

《实验动物 志贺菌检测方法》

修订稿编制说明

联系人： 张钰

联系电话： 13922483354

编制单位： 广东省生物技术研究院（广东省实验动物
监测中心）

时间： 2026 年 7 月 13 日

《实验动物 志贺菌检测方法》

修订稿编制说明

一、任务来源，起草单位，主要起草人

1.任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于开展推荐性国家标准复审工作的通知》（国标委发〔2023〕64号）要求，完成此标准的复审工作，复审结论为修订。2026年1月28日国标委下达修订计划，进入起草阶段。

2.起草单位

广东省生物技术研究院（广东省实验动物监测中心）（以下简称广东生研院）、苏州西山生物技术有限公司、广西壮族自治区兽医研究所、中国医学科学院医学实验动物研究所、广州普莱美生物科技有限公司、华南农业大学。

3.主要起草人

张钰、王静、郭连香、谢永平、向志光、李少旭、刘忠华、梁祥晖。

二、主要工作过程

1. 2026年1月28日国标委下达修订计划后，起草组织单位反复查阅有关猴志贺菌核酸检测相关资料，并与苏州西山生物技术有限公司（以下简称西山公司）和广州普莱美生物科技有限公司（以下简称普莱美公司）交流志贺菌的核酸检测技术方法应用的可行性，完成标准修订相关资料数据的收集、整理和分析，形成了《实验动物 志贺菌检测方法》标准修订初步框架，对标准修订进度做出安排。

2. 2026年3月—6月，初步完成了《实验动物 志贺菌检测方法》标准修订稿编写，并由广东生研院和普莱美公司对新增核酸检测进行临床标本验证，形成标准修订草稿第一稿。

3. 2026年6月—7月，确定参编单位，形成标准参编工作组。确定标准3家验证单位（中国食品药品检定研究院、杭州医学院、北京维通利华实验动物技术有限公司）。针对参编小组的意见对标准修订草稿第一稿进行修订，形成标准修订第二稿。

4. 2026年7月—8月，各参编单位进行标准修订草稿修订，形成标准修订稿第三稿至第五稿。

5. 2026 年 8 月—9 月，参编小组开展临床样品验证工作，分析单位验证结果，最后形成标准征求意见稿。

三、标准修订编写背景

1. 猴志贺菌感染特征

志贺菌是实验猴养殖中最常见的机会致病菌之一，具备人猴双向交叉感染风险。该菌为革兰氏阴性短杆菌，属肠杆菌科志贺菌属，兼性厌氧，无鞭毛、无动力、不产芽孢。常见血清型为痢疾志贺菌（A 群）、福氏志贺菌（B 群）、鲍氏志贺菌（C 群）、宋内志贺菌（D 群）。已报道，猴群主要致病血清型为福氏志贺菌。我们通过对实验猴场分离的 18 株进行全基因组测序，17 株为福氏志贺菌，1 株为鲍氏志贺菌，进一步说明猴群主要感染的是福氏志贺菌。

2. 流行病学特征

传播途径以粪—口传播为主，污染的饮水、饲料、笼具、操作人员手是主要传播媒介。急性期发病猴表现为水样腹泻、黏液脓血便疾病特征，大量排菌、传染性强；无症状猴仅表现间断性软便、稀便，呈隐性排毒，是种群持续污染、反复暴发的主要源头。

3. 检测方法

志贺菌是国标中普通级猴需要排除的病原体，也是进出口猴必须检测项目。目前国内常用的志贺菌检测方法为细菌分离培养，从分离到菌株鉴定已相对成熟，并在食品检测中广泛应用，为此，本次标准修订对于志贺菌的生化和血清鉴定采用《食品安全国家标准 食品微生物学检验志贺氏菌检验》GB 4789.5-2012 相关内容。

