

《实验动物 弓形虫检测方法》编制说明

(修订草案)

一、工作简况

1. 任务来源

根据国家标准化委员会下达的 2026 年国家标准制修订计划，由全国实验动物标准化技术委员会提出并归口，对 GB/T 18448.2-2008《实验动物 弓形虫检测方法》进行修订。

2. 协作单位

本标准修订由全国实验动物标准化技术委员会牵头，主要起草单位包括北京大学、中国医学科学院医学实验动物研究所、杭州医学院、山西医科大学、重庆医科大学儿童医院动物中心等单位。

3. 主要工作过程

启动阶段（2025 年 Q3）：成立标准修订起草小组，拟定工作方案，明确任务分工。

资料调研与实验验证阶段（2026 年 Q1）：检索国内外相关标准（如 OIE 标准）及最新文献，收集弓形虫荧光 PCR 检测相关资料，设计并筛选多对引物探针，开展实验室验证。

草案撰写阶段（2026 年 Q2）：在原有标准基础上，增加实时荧光 PCR 检测方法作为附录 B，形成征求意见稿。

征求意见阶段（2026 年 Q3）：将草案发往相关单位征求意见，汇总处理意见。

送审阶段（2026 年 Q4）：根据意见修改完善形成送审稿。

4. 标准主要起草人及其所做的工作

负责整体技术方案设计与审核。

负责实时荧光 PCR 方法的建立与验证、引物筛选。

负责测试临床样品，检测方法的适用性。

负责组织实验室间比对实验。

负责标准文本的撰写与校对。

二、标准编写背景

原国家标准 GB/T 18448.2-2008 主要规定了间接血凝法(IHA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫荧光试验(IFA)等传统血清学方法。随着分子生物学技术的发展，聚合酶链式反应(PCR)技术已广泛应用于弓形虫的核酸检测。

在 2008 年的修订中，已将普通 PCR 法列入附录，但近年来，实时荧光定量 PCR (Real-time

PCR)因其具有高灵敏度、高特异性、可定量、闭管检测防污染等优势,已成为病原体检测的主流技术。世界动物卫生组织(OIE)也在其标准中推荐使用靶向弓形虫 B1 基因及 529 重复序列的实时荧光 PCR 方法。

为保持我国标准的先进性,并与国际标准接轨,本次修订的重点是将实时荧光 PCR 检测方法作为规范性附录增入标准,为实验动物质量检测提供更准确、高效的技术手段。

三、标准编制原则

本标准编制遵循以下原则:

一是科学性原则。方法建立基于弓形虫基因组保守序列,引物设计经过严格的生物信息学分析,确保检测结果准确可靠。

二是先进性原则。引入实时荧光 PCR 技术,替代或补充传统的普通 PCR,符合国际检测技术发展趋势。

三是适用性原则。考虑到不同级别实验室的硬件条件,保留了传统血清学方法,同时提供了普通 PCR 和荧光 PCR 两种分子生物学方法供选择。

四是可操作性原则。详细规定了试剂配制、反应体系、反应参数及结果判定标准,确保标准具有良好的可执行性。

四、确定标准主要内容的论据

本次修订的主要内容为增加附录 B“实验动物 弓形虫检测方法(实时荧光 PCR 法)”。

1. 靶基因的选择依据

根据 OIE 推荐及国内外文献报道,弓形虫检测常用的靶基因包括:

B1 基因:弓形虫基因组中重复 35 次的保守基因,特异性高,是国际上应用最广泛的靶点。

529 bp 重复序列(REP529):在基因组中存在 200-300 个拷贝,灵敏度高于 B1 基因。

ITS-1 序列:核糖体基因间隔区,拷贝数高,但需注意与相关寄生虫的鉴别。

2. 引物与探针的设计与筛选(主要试验分析)

在标准编制过程中,起草小组对提供的三对候选引物/探针进行了综合评价。

2.1 候选引物探针组合

起草小组设计了 3 组候选引物探针,其序列、靶标及扩增片段大小如下:

引物探针名称	引物探针序列	片段大小	靶基因
TG-1-F	CAGGACTGTAGATGAAGG	196 bp	重复序列
TG-1-R	CCTCTTCTCCACTCTTCA		
TG-1-P	FAM-CTCCGCCATCACCACGAGG-BHQ1		
TG-2-F	GGCTTGGCTGCTTTTCCTG		

