

第十章 T/CALAS 61—2018《实验动物 病原核酸检测技术要求》实施指南

第一节 工作简况

实验动物的病原检测有诸多方法，目前有越来越多的单位采用病原核酸的检测技术来对实验动物的病原感染情况进行检测和监测。然而由于诸多原因，使用核酸检测技术来监控实验动物的病原仍存在问题，需要对检测技术提出规范化的要求，以满足我国实验动物病原核酸检测的需要。

2015 年 11 月中国实验动物学会下达《实验动物核酸检测技术指南》团体标准编制任务。承担单位为中国医学科学院医学实验动物研究所及中国食品药品检定研究院，广东省实验动物监测所等协作单位。

第二节 工作过程

自 2015 年 11 月接到中国实验动物学会下达的编制任务之后，编写人员开始大量的文献检索和资料调研工作。编制工作组在 2016 年 6 月启动编制工作，召开会议讨论并确定了标准编制的原则和指导思想。

2017 年 7~8 月，由中国实验动物学会面向实验动物行业单位公开征求意见。

2017 年 8 月，工作组整理汇总专家对本标准征求意见稿提出的问题，最终形成标准送审稿和编制说明。

2018 年 5 月，团体标准经过了专家的会议评审，工作组针对专家意见进行了认真修订。

2018 年 6 月，经专家委员会的再次会议审定，工作组做了最后的修改，形成报批稿。

2018 年 7 月 1 日，本标准获得批准发布并实施。

第三节 编写背景

微生物等级及监测是实验动物标准化（质量控制）中的重要组成部分。实验动物病原检测主要是病原分离鉴定和血清学抗体检测。病原核酸检测可以作为补充。

近年来，国内外已有部分关于动物病原核酸检测的相关研究报道，且有大量实验动物病原核酸检测方法的已提交申请团体标准，但至今仍然缺乏对实验动物病原核酸检测方法建立的一个具有指导性和规范性的技术标准，难以保证所用实验动物病原核酸检测方法的

标准化。因此,在前期大量研究基础上,本标准的制定旨在按照我国实验动物质量控制等级要求,基于排除引起人兽共患病、实验动物烈性传染病,以及对科学研究干扰大的各类细菌、真菌和病毒等病原的实际目的,规范实验动物病原核酸检测标准、检测方法和检测程序等,制定实验动物病原核酸检测技术的国家团体标准。只有实现实验动物病原核酸检测技术的规范化和标准化,才能保证实验动物病原核酸检测实验结果的科学性和可靠性。

第四节 编制原则

本标准在制定中应遵循以下基本原则:

- (1) 本标准编写格式应符合 GB/T 1.1—2009 的规定;
- (2) 本标准规定的技术内容及要求应科学、合理,具有适用性和可操作性;
- (3) 本标准的水平应达到国内领先水平。

第五节 内容解读

本标准由范围、规范性引用文件、术语和定义、实验室质量控制要求、采样要求、制样要求、扩增反应设计、核酸检测要求、样品备份保存和废弃物处理、结果判定共 10 部分构成。现将主要技术内容说明如下。

一、范围

本文件适用于实验动物及其产品、细胞培养物、实验动物设施环境和动物源生物制品中病原核酸的检测技术。

本文件规定了对实验动物病原核酸检测技术方法的要求,包括对样品采集、核酸检测方法和结果判定等。

二、规范性引用文件

GB 14922	《实验动物 微生物学等级及监测》
GB 19489	《实验室生物安全通用要求》
GB/T 19495.1	《转基因产品检测通用要求和定义》
GB/T 27401	《实验室质量控制规范动物检疫》
GB/T 27403	《实验室质量控制规范食品分子生物学检测》
NY/T 541	《动物疫病实验室检验采样方法》
CNAS-CL36	《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》

三、术语和定义

1.

实验室样品 laboratory sample

由原始样品经过混合，缩分得到的一定数量样品，用于制备试样和存查样品。此术语定义参考 GBT 19495.1《转基因产品检测通用要求和定义》。

2.

测试样品 test sample

由全部或部分实验室样品经过进一步均匀化得到的用于分析或测试的样品。此术语定义参考 GBT 19495.1《转基因产品检测通用要求和定义》。

3.

