



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX
代替 GB/T 14926.46-2008

实验动物 钩端螺旋体检测方法

Laboratory animal Method for examination of *Leptospira* spp.

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2026-09-01）

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。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – 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

目次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 样品采集与保存 2

6 血清学检测方法 2

7 核酸检测 5

8 综合判定 5

9 报告 6

附录 A（规范性） 钩端螺旋体荧光定量 PCR 检测方法 7

附录 B（规范性） 荧光定量 PCR 阳性对照质粒制备 9

前 言

GB/T 14926 标准共 54 个部分，为不同微生物和病毒检测技术方法。本部分自实施之日起，代替 GB/T 14926.46-2008，具体变动如下：

1. 在规范性引用文件中，增加了对 GB/T 45106 动物钩端螺旋体病诊断技术、GB 19489 实验室生物安全通用要求等国标的引用，通用标准针对诊断样品采集、保存与运输技术规范也在标准引用中列出。
2. 在原理中增加了钩端螺旋体简介、钩端螺旋体病原体检测方法、血清学诊断等内容的描述。
3. 增加样品采集与保存，明确样本的采集及保存要求。
4. 增加病原检测方法，对钩端螺旋体荧光定量 PCR 检测做了详细的描述。
5. 修订了检测程序流程，拆分为病原检测程序和抗体检测程序两大部分。
6. 修订结果判定为综合判定，病原检测结合临床诊断、对不同样本的检测结果的判定做了详细要求。血清学结果需结合免疫情况，抗体滴度以及病原检测结果综合判定。
7. 增加附录部分，对钩端螺旋体阳性对照质粒参考基因序列和荧光定量 PCR 扩增基因参考序列进行了描述。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会提出并组织修订。

本部分主要起草人：张彩勤，范薇，师长宏，刘恩岐，刘忠华，向志光，吴朋朋，哈蕊，夏聪聪，邢进，贾菠，罗文萍，高明。

本部分于 202X 年 XX 月首次发布。

实验动物 钩端螺旋体检测方法

1 范围

本文件规定了实验动物钩端螺旋体的检测方法。

本文件适用于犬钩端螺旋体的检测。

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 14926.43 实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂

GB/T 14926.50 实验动物 酶联免疫吸附试验

GB/T 45106 动物钩端螺旋体病诊断技术

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

钩端螺旋体病（Leptospirosis，简称钩体病）是由致病性钩端螺旋体（Leptospira，简称钩体）引起的一种广泛传播的自然疫源性人畜共患传染病。钩端螺旋体可感染小鼠、大鼠、兔、豚鼠、犬等绝大多数实验动物，不仅引发实验动物发热、黄疸、流产、肝肾损伤等病理症状，干扰动物实验结果准确性，还可通过污染环境、尿液等途径感染实验人员，严重威胁生物安全与公共卫生安全。人类钩端螺旋体病多为通过与受感染的动物直接接触或通过间接接触受尿液污染的环境而感染。钩端螺旋体病的前期症状不明显，很容易跟其他疾病相混淆，对钩端螺旋体病的确诊需要实验室的检测。

近年来，对钩端螺旋体生物学及其发病机制的分子基础的认识有了很大的进展，实时荧光定量PCR、环介导等温扩增技术（LAMP）、数字PCR等分子检测技术在病原微生物学的检测中广泛应用，具有灵敏度高、特异性强、检测速度快、可早期诊断等优势，已成为病原检测的主流技术。在钩端螺旋体病感染的早期和康复阶段，可通过对样本进行钩端螺旋体的特异性基因靶向扩增，进行快速和直接的诊断。

血清学诊断主要是测定人或动物血清中的钩端螺旋体特异性抗体，主要包括显微镜凝集试验（microscopic agglutination test, MAT）和酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）。MAT被认为是检测钩端螺旋体病的金标准，已经使用了50多年，是目前最明确的血清学检测方法，即通过钩端螺旋体抗原与相应特异性抗体结合，在适宜的电解质存在下发生凝集现

