

实验动物 猫微生物等级与监测



2021 - 07 - 20 发布

2021 - 10 - 20 实施

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 等级分类..... 1

5 检测要求..... 1

6 检测程序..... 2

7 检测规则..... 3

8 检测方法..... 4

9 结果判定..... 4

10 报告..... 5

附录 A（规范性） 猫泛白细胞减少症病毒和猫疱疹病毒 I 型的多重 PCR 检测方法..... 6

附录 B（规范性） 猫杯状病毒 RT-PCR 检测方法..... 7

附录 C（规范性） 猫血巴尔通体 PCR 检测方法..... 8

附录 D（规范性） 猫传染性腹膜炎病毒巢式 RT-PCR 检测方法..... 9

附录 E（规范性） 猫免疫缺陷病毒巢式 RT-PCR 检测方法..... 10

附录 F（规范性） 猫白血病病毒巢式 RT-PCR 检测方法..... 11

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。

本文件由山西省科学技术厅提出、归口并监督实施。

本文件起草单位：山西医科大学。

本文件主要起草人：宋国华、轩瑞晶、陈朝阳、高继萍、刘茂林、续国强、王晓堂、肖兰飞。



实验动物 猫微生物等级与监测

1 范围

本文件规定了实验动物 猫（以下简称实验猫）微生物等级与监测的术语和定义、等级分类、检测要求、检测程序、检测规则、检测方法、结果判定及报告。

本文件适用于普通级和SPF级实验猫微生物等级与监测。

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 14926.1 实验动物 沙门菌检测方法
- GB/T 14926.4 实验动物 皮肤病原真菌检测方法
- GB/T 14926.14 实验动物 金黄色葡萄球菌检测方法
- GB/T 14926.46 实验动物 钩端螺旋体检测方法
- GB/T 14926.56 实验动物 狂犬病病毒检测方法
- NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验猫 experimental feline

经人工饲育，对其携带的病原微生物和寄生虫实行控制，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

普通级猫 conventional (CV) feline

不携带重要人兽共患病和猫烈性传染病病原的实验猫，简称普通猫。

3.3

无特定病原体级猫 specific pathogen free (SPF) feline

除普通级猫应排除的病原外，不携带所主要潜在感染或条件致病和对科学实验干扰大的病原的实验猫，简称无特定病原体猫。

4 等级分类

实验猫分为普通级与无特定病原体级。

5 检测要求

5.1 临床观察

对实验猫的精神状态、行为、被毛、分泌物进行检查，观察有无异常。

5.2 微生物检测项目

各等级实验猫病原微生物指标见表 1。

表 1 各等级实验猫微生物检测项目

动物等级		病原微生物检测项目	检测要求
无特定病原体级	普通级	猫泛白细胞减少症病毒 Feline panleukopenia virus	●
		猫疱疹病毒 I 型 Feline herpesvirus type 1	●
		猫杯状病毒 Feline calicivirus	●
		猫狂犬病毒 Feline rabies virus	●
		沙门菌 Salmonella spp.	●
		猫巴尔通体 Bartonella	●
		致病性钩端螺旋体 Leptospira	●
		皮肤病原真菌 Pathogenic dermal fungi	○
	高级	猫传染性腹膜炎病毒 Feline infectious peritonitis virus	●
		金黄色葡萄球菌 Staphylococcus aureus	●
		猫免疫缺陷病毒 Feline immunodeficiency virus	○
		猫白血病病毒 Feline leukemia virus	○

注：●必须检测项目；○必要时检查项目。

5.3 检测项目分类

微生物检测项目分为必须检测项目和必要时检查项目。必须检测项目是指在进行实验猫质量评价时必须检测的项目。必要时检查项目是指从省外或国外引进实验猫，怀疑有寄生虫流行感染或申请生产许可证或实验特殊需要时必须检测的项目。

