ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X19—2020

猫冠状病毒免疫组织化学检测方法

Immunohistochemical method for detection of Feline Coronaviruses

（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

中国兽医协会
CVMA

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - 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：青岛农业大学动物医学院，
本标准主要起草人：单虎，秦志华，郭沛，倪彬砚，张洪亮。

中国兽医协会
CVMA

猫冠状病毒免疫组织化学检测方法

1 范围

本标准规定了猫冠状病毒的免疫组织化学检测方法，包括缩略语、材料、操作步骤和结果判定。

本标准适用于猫冠状病毒的实验室诊断。

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

GB/T 14926.55-2001　实验动物 免疫酶组织化学法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 猫冠状病毒病 Feline Coronaviruses Disease

是由冠状病毒科冠状病毒属猫传染性腹膜炎病毒引起的猫科动物的慢性进行性传染病，以腹膜炎、大量腹水积聚和致死率较高为特征。

3.2 猫冠状病毒 Feline Coronaviruses，FCoV

在分类上属于冠状病毒科冠状病毒属，猫冠状病毒(FCoV)又分为猫肠道冠状病毒(Feline enteric coronavims，FECV)和猫传染性腹膜炎病毒(Feline Infectious Coronavirus，FIPV)。为单股正链不分节段的 RNA 病毒，病毒粒子呈多形性，大小为 90--100nm，呈螺旋状对称。有囊膜，囊膜表面有长约 15--20nm 的花瓣状纤突，突起基部较窄，顶部较宽。在电子显微镜下呈日冕或皇冠状，因此命名为冠状病毒。

3.3 RT-PCR 检测 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

是将 RNA 的反转录（RT）和 cDNA 的聚合酶链式扩增（PCR）相结合的技术。

3.4 免疫组织化学法 immunohistochemistry

是通过标记抗体与特异性抗原反应显色的组织化学法。

4 材料

4.1 仪器设备

4.1.1 微量移液器：0.1-2.5uL，0.5-10uL，1-100uL，100-1000uL

4.1.2 石蜡切片机或冷冻切片机

4.1.3 冰箱

4.1.4 培养箱

4.1.5 显微镜

4.2 耗材：载玻片；盖玻片

4.3 试剂：丙酮；胰蛋白酶（0.5%）（配方见附录 A.1）；5%新生牛血清；PBS 溶液（配方见附录 A.2）；乙醇溶液；石蜡；标准阳性血清（鼠抗猫冠状病毒单克隆抗体）；标准阴性血清（无 FCoV 感染的猫血清）底物溶液（配方见附录 A.3）。

5 实验操作

5.1 样品采集和处理

对疑似 FCoV 的病猫开腹探查或细针穿刺取样，取样部位可为浆膜、肾脏、肠系膜淋巴结、脑、眼、肝脏、脾和肺等组织，置冰瓶中立即送检。不能立即送检时，将组织切成小组织块，置于体积分数为10%的福尔马林溶液中固定，保存，送检。

5.2 操作方法

（1）新鲜组织或固定组织按常规方法制备石蜡切片，常规脱蜡至 PBS（切片应用白胶或铬矾明做粘合剂，以防脱片）。

（2）去内源酶：用 0.3%过氧化氢甲醇溶液或 1%盐酸酒精 37℃作用 30min。

（3）胰蛋白酶消化：室温下，胰蛋白酶消化处理 2min，以便充分暴露抗原。

（4）漂洗：PBS 洗 3 次，每次 5min。

（5）封闭：5%小牛血清或 1:10 稀释的正常马血清，37℃湿盒中作用 30min。

（6）加 10 倍稀释的鼠抗猫冠状病毒单克隆抗体和阴性血清，37℃湿盒中孵育 1h 或 37℃湿盒中孵育 30min 后 4℃过夜。

中国兽医协会 CVMA

（7）漂洗： PBS 洗 3 次，每次 5min。

（8）加 1:100 的第二抗体酶结合物，37℃湿盒汇总孵育 1h。

（9）漂洗： PBS 洗 3 次，每次 5min。

（10）底物显色：新鲜配置的底物溶液显色 5~10min 后漂洗。

（11）从 90%乙醇开始脱水、透明、封片，普通光学显微镜观察。

（12）试验同时设置阳性、阴性血清对照。

6. 结果判定

（1）被检组织与阴性血清作用后应无着染，若出现黄色或棕褐色着染，则判定阴性对照不成立，应重复试验。

（2）在符合（1）的条件下，被检组织与 FCoV 阳性血清作用后本底清晰，细胞浆内呈现黄色或棕褐色着染，则判为 FCoV 阳性，相应动物猫冠状病毒感染阳性。

中国兽医协会
CVMA

附　录　A

（规范性附录）

溶液的配制

A.1 胰蛋白酶溶液（0.5%）

胰蛋白酶	0.5g
PBS	100mL

低温保存。使用时，用 PBS 稀释成 0.05%。

A.2 PBS 缓冲液（磷酸盐缓冲溶液）

称取 NaCl 8.0g、KCl 0.2g、KH_2PO_4 0.2g、$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.83g，加水定容至 1000mL，4℃保存备用。

A.3 底物溶液

3,3-二氨基联苯胺盐酸盐（DAB）	40mg
PBS	100mL
丙酮	5mL
30%过氧化氢	0.1mL

滤纸过滤后使用，先用现配。

中国兽医协会 CVMA

参考文献

[1] Pratelli, A. Comparison of Serologic Techniques for the Detection of Antibodies against Feline Coronaviruses[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2008, 20(1):45-50

[2] Tasker, Séverine. Diagnosis of feline infectious peritonitis: Update on evidence supporting available tests[J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2018, 20(3):228-243

[3] G. Tekes, H.-J. Thiel. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis[J]. Advances in Virus Research, 2016, 96:193

[4] Addie, D. D , le, et al. Utility of feline coronavirus antibody tests[J]. Journal of Feline Medicine & Surgery, 2015.

[5] 刘一楠,陈奕熹,汪刚,毛军福,彭贵清..传染性腹膜炎诊断研究进展[J].中国动物传染病学报，2020.

[6] 李凯年，孟丹，孟昱．猫冠状病毒感染及其诊断方法的研究进展[J]．中国动物保健, 2010(11):56-59

[7] 猫冠状病毒和猫传染性腹膜炎病毒RT-PCR检测方法的建立[J]．畜牧与兽医(11):32-34.

[8] 朱萌，周媛，李志赛, et al．猫传染性腹膜炎的诊断与治疗[J]．中兽医医药杂志, 2018, 037(003):65-66.

[9] 唐小娟，王姗，尹伊娅，et al．湖北省武汉市某门诊猫传染性腹膜炎病例统计分析[J]．中国动物检疫, 2019, 36(04):28-31.

[10] 王广龙，王勇，戴健涛，et al．猫传染性腹膜炎研究进展[J]．黑龙江畜牧兽医月刊，2018, 000(004):62-65,247.

[11] 蒋剑成，王志慧，张思瑶, et al．一例猫传染性腹膜炎的诊断报告[C]// 中国兽医病理学学术研讨会暨兽医病理学分会全国会员代表大会.

[12] 张智文.大连地区湿性猫传染性腹膜炎发病情况调查与病例分析[D].吉林:吉林农业大学,2019.

中国兽医协会 CVMA