

DB11

北京市地方标准

DB11/T 1809—2020

代替 DB11/T 828.1—2011, DB11/T 1053.1—2013, DB11/T 1459.1—2017, DB11/T 1459.2—2017,
DB11/T 1459.3—2017, DB11/T 1459.4—2018, DB11/T 1459.5—2018

实验动物 微生物检测

Laboratory animal—Microbiological testing

2020 - 12 - 24 发布

2021 - 04 - 01 实施

北京市市场监督管理局

发布

目 次

| | |
|--------------------------------------|----|
| 前言..... | II |
| 1 范围..... | 1 |
| 2 规范性引用文件..... | 1 |
| 3 术语和定义..... | 4 |
| 4 等级分类..... | 4 |
| 5 检测要求..... | 4 |
| 6 检测程序..... | 12 |
| 7 检测方法..... | 15 |
| 8 检测规则..... | 20 |
| 9 结果判定..... | 21 |
| 10 结论与报告..... | 21 |
| 附录 A（规范性） 猫泛白细胞减少症病毒 PCR 检测方法..... | 23 |
| 附录 B（规范性） 猫杯状病毒 RT-PCR 检测方法..... | 24 |
| 附录 C（规范性） 猫疱疹病毒 I 型 PCR 检测方法..... | 26 |
| 附录 D（规范性） 猫免疫缺陷病毒荧光 PCR 检测方法..... | 27 |
| 附录 E（规范性） 猫传染性腹膜炎病毒 RT-PCR 检测方法..... | 29 |
| 附录 F（规范性） 猫肠道冠状病毒 RT-PCR 检测方法..... | 31 |
| 附录 G（规范性） 猫白血病病毒荧光 PCR 检测方法..... | 33 |
| 附录 H（规范性） 巴尔通体荧光 PCR 检测方法..... | 35 |
| 附录 I（规范性） 空肠弯曲杆菌 PCR 检测方法..... | 36 |
| 附录 J（规范性） 鸽痘病毒荧光 PCR 检测方法..... | 37 |
| 附录 K（规范性） 实验鱼 4 种分枝杆菌的区分鉴定方法..... | 38 |
| 附录 L（规范性） 实验鱼 PCR 检测方法..... | 39 |
| 参考文献..... | 40 |

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。

本文件代替DB11/T 828.1—2011《实验用小型猪 第1部分：微生物学等级及监测》、DB11/T 1053.1—2013《实验用鱼 第1部分：微生物学等级及监测》、DB11/T 1459.1—2017《实验动物 微生物学等级及监测 第1部分：实验用猪》、DB11/T 1459.2—2017《实验动物 微生物学等级及监测 第2部分：实验用牛》、DB11/T 1459.3—2017《实验动物 微生物学等级及监测 第3部分：实验用羊》、DB11/T 1459.4—2018《实验动物 微生物检测与评价 第4部分：实验用狨猴》、DB11/T 1459.5—2018《实验动物 微生物检测与评价 第5部分：实验用长爪沙鼠》，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了“高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒”的检测要求（见 5.2.1，DB11/T 1459.1—2017 的 5.2）；
- b) 增加了“实验雪貂、实验猫、实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽”微生物检测内容（见 5.2.5、5.2.6、5.2.7）；
- c) 更改了“副猪嗜血杆菌、猪水泡病病毒、牛白血病病毒”的检测方法（见 7.1、7.2，DB11/T 1459.1—2017 的 7、DB11/T 828.1—2011 的 7、DB11/T 1459.2—2017 的 7）。

本文件由北京市科学技术委员会提出并归口。

本文件由北京市科学技术委员会组织实施。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、中国兽医药品监察所、国家卫生健康委科学技术研究所、中国科学院水生生物研究所、中国动物疫病预防控制中心、中国人民解放军军事科学院军事医学研究院实验动物中心、北京实验动物研究中心、首都医科大学、浙江省医学科学院、中国医学科学院医学实验动物研究所、北京康蓝生物技术有限公司、北京市实验动物管理办公室、北京实验动物行业协会、北京市标准化研究院。

本文件主要起草人：岳秉飞、王淑菁、冯育芳、李晓波、邢进、王吉、付瑞、贺争鸣、姚文生、康凯、任小侠、印春生、范学政、吴思捷、张莹辉、赵俊杰、刘莹、程君生、薛麟、李根平、王锡乐、刘文菊、樊子风、李爱华、崔宗斌、孙德明、王天奇、田克恭、范薇、巩薇、遇秀玲、卢胜明、刘云波、魏强、向志光、佟巍、张丽芳、阮研硕、李长龙、萨晓婴、戴方伟、陈振文、杜小燕。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——首次发布分别为DB11/T 828.1—2011、DB11/T 1053.1—2013、DB11/T 1459.1—2017、DB11/T 1459.2—2017、DB11/T 1459.3—2017、DB11/T 1459.4—2018、DB11/T 1459.5—2018；

——本次为第一次修订。

实验动物 微生物检测

1 范围

本文件规定了实验动物的微生物等级分类、检测要求、检测程序、检测方法、检测规则、结果判定、结论与报告。

本文件适用于实验小型猪、实验猪、实验牛、实验羊、实验狨猴、实验长爪沙鼠、实验雪貂、实验猫、实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽、实验鱼（斑马鱼和剑尾鱼）的微生物检测。

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 4789.7 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验
- GB 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数
- GB/T 14926.1 实验动物 沙门菌检测方法
- GB/T 14926.3 实验动物 耶尔森菌检测方法
- GB/T 14926.4 实验动物 皮肤病原真菌检测方法
- GB/T 14926.5 实验动物 多杀巴斯德杆菌检测方法
- GB/T 14926.6 实验动物 支气管鲍特杆菌检测方法
- GB/T 14926.8 实验动物 支原体检测方法
- GB/T 14926.10 实验动物 泰泽病原体检测方法
- GB/T 14926.11 实验动物 大肠埃希菌 O115a, c:K(B) 检测方法
- GB/T 14926.12 实验动物 嗜肺巴斯德杆菌检测方法
- GB/T 14926.13 实验动物 肺炎克雷伯杆菌检测方法
- GB/T 14926.14 实验动物 金黄色葡萄球菌检测方法
- GB/T 14926.15 实验动物 肺炎链球菌检测方法
- GB/T 14926.16 实验动物 乙型溶血性链球菌检测方法
- GB/T 14926.17 实验动物 绿脓杆菌检测方法
- GB/T 14926.18 实验动物 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒检测方法
- GB/T 14926.19 实验动物 汉坦病毒检测方法
- GB/T 14926.22 实验动物 小鼠肝炎病毒检测方法
- GB/T 14926.23 实验动物 仙台病毒检测方法
- GB/T 14926.24 实验动物 小鼠肺炎病毒检测方法
- GB/T 14926.25 实验动物 呼肠孤病毒 III 型检测方法

- GB/T 14926.28 实验动物 小鼠细小病毒检测方法
- GB/T 14926.46 实验动物 钩端螺旋体检测方法
- GB/T 14926.47 实验动物 志贺菌检测方法
- GB/T 14926.48 实验动物 结核分枝杆菌检测方法
- GB/T 14926.49 实验动物 空肠弯曲杆菌检测方法
- GB/T 14926.56 实验动物 狂犬病病毒检测方法
- GB/T 14926.57 实验动物 犬细小病毒检测方法
- GB/T 14926.59 实验动物 犬瘟热病毒检测方法
- GB/T 14926.60 实验动物 猕猴疱疹病毒 I 型 (B 病毒) 检测方法
- GB/T 14926.62 实验动物 猴免疫缺陷病毒检测方法
- GB/T 14926.63 实验动物 猴 T 淋巴细胞趋向性病毒 I 型检测方法
- GB/T 14926.64 实验动物 猴痘病毒检测方法
- GB/T 16551 猪瘟诊断技术
- GB/T 17999.1 SPF 鸡 微生物学监测 第 1 部分: SPF 鸡 微生物学监测总则
- GB/T 17999.5 SPF 鸡 微生物学监测 第 5 部分: SPF 鸡 琼脂扩散试验
- GB/T 17999.6 SPF 鸡 微生物学监测 第 6 部分: SPF 鸡 酶联免疫吸附试验
- GB/T 18089 蓝舌病病毒分离、鉴定及血清中和抗体检测技术
- GB/T 18090 猪繁殖与呼吸综合征诊断方法
- GB/T 18637 牛病毒性腹泻/粘膜病诊断技术规范
- GB/T 18638 流行性乙型脑炎诊断技术
- GB/T 18641 伪狂犬病诊断方法
- GB/T 18646 动物布鲁氏菌病诊断技术
- GB/T 18652 致病性嗜水气单胞菌检验方法
- GB/T 18653 胎儿弯曲杆菌的分离鉴定方法
- GB/T 18935 口蹄疫诊断技术
- GB/T 19915.7 猪链球菌 2 型荧光 PCR 检测方法
- GB/T 21674 猪圆环病毒聚合酶链反应试验方法
- GB/T 27517 鉴别猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株复合 RT-PCR 方法
- GB/T 27528 口蹄疫病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法
- GB/T 27530 牛出血性败血症诊断技术
- GB/T 27539 动物流感检测 A 型流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测方法
- GB/T 27637 副结核分枝杆菌实时荧光 PCR 检测方法
- GB/T 27639 结核病原菌实时荧光 PCR 检测方法
- GB/T 27981 牛传染性鼻气管炎病毒实时荧光 PCR 检测方法
- GB/T 27982 小反刍兽疫诊断技术
- GB/T 34750 副猪嗜血杆菌检测方法
- GB/T 36789 动物狂犬病病毒核酸检测方法

