

ICS 65.020.30

B 44



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 18448.2-200x

代替 GB/T 18448.2-2008

---

## 实验动物 弓形虫检测方法

Laboratory animal—Method for examination of *Toxoplasma gondii*

(征求意见稿)

200X-XX-XX 发布

200X-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

GB/T18448 由 10 项实验动物寄生虫检测方法组成。

本部分为 GB/T 18448 的第 2 部分《实验动物 弓形虫检测方法》。

本部分自发布之日起代替 GB/T18448.2-2008。

本部分与 GB/T18448.2-2008 相比主要技术差异如下：

a) 将实时荧光 PCR 检测方法列入附录内容。

本部分附录 A 是规范性附录。

本部分附录 B 是规范性附录。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会提出并技术归口。

本部分起草单位：北京大学、中国医学科学院实验动物研究所、山西医科大学、重庆医科大学附属儿童医院、杭州医学院。

本部分主要起草人：韦玉生、向志光、李夏莹、田永路、宋国华、黄道超、戴方伟。

本部分修订情况：本部分于 1994 年 1 月首次发布，2001 年第一次修订，2008 年第二次修订，2026 年第二次修订。

# 实验动物 弓形虫检测方法

## 1 范围

GB/T 18448 的本部分描述了实验动物弓形虫的检测方法。

本部分适用于小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬及猴等实验动物的弓形虫的检测。

## 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 14926.50 实验动物酶联免疫吸附试验

GB/T 14926.51 实验动物免疫酶试验

GB/T 14926.52 实验动物免疫荧光试验

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

### 4.1 抗体检测

根据免疫学原理，采用弓形虫抗原检测小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬及猴血清中弓形虫抗体。

### 4.2 核酸检测

弓形虫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

5.1 酶标仪。

5.2 荧光显微镜。

5.3 普通显微镜。

5.4 37℃培养箱或水浴箱，温度控制范围 25℃~100℃。

5.5 普通聚合酶链式反应（PCR）仪。

5.6 荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪，温度误差正负 0.5℃，温度均匀性小于或等于 1℃，平均升温速率和平均降温速率大于或等于 1.5℃/s。

## 6 试剂

## 6.1 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 抗原

### 特异性抗原

弓形虫(RH 株)速殖子腹腔接种 SPF 级以上实验小鼠 (KM、ICR、BALB/c 等均可), 3~5 d 后, 以无菌生理盐水灌洗被接种小鼠的腹腔, 收集含有虫体的小鼠腹腔液, 3000 r/min, 离心 10 min, 取沉淀, PBS 洗 3 次。沉淀物加适量蒸馏水反复冻融 5 次, 或用超声波处理后, 10,000 r/min, 离心 30 min, 取上清液。上清液用葡聚糖凝胶 G200 进行纯化(柱内径×柱高: 1.5 cm×60 cm), 流速为 0.2 mL/min。每管收集 2 mL 左右。共收集 60 管以上。分别测定每个收集管中蛋白在 280 nm 下的吸光度值。分离纯化后, 出现 2 个蛋白峰; 将第一峰各管合并, 即为弓形虫特异性抗原 (也称弓形虫可溶性抗原)。

### 6.1.2 正常抗原

以无菌生理盐水注射 SPF 级以上实验小鼠 (与制备抗原的小鼠同品种或品系) 腹腔, 3~5 d 后, 以无菌生理盐水灌洗被注射小鼠腹腔, 收集小鼠腹腔液, 3000 r/min, 离心 10 min, 取沉淀, PBS 洗 3 次。沉淀物加适量蒸馏水反复冻融 5 次, 或用超声波处理后, 10,000 r/min, 离心 30 min, 取上清液, 即为正常抗原。

## 6.2 抗原片

弓形虫 RH 株速殖子腹腔接种 SPF 级以上实验小鼠 (KM、ICR、BALB/c 等均可), 3~5 d 后处死, 收取虫体, 胰酶消化, 以一定浓度涂片, 充分晾干后, 冷丙酮固定, -20℃保存。

## 6.3 弓形虫抗原致敏绵羊红细胞

将绵羊红细胞与一定浓度的鞣酸液反应, 制成鞣化红细胞, 然后, 用弓形虫可溶性抗原在适宜的条件下致敏鞣化红细胞, 制成弓形虫抗原致敏绵羊红细胞。

## 6.4 正常对照绵羊红细胞

## 6.5 阳性血清

自然感染弓形虫的相应动物抗体阳性血清, 或弓形虫免疫血清。

## 6.6 阴性血清

确证无弓形虫感染的动物血清。

## 6.7 酶结合物

辣根过氧化物酶标记的抗小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬和猴 IgG 抗体; 或辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白 A (SPA)。

