



中华人民共和国国家标准

GB/T 41699—2022

兽用生物制品外源支原体检验方法

Detection of mycoplasma contamination in veterinary biological product

2022-10-12 发布

2023-05-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国质量监管重点产品检验方法标准化技术委员会(SAC/TC 374)提出并归口。

本文件起草单位：中国兽医药品监察所。

本文件主要起草人：罗玉峰、沈青春、孟杰、郑存哲、曲鸿飞、王芳、刘博、耿仁浩、魏津、马欣、王德丽、肖璐、陈冬阳。

引 言

当前我国兽用活疫苗制品的支原体检验方法存在检测周期长、检测结果受培养基质量影响较大等问题。本文件参考现行《中国兽药典》《中国药典》等收录的生物制品支原体检验方法,结合生物信息技术研究制定了支原体检测聚合酶链式反应(PCR)的检验方法,并对支原体检验培养法进行了改进。本文件的制定可以规范我国兽用生物制品的生产和检验中的支原体检验。

兽用生物制品外源支原体检验方法

1 范围

本文件描述了用聚合酶链式反应(PCR)法、培养法检验兽用生物制品外源支原体的原理、方法和综合判定。

本文件适用于兽用生物制品中外源支原体的检验。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

支原体 mycoplasma

一种类似细菌但无胞壁、直径 50 nm~300 nm、能通过细菌滤器的原核微生物。

注：支原体是能在人工培养基上独立生长繁殖的结构最简单的微生物，能通过细菌滤器，是引起兽用生物制品污染的重要微生物。

3.2

16S rRNA 基因 16S rRNA gene

细菌细胞内编码 rRNA 相对应的 DNA 序列。

4 原理

通过物理和化学方法使样品脱氧核糖核酸(DNA)从各组分中分离出来，利用苯酚、三氯甲烷(氯仿)、异戊醇等除去样品中的蛋白质、脂肪、多糖及其他次生代谢物，然后采用乙醇沉淀和洗涤核酸样品，获得纯化的 DNA。对现有已公布支原体种类的 16S rRNA 基因序列进行分析，设计能够检测支原体及甾原体的通用引物，建立兽用生物制品产品及细胞的外源支原体检验聚合酶链式反应(PCR)方法。

使用支原体培养基，通过分离培养的方法，对可能污染支原体的兽用生物制品产品及细胞进行人工培养，再通过是否有支原体生长，判断样品是否存在支原体污染。

5 支原体检验聚合酶链式反应(PCR)法

5.1 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1.1 平衡酚：配制按照附录 A 中 A.1.1 的方法。

5.1.2 苯酚：氯仿：异戊醇(25：24：1，体积比)：配制按照 A.1 的方法。

5.1.3 电泳缓冲液(TAE)：配制按照 A.2 的方法。