以实时荧光定量 PCR 检测方法为主的核酸检测技术，在疾病早期诊断中具有快速简便、特异性强、灵敏度高、重复性好的特性，逐渐被应用到实验动物检测中。已报道的志贺菌核酸检测都是以 ipaH 基因为靶标，但是，1990 年来研究发现侵袭性大肠杆菌（EIEC）具有志贺菌 ipaH 基因(Lampel, Jagow et al. 1990)，仅使用 ipaH 基因为靶标，存在假阳性风险。因此，核酸检测阳性样品需要进一步分离培养确认。

4. 修订编制的必要性

4.1 现行有效的志贺菌检测标准情况。通过《全国标准信息公共服务平台》《食

品安全国家标准数据检索平台》查询有关志贺菌检测的现行国家标准有 3 个，行业标准 7 个（表 1）。《实验动物 志贺菌检测方法》GB14926.47 已于 2008 年进行了修订，因此，此年份之前的标准内容不作为修订参考。

表 1 现行有效志贺菌检测国家标准和行业标准汇总

标准名称	标准类型	适用范围	是否有核酸检测方法
《食品安全国家标准 食品微生物学检验志贺氏菌检验》GB 4789.5-2012	国家标准	食品	无
《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌、志贺氏菌和致泻大肠埃希氏菌的肠杆菌科噬菌体诊断检验》GB 4789.31-2013	国家标准	食品	无
《饲料中志贺氏菌的检测方法》GB/T 8381.2-2005	国家标准	饲料	无
《出口食品中致病菌荧光重组酶介导链替换核酸扩增（RAA）检测方法 第 2 部分：志贺氏菌》SN/T 5516.2-2023	行业标准	食品	有
《交叉引物恒温扩增检测方法 第 11 部分 志贺菌》SN/T 3567.11-2017	行业标准	分离的志贺菌，或疑似感染者的标本	有
《入境环保用微生物菌剂检测方法 第 8 部分：志贺氏菌》SN/T 4624.8-2016	行业标准	入境环保用微生物菌剂	有
《国境口岸沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌 O157:H7 的三重荧光 PCR 检测方法》SN/T 4274-2015	行业标准	疑似感染者的标本，或污染的标本	有
《国境口岸环介导恒温扩增（LAMP）检测方法 第 3 部分：志贺氏菌》SN/T 3306.3-2012	行业标准	疑似感染者的标本	有
《食品中志贺氏菌分群检测 MPCR-DHPLC 法》SN/T 2565-2010	行业标准	细菌分群检测	有
《猴志贺氏菌检验操作规程》SN/T 1168-2002	行业标准	猴标本	无

4.2 核酸检测必要性

目前存在志贺菌核酸检测方法的现行有效标准都是行业标准，没有国家标准。这些标准适用范围主要是进出境食品、入境环保菌剂等相关产品，以及疑似感染者的标本或污染的标本等，核酸检测方法包括多重荧光 PCR、环介导恒温扩增（LAMP）和荧光重组酶介导链替换核酸扩增（RAA）等。鉴于实验动物主要针对健康猴群进行检测，大量标本为阴性结果，增加核酸检测方法可以快速排除大量阴性标本对提升检测效率具有重要作用，因此，本次修订增加核酸检测方法具

有必要性。

4.3 志贺菌鉴定修订的必要性。《食品安全国家标准 食品微生物学检验志贺氏菌检验》GB 4789.5-2012 已建立详细的志贺菌生化和血清玻片凝集鉴定方法，而且，市面上大部分厂家的生化鉴定试剂盒设立的项目内容来自此标准，为了统一分离培养后的志贺菌鉴定，本次修订对生化和血清玻片凝集内容进行修改，引用 GB 4789.5-2012 生化和血清鉴定内容。

