ICS 11.220
B 41

# 团　　体　　标　　准

T/CVMA 42-2020

# 猫疱疹病毒荧光定量 PCR 检测方法

Detection of feline herpes virus by fluorescent quantitative PCR

中国兽医协会
CVMA

2020-12-22 发布　　2020-12-22 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

# 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。

本文件由青岛农业大学提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：青岛农业大学、中国动物卫生与流行病学中心、中国兽医药品监察所、上海基灵生物科技有限公司、莱阳市农业农村局。

本文件主要起草人：单虎、倪彬砚、王媛媛、印春生、朱旭、孙建华、于静静。

中国兽医协会
CVMA

# 猫疱疹病毒荧光定量 PCR 检测方法

## 1 范围

本文件规定了猫疱疹病毒（FHV）荧光定量PCR检测方法的材料、耗材与器械、试剂、引物、操作步骤和结果判定等方法。

本文件适用于猫的疱疹病毒的实验室检测。

## 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 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

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

荧光定量PCR：荧光定量聚合酶链反应（fluorescent quantitative polymerase chain reaction）

PCR：聚合酶链反应（polymerase chain reaction）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

PBS：磷酸盐缓冲溶液（phosphate buffered solution）

FAM：羧基荧光素（carboxyfluorescein）

BHQ1：无荧光淬灭基团（black hole quencher-1）

FHV：猫疱疹病毒（feline herpesvirus）

Ct值：每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值所经历的循环数（cycle threshold）

## 5 试剂和材料

### 5.1 试剂

5.1.1 总则：除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合GB/T 6682的要求。

5.1.2 DNA 提取试剂盒。

5.1.3 一步法荧光定量 PCR 试剂盒(探针法)。

中国兽医协会 CVMA

5.1.4 灭菌去离子水，除有特殊说明外，所有检测用试剂均为分析纯，检测用水应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

5.1.5 0.01 mol/L PBS 缓冲液（pH 7.2~pH 7.4，含青霉素 100 U/mL、链霉素 0.1 mg/mL），配制方法应符合附录 A.1 的要求。

5.1.6 上游引物：5′-GCAGATCTACACATCAGA-3′；下游引物：5′-GGGTGATGTTAAATGTGG-3′；探针：5′-FAM-CTCGCCTGAGATGACGGTCC-BHQ1-3′。引物浓度为10μM，探针浓度为10μM。

### 5.2 材料

5.2.1 医用棉签

5.2.2 离心管：1.5 mL

5.2.3 微量移液器吸头：10 μL、200 μL、1000 μL

## 6 仪器设备

6.1 荧光 PCR 检测仪及配套反应管（板）

6.2 高速冷冻离心机，8000 g 以上

6.3 微量移液器：0.1 μL~2.5 μL、0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL

6.4 冰箱：2 ℃~8 ℃和-20 ℃

6.5 生物安全柜或超净台

## 7 样品的采集与前处理

### 7.1 总则

样品的采集、保存与运输按照NY/T 541执行。生物安全要求按照GB 19489的规定。

### 7.2 采样器具处理

医用棉签、离心管、移液器吸头经 119 ℃~123 ℃高压蒸汽灭菌 15 min。

### 7.3 样品前处理

医用棉签采集猫的眼结膜、口腔或鼻腔分泌物，置于离心管中，加入 1 ml~2 mL PBS 稀释并充分混匀，8000 g 离心 10 min，取上清液待检。

## 8 操作方法

### 8.1 DNA 抽提

在样本制备区进行，采用市售的病毒 DNA 提取试剂盒按照说明书操作，提取样品 DNA。也可采用其他等效的 DNA 提取方法。提取过程应设立阴性和阳性对照。以灭菌去离子水为阴性对照，以猫疱疹病毒细胞液为阳性对照，按同样方法提取 DNA。提取后置于-20 ℃冰箱备用。

### 8.2 扩增试剂的准备与配制

在反应混合物配置区进行。荧光定量PCR反应液配方应符合附录A.2的要求。每个检测反应体系需要18 μL荧光定量PCR反应液。充分混匀后，转移反应管至样本制备区。

### 8.3 加样

在样本制备区进行。向每个反应管中加入2 μL提取的DNA，记录反应管对应的样品编号。盖紧管盖后，瞬时离心。

### 8.4 荧光定量 PCR 反应

在检测区进行。将8.3中加样后的反应管放入荧光定量PCR检测仪中，编辑样品表后，选定FAM作为报告基团，BHQ1为淬灭基团，反应参数设置如下： 95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，在每个循环第二步（60 ℃ 30 s）收集荧光信号，共40个循环。

## 9 结果判定

### 9.1 结果分析条件设定

阈值设定原则以阈值线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音情况进行调整。

### 9.2 检测有效判定

9.2.1 阴性对照无Ct值并且无特定扩增曲线。

9.2.2 阳性对照Ct值≤35，并出现典型的S型扩增曲线。

9.2.3 如阴性和阳性对照不满足以上条件，此次检测视为无效。

### 9.3 结果描述及判定

#### 9.3.1 阴性

无Ct值或Ct值＞40，并且无扩增曲线，表示样品中无猫疱疹病毒核酸。

#### 9.3.2 阳性

Ct值≤35，且出现典型的S型扩增曲线，表示样品中存在猫疱疹病毒核酸。

#### 9.3.3 可疑

35＜Ct值≤40，并出现典型的S型扩增曲线，需重新取样提取DNA，扩增后结果判定仍为可疑的，可判定为阳性。

中国兽医协会 CVMA

# 附　录　A
（规范性）
试剂配制

## A.1　PBS缓冲液（磷酸盐缓冲溶液）

0.01 mol/L PBS溶液　（pH 7.2~pH 7.4）

准确称量下面各试剂，加入到800 mL蒸馏水中溶解，调节溶液的pH至7.2~7.4，加水定容至1000 mL。分装后在119 ℃~123 ℃灭菌15 min~20 min，保存于室温。

| 组分 | 剂量 |
|---|---|
| 氯化钠(NaCl) | 8.00 g |
| 氯化钾(KCl) | 0.20 g |
| 磷酸二氢钾(KH2PO4) | 0.24 g |
| 磷酸氢二钠(Na2HPO4·12H2O) | 3.65 g |
| 蒸馏水 | 加至1000 mL |

## A.2　荧光定量PCR反应液配方

| 组分 | 1个检测体系的加入量 |
|---|---|
| 2X Pro Taq HS Probe Premix | 10 μL |
| 10μM 上游引物 | 0.8 μL |
| 10μM 下游引物 | 0.8 μL |
| 10μM 探针 | 0.4 μL |
| 核酸 | 2 μL |
| 灭菌去离子水 | 6 μL |

中国兽医协会 CVMA