

DB

广东省地方标准

DB / —

实验用猫管理规范

Experimental feline management specification

(征求意见稿)

(本稿完成日期: 2023年9月27日)

— — 发布

— — 实施

发布

目 次

前言	II
1. 范围	1
2. 规范性引用文件	1
3. 术语和定义	2
4. 种子资源	2
5. 设施与环境	2
6. 饲养管理	5
7. 动物质量管理	6
8. 动物实验管理	11
9. 动物运输	12
10. 废物处理	13
附录 A（规范性） 实验用猫泛白细胞减少症病毒 PCR 检测方法	14
附录 B（规范性） 实验用猫疱疹病毒 I 型 PCR 检测方法	15
附录 C（规范性） 实验用猫杯状病毒 RT-PCR 检测方法	16
附录 D（规范性） 实验用猫传染性腹膜炎病毒 RT-PCR 检测方法	17
附录 E（规范性） 实验用猫免疫缺陷病毒荧光 PCR 检测方法	18
附录 F（规范性） 实验用猫肠道冠状病毒 RT-PCR 检测方法	19
附录 G（规范性） 实验用猫白血病病毒荧光 PCR 检测方法	20
附录 H（规范性） 实验用猫巴尔通体荧光 PCR 检测方法	21

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则编写。

本标准由广东省科学技术厅提出。

本标准由广东省实验动物标准化技术委员会归口。

本标准由广东省科学技术厅组织实施。

本标准起草单位：广东省实验动物监测所、广州市药品检验所、华南农业大学、深圳市药品检验研究院(深圳市医疗器械检测中心)。

本标准主要起草人：xxxx。

本标准于20xx年xx月首次发布。

实验用猫管理规范

1 范围

本文件规定了实验用猫种子资源、设施与环境、饲养管理、动物质量管理、动物实验管理、动物运输以及废物处理等管理要求。

本标准适用于实验用猫的生产及实验管理。

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，仅该日期的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 8978 污水综合排放标准
- GB 14925 实验动物 环境及设施
- GB 18871 电离辐射防护与辐射源安全基本标准
- GBZ 133 医用放射性废物的卫生防护管理
- GB/T 14924.1 实验动物 配合饲料通用质量标准
- GB/T 14924.2 实验动物 配合饲料卫生标准
- GB/T 14926.1 实验动物 沙门菌检测方法
- GB/T 14926.3 实验动物 耶尔森菌检测方法
- GB/T 14926.4 实验动物 皮肤病原真菌检测方法
- GB/T 14926.5 实验动物 多杀巴斯德杆菌检测方法
- GB/T 14926.6 实验动物 支气管鲍特杆菌检测方法
- GB/T 14926.8 实验动物 支原体检测方法
- GB/T 14926.16 实验动物 乙型溶血性链球菌检测方法
- GB/T 14926.49 实验动物 空肠弯曲杆菌检测方法
- GB/T 14926.56 实验动物 狂犬病病毒检测方法
- GB/T 18448.1 实验动物 体外寄生虫检测方法
- GB/T 18448.2 实验动物 弓形虫检测方法
- GB/T 18448.6 实验动物 蠕虫检测方法
- GB/T 18448.10 实验动物 肠道鞭毛虫和纤毛虫检测方法
- GB/T 18647 动物球虫病诊断技术
- GB/T 31217 全价宠物食品 猫粮
- GB/T 35823 实验动物 动物实验通用要求
- GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南
- GB/T 39760 实验动物 安乐死指南
- GB/Z 34792 实验动物 引种技术规程
- SN/T 3724 进出口食品中幽门螺杆菌的检验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 实验用猫 experimental feline

经人工饲养，对其携带的微生物和寄生虫实行控制，品种遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产和检定以及其他科学实验的猫。

3.2 生产设施 breeding facility

用于实验用猫生产的建筑物和设备的总和。

3.3 实验设施 experiment facility

以研究、试验、教学、产品生产、检验检测等为目的而进行实验用猫试验的建筑物和设备的总和。

3.4 普通环境 conventional environment

符合实验用猫居住的基本要求，控制人员、物品和动物出入，不能完全控制传染因子，适合于饲养普通级实验用猫。

3.5 屏障环境 barrier environment

符合实验用猫居住的要求，严格控制人员、物品和空气的进出，适合于饲养无特定病原体实验用猫。

4 基本要求

4.1 实验用猫生产引种参照 GB/Z 34792 的规定执行。选择行业认可的种子中心或种源基地进行引种。

4.2 生产实验用猫按照引进猫的品种要求设立猫群结构、饲养密度，开展种群公猫、母猫、幼猫、成年猫的饲养管理。

5 设施与环境

5.1 分类

按照设施的使用功能，分为实验用猫生产设施和实验用猫实验设施。

按照空气净化物的控制程度，实验用猫设施环境分为普通环境和屏障环境，见表1。

表 1 实验用猫设施环境分类

设施环境分类		使用功能	适用动物等级
普通环境	—	生产、实验、检疫	普通级
屏障环境	正压	生产、实验、检疫	SPF级
	负压	实验、检疫	普通级、SPF级

5.2 设施

5.2.1 选址

- 5.2.1.1 宜选在空气质量及自然环境较好的区域。
- 5.2.1.2 宜远离有严重空气污染、振动或有噪声干扰的铁路、码头、飞机场、交通要道、工厂、贮仓、堆场等区域。
- 5.2.1.3 设施应有可靠的避免交叉感染的隔离措施。
- 5.2.1.4 动物生物安全实验室选址应符合 GB 19489 的要求。

