

猫传染性腹膜炎病毒的 RTPCR 检测

罗成 梁秋菊 王恩恩 叶婷 李启焱

(深圳市刚竹医疗科技有限公司 广东深圳 518000)

摘要: 猫传染性腹膜炎病毒是一种常见的引起猫腹膜炎和败血症的疾病病原体。RT-PCR 技术是一种高度敏感和特异性的检测方法, 已被广泛用于猫传染性腹膜炎病毒的检测。该方法可以通过样本采集和处理、RNA 提取、RTPCR 反应体系制备和检测方法等步骤检测出病毒核酸, 具有高效、快速、准确等优点。然而, 该方法也存在着一些局限性, 如需要专业实验室和设备、技术操作要求高等。总之, 猫传染性腹膜炎病毒 RTPCR 检测是一种可靠的诊断方法, 对于及早发现和控制疾病传播具有重要意义。

关键词: 猫传染性腹膜炎病毒 RTPCR 检测

前言

猫传染性腹膜炎病毒 (Feline Infectious Peritonitis Virus, FIPV) 是一种引起猫传染性腹膜炎 (Feline Infectious Peritonitis, FIP) 和败血症的疾病病原体。该病毒在全球范围内广泛传播, 并且目前没有特效药物可用于治疗。RT-PCR 技术是一种高度敏感、特异和有效的检测方法, 已被广泛用于 FIPV 病毒核酸的检测。检测方法主要包括样本采集和处理、RNA 提取、RTPCR 反应体系制备和检测方法等步骤。其中, RNA 提取是整个检测过程中最关键的步骤之一, 通常使用商业化的 RNA 提取试剂盒进行 RNA 提取。该检测方法有许多优点, 如高效、快速、准确、操作简便等。同时, 也存在着一些局限性, 如需要专业实验室和设备、技术操作要求高、无法区分活体病毒和死体病毒等。RT-PCR 技术是一种可靠的 FIPV 诊断方法, 能够及早发现并控制疾病传播。

一、猫传染性腹膜炎病毒简介

猫传染性腹膜炎常见于幼猫和老年猫。该病毒在全球范围内广泛分布, 对家庭中的猫造成了威胁。FIPV 属于冠状病毒科, 具有很高的传染性。它通过唾液、鼻涕、眼泪等方式进行传播, 且能经由污染过的环境持久存活, 因此猫之间易相互感染。猫感染 FIPV 后, 最初的表现类似于普通感冒症状, 但病情会逐渐加重, 并导致发热、贫血、消瘦、腹水等症状。FIPV 的治疗十分困难, 目前尚无特效药物可以根治此病, 仅能对症治疗缓解症状, 大多数感染的猫最终都会死亡。为预防和控制猫传染性腹膜炎, 应注意环境卫生、猫的个人卫生和疫苗接种等方面。同时, 如果发现猫出现相关症状, 应及时到兽医诊所寻求帮助, 确诊后应隔离治疗以防止疾病扩散^[1]。

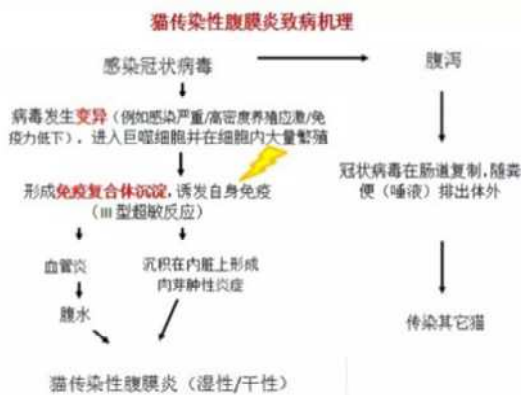


图1 猫传染性腹膜炎病毒流程

二、RTPCR 原理及特点

RTPCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) 是 PCR 技术的一种变体, 是一种利用逆转录酶将 RNA 转换为 cDNA, 并在

聚合酶链反应中扩增特定 DNA 序列的方法。其原理与 PCR 技术基本相同, 但在样品处理部分有所不同。

RTPCR 主要包括三个步骤: RNA 逆转录、cDNA 扩增和测序和鉴定。首先, 在样品中加入逆转录酶及引物, 通过逆转录作用将 RNA 转录成 cDNA。然后, 在 PCR 过程中, 利用引物将 cDNA 复制成大量的 DNA 片段。最后, 可以通过比较检测样品中扩增产物和阳性对照中的扩增产物来确定是否存在目标 DNA 或 RNA 序列。

