



研究简报 RESEARCH NOTES

新型虎源猫杯状病毒 荧光定量PCR检测方法的建立及应用

梅 隐^{1#}, 高向向^{2#}, 刘诗云^{3#}, 吕梦娜^{4,5}, 刘敏婷^{4,5},
侯丽萍³, 李婉萍^{4,5}, 单 芬^{4,5}, 陈 武^{4,5}, 周 妞^{4,5*}

1. 广东省野生动物监测救护中心, 广州 510520;
2. 中国动物卫生与流行病学中心, 青岛 266032;
3. 广州大学, 广州 510006;
4. 广州动物园, 广州 510075;
5. 广州市野生动物研究中心, 广州 510075)

稿件运行过程

收稿日期: 2025-04-29

修回日期: 2025-08-17



关键词: 新型虎源猫杯状病毒;
华南虎;
荧光定量PCR;
大型猫科动物;
临床应用

Keywords: Novel feline calicivirus isolated from tiger;
South China tiger (*Panthera tigris amoyensis*);
Fluorescent quantitative PCR;
Large felids;
Clinical application

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2025)-04-0848-08

DOI: 10.12375/ysdwx.202504026

摘 要

在本团队前期研究中,通过宏病毒组学测序与生物信息学分析,从一例死亡华南虎(*Panthera tigris amoyensis*)组织病料中鉴定出一株新型虎源猫杯状病毒(Feline calicivirus isolated from tiger, TCaV),命名为LYH1224株。为实现对该病毒快速检测,基于TCaV LYH1224株基因组序列设计特异性引物,经反应体系与条件优化,构建了TCaV绝对荧光定量PCR检测方法,并开展了敏感性、特异性和重复性评估。同时,利用该方法对本实验室保存的大型猫科(Felidae)动物临床样品进行检测。结果显示:所建立的方法可特异性扩增新型TCaV基因序列;经优化,引物对4160S/4270A在最佳反应体系与程序下, C_t 值与标准品拷贝数浓度的对数呈现良好的线性关系,扩增效率(E)达101.8%,相关系数(R^2)为0.996,最低检测限为 2×10^4 拷贝/反应,且组内与组间重复试验变异系数(C_v)均小于2.50%;在大型猫科动物临床样品检测中,阳性样品检出率为7.59%(6/79),个体阳性率为2.82%(2/71),且2只阳性个体来自同一保育机构,证实新型TCaV已在华南虎种群中小范围传播。本研究建立的检测方法特异性强、灵敏度高,重复性和实用性佳,为我国大型猫科动物新型TCaV的快速检测和日常监测提供了有效工具。

基金项目: 广州国家实验室专项项目(GZNL2023A01001);广州动物园园立科研项目(YL202201)

第一作者简介: 梅隐(1997—),女,初级林业工程师;主要从事野生动物疫源疫病研究。E-mail:MY_meiyin@126.com

*共同第一作者: 梅隐;高向向;刘诗云

*通信作者: 周妞, E-mail:zhouniu@zju.edu.cn

Establishment and Application of a Fluorescent Quantitative PCR for the Novel Feline Calicivirus Isolated from Tiger

MEI Yin^{1#}, GAO Xiangxiang^{2#}, LIU Shiyun^{3#}, LÜ Mengna^{4,5}, LIU Minting^{4,5},
HOU Liping³, LI Wanping^{4,5}, SHAN Fen^{4,5}, CHEN Wu^{4,5}, ZHOU Niu^{4,5*}

(1. Guangdong Wildlife Monitoring and Rescue Center, Guangzhou 510520, China;

2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China;

3. Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;