5.2.2 设施要求

- 5.2.2.1 外环境整洁，便于清扫和消毒。排水畅通，无废物堆积和污水积存。
- 5.2.2.2 宜设人、动物、物品、车辆专用出入口，道路通畅，配置专用消毒设施和设备。
- 5.2.2.3 设施围护结构坚固，材料无毒、无放射性。
- 5.2.2.4 所有实验设施应有防止野生动物和昆虫等进入的装置。
- 5.2.2.5 生产区和实验区内墙表面应光滑平整，易于清洗、消毒。墙面应采用不易脱落、耐腐蚀、无反光、耐冲击的材料。地面应防滑、耐磨、无渗漏。天花板应耐腐蚀、防水。
- 5.2.2.6 屏障设施建筑物门、窗应有良好的密闭性，饲养间的门应设观察窗。
- 5.2.2.7 屏障环境设施的密闭门宜朝空气压力较高的方向开启，并能自动关闭。
- 5.2.2.8 走廊、门的宽度和高度应满足实验用猫、设备进出和日常工作需要。走廊净宽宜不小于 1.5 m。门的净宽不小于 0.8 m。
- 5.2.2.9 实验设施饲养间应合理组织气流和布置送风口、排风口的位置，避免气流死角、断流和短路。
- 5.2.2.10 实验场所的电力负荷等级，应根据工艺按照 GB 50052 的要求确定。屏障环境应采用不低于二级电力负荷供电。
- 5.2.2.11 屏障环境设施由非洁净区进入洁净区的各类管线管口，应采取可靠的密封措施。
- 5.2.2.12 排水沟、槽、管坡度应保证排水通畅，无污物积存。排水管道管径应大于 DN 150。
- 5.2.2.13 宜设置环境监控系统。

5.2.3.14 开展放射性实验设施，除满足本标准外，还应按照 GB 18871 进行。

5.3 工艺布局

5.3.1 总体布局

- 5.3.1.1 动物实验设施应与动物生产设施分开设置。
- 5.3.1.2 普通级动物的隔离检疫间应与动物实验区分开设置。
- 5.3.1.3 应根据实验动物的生理需要和行为特征，设计建造适合其居住的设施，并能控制人员和动物进出。一般分为前区、生产区、实验区和辅助区。
- 5.3.1.4 前区宜包括：办公室、接待室、档案资料室、维修室、库房、饲料室、配电室、一般走廊和动物装卸平台等。
- 5.3.1.5 生产区宜包括：缓冲间、走廊、消毒后室、清洁物品贮藏室、隔离检疫室、育种室、扩大群饲养室、生产群饲养室、待发室。
- 5.3.1.6 实验区宜包括：缓冲间、走廊、消毒后室、清洁物品贮藏室、隔离检疫间、饲养间、隔离治疗室、实验操作室、手术室等。
- 5.3.1.7 辅助区宜包括：储藏室、洗刷消毒室、废物品存放处理间（设备）、兽医室、检测实验室、解剖室、密闭式动物尸体冷藏存放间（设备）、机械设备室、淋浴间、工作人员休息室、更衣室等。
- 5.3.1.8 动物实验设施应与动物生产设施分开设置。
- 5.3.1.9 普通级动物的隔离检疫间应与动物实验区分开设置。
- 5.3.1.10 在确保满足功能要求的情况下，可根据自身规模和工作特点，合并或增设功能空间或区域，按照 GB 50447 的规定执行。

5.3.2 区域设置要求

- 5.3.2.1 饲养间宜设动物活动空间。
- 5.3.2.2 实验设施排水口应采取防止害虫进入的措施。
- 5.3.2.3 生产设施和实验设施宜设置隔离室，用来独立饲养观察受伤和患病的动物。
- 5.3.2.4 饲料和垫料储藏室应实行环境控制，防止寄生虫污染和野生动物进入，并进行必要的温湿度控制，防止饲料、垫料发霉和变质。
- 5.3.2.5 废物存放处理间（设备）应满足消毒、试验和饲养等过程中产生废水、动物粪污和动物尸体等废物的处理、存放需要。

5.4 环境技术指标

实验用猫的环境技术指标参照GB 14925执行。

5.5 笼具围栏

- 5.5.1 笼具围栏应符合实验用猫的生理、健康及福利要求，应使用无毒、无害、无放射性的材料。成品应耐腐蚀、耐高温、耐高压、耐冲击、易清洗。
- 5.5.2 笼具围栏内外边角均应圆滑、无锐口、毛刺，内部无尖锐的突起，动物不易噬咬、咀嚼。
- 5.5.3 笼具围栏应能避免动物身体或四肢伸出，门或盖有防护装置，能防止动物自行打开或发生意外伤害、逃逸。
- 5.5.4 笼具围栏大小应满足实验用猫的生活习性。
- 5.5.5 实验用猫笼具围栏应符合表2的要求。