- NY/T 536 鸡伤寒和鸡白痢诊断技术
- NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
- NY/T 543 牛流行热微量中和试验方法
- NY/T 544 猪流行性腹泻诊断技术
- NY/T 546 猪传染性萎缩性鼻炎诊断技术
- NY/T 548 猪传染性胃肠炎诊断技术
- NY/T 550 动物和动物产品沙门氏菌检测方法
- NY/T 560 小鹅瘟诊断技术
- NY/T 561 动物炭疽诊断技术
- NY/T 562 动物衣原体病诊断技术
- NY/T 563 禽霍乱（禽巴氏杆菌病）诊断技术
- NY/T 566 猪丹毒诊断技术
- NY/T 576 绵羊痘和山羊痘诊断技术
- NY/T 1186 猪支原体肺炎诊断技术
- NY/T 1244 接触传染性脓疱皮炎诊断技术
- NY/T 1247 禽网状内皮增生病诊断技术
- NY/T 1468 丝状支原体山羊亚种检测方法
- NY/T 3072 禽结核病诊断技术
- SC/T 7201.2 鱼类细菌病检疫技术规程 第2部分：柱状嗜纤维菌烂鳃病诊断方法
- SC/T 7201.3 鱼类细菌病检疫技术规程 第3部分：嗜水气单胞菌及豚鼠气单胞菌肠炎病诊断方法
- SC/T 7201.4 鱼类细菌病检疫技术规程 第4部分：荧光假单胞菌赤皮病诊断方法
- SN/T 1087 Q热检疫技术规范
- SN/T 1171 山羊关节炎-脑炎和绵羊梅迪-维斯纳病检疫技术规范
- SN/T 1172 鸡白血病检疫技术规范
- SN/T 1173 鸡病毒性关节炎检疫技术规范
- SN/T 1207 猪痢疾检疫技术规范
- SN/T 1315 牛地方流行性白血病检疫技术规范
- SN/T 1447 猪传染性胸膜肺炎检疫技术规范
- SN/T 1554 鸡法氏囊病检疫技术规范
- SN/T 1869 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR法
- SN/T 1919 猪细小病毒病检疫技术规范
- SN/T 2439 鱼鳃霉病检疫技术规范
- SN/T 2552.8 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第8部分：普通变形杆菌和奇异变形杆菌检验
- SN/T 2702 猪水泡病检疫技术规范
- SN/T 2744 鸭病毒性肠炎检疫技术规范
- SN/T 2847 水貂阿留申病检疫技术规范

- SN/T 3392 国境口岸莱姆病螺旋体检验规程
- SN/T 3464 鸭病毒性肝炎 I 型检疫技术规范
- SN/T 3484 绵羊肺腺瘤病检疫技术规范
- SN/T 3724 进出口食品中幽门螺杆菌的检验方法
- SN/T 4556 鸭疫里默氏菌病检疫技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验动物 laboratory animal

经人工饲养，对其携带的微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产和检定以及其他科学实验的动物。

[来源：GB 14925—2010，3.1]

3.2

普通级实验动物 conventional (CV) laboratory animal

不携带所规定的人兽共患病病原、动物烈性传染病病原以及对科学实验有重大干扰的病原的实验动物。

3.2.1

无特定抗原抗体普通级实验动物 specific antigen & antibody-free conventional (CV) laboratory animal

普通级实验动物中未免疫特定的疫苗，且经检测不携带实验要求排除的特定病原微生物抗原抗体的实验动物。

3.3

无特定病原体级实验动物 specific pathogen free (SPF) laboratory animal

除普通级实验动物应排除的病原外，不携带主要潜在感染或条件致病和对科学实验干扰大的病原的实验动物。

3.4

无菌级实验动物 germ free (GF) laboratory animal

无可检出的一切生命体的实验动物。

4 等级分类

根据对微生物和寄生虫控制的程度，实验动物分为普通级实验动物、无特定病原体级实验动物和无菌级实验动物三个等级。

5 检测要求

5.1 外观检查

对待检实验动物的精神状态、行为、被毛、天然孔分泌物进行外观检查。

5.2 微生物检测项目

5.2.1 实验猪和实验小型猪各等级病原微生物检测项目按照表 1 的规定执行。

表 1 实验猪和实验小型猪各等级病原微生物检测项目

| 动物等级 | 病原微生物 | 实验猪检测要求 | 实验小型猪检测要求 |
|--|--|---------|-----------|
| 普通级 | 日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus) | ▲ | ▲ |
| | 猪链球菌 2 型 (Streptococcus suis serotype 2) | ▲ | - |
| | 口蹄疫病毒 (Food and mouth disease virus) | ▲ | ▲ |
| | 猪瘟病毒 (Classical swine fever virus) | ▲ | ▲ |
| | 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus) | ● | - |
| | 布鲁氏菌 (Brucella) | ▲ | ● |
| | 钩端螺旋体 (Leptospira) | ○ | ○ |
| | 红斑丹毒丝菌 (Erysipelothrix rhusiopathiae) | ○ | - |
| | 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) | - | ▲ |
| | 皮肤病原真菌 (Pathogenic dermal fungi) | - | ● |
| 无特定病原体级 | 日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus) | ● | ● |
| | 猪链球菌 2 型 (Streptococcus suis serotype 2) | ● | ○ |
| | 口蹄疫病毒 (Food and mouth disease virus) | ● | ● |
| | 猪瘟病毒 (Classical swine fever virus) | ● | ● |
| | 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus) | ● | - |
| | 布鲁氏菌 (Brucella) | ● | ● |
| | 钩端螺旋体 (Leptospira) | ○ | ○ |
| | 红斑丹毒丝菌 (Erysipelothrix rhusiopathiae) | ○ | - |
| | 伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus) | ● | ● |
| | 猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus 2) | ● | ● |
| | 猪细小病毒 (Porcine parvovirus) | ● | ● |
| | 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) | ● | ● |
| | 猪胸膜肺炎放线杆菌 (Actinobacillus pleuropneumoniae) | ● | ● |
| | 猪肺炎支原体 (Mycoplasma hyopneumoniae) | ● | ● |
| 猪痢疾短螺旋体 (Brachyspira hyodysenteriae) | ● | ● | |
| 传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus) | ● | ● | |

表 1 实验猪和实验小型猪各等级病原微生物检测项目（续）

| 动物等级 | 病原微生物 | 实验猪检测要求 | 实验小型猪检测要求 |
|--|--|---------|-----------|
| 无特定病原体级 | 猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus) | ● | - |
| | 支气管败血波氏杆菌 (Bordetella bronchiseptica) | ○ | ● |
| | 多杀性巴氏杆菌 (Pasteurella multocida) | ○ | ● |
| | 副猪嗜血杆菌 (Haemophilus Parasuis) | ○ | - |
| | 皮肤病原真菌 (Pathogenic dermal fungi) | - | ● |
| | 猪水泡病病毒 (Swine vesicular disease virus) | - | ○ |
| | 沙门氏菌 (Salmonella spp.) | - | ○ |
| 无菌级 | 任何可检出的生命体 | ● | ● |
| 注：“▲”表示必检项，普通级实验动物可以免疫，无特定病原体级实验动物和无特定抗原抗体普通级实验动物不可免疫；“●”表示必检项，要求阴性；“○”表示需要时检测项目，要求阴性；“-”表示不检项目。 | | | |

5.2.2 实验牛和实验羊各等级病原微生物检测项目按照表 2 的规定执行。

表 2 实验牛和实验羊各等级病原微生物检测项目

| 动物等级 | 病原微生物 | 实验牛检测要求 | 实验羊检测要求 |
|---------------------------------|--|---------|---------|
| 普通级 | 口蹄疫病毒 (Food and mouth disease virus) | ▲ | ▲ |
| | 布鲁氏菌 (Brucella) | ▲ | ▲ |
| | 牛分枝杆菌 (Mycobacterium bovis) | ● | - |
| | 炭疽芽胞杆菌 (Bacillus anthrac) | ○ | ○ |
| | 钩端螺旋体 (Leptospira) | ○ | ○ |
| | 伯氏疏螺旋体 (Borrelia burgderferi) | ○ | - |
| | 贝氏柯克斯体 (Coxiella burnetii) | ○ | ○ |
| | 小反刍兽疫病毒 (Peste des petits ruminants virus) | - | ▲ |
| 绵羊/山羊痘病毒 (Sheep/Goat pox virus) | - | ▲ | |
| 无特定病原体级 | 口蹄疫病毒 (Food and mouth disease virus) | ● | ● |
| | 布鲁氏菌 (Brucella) | ● | ● |
| | 牛分枝杆菌 (Mycobacterium bovis is) | ● | - |
| | 炭疽芽胞杆菌 (Bacillus anthrac) | ○ | ○ |
| | 钩端螺旋体 (Leptospira) | ○ | ○ |
| | 伯氏疏螺旋体 (Borrelia burgderferi) | ○ | - |
| | 贝氏柯克斯体 (Coxiella burnetii) | ○ | ○ |
| | 牛病毒性腹泻-粘膜病毒 (Bovine viral diarrhea virus) | ● | - |
| | 牛传染性鼻气管炎病毒 (Infectious bovine rhinotracheitis virus) | ● | - |
| | 副结核分枝杆菌 (Mycobacterium paratuberculosis) | ● | ● |
| | 胎儿弯曲杆菌 (Campylobacter fetus) | ● | ● |
| | 多杀性巴氏杆菌 (Pasteurella multocida) | ● | - |
| 牛白血病病毒 (Bovine leukemia virus) | ● | - | |

表2 实验牛和实验羊各等级病原微生物检测项目（续）

| 动物等级 | 病原微生物 | 实验牛检测要求 | 实验羊检测要求 |
|---|--|---------|---------|
| 无特定病原体级 | 衣原体（Chlamydia） | ● | ● |
| | 蓝舌病病毒（Blue tongue virus） | ○ | ○ |
| | 牛流行热病毒（Bovine ephemeral fever virus） | ○ | - |
| | 小反刍兽疫病毒（Peste des petits ruminants virus） | - | ● |
| | 绵羊/山羊痘病毒（Sheep/Goat pox virus） | - | ● |
| | 伪狂犬病病毒（Pseudorabies virus） | - | ● |
| | 山羊支原体（Mycoplasma capricolum） | - | ● |
| | 口疮病毒（Orf virus） | - | ● |
| | 梅迪-维纳斯病毒 ^a （Maedi-visna virus） | - | ○ |
| | 山羊关节炎-脑炎病毒 ^b （Caprine arthritis encephalitis virus） | - | ○ |
| 绵羊肺腺瘤病毒 ^a （Ovine pulmonary adenomatosis virus） | - | ○ | |
| 无菌级 | 任何可检出的生命体 | ● | ● |
| <p>注：“▲”表示必检项，普通级实验动物可以免疫，无特定病原体级实验动物和无特定抗原抗体普通级实验动物不可免疫；“●”表示必检项，要求阴性；“○”表示需要时检测项目，要求阴性；“-”表示不检项目。</p> <p>^a 仅适用于实验绵羊；</p> <p>^b 仅适用于实验山羊。</p> | | | |

