

《实验动物 犬细小病毒检测方法》

GB/T 14926.57

国标修订说明

联系人：刘苗苗

联系电话：18813129626

编制单位：清华大学

时间：2026 年 7 月 30 日

《实验动物 犬细小病毒检测方法》修订稿编制说明

一、任务来源

根据国家标准委员会 2023 年国家标准复审修订计划(国标委发(2023)64 号), 国家标准修订计划 20232762-T-306。推荐性国家标准 GB/T 14926.57《实验动物 犬细小病毒检测方法》由全国实验动物标准化技术委员会(TC281)归口, 主管部门为科技部。主要起草单位中国实验动物学会等。

二、主要工作过程、标准主要起草人及其所做的工作

1. 2025 年 4 月于北京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;

2. 2025 年 5-2026 年 1 月, 反复查阅大量相关资料, 讨论和确定标准相关研究内容, 起草了《实验动物 犬细小病毒检测方法》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。

3. 2026 年 2 月, 召开了标准修订的第二次工作会议, 明确了修订工作的流程, 确定了征求意见稿的格式和要求, 并做方法验证工作的计划。

4. 2026 年 2 月-7 月, 进行标准验证数据工作。

5. 2026 年 7 月, 工作组统稿, 形成征求意见稿。

依据工作分工, 由清华大学(生命科学学院实验动物中心)主持 GB/T 14926.57《实验动物 犬细小病毒检测方法》修订工作。本标准修订单位包括清华大学、华南农业大学、北京维通利华实验动物技术有限公司、北京畜牧兽医研究所、浙江中医药大学、中国药品检定研究院、中国医学科学院医学实验动物研究所、苏州西山生物技术有限公司。

三、标准编写背景

1. 犬细小病毒

犬细小病毒(Canine Parvovirus, CPV)属于细小病毒科、细小病毒亚科、原细小病毒属。该病毒是导致犬类急性出血性肠炎和非化脓性心肌炎的主要病原体, 具有高度的传染性和环境耐受性。CPV 为无包膜的单链 DNA 病毒, 在实验动物领域, CPV 是犬类需重点排除的烈性传染病病原, 也是进出口犬只检疫的必测项目, 对动物福利和实验结果的准确性具有重大影响。

2. 犬细小病毒检测方法现状

目前, 国内 CPV 感染的诊断主要依赖于临床症状观察及针对抗原或抗体的检测方法, 如胶体金免疫层析法、酶联免疫吸附试验(ELISA)等。

虽然血清学和抗原快速检测简便, 但在感染初期或病毒排毒量较低的情况下, 容易出现漏检; 此外, 对于环境样本(如笼具表面、水源)及无血清样本, 传统的免疫学方法敏感度不足。病毒分离培养虽为病原检测的“金标准”, 但其操作繁琐、培养周期长、敏感性受样本质量影响大, 无法满足实验动物大规模快速筛查及进出口即时检疫的需求。

随着分子生物学技术的演进, 实时荧光定量 PCR(qPCR)技术凭借其灵敏度高、特异性强、可定量以及闭管操作防止污染等优势, 已成为 CPV 早期感染检测和病毒载量评估的首选手段。在实验动物种群净化、环境风险评估以及生物制品污染筛查中, qPCR 技术展现了显著的技术优势。

3. 《实验动物 犬细小病毒 qPCR 检测方法》编制的必要性

通过调研中国实验动物学会及国家标准相关数据库, 现有的关于犬细小病毒的标准多集中于临床诊断或传统的常规 PCR 方法。针对实验动物这一特定领域,

尤其是应用高灵敏度 qPCR 技术进行定量检测的专项标准尚不够完善。

为进一步提升实验犬的质量监控水平，完善实验动物环境风险评价体系，急需制定一套统一、规范的 qPCR 检测标准。

本标准的编制结合了国内外 CPV 检测的技术要求，在原有检测方法的基础上新增了高灵敏度的病原核酸定量检测手段。这对于从源头保障实验动物质量、维护实验环境生物安全以及促进国际实验动物质量互认具有重要意义。

