

国家标准

《实验动物 泰泽病原体检测方法》

编制说明

联 系 人：戴方伟

联系电话：13116754770

编制单位：杭州医学院

时 间：2026 年 8 月 10 日

《实验动物 泰泽病原体检测方法》编制说明

（一）工作简况，包括任务来源、制定背景、起草过程等

1.1 任务来源

2026 年 1 月 28 日，全国实验动物标准化技术委员会和中国实验动物学会接到了推荐性国家标准 GB/T 14926.10《实验动物 泰泽病原体检测方法》（任务编号：20260680-T-306）修订任务，组织国内专家开展标准修订工作。

1.2 标准编写背景

泰泽病原体是我国实验动物国家标准《GB 14922-2022 实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测》中要求排除的关键病原项目之一，对保障实验动物质量和科学研究可靠性至关重要。

我国实验动物泰泽病原体检测方法的国家标准建设始于上世纪 90 年代。GB/T 14926.10《实验动物 泰泽病原体检测方法》于 1994 年首次发布，首次以技术标准的形式对实验动物的泰泽病原体检测提出明确要求。该标准在 2001 年进行了首次修订（GB/T 14926.10-2001），在 1994 版基础上将标准名称调整为《实验动物 泰泽病原体检测方法》，新增酶联免疫吸附试验（ELISA）及免疫荧光试验（IFA）作为初步检测的选用方法。在 2008 年进行了第二次修订，发布现行 GB/T 14926.10-2008，删除了可的松激发试验，并对两种血清学方法进行修改，形成以 ELISA 和 IFA 检测方法为主要内容的标准体系。现行版本自 2009 年 3 月 1 日实施至今，已运行十余年，已成为国家及省级检测机构进行质量监督的核心方法，为我国实验动物质量的整体提升发挥了不可替代的作用。

现行 GB/T 14926.10-2008 中 ELISA 和 IFA 检测方法的核心原理是动物感染泰泽病原体后产生相应抗体，再依据免疫学原理进行检测。该技术路线成熟、应用时间长，但抗体检测依赖宿主免疫应答，在感染早期抗体尚未达到可检出水平时存在窗口期；对于免疫应答较弱、免疫抑制或感染阶段不同的动物，单纯依赖血清学结果可能受到限制。与此同时，随着分子生物学的发展，实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）技术已广泛应用于病原体核酸检测，具有直接检测目标基因核酸、检测周期短、闭管操作、适于标准化和批量检测等特点。

实时荧光定量 PCR 与血清学检测针对病原感染的不同生物学指标，两者具有明显的互补价值。随着 GB 14922-2022 新国标的实施，对实验动物微生物学等级及监测提出了更高要求，因此修订原有检测方法标准，引入成熟的分子生物学检测技术刻不容缓。

杭州医学院等单位在推动检测技术开发和标准化方面已积累了实践经验。为进一步提高泰泽病原体检测的准确性、效率与标准化水平，适应行业发展的迫切需求，亟需对现行标准进行修订，将成熟、可靠的现代分子生物学检测技术（特别是实时荧光定量 PCR 方法）纳入国家标准的框架内。

1.3 起草过程

任务下达后中国实验动物学会立即组织专家成立修订工作组。

2026 年 2 月召开了标准修订的第一次工作会议，明确了修订的要点和责任分工；

2026 年 2 月-2026 年 5 月，经查阅泰泽病原体检测相关资料，讨论和确定标准相关研究内容，起草了《实验动物 泰泽病原体检测方法》标准框架和编写要求，并对标准的研究进度做出安排。期间完成了对标准及相关资料数据的收集、整理和分析，形成标准编写框架，完成第一稿；

2026 年 5 月，召开了标准修订的第二次工作会议，阶段性汇报了标准修订进展，讨论并解决了靶基因选择、适用范围界定及阳性样本稀缺问题，确立了以天然样本为准的质控原则，并明确了 8 月提交征求意见稿的时间节点；

2026 年 5 月-6 月，测试和评价了标准中新增方法涉及的试剂、参数、各性能指标；

2026 年 6 月，召开了标准修订的第三次工作会议，介绍了新版国家标准智能化研制系统的使用要求，阶段性汇报了标准修订进展，明确了第三方验证比对的要求；

2026 年 7 月-8 月，确认和验证了标准中新增方法的检测能力，开展了第三方实验室验证和比对工作；

2026 年 8 月，汇报和讨论了《实验动物 泰泽病原体检测方法》的工作完成情况，形成并完善了征求意见稿，提交至国家标准智能化研制系统。

依据工作分工，杭州医学院主持 GB/T 14926.10《实验动物 泰泽病原体检测方法》修订工作。本次修订组成员包括：杭州医学院的戴方伟、石巧娟、柯贤福、傅佳妮；苏州西山生物技术有限公司的郭连香、中国医学科学院医学实验动物研究所的向志光、中国食品药品检定研究院的邢进、华南农业大学的刘忠华、广东省生物技术研究院（广东省实验动物监测中心）的闵凡贵、中国医学科学院基础医学研究所的吕安、西安交通大学的刘恩岐、江西省职业病防治研究院的贾波。