特异性 specificity

特异性是指核酸检测方法所选用引物在含有目标检测病原核酸的样本中经过扩增有且只有单一扩增产物，而且在测试样品中含有其他病原微生物核酸的情况下不产生非特异扩增。

4.

敏感性 sensitivity

敏感性是指对该检测方法所能检测到病原核酸的最低检测限的评估。

5.

检测低限 detection limit

检测低限是指被检测物能被可靠检出的最低浓度或含量。此术语定义参考 GBT 19495.1《转基因产品检测通用要求和定义》。

6.

蓝冰运输 blue ice transport

采用可循环利用的高效蓄冷载体来维持检测样品在 2~8℃温度范围内运输。

7.

实验动物病原核酸 pathogen nucleic acid of laboratory animals

实验动物天然携带或是人为感染的病原微生物，为了研究或是健康监测等目的而需要对病原微生物进行检测，病原微生物自身的基因组 DNA 或是 RNA。

8.

核酸提取 nucleic acid extraction

从测试样品中分离提取出 DNA 或 RNA。

9.

标准物质 standard substance

用于实验动物病原核酸检测，其性质满足设备校准、实验方法评估等需求的一类物质。

10.

阳性目标核酸对照 positive target nucleic acid control

从可溯源的标准物质提取的核酸或含有已知序列的阳性样品或生物中提取的核酸，该对照用于证明测试样品的分析结果含有目标序列。

11.

阴性目标核酸对照 negative target nucleic acid control

不含有目标核酸序列的核酸，可使用可溯源的阴性标准物质。

12.

扩增试剂对照 amplification reagent control

该对照含有除了目标核酸模板以外所有的反应试剂，在扩增反应体系中用相同体积的水（不含核酸）取代核酸模板。

13.

提取空白对照 extract blank control

该对照为在核酸提取过程中，以水代替测试样品完成核酸提取过程所有步骤，用以证明提取过程中没有核酸污染。

14.

阳性提取对照 positive extraction control

用含有已知目标核酸的样品与测试样品同时提取核酸，证明用同样的提取方式，两者都可以提取出目标核酸。

15.

环境对照 environmental control

用于确定如实验室空气没有受到核酸污染的样品对照，该对照是在管中添加不含核酸适当体积的水，在样品测试的过程中即从混样到扩增均敞开与空气接触。

四、实验室质量控制要求

核酸检测实验室最重要的质量控制在于对于核酸污染的控制，因此在实验室设计和运行管理上应有较高的要求。

本部分参考 GB/T27403《实验室质量控制规范食品分子生物学检测》的管理要求和技术要求，亦可参考 GB/T19495.2《转基因产品检测实验室技术要求》和 CNAS-CL36《医学实验室质量和能力认可准则》在分子诊断领域的应用说明，包括检测实验室分区、检测设备校准和试剂及标准物质的质量控制等方面。

五、采样要求

采样方法应参考 GB/T 27401《实验室质量控制规范 动物检疫》、GB/T 14926.42《实验动物细菌学检测标本采集》、NY/T 541《动物疫病实验室检验采样方法的相关要求》。

1. 生物安全要求

遵循 GB19489《实验室生物安全通用要求》。应定期对实验动物设施中实验动物的病原暴露风险进行调查和评估，并制定合适的检测时间和频度。

2. 采样位置的确定

应根据病原传播途径和组织嗜性等特点来确定样品采集位置，并进行核酸扩增实验验证。例如，仙台病毒和小鼠肺炎病毒属于呼吸道病毒，可以采取肺组织进行核酸检测；小鼠肝炎病毒经粪便排毒，可以通过采集粪便或肠内容物来进行核酸检测，若实验小鼠接触

污染的饲料、饮水、用具和周围环境等，可经口，鼻等途径发生感染，也可以通过对实验动物设施的环境样品进行采集和核酸检测。

3. 采样时间和周期的确定

应通过动物感染实验确认病原感染窗口期，并进行核酸扩增实验验证，从而确定样品采集时间和周期。

4. 样品处置

样品采集范围包括实验动物组织、血液、呼吸道分泌物、胃肠内容物或粪便、细胞培养物、实验动物饲料垫料和饮水、实验动物设施设备棉拭子及设施设备空间气体样品。必要时采取适当的方法进行富集或浓缩。为考虑核酸稳定性，应选择合适的保存液和预处理方式。例如，血液样品应避免溶血现象的发生，否则会严重影响核酸检测结果；应尽量减少样品保存液对核酸稳定性的影响。

