



中华人民共和国国家标准

GB/T 46337—2025

动物新型冠状病毒感染诊断技术

Diagnostics for animal infection with
severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

2025-10-05 发布

2026-05-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 生物安全要求	1
6 临床诊断	2
7 样品采集、处理和保存	2
8 荧光 RT-PCR	4
9 病毒分离鉴定	5
10 综合判定	6
附录 A (规范性) 溶液配制(所用试剂为分析纯)	7
附录 B (规范性) 荧光 RT-PCR 引物和探针序列信息及反应体系配制表	8
附录 C (资料性) 荧光 RT-PCR 检测及结果判定参考图	9
附录 D (规范性) 荧光 RT-PCR 检测结果判定	10
附录 E (资料性) Vero 细胞感染 SARS-CoV-2 的 CPE 参考图	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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所。

本文件主要起草人：王楷宬、谭文杰、潘俊慧、黄保英、魏世萌、祁倩、王素春、李阳、隋金钰、周凯钰太、李超、刘华雷、康京丽。



引　　言

新型冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2,SARS-CoV-2)属于 β 冠状病毒属,是一种有包(囊)膜的单股正链RNA病毒,基因组大小约为30 kb,病毒颗粒呈球形或椭球形,直径为60 nm~140 nm。

截至2024年,至少36个国家报告了动物SARS-CoV-2感染病例,涉及犬、猫、貂、虎、狮、白尾鹿、大猩猩、雪豹以及河马等。除上述自然感染动物外,研究发现兔和狐狸等动物也会人工感染SARS-CoV-2。SARS-CoV-2感染动物后可能发生变异,导致病毒感染宿主谱扩大,加大了SARS-CoV-2防控难度。

基于当前动物SARS-CoV-2感染情况及其危害制定的本文件,能用于各类动物SARS-CoV-2感染的诊断。

动物新型冠状病毒感染诊断技术

1 范围

本文件规定了动物新型冠状病毒感染的临床诊断、样品采集、处理和保存、荧光 RT-PCR 和病毒分离鉴定等方法的技术要求。

本文件适用于动物新型冠状病毒感染的诊断、检疫、检测、监测和流行病学调查等。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- CPE:细胞病变(Cytopathic Effect)
- Ct 值:循环阈值(Cycle Threshold)
- DMEM:培养基(Dulbecco'S Modified Eagle Medium)
- EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)
- FBS:胎牛血清(Fetal Bovine Serum)
- N:核衣壳蛋白(Nucleocapsid Protein)
- ORF1ab:开放阅读框 1ab(Open Reading Frame 1ab)
- PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution)
- RNA:核糖核酸(Ribonucleic Acid)
- RT-PCR:反转录聚合酶链式反应(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
- SARS-CoV-2:新型冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)
- Vero:非洲绿猴肾细胞(African Green Monkey Kidney)
- Vero E6:非洲绿猴肾细胞 E6(African Green Monkey Kidney E6)

5 生物安全要求

进行动物新型冠状病毒感染的检测和诊断时,样品采集与处理、核酸提取和病毒分离鉴定等,按照

GB 19489 的规定执行。

6 临床诊断

6.1 流行病学

- 6.1.1 传染源:主要为 SARS-CoV-2 感染的患者和动物,及受污染的物品和环境。
- 6.1.2 传播途径:主要经呼吸道飞沫和密切接触传播,在相对封闭环境中可经气溶胶传播。
- 6.1.3 易感动物:主要为貂等鼬科动物;猫、狮子、虎和豹等猫科动物;大猩猩等非人类灵长类动物;鼠等啮齿类动物;白尾鹿和犬等其他动物。老龄动物较易感。

6.2 临床症状

- 6.2.1 呼吸道症状:咳嗽、喷嚏、流涕、呼吸窘迫。
- 6.2.2 消化道症状:呕吐、腹泻。
- 6.2.3 全身症状:发烧、食欲不振、嗜睡。

6.3 病理变化

- 6.3.1 影像学检查:可见肺叶有毛玻璃混浊和/或斑片状病变。
- 6.3.2 眼观病变:可见鼻和气管黏膜上皮局部充血、水肿以及分泌物等。
- 6.3.3 组织病理学检查:肺泡腔内充满粉红色渗出液、淋巴细胞和脱落的上皮细胞;肺泡间隔增宽,有大量渗出液;部分感染动物小肠上皮细胞变性、坏死。