象，此种凝集现象可用暗视野显微镜观察，进而做出判定。ELISA 则是利用钩端螺旋体抗原与待检血清中的特异性抗体结合，形成抗原抗体复合物。此抗原抗体复合物仍保持其抗原活性，可与相应的第二抗体酶结合物结合。在酶的催化作用下底物发生反应，产生有色物质。颜色反应的深浅与待检血清中所含有的特异性抗体的量成正比。

5 样品采集与保存

5.1 样品采集

采集待检动物的组织器官（肝脏、肺脏、大脑和肾脏），体液（血液、乳汁、脑脊髓液、胸腔和腹腔液）以及尿液等样品，做病原或抗体检测。剖检、采样和病原学操作应在生物安全二级（BSL-2）实验室进行，按照 GB 19489 要求执行，采样及检测人员应采取针对性防护措施。样本采集方法参照 GB/T 45106 执行。

5.2 样品保存

样品短期（1 天以内）保存条件为 2℃～5℃，长期（超过 1 天）保存条件为-20℃及其以下的冰箱，长期保存的样品不能用于病原菌分离培养鉴定。

6 血清学检测方法

6.1 抗体检测程序（见图 1）

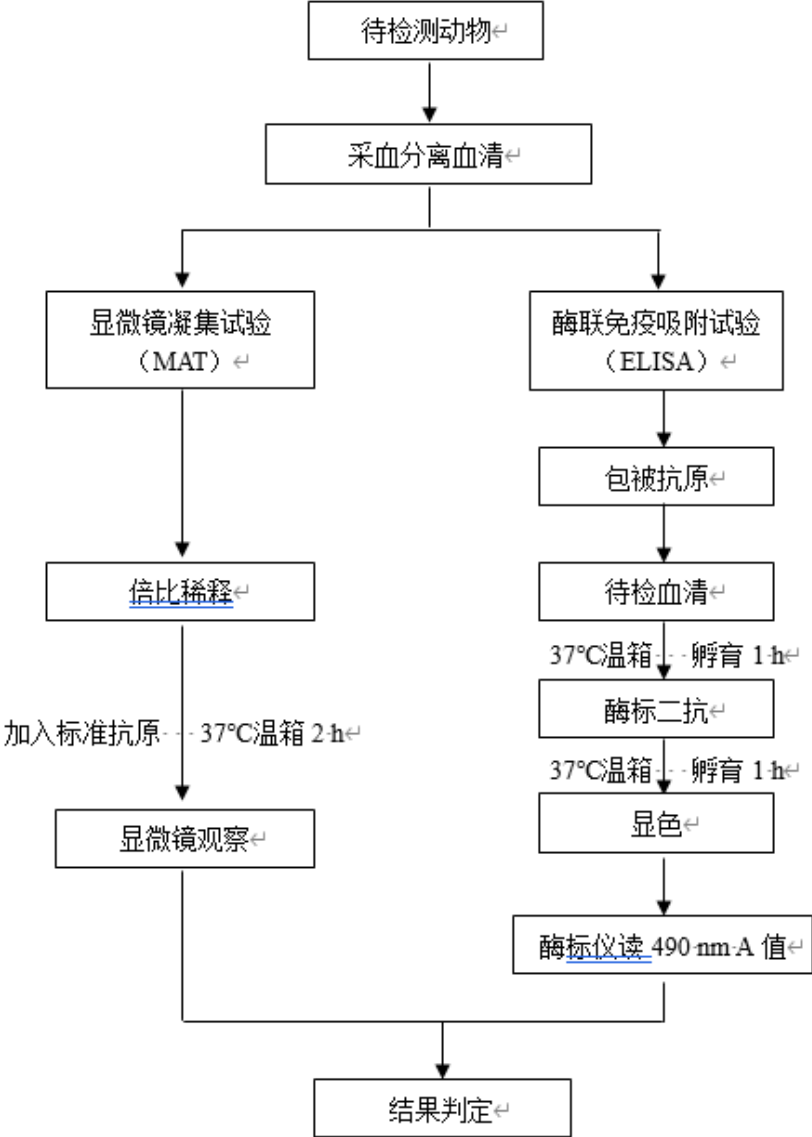


图 1 抗体检测程序

6.2 检测试剂的制备

6.2.1 血液的采集、血清分离方法参照 GB/T 14926.42 执行，培养基和试剂溶液的配制参照 GB/T 14926.43 和 GB/T 14926.50 执行。

6.2.2 显微镜凝集抗原

钩端螺旋体标准株接种 EMJH 培养基，30℃培养 5～7 d。取样作暗视野显微镜检查，每 400 倍视野不少于 50 条，运动活泼并无自凝现象，即可作为抗原。

6.2.3 ELISA 抗原

生长良好的钩端螺旋体培养物 10,000 r/min 离心 30 min，取沉淀用 PBS 在相同条件下洗 2 次。适量 PBS 悬浮沉淀，超声波破碎后，10,000 r/min 离心 20 min，上清即为 ELISA 抗原。

6.2.4 酶结合物

辣根过氧化物酶（HRP）标记羊或兔抗犬 IgG 抗体，辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白 A（SPA）。

6.2.5 阳性血清

钩端螺旋体免疫 SPF 级犬所获得的血清，或犬自然感染钩端螺旋体后所获得的血清。