四、编制原则

本标准在制定中遵循以下原则：

1. 本标准修订编写格式符合 GB/T 1.1 中的规定。

2. 本标准修订的技术内容及要求具有科学合理，适用性和可操作性。本次标准修订新增猴的志贺菌实时荧光 PCR 检测方法，以志贺菌特异基因 ipaH 为靶标进行实时荧光 PCR 检测，对于志贺菌核酸检测阴性判定为志贺菌检测阴性。由于侵袭性大肠杆菌（EIEC）也具有相同的 ipaH 基因，因此，志贺菌核酸检测阳性，仍需要进行分离培养鉴定进行最终判定。为了统一志贺菌的鉴定，本次标准修订还引用了《食品安全国家标准 食品微生物学检验志贺氏菌检验》GB 4789.5-2012 菌株鉴定方法。

2.1 关于 ipaH 引物的选择。编制小组成员具有多年实验猴志贺菌检测经验，所使用的 ipaH 引物和探针、反应体系来自西山公司，该公司从临床检测样本中选取 337 份样本进行传统微生物培养与 PCR 方法（ipaH 引物）的平行比对试验，其中 qPCR 方法判定为阴性的 218 份样本，经微生物培养鉴定结果全部为阴性。119 份 qPCR 阳性样本，通过微生物培养法确认 72 份志贺氏菌阳性样本，47 份培养法未检出，qPCR 阳性的样本，可能是肠侵袭性大肠埃希菌（EIEC），或低载菌量志贺氏菌。

2.2 引物比对。编制小组对分离的 18 株实验猴志贺氏菌进行高通量测序，并与 NCBI 公开的菌株序列进行比较，结果显示，所有测序株在 ipaH 区域均呈现极高的测序深度与覆盖度（图 1A），ipaH 引物能精准匹配志贺氏菌序列保守区以及 EIEC（图 1B）。

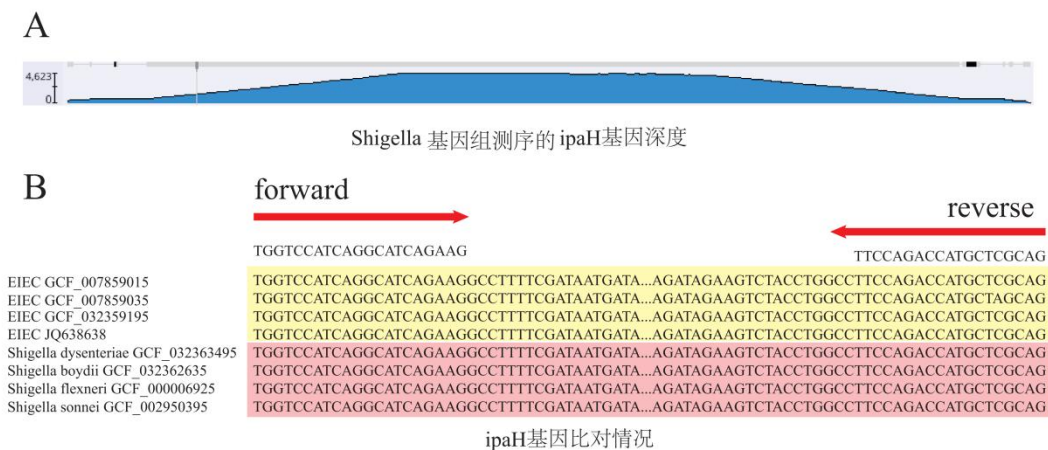


图 1 引物比对

2.3 实时荧光 PCR 反应体系敏感性和特异性检测。编制小组对痢疾志贺菌（CIM 1.236）进行反应体系敏感性和特异性评价，结果显示，该体系志贺菌最低检测限为 0.5 fg/well（表 2）。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系敏感性检测结果