5.2.3 实验狨猴各等级病原微生物检测项目按照表3的规定执行。

表3 实验狨猴各等级病原微生物检测项目

| 动物等级 | 病原微生物 | 检测要求 |
|---------|---|------|
| 普通级 | 猕猴疱疹病毒 I 型（B 病毒）（Cercopithecine Herpesvirus Type 1） | ● |
| | 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒（Lymphocytic Choriomeningitis Virus） | ○ |
| | 沙门氏菌（Salmonella spp.） | ● |
| | 皮肤病原真菌（Pathogenic dermal fungi） | ● |
| | 志贺菌（Shigella spp.） | ● |
| | 结核分枝杆菌（Mycobacterium tuberculosis） | ● |
| 无特定病原体级 | 猕猴疱疹病毒 I 型（B 病毒）（Cercopithecine Herpesvirus Type 1） | ● |
| | 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒（Lymphocytic Choriomeningitis Virus） | ○ |
| | 沙门氏菌（Salmonella spp.） | ● |
| | 皮肤病原真菌（Pathogenic dermal fungi） | ● |
| | 志贺菌（Shigella spp.） | ● |
| | 结核分枝杆菌（Mycobacterium tuberculosis） | ● |
| | 仙台病毒（Sendai virus） | ○ |
| | 猴免疫缺陷病毒（Simian immunodeficiency virus） | ● |
| | 猴 T 淋巴细胞趋向性病毒 1 型（Simian T lymphotropic virus type 1） | ● |
| | 猴痘病毒（Simian pox virus） | ● |
| | 小肠结肠炎耶尔森菌（Yersinia enterocolitica） | ● |

表 3 实验猕猴各等级病原微生物检测项目（续）

| 动物等级 | 病原微生物 | 检测要求 |
|---------|--------------------------------------|------|
| 无特定病原体级 | 空肠弯曲菌（ <i>Campylobacter jejuni</i> ） | ○ |
| 病原体级 | 奇异变形杆菌（ <i>Proteus mirabilis</i> ） | ○ |
| 无菌级 | 任何可检出的生命体 | ● |

注：“●”表示必检项，要求阴性；“○”表示需要时检测项目，要求阴性。

5.2.4 实验长爪沙鼠各等级病原微生物检测项目按照表 4 的规定执行。

表 4 实验长爪沙鼠各等级病原微生物检测项目

| 动物等级 | 病原微生物 | 检测要求 |
|---|--|------|
| 普通级 | 汉坦病毒（Hantavirus） | ● |
| | 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒（Lymphocytic Choriomeningitis Virus） | ● |
| | 沙门氏菌（ <i>Salmonella</i> spp.） | ● |
| | 皮肤病原真菌（Pathogenic dermal fungi） | ○ |
| 无特定病原体级 | 汉坦病毒（Hantavirus） | ● |
| | 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒（Lymphocytic Choriomeningitis Virus） | ● |
| | 沙门氏菌（ <i>Salmonella</i> spp.） | ● |
| | 皮肤病原真菌（Pathogenic dermal fungi） | ○ |
| | 仙台病毒（Sendai Virus） | ● |
| | 小鼠肝炎病毒（Mouse Hepatitis Virus） | ● |
| | 小鼠肺炎病毒（Pneumonia Virus of Mice） | ● |
| | 呼肠孤病毒 III 型（Reovirus type III） | ● |
| | 小鼠细小病毒（Minute Virus of Mice） | ● |
| | 绿脓杆菌（ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ） | ● |
| | 泰泽病原体（Tyzzer's organism） | ● |
| | 支原体（ <i>Mycoplasma</i> spp.） | ● |
| | 多杀巴斯德杆菌（ <i>Pasteurella multocida</i> ） | ● |
| | 支气管鲍特杆菌（ <i>Bordetella bronchiseptica</i> ） | ● |
| | 嗜肺巴斯德杆菌（ <i>Pasteurella pneumotropica</i> ） | ● |
| | 幽门螺杆菌（ <i>Helicobacter pylori</i> ） | ● |
| | 金黄色葡萄球菌（ <i>Staphylococcus aureus</i> ） | ● |
| | 肺炎链球菌（ <i>Streptococcus pneumoniae</i> ） | ● |
| | 乙型溶血性链球菌（Beta hemolytic streptococcus） | ○ |
| | 鼠棒状杆菌（ <i>Corynebacterium kutscheri</i> ） | ○ |
| 产酸克雷伯杆菌（ <i>Klebsiella oxytoca</i> ） | ○ | |
| 大肠埃希菌（ <i>Escherichia coli</i> ） | ○ | |
| 肺炎克雷伯杆菌（ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ） | ○ | |
| 无菌级 | 任何可检出的生命体 | ● |

注：“●”表示必检项，要求阴性；“○”需要时检测项目，要求阴性。

5.2.5 实验雪貂各等级病原微生物检测项目按照表 5 的规定执行。

表 5 实验雪貂各等级病原微生物检测项目

| 动物等级 | 病原微生物 | 检测要求 |
|--|--|------|
| 普通级 | 沙门氏菌 (Salmonella spp.) | ● |
| | 皮肤病原真菌 (Pathogenic dermal fungi) | ● |
| | 志贺菌 (Shigella spp.) | ● |
| | 阿留申病毒 (Aleutian disease virus) | ● |
| | 犬瘟热病毒 (Canine distemper virus) | ▲ |
| | 犬细小病毒 (Canine parvovirus) | ▲ |
| | 狂犬病毒 (Rabies virus) | ▲ |
| 无特定病原体级 | 沙门氏菌 (Salmonella spp.) | ● |
| | 皮肤病原真菌 (Pathogenic dermal fungi) | ● |
| | 志贺菌 (Shigella spp.) | ● |
| | 阿留申病毒 (Aleutian disease virus) | ● |
| | 支原体 (Mycoplasma spp.) | ● |
| | 乙型溶血链球菌 (Beta-hemolytic streptococcus) | ● |
| | 支气管鲍特杆菌 (Bordetella bronchiseptica) | ● |
| | 肺炎克雷伯杆菌 (Klebsiella pneumoniae) | ○ |
| | 弯曲杆菌 (Campylobacter spp.) | ○ |
| | 多杀巴斯德杆菌 (Pasteurella multocida) | ○ |
| | 肺炎链球菌 (Streptococcus pneumoniae) | ○ |
| | 奇异变形杆菌 (Proteus mirabilis) | ○ |
| | 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) | ○ |
| | 绿脓杆菌 (Pseudomonas aeruginosa) | ○ |
| | A 型流感病毒 (Influenza A) | ● |
| | 犬瘟热病毒 (Canine distemper virus) | ● |
| | 犬细小病毒 (Canine parvovirus) | ● |
| 狂犬病毒 (Rabies virus) | ● | |
| 汉坦病毒 (Hantavirus) | ○ | |
| 无菌级 | 任何可检出的生命体 | ● |
| 注：“▲”表示必检项，普通级实验动物可以免疫，无特定病原体级实验动物和无特定抗原抗体普通级实验动物不可免疫；“●”表示必检项，要求阴性；“○”表示需要时检测项目，要求阴性。 | | |

5.2.6 实验猫各等级病原微生物检测项目按照表 6 的规定执行。

表 6 实验猫各等级病原微生物检测项目

| 动物等级 | 病原微生物 | 检测要求 |
|------|---|------|
| 普通级 | 猫泛白细胞减少症病毒 (Feline panleukopenia virus) | ▲ |
| | 猫杯状病毒 (Feline calicivirus) | ▲ |
| | 猫疱疹病毒 I 型 (Feline herpesvirus type 1) | ▲ |

表6 实验猫各等级病原微生物检测项目（续）

| 动物等级 | 病原微生物 | 检测要求 |
|---|---|------|
| 普通级 | 狂犬病毒 (Rabies virus) | ▲ |
| | 沙门氏菌 (Salmonella spp.) | ● |
| | 皮肤病原真菌 (Pathogenic dermal fungi) | ○ |
| 无特定病原体级 | 猫泛白细胞减少症病毒 (Feline panleukopenia virus) | ● |
| | 猫杯状病毒 (Feline calicivirus) | ● |
| | 猫疱疹病毒 I 型 (Feline herpesvirus type 1) | ● |
| | 狂犬病毒 (Rabies virus) | ● |
| | 沙门氏菌 (Salmonella spp.) | ● |
| | 皮肤病原真菌 (Pathogenic dermal fungi) | ○ |
| | 猫免疫缺陷病毒 (Feline immunodeficiency virus) | ● |
| | 猫传染性腹膜炎病毒 (Feline infectious peritonitis virus) | ● |
| | 猫肠道冠状病毒 (Feline enteric coronavirus) | ○ |
| | 猫白血病病毒 (Feline leukemia virus) | ○ |
| | 支气管败血波氏杆菌 (Bordetellabronchiseptica) | ● |
| | 多杀巴斯德杆菌 (Pasteurellamultocida) | ● |
| | 小肠结肠炎耶尔森菌 (Yersinia enterocolitica) | ○ |
| | 巴尔通体 (Bartonella) | ○ |
| | 衣原体 (Chlamydia) | ○ |
| | 空肠弯曲杆菌 (Campylobacterjejuni) | ○ |
| 螺杆菌 (Helicobacter) | ○ | |
| 乙型溶血性链球菌 (β hemolytic Streptococcus) | ○ | |
| 无菌级 | 任何可检出的生命体 | ● |