（二） 国家标准编制原则、主要内容及其确定依据，修订国家标准时，还包括修订前后技术内容的对比

2.1 标准编制原则

本标准的编制主要遵循以下原则：

1. 科学性原则。在尊重科学、亲身实践、调查研究的基础上，制定本标准。
2. 可操作性原则。本标准新增核酸检测方法，无论是从样品采集，处理，PCR 反应，均操作简单，具有可操作性和实用性。
3. 协调性原则。以切实提高我国实验动物泰泽病原体检测技术水平为核心，符合我国现行有关法律、法规和相关的标准要求。

2.2 主要内容及其确定依据

标准主要内容包括范围、规范性引用文件、术语和定义、原理、主要设备和材料、试剂、检测方法、结果判定、结果报告、附录共十个章节。本次修订主要增加了核酸检测方法，核酸检测方法具体内容在附录 A 中进行了描述，并对标准正文中范围、规范性引用文件、术语和定义、原理、主要设备和材料、试剂、检测方法、结果判定做了相关内容的修改。

2.3 修订前后技术内容的对比

本次修订和 GB/T 14926.10-2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了范围（见第 1 章，2008 年版的第 1 章）；
- b) 更改了规范性引用文件（见第 2 章，2008 年版的第 2 章）；

- c) 增加了术语和定义（见第 3 章）；
- d) 更改了原理（见第 4 章，2008 年版的第 3 章）；
- e) 更改了主要设备和材料（见第 5 章，2008 年版的第 4 章）；
- f) 更改了试剂（见第 6 章 6.1.2.1、6.1.3-6.1.6，2008 年版的第 5 章 5.2.1、5.3-5.7）；
- g) 增加了“生物安全措施”（见 7.1）、“实验室总体技术要求”（见 7.2）、“样本采集和处理”（见 7.3）；
- h) 更改了结果判定（见第 8 章，2008 年版的第 7 章）；
- i) 增加了核酸检测原理（见 4.2）、核酸检测用设备和材料（见 5.5-5.8）、核酸测试剂（见 6.2）、核酸样本检测方法（见 7.4.3）、核酸检测结果判定（见 8.2）和泰泽病原体核酸检测具体操作方法（见附录 A）。

（三） 试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

3.1 试验验证的分析、综述报告

3.1.1 材料和仪器

3.1.1.1 引物和探针

本标准中的泰泽病原体实时荧光定量 PCR 方法以泰泽病原体 16S rRNA 基因序列为靶标，扩增片段为 162 bp，按照表 1 中的序列合成正向引物、反向引物和探针。

表 1 泰泽病原体实时荧光定量 PCR 扩增引物和探针

引物名称	引物序列（5'→3'）	产物大小/bp
正向引物	AGCAAACGCAATAAGCACTCCA	162
反向引物	TACTTTACGTAGCCTGTCAATGGTATGT	
探针 ^a	FAM-AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG-TAMRA	

^a 探针也可选用具有与 5-羧基荧光素（FAM）荧光基团相同检测效果的其他合适的荧光报告基团和荧光淬灭基团组合。

3.1.1.2 试剂

2×实时荧光定量 PCR 预混液：Premix EX Taq（Probe qPCR）（TaKaRa，货号 RR390A）。

无核酸酶水： High Purity Water（生工，货号 B548405-0500）。

阳性对照：含有泰泽病原体的 DNA 或含目的基因片段的重组质粒。

阴性对照：不含有泰泽病原体的 DNA。

3.1.1.3 仪器

Bio-Rad CFX96 Touch（C1000 Touch 底座）。

3.1.2 反应体系和反应参数

3.1.2.1 反应体系

实时荧光定量 PCR 反应体系按照表 2 进行配制，反应液的配制应在冰上操作。每次反应均应设立阳性对照、阴性对照和空白对照，空白对照为不加模板对照，即在反应中用水代替模板。

表 2 泰泽病原体实时荧光定量 PCR 方法反应体系

反应组分	体积/ μL	终浓度/（nmol/L）
2×实时荧光定量 PCR 预混液	10	—
正向引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.4	200
反向引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.4	200
探针（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.4	200
DNA 模板	1	—
无核酸酶水	7.8	—
总体积	20	—

3.1.2.2 反应参数

实时荧光定量 PCR 反应程序参数按照表 3 进行设置。

表 3 泰泽病原体实时荧光定量 PCR 方法反应参数

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间/s	采集荧光值号	循环数
预变性	95	30	否	1
变性	95	5	否	40
退火/延伸	60	34	是	