表2 实验用猫笼具围栏尺寸

体重/kg	底板面积/（m ² /只）	高度/m
≤2.5	0.28	0.76（栖木）
>2.5	0.37	0.76（栖木）

5.6 料盘

- 5.6.1 选用无毒、耐冲洗、耐高温、易消毒灭菌的材料制作料盘。
- 5.6.2 料盘的大小应满足同栏所有动物同时进食。
- 5.6.3 自动落料料盘应保证实验用猫能自主无障碍采食到饲料。

5.7 福利用品

福利用品应符合实验用猫的生活习性，所采用的材料应无毒、无害，成品应耐高温、耐高压、易清洗、不易采食。

6. 饲养管理

6.1 饲喂

饲料应符合GB 14924.1和GB/T 14924.2的要求。饲料在产品保质期内使用，应清洁干净、新鲜、无杂质、无异味、无霉变、无发酵、无虫蛀及鼠咬。每日采用定时定量方式饲喂。幼猫或猫体弱时可适当加喂羊乳。建议正常日饲喂量见表3。

表3 每日饲喂量

猫	月龄	日定量 (g)
幼猫	2~4	30~70
	4~6	60~80
哺乳期猫	前期	160~200
	后期	200~300
成年猫	-	80~100

6.2 饮水

动物饮水应符合GB 14925饮水的要求。

6.3 垫料

成年实验用猫一般不需垫料，对于幼猫等特殊情况需要垫料时，垫料的材质应符合猫的生理、健康和福利要求，应满足吸湿性好、尘埃少、无异味、无毒性、无油脂、耐高温、耐高压等条件，不宜使用刨花。

6.4 消毒灭菌

进入屏障环境的饲料、垫料、饮水等应经消毒灭菌处理。

6.5 卫生管理

应保持猫舍及周边环境清洁，及时清扫并更换垫料，定期消毒并清洗饲料盒、饮水盆、笼具。

7 实验用猫质量管理

7.1 微生物与寄生虫学等级

按微生物、寄生虫控制等级分类分为普通级和无特定病原体级。

7.2 检测指标和项目

7.2.1 临床检查

实验用猫临床检查应无异常。

7.2.2 检测项目

实验用猫微生物及寄生虫检测项目见表4。

表 4 实验用猫微生物及寄生虫检测项目

动物等级	检测项目	检测要求	
普通级	狂犬病毒 <i>Rabies virus</i>	△	
	猫泛白细胞减少症病毒 <i>Feline panleukopenia virus</i>	△	
	猫疱疹病毒 I 型 <i>Feline herpesvirus type 1</i>	△	
	猫杯状病毒 <i>Feline calicivirus</i>	△	
	沙门氏菌 <i>Salmonella spp.</i>	●	
	皮肤病原真菌 <i>Pathogenic dermal fungi</i>	○	
	体外寄生虫 <i>Ectoparasites</i>	●	
	弓形虫 <i>Toxoplasma gondii</i>	●	
	无特定病原体级	猫传染性腹膜炎病毒 <i>Feline infectious peritonitis virus</i>	●
		猫免疫缺陷病毒 <i>Feline immunodeficiency virus</i>	●
		猫肠道冠状病毒 <i>Feline enteric coronavirus</i>	○
		猫白血病病毒 <i>Feline leukemia virus</i>	○
		巴尔通体 <i>Bartonella</i>	●
		支气管败血波氏杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	●
多杀巴斯德杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>		●	
小肠结肠炎耶尔森菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>		○	
衣原体 <i>Chlamydia</i>		○	
空肠弯曲杆菌 <i>Campylobacter jejuni</i>		○	
螺杆菌 <i>Helicobacter</i>		○	
乙型溶血性链球菌 <i>βhemolytic Streptococcus</i>		○	
蠕虫 <i>Helminths</i>		●	
鞭毛虫 <i>Flagellates</i>		○	
球虫 <i>Coccidian</i>	○		
<p>注1：△必须检测，普通级可以免疫，无特定病原体级不能免疫；</p> <p>注2：●必须检测，要求阴性；</p> <p>注3：○必要时检测。</p> <p>注4：必须检测项目：指在进行实验动物质量评价、等级确定时必须进行的项目。</p> <p>注5：必要时检测项目：指相关行政部门要求时、本病流行时、进出口时，或特殊实验要求时需要检测的项目。</p>			