注：“▲”表示必检项，普通级实验动物可以免疫，无特定病原体级实验动物和无特定抗原抗体普通级实验动物不可免疫；“●”表示必检项，要求阴性；“○”表示需要时检测项目，要求阴性。

5.2.7 实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽各等级病原微生物检测项目按照表7的规定执行。

表7 实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽各等级病原微生物检测项目

| 动物等级 | 病原微生物 | 实验鸡检测要求 | 实验鸭检测要求 | 实验鹅检测要求 | 实验鸽检测要求 |
|------|---|---------|---------|---------|---------|
| 普通级 | 禽流感病毒 (Avian Influenza Virus) | ▲ | ▲ | ▲ | ○ |
| | 新城疫病毒 (Newcastle Disease Virus) | ▲ | ● | ● | ● |
| | 马立克氏病病毒 (Marek's Disease Virus) | ▲ | - | - | - |
| | 传染性支气管炎病毒 (Infection Bronchitis Virus) | ▲ | - | - | - |
| | 传染性喉气管炎病毒 (Infection Laryngotracheitis Virus) | ▲ | - | - | - |
| | 传染性法氏囊病病毒 (Infection Bursal Disease Virus) | ▲ | - | - | - |
| | 禽呼肠孤病毒 (Avian Reovirus) | ▲ | - | - | - |
| | 禽腺病毒 III 群 (Avian Adenovirus Group III) | ▲ | - | - | - |

表7 实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽各等级病原微生物检测项目（续）

| 动物等级 | 病原微生物 | 实验鸡检测要求 | 实验鸭检测要求 | 实验鹅检测要求 | 实验鸽检测要求 |
|--|--|---------|---------|---------|---------|
| 普通级 | 禽痘病毒（Fowl Pox Virus） | ▲ | - | - | - |
| | 鸡白痢沙门氏菌（Salmonella pullorum） | ● | - | - | - |
| | 副鸡嗜血杆菌（Haemophilus paragallinarum） | ▲ | - | - | - |
| | 鸡毒支原体（Mycoplasma gallisepticum） | ▲ | - | - | - |
| | 鸭肠炎病毒（Duck enteritis virus） | - | ▲ | ● | - |
| | 多杀性巴氏杆菌（Pasteurella multocida） | - | ● | ● | ○ |
| | 沙门氏菌（Salmonella spp.） | - | ● | ● | ● |
| | 衣原体（Chlamydia） | - | ● | ● | ● |
| 鹅细小病毒（Goose parvovirus） | - | - | ▲ | - | |
| 无特定病原体级 | 禽流感病毒（Avian Influenza Virus） | ● | ● | ● | ○ |
| | 新城疫病毒（Newcastle Disease Virus） | ● | ● | ● | ● |
| | 马立克氏病病毒（Marek's Disease Virus） | ● | - | - | - |
| | 传染性支气管炎病毒（Infection Bronchitis Virus） | ● | - | - | - |
| | 传染性喉气管炎病毒（Infection Laryngotracheitis Virus） | ● | - | - | - |
| | 传染性法氏囊病病毒（Infection Bursal Disease Virus） | ● | - | - | - |
| | 禽呼肠孤病毒（Avian Reovirus） | ● | - | - | - |
| | 禽腺病毒 III 群（Avian Adenovirus Group III） | ● | ○ | ○ | - |
| | 禽痘病毒（Fowl Pox Virus） | ● | - | - | - |
| | 鸡白痢沙门氏菌（Salmonella pullorum） | ● | - | - | - |
| | 副鸡嗜血杆菌（Haemophilus paragallinarum） | ● | - | - | - |
| | 鸡毒支原体（Mycoplasma gallisepticum） | ● | - | - | - |
| | 淋巴白血病毒（Lymphoid Leukosis Virus） | ● | - | - | - |
| | 网状内皮增生症病毒（Reticulendotheliosis Virus） | ● | ● | ● | - |
| | 鸡传染性贫血病毒（Chicken Infectious Anaemia Virus） | ● | - | - | - |
| | 禽脑脊髓炎病毒（Avian Encephalomyelitis Virus） | ● | - | - | - |
| | 禽腺病毒 I 群（Avian Adenovirus Group I） | ● | - | - | ○ |
| | 禽结核杆菌（Avian tuberculosis） | ● | - | - | - |
| | 滑液囊支原体（Mycoplasma synoviae） | ● | - | - | - |
| | 多杀性巴氏杆菌（Pasteurella multocida） | ○ | ● | ● | ○ |
| | 鸭肠炎病毒（Duck enteritis virus） | - | ● | ● | - |
| | 沙门氏菌（Salmonella spp.） | - | ● | ● | ● |
| | 衣原体（Chlamydia） | - | ● | ● | ● |
| 鸭肝炎病毒 I 型（Duck hepatitis virus type I） | - | ● | - | - | |
| 鸭疫里默氏杆菌（Riemerella anatipestifer） | - | ● | ● | - | |
| 鹅细小病毒（Goose parvovirus） | - | - | ● | - | |
| 鸽痘病毒（Pigeon pox virus） | - | - | - | ● | |
| 无菌级 | 任何可检出的生命体 | ● | ● | ● | ● |

表7 实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽各等级病原微生物检测项目（续）

| 动物等级 | 病原微生物 | 实验鸡检测要求 | 实验鸭检测要求 | 实验鹅检测要求 | 实验鸽检测要求 |
|--|-------|---------|---------|---------|---------|
| 注：“▲”表示必检项，普通级实验动物可以免疫，无特定病原体级实验动物和无特定抗原抗体普通级实验动物不可免疫；“●”表示必检项，要求阴性；“○”表示需要时检测项目，要求阴性；“-”表示不检项目。 | | | | | |

5.2.8 实验鱼各等级病原微生物检测项目按照表8的规定执行。

表8 实验鱼病原微生物检测项目

| 动物等级 | 病原微生物 | 检测要求 |
|---|--|------|
| 普通级 | 海分枝杆菌 (<i>Mycobacterium marinum</i>) | ● |
| | 龟分枝杆菌 (<i>Mycobacterium chelonae</i>) | ● |
| | 脓肿分枝杆菌 (<i>Mycobacterium abscessus</i>) | ● |
| | 嗜血分枝杆菌 (<i>Mycobacterium haemophilum</i>) | ● |
| | 霍乱弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>) | ● |
| | 嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>) | ● |
| | 海豚链球菌 (<i>Streptococcus iniae</i>) | ○ |
| 无特定病原体级 | 海分枝杆菌 (<i>Mycobacterium marinum</i>) | ● |
| | 龟分枝杆菌 (<i>Mycobacterium chelonae</i>) | ● |
| | 脓肿分枝杆菌 (<i>Mycobacterium abscessus</i>) | ● |
| | 嗜血分枝杆菌 (<i>Mycobacterium haemophilum</i>) | ● |
| | 霍乱弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>) | ● |
| | 嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>) | ● |
| | 海豚链球菌 (<i>Streptococcus iniae</i>) | ○ |
| | 柱状黄杆菌 (<i>Flavobacterium columnare</i>) | ● |
| | 维隆尼气单胞菌 (<i>Aeromonas veronii</i>) | ● |
| | 简氏气单胞菌 (<i>Aeromonas jandaei</i>) | ● |
| | 偶发分枝杆菌 (<i>Mycobacterium fortuitum</i>) | ● |
| | 水霉菌 (<i>Saprolegnia</i> spp.) | ● |
| | 鳃霉菌 (<i>Branchiomyces</i> spp.) | ● |
| | 嗜鳃黄杆菌 (<i>Flavobacterium branchiophilum</i>) | ○ |
| | 嗜冷黄杆菌 (<i>Flavobacterium psychrophilum</i>) | ○ |
| | 荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i> spp.) | ○ |
| 温和气单胞菌 (<i>Aeromonas sobri</i>) | ○ | |
| 链球菌 ^a (<i>Streptococcus</i> spp.) | ○ | |
| 无菌级 | 任何可检出的生命体 | ● |
| 注：“●”表示必检项，要求阴性；“○”表示需要时检测项目，要求阴性。 | | |
| ^a 指海豚链球菌之外的链球菌。 | | |

6 检测程序

6.1 实验小型猪、实验猪、实验牛、实验羊、实验狨猴、实验长爪沙鼠、实验雪貂、实验猫、实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽检测程序

6.1.1 实验小型猪、实验猪、实验牛、实验羊、实验狨猴、实验长爪沙鼠、实验雪貂、实验猫、实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽检测程序符合图1的要求。

6.1.2 麻醉应根据不同动物种类、采集部位决定是否需要麻醉。需要麻醉时，应考虑不同种类实验动物的耐受剂量，可采用吸入性麻醉或注射麻醉，麻醉过程中应随时注意实验动物的反应。实施麻醉人员应经过相应培训并具备相应的能力。