RTPCR 技术具有以下几个优点: 可以检测低丰度的 RNA 或 DNA。可以快速高效地扩增目标序列。仅需要极少数量的起始 DNA 模板就能完成检测, 不需要纯化和扩增提取大量的模板 DNA。能够同时检测多个靶标, 在唯一的实验中获得多个结果。结果稳定可靠, 适用于现代医学和生命科学各个领域。虽然 RTPCR 技术非常强大, 但需要精确的实验室操作、指定的设备及引物设计和压制杂交机制等多重因素的影响。此外, 还需要对反应体系进行评估并建立 QSOP 或 SOP 等严格的操作规范。综上所述, RTPCR 作为一种高度敏感和特异性的检测方法, 在多个领域都得到了广泛的应用和推广^[2]。

表 1 RTPCR 原理及特点

特点	RTPCR 原理
灵敏度	灵敏度高, 能够检测到非常低浓度的病毒核酸
特异性	特异性强, 能够区分出不同种类的病毒
准确性	准确性高, 结果可靠, 误差极小
操作复杂度	操作相对复杂, 需要高度专业化的实验室和技术操作
时间成本	时间成本相对较高, 需要几个小时到两天不等
可靠性	结果稳定, 不易受到外界因素的影响
应用范围	广泛应用于新冠病毒、流感病毒等病毒核酸检测领域

以上为 RTPCR 技术的主要特点和其原理, 总体来说, RTPCR 技术是目前病毒核酸检测中使用最为广泛的技术之一, 其结果灵敏、准确、可靠, 同时需要专门的实验室和技术人员进行操作。

三、猫传染性腹膜炎病毒 RTPCR 检测方法

1. 样本采集与处理

猫传染性腹膜炎病毒 RTPCR 检测方法的样本采集与处理如下: 样本选择: 首先应当选择猫传染性腹膜炎的相关症状或曾与患有该疾病的猫共同居住过的猫作为检测的样本。样本采集: 可以采用口腔、鼻腔、肛门等部位的分泌物或组织进行检测。采集时应使用无菌棉签, 并尽可能避免正常细菌较多的地方。样本处理: 样本采集后应立即送至实验室进行处理。对于生物组织, 需要用 RNA 提取试剂盒或其他方法将 RNA 提取出来, 对于体液, 直接可以用去除 RNA 酶和 DNA 酶的缓冲液等方式直接处理来捕获转录本。逆

转录反应：将提取出的 RNA 反转录成为 cDNA，通常采用随机引物或特异性引物进行逆转录。逆转录反应可以通过 PCR 仪进行，基本上包括以下参数：25-42° C (10-60 分钟) RNase H、50-98° C (10-15 分钟) Denaturation、5° C 固化停止反应。PCR 扩增：建议使用早期检测引导 cDNA 的应力，做重放利用探针或 SYBR Green 等方法进行检测并分析特异性的 PCR 产物。

2. RNA 提取

猫传染性腹膜炎病毒 RTPCR 检测方法中的 RNA 提取步骤：第一、样本收集：从患有猫传染性腹膜炎病症或疑似受病毒感染猫的体内采集样品，如腹水、胸水、积液、组织、血液等。注意采集时要避免污染和异物干扰。第二、RNA 提取：将采集到的样品进行总 RNA 提取，选择合适的 RNA 提取试剂盒或其他 RNA 提取方法。在提取过程中应严格控制好细菌、RNA 酶以及其它外部 DNA/RNA 质量的混入以确保病原体的纯度和完整性。第三、存储：提取后得到的 RNA 可立即用于反转录 PCR 分析或冻存备用。一般情况下，为了保持 RNA 的稳定性和完整性，应在-80℃或液氮中保存。根据样品类型和 RNA 提取试剂盒的要求，具体的 RNA 提取步骤和细节可能会有所不同，建议在实验前详细阅读相关试剂盒说明书或寻求专业技术支持。

3. RTPCR 反应体系制备

准备 PCR 试剂：根据所选 PCR 方法和试剂盒的要求，配制 PCR 反应液。一般情况下，PCR 反应液由模板 DNA/RNA、引物、酶、缓冲液、dNTPs 等组成。

反转录体系制备：准备反转录反应液。反转录反应一般由 RNA 模板、逆转录酶、primers 等组成。为防止外源核酸污染，反转录过程可以使用 RNase inhibitors 来避免 RNA 降解。