6.2.6 阴性血清

无钩端螺旋体感染的犬血清。

6.3. 显微镜凝集试验（MAT）

6.3.1 设备器材

普通恒温培养箱、实体显微镜、恒温水浴箱、高速离心机、微量加样器及配套枪头。

6.3.2 待检血清灭活

将待检血清以 56℃水浴灭活 30 min 后备用。

6.3.3 显微镜凝集试验

a) 取 96 孔凹底平板，第 1 孔加入生理盐水 0.16 mL，以后每孔加入生理盐水 0.1 mL，一直加到第 9 孔。

b) 在第 1 孔中加入血清 0.04 mL，混匀后，吸取 0.1 mL 到第 2 孔，如此类推，直到第 9 孔，弃去 0.1 mL。

c) 另标明 10、11、12 孔，第 10 孔加入阴性血清 0.1 mL，第 11 孔加入阳性血清 0.1 mL，第 12 孔加入生理盐水 0.1 mL。

d) 将各孔加入标准抗原 0.1 mL，混匀，此时各孔血清稀释度为 1：10，1：20，1：40，1：80，1：160，1：320，1：640，1：1280，1：2560。具体操作见表 1。

表 1 钩端螺旋体定量显微镜凝集试验操作方法

96 孔板编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
生理盐水（mL）	0.16	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	0.1
待检血清（mL）	0.04	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	弃去	0.1	—
阴性血清（mL）	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	—	—
阳性血清（mL）	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	—
标准抗原（mL）	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
血清最终稀释度	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	—	—	—