注：试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和扩增循环数（Ct 值）判定结果。

3.1.3 方法评价

3.1.3.1 标准曲线

将构建的含泰泽病原体基因的质粒标准品用 TE 缓冲液进行 10 倍梯度稀释，得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 系列标准品模板。利用优化后的反应体系和反应参数测定各稀释梯度的 Ct 值，实时荧光定量 PCR 扩增曲线见图 1。以 Ct 值

为纵坐标，以标准品模板拷贝数的对数值为横坐标，建立该荧光定量 PCR 方法的标准曲线，见图 2。其线性回归方程为 $y=-3.431x+41.902$ ，扩增效率为 95.7%，决定系数 $R^2=1.000$ ，决定系数和扩增效率表明在测试浓度范围内 Ct 值与模板拷贝数对数值之间具有良好的线性关系，扩增效率稳定。

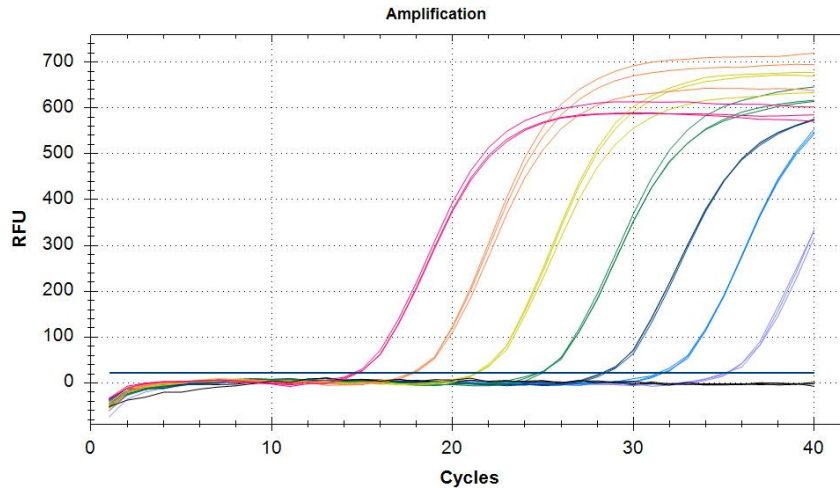


图 1 10 倍梯度稀释泰泽病原体质粒标准品核酸实时荧光定量 PCR 方法扩增曲线

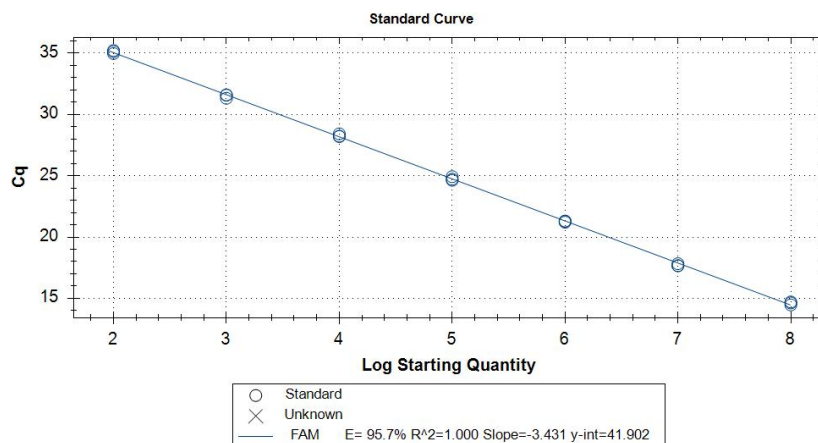


图 2 10 倍梯度稀释泰泽病原体质粒标准品核酸实时荧光定量 PCR 方法标准曲线

3.1.3.2 最低检测限测定

采用 10 copies/ μL 、50 copies/ μL 、100 copies/ μL 这三种低浓度的含泰泽病原体基因的质粒标准品为模板，按 1 μL /孔加样，进行 20 次重复实时荧光定量 PCR 检测，以确定该方法最低检测限。结果显示 10 copies/ μL 水平的检出率为 50%（10/20），50 copies/ μL 和 100 copies/ μL 水平的检出率均为 100%

（20/20），见表 4。因此，在 50 copies/ μL ，1 μL /孔条件下检出率达到 100%

（20/20），满足最低检测限的验证要求，该方法最低检测限为 50 copies/PCR。

表 4 泰泽病原体实时荧光定量 PCR 方法最低检测限试验结果

质粒拷贝数 /(copies/μL)	20 次重复 Ct 值	检出率 /%	质粒拷贝数 /(copies/μL)	20 次重复 Ct 值	检出率 /%	质粒拷贝数 /(copies/μL)	20 次重复 Ct 值	检出率 /%
	N/A			37.3			35.69	
	N/A			37.06			36.53	
	39.36			35.69			36.49	
	39.44			37.31			35.99	
	39.24			37.52			36.6	
	N/A			39.33			36.88	
	N/A			37.47			35.78	
	38.83			36.53			36.11	
	N/A			37.5			35.34	
	37.4			37.37			35.59	
	N/A			37.38			36.35	
1 × 10 ¹	39.83	50	5 × 10 ¹	37.76	100	1 × 10 ²	36.54	100
	38.15			38.41			35.96	
	39.18			36.37			36.22	
	39.16			35.36			36.1	
	37.33			38.16			36.46	
	N/A			36.72			35.77	
	N/A			37.76			35.84	
	N/A			35.93			36.1	
	39.41			36.71			36.22	
	39.65			36.71			36.02	
	39.23			36.57			36.04	
	37.36			37.92			36.14	
	N/A			37.13			36.51	