6.1.3 采血以及毛发、皮屑、鼻咽拭子、肛拭子（或新鲜粪便）的采样方法参照 NY/T 541 进行。

6.1.4 必要时可根据临床症状和前期检测结果，进一步采集动物组织或特定样本进行检测。

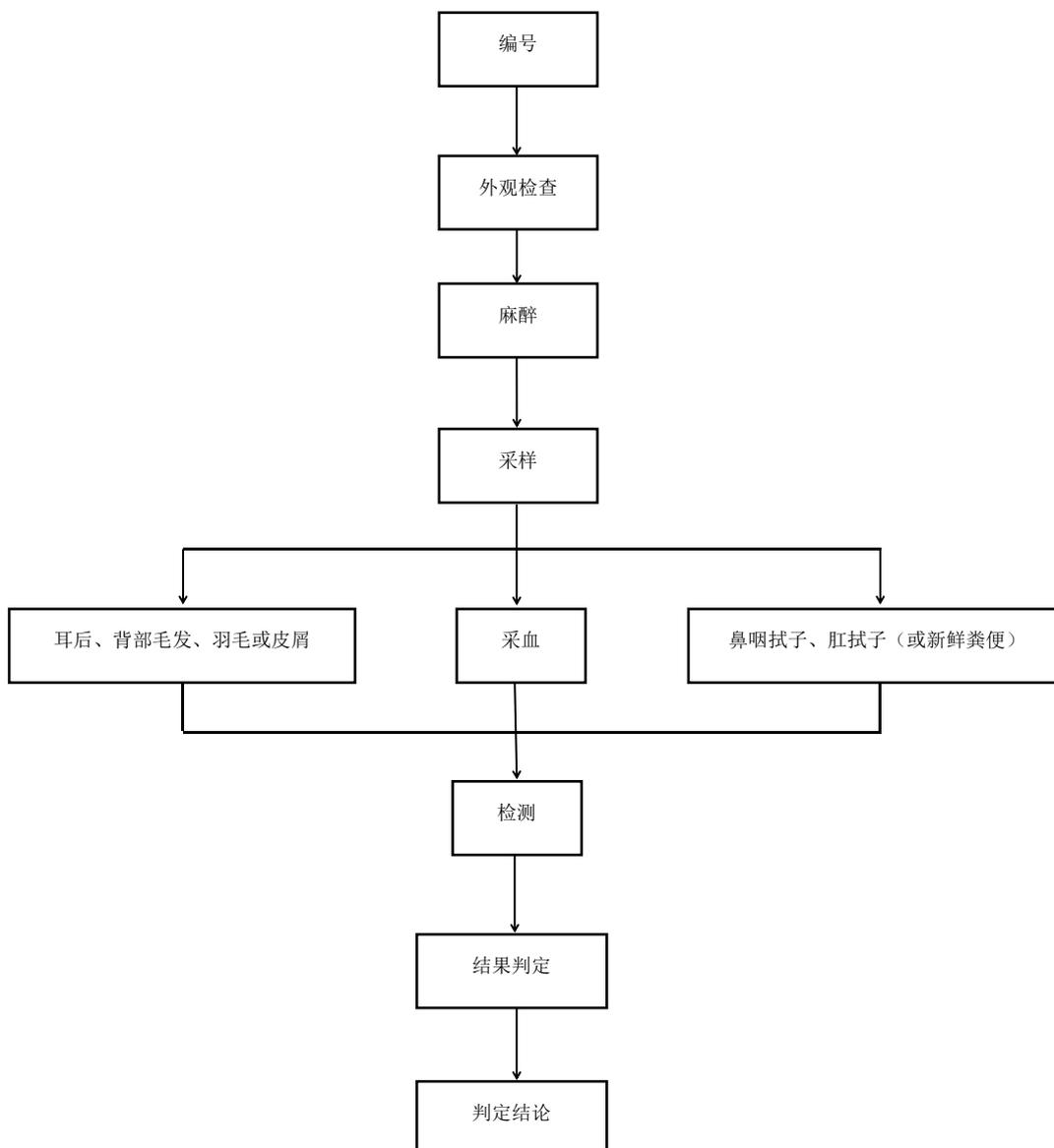


图1 实验动物微生物检测程序

6.2 实验鱼检测程序

6.2.1 实验鱼检测程序符合图 2 的要求。

6.2.2 实验鱼的麻醉应便于检查、采用和满足动物福利伦理的要求。

6.2.3 必要时可根据临床症状和前期检测结果，进一步采集动物组织或特定样本进行检测。

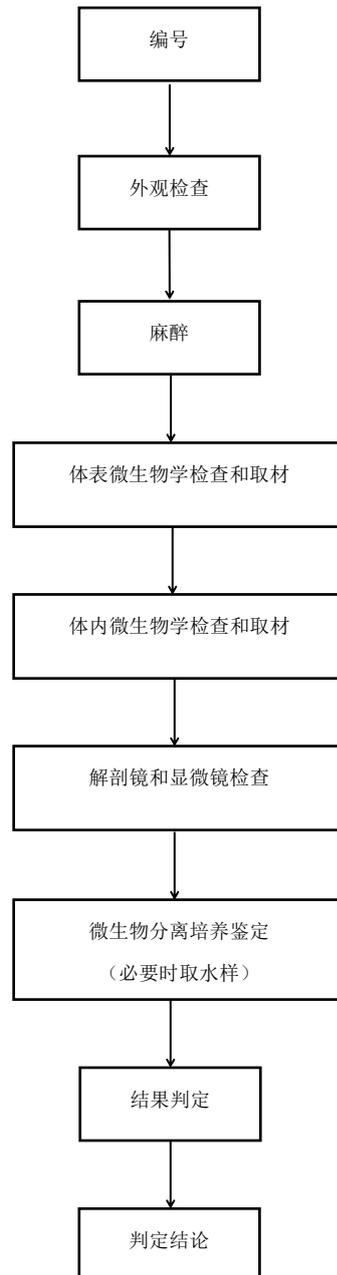


图 2 实验鱼微生物检测程序

7 检测方法

7.1 实验猪和实验小型猪病原微生物学检测方法

实验猪和实验小型猪病原微生物学检测方法按照表9的规定执行。

表9 实验猪和实验小型猪病原微生物学检测方法

| 病原微生物 | 检测方法 |
|-----------------|---------------|
| 日本脑炎病毒 | GB/T 18638 |
| 猪链球菌 2 型 | GB/T 19915.7 |
| 口蹄疫病毒 | GB/T 18935 |
| 猪瘟病毒 | GB/T 16551 |
| 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 | GB/T 27517 |
| 布鲁氏菌 | GB/T 18646 |
| 钩端螺旋体 | GB/T 14926.46 |
| 红斑丹毒丝菌 | NY/T 566 |
| 伪狂犬病病毒 | GB/T 18641 |
| 猪圆环病毒2型 | GB/T 21674 |
| 猪细小病毒 | SN/T 1919 |
| 猪繁殖与呼吸综合征病毒 | GB/T 18090 |
| 猪胸膜肺炎放线杆菌 | SN/T 1447 |
| 猪肺炎支原体 | NY/T 1186 |
| 猪痢疾短螺旋体 | SN/T 1207 |
| 传染性胃肠炎病毒 | NY/T 548 |
| 猪流行性腹泻病毒 | NY/T 544 |
| 支气管败血波氏杆菌 | NY/T 546 |
| 多杀性巴氏杆菌 | NY/T 546 |
| 副猪嗜血杆菌 | GB/T 34750 |
| 猪水泡病病毒 | SN/T 2702 |
| 皮肤病原真菌 | GB/T 14926.4 |
| 沙门氏菌 | NY/T 550 |

7.2 实验牛和实验羊病原微生物学检测方法

实验牛和实验羊病原微生物学检测方法按照表10的规定执行。

表10 实验牛和实验羊病原微生物学检测方法

| 病原微生物 | 检测方法 |
|--------|---------------|
| 口蹄疫病毒 | GB/T 27528 |
| 布鲁氏菌 | GB/T 18646 |
| 牛分枝杆菌 | GB/T 27639 |
| 炭疽芽胞杆菌 | NY/T 561 |
| 钩端螺旋体 | GB/T 14926.46 |

表 10 实验牛和实验羊病原微生物学检测方法（续）

| 病原微生物 | 检测方法 |
|-------------|------------|
| 伯氏疏螺旋体 | SN/T 3392 |
| 贝氏柯克斯体 | SN/T 1087 |
| 牛病毒性腹泻-粘膜病毒 | GB/T 18637 |
| 牛传染性鼻气管炎病毒 | GB/T 27981 |
| 副结核分枝杆菌 | GB/T 27637 |
| 胎儿弯曲杆菌 | GB/T 18653 |
| 多杀性巴氏杆菌 | GB/T 27530 |
| 牛白血病病毒 | SN/T 1315 |
| 衣原体 | NY/T 562 |
| 蓝舌病病毒 | GB/T 18089 |
| 牛流行热病毒 | NT/T 543 |
| 小反刍兽疫病毒 | GB/T 27982 |
| 绵羊/山羊痘病毒 | NY/T 576 |
| 伪狂犬病病毒 | GB/T 18641 |
| 山羊支原体 | NY/T 1468 |
| 口疮病毒 | NY/T 1244 |
| 梅迪-维纳斯病毒 | SN/T 1171 |
| 山羊关节炎-脑炎病毒 | SN/T 1171 |
| 绵羊肺腺瘤病毒 | SN/T 3484 |

7.3 实验狨猴病原微生物学检测方法

实验狨猴病原微生物学检测方法按照表11的规定执行。

表 11 实验狨猴病原微生物学检测方法

| 病原微生物 | 检测方法 |
|--------------------------------|----------------|
| 沙门氏菌 | GB/T 14926. 1 |
| 皮肤病原真菌 | GB/T 14926. 4 |
| 志贺菌 | GB/T 14926. 47 |
| 结核分枝杆菌 | GB/T 14926. 48 |
| 小肠结肠炎耶尔森菌 | GB/T 14926. 3 |
| 空肠弯曲菌 | GB/T 14926. 49 |
| 奇异变形杆菌 | SN/T 2552. 8 |
| 猕猴疱疹病毒 I 型 ^a | GB/14926. 60 |
| 仙台病毒 ^a | GB/14926. 23 |
| 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 ^a | GB/14926. 18 |
| 猴免疫缺陷病毒 ^a | GB/T 14926. 62 |
| 猴 T 淋巴细胞趋向性病毒 1 型 ^a | GB/T 14926. 63 |
| 猴痘病毒 ^a | GB/T 14926. 64 |