6 检测程序

检测程序按图 1 执行。在采样时，结合临床症状和实验室检查结果，需要进一步确证的，可取特定样本进行检测。

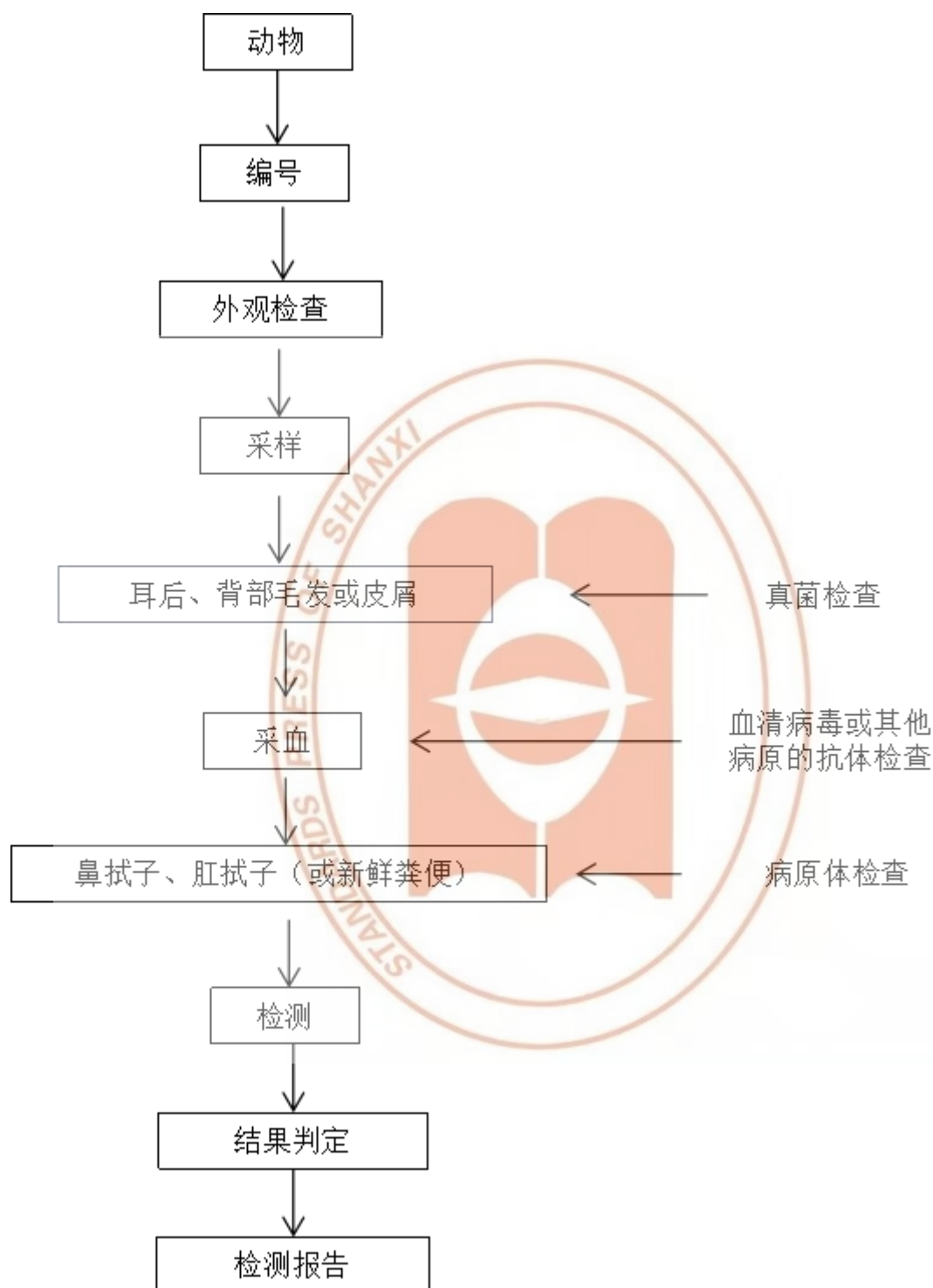


图1 检测程序

7 检测规则

7.1 检测频率

普通级与无特定病原体级猫群至少每 6 个月检测 1 次。

7.2 采样

7.2.1 方式

选择成年实验猫用于检测（也可根据需求抽样），随机抽样。新鲜粪便样本应在饲养单元中选取至少 4 个点随机取样。血液采样量每只动物至少 1mL。

7.2.2 数量

根据实验猫群体大小，抽样数量见表 2。

表 2 实验猫抽样量

群体大小（只）	抽样数量
小于100	不少于5只
100～500	不少于10只
大于500	不少于15只

7.2.3 方法

采样方法遵守 NY/T 541 第 3 章样品的采集。受检动物应当日采样，可按病毒、细菌、真菌及寄生虫检测要求联合采样。

7.3 送检要求

样本要求有明显标识，包装完好，送检单应写明检品名称、品系、等级、数量及检测项目等内容，安全送达送检单位。

8 检测方法

- 8.1 猫泛白细胞减少症病毒和猫疱疹病毒 I 型采用多重 PCR 方法检测，见附录 A。
- 8.2 猫杯状病毒采用 RT-PCR 方法检测，见附录 B。
- 8.3 狂犬病病毒按 GB/T 14926.56 的规定进行。
- 8.4 沙门氏菌按 GB/T 14926.1 的规定进行。
- 8.5 猫巴尔通体采用 PCR 方法检测，见附录 C。
- 8.6 钩端螺旋体按 GB/T 14926.46 的规定进行。
- 8.7 皮肤病原真菌按 GB/T 14926.4 的规定进行。
