



中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.1~14926.6—2001
GB/T 14926.8~14926.17—2001
GB/T 14926.41—2001
GB/T 14926.44~14926.49—2001

实验动物 微生物学检测方法(2)

Laboratory animal—Microbiological examination methods

2001-08-29 发布

2002-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

目 录

GB/T 14926.1—2001	实验动物	沙门菌检测方法	1
GB/T 14926.2—2001	实验动物	单核细胞增生性李斯特杆菌检测方法	5
GB/T 14926.3—2001	实验动物	耶尔森菌检测方法	9
GB/T 14926.4—2001	实验动物	皮肤病原真菌检测方法	13
GB/T 14926.5—2001	实验动物	多杀巴斯德杆菌检测方法	17
GB/T 14926.6—2001	实验动物	支气管鲍特杆菌检测方法	21
GB/T 14926.8—2001	实验动物	支原体检测方法	25
GB/T 14926.9—2001	实验动物	鼠棒状杆菌检测方法	30
GB/T 14926.10—2001	实验动物	泰泽病原体检测方法	34
GB/T 14926.11—2001	实验动物	大肠埃希菌 O115a,c:K(B)检测方法	39
GB/T 14926.12—2001	实验动物	嗜肺巴斯德杆菌检测方法	42
GB/T 14926.13—2001	实验动物	肺炎克雷伯杆菌检测方法	46
GB/T 14926.14—2001	实验动物	金黄色葡萄球菌检测方法	50
GB/T 14926.15—2001	实验动物	肺炎链球菌检测方法	54
GB/T 14926.16—2001	实验动物	乙型溶血性链球菌检测方法	58
GB/T 14926.17—2001	实验动物	绿脓杆菌检测方法	62
GB/T 14926.41—2001	实验动物	无菌动物生活环境及粪便标本的检测方法	66
GB/T 14926.44—2001	实验动物	念珠状链杆菌检测方法	69
GB/T 14926.45—2001	实验动物	布鲁杆菌检测方法	73
GB/T 14926.46—2001	实验动物	钩端螺旋体检测方法	78
GB/T 14926.47—2001	实验动物	志贺菌检测方法	83
GB/T 14926.48—2001	实验动物	结核分枝杆菌检测方法	87
GB/T 14926.49—2001	实验动物	空肠弯曲杆菌检测方法	90

前 言

本标准规定了犬型钩端螺旋体的检测方法。

本标准由中华人民共和国科学技术部提出并归口。

本标准起草单位：中国实验动物学会。

本标准主要起草人：范薇。

中华人民共和国国家标准

实验动物 钩端螺旋体检测方法

GB/T 14926.46—2001

Laboratory animal—Method for examination of *Leptospira* sp.

1 范围

本标准规定了实验动物钩端螺旋体的检测方法。

本标准适用于犬型钩端螺旋体的检测。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 14926.42—2001 实验动物 细菌学检测 标本采集

GB/T 14926.43—2001 实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂

GB/T 14926.50—2001 实验动物 酶联免疫吸附试验

3 原理

钩端螺旋体抗原与待检血清中的特异性抗体结合,产生凝集反应和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。

4 主要设备和材料

- 4.1 普通恒温培养箱。
- 4.2 实体显微镜。
- 4.3 恒温水浴箱。
- 4.4 高速离心机。
- 4.5 超声波细胞粉碎器。
- 4.6 酶标仪。
- 4.7 微量加样器,容量 5~50 μL 和 50~200 μL 。

5 培养基及试剂

- 5.1 犬型钩端螺旋体标准抗原。
- 5.2 标准阳性血清。
- 5.3 标准阴性血清。
- 5.4 生理盐水。
- 5.5 ELISA 抗原。
- 5.5.1 钩端螺旋体培养