6.4 临床判定

符合 6.1,且出现 6.2 或 6.3 中的一条或多条情况时,可初步判定为临床疑似感染。确诊应采集样品进行实验室诊断。

7 样品采集、处理和保存

7.1 仪器设备

- 7.1.1 台式高速冷冻离心机。
- 7.1.2 组织匀浆器或研磨器。
- 7.1.3 高压灭菌器。
- 7.1.4 漩涡振荡器。
- 7.1.5 生物安全柜:Ⅱ级或Ⅱ级以上。
- 7.1.6 微量可调移液器(100 μL 和 1 000 μL)。

7.2 试剂材料

- 7.2.1 除另有规定外,所用试剂均为分析纯,所用水为 GB/T 6682 规定的二级水。
- 7.2.2 0.01 mol/L PBS(pH 7.2),配制方法按照附录 A 中 A.1。
- 7.2.3 样品稀释液,配制方法按照 A.2。
- 7.2.4 采样管:2 mL,无菌无核酸酶。
- 7.2.5 样品保存管:15 mL 和 50 mL,无菌无核酸酶螺口离心管。
- 7.2.6 一次性无菌采样拭子。

- 7.2.7 一次性静脉采血针。
- 7.2.8 无菌剪刀、无菌镊子。
- 7.2.9 采血管。

7.3 样品采集

7.3.1 样品选择

对于活体动物,首选采集鼻、咽拭子和/或肛拭子,采样拭子避免触碰到其他物体;如需要,也可采集粪便拭子、血液等。对于病死动物,可采集肺、气管等样品。

7.3.2 拭子样品

7.3.2.1 鼻腔采样:应将采样拭子轻轻插入鼻孔,旋转至少3次。如鼻孔无法插入,可改为鼻周采样,使用采样拭子轻扫鼻腔附近区域至少3次。

7.3.2.2 咽部采样:应使用采样拭子擦拭动物咽喉两侧扁桃体和咽后壁至少3次。

7.3.2.3 将同一只动物的鼻拭子和/或咽拭子,共同装入含有样品稀释液的2 mL采样管中,拭子头应完全浸入样品稀释液中,编号并填写相应采样单。

7.3.2.4 肛门采样:应使用采样拭子轻轻插入肛门中,旋转至少3次后拔出。装入含有样品稀释液的2 mL采样管中,拭子头应完全浸入样品稀释液中,编号并填写相应采样单。

7.3.2.5 若无法采集肛拭子,可用采样拭子蘸取粪便,装入采样管。

7.3.3 血液样品

用含有EDTA的采血管无菌采集动物静脉血,采血后立即颠倒充分混匀,编号并填写相应采样单。

7.3.4 组织样品

用无菌剪刀、镊子采集病死动物的肺、气管等组织,分别装入15 mL或50 mL的样品保存管中,编号并填写相应采样单。

7.4 样品保存、包装与运输

样品保存、包装与运输按照NY/T 541的规定执行。

7.5 样品处理

7.5.1 拭子样品

使用振荡器将拭子样品采样管中的内容物充分混合,弃去拭子后12 000 r/min离心5 min,取上清液备用。

7.5.2 血液样品

可直接作为检测材料,或按NY/T 541的规定制备血浆备用。

7.5.3 组织样品

无菌条件下将组织剪碎,按1:4加入PBS后经组织匀浆器或研磨器制成匀浆,冻融2次~3次,12 000 r/min离心10 min,取上清液备用。

8 荧光 RT-PCR

8.1 仪器设备

- 8.1.1 荧光定量 PCR 仪。
- 8.1.2 台式高速冷冻离心机。
- 8.1.3 漩涡振荡器。
- 8.1.4 低速离心机。
- 8.1.5 微量可调移液器(10 μL、100 μL、1 000 μL 等不同规格)。
- 8.1.6 生物安全柜:Ⅱ级或Ⅱ级以上。