e) 置 37℃温箱 2 h，取出后摇匀，用接种环挑取各孔中的反应物置于载玻片上，在暗视野下观察结果。

6.3.4 结果判定

a) ++++：几乎全部钩端螺旋体呈蝌蚪状或折光率高的团块，或有大小不等的点状或块状残片，仅有少数游离的钩端螺旋体。

b) +++：75%的钩端螺旋体被凝集，大部分呈块状或蜘蛛状，尚有 25%菌体游离。

c) ++：50%左右的钩端螺旋体被凝集，尚有 50%菌体游离。

d) +：25%左右的钩端螺旋体被凝集，尚有 75%菌体游离。

e) 一：全部菌体正常，分散，无凝集块，游离菌数与对照相同。
待检血清凝集效价在 1：20 达到“++”或以上时，均判为阳性反应。

6.4 酶联免疫吸附试验（ELISA）

酶联免疫吸附试验按照 GB/T 14926.50 操作。

7 核酸检测

7.1 核酸检测程序（见图 2）

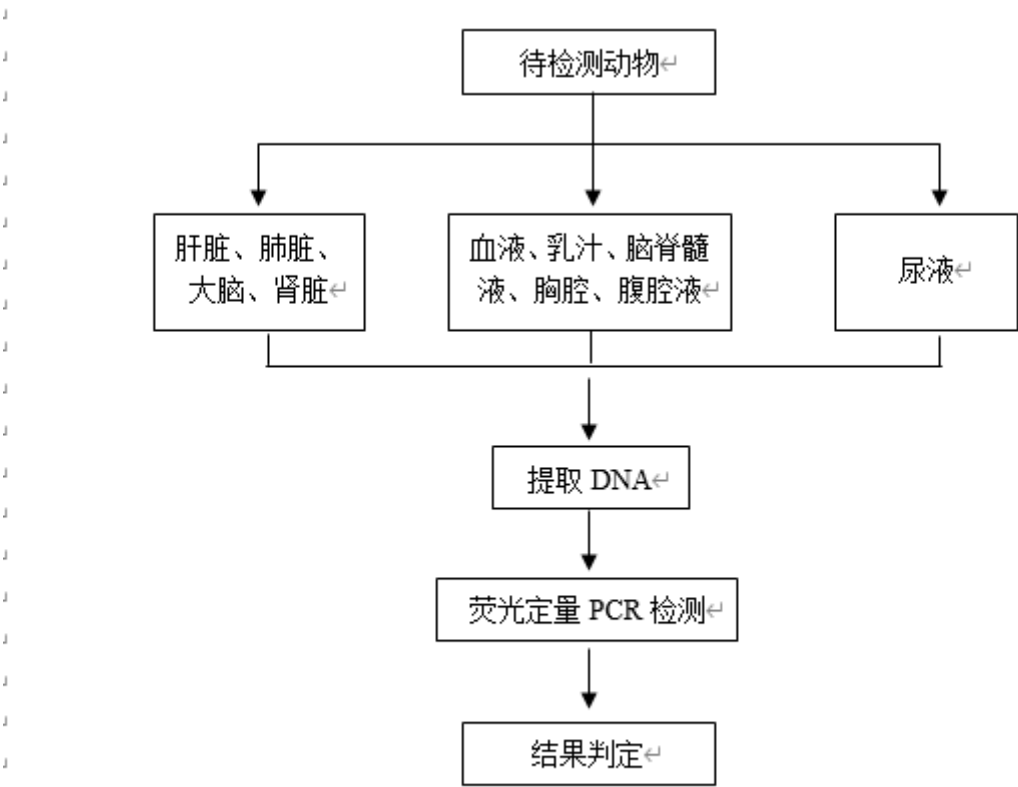


图 2 核酸检测程序

7.2 荧光定量 PCR 检测

荧光定量 PCR 方法进行核酸检测，按照附录 A 操作。

8 综合判定

- 8.1 临床诊断判定为疑似钩端螺旋体感染动物，经荧光定量 PCR 检测和血清抗体检测（MAT、ELISA）任何一项检测为阳性者，即可判定为钩端螺旋体病阳性。
- 8.2 组织器官样品，经荧光定量 PCR 检测之后，只要有一个阳性结果，即可判定为钩端螺旋体病阳性。
- 8.3 对核酸检测结果阳性或可疑结果，需用同一种方法重试，如仍为阳性或可疑，则判为阳性。
- 8.4 普通级犬如接种疫苗后，经 ELISA 检测抗体效价 $\geq 1:160$ ，或显微镜凝集检测抗体效价 $\geq 1:20$ 判为合格。被检动物免疫抗体合格率 $\geq 70\%$ 可判为该犬群免疫合格。