样本名称	基因名称	任务	报告基团	Ct	Ct 平均值	Ct SD	浓度 (ng/well)
7	ipaH	STANDARD	FAM	37.178	36.435	0.714	0.0000005
7	ipaH	STANDARD	FAM	36.372	36.435	0.714	0.0000005
7	ipaH	STANDARD	FAM	35.754	36.435	0.714	0.0000005
6	ipaH	STANDARD	FAM	32.986	33.756	1.136	0.000005
6	ipaH	STANDARD	FAM	33.221	33.756	1.136	0.000005
6	ipaH	STANDARD	FAM	35.06	33.756	1.136	0.000005
5	ipaH	STANDARD	FAM	30.359	30.452	0.086	0.00005
5	ipaH	STANDARD	FAM	30.528	30.452	0.086	0.00005
5	ipaH	STANDARD	FAM	30.468	30.452	0.086	0.00005
4	ipaH	STANDARD	FAM	25.999	25.872	0.118	0.0005
4	ipaH	STANDARD	FAM	25.852	25.872	0.118	0.0005
4	ipaH	STANDARD	FAM	25.766	25.872	0.118	0.0005
3	ipaH	STANDARD	FAM	21.699	21.647	0.112	0.005
3	ipaH	STANDARD	FAM	21.518	21.647	0.112	0.005
3	ipaH	STANDARD	FAM	21.723	21.647	0.112	0.005
2	ipaH	STANDARD	FAM	18.224	18.189	0.053	0.05
2	ipaH	STANDARD	FAM	18.216	18.189	0.053	0.05
2	ipaH	STANDARD	FAM	18.128	18.189	0.053	0.05
1	ipaH	STANDARD	FAM	14.498	14.505	0.025	0.5
1	ipaH	STANDARD	FAM	14.533	14.505	0.025	0.5
1	ipaH	STANDARD	FAM	14.484	14.505	0.025	0.5

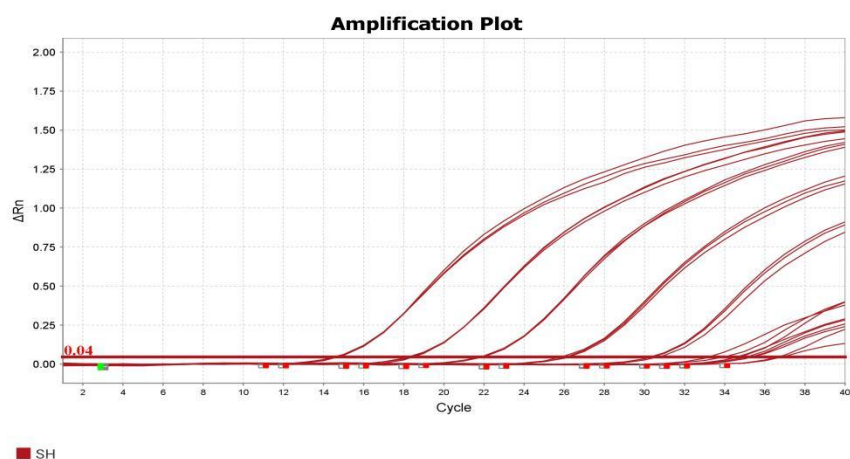


图 2 qPCR 反应体系志贺菌灵敏性测试荧光扩增图

对铜绿假单胞菌（GIM1.220）、假结核耶尔森菌（GIM1.267）、小肠结肠耶尔森菌（GIM1.266）、鼠伤寒沙门菌（GIM 1.237）、甲型副伤寒沙门菌（GIM 1.235）、乙型副伤寒沙门菌（GIM 1.224）、肺炎克雷伯菌（GIM1.279）、大肠杆菌埃希菌（ATCC25922）、金黄色葡萄球菌（BYJ35-19）、乙型溶血性链球菌（GIM 1.245）、空肠弯曲杆菌（临床株）、痢疾志贺菌（CIM 1.236）、志贺菌 168（临床分离株）进行实时荧光 PCR 检测。结果显示，痢疾志贺及志贺菌 168 为 ipaH 志贺菌靶基因阳性，判定为志贺菌核酸阳性；其他菌株均未出现特性性扩增曲线，显示该反应体系特异性较好（表 3）。

表 3 实时荧光 PCR 反应体系特异性检测结果

样品名称	Target Name	Task	Reporter	CT
铜绿假单菌 (GIM1.220)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
空肠弯曲杆菌 (临床株)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
假结核耶尔森菌 (GIM1.267)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
小肠结肠耶尔森菌 (GIM1.266)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
甲型副伤寒沙门菌 (GIM 1.235)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
乙型副伤寒沙门菌 (GIM 1.224)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined

鼠伤寒沙门菌 (GIM 1.237)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
肺炎克雷伯菌 (GIM1.279)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
大肠杆菌埃希菌 (ATCC25922)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
金黄色葡萄球菌 (BYJ35-19)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
乙型溶血性链球菌 (GIM 1.245)	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
福氏志贺 (临床 168 株)	ipaH	UNKNOWN	FAM	17.330
痢疾志贺菌 (CIM 1.236)	ipaH	UNKNOWN	FAM	12.111
阴性对照	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined
空白对照	ipaH	UNKNOWN	FAM	Undetermined

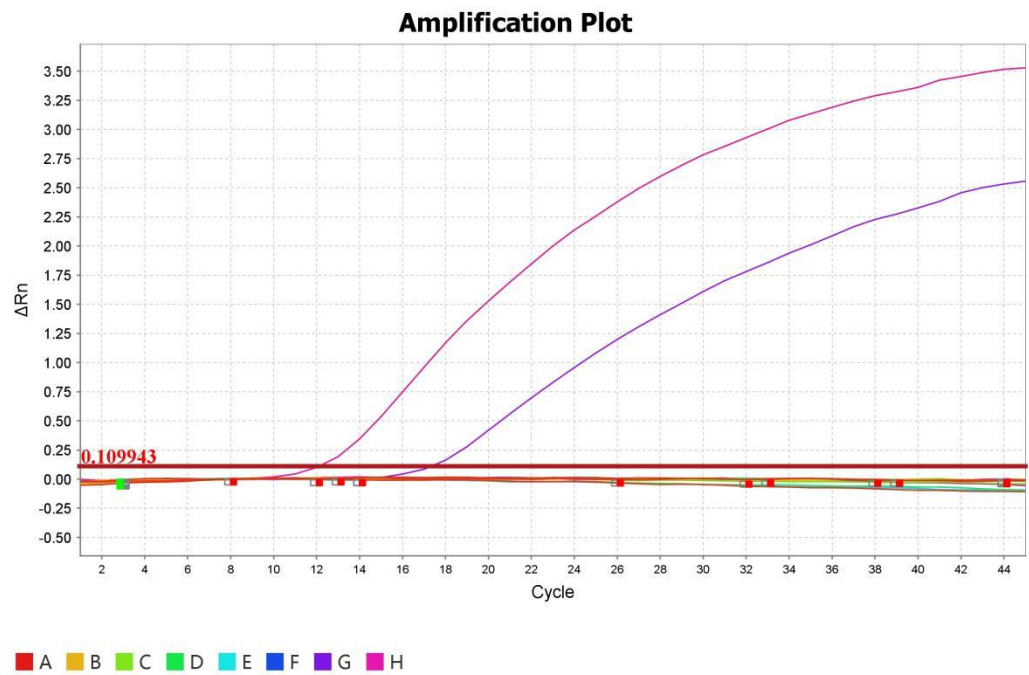


图 3 志贺菌特异性检测荧光扩增图

2.4 生化鉴定情况。编制小组对保存的 49 株志贺菌进行标准中指定的生化鉴定，结果 49 株菌满足志贺菌鉴定特征（表 4）。同时，开展标准中推荐的实时荧光 PCR 检测，样品 CT 值小于 21 个循环，具有典型扩增曲线，符合核酸检测阳性特征（表 5）。