8.2 试剂材料



- 8.2.1 市售商品化 RNA 提取试剂盒。
- 8.2.2 2×RT-PCR 缓冲液。
- 8.2.3 反转录酶。
- 8.2.4 DNA 扩增酶。
- 8.2.5 无核酸酶水:分子生物学级。
- 8.2.6 阳性对照标准品:经 100 °C 加热 10 min 或 56 °C 加热 30 min 灭活处理后的 SARS-CoV-2 病毒液或携带检测靶基因的假病毒。若病毒液和假病毒难以获得,可采用携带检测靶基因的质粒。
- 8.2.7 阴性对照标准品:无菌无核酸酶水。
- 8.2.8 引物和探针,按附录 B 中 B.1 执行。
- 8.2.9 离心管与带滤芯吸头:无菌无核酸酶。
- 8.2.10 PCR 扩增管(0.2 mL)或 PCR 板:无菌无核酸酶。

8.3 RNA 提取

取 7.5 处理后的样品,进行 RNA 提取。可选市售商品化 RNA 提取试剂盒,按照说明书进行操作。

8.4 荧光 RT-PCR 反应混合液配制

按照 B.2 同时配制 ORF1ab 和 N 基因检测的荧光 RT-PCR 反应体系。也可选用其他市售等效荧光 RT-PCR 扩增试剂盒进行检测。

8.5 荧光 RT-PCR 反应

8.5.1 按照 B.2 将待检样品 RNA 分别加入 ORF1ab 和 N 基因检测的荧光 RT-PCR 反应体系中。每个待检样品的 2 个靶标(ORF1ab 和 N)荧光 RT-PCR 检测均需做 3 个平行反应,同时设立阳性对照和阴性对照。

8.5.2 将 PCR 反应管放入荧光定量 PCR 仪扩增,反应条件为:42 °C 5 min,95 °C 30 s,进行 1 个循环;95 °C 5 s,60 °C 30 s(收集 FAM 通道荧光信号),进行 40 个循环。反应结束后,根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

8.6 试验成立条件

阳性对照出现特异性扩增曲线,且 Ct 值≤33;同时阴性对照无 Ct 值,且无特异性扩增曲线(见附录 C),说明试验成立。否则,试验不成立。

8.7 结果判定

8.7.1 靶标检测的结果判定

当试验成立时,被检样品 C_t 值 $\leqslant 37$,且出现特异性扩增曲线,则判为检测靶标阳性;当 $37 < C_t$ 值 $\leqslant 40$,且出现特异性扩增曲线,则判定为检测靶标可疑,重复测定后仍在可疑区间,则判为检测靶标阳性;当被检样品无 C_t 值或 C_t 值 > 40 ,且无特异性扩增曲线,则判为检测靶标阴性。

8.7.2 样品检测的结果判定

样品检测结果按照附录 D 进行判定。

- 同一份样品中 2 个靶标(ORF1ab 和 N)荧光 RT-PCR 检测均为阳性,即 2 个靶标的 3 个平行反应各出现至少 1 个阳性检测结果;或同一份样品中单靶标(ORF1ab 或 N)荧光 RT-PCR 检测至少 2 个平行反应为阳性,样品判定为 SARS-CoV-2 核酸阳性。
- 同一份样品中 2 个靶标(ORF1ab 和 N)荧光 RT-PCR 检测均为阴性,样品判定为 SARS-CoV-2 核酸阴性。
- 当出现单靶标(ORF1ab 或 N)只有 1 个平行反应为阳性时,需对该样品重新提取核酸,并进行荧光 RT-PCR 检测,若仍出现单靶标至少 1 个平行反应为阳性,则样品判定为 SARS-CoV-2 核酸阳性;否则,判为 SARS-CoV-2 核酸阴性。

9 病毒分离鉴定

9.1 仪器设备

- 倒置生物显微镜。
- $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱和 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。
- CO_2 恒温培养箱。
- 生物安全柜:Ⅱ级或Ⅲ级以上。
- 微量可调移液器($10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $1\,000\text{ }\mu\text{L}$ 等不同规格)。
- 细胞计数仪。