- 8.8 猫传染性腹膜炎病毒采用巢式 RT-PCR 方法检测，见附录 D。
- 8.9 金黄色葡萄球菌按 GB/T 14926.14 的规定进行。
- 8.10 猫免疫缺陷病毒采用巢式 RT-PCR 方法检测，见附录 E。
- 8.11 猫白血病病毒采用巢式 RT-PCR 方法检测，见附录 F。

9 结果判定

在检测的各等级动物中，如有某项指标不符合该等级标准指标要求，则判为不符合该等级标准。

10 报告

检测结束出具报告，报告应包括检测结果、检验结论等内容。



附录 A

(规范性)

猫泛白细胞减少症病毒和猫疱疹病毒 I 型的多重 PCR 检测方法

采用 PCR 方法,特异性扩增猫泛白细胞减少症病毒(FPV)的 NS 基因序列和猫疱疹病毒 I 型(FHV-I)的 TK 基因序列,用于猫泛白细胞减少症病毒和猫疱疹病毒 I 型的检测。

A.1 病毒 DNA 的提取

按照病毒 DNA 提取试剂盒操作方法进行,提取的 DNA 于-20℃保存备用。

A.2 PCR 反应引物

A.2.1 猫泛白细胞减少症病毒PCR反应引物

上游引物序列(5'-3') : ATGGTTGGTGACTCTTTGTTT

下游引物序列(5'-3') : TACATTGATTGACACTCCC

A.2.2 猫疱疹病毒I型PCR反应引物

上游引物序列(5'-3') : GACGTGGTGAATTATCAG

下游引物序列(5'-3') : CAACTAGATTCCACCAGG

A.3 PCR 反应条件

94℃变性 5min; 94℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 1min, 30 个循环; 72℃延伸 10min。

