



# 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

本标准是对 GB/T 14926.8—1994《实验动物 肺支原体检验方法》的修订。

本标准取消了用于支原体种鉴定的生长抑制试验,将盲传次数减至 1 次,增加了 ELISA 法作为初步检测的选用方法。

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:李红。

本标准于 1994 年 1 月首次发布。

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.8—2001

## 实验动物 支原体检测方法

代替 GB/T 14926.8—1994

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

---

### 1 范围

本标准规定了实验动物支原体的检测方法。

本标准适用于小鼠、大鼠的支原体检测。

### 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

对实验动物具有致病能力的支原体主要寄居其上呼吸道,支原体在半流体培养基和固体培养基上可形成特殊菌落,菌落可被 Dienes 染色液染成蓝色而不褪色,据此可进行病原学鉴定。动物感染支原体后血清中可产生相应抗体,使用 ELISA 法可进行抗体检测,但由于动物自然感染后血清抗体水平较低,亦有可能因与其他病原微生物存在共同抗原而导致的交叉反应,故血清学方法仅作为初步检测的选用方法。

### 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 涡旋混匀器。

4.4 毛细吸管,每份样品 1 支。

4.5 恒温水浴箱。

4.6 高速离心机。

4.7 超声波细胞粉碎器。

4.8 酶标仪。

4.9 聚苯乙烯板,40 孔、55 孔或 96 孔(可拆或不可拆),用前洗净晾干,紫外光照射 1 h。

4.10 微量加样器,容量 5~50  $\mu\text{L}$  和 50~200  $\mu\text{L}$ 。

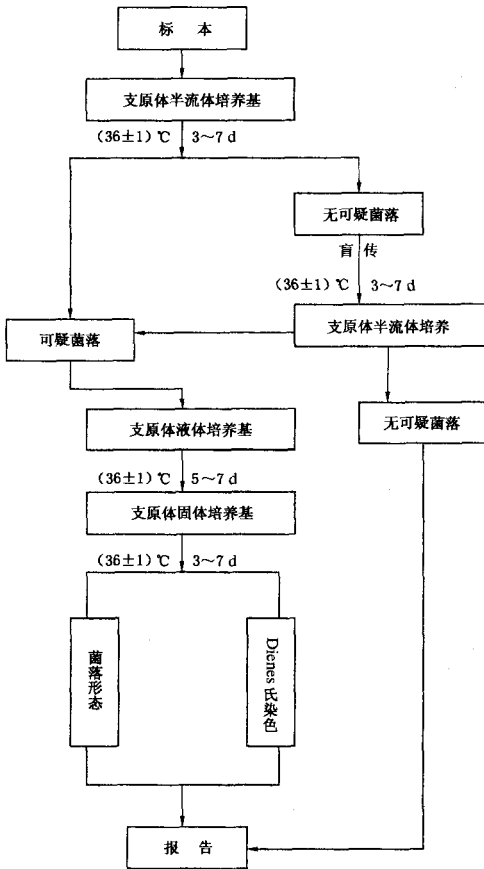
### 5 培养基和试剂

#### 5.1 支原体半流体培养基。

- 5.2 支原体液体培养基。
- 5.3 支原体固体培养基。
- 5.4 Dienes 染色液。
- 5.5 ELISA 抗原
  - 5.5.1 支原体培养:肺支原体、关节支原体和溶神经支原体标准株接种支原体液体培养基,36℃摇动培养 2~3 d。
  - 5.5.2 已明显混浊的培养液按 8 000 r/min 离心 30 min,沉淀用 PBS 在相同条件下洗 3 次。
  - 5.5.3 上述沉淀用 PBS 悬浮,超声波打碎后,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小鼠、大鼠 IgG 抗体,用于检测相应动物血清抗体;辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白 A(SPA),用于检测小鼠血清抗体。
- 5.7 阳性血清
  - 支原体抗原免疫清洁级或 SPF 级小鼠或大鼠所获得的抗血清。
- 5.8 阴性血清
  - 无支原体感染的清洁级或 SPF 级小鼠和大鼠血清。
- 5.9 其他试剂溶液的配制见 GB/T 14926.49—2001。

## 6 检测方法

- 6.1 分离培养法
  - 6.1.1 检测程序



## 6.1.2 操作步骤

### 6.1.2.1 采样

取包括咽部及以下气管约 5~10 mm 左右放入装有 0.6~0.7 mL 酵母浸液的试管中,用蜗旋混匀器制成洗脱液。

### 6.1.2.2 分离培养

按 GB/T 14926.42—2001 4.18 进行接种后放  $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$  培养箱培养。

### 6.1.2.3 鉴定

a) 支原体在半流体培养基中经 3~7 d 培养,在培养基的上部可形成小的慧星状、云雾状或沙粒状菌落。

b) 吸取含可疑菌落的半流体培养物约 0.5 mL 转种支原体液体培养基,  $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$  培养 5~7 d,吸取该培养物约 0.1 mL 接种于支原体固体培养基,用 L 棒涂抹均匀,待表面干后将培养基放入保鲜袋,

密闭,  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  培养。

c) 支原体在固体培养基培养 3~7 d 后可形成“煎蛋状”或“杨莓状”菌落。

d) 染色: 将有可疑菌落的固体培养基平皿进行 Dienes 染色, 30 min 或更长时间后支原体菌落依然为蓝色, 而细菌 L 型菌落则变为无色。

e) 如初代半流体培养 7 d 无可疑菌落出现, 应吸取约 1/10 的初代培养基接种于相同培养基进行盲传, 经  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  培养 7 d, 如仍无可疑菌落出现则判定为阴性; 对出现可疑菌落者则按照“b)、c)、d)”步骤进行鉴定。

## 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  $\mu\text{L}$ , 置  $37^\circ\text{C}$  1 h 后再  $4^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{L}$ , 置  $37^\circ\text{C}$ , 避光显色 10~15 min。

### 6.2.6 终止反应

每孔加入终止液 50  $\mu\text{L}$ 。

### 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  $\geq 0.2$ ;

b) 待检血清的 A 值/阴性对照血清的 A 值  $\geq 2.1$ 。

#### 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。

#### 6.2.8.4 对阳性结果需重试, 如为阳性则判为阳性。

## 7 结果报告

ELISA 法结果阳性者应抽取相同动物群动物进行支原体分离培养, 符合上述培养、染色特征者作出阳性报告, 不符合者作出阴性报告。