7.3 检测程序

检测程序见图 1。

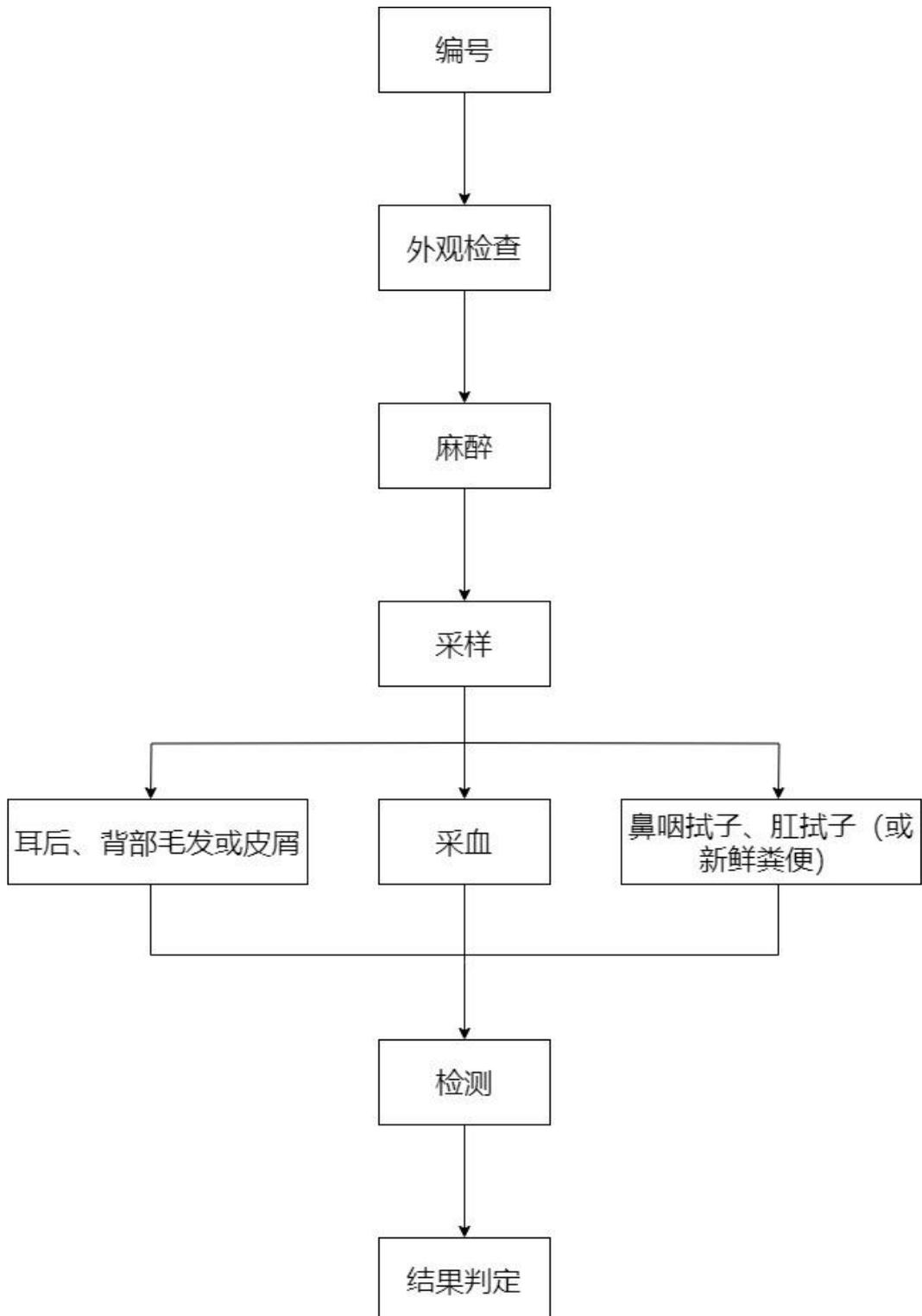


图 1 检测程序

7.4 检测方法

实验用猫微生物和寄生虫的检测方法见表 5。

表 5 实验用猫微生物和寄生虫的检测方法

检测项目	推荐检测方法	适用范围
狂犬病毒	GB/T 14926. 56	抗体检测
猫泛白细胞减少症病毒	附录A	抗原检测、核酸检测
猫疱疹病毒I型	附录B	抗原检测、核酸检测
猫杯状病毒	附录C	抗原检测、核酸检测
沙门氏菌	GB/T 14926. 1	培养鉴定
皮肤病原真菌	GB/T 14926. 4	培养鉴定
体外寄生虫	GB/T 18448. 1	镜检、肉眼观察
弓形虫	GB/T 18448. 2	抗体检测、核酸检测
猫传染性腹膜炎病毒	附录D	核酸检测
猫免疫缺陷病毒	附录E	核酸检测
猫肠道冠状病毒	附录F	核酸检测
猫白血病病毒	附录G	核酸检测
巴尔通体	附录H	核酸检测
支气管败血波氏杆菌	GB/T 14926. 6	培养鉴定
多杀巴斯德杆菌	GB/T 14926. 5	培养鉴定
小肠结肠炎耶尔森菌	GB/T 14926. 3	培养鉴定
衣原体	GB/T 14926. 8	培养鉴定
空肠弯曲杆菌	GB/T 14926. 49	培养鉴定
螺杆菌	SN/T 3724	培养鉴定
乙型溶血性链球菌	GB/T 14926. 16	培养鉴定
蠕虫	GB/T 18448. 6	镜检、肉眼观察
鞭毛虫	GB/T 18448. 10	镜检
球虫	GB/T 18647	镜检

