

ICS 65.020.30

CCS B 44



中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.10-202x

代替 GB/T14926.10-2008

实验动物 泰泽病原体检测方法

Laboratory animal—Method for examination of Tyzzer's organism

（征求意见稿）

202x-xx-xx 发布

202x-xx-xx 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020《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。

本文件代替 GB/T 14926.10-2008《实验动物 泰泽病原体检测方法》，与 GB/T 14926.10-2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了范围（见第1章，2008年版的第1章）；
- b) 更改了规范性引用文件（见第2章，2008年版的第2章）；
- c) 增加了术语和定义（见第3章）；
- d) 更改了原理（见第4章，2008年版的第3章）；
- e) 更改了主要设备和材料（见第5章，2008年版的第4章）；
- f) 更改了试剂（见第6章 6.1.2.1、6.1.3-6.1.6，2008年版的第5章 5.2.1、5.3-5.7）；
- g) 增加了“生物安全措施”（见7.1）、“实验室总体技术要求”（见7.2）、“样本采集和处理”（见7.3）；
- h) 更改了结果判定（见第8章，2008年版的第7章）；
- i) 增加了核酸检测原理（见4.2）、核酸检测用设备和材料（见5.5-5.8）、核酸检测试剂（见6.2）、核酸样本检测方法（见7.4.3）、核酸检测结果判定（见8.2）和泰泽病原体核酸检测具体操作方法（见附录A）。

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科学技术部提出。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC 281）归口。

本文件起草单位：杭州医学院、苏州西山生物技术有限公司、中国医学科学院医学实验动物研究所、中国食品药品检定研究院、华南农业大学、广东省生物技术研究院（广东省实验动物监测中心）、中国医学科学院基础医学研究所、西安交通大学、江西省职业病防治研究院。

本文件主要起草人：戴方伟、郭连香、向志光、邢进、石巧娟、柯贤福、刘忠华、闵凡贵、傅佳妮、吕安、刘恩岐、贾菠。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——1994年首次发布为 GB/T 14926.10-1994，2001年第一次修订，2008年第二次修订；

——本次为第三次修订。

实验动物 泰泽病原体检测方法

1 范围

本文件描述了实验动物泰泽病原体检测方法。

本文件适用于小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠和兔等实验动物，及实验接种物、实验动物环境样本和动物源性样本中泰泽病原体的检测。

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，注明日期的引用文件，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 14926.42 实验动物 细菌学检测 标本采集

GB/T 14926.50 实验动物 酶联免疫吸附试验

GB/T 14926.52 实验动物 免疫荧光试验

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 19495.2 转基因产品检测实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

泰泽病原体 Tyzzer's organism

指引起泰泽病（Tyzzer's disease）的病原体，根据最新微生物分类，其国际命名暂定为 *Clostridium piliforme*。

4 原理

4.1 抗体检测原理

根据免疫学原理，采用泰泽病原体抗原检测被检动物血清中的泰泽病原体抗体。

4.2 核酸检测原理

泰泽病原体特有的基因组核酸序列,可被基于聚合酶链式反应等的核酸扩增技术所识别。

5 主要设备和材料

5.1 普通恒温培养箱或水浴箱。

5.2 荧光显微镜。

5.3 生物显微镜。

5.4 酶标仪。

5.5 实时荧光定量 PCR 仪。

5.6 高速冷冻离心机, 普通离心机。

5.7 生物安全柜。

5.8 其他材料: 聚苯乙烯板、微量加样器、载玻片、盖玻片、离心管、PCR 反应管/板等。

6 试剂

6.1 血清学检测试剂

6.1.1 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 抗原按以下程序制备:

6.1.1.1 泰泽病原体抗原: 受泰泽病原体感染的、带有严重坏死灶的动物肝脏按 1:10 加人磷酸盐缓冲液 (PBS) 后在冰浴中用组织研磨器制成匀浆, 3600 r/min 离心, 取上清液作抗原。

6.1.1.2 阴性对照抗原: 未受泰泽病原体感染的动物肝脏, 按 6.1.1.1 的方法制成。

6.1.2 抗原片按以下程序制备:

6.1.2.1 抗原: 受泰泽病原体感染的、带有严重坏死灶的动物肝组织用 PBS 按 1:10 在冰浴中制成匀浆, 调整浓度至每个显微镜油镜视野有适当的菌量, 即细菌、肝细胞、细胞碎片完全铺开, 不重叠。泰泽病原体易发生自溶现象, 应尽快完成。