3.1.4 特异性试验

为评价该实时荧光定量 PCR 方法在检测泰泽病原体 DNA 与其他细菌 DNA 之间是否存在交叉反应，总共收集 37 种不同菌株 DNA 进行检测。菌株类型覆盖γ-变形菌纲 Gamma-proteobacteria（4 株巴斯德氏菌科 *Pasteurellaceae*、5 株肠杆菌科 *Enterobacteriaceae*、1 株假单胞菌科 *Pseudomonadaceae*、1 株耶尔森菌科 *Yersiniaceae*）、β-变形菌纲 Beta-proteobacteria（1 株产碱杆菌科 *Alcaligenaceae*）、ε-变形菌纲 Epsilon-proteobacteria（1 株螺杆菌科 *Helicobacteraceae*）、放线菌纲 Actinomycetes（2 株棒状杆菌科 *Corynebacteriaceae*）、柔膜菌纲 Mollicutes（2 株后支原体科 *Metamycoplasmataceae*、1 株支原体科 *Mycoplasmoidaceae*）、梭杆菌纲 Fusobacteriia（1 株纤毛菌科 *Leptotrichiaceae*）、芽孢杆菌纲 Bacilli（2 株链球菌科 *Streptococcaceae*、3 株葡萄球菌科 *Staphylococcaceae*、1 株肠球菌科

Enterococcaceae、1 株李斯特菌科 *Listeriaceae*) 和梭菌纲 *Clostridia* (7 株毛螺菌科 *Lachnospiraceae*、1 株 *Anaerotignaceae*、2 株梭菌科 *Clostridiaceae*、1 株 *Oscillospiraceae*)，见表 5。

表 5 用于泰泽病原体实时荧光定量 PCR 方法特异性试验的菌株

分类-菌纲	数量	分类-菌科	菌种名称	来源
γ -变形菌纲 Gamma-proteobacteria	11	巴斯德氏菌科 <i>Pasteurellaceae</i>	鼠盲肠嗜齿杆菌 <i>Rodentibacter caecimuris</i>	中国食品药品检定研究院
			嗜肺嗜齿杆菌 <i>Rodentibacter pneumotropicus</i>	
			多杀巴斯德杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>	
			副鸡禽杆菌 <i>Avibacterium paragallinarum</i>	
		肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae</i>	肠炎沙门氏菌 <i>Salmonella enterica</i>	杭州医学院分离株
			肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
			嗜齿柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter rodentium</i>	
			产酸克雷伯杆菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>	
β -变形菌纲 Beta-proteobacteria	1	假单胞菌科 <i>Pseudomonadaceae</i>	绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	中国食品药品检定研究院
		耶尔森菌科 <i>Yersiniaceae</i>	假结核耶尔森菌 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	
		产碱杆菌科 <i>Alcaligenaceae</i>	支气管鲍特杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	
ϵ -变形菌纲 Epsilon-proteobacteria	1	螺杆菌科 <i>Helicobacteraceae</i>	幽门螺杆菌 <i>Helicobacter pylori</i>	中国食品药品检定研究院
放线菌纲 Actinomycetes	2	棒状杆菌科 <i>Corynebacteriaceae</i>	鼠棒状杆菌 <i>Corynebacterium kutscheri</i>	
			牛棒状杆菌 <i>Corynebacterium bovis</i>	
柔膜菌纲 Mollicutes	3	后支原体科 <i>Metamycoplasmataceae</i>	肺支原体 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	中国食品药品检定研究院
		支原体科 <i>Mycoplasmoidaceae</i>	滑液囊支原体 <i>Mycoplasma synoviae</i>	
			鸡毒支原体 <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	
梭杆菌纲 Fusobacteriia	1	纤毛菌科 <i>Leptotrichiaceae</i>	念珠状链杆菌 <i>Streptobacillus moniliformis</i>	杭州医学院分离株
芽孢杆菌纲 Bacilli	7	链球菌科 <i>Streptococcaceae</i>	化脓链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>	
			肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
		葡萄球菌科 <i>Staphylococcaceae</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	
			木糖葡萄球菌 <i>Staphylococcus xylosus</i>	
			科氏葡萄球菌 <i>Staphylococcus cohnii</i>	
		肠球菌科 <i>Enterococcaceae</i>	粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i>	
		李斯特菌科 <i>Listeriaceae</i>	单核细胞增生李斯特菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	
梭菌纲 Clostridia	11	毛螺菌科 <i>Lachnospiraceae</i>	泰泽病原体 <i>Clostridium piliforme</i>	中国食品药品检定研究院
			梭形梭菌 <i>Clostridium clostridioforme</i>	
			结肠梭菌 <i>Clostridium colinum</i>	
			乳清酸梭菌 <i>Clostridium oroticum</i>	
			共生梭菌 <i>Clostridium symbiosum</i>	
			球形布劳特氏菌 <i>Blautia coccoides</i>	
			鲍氏梭菌 <i>Clostridium bolteae</i>	
		<i>Anaerotignaceae</i>	丙酸梭菌 <i>Clostridium propionicum</i>	
		梭菌科 <i>Clostridiaceae</i>	溶组织梭菌 <i>Clostridium histolyticum</i>	
		<i>Oscillospiraceae</i>	产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringens</i>	
			瘦长梭菌 <i>Clostridium leptum</i>	