9.2 试剂材料

- 0.01 mol/L PBS($\text{pH}\ 7.2$),同 7.2.2。
- 0.25%胰酶,配制方法按照 A.3。
- DMEM 培养基(商品化试剂)。
- 青链霉素(双抗)混合液($100\times$)。
- 胎牛血清。
- 细胞营养液,配制方法按照 A.4。
- 细胞维持液,配制方法按照 A.5。
- 试验细胞:Vero 细胞、Vero E6 细胞。
- 细胞培养瓶、细胞培养板。

9.3 试验程序

9.3.1 单层细胞制备

- 使用 0.25%胰酶将状态良好的细胞消化后,采用含 1%双抗的细胞营养液终止消化。

9.3.1.2 将消化后的细胞进行计数,调整浓度为 1×10^6 个/mL,加入细胞培养板或细胞培养瓶中。

9.3.1.3 细胞培养12 h~24 h,当密度达80%~90%时,吸弃细胞营养液。

9.3.2 病毒接种

9.3.2.1 样品制备:经7.5处理过的样品与细胞维持液按照1:5~1:10的比例进行混合,混匀后,室温放置10 min。

9.3.2.2 吸附:在细胞培养板(12孔板或6孔板)中加入制备好的样品(每孔500 μL或1 mL),置于37 °C、5%(体积分数)CO₂恒温培养箱中吸附(首次病毒接种吸附120 min,后续病毒传代吸附60 min),然后吸弃上清,加入细胞维持液,置于37 °C、5%(体积分数)CO₂恒温培养箱培养;同时设置正常细胞对照。

9.3.2.3 细胞病变观察和盲传:每天观察出现变圆、皱缩、脱落的CPE(见附录E)并记录,初代分离培养通常难以出现CPE,一般需要盲传2代~3代。

9.3.2.4 取样与鉴定:当细胞出现CPE时,收取培养上清液或细胞裂解液进行鉴定;若盲传至少3代仍未见CPE,培养至120 h收取培养上清液或细胞裂解液进行鉴定。采用市售商品化RNA提取试剂盒提取培养上清液或细胞裂解液中的核酸,按照第8章进行荧光RT-PCR检测。

9.4 结果判定

9.4.1 收集盲传至少3代的培养上清液或细胞裂解液,经荧光RT-PCR检测为阴性者,判为SARS-CoV-2分离鉴定阴性。

9.4.2 收集盲传至少3代的培养上清液或细胞裂解液,经荧光RT-PCR检测为阳性者,判为SARS-CoV-2分离鉴定阳性。分离鉴定的SARS-CoV-2可用于基因测序和遗传变异分析等。

10 综合判定

10.1 符合6.1,且出现6.2或6.3中的一条或多条情况时,判定为动物SARS-CoV-2感染疑似病例。

10.2 疑似病例或有SARS-CoV-2阳性病例接触史的无症状动物,按照第8章或第9章中规定的任一方法,检测为阳性者,判定为动物SARS-CoV-2感染。

附录 A
(规范性)
溶液配制(所用试剂为分析纯)

A.1 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)

配制 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液所需试剂如下：

- 8 g 的氯化钠(NaCl)；
- 0.2 g 的氯化钾(KCl)；
- 2.9 g 的磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)；
- 0.2 g 的磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

试剂加水溶解至 1 L, 调整 pH 至 7.2, 高压灭菌, 4 °C 保存。

A.2 样品稀释液

0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)无菌条件下分别加入青霉素(终浓度 2 000 U/mL)、链霉素(终浓度 2 mg/mL)、庆大霉素(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、霉菌抑制素(终浓度 1 000 U/mL)和牛血清白蛋白(终浓度 5 mg/mL)。

上述抗生素浓度宜用于组织或咽喉拭子, 如果用于粪便和肛拭子的缓冲液, 抗生素浓度可提高 5 倍。

A.3 0.25% 胰酶

准确量取 DMEM 培养基 100 mL, 胰酶 0.25 g, 充分混匀, 溶解后过滤除菌, -20 °C 保存。

A.4 细胞营养液

 准确量取 DMEM 培养基 90 mL, 胎牛血清 10 mL, 充分混匀, 使用 5% 碳酸氢钠(NaHCO_3)调整 pH 至 7.2~7.4, 2 °C~8 °C 保存。