## 6.8 荧光标记物

异硫氰酸荧光素等荧光标记物标记的抗小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬和猴 IgG 抗体。

## 6.9 聚合酶链反应(PCR)试剂

6.9.1 无核酸酶去离子水

6.9.2 商品化组织、细胞、全血基因组 DNA 快速提取试剂盒或等效试剂。

6.9.3 PCR 试剂盒或等效试剂。

6.9.4 引物：根据表 1 和表 2 的序列合成引物，引物加无核糖核酸酶(RNase)去离子水分别配制成 10 μmol/L 储备液，-20 °C保存。

表 1 一次 PCR 引物

| 引物名称 | 引物序列（5'-3'）            | 产物大小/bp |
|------|------------------------|---------|
| 正向引物 | GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG | 194     |
| 反向引物 | TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC   |         |

表 2 套式 PCR 引物

| 引物名称     | 引物序列（5'-3'）              | 产物大小/bp |
|----------|--------------------------|---------|
| 正向引物（P1） | GCGAATTCATGTCAGATCCCCCT  | 889     |
| 反向引物（P2） | GTGGATCCTCACGCGACACAAGCT |         |
| 正向引物（P3） | CGACAGCCGGTCATTCTC       | 520     |
| 反向引物（P4） | GCAACCAGTCAGCGTCGTCC     |         |

6.10 实时荧光定量聚合酶链反应（PCR）试剂

6.10.1 无核酸酶去离子水。

6.10.2 DNA 抽提试剂或试剂盒。

6.10.3 实时荧光定量 PCR 试剂盒或等效试剂。

6.9.4 引物和探针：根据表 3 的序列合成引物和探针，引物和探针加无核糖核酸酶(RNase)去离子水分别配制成 10 μmol/L 储备液，-20 °C保存。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物和探针

| 引物名称                                                    | 引物序列（5'-3'）                       | 产物大小/bp |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|
| 正向引物                                                    | GGCTTGGCTGCTTTTCCTG               | 123     |
| 反向引物                                                    | TGTCTCCCTCGCCCTCTTCT              |         |
| 探针                                                      | FAM-TGGAAAAAGAGACACCGGAATGCG-BHQ1 |         |
| 注：探针也能选用具有与 FAM 和 BHQ1 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 血清的采集按照 GB/T 14926.42 中 4.3 血清采样要求操作。其他样本的采集，按照附录 B 操作。

7.2 采用 ELISA 方法，按照 GB/T 14926.50 操作。

7.3 采用免疫荧光法（IFA），按照 GB/T 14926.52 操作。

7.4 采用免疫酶染色试验（IEA），按照 GB/T 14926.51 操作

7.5 采用间接血凝法（IHA），按照 附录 A 操作。

7.6 采用 PCR 方法和实时荧光 PCR 进行核酸检测，按照附录 B 操作。

## 8 结果判定

### 8.1 ELISA/IFA/IEA

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 IHA

小于或等于 1:16 判为阴性；1:32 判为可疑；等于或大于 1:64 判为阳性。

### 8.3 PCR 结果判定

对阳性结果，用同一种方法或实时荧光 PCR 重试。如仍为阳性，则判为阳性。

### 8.4 实时荧光 PCR 结果判定

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

(规范性附录)

### 弓形虫间接血凝法检测方法

#### A.1 材料和试剂

按照 6.3-6.6 进行材料和试剂的准备。

#### A.2 样品的采集

A.2.1 采血约 1 mL (小鼠、大鼠、地鼠眶静脉窦采血；豚鼠心脏采血；兔耳部采血；犬和猴后肢静脉采血)，凝血试管斜放待凝，置 4℃冰箱 2 h。

A.2.2 2 h 后，从冰箱中取出凝血试管，轻轻吸取血清移入另一试管中。

A.2.3 将分离出的血清置 56℃水浴中灭活 30 min，备用。

#### A.3 加样

在微量反应板上，依次对每份血清进行倍比稀释，每份血清稀释两横排，每孔留量为 25 μL。同时设阳性对照、阴性对照和空白对照。

#### A.4 加致敏红细胞

第一横排滴加弓形虫致敏红细胞 25 μL，第二横排滴加正常对照绵羊红细胞 25 μL。将加好样品的微量反应板置于振荡器上振荡 3 min~5 min，使致敏红细胞与待检的稀释血清充分混合，置 15~28℃室温下过夜后判定结果。