4. Guangzhou Zoo, Guangzhou 510075, China;

5. Guangzhou Wildlife Research Center, Guangzhou 510075, China)

Abstract: In our previous research, a novel Feline calicivirus isolated from tiger (designated as the TCaV LYH1224 strain) was identified from the tissue samples of a dead South China tiger (*Panthera tigris amoyensis*) using metaviromic sequencing and bioinformatics analysis. In order to achieve the rapid detection of TCaV, specific primers were designed based on the genome sequence of LYH1224 strain. Then a fluorescent quantitative PCR method for TCaV was established after optimizing the reaction system and procedure, followed by an evaluation on its sensitivity, specificity and repeatability. Furthermore, the clinical samples of large felids (Felidae) preserved in our laboratory were detected. The results showed that the gene sequence of the novel TCaV could be specifically amplified by the established method. After optimization, a good linear relationship was shown between the C_t value and the logarithm of the concentration of the plasmid standards under the optimal reaction system and procedure when the primer pair 4160S/4270A was chosen, and the amplification efficiency (E) reached 101.8%, the correlation coefficient (R^2) was 0.996, the lowest detection limit was 2×10^1 copies/reaction, and the coefficients of variation (C_v) of both intra- and inter-group repeated tests were both less than 2.50%. For the detection of clinical samples of large felids, the detection rate of positive samples was 7.59% (6/79), the individual positive rate was 2.82% (2/71), and the two positive individuals were from the same conservation institution. Novel TCaV has been confirmed to be spreading within a small range of the South China tiger population. In conclusion, the established method would offer an effective tool for the detection and routine monitoring of the novel TCaV in large felids across China, owing to its strong specificity, high sensitivity, good reproducibility and practicality.

虎(*Panthera tigris*)是国家一级重点保护野生动物^[1],也是国家林业和草原局“十四五”规划中列出的12种“旗舰种、关键种”之一^[2],曾广泛分布于我国东北、华南、华中乃至新疆等地。华南虎(*P. t. amoyensis*)作为我国特有的虎亚种^[3],其种群的健康状况关乎物种延续。目前,尽管国内动物园及其他动物保育机构已保育了一定数量的虎,但在圈养或半圈养条件下,种群近交系数普遍偏高^[4],其生活环境、营养组成和机能状态与野生个体存在很大差异,使得疾病防控面临严峻挑战。

猫杯状病毒(Feline calicivirus, FCV)为杯状病毒科(Caliciviridae)水疱性病毒属(*Vesivirus*)成员^[5],

是引发猫科(Felidae)动物呼吸道疾病的重要病原体。感染FCV的猫通常表现为口腔疼痛性糜烂和轻度上呼吸道症状,严重时发展为致死性肺炎或突发性死亡^[6-8]。狮(*Panthera leo*)、猎豹(*Acinonyx jubatus*)和虎等大型猫科动物感染该病毒的情况也时有发生^[9-13]。尽管FCV的研究在家猫群体中已较为深入,但在大型猫科动物领域,相关研究主要集中于病原检测、分子生物学鉴定和致病性分析等方面^[11,13],而新型虎源猫杯状病毒(Feline calicivirus isolated from tiger, TCaV)的病毒特性、传播规律和防控治疗等关键信息仍有待填补^[14]。

荧光定量PCR技术凭借高灵敏度、强特异性和

精确定量等优势,已在病毒核酸检测领域被广泛应用^[15-16]。在前期研究中,本团队通过宏病毒组学高通量测序技术,首次从一例突发死亡的华南虎组织病料中鉴定出一株新型 TCaV 毒株,命名为 LYH1224。经 NCBI BLAST 比对,该毒株基因组与目前已知 FCV 序列的相似性最高,为 85.14%(未公开发表)。为实现对新型 TCaV 的快速、准确检测以及日常监控,本研究旨在建立一种绝对荧光定量 PCR 检测方法。

本研究围绕 TCaV LYH1224 株的基因组序列设计特异性引物,通过优化反应体系和条件,建立了荧光定量 PCR 检测方法,旨在填补大型猫科动物病毒学检测技术的空白,为华南虎等大型猫科动物的疫病防控提供关键技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

所用病原材料包括新型 TCaV (LYH1224 株)、

FCV、猫泛白细胞减少症病毒 (Feline panleukopenia virus, FPV)、猫冠状病毒 (Feline coronavirus, FCoV)、猫疱疹病毒 (Feline herpesvirus, FHV)、猫星状病毒 (Feline astrovirus, FeAstV) 和猫嶙病毒 (Feline kobuvirus, FeKoV) 等病料或病毒培养液。临床样本为 2019—2024 年采集自 71 只大型猫科动物的 79 份样本 (组织、血液或粪便等),物种包括东北虎 (*Panthera tigris altaica*)、华南虎、孟加拉虎 (*P. t. tigris*)、狮和豹 (*P. pardus*) 等,采集地区涵盖河南、山东、上海、湖南、广东和广西等地。病毒材料及临床样本均由广州动物园野生动物微生物实验室 (以下简称“本实验室”) 保存。

