

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 61—2018

实验动物 病原核酸检测技术要求

Laboratory animal - Guideline for pathogen nucleus detection

2018-06-30 发布

2018-07-01 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T1.1—2009 给出的规则编制。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本标准起草单位：中国医学科学院医学实验动物研究所，中国食品药品检定研究院，广东省实验动物监测所。

本标准主要起草人：向志光、孔琪、秦川、魏强、岳秉飞、张钰、李欣悦、佟巍、张丽芳、阮研硕。

实验动物 病原核酸检测技术要求

1 范围

本标准规定了实验动物病原核酸检测技术方法的通用要求，包括实验室质量控制、采样、样品运输和保存、制样、核酸检测、结果判定等。

本标准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方法的建立。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是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 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》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验室样品 laboratory sample

由原始样本经过混合、缩分得到的一定数量样品，用于制备测试样品和存查样品。

3.2

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。

3.3

特异性 specificity

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。

3.4

敏感性 sensitivity

对检测方法所能检测到病原核酸的最低检测限的评估。

3.5

检测低限 detection limit

被检测物能被可靠检出的最低浓度或含量。

3.6

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。

3.7

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，检测对象为病原微生物自身的基因组 DNA 或是 RNA。

3.8

核酸提取 nucleic acid extraction

从测试样品中分离提取出 DNA 或 RNA。

3.9

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。

3.10

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

从可溯源的标准物质，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。

3.11

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。

3.12

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。

3.13

提取空白对照 extract blank control

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。

3.14

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。

3.15

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的适当体积水，在样品测试的过程中即从混样到扩增均敞开与空气接触。

4 实验室质量控制要求

4.1 检测实验室应按照实验室样品与测试样品制备、核酸扩增、扩增产物的实验流程将检测实验室进行物理分区，并进行相应的管理，以满足参考标准 GB/T 19495 和 GB/T 27403 的技术要求。条件允许时，应设置试剂储备区。对于使用荧光信号检测扩增产物的技术体系，可合并核酸扩增与产物分析区域。

4.2 检测设备校准参考 CNAS-CL36。

4.3 检测试剂应进行验收，必要时应进行性能验证。

5 采样要求

5.1 采样方法

可参考 GB/T 27401 及 NY/T 541 执行。

5.2 生物安全要求

遵循 GB19489 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。

5.3 采样位置的确定

应根据病原在实验动物中的传播途径和动物组织嗜性等特点确定样本采集部位。

5.4 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，确定样本采集时间和周期。

5.5 样本处置

样本采集范围包括：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本。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。

6 样品的运输和保存

样本采集后，应用密封容器立即送往检测实验室。常规检测样本一般要求蓝冰运输（2~8℃）和冷冻保存（-20℃或-80℃）。不能尽快处置的实验室样品应冷冻储存，以尽可能减少核酸降解。实验室应根据样品的储运条件对采样与检测的间隔时间做出规定，并应在规定时间内进行样本检测。超长期储存后的实验室样本，再使用前应再次评估标本的完整性。

7 制样要求

7.1 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、样品数量、样品编号、采样人员等。

7.2 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。

7.3 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。

7.4 在对实验室样品进行混样、测试样品的制备的过程中，应避免交叉污染。

8 核酸检测要求

8.1 核酸检测方法要求

8.1.1 应对引物的特异性和扩增方法的敏感性进行评价。

8.1.2 核酸检测方法的特异性应通过有效实验加以证明，阳性误差率应小于等于 5%。检测低限应符合分析物的最低含量水平，即阴性误差率小于等于 5%。

8.1.3 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。

8.2 扩增反应设计

8.2.1 引物

应给出引物完整的序列信息资料，且应证实引物能够扩增其目标序列；应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。

8.2.2 扩增反应体系

应针对每个引物和体系优化反应条件，特别是镁离子浓度及热循环条件。对于特定的样品，首次使用某一引物体系时，应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。

8.3 核酸检测操作要求

8.3.1 核酸提取

8.3.1.1 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 260nm 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。

8.3.1.2 每个实验室样品应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应设置一个提取空白对照（以水代替样品），阳性提取对照应有计划地应用，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应设立环境对照。

8.3.2 核酸扩增

8.3.2.1 核酸扩增反应体系的配制

应先配制多次量的各种试剂混合液，然后再分装到每个反应管中。

8.3.2.2 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。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（可为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。

8.3.2.3 加样过程

加样前应确保检测试剂是否有效和反应体系是否存在污染。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。

8.3.3 扩增产物的检测和确证

8.3.3.1 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。

8.3.3.2 扩增产物的确证

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。

9 样品备份保存和废弃物处理

9.1 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，应经无害化处理。

9.2 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，浸泡时间应不少于 6 h。

10 结果判定

10.1 质量控制

10.1.1 应检测模板核酸的质量。

10.1.2 检测结果应来自同一实验室样品的两份测试样品。

10.1.3 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，应重新检测。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。

10.2 结果判定

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，可用于分析和报告测试样品的检测结果。当测试对照样品的结果不满足下述条件时，不能做出判断。

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

a. 目标扩增产物可检出；b. 目标扩增产物未检出。