^a 指酶结合物使用酶标记的兔抗狨猴IgG抗体。

7.4 实验长爪沙鼠病原微生物学检测方法

实验长爪沙鼠病原微生物学检测方法按照表12的规定执行。

表 12 实验长爪沙鼠病原微生物学检测方法

| 病原微生物 | 检测方法 |
|--------------|---------------|
| 沙门氏菌 | GB/T 14926.1 |
| 小肠结肠炎耶尔森菌 | GB/T 14926.3 |
| 皮肤病原真菌 | GB/T 14926.4 |
| 多杀巴斯德杆菌 | GB/T 14926.5 |
| 支气管鲍特杆菌 | GB/T 14926.6 |
| 支原体 | GB/T 14926.8 |
| 泰泽病原体 | GB/T 14926.10 |
| 大肠埃希菌 | GB/T 14926.11 |
| 嗜肺巴斯德杆菌 | GB/T 14926.12 |
| 肺炎克雷伯杆菌 | GB/T 14926.13 |
| 金黄色葡萄球菌 | GB/T 14926.14 |
| 肺炎链球菌 | GB/T 14926.15 |
| 乙型溶血性链球菌 | GB/T 14926.16 |
| 绿脓杆菌 | GB/T 14926.17 |
| 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 | GB/T 14926.18 |
| 汉坦病毒 | GB/T 14926.19 |
| 小鼠肝炎病毒 | GB/T 14926.22 |
| 仙台病毒 | GB/T 14926.23 |
| 小鼠细小病毒 | GB/T 14926.28 |
| 呼肠孤病毒 III 型 | GB/T 14926.25 |
| 小鼠肺炎病毒 | GB/T 14926.24 |

7.5 实验雪貂病原微生物学检测方法按照表 13 的规定执行。

表 13 实验雪貂病原微生物学检测方法

| 病原微生物 | 检测方法 |
|---------|---------------|
| 沙门氏菌 | GB/T 14926.1 |
| 皮肤病原真菌 | GB/T 14926.4 |
| 志贺菌 | GB/T 14926.47 |
| 支原体 | GB/T 14926.8 |
| 乙型溶血链球菌 | GB/T 14926.16 |
| 支气管鲍特杆菌 | GB/T 14926.6 |
| 肺炎克雷伯杆菌 | GB/T 14926.13 |
| 弯曲杆菌 | GB/T 14926.49 |
| 多杀巴斯德杆菌 | GB/T 14926.5 |

表 13 实验雪貂病原微生物学检测方法（续）

| 病原微生物 | 检测方法 |
|---------|---------------|
| 肺炎链球菌 | GB/T 14926.15 |
| 奇异变形杆菌 | SN/T 2552.8 |
| 金黄色葡萄球菌 | GB/T 14926.14 |
| 绿脓杆菌 | GB/T 14926.17 |
| 阿留申病毒 | SN/T 2847 |
| 犬瘟热病毒 | GB/T 14926.59 |
| 犬细小病毒 | GB/T 14926.57 |
| 狂犬病毒 | GB/T 14926.56 |
| A 型流感病毒 | GB/T 27539 |
| 汉坦病毒 | GB/T 14926.19 |

7.6 实验猫病原微生物学检测方法

实验猫病原微生物学检测方法按照表14的规定执行。

表 14 实验猫病原微生物学检测方法

| 病原微生物 | 检测方法 |
|------------|---------------|
| 猫泛白细胞减少症病毒 | 附录 A |
| 猫杯状病毒 | 附录 B |
| 猫疱疹病毒 I 型 | 附录 C |
| 狂犬病毒 | GB/T 36789 |
| 沙门氏菌 | NY/T 550 |
| 皮肤病原真菌 | GB/T 14926.4 |
| 猫免疫缺陷病毒 | 附录 D |
| 猫传染性腹膜炎病毒 | 附录 E |
| 猫肠道冠状病毒 | 附录 F |
| 猫白血病病毒 | 附录 G |
| 支气管败血波氏杆菌 | GB/T 14926.6 |
| 多杀巴斯德杆菌 | GB/T 14926.5 |
| 小肠结肠炎耶尔森菌 | GB/T 14926.3 |
| 巴尔通体 | 附录 H |
| 衣原体 | NY/T 562 |
| 空肠弯曲杆菌 | 附录 I |
| 螺杆菌 | SN/T 3724 |
| 乙型溶血性链球菌 | GB/T 14926.16 |

7.7 实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽病原微生物检测方法

实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽病原微生物学检测方法按照表15的规定执行。

表 15 实验鸡、实验鸭、实验鹅、实验鸽病原微生物检测方法

| 病原微生物 | 检测方法 |
|------------|--------------|
| 禽流感病毒 | GB/T 17999.6 |
| 新城疫病毒 | GB/T 17999.6 |
| 马立克氏病病毒 | GB/T 17999.5 |
| 传染性支气管炎病毒 | GB/T 17999.6 |
| 传染性喉气管炎病毒 | GB/T 17999.6 |
| 传染性法氏囊病病毒 | SN/T 1554 |
| 禽呼吸孤病毒 | SN/T 1173 |
| 禽腺病毒 III 群 | GB/T 17999.6 |
| 禽痘病毒 | GB/T 17999.5 |
| 鸡白痢沙门氏菌 | NY/T 536 |
| 副鸡嗜血杆菌 | GB/T 17999.1 |
| 鸡毒支原体 | GB/T 17999.6 |
| 淋巴白血病病毒 | SN/T 1172 |
| 网状内皮增生症病毒 | NY/T 1247 |
| 鸡传染性贫血病毒 | GB/T 17999.6 |
| 禽脑脊髓炎病毒 | GB/T 17999.6 |
| 禽腺病毒 I 群 | GB/T 17999.5 |
| 禽结核杆菌 | NY/T 3072 |
| 滑液囊支原体 | GB/T 17999.6 |
| 多杀性巴氏杆菌 | NY/T 563 |
| 鸭肠炎病毒 | SN/T 2744 |
| 沙门氏菌 | GB/T 14926.1 |
| 衣原体 | NY/T 562 |
| 鸭肝炎病毒 I 型 | SN/T 3464 |
| 鸭疫里默氏杆菌 | SN/T 4556 |
| 鹅细小病毒 | NY/T 560 |
| 鸽痘病毒 | 附录 J |

7.8 实验鱼病原微生物学检测方法

7.8.1 实验鱼细菌和真菌检测方法

实验鱼细菌和真菌的检测方法按照表16的规定执行。

表 16 实验鱼细菌和真菌检测方法

| 病原微生物 | 检测方法 |
|--------|---------------------|
| 海分枝杆菌 | 抗酸染色 (ZIRC) |
| 龟分枝杆菌 | 抗酸染色 (ZIRC) |
| 脓肿分枝杆菌 | 抗酸染色 (ZIRC) |
| 霍乱弧菌 | 微生物分离培养 (GB 4789.7) |

表 16 实验鱼细菌和真菌检测方法（续）

| 病原微生物 | 检测方法 |
|---|--------------------------------------|
| 海豚链球菌 | 微生物分离培养（GB/T 14926.15） |
| 链球菌 | 微生物分离培养（GB/T 14926.15及GB/T 14926.16） |
| 嗜水气单胞菌 | 微生物分离培养（SC/T 7201.3） |
| 柱状黄杆菌 | 微生物分离培养（SC/T 7201.2） |
| 嗜鳃黄杆菌 | 微生物分离培养（SC/T 7201.2） |
| 嗜冷黄杆菌 | 微生物分离培养（SC/T 7201.2） |
| 荧光假单胞菌 | 微生物分离培养（SC/T 7201.4） |
| 维隆气单胞菌 | 微生物分离培养（GB/T 18652） |
| 简氏气单胞菌 | 微生物分离培养（GB/T 18652） |
| 偶发分枝杆菌 | 抗酸染色（ZIRC） |
| 嗜血分枝杆菌 | 抗酸染色（ZIRC） |
| 水霉菌 | 微生物分离培养（GB 4789.15） |
| 鳃霉菌 | 微生物分离培养（SN/T 2439） |
| 温和气单胞菌 | 微生物分离培养（GB/T 18652） |
| 注：抗酸染色（ZIRC）方法参考2012年4月24日国际斑马鱼资源中心《斑马鱼疾病健康手册》（ZIRC Health Services Zebrafish Disease Manual, M.L. Kent, J.M. Spitsbergen, J.M. Matthews, J.W. Fournie, K.N. Murray and M. Westerfield） | |

7.8.2 实验鱼 4 种分枝杆菌的区分鉴定方法按照附录 K 的规定执行。

7.8.3 实验鱼聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）检测方法按照附录 L 的规定执行。

8 检测规则

8.1 检测频率

每3个月至少应检测1次。

8.2 抽样

8.2.1 抽样方式

按微生物和寄生虫采样要求联合取样，随机抽样。抽样月龄按表17的规定执行。

表 17 实验动物抽样月龄

| 动物种类 | 抽样月龄 |
|-------|------|
| 实验小型猪 | ≥6 |
| 实验猪 | ≥2 |
| 实验牛 | ≥6 |
| 实验羊 | ≥2 |
| 实验狨猴 | ≥6 |

表 17 实验动物抽样月龄（续）

| 动物种类 | 抽样月龄 |
|--------|---|
| 实验长爪沙鼠 | ≥2 |
| 实验猫 | ≥6 |
| 实验雪貂 | ≥6 |
| 实验鸡 | ≥1 |
| 实验鸭 | ≥1 |
| 实验鹅 | ≥1 |
| 实验鸽 | ≥1 |
| 实验鱼 | 应选择 3 月龄以上的成鱼，必要时同时取饲养环境水样用于检测；应在不同的水环境内随机抽样。 |

8.2.2 抽样方法

抽样方法按照NY/T 541的规定进行。

8.2.3 抽样数量

实验鱼抽样数量：同一水环境实验鱼数量少于100尾，则抽样5尾；大于等于100尾，则按5%比例抽取，最大抽样量为30尾。其他动物抽样数量按表18的规定执行。

表 18 实验动物抽样数量

| 群体大小（只/头/羽） | 抽样数量（只/头/羽） |
|-------------|-------------|
| <100 | ≥5 |
| 100~500 | ≥10 |
| >500 | ≥15 |