1.2 引物设计与合成

对经宏病毒组学测序拼接的基因序列,使用 Primer premier 5.0 软件设计 6 条特异性引物,并组合成 4 组引物对: 4158S/4270A、4160S/4270A、5074S/5269A 和 5074S/5290A (表 1),交由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

表 1 新型 TCaV 荧光定量 PCR 引物

Table 1 Fluorescent quantitative PCR primers for novel TCaV

引物名称 Primer name	上游引物 (5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物 (5'→3') Reverse primer (5'→3')	产物大小 /bp Product size
4158S/4270A	4158S: CCATTGTCATCTATGTAAGGGAGTC	4270A: TGGAAGCCAAAGCCGTA	113
4160S/4270A	4160S: ATTGTCATCTATGTAAGGGAGTC		111
5074S/5269A	5074S: CTCCAGCACGGATCACC	5269A: GCCATCAGAGCCGCATA	196
5074S/5290A		5290A: TCATTGGCAGGGCAGTT	217

1.3 质粒标准品制备

将较长的 4158S/4270A、5074S/5290A 引物对的 PCR 产物序列进行串联,送至北京擎科生物科技股份有限公司合成,然后把合成的序列连接至 pMD18-T 载体,并转化至 Top10 感受态细胞。将经测序验证正确的重组质粒命名为 p-TCaVq,并使用上述 4 组引物对进行 PCR 验证。使用质粒小提试剂盒抽提重组质粒,测定其纯度和浓度,当 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0 时,质粒纯度符合要求。根据质粒浓度计算其 DNA 拷贝数浓度,使用 ddH₂O 倍比稀释后,将其作为荧光定量 PCR 的质粒标准品。

1.4 荧光定量 PCR 反应体系与程序优化

以 p-TCaVq 质粒标准品为模板,使用 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 试剂,在 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪上进行反应条件优化。通过比

较不同引物终浓度 (0.4 μmol/L、0.5 μmol/L) 及不同退火时间 (30 s、45 s) 的组合,以确定最佳反应体系与程序。

1.5 标准曲线建立

以 10 倍倍比稀释的质粒标准品 (1 × 10¹ ~ 1 × 10⁹ 拷贝/μL) 为模板,使用优化后的荧光定量 PCR 体系和程序进行扩增,每个浓度梯度设置 2 个重复。以质粒标准品拷贝数浓度的对数为横坐标,检测得出的 C_t 值为纵坐标,绘制标准曲线。

1.6 灵敏度试验

以 10 倍倍比稀释的质粒标准品 (1 × 10⁰ ~ 1 × 10⁹ 拷贝/μL) 为模板,采用优化后的荧光定量 PCR 体系和程序进行扩增,每个浓度梯度设置 2 个重复,以确定可检测的最低拷贝数浓度。同时,将检测结果与常规 PCR 进行比较,以评价本方法的敏感性。

1.7 特异性试验

为评估所建立方法的特异性,使用优化后的荧光定量PCR体系和程序,对常见的大型猫科动物病原(TCaV LYH1224株、FCV、FPV、FCoV、FHV、FeAstV和FeKoV等病料或病毒培养液)进行检测。所有检测样本的核酸均使用AxyPrep体液病毒DNA/RNA小量抽提试剂盒,从研磨液上清或病毒培养液中抽提。对于DNA病毒(FPV、FHV),将抽提的核酸直接作为模板进行检测;对于RNA病毒(TCaV LYH1224株、FCV、FCoV、FeAstV和FeKoV),则先将抽提的核酸使用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit合成为cDNA后,再作为模板进行检测。

1.8 重复性试验

为评估所建立方法的重复性,选取4个浓度梯度(1×10^8 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 拷贝/ μL)的质粒标准品,采用优化后的荧光定量PCR体系和程序进行扩增。对每个浓度样品在同一组内重复检测3次,以评估组内重复性;设置3个独立小组,分别进行试验,以评估组间重复性。最后,分别计算组内与组间重复 C_t 值的变异系数(C_v),以综合评价该方法的重复性与稳定性。