六、样品的运输和保存

样品采集后，应用密封容器立即送往检测实验室。常规检测样品一般要求蓝冰运输（2~8℃）和冷冻保存（-20℃或-80℃）。不能尽快处置的实验室样品，应按规定条件储存，以尽可能减少核酸降解，并在规定时间内进行样品检测。超长期储存后的实验室样品，再次使用前应再次评估标本的完整性。

由于运输条件、样品保存条件和有效保存时间可能使样品核酸降解，影响样品检测结果的真实性，应根据不同样品类型和待检病原特点，通过核酸检测试验验证，规定样品运输和储存条件及样品检测有效时间，应保证样品阳性误差率小于或等于 5%。

七、制样要求

本部分引用 GB/T19495.1《转基因产品检测通用要求和定义》及 GB/T19495.2《转基因产品检测实验室技术要求》。

送检样品的包装应完好且有明确标识，包括但不限于采样时间、样品来源、样品类型、数量、样品编号、采样人员等。实验室收到样品后，应对申请单进行确认，审查抽样报告，核查样品标识，确认无误后，再进行样品制备。将实验室样品均匀混合，取一半作为留存样品，另一半用于检测。在对实验室样品进行混样、测试样品的制备等过程中，应避免交叉污染。

八、核酸检测要求

（一）核酸检测方法要求

应对引物的特异性和扩增方法的敏感性进行评价。核酸检测方法的特异性必须通过有效实验加以证明，实验动物有效性应考虑测试样本的数量，并经过多次重复实验加以验证。有效性的实验须阳性误差率应小于或等于 5%。检测低限应符合分析物的最低含量水平即阴性误差率小于或等于 5%，实际的检测低限是指目标核酸能被检出的最低含量，它与测试样品、核酸质量和（或）数量及方法的绝对低限有关。已建立的核酸检测方法，应通过其他三家检测实验室的验证，确定该方法的适用性。

（二）扩增反应设计

1. 引物

应给出引物完整的序列信息资料，且必须证实引物能够扩增其目标序列。必须进行引物特异性验证，即对实验动物其他病原核酸进行核酸扩增试验时不产生非特异扩增。

2. 扩增反应体系和条件

反应条件，特别是镁离子浓度及热循环条件要针对每个引物和体系进行优化。对于特定的样品，首次使用某一引物体系时，要证实所采用的循环条件不出现竞争性产物，以免降低核酸检测敏感性。

（三）核酸检测操作要求

1. 核酸提取

样本的核酸提取应当在样本处理区进行。对样品进行核酸提取可采用 260 nm 紫外波长测定确认核酸提取的产率、 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 的比值确认核酸提取纯度。

每个实验室样品必须设置两个提取平行样，每一次从测试样品提取核酸的过程都必须设置一个提取空白对照（以水代替样品），样品数量超过一定量就必须增加阴性提取对照，阳性提取对照必须有计划地应用，或者当使用一批新的提取试剂时也要应用，以揭示试剂是否有效或者提取步骤是否存在错误，在实验的整个过程中必须设立环境对照。

2. 核酸扩增

1) 核酸扩增反应体系的配置

推荐先配制至少 10 次量的各种试剂混合液，然后再分装到每个反应管中。这样可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂，同时也可以减少实验操作或实验之间产生的误差。

2) 设置对照实验

每次检测应同时设计阳性目标对照、阴性目标对照、试剂空白对照和提取空白对照，其中阳性对照以含有核酸作为阳性对照模板，阴性对照以不含有核酸样本（可以是正常动物组织或正常培养物）作为阴性对照模板，空白对照即为不加模板对照，即在反应中用水来代替模板。确保检测试剂是否有效和反应体系是否存在污染。