6.1.2.2 抗原片制备: 将上述抗原液适量滴于玻片孔中, 室温干燥后, 冷丙酮 (4℃) 固定 10 min。PBS 漂洗后充分干燥, 置于 -20℃ 备用。

6.1.3 酶结合物: 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等标记羊或兔抗小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠 IgG 抗体, 用于检测相应动物血清抗体; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体, 用于检测兔血清抗体; 辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌蛋白 A (SPA), 用于检测大鼠血清以外的动物血清抗体。

- 6.1.4 荧光结合物：异硫氰酸荧光标记的羊或兔抗小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠 IgG 抗体用于检测相应动物的血清抗体；荧光标记的羊抗兔 IgG 抗体，用于检测兔血清抗体。
- 6.1.5 阳性血清：自然感染泰泽病原体的相应动物抗体阳性血清，或泰泽病原体免疫血清。
- 6.1.6 阴性血清：确证无泰泽病原体感染的相应动物血清。
- 6.1.7 其他试剂溶液的配制见 GB/T14926.50 和 GB/T14926.52。

6.2 核酸检测试剂

- 6.2.1 无核酸酶水。
- 6.2.2 商品化 DNA 提取试剂。
- 6.2.3 实时荧光定量 PCR 试剂。
- 6.2.4 阳性对照：含有泰泽病原体的 DNA 或含目的基因片段的重组质粒。
- 6.2.5 阴性对照：不含有泰泽病原体的 DNA，灭菌去离子水或 TE 溶液。
- 6.2.6 引物和探针按照表 1 的序列合成。引物和探针加无核酸酶水配制成 10 μmol/L 储备液，于-20 °C及以下低温保存。

表 1 泰泽病原体实时荧光定量 PCR 扩增引物和探针

引物名称	引物序列（5'→3'）	产物大小/bp
正向引物	AGCAAACGCAATAAGCACTCCA	162
反向引物	TACTTTACGTAGCCTGTCAATGGTATGT	
探针 ^a	FAM-AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCG-TAMRA	
^a 探针也可选用具有与 5-羧基荧光素（FAM）荧光基团相同检测效果的其他合适的荧光报告基团和荧光淬灭基团组合。		

7 检测方法

7.1 生物安全措施

实验操作及处理按照 GB 19489 的规定，由具备相关资质的工作人员进行相应操作。

7.2 实验室总体技术要求

实验室总体技术要求和检验质量控制的基本要求按照 GB/T 19495.2 规定进行。

7.3 样本的采集及处理

- 7.3.1 血清样本的采集按照 GB/T 14926.42 操作。
- 7.3.2 肝组织、回盲部组织和内容物、粪便、实验接种物、实验动物环境样本和动物源性

样本的采集按照附录 A 操作。

7.4 样本的检测方法

7.4.1 采用 ELISA 方法进行血清学检测，按照 GB/T 14926.50 操作。

7.4.2 采用间接免疫荧光试验（IFA）方法进行血清学检测，按照 GB/T 14926.52 操作。

7.4.3 采用实时荧光定量 PCR 方法进行泰泽病原体核酸检测，按照附录 A 操作。

8 结果判定

8.1 血清学检测

对阳性检测结果，选用同一种方法或另一种方法重试。如仍为阳性则判为阳性。

8.2 核酸检测

对阳性或可疑结果，用同一种方法重试。如仍为阳性或可疑，则判为阳性。

9 结果报告

根据判定结果，出具报告。

附录 A

(规范性)