1.9 临床样品检测

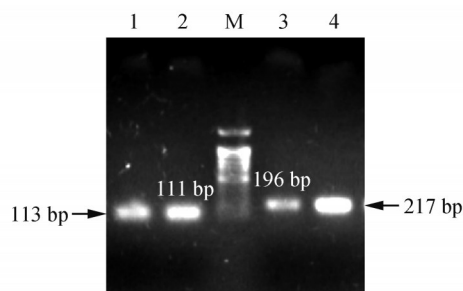
采用优化后的荧光定量PCR体系和程序,对本实验室保存的79份组织、血液或粪便等临床样品进行检测,以筛查新型TCaV。其中,组织、粪便样品需与无菌PBS混合,经研磨、冻融和离心后,取上清液备用。检测样品的核酸提取方法同1.7特异性试验。

2 结果

2.1 重组质粒验证及质粒标准品制备

重组质粒验证:以抽提的p-TCaVq重组质粒DNA为模板,采用4对引物(4158S/4270A、4160S/

4270A、5074S/5269A和5074S/5290A)进行PCR扩增。结果显示,所有引物对均能特异性扩增出预期大小的片段(图1),证明该质粒可作为检测模板。



M. DL2000 DNA Marker; 1-4. 分别为引物对4158S/4270A、4160S/4270A、5074S/5269A和5074S/5290A的扩增产物。

M. DL2000 DNA Marker; 1-4. Amplification products of four sets of primer pairs (4158S/4270A, 4160S/4270A, 5074S/5269A and 5074S/5290A).

图1 重组质粒p-TCaVq的扩增结果

Figure 1 Amplification results of recombinant plasmid p-TCaVq

标准品制备:经测定,抽提制备的p-TCaVq重组质粒的 OD_{260}/OD_{280} 为1.8~2.0,符合纯度要求,其质量浓度为200 ng/ μL ,换算为拷贝数浓度为 6.037×10^{10} 拷贝/ μL 。将此质粒用ddH₂O稀释至 10^{10} 拷贝/ μL 后,再进行10倍梯度稀释,作为质粒标准品待用。

2.2 荧光定量PCR体系与程序优化

以p-TCaVq质粒标准品为模板,通过设置不同引物终浓度及退火时间,对4组引物对的扩增效率(E)和相关系数(R^2)进行比较,以确定最佳反应体系和程序。结果显示,当4160S/4270A引物对终浓度为0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、退火时间为45 s时,扩增效率最佳(101.8%),且相关系数最高($R^2 = 0.996$)(表2)。由此,确定TCaV荧光定量PCR的最佳反应体系(20.0 μL):SYBR Mix 10.0 μL 、4160S/4270A引物终浓度0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、核酸模板2.0 μL ,最后以ddH₂O补至20.0 μL 。最适反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸45 s,40个循环。

表2 不同体系和程序下新型TCaV荧光定量PCR的扩增效率(E)和相关系数(R^2)

Table 2 Amplification efficiency(E) and correlation coefficient(R^2) of fluorescent quantitative PCR for novel TCaV under different systems and programs

PCR体系 PCR system		4158S/4270A		4160S/4270A		5074S/5269A		5290A/5074S	
引物终浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Primer final concentration	退火时间 / s Annealing time	E / %	R^2	E / %	R^2	E / %	R^2	E / %	R^2
0.4	30	75.1	0.957	87.7	0.919	56.5	0.993	44.6	0.979
0.4	45			92.3	0.908			76.7	0.945
0.5	45	92.5	0.987	101.8	0.996	94.3	0.982	72.5	0.933

2.3 标准曲线建立

在2.2节确定的最佳条件下,将不同浓度梯度($1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^9$ 拷贝/ μL)的p-TCaVq质粒标准品作为模板进行荧光定量PCR扩增。以标准品浓度的对数值为 x 轴,测得的 C_t 值为 y 轴,绘制标准曲线。