四、编制原则

本标准在制定中遵循以下原则：

- 1. 本标准编写格式符合 GB/T 1.1 中的规定。
- 2. 本标准规定的技术内容及要求科学合理，适用性和可操作性相结合。编制小组成员结合实践工作，以及国内外参考文献，提出合理的评价方案，制订的技术规范可操作、可评价。
- 3. 本标准的水平达到或高于国内领先水平。随着分子生物学技术的发展，病毒核酸检测技术逐渐在应用中得到完善，通过规范操作，可以避免核酸检测对实验室的污染，本标准在 GB/T 14926.57-2008 原有基础上，将核酸检测技术列入其中，扩充了病原快速检测技术，完善了标准检测方法，增加了无血清样品的检测技术方法，这对加强实验动物质量，预防和控制 CPV 传播具有重要意义。

五、主要内容

本标准主要内容为犬细小病毒检测方法，包括抗体检测方法和核酸检测方法的原理和具体方法。

本次修订与前版本主要技术差异：

本文件与 GB/T 14926.57-2008 相比，主要技术差异如下：

- 1. 新增核酸检测规范性引用文件（见章节 2）；
- 2. 增加了核酸检测原理（见章节 3），增加了核酸检测用主要试剂和器材（见章节 4 中 4.1.7 及 4.2.4），增加了犬细小病毒核酸检测方法（见章节 5 中 5.3）及其结果判定（见章节 6 中 6.4）；
- 3. 增加附录 A，将犬细小病毒核酸检测方法所需的主要设备和材料、试剂、样本采集、样本 DNA 提取、实时荧光定量 PCR 反应体系和反应参数、结果判定等进行了规范（见附录 A）。

六、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

1. 引物及探针的合成

引物和探针序列见表 1，引物和探针由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

表1 CPV实时荧光定量PCR方法扩增引物和探针

引物和探针名称	引物和探针序列（5’ -3’ ）
正向引物	GGCCTGGGAACAGTCTTGAC
反向引物	GCGAAGATAAGCAGCGTAAGC
探针	FAM-CCAACTAACCCTTCTGACGCCGCTG-TAMRA

注：探针也可选用具有与FAM和TAMRA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

2. 荧光定量 PCR 检测方法

可采用经验证的、等效的商品化荧光定量 PCR 预混液或等效试剂。参照诺唯赞公司 Animal Detection U+ Probe qPCR Super PreMix 试剂盒操作说明配制荧光定量 PCR 反应体系（25 μL）：2 x Animal Detection U Probe qPCR Super PreMix 12.5 μL，CPV 上游引物 0.5 μL，CPV 下游引物 0.5 μL，探针 0.5 μL，模版 2 μL，加 RNase-free 双蒸水至 25 μL。反应条件：37° C 2min, 1 个循环；95° C 30s, 1

个循环;95° C 10s, 60° C 30s, 45 个循环, 60° C 延伸结束后收集荧光。

3. 特异性试验

采用建立的荧光定量 PCR 方法以犬常见病毒 CPV、CAV-2 及 CDV，以及同科同属 FPV、MVM 及 PPV 阳性样本作为模板进行 CPV qPCR 特异性检测，水作为空白对照 (NTC)，验证该方法的特异性。结果除 CPV 为阳性外，其他病毒与水空白对照均为阴性，均未出现扩增，表明建立的方法具有良好的特异性(图 1 和图 2)。