TG-2-R	TGTCTCCCTCGCCCTCTTCT	123 bp	重复序列
TG-2-P	FAM-TGGAAAAAGAGACACCGGAATGCG-BHQ1		
TG-B1-F	GGAGCAAGAGTTGGGACTAAA	136 bp	B1 基因
TG-B1-R	AAGAACTCCGTTGCGATAGG		
TG-B1-P	FAM-TGACTCGAACCAGATGTGCTAAAGGC-BHQ1		

2.2 扩增有效性筛选

以弓形虫 RH 株基因组 DNA 为模板（1 ng/μL），对 3 组引物探针进行扩增有效性测试。结果显示，TG-re-F2/R2/P2 组合（以下称 TG-2）和 TG-B1 组合均能获得典型扩增曲线。

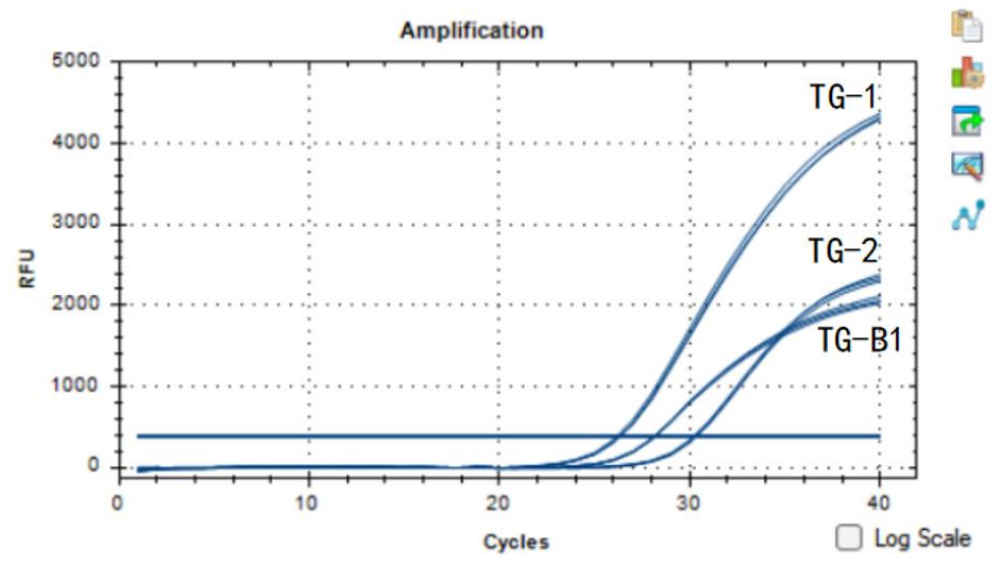


图 1 扩增有效性筛选

2.3 特异性测试

以弓形虫阳性核酸及常见实验动物寄生原虫（鼠六鞭毛虫、鼠唇鞭毛虫、鼠三毛滴虫、鼠贾第鞭毛虫、疟原虫）DNA 为模板进行交叉反应测试。结果显示，TG-1 引物探针出现了非特异性扩增，TG-2 引物探针组合仅对弓形虫阳性核酸产生特异性扩增，对其他寄生虫 DNA 均无扩增信号，表明该方法具有高度特异性，与其他相关病原体无交叉反应。综合考虑图 11 和图 2，选择 TG-2 作为后续测试的引物探针组合。

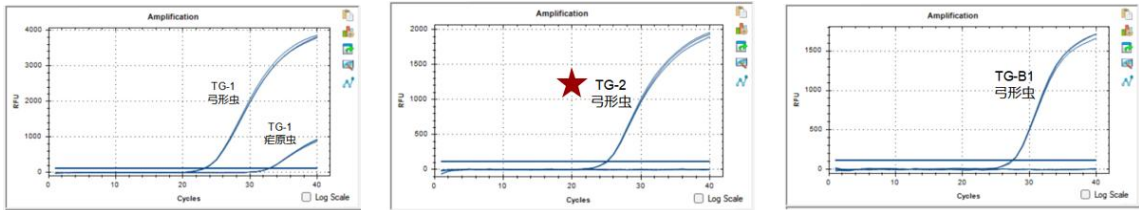


图 2 特异性测试

2.4 线性区间测试

将弓形虫基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释（浓度范围 1×10^6 copies/ μL 至 1×10^1 copies/ μL ），采用 TG-2 组合进行实时荧光 PCR 检测，绘制标准曲线。标准曲线方程为 $y = -3.559x + 34.793$ ， $R^2 = 0.996$ 。依据标准规定（ $R^2 \geq 0.98$ ，斜率在 $-3.6 \sim -3.1$ 之间），该方法的线性关系良好，扩增效率在 90%~110%之间，符合定量检测要求。