8.3 送检要求

样品和送检单一同送达具备检测能力的实验室，送检单应写明检品名称、品系、等级、数量及检测项目等内容。

9 结果判定

9.1 抗体检查

经检测，免疫项目的群体免疫合格率不低于70%，判为合格。

经检测，非免疫项目，血清抗体阴性判为合格。

9.2 抗原和核酸检查

经检测，未见阳性结果判为合格。

10 结论与报告

10.1 结论

按照检测规则，检测指标均合格，依据表1～表8，判为符合相应等级的实验动物。

按照检测规则，若检测指标有1项（含）以上不合格，依据表1～表8，判为不符合相应等级的实验动物。

10.2 报告

根据检测结果出具检测报告。

附 录 A
(规范性)
猫泛白细胞减少症病毒 PCR 检测方法

A.1 待测样本DNA的提取与保存

将样本按照DNA提取试剂盒的操作说明提取DNA，冻存于-70℃冰箱备用。

A.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

A.3 PCR反应引物

根据 *vp 2* 基因序列 (GenBank: AF015223) 设计：

上游引物序列 (5'-3')：AGTTCAACAAGATAAAAAGAC

下游引物序列 (5'-3')：TCCTGTATCTTGATGTGCTA

A.4 PCR反应体系及条件

A.4.1 PCR反应体系

20 μL体系包括10×PCR buffer (含Mg²⁺) 2 μL, dNTP (2.5 mM) 1.6 μL, 上下游引物 (10 μM) 各1 μL, Taq酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 模板DNA 2 μL, 最后用灭菌双蒸水补至20 μL。

A.4.2 PCR反应条件

94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃延伸10 min。

A.5 PCR产物大小

301 bp。

A.6 结果判定

阳性对照出现301 bp的目的片段，阴性对照无条带，实验成立；待检样品出现301 bp目的片段时，判定猫泛白细胞减少症病毒阳性；未出现301 bp目的片段时，判定猫泛白细胞减少症病毒阴性。

附 录 B
(规范性)
猫杯状病毒 RT-PCR 检测方法

B.1 待测样本RNA的提取与保存

将样本按照 RNA 提取试剂盒的操作说明提取 RNA，冻存于-70 °C冰箱备用。

B.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

B.3 逆转录

B.3.1 逆转录体系

25 μ L体系包括5 \times RT buffer 5 μ L，dNTP (2.5 mM) 4 μ L，随机引物 (500 μ g/mL) 1 μ L，AMV (10 U/ μ L) 0.5 μ L，模板RNA 8 μ L，最后用灭菌双蒸水补至25 μ L。

B.3.2 逆转录反应条件

37 °C 90 min，72 °C 15 min，4 °C 5 min，各1个循环。

B.4 PCR反应引物及探针

根据衣壳蛋白基因序列 (GenBank: AY560117) 设计：

上游引物序列 (5'-3')：AACCTGCGCTAACGTGCTT

下游引物序列 (5'-3')：CAGTGACAATACACCCAGAA

B.5 PCR反应体系及条件

B.5.1 PCR反应体系

25 μ L体系包括10 \times PCR buffer (含Mg²⁺) 2.5 μ L，dNTP (2.5 mM) 2.5 μ L，上下游引物 (10 μ M) 各1.5 μ L，Taq酶 (5 U/ μ L) 1.0 μ L，模板cDNA 2 μ L，最后用灭菌双蒸水补至25 μ L。

B.5.2 PCR反应条件

94 °C 5 min；94 °C 1 min，55 °C 1 min，72 °C 1 min，35个循环；72 °C延伸10 min。

B.6 PCR产物大小

926 bp。

B.7 结果判定

阳性对照出现926 bp的目的片段，阴性对照无条带，实验成立；待检样品出现926 bp目的片段时，判定猫杯状病毒阳性；未出现926 bp目的片段时，判定猫杯状病毒阴性。

附 录 C
(规范性)
猫疱疹病毒 I 型 PCR 检测方法

C.1 待测样本DNA的提取与保存

将样本按照DNA提取试剂盒的操作说明提取DNA，冻存于-70℃冰箱备用。

C.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

C.3 PCR反应引物

根据 *tk* 基因序列 (GenBank: FJ478159) 设计：

上游引物序列 (5'-3')：ATACTGTCCGCATTTACATAGA

下游引物序列 (5'-3')：CGGTTCTTGAGCGTCCC

C.4 PCR反应体系及条件

C.4.1 PCR反应体系

20 μL体系包括10×PCR buffer (含Mg²⁺) 2 μL, dNTP (2.5 mM) 1.6 μL, 上下游引物 (10 μM) 各1 μL, Taq酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 模板DNA 2 μL, 最后用灭菌双蒸水补至20 μL。

C.4.2 PCR反应条件

94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃延伸5 min。

C.5 PCR产物大小

531 bp。

C.6 结果判定

阳性对照出现531 bp的目的片段，阴性对照无条带，实验成立；待检样品出现531 bp目的片段时，判定猫疱疹病毒I型阳性；未出现531 bp目的片段时，判定猫疱疹病毒I型阴性。

附 录 D
(规范性)
猫免疫缺陷病毒荧光 PCR 检测方法

D.1 待测样本RNA的提取与保存

将样本按照 RNA 提取试剂盒的操作说明提取 RNA，冻存于-70 °C冰箱备用。

D.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

D.3 逆转录

D.3.1 逆转录体系

25 μ L体系包括5 \times RT buffer 5 μ L，dNTP (2.5 mM) 4 μ L，随机引物 (500 μ g/mL) 1 μ L，AMV (10 U/ μ L) 0.5 μ L，模板RNA 8 μ L，最后用灭菌双蒸水补至25 μ L。

D.3.2 逆转录反应条件

37°C 90 min，72°C 15 min，4°C 5 min，各1个循环。

D.4 荧光PCR反应引物及探针

上游引物序列 (5'-3')：AGAACCTGGTGATATACCAGAGAC

下游引物序列 (5'-3')：TTGGGTCAAGTGCTACATATTG

探针 (5'-3')：(FAM) TATGCCTGTGGAGGGCCTTCCT (TAMRA)

D.5 荧光PCR反应体系及条件

D.5.1 荧光PCR反应体系

50 μ L体系包括2 \times Mix buffer 25 μ L，上下游引物 (10 μ M) 各2.5 μ L，探针 (10 μ M) 0.5 μ L，模板cDNA 10 μ L，最后用灭菌双蒸水补至50 μ L。

D.5.2 荧光PCR反应条件

95℃预变性 3 min; 95℃ 30 s, 64℃ 30 s, 共5个循环; 85℃ 30 s, 64℃ 1 min (采集荧光信号), 共40个循环。

D.6 结果判定

阳性对照Ct值 ≤ 35 , 有明显的荧光扩增曲线, 阴性对照无Ct值, 并且无荧光扩增曲线, 试验有效;
待检样品有荧光扩增曲线, 且Ct值 ≤ 35 , 判定猫免疫缺陷病毒阳性;
待检样品无荧光扩增曲线, 或Ct值 > 35 , 判定猫免疫缺陷病毒阴性。

附 录 E

(规范性)

猫传染性腹膜炎病毒 RT-PCR 检测方法

E.1 待测样本RNA的提取与保存

将样本按照 RNA 提取试剂盒的操作说明提取 RNA，冻存于-70 °C冰箱备用。

E.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

E.3 逆转录

E.3.1 逆转录体系

25 μL 体系包括5 \times RT buffer 5 μL ，dNTP (2.5 mM) 4 μL ，随机引物 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1 μL ，AMV (10 U/ μL) 0.5 μL ，模板RNA 8 μL ，最后用灭菌双蒸水补至25 μL 。

E.3.2 逆转录反应条件

37 °C 90 min，72 °C 15 min，4 °C 5 min，各1个循环。

E.4 PCR反应引物及探针

根据 3' UTR 基因序列 (GenBank: NC_002306) 设计：

上游引物序列 (5'-3')：GGCAACCCGATGTTTAAACTGG

下游引物序列 (5'-3')：CACTAGATCCAGACGTTAGCTC

E.5 PCR反应体系及条件

E.5.1 PCR反应体系

25 μL 体系包括10 \times PCR buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL ，dNTP (2.5 mM) 2.5 μL ，上下游引物 (10 μM) 各1.5 μL ，Taq酶 (5 U/ μL) 1.0 μL ，模板cDNA 2 μL ，最后用灭菌双蒸水补至25 μL 。

E.5.2 PCR反应条件

94 °C 5 min；95 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 30 s，35个循环；72 °C延伸7 min。

E.6 PCR产物大小

223 bp。

E.7 结果判定

阳性对照出现223 bp的目的片段，阴性对照无条带，实验成立；待检样品出现223 bp目的片段时，判定猫传染性腹膜炎病毒阳性；未出现223 bp目的片段时，判定猫传染性腹膜炎病毒阴性。

附 录 F
(规范性)
猫肠道冠状病毒 RT-PCR 检测方法

F.1 待测样本RNA的提取与保存

将样本按照RNA提取试剂盒的操作说明提取RNA，冻存于-70℃冰箱备用。

F.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

F.3 逆转录

F.3.1 逆转录体系

25 μL体系包括5×RT buffer 5 μL，dNTP (2.5 mM) 4 μL，随机引物 (500 μg/mL) 1 μL，AMV (10 U/μL) 0.5 μL，模板RNA 8 μL，最后用灭菌双蒸水补至25 μL。

F.3.2 逆转录反应条件

37℃ 90 min，72℃ 15 min，4℃ 5 min，各1个循环。

F.4 PCR反应引物及探针

根据 S 基因序列 (GenBank: X80799) 设计：

上游引物序列 (5'-3')：TGCTATTAGTAAGTGGGGCC

下游引物序列 (5'-3')：ATAACCGCTACGCTTCATAC

F.5 PCR反应体系及条件

F.5.1 PCR反应体系

50 μL体系包括10×PCR buffer (含Mg²⁺) 5.0 μL，dNTP (2.5 mM) 1.0 μL，上下游引物 (50 μM) 各1.0 μL，Taq酶 (4 U/μL) 0.5 μL，模板cDNA 1.0 μL，最后用灭菌双蒸水补至50 μL。