注：表中排在第一位的检测方法为首选方法。

7.5 检测规则

7.5.1 检测频率

每 3 个月应至少检测 1 次。

7.5.2 取样要求

7.5.2.1 应选择3月龄以上的实验用猫。

7.5.2.2 根据实验用猫群体大小，取样数量见表6。

表6 取样数量

群体大小/只	取样数量
<100	不少于5只
100~500	不少于10只
>500	不少于15只

7.5.2.3 送检容器应按动物级别要求编号和标识，包装好，安全送达实验室，并附送检单，写明动物品种品系、等级、数量和检测项目。

7.5.3 采样方法应按照程序图进行。

7.6 结果判定

7.6.1 抗体检测

免疫项目，群体免疫合格率大于等于70%，应判定合格。

非免疫项目，抗体阴性，应判定为合格。

7.6.2 抗原或核酸检测

未见阳性结果，应判定为合格。

7.6.3 结果评价

在检测的各等级实验用猫中，如有某项指标不符合该等级指标，则判为不符合该等级。

8 动物实验管理

8.1 总体要求

动物实验管理参照 GB/T 35823 执行。

8.2 遵循实验动物福利伦理原则

8.2.1 使用实验动物应符合“替代、减少、优化”原则。

8.2.2 在不影响实验结果判定的情况下，尽可能减少动物的痛苦或缩短动物承受痛苦的时间。

8.2.3 在对实验动物进行手术或其他活体操作时，应进行有效的麻醉、镇静或止痛；动物处于手术后、患病等疼痛、痛苦状态时，应实施有效的止痛；处死实验动物时，应实施安死术。

8.2.4 使用合格的实验动物，保障人和动物的健康。

8.2.5 采取有效措施，保障动物处于舒适、健康、快乐等自然生活状态的五项自由，包括免于饥渴的自由，免于不适的自由，免于痛苦、伤害和疾病的自由，表达主要天性的自由，免于恐惧和焦虑的自由。

8.2.6 在生产、使用和运输过程中应当维护实验动物福利，关爱实验动物，不得虐待实验动物。

8.3 福利伦理审查

参照GB/T 35892等有关标准规定，对使用实验动物的必要性、合理性和规范性进行检查和审定。

8.4 麻醉、止痛和镇静

8.4.1 麻醉

8.4.1.1 麻醉剂主要分为注射麻醉剂和气体麻醉剂。注射麻醉剂适用于短期手术，气体麻醉剂适用于较长时间手术。使用气体麻醉剂前通常先使用注射麻醉剂诱导麻醉，再使用气体麻醉剂维持麻醉。气体麻醉不宜作为首选麻醉方式单独使用。

8.4.1.2 气体麻醉剂主要包括异氟烷（isoflurane）、七氟烷（sevoflurane）和氟烷（halothane）等，其中异氟烷最为常用。

8.4.1.3 常用注射麻醉剂包括戊巴比妥钠（pentobarbital sodium），乌拉坦（urethanum），氯胺酮（ketamine）、替雷他敏（tiletamine）等。

8.4.2 止痛

阿片类药物主要包括丁丙诺啡（buprenorphine）、布托啡诺（butorphanol）、吗啡（morphine）等。

8.4.3 镇静

镇静剂通常与阿片类药物联合使用，主要包括乙酰丙嗪（acepromazine），地西洋（diazepam）等。

8.5 安乐死

参照GB/T 39760规定执行。

9 动物运输

实验用猫运输条件应充分考虑动物安全性和舒适度，保证动物健康和福利。参照GB 14925动物运输规定执行。

10 废物处理

10.1 污水处理

设施应有相对独立的污水初级处理设备或化粪池。动物的粪尿、笼器具洗刷用水、废弃的消毒液、实验中废弃的试液等污水，应经处理并达到GB 8978二类一级标准要求后排放。感染动物实验室所产生的废水，应先经彻底灭菌后方可排出。

10.2 一般废物处理

废垫料应集中作无害化处理。一次性工作服、口罩、帽子、手套及实验废物等应进行无害化处理。注射针头、刀片等锐利物品应收集到利器盒中统一处理。

10.3 病理性废物处理

动物尸体及组织应装入生物安全袋中，临时存放于尸体冷藏柜（间）内，集中作无害化处理。感染性动物实验的动物尸体及组织须经高压灭菌后传出实验室再作进一步无害化处理。

10.4 感染性、放射性废物处理

感染性动物实验所产生的废物应先行高压灭菌后再作进一步无害化处理。放射性动物实验所产生放射性沾染废物应按GB 18871的规定和GBZ 133的要求处理。

附录 A (规范性)