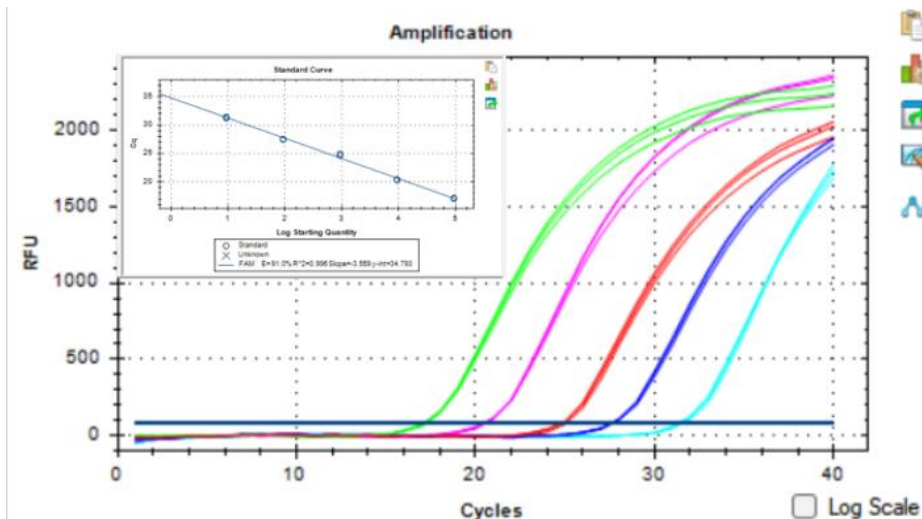


图 3 线性区间测试

2.5 退火温度优化

设置 65°C 至 50°C 共 8 个温度梯度（65、62.5、60、57.5、55、52.9、50、48°C），对 TG-2 组合进行退火温度测试。结果表明，在 52.9°C 时荧光扩增曲线上升幅度最大，Ct 值最小，因此确定最佳退火温度为 53°C。

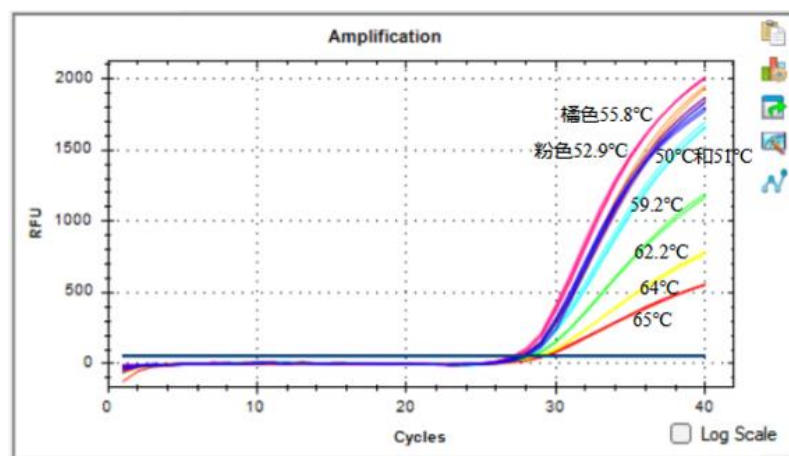


图 4 退火温度优化

2.6 引物探针浓度优化

设置探针浓度梯度（0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{mol/L}$ ），固定引物浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 。实验显示，随着探针浓度增加，荧光信号增强，但浓度超过 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 后信号增益趋于平缓。综合

考虑体系配制便利性和成本，确定引物终浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ ，探针终浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 。