混合制备的 PCR 反应液和反转录反应液。

视情况添加样品：将从样本中提取的 RNA 加入混有 PCR 反应液和反转录反应液的管中。样品应按照不同类型进行调整。

进行 PCR 声明：程序包括变性、退火和延伸周期。这三个程序是不断重复的，并在 PCR 仪中通过温度来控制酶的活性。

结束 PCR 声明后，PCR 产物可进行电泳或其它方式的检测。

总之，在进行 RTPCR 反应体系制备的过程中，需要控制好材料纯度、操作规范度和实验室卫生等多个方面的问题，以确保检测结果的可靠性和准确性。

表 2 猫传染性腹膜炎病毒 RTPCR 检测方法

检测方法	优点	缺点
实时荧光 PCR 检测法	灵敏度高，特异性好	对样本要求较高，容易受到样本污染影响，操作复杂
梯度 PCR 检测法	操作简单，成本低	灵敏度不如实时荧光 PCR 检测法
普通 PCR 检测法	操作简单，成本低	灵敏度较低，特异性不如实时荧光 PCR 检测法
磁珠快速分离 RTPCR 检测法	操作便捷，检测时间快	对样本要求较高，容易受到样本污染影响
内切酶限制性酶位点分析法	检测简单，灵敏度和特异性均较高	检测结果需要通过电泳分析，操作繁琐
嵌段 PCR 检测法	能够对扩增片段进行分析，可以用于测定病毒株的类型和亚型	操作繁琐，扩增引物的设计较为复杂

四、结果分析

1、常见的可能结果

阴性：取样的 FIPV RNA 没有在样本中被检测到，这意味着不会有 FIP 发生。

假阴性：样本处理不当、病毒载量较低或是技术问题等都可能导致 RTPCR 检测结果为阴性,但实际上猫已经携带 FIPV。

阳性：FIPV RNA 在样品中被检测到。这时要将其与病情和其他检查结果综合考虑，以做出最终诊断是否为猫传染性腹膜炎。

2、需要注意的事项

阳性检测并不能完全确定 FIP 的存在，因为猫也可能是处于 FIPV 感染过程中很早的时候，而此时 FIP 的临床表现还未显现出来。同时，对于阳性检测结果，必须结合其他诊断信息，如临床症状、血液学检查、病理检查等来综合判断是否真的发生了猫传染性腹膜炎。在进行 FIPV 的 RTPCR 检测结果分析时，应结合患猫的临床表现和其他辅助检查结果进行综合分析，以做出最终判断是否为猫传染性腹膜炎感染。

五、RTPCR 检测在猫传染性腹膜炎诊断中的应用

1、应用的优点

优点：高灵敏度：相对于其它检测手段，RTPCR 技术能够更快、更准确地检测到目标病毒核酸。特异性强：由于 PCR 反应仅特异性扩增 DNA 或 RNA 的特定片段，使得 RTPCR 方法被广泛使用。操作简便：相对于实验室内其它的诊断方法，RTPCR 技术所需耗材较少，且操作过程相对简单。快速检测出结果：与其它分子生物学方法不同，RTPCR 技术能够在短时间内提供可靠结果。

2、应用的缺点

缺点：所收集到的样本需求高：RTPCR 检测需要从患猫体内获得合适的样品如腹水、胸水、积液、组织等等，搜集难度相对较大，需要专业的人员进行操作，以免造成假阴性结果。对工具和设备有特殊要求：PCR 实验操作对实验器材和环境的质量要求较高，控制污染非常重要，实验者必须有足够的经验和按照严格的计划进行操作。无法判断活着的爆发：通过检测猫传染性腹膜炎病毒 (FIPV) 的 RNA 不能区分其它非感染状况引发肠胃和腹泻类疾病，因此必须与其他诊断方法结合使用。总之，RTPCR 技术是一种快速、灵敏、特异的 PCR 检测方法，优点明显，但也存在一定的缺陷。因此，在使用该技术时，需要注意样品收集质量、操作规范以及如何与其它诊断方法相结合等问题。

六、结语

RTPCR 是一种高效、快速、准确、可靠的检测方法，对于诊断猫传染性腹膜炎具有十分重要的临床意义。需要注意的是，RTPCR 检测结果应结合其他相关检查和临床表现，作出全面的诊断和治疗计划。在进行 FIPV 的 RTPCR 检测结果分析时，应结合患猫的临床表现和其他辅助检查结果进行综合分析，以做出最终判断是否为猫传染性腹膜炎感染。

参考文献：

[1]杨妮,韩佃刚,杨云庆等.猫传染性腹膜炎病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J].中国动物检疫,2022,39(10):127-131.

[2]王元红. 猫传染性腹膜炎病毒 HF1902 株分离鉴定及 SYBR Green 检测方法的建立[D].安徽农业大学,2020.DOI:10.26919/d.cnki.gannu.2020.000178.

作者简介：罗成 (1973 年 4 月) 男，汉族，四川资中，研究生，董事长，研究方向：动物病毒检测