实验用猫泛白细胞减少症病毒 PCR 检测方法

A.1 检测原理

猫泛白细胞减少症病毒又称猫细小病毒,属于细小病毒科、细小病毒属,是一种单股线状无囊膜 DNA 病毒,是猫的一种急性高度接触性传染病。临床表现多以突然发高热、顽固性呕吐、腹泻、脱水、循环障碍及白细胞急剧减少为主要特征,一般潜伏期 2~9 日。本方法通过对采集的猫血样病毒 DNA,进行 PCR 的检测,采用特异性引物进行 PCR 扩增,达到检测阴性实验用猫的目的。

A.2 检测样本

取部分实验用猫血液样品,按照 DNA 提取试剂盒的方法进行操作,提取的 DNA 于 -70℃ 保存、备用。

A.3 检测引物

针对 *vp2* 基因 (GeneBank: AF015223) :
上游引物序列 (5'-3') : AGTTCAACAAGATAAAAAGAC
下游引物序列 (5'-3') : TCCTGTATCTTGATGTGCTA

A.4 检测方法

样品处理时设置阳性对照和阴性对照,阳性对照已知阳性的同类样品或标准灭活毒株/质粒,阴性对照为灭菌蒸馏水。PCR 反应体系如下: DNA 模板 < 500ng, 上游引物 (10 μ M) 1 μ L, 下游引物 (10 μ M) 1 μ L, 2×Taq PCR MasterMix 10 ul, ddH₂O 补至 20 μ L。PCR 扩增程序如下: 95℃ 预变性 5min; 94℃ 30 s, 55℃ 30s, 72℃ 60s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

A.5 检测基因 PCR 产物大小

301bp。

A.6 结果评价

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

附录 B
(规范性)
实验用猫疱疹病毒 I 型 PCR 检测方法

B.1 检测原理

猫疱疹病毒 I 型简称 (FHV-1) 是猫疱疹病毒病的病原, 猫的疱疹病毒一般通过口鼻、眼结膜等途径感染猫。目前只有一种血清型被确认, 但其毒力在各病毒株之间有不同, 猫疱疹病毒于感染 24 小时之后开始排放病毒, 并持续 1~3 周, 急性发病会在 10~14 天内得到缓解, 有些则会形成上呼吸道及眼睛的慢性病灶。本方法通过对采集的猫呼吸道分泌物 DNA, 进行 PCR 的检测, 采用特异性引物进行 PCR 扩增, 达到检测阴性实验用猫的目的。

B.2 检测样本

取部分实验用猫呼吸道分泌物样品, 按照病毒DNA提取试剂盒的方法进行操作, 提取的DNA于-70℃保存、备用。

B.3 检测引物

针对tk基因 (GeneBank: FJ478159) :
上游引物序列 (5'-3') : ATACTGTCCGCATTTACATAGA
下游引物序列 (5'-3') : CGGTCTTGAGCGTCCC

B.4 检测方法

样品处理时设置阳性对照和阴性对照, 阳性对照已知阳性的同类样品或标准灭活毒株/质粒, 阴性对照为灭菌蒸馏水。PCR反应体系如下: DNA模板<500ng, 上游引物(10 μ M) 1 μ L, 下游引物(10 μ M) 1 μ L, 2×Taq PCR MasterMix 10 uL, ddH₂O补至20 μ L。PCR扩增程序如下: 95℃预变性5min; 94℃ 30 s, 54℃ 30s, 72℃ 60s, 共35个循环; 72℃延伸10min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

B.5 检测基因 PCR 产物大小

531bp。

B.6 结果评价

阳性对照出现531bp的目的片段, 阴性对照无条带, 实验判定成立: 待检样品出现531bp目的片段时, 判定猫疱疹病毒I型阳性; 未出现531bp目的片段时, 判定猫疱疹病毒I型阴性。

附录 C
(规范性)
实验用猫杯状病毒 RT-PCR 检测方法

C.1 检测原理

猫杯状病毒感染是猫病毒性呼吸道传染病，主要表现为上呼吸道症状，即精神沉郁、浆液性和粘液性鼻漏、结膜炎、口腔炎、气管炎、支气管炎，伴有双相热。猫杯状病毒感染是猫的多发病，发病率高，死亡率低。本方法通过对采集的猫鼻腔或口腔分泌物病毒 RNA，进行 PCR 的检测，采用特异性引物进行 PCR 扩增，达到检测阴性实验用猫的目的。

C.2 检测样本

取部分实验用猫鼻腔或口腔分泌物样品，按照病毒RNA提取试剂盒的方法进行操作，提取的RNA于-70℃保存、备用。反转录试剂盒对RNA进行反转录，制备cDNA。

C.3 检测引物

针对衣壳蛋白基因 (GeneBank: AY560117)
上游引物序列 (5'-3') : AACCTGCGCTAACGTGCTT
下游引物序列 (5'-3') : CAGTGACAATACACCCAGAA