A.5 细胞维持液

准确量取 DMEM 培养基 98 mL, 胎牛血清 2 mL, 充分混匀, 使用 5% 碳酸氢钠(NaHCO_3)调整 pH 至 7.6~7.8, 2 °C~8 °C 保存。

附录 B

(规范性)

荧光 RT-PCR 引物和探针序列信息及反应体系配制表

B.1 荧光 RT-PCR 引物和探针序列

荧光 RT-PCR 引物和探针序列信息见表 B.1。

表 B.1 荧光 RT-PCR 引物和探针序列信息

引物/探针名称	引物序列(5'-3')
ORF1ab-F	CCTGTGGGTTTACACTTAA
ORF1ab-R	ACGATTGTGCATCAGCTGA
ORF1ab-P	FAM-CCGTCTCGGGTATGGAAAGGTTATGG-BHQ1
N-F	GGGGAACCTCTCCTGCTAGAAT
N-R	CAGACATTTGCTCTCAAGCTG
N-P	FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA

B.2 荧光 RT-PCR 反应体系配制表

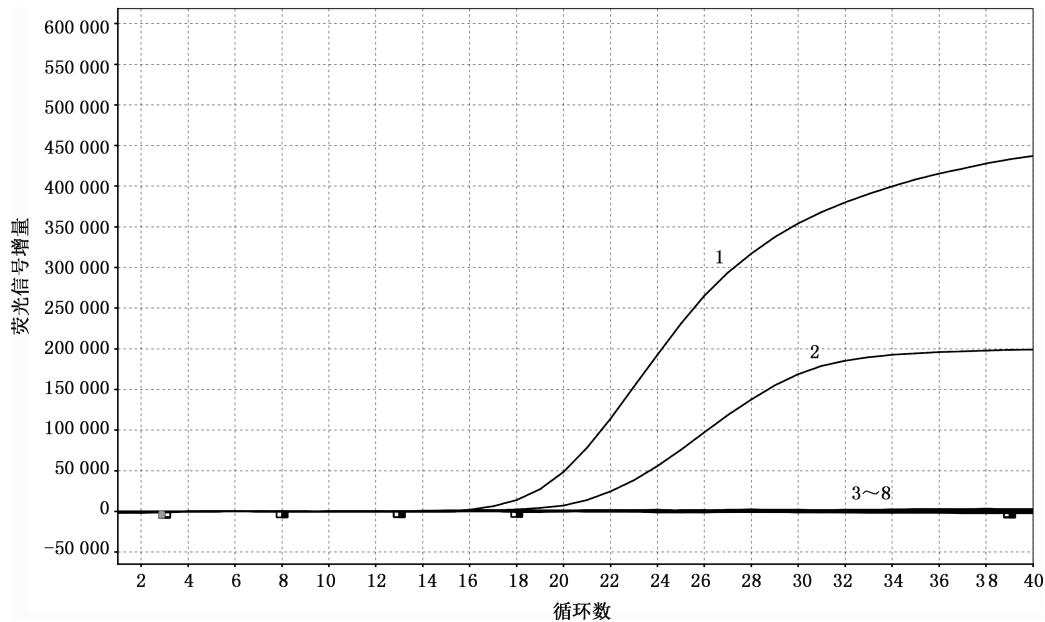
荧光 RT-PCR 反应体系配制按表 B.2。

表 B.2 荧光 RT-PCR 反应体系配制表

组分	体积/ μ L
2×RT-PCR 缓冲液	10.0
反转录酶	0.4
DNA 扩增酶	0.4
上游引物($10 \mu\text{mol/L}$)	0.4
下游引物($10 \mu\text{mol/L}$)	0.4
探针($10 \mu\text{mol/L}$)	0.4
无核酸酶水	6.0
待检样品 RNA	2.0
总体积	20.0

