mu$ L，混匀后倒入胶槽制备凝胶板。在电泳槽中加入 1 $\times$ TAE 缓冲液，液面刚好没过凝胶。分别取 PCR 扩增产物、阴/阳性对照（阳性对照的扩增模板为含有扩增目的基因的重组质粒，阴性对照的扩增模板为灭菌水）扩增产物 10  $\mu$ L 和 2  $\mu$ L 5 $\times$ 电泳上样缓冲液混合后，分别加样到各凝胶孔中，取 5 $\mu$ L DNA Marker 加到凝胶孔中。5V/cm 恒压下电泳 30min 左右，将电泳凝胶置于凝胶成像系统中观察结果，进行判定。

### 6.5.2 结果判定

实验结果成立条件：阳性对照 PCR 扩增产物电泳后在 495 bp 位置出现特异性条带，同时阴性对照 PCR 扩增产物电泳后没有任何条带，则试验结果成立，否则结果不成立。阳性对照使用标准阳性质粒，其核酸序列见附录 D。

样品结果判定：在实验成立的前提下，如果样品的 PCR 产物电泳后在 495bp 位置上出现特异性条带，判定为 FeLV 核酸检测阳性；否则判定为阴性。

## 7 荧光定量 PCR 检测

### 7.1 仪器设备

荧光PCR仪

### 7.2 试剂及引物探针序列

推荐的实时荧光RT-PCR引物探针序列参见附录B。

### 7.3 RNA 提取

见7.3。

### 7.4 实时荧光 RT-PCR 操作

#### 7.4.1 实时荧光 RT-PCR 扩增试剂的准备与配制

在专门的反应混合物配置区配制实时荧光RT-PCR扩增试剂。根据需要检测的样品数，按照推荐的反应液配方（见附录B）配制反应液，充分混合均匀后分装，每个反应管15 $\mu$ L，转移反应管至样本制备区。

#### 7.4.2 加样

在专门的样本制备区进行。将8.4.1配好的反应管中分别加入8.3中制备的RNA溶液5 $\mu$ L（约500ng），使每管总体积达到20 $\mu$ L，记录反应管对应的样品编号，盖紧管盖后，500r/min离心30 s。

#### 7.4.3 实时荧光 RT-PCR 反应设定

在专门的检测区进行实时荧光RT-PCR反应，将8.4.2中加样后的反应管放入实时荧光RT-PCR检测仪内，编辑样品表后，选定与探针标记荧光基团相符合的检测通道读取荧光信号值，淬灭基团选择none。推荐的实时荧光RT-PCR反应参数见B。

### 7.5 结果判定



### 7.5.1 结果分析

读取检测结果，阈值设定原则以阈值线超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为准，可根据不同仪器噪声进行调整。

### 7.5.2 质控标准

阴性对照的检测结果显示无特异性扩增，阳性对照Ct值 $\leq 30$ 。

### 7.5.3 结果描述与判定

#### 7.5.3.1 阳性

Ct值 $< 35$ ，且出现明显的S扩增曲线，表明样品中存在猫白血病病毒核酸。

#### 7.5.3.2 阴性

无特异性扩增曲线，或Ct值 $> 38$ ，表明样品中无猫白血病病毒核酸。

#### 7.5.3.3 有效原则

$35 \leq \text{Ct值} \leq 38$ 的样本应重做，重做结果无特异性扩增或Ct值 $> 38$ 则为阴性；反之，有Ct值且有明显扩增曲线为阳性。

## 9 诊断原则

猫白血病病毒感染的诊断是以病原学检查为主，结合流行病学史、临床表现进行综合分析做出诊断。流行病学史和临床表现是该病诊断的重要依据，但不是必要条件。病例确诊需严格的病原学检测证据。

## 10 综合判定

### 10.1 猫白血病病毒感染疑似病例

满足 5.1 或 5.2 任一项均可怀疑猫白血病病毒感染。

### 10.2 猫白血病病毒感染确诊病例

满足 5.1 或 5.2 且 7.5.2 检测阳性或 8.5.3 核酸检测阳性可确定猫白血病病毒感染。

### 10.3 猫白血病病毒感染排除病例

满足 5.1 或 5.2 且 7.5.2 检测两次以上检测阴性或 8.5.3 检测两次以上检测阴性可排除猫白血病病毒感染。

## 附录 A

(资料性)

### 骨髓穿刺方法

#### A.1 骨髓穿刺液采集方法

- A.1.1 采用股骨近端穿刺。用手触摸股骨近端外侧大转子的部位，剪毛，消毒；
- A.1.2 静脉注射戊巴比妥钠40mg/kg体重，进行麻醉（可使用同样具有麻醉效果的麻醉剂进行麻醉）；
- A.1.3 用手抓住后腿中部，使其膝盖部位位于食指和拇指之间；
- A.1.4 用16号骨髓穿刺针在大转子内侧，经转子窝刺入1~1.5 mL；
- A.1.5 取出针芯，接上10~20 mL注射器，用力快速吸取~0.5 mL骨髓穿刺液。