A.4 PCR 产物

A.4.1 检测方法

1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

A.4.2 产物大小

猫泛白细胞减少症病毒目的片段大小为 392 bp; 猫疱疹病毒I型目的片段大小为 290 bp。

附 录 B
(规范性)
猫杯状病毒 RT-PCR 检测方法

采用 PCR 方法，特异性扩增猫杯状病毒（FCV）的 ORF2 基因序列，用于猫杯状病毒的检测。

B.1 病毒 RNA 提取

按照病毒 RNA 提取试剂盒操作方法进行，提取的 RNA 于-20℃保存备用。

B.2 反转录

使用反转录试剂盒对所提RNA进行反转录，制备cDNA。

B.3 PCR 反应引物

上游引物序列（5'-3'）：AACCTGCGCTAACGTGCTT

下游引物序列（5'-3'）：CAGTGACAATACACCCAGAA

B.4 PCR 反应条件

94℃预变性 5min；94℃变性 30s，55℃退火 30s，72℃延伸 1min，30 个循环；72℃延伸 10min。

B.5 PCR 产物

B.5.1 检测方法

1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

B.5.2 产物大小

猫杯状病毒目的片段大小为922 bp。

附 录 C
(规范性)
猫血巴尔通体 PCR 检测方法

采用 PCR 方法，特异性扩增猫血巴尔通体 16S rDNA 基因片段，用于猫血巴尔通体的检测。

C.1 DNA 提取

按照 DNA 提取试剂盒操作方法进行，提取的 DNA 于-20℃保存备用。

C.2 PCR 反应引物

上游引物序列 (5'-3')：TCACAATGGACGAAAGTCTG

下游引物序列 (5'-3')：CCAAACATCTCAAGACACGAG

C.3 PCR 反应条件

95℃预变性 2min；95℃变性 15s，55℃退火 30s，72℃延伸 1min，35 个循环；72℃延伸 5min。

C.4 PCR 产物

C.4.1 检测方法

1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

C.4.2 产物大小

猫血巴尔通体目的片段大小为 711 bp。

附录 D

(规范性)

猫传染性腹膜炎病毒巢式 RT-PCR 检测方法

采用 RT-PCR 方法，特异性扩增猫传染性腹膜炎病毒 ORF1b 基因片段，用于猫传染性腹膜炎病毒的检测。

D.1 病毒 RNA 提取

按照病毒 RNA 提取试剂盒操作方法进行，提取的 RNA 于-20℃保存备用。

D.2 反转录

使用反转录试剂盒对所提RNA进行反转录，制备cDNA。

D.3 PCR 反应引物

上游引物序列 (5' -3')：GTGATGCTATCATGACTAG

下游引物序列 (5' -3')：CAGTGACAATACACCCAGAA

D.4 PCR 反应条件

95℃预变性 2min；95℃变性 30s，48℃退火 35s，72℃延伸 45s，30 个循环；72℃延伸 5min。

D.5 PCR 产物

D.5.1 检测方法

1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

D.5.2 产物大小

猫传染性腹膜炎病毒目的片段大小为 417 bp。

附录 E

(规范性)

猫免疫缺陷病毒巢式 RT-PCR 检测方法

采用巢式 RT-PCR 方法，特异性扩增猫免疫缺陷病毒 pol 基因片段，用于猫免疫缺陷病毒的检测。

E.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-20℃保存备用。

E.2 反转录

使用反转录试剂盒对所提RNA进行反转录，制备cDNA。

E.3 PCR 反应引物

E.3.1 第一次反应引物

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

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

E.3.2 第二次反应引物

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

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

E.4 PCR 反应条件

E.4.1 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 2min；95℃变性 45s，58℃退火 30s，72℃延伸 1min，35 个循环；72℃延伸 7min。

E.4.2 第二次PCR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 2min；95℃变性 45s，58℃退火 30s，72℃延伸 1min，35 个循环；72℃延伸 7min。

E.5 PCR 产物

E.5.1 检测方法

1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

E.5.2 产物大小

猫免疫缺陷病毒目的片段大小为 578 bp。

附录 F

(规范性)

猫白血病病毒巢式 RT-PCR 检测方法

采用巢式 RT-PCR 方法，特异性扩增猫白血病病毒基因片段，用于猫白血病病毒的检测。

F.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-20℃保存、备用。

F.2 反转录

使用反转录试剂盒对所提RNA进行反转录，制备cDNA。

F.3 PCR 反应引物

F.3.1 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

F.3.2 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

F.4 PCR 反应条件

F.4.1 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 2min；95℃变性 45s，58℃退火 30s，72℃延伸 1min，35 个循环；72℃延伸 7min。

F.4.2 第二次PCR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 2min；95℃变性 45s，58℃退火 30s，72℃延伸 1min，35 个循环；72℃延伸 7min。

F.5 PCR 产物

F.5.1 检测方法

1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

F.5.2 产物大小

猫白血病病毒目的片段大小为 601 bp。