表 4 49 株志贺菌生化鉴定结果

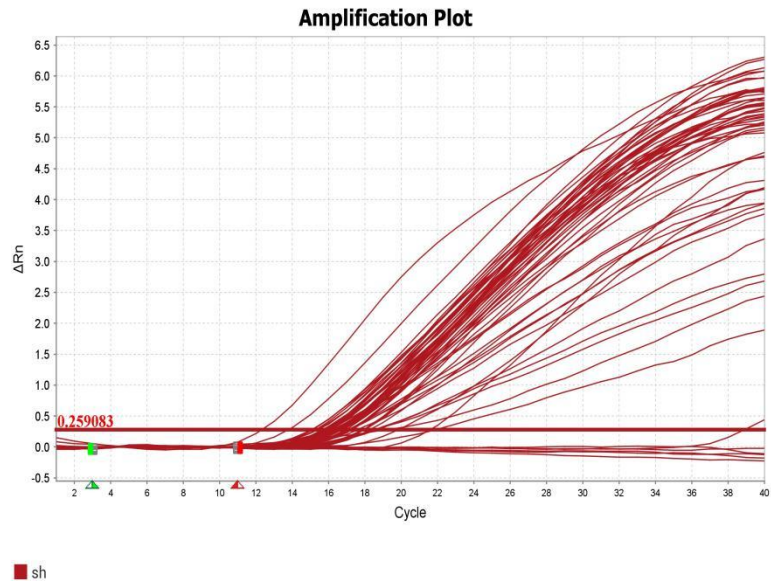
生化鉴定项目	符合率
三糖铁（K/A）	49/49
半固体琼脂（+）	49/49
赖氨酸脱羧酶（-）	49/49
鸟氨酸脱羧酶（-或+）	41/49 阴性，8/49 阳性
靛基质（-）	49/49
尿素（-）	49/49
水杨苷（-）	49/49
七叶苷（-）	49/49
甘露醇（+）	49/49
棉子糖（-）	49/49
ONPG（-）	49/49
甘油（-）	49/49
葡萄糖胺（-）	49/49
西蒙氏柠檬酸盐（-）	49/49
粘液酸（-）	49/49
血清鉴定（+）	49/49

注：+：阳性，-：阴性

表 5 49 株志贺菌实时荧光 PCR 检测结果

Sample Name	Target Name	Reporter	Quencher	CT
1	ipaH	FAM	NFQ-MGB	14.937
2	ipaH	FAM	NFQ-MGB	17.883
3	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.976
4	ipaH	FAM	NFQ-MGB	14.945
5	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.265
6	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.307
7	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.528
8	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.653
9	ipaH	FAM	NFQ-MGB	17.824
10	ipaH	FAM	NFQ-MGB	17.039
11	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.827
12	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.693
13	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.809
14	ipaH	FAM	NFQ-MGB	14.958
15	ipaH	FAM	NFQ-MGB	17.109
16	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.309

17	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.137
18	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.425
19	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.829
20	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.493
21	ipaH	FAM	NFQ-MGB	13.689
22	ipaH	FAM	NFQ-MGB	19.701
23	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.134
24	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.203
25	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.231
26	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.619
28	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.992
29	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.149
30	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.583
31	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.236
32	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.809
33	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.968
34	ipaH	FAM	NFQ-MGB	17.773
36	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.815
37	ipaH	FAM	NFQ-MGB	17.027
38	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.592
39	ipaH	FAM	NFQ-MGB	18.152
40	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.668
41	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.916
42	ipaH	FAM	NFQ-MGB	21.639
43	ipaH	FAM	NFQ-MGB	18.496
44	ipaH	FAM	NFQ-MGB	21.494
45	ipaH	FAM	NFQ-MGB	17.447
46	ipaH	FAM	NFQ-MGB	17.000
47	ipaH	FAM	NFQ-MGB	17.176
48	ipaH	FAM	NFQ-MGB	18.414
49	ipaH	FAM	NFQ-MGB	15.760
50	ipaH	FAM	NFQ-MGB	16.409
51	ipaH	FAM	NFQ-MGB	18.365
NTC	ipaH	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
NTC	ipaH	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
NTC	ipaH	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
NTC	ipaH	FAM	NFQ-MGB	38.763
O157	ipaH	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
O157	ipaH	FAM	NFQ-MGB	Undetermined
P	ipaH	FAM	NFQ-MGB	12.244