（免疫抗体合格率＝被检动物抗体阳性数/被检动物总数×100％）

8.5 SPF 级犬不应进行疫苗接种，或未进行免疫的普通级犬，经过血清抗体检测（MAT、ELISA）结果为阳性的，应选用同一种方法或不同检测方法重测（，如结果仍为阳性即可判定为钩端螺旋体感染阳性。

9 报告

根据判定结果，出具报告。

附 录 A
(规范性)
钩端螺旋体荧光定量 PCR 检测方法

A.1 样本的采集及处理血清采集按照 GB/T 14926.42 操作。

对于组织样品，无菌从其内部取黄豆粒大小，放入 5 mL EMJH 液体培养基；对于液体样品，取 150 μL~200 μL 加入 5 mL 的 EMJH 培养基。对于粪便样品，采集少量新鲜犬粪便，加入适量 EMJH 培养基或生理盐水，充分研磨匀浆，离心取上清至另一无菌离心管中，编号备用。EMJH 培养基和试剂溶液的配制参照 GB/T 45106 执行。

采样过程中样本不应交叉污染，采样及样本前处理过程中须戴一次性手套。

A.2 样本的运输和存放采集或处理的样本在 2~8℃ 条件下保存应不超过 24 h，若需长期保存，应置于-70℃ 以下冰箱，但避免反复冻融（冻融不超过 3 次，长期保存不超过 2 年）。

A.3 荧光定量 PCR 检测方法 A.4.1 设备器材

荧光定量 PCR 仪、生物安全柜、台式低温高速离心机、涡旋振荡器、微量可调移液器及配套枪头、无 RNase PCR 八联管、离心管。

A.4.2 试剂

DNA 提取试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒、无 RNase 水均采用市售商品化试剂，阳性对照（钩端螺旋体标准株或钩端螺旋体阳性动物肾脏，提取总 DNA 后稀释至 10 ng/ μL）和阴性对照（钩端螺旋体阴性动物肾脏，提取总 DNA 后稀释至 10 ng/ μL）由实验室按要求制备，-20℃ 保存。

A.4.3 提取 DNA

采用商品化 DNA 提取试剂盒提取样本 DNA，参照核酸提取试剂盒说明书进行阳性对照、阴性对照和样本 DNA 的提取。样本处理应在生物安全柜中进行，并避免气溶胶污染。提取后的 DNA 宜尽快进行下一步 PCR 反应，若暂时不能进行下一步，应于-70℃ 保存备用。

A.4.4 引物

荧光定量 PCR 检测引物和探针按照表 A.1 的序列合成，引物和探针加无 RNase 水配制成 10 μmol/L 储备液，于-20 ℃ 及以下低温保存。

表 A.1 钩端螺旋体荧光定量 PCR 扩增引物和探针

引物名称 ^a	引物序列 (5'→3') ^a	产物 ^a 大小 ^a
正向引物 ^a	GCAACTAAACAACCTGACGCTAGG ^a	110bp ^a
反向引物 ^a	GTTGAAAAGAATTGGGATGAGG ^a	
探针 ^a	FAM-TAAACCTATTTCGGAGAGAACCAGCTATC-BHQ1 ^a	
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。 ^a		

A.4.5 荧光定量 PCR 扩增体系

荧光定量 PCR 反应体系按照表 A.2 进行配制，反应液的配制应在冰浴上操作。每次反应均应设立阳性对照、阴性对照和空白对照（无核酸对照，即在反应中用无 RNase 水代替模板）。

表 A.2 荧光定量 PCR 反应体系

反应组分	体积	终浓度
2xT5 Fast-qPCR Mix (probe)	10 μ L	1×
正向引物 (10 μ mol/L)	0.4 μ L	200 nmol/L
反向引物 (10 μ mol/L)	0.4 μ L	200 nmol/L
荧光探针 (10 μ mol/L)	0.2 μ L	100 nmol/L
DNA 模板	2 μ L	—
无 RNase 水	7 μ L	—
总体积	20 μ L	—
注：使用其他等效的荧光定量 PCR 检测试剂盒时，反应体系应根据选用的商品化荧光定量 PCR 预混液说明书进行相应的调整。		