F.5.2 PCR反应条件

94℃ 5 min；94℃ 45 s，52℃ 45 s，72℃ 90 s，30个循环；72℃延伸10 min。

F.6 PCR产物大小

366 bp。

F.7 结果判定

阳性对照出现366 bp的目的片段，阴性对照无条带，实验成立；待检样品出现366 bp目的片段时，判定猫肠道冠状病毒阳性；未出现366 bp目的片段时，判定猫肠道冠状病毒阴性。

附 录 G
(规范性)
猫白血病病毒荧光 PCR 检测方法

G.1 待测样本RNA的提取与保存

将样本按照RNA提取试剂盒的操作说明提取RNA，冻存于-70 °C冰箱备用。

G.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

G.3 逆转录

G.3.1 逆转录体系

25 μL体系包括5×RT buffer 5 μL，dNTP (2.5 mM) 4 μL，随机引物 (500 μg/mL) 1 μL，AMV (10 U/μL) 0.5 μL，模板RNA 8 μL，最后用灭菌双蒸水补至25 μL。

G.3.2 逆转录反应条件

37 °C 90 min，72 °C 15 min，4 °C 5 min，各1个循环。

G.4 荧光PCR反应引物及探针

上游引物序列 (5'-3')：CTCCCTTTCTGAAGTAGTCTTACAAAACA

下游引物序列 (5'-3')：GTGATCCGCATAGAAGCAACATTC

MGB探针 (5'-3')：(FAM) CTGTGCCGCATTA AAA (NFQ)

G.5 荧光PCR反应体系及条件

G.5.1 荧光PCR反应体系

20 μL体系包括2×Mix buffer 10 μL，上下游引物 (10 μM) 各0.4 μL，探针 (10 μM) 0.2 μL，模板cDNA 1 μL，最后用灭菌双蒸水补至20 μL。

G.5.2 荧光PCR反应条件

50 °C 2 min；95 °C 预变性10 min；95 °C 15 s，60 °C 1 min (采集荧光信号)，共40个循环。

G.6 结果判定

G.7 结果判定

阳性对照Ct值 ≤ 35 ，有明显的荧光扩增曲线，阴性对照无Ct值，并且无荧光扩增曲线，试验有效；
待检样品有荧光扩增曲线，且Ct值 ≤ 35 ，判定猫白血病病毒阳性；
待检样品无荧光扩增曲线，或Ct值 > 35 ，判定猫白血病病毒阴性。

附 录 H
(规范性)
巴尔通体荧光 PCR 检测方法

H.1 待测样本DNA的提取与保存

将样本按照DNA提取试剂盒的操作说明提取DNA，冻存于-70℃冰箱备用。

H.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

H.3 荧光PCR引物及探针

上游引物序列（5'-3'）：GGTCATATTGATGGTTTGGCTGAGA

下游引物序列（5'-3'）：GGTATAAAACGCTTTGGTACTTGTAGGA

MGB探针（5'-3'）：FAM-CACCTTCGCTTTTCTG-NFQ

H.4 荧光PCR反应体系及条件

H.4.1 荧光PCR反应体系

20 μL体系包括2×Mix buffer 10 μL，上下游引物（10 μM）各0.4 μL，探针（10 μM）0.2 μL，模板DNA 2 μL，最后用灭菌双蒸水补至20 μL。

H.4.2 荧光PCR反应条件

50℃ 2 min；95℃预变性10 min；95℃ 15 s，60℃ 1 min（采集荧光信号），共40个循环。

H.5 结果判定

H.6 结果判定

阳性对照Ct值≤35，有明显的荧光扩增曲线，阴性对照无Ct值，并且无荧光扩增曲线，试验有效；待检样品有荧光扩增曲线，且Ct值≤35，判定巴尔通体阳性；待检样品无荧光扩增曲线，或Ct值>35，判定巴尔通体阴性。

附 录 I
(规范性)
空肠弯曲杆菌 PCR 检测方法

1.1 待测样本DNA的提取与保存

将样本按照DNA提取试剂盒的操作说明提取DNA，冻存于-70℃冰箱备用。

1.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

1.3 PCR引物及探针

根据 *HIPO* 基因序列 (GenBank: LS483362.1) 设计：

上游引物序列 (5'-3')：TTGGGTGGTGCTAAGGCAAT

下游引物序列 (5'-3')：AGAAGCCATCATCGCACCTT

1.4 PCR反应体系及条件

1.4.1 PCR反应体系

20 μL体系包括2×Mix buffer 10 μL，上下游引物 (10 μM) 各0.4 μL，探针 (10 μM) 0.2 μL，模板DNA 2 μL，最后用灭菌双蒸水补至20 μL。

1.4.2 PCR反应条件

94℃ 5 min；94℃ 30 s，62℃ 30 s，72℃ 1 min，35个循环；72℃延伸5 min。

1.5 PCR产物大小

269 bp。

1.6 结果判定

阳性对照出现269 bp的目的片段，阴性对照无条带，实验成立；待检样品出现269 bp目的片段时，判定空肠弯曲杆菌阳性；未出现269 bp目的片段时，判定空肠弯曲杆菌阴性。

附 录 J
(规范性)
鸽痘病毒荧光 PCR 检测方法

J.1 待测样本DNA的提取与保存

将样本按照DNA提取试剂盒的操作说明提取DNA，冻存于-70℃冰箱备用。

J.2 对照设立

从样品处理开始应设置阳性对照、阴性对照。

阳性对照：取已知阳性的同类样品作为阳性对照，也可将适量灭活病原体或质粒添加到已知阴性样品中作为阳性对照样品。

阴性对照：取已知阴性的同类样品作为阴性对照。

空白对照：在扩增反应阶段设置。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

J.3 荧光PCR引物及探针

上游引物序列（5'-3'）：CTAATAAACTAGAAGCAGAAATAAATATGAGATCAATCAAAAAG

下游引物序列（5'-3'）：TCAGATAGTCTAGATTCACATGAGATACAAAACA

MGB探针（5'-3'）：（FAM）TCGGGATATGGGAACTTA（NFQ）

J.4 荧光PCR反应体系及条件

J.4.1 荧光PCR反应体系

20 μL体系包括2×Mix buffer 10 μL，上下游引物（10 μM）各0.4 μL，探针（10 μM）0.2 μL，模板DNA 2 μL，最后用灭菌双蒸水补至20 μL。

J.4.2 荧光PCR反应条件

50℃ 2 min；95℃预变性10 min；95℃ 15 s，60℃ 1 min（采集荧光信号），共40个循环。

J.5 结果判定

J.6 结果判定

阳性对照Ct值≤35，有明显的荧光扩增曲线，阴性对照无Ct值，并且无荧光扩增曲线，试验有效；待检样品有荧光扩增曲线，且Ct值≤35，判定鸽痘病毒阳性；待检样品无荧光扩增曲线，或Ct值>35，判定鸽痘病毒阴性。

附 录 K

(规范性)

实验鱼 4 种分枝杆菌的区分鉴定方法

实验鱼中偶发分枝杆菌、龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和海分枝杆菌的区分鉴定方法按照表K.1的规定执行。嗜血分枝杆菌采用种特异性引物进行PCR快速检测。

表 K.1 实验鱼 4 种分枝杆菌的区分鉴定方法

| | 偶发分枝杆菌 | 龟分枝杆菌 | 脓肿分枝杆菌 | 海分枝杆菌 |
|---|--------|-------|--------|----------|
| 色素产生 | - | - | - | 光照后可产生色素 |
| 硝酸还原 | + | - | - | - |
| Tween-80水解 | ± | - | - | + |
| 50g/L NaCl生长 | + | - | + | - |
| 耐热触酶 (68℃ 20min) | + | + | + | ± |
| 芳香硫酸酯酶 | + | + | + | ± |
| 尿素酶 | + | + | + | |
| 铁吸收 | + | - | - | |
| 生长速度 | 速生 | 速生 | 速生 | 缓生 |
| 注：“+”表示84%以上菌株阳性；“-”表示少于16%阳性；“±”表示50%~84%阳性。 | | | | |

附 录 L
(规范性)
实验鱼 PCR 检测方法

按照SN/T 1869进行细菌DNA提取、PCR扩增、电泳和结果分析。实验鱼有关细菌的属或种特异性PCR扩增引物见表L.1。对扩增产物进行常规的分子克隆和测序比对。

表 L.1 实验鱼 PCR 检测方法

| 菌种或菌株 | 引物名称和序列 | 扩增产物大小 |
|----------------------------------|---|--------|
| Flavobacterium spp. ^a | AGRGTTTGATCMTGGCTCAG GGACCCTTTAAACCCAAG | 561bp |
| Flavobacterium Colummure | GCCCAGAGAAATTTGGAT TGCGATTACTAGCGAATCC | 1193bp |
| Flavobacterium psychrophilum | AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT | 1498bp |
| F. psychrophilum 巢式PCR引物 | GTTGGCATCAACACACT CGATCCTACTTGCGTAG | 1089bp |
| Mycobacterium spp. ^a | GCGAACGGGTGAGTAACACG TGCACACAGGCCACAAGGGA | 924bp |
| Mycobacterium 巢式PCR引物 | AATGGGCGCAAGCCTGATG ACCGCTACACCAGGAAT | 300bp |
| Mycobacterium haemophilum | GACGAAGTCGTAACAAGG TGAACACGCCACCATTAC | 220bp |
| Vibrio spp. ^a | AAATCAGGCTCGGGCCCT GCAATTTT (A/G) TC (A/G/T) AC (C/T) GG | 241bp |
| Vibrio cholerae | CACCAAGAAGGTGACTTATTGT GAACTTATAACCACCCGCG | 588bp |
| Streptococcus spp. ^a | GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC ACGTTTCGATTTTCATCACGTTG | 197bp |
| Streptococcus iniae | AAGGGGAAATCGCAAGTGCC ATATCTGATTGGGCCGTCTAA | 850bp |
| Aeromonas spp. ^a | CTACTTTTGCCGGCGAGCGG TGATTCCCGAAGGCACTCCC | 953bp |
| ^a 为相应细菌的属特异性引物。 | | |

参 考 文 献

- [1] GB 14925 实验动物 环境及设施
 - [2] ZIRC Health Services Zebrafish Disease Manual
-