泰泽病原体核酸检测方法

A.1 材料和试剂

按照 5 和 6.2 进行材料和试剂的准备。

A.2 样本采集与处理

A.2.1 脏器组织

将活体动物安乐死后剖检，无菌采集适量肝脏（优先选取坏死灶区域）或回盲部等感染组织于无菌离心管，编号备用。

A.2.2 盲肠内容物或粪便

无菌采集适量动物盲肠内容物或粪便于无菌离心管中，编号备用。

A.2.3 实验接种物、实验动物环境样本及动物源性样本

取适量待测细胞培养物、肿瘤组织等待测接种物于无菌离心管中，编号备用。

取适量实验动物饲料或垫料于无菌离心管中，编号备用。

取适量实验动物饮水于无菌离心管中，编号备用。

用无菌拭子拭取实验动物笼具出风口初效滤膜表面粉尘以及实验动物环境中的待测位置，将拭子从根部折断，保留拭子棉头，置于无菌离心管中，编号备用。

取笼具系统内置的出风口粉尘吸附介质装入无菌离心管中，编号备用。

A.2.4 采样说明

采样过程中样本不应交叉污染。A.2.1 和 A.2.2 是实验动物感染泰泽病原体监测主要采集样本类型，其中肝脏和盲肠内容物是病原主要富集部位，粪便样本可用于动物活体采样检测。其他类型的样本，如实验动物接种物、实验动物环境样本，这些样本是实验动物微生物质量控制的辅助样本，在样本采集时需考虑样本中泰泽病原体污染量可能较低，采样量宜有所增加，样本采集量应满足后续核酸提取的要求，具体可根据所选核酸提取试剂的操作说明进行确定。

A.3 样本的运输和存放

样本采集后应密封，置于冰上尽快运送至检测实验室。在 2℃~8℃条件下暂存不应超过 24 h；若不能立即检测，应于-20℃以下环境保存；若需长期保存，应置于-70℃以下环境，并避免反复冻融（冻融不超过 3 次，长期保存不超过 2 年）。

A.4 核酸提取

使用核酸提取试剂，按照操作说明书提取样本中的 DNA。样本处理应在生物安全柜中进行，并避免气溶胶污染。制备好的 DNA 宜尽快进行下一步实时荧光定量 PCR 反应，若暂时不能进行扩增反应，24 h 内可保存于 2 °C~8 °C 环境；若需长期保存，应置于 -70 °C 以下环境，并避免反复冻融，防止核酸降解。

A.5 实时荧光定量 PCR

A.5.1 实时荧光定量 PCR 反应体系

实时荧光定量 PCR 反应体系按照表 A.1 的规定进行配制。反应液的配制应在冰上操作。每次反应均应设立阳性对照、阴性对照和空白对照，空白对照即为不加模板对照，即在反应中用水代替模板。

表 A.1 实时荧光定量 PCR 反应体系

反应组分	体积/ μL	终浓度/ (nmol/L)
2 $\times$ 实时荧光定量 PCR 预混液	10	—
正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4	200
反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4	200
探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4	200
50 $\times$ 6-羧基-X-罗丹明 (ROX)	0.4	—
DNA 模板	1	—
无核酸酶水	7.4	—
总体积	20	—
注 1: 试剂 ROX 只在具有 ROX 荧光校正通道的实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增时添加，否则用水补齐。		
注 2: 使用其他等效的实时荧光定量 PCR 检测试剂时，反应体系和反应参数进行相应调整。		

A.5.2 实时荧光定量 PCR 反应参数

实时荧光定量 PCR 反应程序参数按照表 A.2 的规定设置。使用其他等效的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒，反应体系和参数按照说明书进行设置。

表 A.2 实时荧光定量 PCR 反应参数

步骤	温度/℃	时间/s	采集荧光值号	循环数
预变性	95	30	否	1
变性	95	5		40
退火/延伸	60	34	是	
注：试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和扩增循环数（Ct 值）判定结果。				

A.6 实时荧光定量 PCR 结果判定

A.6.1 结果分析和条件设定

直接读取检测结果，基线和阈值设定原则根据仪器的噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样本扩增曲线的最高点为准。

A.6.2 质控标准

A.6.2.1 空白对照无 Ct 值，并且无特异性荧光扩增曲线。

A.6.2.2 阴性对照无 Ct 值,并且无特异性荧光扩增曲线。

A.6.2.3 阳性对照 Ct 值 ≤ 35 ，并且有特异性荧光扩增曲线，则表明反应体系运行正常，否则此次试验无效，需重新进行实时荧光定量 PCR 扩增。

A.6.3 结果判定

A.6.3.1 质控成立条件下，待测样本无特异性扩增曲线，Ct 值 >40 或无 Ct 值，则判定样本泰泽病原体核酸阴性。

A.6.3.2 质控成立条件下，待测样本有特异性扩增曲线，Ct 值 ≤ 35 时，则判定样本泰泽病原体核酸阳性。

A.6.3.3 质控成立条件下，待测样本有特异性扩增曲线， $35 < \text{Ct 值} \leq 40$ ，判为可疑，需复检，复检仍出现 $35 < \text{Ct 值} \leq 40$ ，并且曲线有明显的对数增长期，则判定样本泰泽病原体核酸阳性；否则判为阴性。

A.6.4 序列测定

必要时，可取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定，序列结果与已公开发表的泰泽病原体特异性片段序列进行比对分析，以确证检测结果。