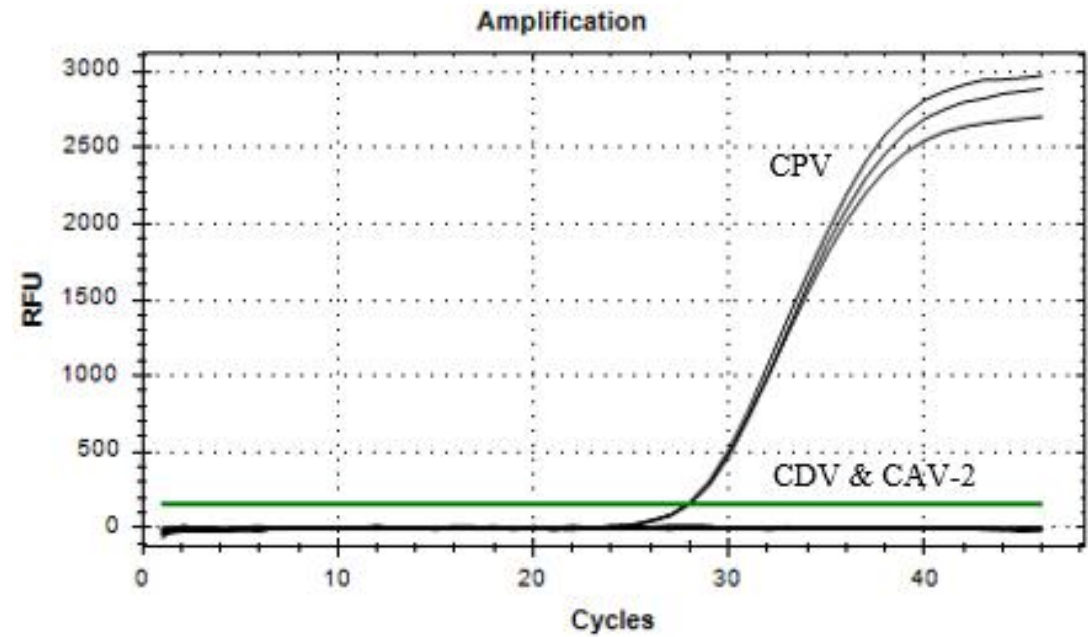


图 1 CPV 实时荧光定量 RT-PCR 犬常见病毒的特异性检测结果

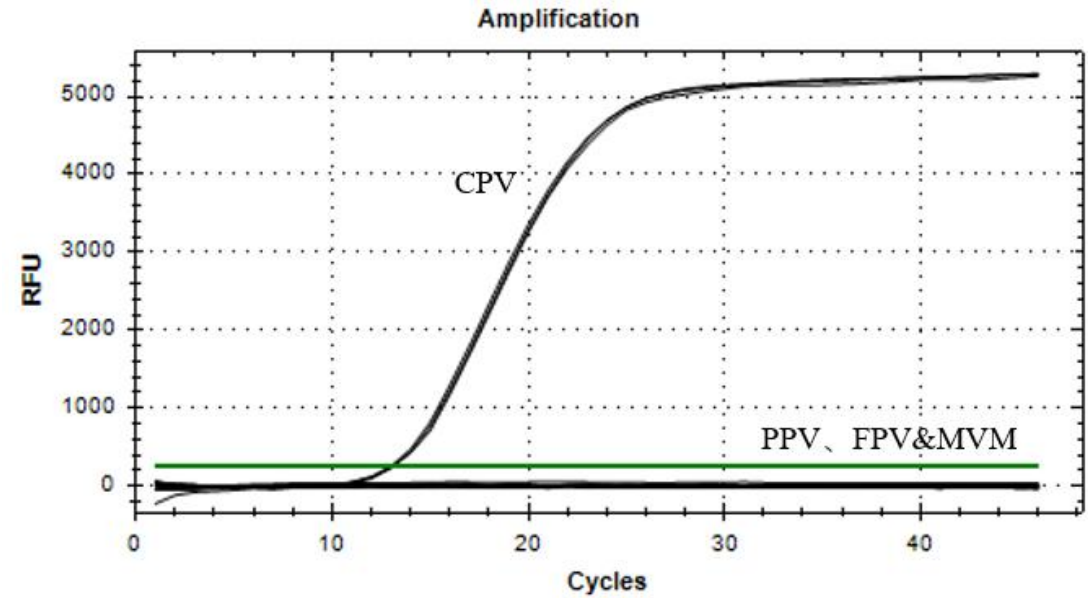


图 2 CPV 实时荧光定量 RT-PCR 同科同属病毒的特异性检测结果

4. 定量标准曲线的建立及敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution (Takara 公司) 做 10 倍系列稀释，得到 $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^0$ copies/ μ L 系列标准模板。利用优化后的反应体系和条件测定各稀释度的 Ct 值，荧光定量 PCR 曲线结果见图 3, 可见各梯度之间间隔的 Ct 值基本