#### A.5 结果记录

在对照系统（阴性血清对照、阳性血清对照、空白对照）成立的条件下判定结果。

红细胞呈膜状均匀沉于孔底，中央无沉点或沉点小如针尖，记为“++++”。

红细胞虽呈膜状沉着，但颗粒较粗，中央沉点较大，记为“+++”。

红细胞部分呈膜状沉着，周围有凝集团点，中央沉点大，记为“++”。

红细胞沉集于中心，周围有少量颗粒状沉着物，记为“+”。

红细胞沉集于中心，周围无沉着物，分界清楚，记为“-”。

#### A.6 结果判定

出现“++”孔的血清最高稀释倍数定为本间接血凝试验的凝集效价。小于或等于 1:16 判为阴性；1:32 判为可疑；等于或大于 1:64 判为阳性。

## 附录 B

(规范性附录)

### 弓形虫普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法

#### B.1 材料和试剂

按照 6.9 和 6.10 进行材料和试剂的准备。

#### B.2 样本的采集

##### B.2.1 血液和脏器组织的采集

按照 GB/T 14926.42 的一般要求, 将活体动物安乐死后剖检, 采集弓形虫主要富集的部位, 例如血液、肝、脾、子宫、肾脏等; 疑似患病动物的粪便样品采集应注意生物安全防护。

##### B.2.2 腹水的采集

动物麻醉或者安乐死之后, 用生理盐水冲洗腹腔, 收集腹腔液。

##### B.2.3 样本的运输和存放

样本采集后应密封、加冰并尽快运送到检测实验室。在 2℃~8℃条件下暂存应不超过 24 h, 若不能立即检测应-20℃保存, 若需长期保存, 需置于-80℃冰箱, 避免反复冻融(冻融不超过 3 次)。

#### B.3 样本 DNA 的提取

根据核酸提取技术要求或核酸提取试剂的要求提取 DNA。DNA 的提取操作应在生物安全柜中进行, 避免气溶胶污染。制备好的 DNA 应尽快进行下一步反应, 若暂时不能进行, 应于-20℃冰箱保存备用。

#### B.4 一次 PCR

##### B.4.1 反应体系

按照表 B.1 进行的设立。反应液的配制在冰上操作, 每次反应同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

表 B.1 一次 PCR 反应体系配制

| 反应组分                       | 用量/ $\mu\text{L}$ | 终浓度/(nmol/L) |
|----------------------------|-------------------|--------------|
| 2 $\times$ PCR 预混液 (含酶)    | 25                | 1 $\times$   |
| P1 (10 $\mu\text{mol/L}$ ) | 1                 | 10 pmol/L    |
| P2 (10 $\mu\text{mol/L}$ ) | 1                 | 10 pmol/L    |
| DNA 模板                     | 3-5               | --           |
| 去离子水                       | 18-20             | --           |

表 B.1 一次 PCR 反应体系配制（续）

|     |    |  |
|-----|----|--|
| 总体积 | 50 |  |
|-----|----|--|

#### B.4.2 反应参数

一次 PCR 反应参数按照表 B.2 设置。

表 B.2 一次 PCR 反应参数

| 步骤  | 温度/°C | 时间    | 循环数 |
|-----|-------|-------|-----|
| 预变性 | 94    | 3 min | 1   |
| 变性  | 94    | 30 s  | 41  |
| 退火  | 60    | 30 s  |     |
| 延伸  | 72    | 30 s  |     |
| 延伸  | 72    | 7 min | 1   |

#### B.4.3 结果判断

在阳性、阴性对照成立的条件下，即阳性对照的扩增产物经电泳检测可见到 194 bp 扩增条带，阴性对照的扩增产物经电泳检测未见到 194 bp 扩增时，可判定弓形虫检测结果。

B.4.3.1 琼脂糖凝胶电泳板在紫外灯检测仪上观察到 194 bp 扩增条带，弓形虫检测阳性；

B.4.3.2 琼脂糖凝胶电泳板在紫外灯检测仪上未观察到 194 bp 扩增条带，弓形虫检测阴性。

#### B.5 套式 PCR

##### B.5.1 反应体系

第一次扩增按照表 B.3 进行体系配置，第二次扩增按照表 B.4 进行体系配置。反应液的配制在冰上操作，每次反应同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

表 B.3 套式 PCR 第一次扩增反应体系配制

| 反应组分           | 用量/μL | 终浓度/(nmol/L) |
|----------------|-------|--------------|
| 2×PCR 预混液（含酶）  | 25    | 1×           |
| P1 (10 μmol/L) | 1     | 10 pmol/L    |
| P2 (10 μmol/L) | 1     | 10 pmol/L    |
| DNA 模板         | 1-2   | --           |
| 去离子水           | 22-23 | --           |
| 总体积            | 50    | --           |