C.4 检测方法

样品处理时设置阳性对照和阴性对照，阳性对照已知阳性的同类样品或标准灭活毒株/质粒，阴性对照为灭菌蒸馏水。PCR反应体系如下：cDNA模板<500ng, 上游引物(10 μ M)1 μ L, 下游引物(10 μ M)1 μ L, 2×Taq PCR MasterMix 10 ul, ddH₂O补至20 μ L。PCR扩增程序如下：95℃预变性5min; 94℃ 60 s, 55℃ 60s, 72℃ 60s, 共35个循环；72℃延伸10min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

C.5 检测基因 PCR 产物大小

926bp。

C.6 结果评价

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 (规范性)

实验用猫传染性腹膜炎病毒 RT-PCR 检测方法

D.1 检测原理

猫传染性腹膜炎病毒是一种慢性、渐进性、致死性传染病，主要感染 0.5~5 岁的猫，易感增强的纯种猫、多只猫混养及流浪猫更易感。病程可能是突发性或缓慢且持续数周。本方法通过对采集的猫胸腔积液、腹水病毒 RNA，进行 PCR 的检测，采用特异性引物进行 PCR 扩增，达到检测阴性实验用猫的目的。

D.2 检测样本

取部分实验用猫胸腔积液、腹水等样品，按照病毒 RNA 提取试剂盒的方法进行操作，提取的 RNA 于 -70℃ 保存、备用。反转录试剂盒对 RNA 进行反转录，制备 cDNA。

D.3 检测引物

针对靶基因 3'UTR 序列 (GeneBank: NC.002306)
上游引物序列 (5'-3') : GGCAACCCGATGTTTAAACTGG
下游引物序列 (5'-3') : CACTAGATCCAGACGTTAGCTC

D.4 检测方法

样品处理时设置阳性对照和阴性对照，阳性对照已知阳性的同类样品或标准灭活毒株/质粒，阴性对照为灭菌蒸馏水。PCR 反应体系如下：cDNA 模板 < 500ng，上游引物 (10 μ M) 1 μ L，下游引物 (10 μ M) 1 μ L，2×Taq PCR MasterMix 10 uL，ddH₂O 补至 20 μ L。PCR 扩增程序如下：95℃ 预变性 5min；95℃ 30 s，55℃ 30s，72℃ 30s，共 35 个循环；72℃ 延伸 10min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

D.5 检测基因 PCR 产物大小

223bp。

D.6 结果评价

阳性对照出现 223bp 的目的片段，阴性对照无条带，实验判定成立：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 E (规范性)

实验用猫免疫缺陷病毒荧光 PCR 检测方法

E.1 检测原理

猫免疫缺陷病毒病于 1987 年发现,属于反转录病毒科慢病毒属,受到感染的猫会罹患猫后天免疫缺乏综合症,俗称猫艾滋病。本方法通过对采集的猫血样病毒 RNA,进行荧光 PCR 的检测,采用特异性引物进行扩增,达到检测阴性实验用猫的目的。

E.2 检测样本

取部分实验用猫血液样品,按照病毒RNA提取试剂盒的方法进行操作,提取的RNA于-70℃保存、备用。反转录试剂盒对RNA进行反转录,制备cDNA。

E.3 荧光 PCR 检测引物及探针

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

下游引物序列(5'-3'): TTGGGTCAAGTGCTACATATTG

探针(5'-3'): (FAM) TATGCCTGTGGAGGCCTTCCT (TAMRA)

E.4 检测方法

样品处理时设置阳性对照和阴性对照,阳性对照已知阳性的同类样品或标准灭活毒株/质粒,阴性对照为灭菌蒸馏水。PCR反应体系如下: cDNA模板<500ng,上游引物(10 μ M)2.5 μ L,下游引物(10 μ M)2.5 μ L, 2×Mix buffer 25 uL,探针(10 μ M)0.5 uL, ddH₂O补至50 μ L。荧光PCR扩增程序如下: 95℃预变性3min;95℃ 30 s,64℃ 30s,共5个循环;85℃ 30s,64℃ 60s(采集荧光信号),共40个循环。

E.5 结果评价

阳性对照Ct值≤35,有明显的荧光扩增曲线,阴性对照无Ct值,且无荧光扩增曲线,实验判定成立:待检样品出现荧光扩增曲线,且Ct值≤35,判定猫免疫缺陷病毒阳性;待检样品无荧光扩增曲线,且Ct值>35时,判定猫免疫缺陷病毒阴性。

附录 F
(规范性)
实验用猫肠道冠状病毒 RT-PCR 检测方法

F.1 检测原理

猫肠道冠状病毒病是由肠道冠状病毒引起的猫的一种肠道传播病,属于冠状病毒科。主要引起低日龄幼猫患肠炎。本方法通过对采集的猫血液、肠拭子、或者胸腹水病毒 RNA,进行 PCR 的检测,采用特异性引物进行 PCR 扩增,达到检测阴性实验用猫的目的。

F.2 检测样本

取部分实验用猫血液、肠拭子、或者胸腹水样品,按照病毒RNA提取试剂盒的方法进行操作,提取的RNA于-70℃保存、备用。反转录试剂盒对RNA进行反转录,制备cDNA。