检测结果显示，仅泰泽病原体 DNA 和阳性对照（含泰泽病原体基因的质粒）出现特异性扩增，其余 36 种非目标菌株 DNA 检测结果均为阴性，说明该方法在所测试的 37 种菌株范围内具有良好的特异性，见图 3。

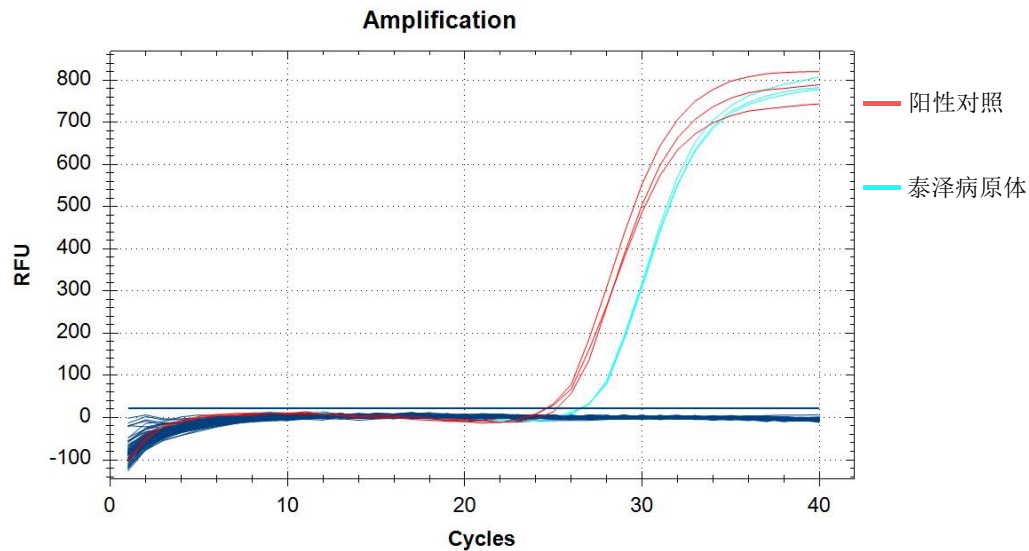


图 3 泰泽病原体实时荧光定量 PCR 方法特异性试验扩增曲线

3.1.5 重复性试验

以 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 和 1×10^7 copies/ μL 这 5 个浓度的含泰泽病原体基因的质粒标准品核酸为模板，使用该方法分 3 天（次）进行测试，在同一次反应中每个浓度均设置 3 个技术性重复，对各浓度核酸的 Ct 值进行统计，计算每个样品之间的组内变异系数（CV）和组间 CV，见表 6。结果显示，各浓度组内重复试验 Ct 值 CV 均小于 1%，组间重复试验 Ct 值 CV 均小于 3%，表明该方法具有良好的重复性和稳定性。

表 6 泰泽病原体实时荧光定量 PCR 方法重复性试验结果

质粒拷贝数 /(copies/ μL)	批次	复孔 Ct 值			组内 Ct 均值	组内 Ct SD	组内 CV/%	组间 Ct 均值	组间 Ct SD	组间 CV/%
		1	2	3						
10^3	1	31.57	31.32	31.59	31.49	0.15	0.48			
	2	31.60	31.86	32.02	31.83	0.21	0.66	31.95	0.54	1.69
	3	32.60	32.46	32.57	32.54	0.07	0.22			
10^4	1	28.23	28.42	28.20	28.28	0.12	0.42			
	2	28.18	28.18	28.26	28.21	0.05	0.16	28.43	0.32	1.13
	3	28.94	28.68	28.77	28.80	0.13	0.45			
10^5	1	24.73	24.93	24.64	24.77	0.15	0.61			
	2	24.90	24.71	24.88	24.83	0.10	0.40	24.94	0.24	0.96
	3	25.18	25.25	25.20	25.21	0.04	0.14			