## 附 录 B

(资料性)

## 引物序列及 PCR 反应参数

## B.1 RT-PCR 引物序列

猫白血病病毒 RNA 或前病毒 DNA PCR 检测引物序列

引物名称	序列 (5'—3')
Pol_F	TGAATGTCCCTACCCGTT
Pol_R	GGATGGATGTCTCTACCC

注1: 引物由生物公司合成, 纯度为HPLC级, 用DEPC水溶解并稀释至终浓度10  $\mu\text{mol/L}$ , -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

注2: 扩增目的片段长度495 bp, 针对FeLV pol基因。

## B.2 PCR 检测反应体系

试剂	终浓度	体积
2 $\times$ Taq酶	\	10 $\mu\text{L}$
Pol_F	0.5 $\mu\text{mol/L}$	0.5 $\mu\text{L}$
Pol_R	0.5 $\mu\text{mol/L}$	0.5 $\mu\text{L}$
DNA模板	\	2 $\mu\text{L}$
灭菌去离子水	\	7 $\mu\text{L}$
总体积	\	20 $\mu\text{L}$

## B.3 荧光定量 PCR 引物序列及探针

引物 (探针)	序列 (5' $\rightarrow$ 3')
U3_F	AAC AGC AGA AGT TTC AAG GCC
U3_R	TTA TAG CAG AAA GCG CGC G
探针	FAM-CCAGCAGTCTCCAGGCTCCCC A-BHQ1

注1: 引物由生物公司合成, 纯度为HPLC级, 用商品化DEPC水溶解并稀释至终浓度10  $\mu\text{mol/L}$ , -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

注2: 引物及探针是参考 U3基因合成。

## B.4 荧光定量 PCR 反应体系

试剂	终浓度	体积 ( $\mu\text{L}$ )
2 $\times$ RT缓冲液	\	10
酶混合液		0.5
上游引物 U3_F	0.48 $\mu\text{mol/L}$	0.4
下游引物 U3_R	0.48 $\mu\text{mol/L}$	0.4
探针	0.16 $\mu\text{mol/L}$	0.8
DNA模板	\	2
DEPC水	\	5.9
总体积	\	20 $\mu\text{L}$

## B.5 实时荧光 RT-PCR 反应参数

推荐的实时荧光RT-PCR反应参数:

第一阶段, 反转录45 $^{\circ}\text{C}/15\text{min}$ ;

第二阶段, 预变性95 $^{\circ}\text{C}/2\text{min}$ ;

第三阶段, 95 $^{\circ}\text{C}/15\text{s}$ , 60 $^{\circ}\text{C}/60\text{s}$ , 40个循环, 在第三阶段每次循环退火延伸时收集荧光, 实验结束后, 根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

## 附录 C

(资料性)

## 溶液配方

## C.1 TAE 配置方法

一般先配制 50 倍的 TAE 缓冲液，用时稀释为 1 倍 TAE。50 倍 TAE 缓冲液的配制方法为：

C.1.1 称取下列试剂于 1 L 烧杯中： Tris 242 g，Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 37.2 g；

C.1.2 向烧杯中加入约 600 mL 的去离子水，充分搅拌溶解；

C.1.3 加入 57.1 mL 的醋酸，充分搅拌；

C.1.4 加去离子水将溶液定容至 1 L 后，室温保存。

中国兽医药协会  
征求意见 见稿

附录 D

(资料性)

标准阳性质粒核酸序列

TGAATGTCCTACCCGTTATTAGGGAGAGACCTATTAACCAAACCTCAAGGCTCAGATCCATT  
TCACCGGGGAAGGAGCTAATGTTGTTGGACCCATGGGCTCACCCCTACAAGTCCTCACCTTGCAA  
CTAGAAGAAGAGTATCGGCTATTTGAGCCGAAAAGTGAACCTGAAACAAGGTATGGACAGTTGGC  
TTAAAACTTTCCCCGGGCATGGGCAGAAACAGGAGGTATGGGAATGGCTCATTGCCAAGCCCC  
CATCCTCATTCAACTTAAAGCTACTGCCACCCCAATCTCCATTCGGCAGTACCCCATGCCCATG  
AAGCTTACCAAGGAATTAACCCCATATAAGGAGAATGCTGGACCAAGGCATCCTCAAGCCCTG  
CCGGTCCCCATGGAATACACCCTATTACCTGTCAAAAAGCCAGGAACCGGGGATTACCGACCA  
GTGCAGGACTTAAGAGAAGTAAATAAAAAGGGTAGAGGACATCCATC

---