结果显示,4160S/4270A引物对的标准曲线方程为 $y = -3.280x + 36.992$, E 为101.8%, R^2 为0.996(图2),表明 C_t 值与各标准品拷贝数浓度对数之间具有良好的线性关系。

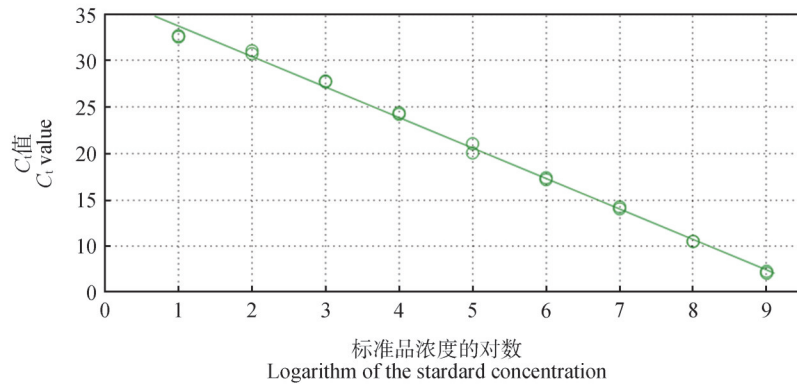


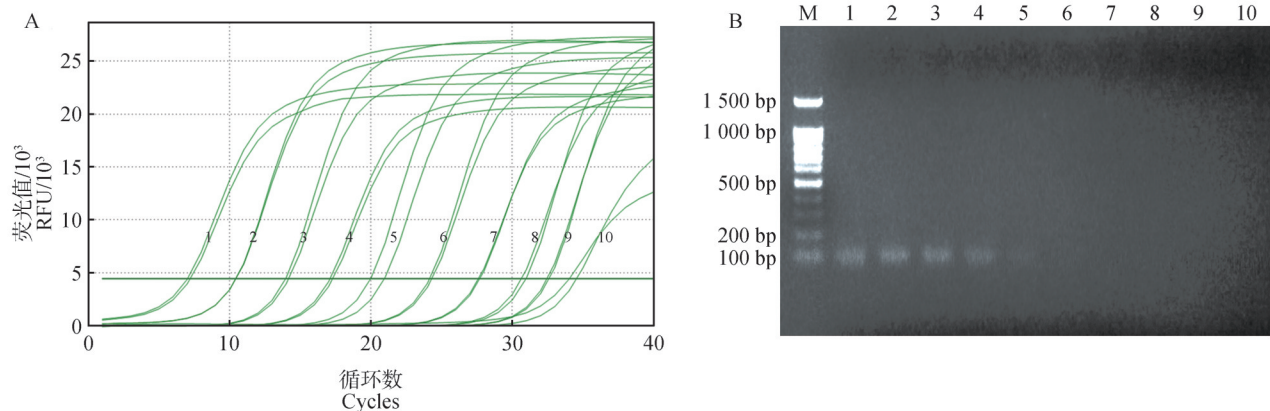
图2 新型TCaV在最优荧光定量PCR反应条件下的标准曲线

Figure 2 Standard curve of fluorescent quantitative PCR for the novel TCaV under optimal conditions

2.4 灵敏度试验

选取10倍倍比稀释的p-TCaVq质粒标准品($1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^0$ 拷贝/ μL)作为模板,比较本研究建立的荧光定量PCR和常规PCR方法的灵敏度。由图3可见,荧光定量PCR方法在所有浓度梯度下均能检测到荧光信号,且在 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^9$ 拷

贝/ μL 时,有完整的扩增曲线,其最低检测限为 2.0×10^1 拷贝/反应(图3A);而常规PCR方法仅在 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^9$ 拷贝/ μL 的高浓度范围内可观察到特异性扩增条带,其最低检测限为 10^5 拷贝/反应(图3B)。结果表明,建立的TCaV荧光定量PCR方法敏感性较强,比常规PCR方法的灵敏度高出约4个数量级。



A. 荧光定量PCR; B. 常规PCR; M. 100 bp DNA Ladder; 1~10. 质粒标准品拷贝数浓度依次为 $1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^0$ 拷贝/ μL 。

A. Fluorescent quantitative PCR; B. Conventional PCR; M. 100 bp DNA Ladder; 1 - 10. Plasmid dilution from 1.0×10^9 copies/ μL to 1.0×10^0 copies/ μL .