附录 C
(资料性)
荧光 RT-PCR 检测及结果判定参考图

荧光 RT-PCR 检测及结果判定见图 C.1。



标引序号说明：

- 1 —— SARS-CoV-2 ORF1ab 阳性对照；
- 2 —— SARS-CoV-2 N 阳性对照；
- 3~8——阴性对照。

图 C.1 荧光 RT-PCR 检测及结果判定参考图



附录 D
(规范性)
荧光 RT-PCR 检测结果判定

荧光 RT-PCR 检测结果判定见表 D.1。

表 D.1 荧光 RT-PCR 检测结果判定表

ORF1ab	N	判定结果
+ / + / +	+ / + / +	SARS-CoV-2 核酸阳性
+ / + / +	+ / + / -	
+ / + / +	+ / - / -	
+ / + / -	+ / + / +	
+ / + / -	+ / + / -	
+ / + / -	+ / - / -	
+ / - / -	+ / + / +	
+ / - / -	+ / + / -	
+ / - / -	+ / - / -	
+ / + / +	- / - / -	
+ / + / -	- / - / -	
- / - / -	+ / + / -	
- / - / -	+ / + / +	
+ / - / -	- / - / -	
- / - / -	+ / - / -	需重新提取核酸,进行荧光 RT-PCR 检测,若仍出现单靶标至少 1 个平行反应为阳性,则样品判定为 SARS-CoV-2 核酸阳性;否则,判为 SARS-CoV-2 核酸阴性
- / - / -	- / - / -	SARS-CoV-2 核酸阴性

注:“+”表示检测反应孔结果为阳性,“-”表示检测反应孔结果为阴性。

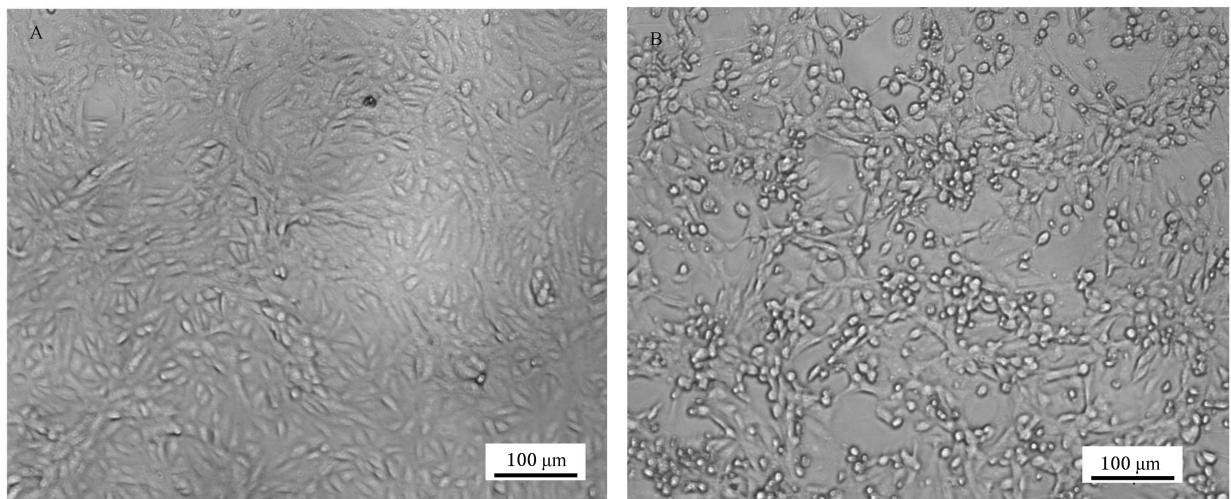


附录 E

(资料性)

Vero 细胞感染 SARS-CoV-2 的 CPE 参考图

Vero 细胞感染 SARS-CoV-2 的 CPE 见图 E.1。



标引序号说明：

A —— Vero 细胞正常形态参考图；

B —— SARS-CoV-2 接种 Vero 细胞后 48 h 的 CPE 参考图。

图 E.1 Vero 细胞感染 SARS-CoV-2 的 CPE 参考图