杭 州 医 学 院

	1	21.31	21.21	21.28	21.27	0.05	0.23			
10 ⁶	2	21.17	21.10	21.30	21.19	0.10	0.47	21.34	0.20	0.94
	3	21.58	21.54	21.57	21.56	0.02	0.09			
	1	17.67	17.67	17.83	17.72	0.09	0.51			
10 ⁷	2	17.69	17.63	17.73	17.68	0.05	0.28	17.72	0.04	0.23
	3	17.74	17.69	17.85	17.76	0.08	0.45			

3.1.6 临床适用性测试

使用该泰泽病原体实时荧光定量 PCR 方法对收集的 48 份临床样本 DNA（苏州西山生物技术有限公司提供 2 份：XISHAN-SHASHU、XISHAN-RAT；中国食品药品检定研究院提供 1 份：泰（27）；其余 45 份均来源杭州医学院）进行检测，每次反应同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。48 份待检测临床样本类型覆盖小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、沙鼠、兔的肝脏和盲肠内容物，以及环境样本，见表 7。使用该方法共检出 11 份泰泽病原体核酸阳性，37 份阴性，结果表明该检测方法可应用于临床样本的检测。

表 7 泰泽病原体实时荧光定量 PCR 方法临床适用性试验结果

序号	样本编号	样本类型	Ct 均值	序号	样本编号	样本类型	Ct 均值
1	XISHAN-SHASHU	沙鼠肝脏	25.34	25	泰（27）	大鼠肝脏	29.20
2	XISHAN-RAT	大鼠肝脏	24.39	26	155-1M	豚鼠盲肠内容物	30.07
3	394-1G	大鼠肝脏	N/A	27	155-2M	豚鼠盲肠内容物	30.51
4	394-3G	大鼠肝脏	N/A	28	99-1G	地鼠肝脏	N/A
5	398-3G	大鼠肝脏	N/A	29	99-2G	地鼠肝脏	N/A
6	398-6G	大鼠肝脏	N/A	30	99-1M	地鼠盲肠内容物	N/A
7	398-8G	大鼠肝脏	N/A	31	99-2M	地鼠盲肠内容物	N/A
8	398-9G	大鼠肝脏	N/A	32	58-1G	兔肝脏	N/A
9	394-1M	大鼠盲肠内容物	N/A	33	58-2G	兔肝脏	N/A
10	394-3M	大鼠盲肠内容物	N/A	34	58-1M	兔盲肠内容物	N/A
11	398-3M	大鼠盲肠内容物	N/A	35	58-2M	兔盲肠内容物	N/A
12	398-6M	大鼠盲肠内容物	34.32	36	柜 1	环境-安全柜-消毒后	N/A
13	398-8M	大鼠盲肠内容物	N/A	37	出 1	环境-出风口-消毒后	N/A
14	398-9M	大鼠盲肠内容物	35.55	38	进 1	环境-进风口-消毒后	N/A
15	27-1G	小鼠肝脏	N/A	39	利 1	环境-利器盒-消毒后	N/A
16	27-8G	小鼠肝脏	N/A	40	笼 1	环境-笼盒-消毒后	N/A
17	59-6G	小鼠肝脏	N/A	41	手 1	环境-手套-消毒后	N/A
18	452-1G	小鼠肝脏	N/A	42	台 1	环境-台面-消毒后	N/A
19	452-3G	小鼠肝脏	N/A	43	暂 1	环境-暂存间-消毒后	N/A
20	27-1M	小鼠盲肠内容物	N/A	44	柜 2	环境-安全柜-感染试验结束后未消毒	NA
21	27-8M	小鼠盲肠内容物	33.08	45	出 2	环境-出风口-感染试验结束后未消毒	33.42

22	59-6M	小鼠盲肠内容物	N/A	46	进 2	环境-进风口-感染试验结束后未消毒	NA
23	452-1M	小鼠盲肠内容物	N/A	47	笼 2	环境-笼盒-感染试验结束后未消毒	35.35
24	452-3M	小鼠盲肠内容物	N/A	48	手 2	环境-手套-感染试验结束后未消毒	33.86

3.1.7 实验室间方法确认

3.1.7.1 方法性能验证方案

该泰泽病原体实时荧光定量 PCR 检测方法由苏州西山生物技术有限公司（西山）同步进行各方面性能测试，包括标准曲线建立、最低检测限检测、方法特异性检测、重复性检测和临床样本检测，以评估该检测方法的各方面性能在不同实验室间的稳定性。

3.1.7.2 检测方法建立

以泰泽病原体的标准核酸为模板，采用 TARA KA 荧光定量试剂盒（探针法）（Cat.#RR390A），使用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪以及上述特异性引物和探针进行扩增。反应体系为 20 μ L：DNA 模板 5 μ L，2 $\times$ Probe qPCR mix（含 Mg²⁺、dNTP、Taq 酶）10 μ L，正向引物（20 μ mol/L）0.2 μ L，反向引物（20 μ mol/L）0.2 μ L，探针（20 μ mol/L）0.2 μ L，用水补至 20 μ L。反应参数为 95 $^{\circ}$ C 30 s、95 $^{\circ}$ C 5 s，60 $^{\circ}$ C 34 s，共计 40 个循环。结果显示泰泽病原体标准核酸的扩增标准曲线呈“S”型，未见翘尾等异常情况。