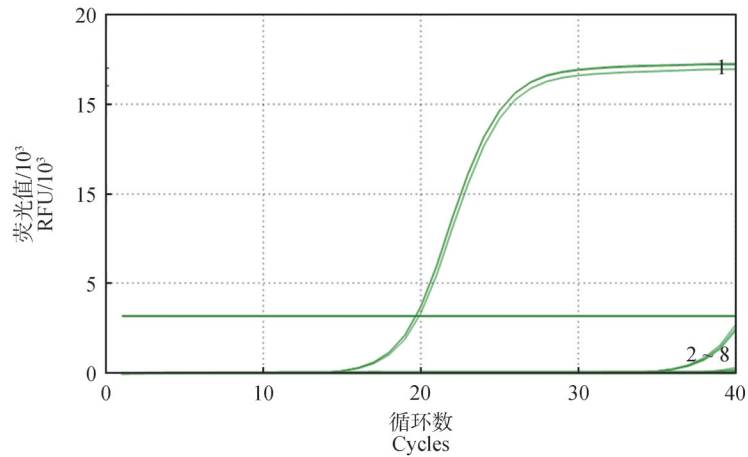
图3 灵敏度检测结果

Figure 3 Results of sensitivity test

2.5 特异性试验

采用建立的荧光定量PCR法对TCaV LYH1224分离株、FCV、FPV、FCoV、FHV、FeAstV和FeKoV的cDNA

或DNA进行检测,结果仅TCaV LYH1224样品呈特异性阳性反应,其余病毒及阴性对照均无扩增曲线,结果为阴性(图4),表明此方法具有良好的特异性。



1. TCaV LYH1224 株;2~8. FCV、FPV、FCoV、FHV、FeAstV、FeKoV 和阴性对照。
1. TCaV LYH1224 strain;2~8. FCV,FPV,FCoV,FHV,FeAstV,FeKoV and negative control.

图4 特异性检测结果

Figure 4 Results of specificity test

2.6 重复性试验

选取4个浓度梯度(1×10⁸、1×10⁵、1×10⁴、1×10³拷贝/μL)的质粒标准品作为模板,分别进行组内和组间重复性试验。结果显示,所有浓度下组内和组间试验的C_v均小于2.50%,表明该方法的重复性和稳定性较好(表3)。

2.7 临床样品检测

为调查新型TCaV在我国大型猫科动物中的流行情况,使用建立的荧光定量PCR方法,对2019—2024年从河南、山东、上海、湖南、广东和广西等地采集的71只大型猫科动物的79份组织、血液和粪便等临床样本(表4)进行检测。样本包括东北虎、华南虎和孟加拉虎等60只虎的68份样本,以及与虎亲缘关

表3 组内及组间重复性试验结果

Table 3 Results of reproducibility tests of the intra- and inter-assay

标准样品/ (拷贝·μL ⁻¹) Standard concentration	组内重复性 Intra-assay		组间重复性 Inter-assay	
	C _i	C _v /%	C _i	C _v /%
10 ⁸	11.18 ± 0.14	1.27	11.13 ± 0.10	0.92
10 ⁵	24.62 ± 0.22	0.89	24.40 ± 0.59	2.42
10 ⁴	27.15 ± 0.51	1.88	27.84 ± 0.49	1.76
10 ³	28.61 ± 0.13	0.45	28.92 ± 0.51	1.77

注: C_i数据为平均值 ± 标准差。
Note: C_i data is the mean ± SD.