相等，ddH₂O 没有荧光扩增曲线为阴性结果。以标准品稀释拷贝数的对数值为横坐标，以临界环数(threshold cycle, Ct)为纵坐标建立荧光实时定量 PCR 的标准曲线，标准质粒在 2x10⁸copies/μL~2x10¹copies/μL 之间具有良好的线性关系，结果见图 4。其线性回归方程为 $Ct = -3.34 \lg(\text{拷贝数}) + 41.16$ ，标准曲线斜率为 -3.34，根据公式计算得扩增效率 $E = 10^{1/3.34} - 1 = 0.9925$ ，即扩增效率为 99.25%，相关系数 $R^2 = 0.9999$ ，说明 PCR 扩增该标准品的效率较高，线性关系良好。2x10⁰copies/μL 组因模板浓度较低无扩增曲线。因此，本研究中标准品定量 20 拷贝以上能表现较好线性和相关性，故本方法检测的灵敏度为 20 个拷贝。

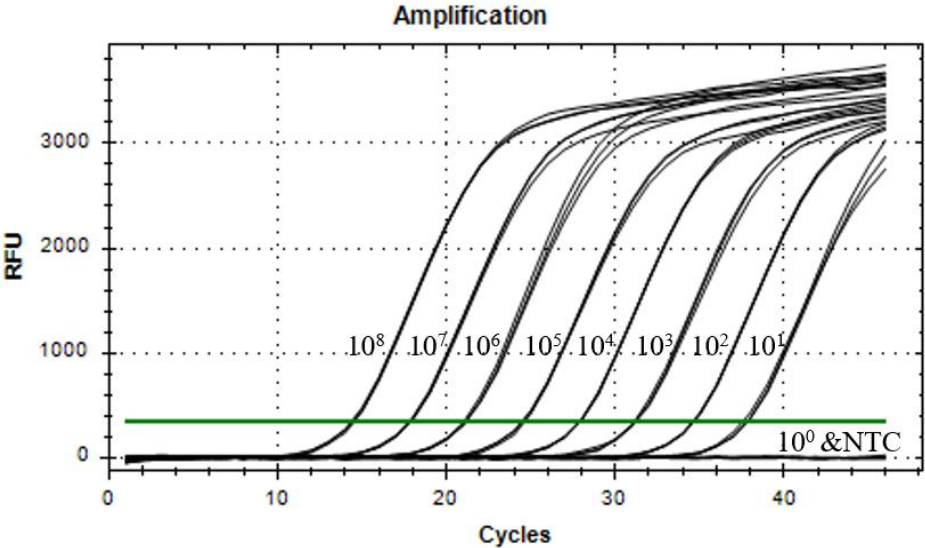


图 3 10 倍系列稀释质粒标准品的 CPV 实时荧光量 PCR 扩增曲线

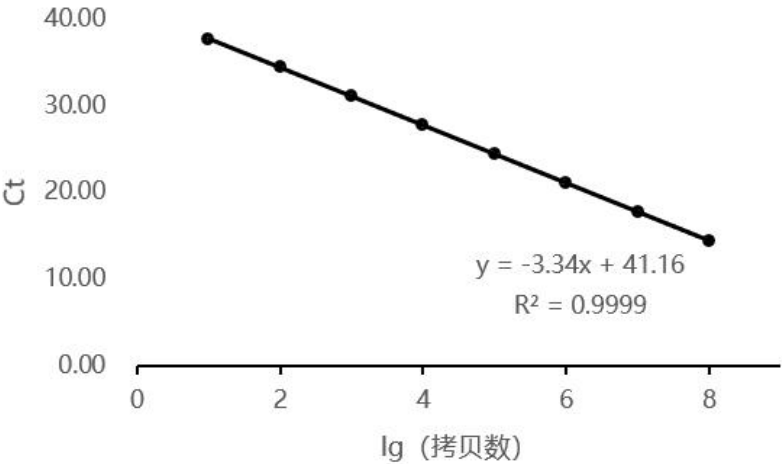


图 4 10 倍系列稀释质粒标准品的 CPV 实时荧光量 PCR 标准曲线

5. 重复性试验

对 10 份 10 倍系列稀释的质粒标准品 (2x10¹~2x10⁸copies/μL) 在同一次反应中进行 3 次重复测定，对各稀释度的 Ct 值进行统计，计算每个样品各反应管之间的变异系数(CV%)。

通过对 2x10¹~2x10⁸copies/μL 稀释度样本进行重复性检测，重复性试验的变异系数均小于 2%(表 2)，表明建立实时荧光定量 PCR 方法重复性好，方法稳定可靠。

表 2 CPV 标准品梯度稀释实时荧光定量 PCR 重复性检测结果

模板	2×10^1 copies / μL	2×10^2 copies / μL	2×10^3 copies / μL	2×10^4 copies / μL	2×10^5 copies / μL	2×10^6 copies / μL	2×10^7 copies / μL	2×10^8 copies / μL
Ct1	37.8	34.58	31.13	27.86	24.6	21.02	17.75	14.4
Ct2	37.77	34.62	31.12	27.87	24.45	21.14	17.86	14.35