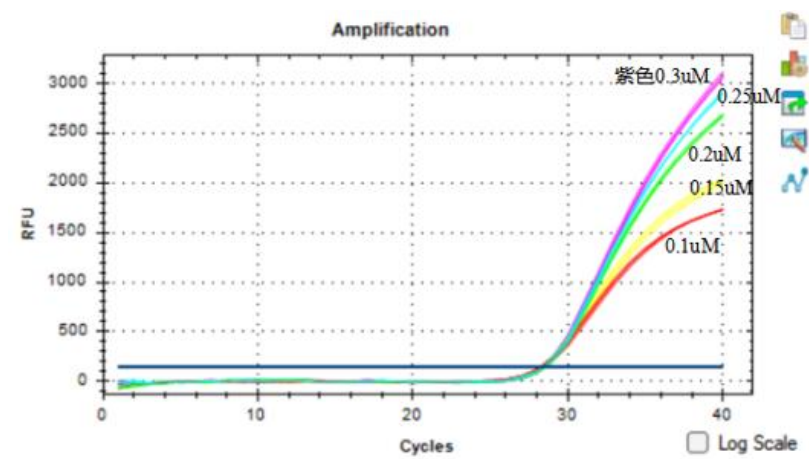


图 5 引物探针浓度优化

2.7 检出限 (LOD) 测定

将弓形虫 DNA 模板稀释至低浓度，进行多次重复检测。结果显示，TG-2 组合在模板浓度为 16 copies/ μL 和 3.2 copies/ μL 时均可稳定检出 (Ct 值分别约为 32 和 32~35)。以 60 次重复实验进行验证，在 3.2 copies/ μL 水平下阳性检出率为 100%，因此确定该方法的检出限为 4 copies/ μL (取整)。

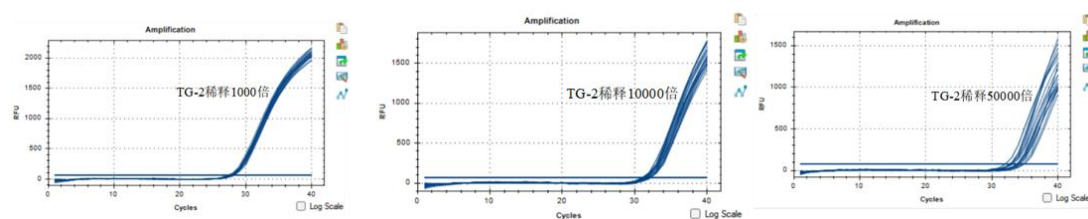


图 6 检出限 (LOD) 测定

2.8 方法再现性测试

由两名不同操作人员，在两个不同时间段，使用两台不同品牌的实时荧光 PCR 仪器，对 3 个不同浓度水平的弓形虫 DNA 样品各进行 20 次重复检测。结果显示，批该方法再现性良好，适用于不同实验室间的推广使用。

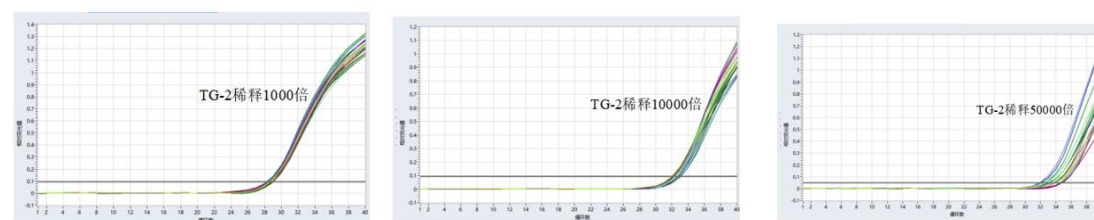


图 7 方法再现性测试

2.9 不同物种、不同组织的适应性测试

为验证方法对多种实验动物的适用性，选取沙鼠（全血，感染）、大鼠（全血，未感染）、豚鼠（全血，未感染）、新西兰兔（脾脏，未感染）、大鼠（腹水，感染）等样品进行检测。结果显示，所有感染样品均获得阳性扩增（Ct 值在 25~27 之间），未感染样品均为阴性。表明该方法适用于常见实验动物的血液、组织、腹水等不同类型样本的弓形虫核酸检测。