系较近的美洲豹(*P. onca*)、豹和狮等其他11只大型猫科动物的11份样本。

表4 大型猫科动物临床样本信息

Table 4 Information of detected clinical samples of large felids (Felidae)

物种 Species	样本数量/份 No. of samples	个体数量/只 No. of individuals	样品类型 Sample type	采集地点 Sampling site
华南虎 <i>Panthera tigris amoyensis</i>	16	8	心、肺、脾、肝、肾、胃、肠、胰腺、血液	河南、江苏、广东
东北虎 <i>Panthera tigris altaica</i>	45	45	粪便、脾、肝	上海、湖南、广东、广西
孟加拉虎 <i>Panthera tigris tigris</i>	7	7	粪便、脾	湖南、广东、广西
美洲豹 <i>Panthera onca</i>	1	1	粪便	广西
豹 <i>Panthera pardus</i>	4	4	粪便、肝、脾	山东、江苏
狮 <i>Panthera leo</i>	6	6	粪便、肠	山东、广东、广西

设定C_i平均值小于30为阳性判定标准,结果显示:在79份样本中,共检出6份阳性,样本阳性检出

率为7.59%(6/79);进一步分析表明,6份阳性样本均为组织样本,其病毒拷贝数为10^{5.88}~10^{7.89}拷贝/g,

且均来源于2只发病死亡的华南虎,即个体阳性检出率为2.82%(2/71),且这2只阳性华南虎来自于同一保育机构,提示TCaV可能已在该华南虎种群中小范围传播。

3 讨论

已有研究表明,FCV在全球家猫群体中广泛流行,是最常见的病毒传染性病原之一^[5,17]。在大型猫科动物中,FCV感染也时有发生,如高玉伟等^[10]从猎豹与虎中分离到FCV;杨清等^[12]从贵州省某动物园死亡的东北虎脾脏中分离得到1株FCV;周易等^[18]对40份东北虎血液样本进行检测,发现4份FCV阳性。但关于大型猫科动物源FCV的深入研究仍然较少,尤其是新型TCaV亟需开展相关研究以助力大型猫科动物的疫病防控与种群保护。

在前期研究中,本团队利用宏病毒组学测序和生物信息学分析,成功鉴定出一种新型TCaV,即LYH1224株,该毒株基因组序列与目前已知的FCV序列相似性较低。该毒株的鉴定不仅拓展了大型猫科动物相关病毒的种类,也为后续开展病毒的遗传特性、进化规律等研究奠定了基础,为深入了解FCV在猫科物种间的传播与演化路径提供了关键线索。

在检测方法的构建方面,本研究针对TCaV LYH1224株设计特异性引物,通过对反应体系和条件的细致优化,建立了一种灵敏度高、特异性强的荧光定量PCR方法。经验证,该方法重复性佳,最低检测限可达 2×10^1 拷贝/反应。与常规PCR方法相比,荧光定量PCR检测耗时更短,且能检测出低病毒载量样本,显著提高了检测效率和准确性。这一方法适用于临床中低载量病毒的筛查,尤其适用于疫病早期诊断和常态化监测,为及时采取防控措施争取了关键窗口期。

临床样本检测结果显示,在本实验室保存的大型猫科动物临床样本中,TCaV的样本阳性检出率为7.59%,个体阳性率为2.82%,且2例阳性个体均来自同一保育机构。这一发现表明,TCaV已在华南虎种群内小范围传播,若不及时防控,极易引发大规模疫情,对种群健康构成严重威胁。因此,本研究结果警示,必须强化对华南虎等大型猫科动物的疫病监测,建立常态化监测体系,以阻断病毒的进一步扩散。

综上所述,本研究建立的荧光定量PCR方法为

国内大型猫科动物新型TCaV的快速检测提供了可靠的技术支持,在临床诊断、疫病监测以及防控决策制定等方面具有重要应用价值。然而,本实验室保存的临床样本,在地域和时间跨度上具有局限性,其结果可能无法全面反映新型TCaV在自然环境中的真实流行情况。未来,需进一步扩大样本采集范围,开展多地区、多时间点和多物种的监测,以深入探究新型TCaV的传播机制与流行规律。此外,可参考其他猫科病毒研究的成功经验,开展病毒致病性和免疫原性研究,为开发针对性的疫苗和治疗药物提供理论支撑,从而切实保障华南虎等大型猫科动物的种群安全。

4 结论

本研究成功建立了一种新型TCaV荧光定量PCR检测方法。该方法特异性强、灵敏度高、重复性佳,且检测速度快于常规PCR方法,为我国大型猫科动物新型TCaV的快速检测、流行病学监测及早期预警提供了可靠的技术工具,为新型TCaV的有效防控奠定了坚实基础。

参考文献:

- [1] 国家重点保护野生动物名录(2021年2月1日修订)[J]. 野生动物学报, 2021, 42(2): 605-640.
List of national key protected wild animals in China (revised on February 1, 2021) [J]. Chinese Journal of Wildlife, 2021, 42(2): 605-640.
- [2] 国家林业和草原局,国家发展和改革委员会.“十四五”林业草原保护发展规划纲要[EB/OL](2021-08-19)[2025-04-19].
<https://www.forestry.gov.cn/search/15329>.
National Forestry and Grassland Administration, National Development and Reform Commission. Outline of the 14th five-year plan for forestry and grassland protection and development [EB/OL] (2021-08-19) [2025-04-19]. <https://www.forestry.gov.cn/search/15329>.
- [3] LUO S J, LIU Y C, XU X. Tigers of the world: Genomics and conservation [J]. Annual Review of Animal Biosciences, 2019, 7: 521-548.
- [4] WANG C, WU D D, YUAN Y H, *et al.* Population genomic analysis provides evidence of the past success and future potential of South China tiger captive conservation [J]. BMC Biology, 2023, 21(1): 64.
- [5] RADFORD A D, COYNE K P, DAWSON S, *et al.* Feline calicivirus [J]. Veterinary Research, 2007, 38(2): 319-335.
- [6] ELLIS T M. Jaundice in a Siamese cat with *in utero* feline calicivirus infection [J]. Australian Veterinary Journal, 1981, 57(8):

- 383-385.
- [7] LOVE D N, BAKER K D. Sudden death in kittens associated with a feline picornavirus [J]. *Australian Veterinary Journal*, 1972, 48(11): 643.
- [8] SLAVIERO M, EHLERS L P, ARGENTA F F, *et al.* Causes and lesions of fatal pneumonia in domestic cats [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2021, 189: 59-71.
- [9] KADOI K, KIRYU M, IWABUCHI M, *et al.* A strain of calicivirus isolated from lions with vesicular lesions on tongue and snout [J]. *The New Microbiologica*, 1997, 20(2): 141-148.
- [10] 高玉伟, 夏咸柱, 扈荣良, 等. 猎豹与虎猫杯状病毒的分离及其超变区基因比较研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(3): 179-182.
- GAO Y W, XIA X Z, HU R L, *et al.* Characterization and hypervariable region analysis of two feline calicivirus isolates from cheetah and tiger [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 25(3): 179-182.
- [11] TIAN J, LIU D F, LIU Y X, *et al.* Molecular characterization of a feline calicivirus isolated from tiger and its pathogenesis in cats [J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 192: 110-117.
- [12] 杨清, 刘巧荣, 孙明, 等. 虎源猫杯状病毒的分离及其基因组遗传变异分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2019, 55(9): 7-11.
- YANG Q, LIU Q R, SUN M, *et al.* Isolation, identification and genomic characterization of feline calicivirus from tiger [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2019, 55(9): 7-11.
- [13] HUANG S P, LI X, GUO L J, *et al.* Prevalence of four viruses in captive Siberian tigers from northeastern China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(5): e1434-e1444.
- [14] WEI Y Q, ZENG Q Y, GOU H T, *et al.* Update on feline calicivirus: Viral evolution, pathogenesis, epidemiology, prevention and control [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1388420.
- [15] GIBSON U E, HEID C A, WILLIAMS P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR [J]. *Genome Research*, 1996, 6(10): 995-1001.
- [16] ENGSTROM-MELNYK J, RODRIGUEZ P L, PERAUD O, *et al.* Clinical applications of quantitative real-time PCR in virology [J]. *Methods in Microbiology*, 2015, 42: 161-197.
- [17] SPIRI A M. An update on feline calicivirus [J]. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 2022, 164(3): 225-241.
- [18] 周易, 林立森, 杨四权, 等. 圈养东北虎源猫杯状病毒的巢氏PCR检测及ORF2基因遗传进化分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2022(24): 80-84.
- ZHOU Y, LIN L S, YANG S Q, *et al.* Nested PCR detection and genetic evolutionary analysis of ORF2 gene fragments of feline calicivirus originating from captive northeast tigers [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2022(24): 80-84.