Ct3	37.52	34.57	31.2	27.87	24.47	21.13	17.83	14.51
平均值 Ct	37.70	34.59	31.15	27.87	24.51	21.10	17.81	14.42
标准差 SD	0.15	0.03	0.04	0.01	0.08	0.07	0.06	0.08
变异系数 CV%	0.41	0.08	0.14	0.02	0.33	0.32	0.32	0.57

6. 适用性测试

利用实时荧光定量 PCR 方法对收集的 73 份临床样本进行检测，每次反应同时设置阳性对照和阴性对照。结果检出 61 份阴性，12 份阳性。阳性和阴性样本与第三方检测结果相符。

7. 第三方实验室验证

由清华大学实验动物中心组织共 3 家单位参与此次验证，参加单位包括北京大学实验动物中心、上海实验动物研究中心、杭州医学院。参加单位使用清华大学实验动物中心准备的样本与引物，参考本标准中的方法，有条件的单位使用自己单位的样本或方法进一步验证。

经实验室间比对，3 家单位使用本标准中的方法均有效检测出阳性及阴性样本，结果符合性 100%，说明本方法在不同实验室间可重复。

表 3 CPV 实时荧光定量 PCR 检测方法实验室间比对结果

参加单位	CPV 核酸检测结果符合性评价	
	阳性样本	阴性样本
北京大学（实验动物中心）	符合	符合
上海实验动物中心	符合	符合
杭州医学院	符合	符合

七、采用国际标准和国外先进标准情况

国外无此类标准。

八、与现行法律、法规、强制性标准的关系与现行法律、法规没有冲突。

九、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

十、标准性质的建议

本标准为您推荐性标准。

十一、贯彻标准的要求和措施建议

举办培训班以及学会交流。

十二、对强制性国家标准自发布日期至实施日期之间的过渡期(以下简称过渡期)的建议及理由，包括实施强制性国家标准所需要的技术改造、成本投入、老旧产品退出市场时间等

无此情况。

十三、是否需要对外通报的建议及理由

否。

十四、废止现行有关标准的建议

原《实验动物 犬细小病毒病毒检测》(GB/T 14926.57-2008)废止。

十五、涉及专利的有关说明

无专利冲突。

十六、强制性国家标准所涉及的产品、过程或者服务目录无此情况。