F.3 PCR 检测引物及探针

针对S基因序列 (GeneBank: X80799) :
上游引物序列 (5'-3') : TGCTATTAGTAAGTGGGGCC
下游引物序列 (5'-3') : ATAACCGCTACGCTTCATAC

F.4 检测方法

样品处理时设置阳性对照和阴性对照,阳性对照已知阳性的同类样品或标准灭活毒株/质粒,阴性对照为灭菌蒸馏水。PCR反应体系如下: cDNA模板<500ng,上游引物(10 μ M)2.5 μ L,下游引物(10 μ M)2.5 μ L, 2×Mix buffer 25 ul, ddH₂O补至50 μ L。PCR扩增程序如下: 95℃ 预变性5min;94℃ 45 s, 52℃ 45s, 72℃ 90s, 共30个循环; 72℃ 延伸10min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

F.5 检测基因 PCR 产物大小

366bp。

F.5 结果评价

阳性对照出现366bp的目的片段,阴性对照无条带,实验判定成立:待检样品出现366bp目的片段时,判定猫肠道冠状病毒阳性;未出现366bp目的片段时,判定猫肠道冠状病毒阴性。

附录 G
(规范性)
实验用猫白血病病毒荧光 PCR 检测方法

G.1 检测原理

猫白血病是猫常见的非创伤性致死疾病，是由猫白血病病毒和猫肉瘤病毒引起的恶性肿瘤性传染病。主要特征是恶性淋巴瘤、骨髓性白血病以及变性性胸腺萎缩和非再生性贫血等，其中对猫最严重的是恶性淋巴瘤，幼猫易感性高。本方法通过对采集的猫血样病毒 RNA，进行荧光 PCR 的检测，采用特异性引物进行 PCR 扩增，达到检测阴性实验用猫的目的。

G.2 检测样本

取部分实验用猫血液样品，按照病毒RNA提取试剂盒的方法进行操作，提取的RNA于-70℃保存、备用。反转录试剂盒对RNA进行反转录，制备cDNA。

G.3 荧光 PCR 检测引物及探针

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

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

MGB探针(5'-3') : (FAM) CTGTGCCGCATTAAAA (NFQ)

G.4 检测方法

样品处理时设置阳性对照和阴性对照，阳性对照已知阳性的同类样品或标准灭活毒株/质粒，阴性对照为灭菌蒸馏水。PCR反应体系如下：cDNA模板<500ng, 上游引物(10 μ M)1 μ L，下游引物(10 μ M)1 μ L，2×Mix buffer 10 ul，探针(10 μ M)0.2 μ L，ddH₂O补至20 μ L。PCR扩增程序如下：50℃ 2min，95℃预变性10min;95℃ 15 s,60℃ 60s（采集荧光信号），共40个循环。

G.5 结果评价

阳性对照Ct值≤35, 有明显的荧光扩增曲线, 阴性对照无Ct值, 且无荧光扩增曲线, 实验判定成立: 待检样品出现荧光扩增曲线, 且Ct值≤35, 判定猫白血病病毒阳性; 待检样品无荧光扩增曲线, 且Ct值>35时, 判定猫白血病病毒阴性。

附录 H
(规范性)
实验用猫巴尔通体荧光 PCR 检测方法

H.1 检测原理

猫血巴尔通氏体病是由巴尔氏通体（介于细菌和立克次体之间的一种微生物）引起的一种在血液中增殖的微生物所引起的以贫血为特征的疾病。本病又称猫传染性贫血。本方法通过对采集的猫血样 DNA，进行荧光 PCR 的检测，采用特异性引物进行荧光 PCR 扩增，达到检测阴性实验用猫的目的。

H.2 检测样本

取部分实验用猫血液样品，按照DNA提取试剂盒的方法进行操作，提取的DNA于-70℃保存、备用。

H.3 荧光 PCR 检测引物及探针

上游引物序列(5'-3') :GGTCATATTGATGGTTTGGCTGAGA
下游引物序列(5'-3') :GGTATAAAACGCTTTGGTACTTGTAGGA
MGB探针(5'-3') : (FAM) CACCTTCGCTTTTCTG (NFQ)

H.4 检测方法

样品处理时设置阳性对照和阴性对照，阳性对照已知阳性的同类样品或标准灭活毒株/质粒，阴性对照为灭菌蒸馏水。PCR反应体系如下：DNA模板<500ng，上游引物(10 μ M)0.4 μ L，下游引物(10 μ M)0.4 μ L，2×Mix buffer 10 ul，探针(10 μ M)0.2 μ L，ddH₂O补至20 μ L。PCR扩增程序如下：50℃ 2min，95℃ 预变性10min；95℃ 15 s，60℃ 60s（采集荧光信号），共40个循环。

H.5 结果评价

阳性对照Ct值≤35，有明显的荧光扩增曲线，阴性对照无Ct值，且无荧光扩增曲线，实验判定成立；待检样品出现荧光扩增曲线，且Ct值≤35，判定猫巴尔通体阳性；待检样品无荧光扩增曲线，且Ct值>35时，判定猫巴尔通体阴性。