加样过程为：先加空白对照，然后加样品核酸提取物，再加阴性对照，最后加阳性对照。

3. 扩增产物的检测和确证

1) 扩增产物的检测

根据不同的核酸扩增方法，应给出具体的扩增产物检测方法。

2) 扩增产物的确证

必要时，取待检样本扩增出的阳性扩增产物进行核酸序列测定，序列结果与已公开发表的特异性片段序列进行比对，序列同源性在 90% 以上，可确诊待检样本含目标核酸。

九、样品备份保存和废弃物处理

实验室样品、核酸提取物和（或）核酸扩增产物应视样品的状态采用相应的保存方式，规定保存期，以备复验、谈判和仲裁。保存期满后，需经无害化处理。

废弃物处理包括移液器吸头、PCR 产物、阳性样品和阳性质粒等。使用过的移液器吸头应经高温高压处理后丢弃。PCR 产物、阳性样品和阳性质粒应放入含有 1 mol/L 盐酸溶液中浸泡，浸泡时间不宜少于 6 h。

十、结果判定

1. 质控标准

检测结果应来自同一实验室样品的两份测试样品。当一份测试样品的结果为阳性、另一份测试样品的结果为阴性时，应重做检测，可能的话，可通过增加核酸扩增反应中的核酸模板量，使两份试样得到同样的结果，此外还需检测模板核酸的质量。

2. 结果分析与判定

各种对照的核酸扩增结果与测试样品结果判定的关系见表 1。表 1 可用于分析和报告测试样品的检测结果。

表 1 各种对照的核酸扩增结果与测试样品结果判定的关系

测试样品	阳性提取对照	提取空白对照	阴性目标核酸对照	阳性目标核酸对照	结果分析
+	+	-	-	+	阳性
-	+	-	-	+	阴性
+	-	+	-	+	可疑 ^c
-	-	-	-	+	可疑 ^d
+	+	+	+	+	可疑 ^e
-	-	-	-	-	可疑 ^f

a. 目标扩增产物可检出；b. 未检出目标扩增产物；c. 应从提取核酸开始重做实验（可能存在污染）；d. 应更换核酸提取方法或提取试剂；e. 应更换核酸扩增试剂（可能存在污染）；f. 应更换核酸扩增试剂（可能试剂失效）。

第六节
 分
 析
 报
 告

本标准作为实验动物病原核酸检测的技术要求、各类核酸检测技术方法及各个实验室在进行技术方法验证时，可参考本技术要求对于技术方法进行验证并编制报告。

第七节
 其
 他
 说
 明

一、国内外同类标准分析

目前国内外尚无针对实验动物的病原核酸检测提出具体的技术要求的标准。本标准系第一个实验动物病原核酸检测技术要求的团体标准。

二、与法律法规、标准的关系

本标准按 GB/T 1.1—2009 规则和实验动物标准的基本结构编写，与实验动物标准体系协调统一；本标准与《实验动物管理条例》、《实验动物质量管理办法》等国家相关法规和实验动物强制性标准的规定和要求协调一致。目前实验动物国家标准没有小鼠泰勒病毒检测方法标准，本标准作为团体标准是对现有标准的有利补充。

三、重大分歧意见的处理经过和依据

从标准结构框架和制定原则的确定、标准的引用、有关技术指标和参数的试验验证、主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见（通过函寄和会议形式多次咨询和研讨），均未出现重大意见分歧的情况。

四、作为推荐性标准的建议

本标准发布实施后作为推荐性标准使用。

五、标准实施要求和措施

本标准发布实施后，建议通过培训班、会议宣传和网络宣传等形式积极开展宣传贯彻培训活动，面向各行业开展动物实验的机构和个人，宣传贯彻标准内容。

第八节 本标准常见知识问答

1. 检测样品的运输和保藏，是否有具体的时间和温度的要求？

答：不同的病原微生物，在不同的原始样品中，其储藏条件会对检测结果产生一定影响。因此，本技术要求建议在低温条件下，采样一定的运输环境来储运样品，并在一定时间范围内进行检测。具体到每种病原、每类样品，需要进行具体测试来制定相应的规范。

2. 实验动物病原核酸检测的生物安全要求具体的有什么要求？

答：进行病原核酸检测的实验室一方面要满足对于普通生物安全实验室的要求，另一方面还要考虑到核酸检测的特殊性。因此，此类实验的生物安全要求可参考所检测病原归属的生物安全实验室等级的要求，并根据各类病原做出具体规范。