3.1.7.3 特异性检测

采用该检测方法对 11 株标准菌株（肺炎克雷伯杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、支气管鲍特杆菌、嗜肺巴斯德杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、产气荚膜梭菌、枯草芽孢杆菌、萎缩芽孢杆菌、嗜热脂肪地芽孢杆菌）以及 5 株临床菌株（苏云金芽孢杆菌、简单芽孢杆菌、暹罗芽孢杆菌、掘越氏芽孢杆菌、泰泽病原体）核酸进行检测，验证其方法特异性。结果显示除泰泽病原体核酸检测结果为阳性外，其他细菌核酸检测结果均为阴性，表明该方法具有良好的特异性。此结论与杭州医学院对该性能评价一致。

3.1.7.4 定量标准曲线的建立及最低检测限试验

将已知浓度的泰泽病原体核酸进行梯度稀释（ $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^2$ copies/mL），利用优化后的反应体系、反应参数测定各稀释梯度的 Ct 值，以 Ct 值为纵坐标，以起始模板浓度的对数为横坐标，绘制标准曲线。结果显示各梯度之间间隔的 Ct 值基本相等，标准核酸在 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^9$ copies/mL 之间具有良好的线

性关系，其线性回归方程为 $y = -3.34x + 48.747$ ，扩增效率为 99.0%，决定系数 R^2 为 1.00，说明该方法扩增该标准品的效率较高，线性关系良好。此结论与杭州医学院对该性能评价一致。

以 5000 copies/mL、1000 copies/mL 标准品为模板，各取 20 份，每孔 5 μ L 加样量进行实时荧光定量 PCR 检测。结果显示在 1000 copies/mL 浓度模板条件下检出率为 50% (10/20)，在 5000 copies/mL 浓度模板条件下检出率可达 100% (20/20)，确定该方法最低检测限为 5000 copies/mL，即 25 copies/PCR。此结果与杭州医学院对该性能检测结果相近。

3.1.7.5 重复性试验

对不同浓度泰泽病原体标准核酸 1.1×10^7 copies/mL 与 1.1×10^5 copies/mL 在同一次反应中进行 10 次重复测定，对各稀释梯度的 Ct 值进行统计，计算每个样品之间的批内 CV。对批间稀释的上述样品分 5 天测试，5 次不同的试验中进行组间重复性评估，同一次反应中进行 5 次重复，计算同一样品每次测定结果之间的批间 CV。结果显示 1.1×10^7 copies/mL 与 1.1×10^5 copies/mL 浓度的泰泽病原体标准核酸的批内重复试验 CV 分别为 0.46% 和 0.74%，批间重复试验 CV 分别为 0.79% 和 0.33%，上述 CV 均小于 1%，表明该检测方法重复性好，方法稳定。此结论与杭州医学院对该性能评价一致。

3.1.7.6 临床样品检测

应用该泰泽病原体实时荧光定量 PCR 方法对 178 份临床样本进行检测，样本类型包括肝脏、粪便、肠组织或肠内容物、环境拭子等，从中检出 4 份阳性，阳性率为 2.2%。挑选部分待检样本的阳性扩增产物进行测序，测序结果与检测结果一致，结果表明所建立的检测方法可应用于临床样本的检测。此结论与杭州医学院对该性能评价一致。

3.1.8 结果解释和判定

3.1.8.1 结果分析和条件设定

直接读取检测结果，基线和阈值设定原则根据仪器的噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样本扩增曲线的最高点为准。

3.1.8.2 质控标准

1. 空白对照无 Ct 值，并且无特异性荧光扩增曲线。

2. 阴性对照无 Ct 值,并且无特异性荧光扩增曲线。
3. 阳性对照 Ct 值 ≤ 35 , 并且有特异性荧光扩增曲线, 则表明反应体系运行正常, 否则此次试验无效, 需重新进行实时荧光定量 PCR 扩增。

3.1.8.3 结果判定

1. 质控成立条件下, 待测样本无特异性扩增曲线, Ct 值 >40 或无 Ct 值, 则判定样本泰泽病原体核酸阴性。
2. 质控成立条件下, 待测样本有特异性扩增曲线, Ct 值 ≤ 35 时, 则判定样本泰泽病原体核酸阳性。
3. 质控成立条件下, 待测样本有特异性扩增曲线, $35 < \text{Ct 值} \leq 40$, 判为可疑, 需复检, 复检仍出现 $35 < \text{Ct 值} \leq 40$, 并且曲线有明显的对数增长期, 则判定样本泰泽病原体核酸阳性; 否则判为阴性。