2.6 标准验证情况。3 个单位对提供的 5 份标本进行验证，符合预期结果（见验证报告）。参编单位按照修订标准进行至少 20 份临床样品检测，？家单位结果都符合要求。

3.本标准的修订水平达到或高于国内领先水平，具有先进性。随着分子生物学技术的发展，猴志贺菌核酸检测技术基本成熟，这次修订在 GB/T 14926.47-2008 原有基础上，增加核酸检测方法，适用于对健康猴群的大量筛查，对提升检测效率具有重要作用。同时，保留分离培养方法，实验人员可根据实验室实际条件和需要进行选择。

五、主要技术内容

本标准主要内容包括志贺菌分离培养和核酸检测的原理和具体方法。

本标准由范围、规范性引用文件、术语和定义、原理、主要设备、培养基及试剂、检测程序、操作步骤、结果报告和附录 10 部分构成。现将《实验动物 志贺菌检测方法》修订内容说明如下。

1. 更改了规范性引用文件。新增 GB 4789.5-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验；
2. 更改了原理。新增核酸检测原理，依据核酸体外扩增基本原理，对志贺菌特异性靶基因 ipaH 序列设计引物和荧光标记探针，进行实时荧光 PCR 扩增，通过 Ct 值及扩增曲线进行标本检出结果判定。
3. 更改了主要设备。新增微生物生化鉴定系统和实时荧光 PCR 仪。

4. 更改了培养基和试剂。新增 GN 增菌液、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐（XLD）琼脂、 β -半乳糖苷酶培养基、粘液酸盐培养基，生化鉴定试剂盒，删除克氏双糖铁琼脂。
5. 更改了检测程序。新增核酸检测程序。
6. 更改了操作步骤。新增前增菌的保存，以及不典型菌落特征的培养时间；修改了生化特征以及血清玻片凝集试验。
7. 更改了结果报告。新增核酸检测的报告。
8. 新增附录 A，GN 增菌液成分及配制方法。
9. 新增附录 B，志贺菌实时荧光 PCR 检测方法。

六、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

目前，我国现行国标 GB/T 14926.47-2008《实验动物 志贺菌检测方法》中规定了猴志贺菌的分离培养方法。本标准立足于我国在猴志贺菌核酸检测技术相关研究结果，在原有国标 GB/T 14926.47-2008 基础上修订而成，是首次在健康动物检测中引入核酸检测方法，对提升健康猴群志贺菌的筛查效率具有重要作用，对加强我国实验动物病原检测能力，增加新技术在实验动物检测中的应用 also 具有重要意义。

七、与现行法律、法规、强制性标准的关系

本标准修订按 GB/T 1.1-2020 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，对《实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测》GB 14922-2022 开展实验猴质量检测具有重要支撑作用。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

暂无。

九、标准作为强制性标准或推荐性标准的建议

本标准作为检测方法标准，建议继续作为推荐性标准执行。

十、贯彻标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

本标准修订过程中进行了广泛讨论与交流，具有较强的科学性、先进性和适用性。本标准修订仍需要经过实践检验逐步完善，建议中国实验动物学会组织系统的培训和宣传。

十一、废止现行有关标准的建议

暂无。

十二、其他应予说明的事项

1. 本部分的编写格式是按照《GB/T 1.1 标准化工作导则 第一部分：标准的结构和编写规则》执行的。修订过程中引用了《食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验》GB 4789.5-2012 的生化和血清鉴定内容，保障细菌鉴定的统一化。

2.主要参考文献

[1]Lampel, K. A., J. A. Jagow, M. Trucksess and W. E. Hill (1990). "Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food." *Appl Environ Microbiol* 56(6): 1536–1540.

[2]I. Løbersli, et al. "Molecular Differentiation of *Shigella* Spp. from Enteroinvasive *E. Coli*." *European Journal of Microbiology and Immunology* 6 (2016) 3, pp. 197 – 205

[3] GB 4789.5-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验。