表 B.4 套式 PCR 第二次扩增反应体系配制

| 反应组分                       | 用量/ $\mu\text{L}$ | 终浓度/ (nmol/L) |
|----------------------------|-------------------|---------------|
| 2 $\times$ PCR 预混液 (含酶)    | 25                | 1 $\times$    |
| P1 (10 $\mu\text{mol/L}$ ) | 1                 | 10 pmol/L     |
| P2 (10 $\mu\text{mol/L}$ ) | 1                 | 10 pmol/L     |
| 第一次扩增产物                    | 1-2               | --            |
| 去离子水                       | 22-23             | --            |
| 总体积                        | 50                | --            |

### B.5.2 反应参数

套式 PCR 反应参数按照表 B.5 设置。

表 B.5 套式 PCR 反应参数

| 步骤  | 温度/ $^{\circ}\text{C}$ | 时间    | 循环数 |
|-----|------------------------|-------|-----|
| 预变性 | 94                     | 3 min | 1   |
| 变性  | 94                     | 1 min | 30  |
| 退火  | 55                     | 1 min |     |
| 延伸  | 72                     | 2 min |     |
| 延伸  | 72                     | 8 min | 1   |

### B.5.3 结果判断

阳性、阴性对照成立的条件下，即阳性对照的第一次扩增产物经第二次扩增后，电泳检测，可以见到有 520 bp 的扩增带；阴性对照未见到相应扩增带，可判定弓形虫检测结果。

B.5.3.1 第一次扩增后产物经第二次扩增后见到有 520 bp 的扩增带，弓形虫检测阳性。

B.5.3.2 第一次扩增后产物经第二次扩增后未见到有 520 bp 的扩增带，弓形虫检测阴性。

## B.6 实时荧光定量 PCR

### B.6.1 反应体系

按照表 B.6 进行的设立。反应液的配制在冰上操作，每次反应同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

表 B.6 实时荧光定量 PCR 扩增反应体系配制

| 反应组分                    | 用量/ $\mu\text{L}$ | 终浓度/ (nmol/L) |
|-------------------------|-------------------|---------------|
| 2 $\times$ 实时荧光 PCR 预混液 | 10                | 1 $\times$    |

表 B.6 实时荧光定量 PCR 扩增反应体系配制（续）

|                    |     |            |
|--------------------|-----|------------|
| 正向引物(10 μmol/L)    | 0.6 | 300 nmol/L |
| 反向引物(10 μmol/L)    | 0.6 | 300 nmol/L |
| 探针（10 μmol/L）      | 0.3 | 150 nmol/L |
| DNA 模板             | 2   | 25 ng/ μ L |
| 50×6-羧基-X-罗丹明(ROX) | 0.4 | --         |
| 去离子水               | 补足  | --         |
| 总体积                | 20  |            |

### B.6.2 反应参数

实时荧光定量 PCR 反应参数按照表 B.7 设置。

表 B.7 实时荧光定量 PCR 反应参数

| 步骤    | 温度/°C | 时间    | 采集荧光信号 | 循环数 |
|-------|-------|-------|--------|-----|
| 预变性   | 95    | 3 min | 否      | 1   |
| 变性    | 95    | 10 s  | --     | 40  |
| 退火、延伸 | 53    | 30 s  | 是      |     |

注：使用其他等效的实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂盒进行，反应体系和反应参数进行相应调整。试验结束后，根据收集的荧光曲线和扩增循环数(Ct 值)判定结果。

### B.6.3 结果判断

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品扩增曲线的最高点为准。记录扩增曲线和单个样本的 Ct 值。

质控标准：

空白对照无 Ct 值，且无荧光扩增曲线。

阴性对照无 Ct 值，且无荧光扩增曲线。

阳性对照 Ct 值≤35，且有明显的荧光扩增曲线，则满足质控要求；否则此次试验无效，需重测。

B.5.2.1 质控成立条件下，若待检测样本无荧光扩增曲线，则判定为阴性。

B.5.2.2 质控成立条件下，若待检测样本有荧光扩增曲线，且 Ct 值≤35 时，则判定为阳性。

B.5.2.3 质控成立条件下，若待检测样本 Ct 值介于 35 和 40 之间时，则判定为可疑。

B.5.2.4 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弓形虫特

异性片段序列进行比对，以确证检测结果。

**B.7 注意事项：**

B.7.1 整个检测工作应遵循 PCR 实验室规范，加强安全防护，应有四个隔开的工作区域，分别从事试剂储存和准备、标本制备、扩增和扩增产物分析，以避免发生潜在的交叉污染。

B.7.2 整个检测工作应加强生物安全防护意识，特别是由虫蛛攻击小鼠产生阳性腹水，并制备模板 DNA 的工作，必须在生物安全防护 2 级的条件下进行。

---