3.1.8.4 序列测定

必要时, 可取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定, 序列结果与已公开发表的泰泽病原体特异性片段序列进行比对分析, 以确证检测结果。

3.1.9 实验室间验证比对

为评价该检测方法在不同实验室条件下的适用性和可比性, 由杭州医学院组织, 联合北京维通利华实验动物技术有限公司、北京大学、上海实验动物研究中心共 4 家实验室, 开展泰泽病原体核酸检测方法的实验室间验证比对。杭州医学院向各单位统一提供 8 份盲样 (包括沙鼠肝脏 DNA、大鼠肝脏 DNA、小鼠肝脏 DNA、兔粪便 DNA、豚鼠粪便 DNA、地鼠粪便 DNA、环境棉拭子提取液 DNA 等) 进行验证比对。各验证单位使用杭州医学院统一提供的本标准方法和试剂、杭州医学院统一提供的本标准方法和验证单位常用的试剂、验证单位使用的其他泰泽病原体核酸实时荧光定量 PCR 检测方法和验证单位常用的试剂这三种方式, 对 8 份盲样和验证单位自备的样品进行检测。

经验证比对, 结果显示 4 家实验室使用本标准中的方法均能有效检测出阳性及阴性样本, 结果符合率为 100% (见表 8、表 9 及附件 1-3), 说明本标准方法在不同实验室间可重复。

表 8 验证比对样本信息及各验证单位使用本标准方法检测结果

杭 州 医 学 院

样本编号	样本类型	杭州医学院		维通利华		北京大学		上海实验动物研究中心	
		Ct 均值	判定	Ct 均值	判定	Ct 均值	判定	Ct 均值	判定
HMC-1	沙鼠肝脏+泰泽基因质粒	23.50	阳性	25.92	阳性	24.29	阳性	25.15	阳性
HMC-2	大鼠肝脏+泰泽基因质粒	27.03	阳性	29.89	阳性	27.32	阳性	29.48	阳性
HMC-3	小鼠肝脏	N/A	阴性	N/A	阴性	N/A	阴性	N/A	阴性
HMC-4	兔粪便	N/A	阴性	N/A	阴性	N/A	阴性	N/A	阴性
HMC-5	豚鼠粪便	N/A	阴性	N/A	阴性	N/A	阴性	N/A	阴性
HMC-6	地鼠粪便	N/A	阴性	N/A	阴性	N/A	阴性	N/A	阴性
HMC-7	环境-生物安全柜棉拭子	N/A	阴性	N/A	阴性	N/A	阴性	N/A	阴性
HMC-8	沙鼠肝脏	27.56	阳性	29.98	阳性	28.22	阳性	29.53	阳性

表 9 实验室间验证比对结果评价

单位名称	报告一	报告二	报告三
	方法：统一提供的方法	方法：统一提供的方法	方法：机构使用的其他泰泽病原体实时荧光定量PCR方法
	试剂：统一提供的试剂	试剂：机构常用的试剂	试剂：机构常用的试剂
北京维通利华实验动物技术有限公司	符合预期	/	符合预期
北京大学	符合预期	符合预期	/
上海实验动物研究中心	符合预期	/	符合预期

3.2 技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

本标准修订引入核酸检测方法，预期产生显著综合效益。经济效益方面，通过快速、精准诊断，可大幅缩短检测周期，降低设施占用与养殖成本，避免因疫病扩散导致的整群淘汰损失。社会效益方面，将有效提升实验动物质量，为生物医药研究提供可靠动物模型，从源头保障科研数据的准确性与可重复性。生态效益方面，核酸检测样本用量少，有助于减少不必要的动物处死，符合动物伦理“3R”原则，推动产业可持续发展。本标准实施将对提升我国实验动物质量、促进相关产业高质量发展具有重要推动作用。

（四） 采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

国外无此类标准。

（五） 以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

无此情况。

(六) 与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

与现行法律、法规没有冲突。

(七) 重大分歧意见的处理经过和依据

无。

(八) 涉及专利的有关说明

本文件未涉及专利。

(九) 实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议。

1. 本标准为推荐性标准。
2. 标准发布后建议通过举办标准培训班以及学术会议进行标准宣贯。
3. 标准发布后原《实验动物 泰泽病原体检测方法》（GB/T 14926.10-2008）废止，建议发布即实施。

(十) 其他应当说明的事项。

1. 在 2025 年 4 月，国家标准化管理委员会发布了《关于国家标准起草中开展公平竞争审查的通知》。本标准组织修订单位杭州医学院按照审查要求对本标准的修订工作进行了审查，审查结果为“符合《公平竞争审查条例》《公平竞争审查条例实施办法》相关要求，不存在违反公平竞争情况。”

2. 实验室间验证比对材料见附件：

- (1) 附件 1：北京维通利华实验动物技术有限公司验证报告；
- (2) 附件 2：北京大学验证报告；
- (3) 附件 3：上海实验动物研究中心验证报告。