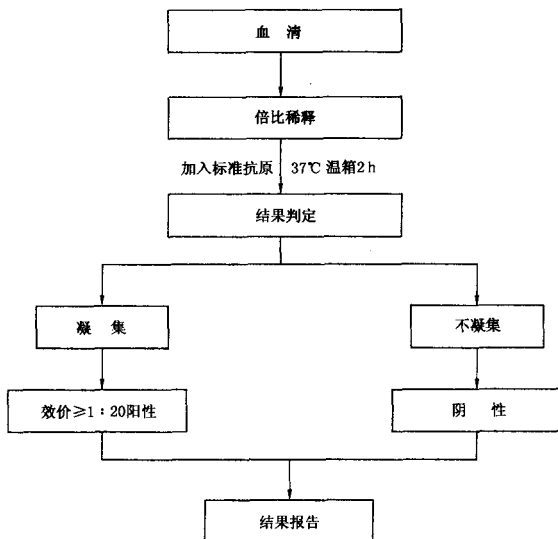
各群钩端螺旋体标准株接种 Korthof 培养基, 28℃ 培养 5~7 d。

- 5.5.2 生长良好的培养物用 10 000 r/min 离心 30 min, 沉淀用 PBS 在相同条件下洗 2 次。
- 5.5.3 上述沉淀用 PBS 悬浮, 超声波打碎后, 10 000 r/min 离心 20 min, 上清即为 ELISA 抗原。
- 5.6 酶结合物
辣根过氧化物酶标记羊或兔抗犬 IgG 抗体, 辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白 A (SPA)。
- 5.7 阳性血清
钩端螺旋体免疫 SPF 犬所获得的血清, 或自然感染后所获得的血清。
- 5.8 阴性血清
无钩端螺旋体感染犬血清。
- 5.9 其他试剂溶液的配制见 GB/T 14926.50—2001。

6 检测方法

6.1 试管凝集实验

6.1.1 检测程序



6.1.2 操作步骤

6.1.2.1 采样

采血、分离血清。

6.1.2.2 血清稀释

参照表 1 进行。

将待检血清以 56℃ 水浴灭活 30 min 后备用。取 96 孔板, 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。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。

6.1.2.3 对照

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。

6.1.2.4 加入抗原

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。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。

表 1 钩端螺旋体定量凝集试验操作方法

凹孔板编号	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			

6.1.2.5 结果判定

++++: 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。

+++ : 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。

++ : 50% 左右的钩端螺旋体被凝集, 尚有 50% 菌体游离。

+ : 25% 左右的钩端螺旋体被凝集, 尚有 75% 菌体游离。

— : 全部菌体正常, 分散, 无凝集块, 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。

6.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)

6.2.1 包被抗原

根据滴定的最适工作浓度, 将抗原用包被液稀释。每孔 100 μ L, 置 37℃ 1 h 后再 4℃ 过夜。

6.2.2 用洗涤液洗 5 次, 每次 3 min, 叩干。

6.2.3 加样

待检血清和阴性、阳性血清分别用稀释液做 1:40 稀释, 每孔 100 μ L, 37℃ 1 h, 洗涤同上。

6.2.4 加酶结合物

用稀释液将酶结合物稀释至适当浓度, 每孔加入 100 μ L, 37℃ 1 h, 洗涤同上。

6.2.5 加底物溶液

每孔加入新配制的底物溶液 100 μ L, 置 37℃, 避光显色 10~15 min。

6.2.6 终止反应

每孔加入终止液 50 μ L。

6.2.7 测 A 值

在酶标仪上, 于 490 nm 处读出各孔 A 值。

6.2.8 结果判定

在阴性和阳性血清对照成立的条件下, 进行结果判定。

6.2.8.1 同时符合下列 2 个条件者, 判为阳性。

a. 待检血清的 A 值 ≥ 0.2 ;

b. 待检血清的 A 值/阴性对照血清的 A 值 ≥ 2.1 。

6.2.8.2 均不符合上述 2 个条件者, 判为阴性。

6.2.8.3 仅有1条符合者,判为可疑,需重试。如为阳性则判为阳性。

6.2.8.4 对阳性结果需重试,如再为阳性则判为阳性。

7 结果报告

凡符合上述各项检测结果者作出阳性报告,不符合者作出阴性报告。