A.4.6 荧光定量 PCR 扩增程序：37℃ 2 min 污染消化；95℃ 预变性 30 s；95℃ 变性 10 s；60℃ 退火 30 s，同时采集荧光信号；扩增阶段重复 40 个循环。上述反应条件是以诺唯赞 QN222 荧光定量 PCR 试剂为例，实际反应条件需根据试剂说明书进行调整。

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.5 结果判定 A.5.1 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.5.2 质控标准

阴性对照和空白对照无 Ct 值，且无荧光扩增曲线；阳性对照样品 Ct 值≤35，且有典型的荧光扩增曲线。二者均成立，则满足质控要求，否则此次试验无效，需重测。

A.5.3 结果判定

在质控标准成立的条件下，结果判定如下：

若待检测样本 Ct 值≥40 时，且无荧光扩增曲线，则判定为钩端螺旋体核酸阴性；

若待检测样本有荧光扩增曲线，Ct 值≤35 时，则判定为钩端螺旋体核酸阳性；

若待检测样本有荧光扩增曲线，Ct 值>35 并<40 时，则判定为钩端螺旋体核酸可疑，需重新采样进行检测，若依旧为可疑情况，且有荧光扩增曲线，则样品被判定为核酸阳性，否则判为核酸阴性。

A.5.4 序列测定

必要时，可取阳性 PCR 扩增产物进行序列测定，并与已公开发表的钩端螺旋体核酸特异性片段序列进行同源性比对分析，以确证检测结果。

附录 B

(规范性)

荧光定量 PCR 阳性对照质粒制备

B.1 钩端螺旋体阳性对照质粒参考基因序列钩端螺旋体 23S rDNA 基因片段参考序列以 GenBank 基因库中 CP044513.1、CP006723.1、AE016823.1、CP011931.1、AE010300.2、CP012603.1 参考序列比对后，选取共有的保守区域为参考序列（558bp）：

GAAAGAACGCTCTCCTACCACTCCTTACGGAATCCGTGCCTTCGGCGCCATGCTTAGTCCCGATTACATTTTCGGCGCGGGAGCACTCGACCAGTGAGCTATTACGCACTCTTTAAAGGGTGGCTGCTTCTAAGCCAACCTCCTGGTTGTATATGCGCCCCACATCCTTTGCCACTTAGCATGAACCTTTGGGGCCTTAAACGACGGTCTGGGCTGTTTCCCTTTTGACCACGGAGCTTATCCCCGTAGTCTGACTGCCAGTCTTTGGAGTTACGGTATTCGAAGTTTGATAGGGTTTGGAAGCTTGTGGGCCCCCTAGTCCTTTCAGAGCTCTACCCCC**GCAACTAAACAACTGACGCTAGG**CCTAAACCTATTTTCGGAGAGAACCAGCTATCGCCTGCCTTGATAGGCCTTTCACCCCTATCCACA**CCTCATCCCAATTCTTTTCAAC**CGAAAAAGGGTTCGGTCCTCCAGTGAGTTTACCCACCTTCAACCTGGACATGGATAGCTCGACAGGCTTCGGGTCTATTCCACGCTACTTTAACGCCCTATTAG

注：下划线加粗部分为特异性引物序列。

B.2 荧光定量 PCR 扩增基因参考序列荧光定量 PCR 特异性扩增基因序列（如下 110bp）：

GCAACTAAACAACCTGACGCTAGGCCTAAACCTATTTTCGGAGAGAACCAGCTATCGCCTGCCTTGATAGGCCTTTCACCCCTATCCAC**CCTCATCCCAATTCTTTTCAAC**

注：下划线加粗部分为特异性引物序列。