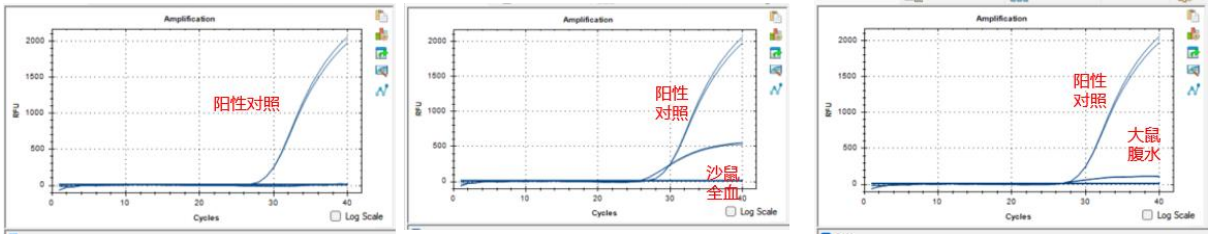


图 7 方法再现性测试

3. 最终确定的技术参数

综合上述实验结果，附录 B 规定的实时荧光 PCR 方法的主要技术参数如下：

3.1 引物和探针序列

TG-2	TG-2-F	GGCTTGGCTGCTTTTCCTG
	TG-2-R	TGTCTCCCTCGCCCTCTTCT
	TG-2-P	TGGA AAAAGAGACACCGGAATGCG

3.2 反应体系（20 μL）：

反应组分	用量/μL	终浓度
2×实时荧光 PCR 预混液	10	1×
正向引物(10 μmol/L)	0.6	300 nmol/L
反向引物(10 μmol/L)	0.6	300 nmol/L
探针（10 μmol/L）	0.3	150 nmol/L
DNA 模板	2	25 ng/μL
50×6-羧基-X-罗丹明(ROX)	0.4	--
无 RNase 去离子水	补足	--
总体积	20	

（3）扩增程序：95℃ 3 min；95℃ 10 s，53℃ 30 s，40 个循环；每个循环的延伸阶段收集荧光信号。

(4) 结果判定：阳性对照 Ct 值<35 且呈典型 S 型扩增曲线，阴性对照无 Ct 值，待测样品 Ct 值≤35 判为阳性，Ct 值>38 判为阴性，介于 35~38 之间判为可疑，需重复检测。

4. 与旧版标准水平的对比

对比项目	GB/T 18448.2-2008 (含普通 PCR)	本次修订后 (含附录 B)	优势
检测技术	普通 PCR (终点电泳检测)	实时荧光 PCR (动态监测)	可定量，无需电泳，避免污染
灵敏度	普通 (约 200 copies/μL)	高 (3.6 copies/μL)	可检测微量感染，适用于早期诊断
特异性	依靠引物和电泳条带大小	依靠引物和特异性荧光探针	双保险机制，极大降低假阳性
操作风险	需开盖电泳，易污染	闭管检测，无需后处理	更加安全，适合大规模筛查
与国际标准	滞后	与 OIE 推荐方法接轨	提升我国标准的国际等效性

五、主要试验的分析、综述报告及预期的经济效果

1. 主要试验分析

通过对不同稀释度的弓形虫 DNA 模板进行检测，TG-2 引物探针组合的检测下限可达 3.6 copies/μL。

2. 社会经济效益分析

经济效益：实时荧光 PCR 法可实现对大批量样本的快速筛查，节省人力成本；高灵敏度可有效检出隐性感染，防止实验动物种群中弓形虫的传播，减少由此造成的科研损失和动物资源浪费。

社会效益：提升实验动物质量检测水平，保障生物医学研究数据的准确性和可靠性，符合国家生物安全战略要求。

六、采用国际标准和国外先进标准的程度

本标准修订过程中参考了世界动物卫生组织 (OIE)《陆生动物诊断试验和疫苗手册》中关于弓形虫病的章节。OIE 推荐使用靶向 B1 基因或 529 重复序列的 PCR 方法。本标准附录 B 规定的实时荧光 PCR 方法原理与国际标准一致，技术指标相当，实现了与国际先进标准的

接轨。

七、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

本标准内容符合《中华人民共和国标准化法》、《实验动物管理条例》及国家关于生物安全的相关规定。本标准与现行有效的其他实验动物寄生虫检测标准（GB/T 18448 系列）协调一致，无技术冲突。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

在本标准征求意见过程中，未收到重大分歧意见。

九、标准作为强制性标准或推荐性标准的建议

建议本标准的性质仍为推荐性国家标准。因为本标准提供的检测方法属于技术规范，供相关单位自愿采用，不宜强制执行。

十、贯彻标准的要求和措施建议

组织措施：建议由全国实验动物标准化技术委员会组织举办标准宣贯培训班，重点针对新增的实时荧光 PCR 技术进行实操培训。

技术措施：对于不具备荧光 PCR 仪器的基层单位，可继续使用标准中的 IHA、ELISA 等血清学方法或普通 PCR 方法。

十一、废止现行有关标准的建议

本标准发布实施后，将代替 GB/T 18448.2-2008《实验动物 弓形虫检测方法》。

十二、其他应予说明的事项

实验室在使用时，可使用本标准附录 B 提供的引物探针、反应体系和参数，配合经验证的商品化试剂盒进行检测，但必须设立严格的阴阳性对照。