

# 鱼类无乳链球菌超快速荧光 PCR 检测技术规范

## 编制说明

### 一、任务来源（包括目的意义）

中国作为水产养殖大国，2023 年的养殖产量达 5809 万吨，养殖业蓬勃发展的同时，也受到各种因素制约，其中链球菌是导致养殖鱼类大规模死亡的主要病害之一，无乳链球菌（*Streptococcus agalactiae*）是其主要病原菌，除了对罗非鱼养殖业造成巨大经济损失之外，还感染鲫（*Carassius carassius*）、鳙（*Aristichthys nobilis*）、鲢（*Cirrhinus molitorella*）、卵形鲳鲹（*T. ovatus*）、宝石鲈（*Scortum barcoo*）、大菱鲆（*Scophthalmus maximus*）、虹鳟（*Oncorhynchus mikiss*）、西伯利亚鲟（*Acipenser baerii*）、尖吻鲈（*Lates calcarifer*）、齐口裂腹鱼（*Schizothorax prenanti*）、红尾皇冠鱼（*Aequidens rivulatus*）、银鲳（*Pampus argenteus*）、鞍带石斑鱼（*Epinephelus lanceolatus*）等在内的多种海水与淡水鱼类。除美国蟾蜍、科威特湾宽吻海豚外，无乳链球菌还引起了美国牛蛙（*Rana rugurosa*）和灰海豹（*Halichoerus grypus*）、中国斑节对虾（*Penaeus monodon*）等非鱼类水生动物的感染和死亡，给全球养殖业带来巨大经济损失。同时无乳链球菌也会危害人类，2015 年新加坡、2024 年中国香港都有成人食用或者接触鱼感染无乳链球菌的报道，从分子生物学角度也证明了水生动物的某些无乳链球菌菌株具有人畜共患的风险。目前，针对无乳链球菌的控制策略和人兽共患风险不同，快速准确的检测无乳链球菌，对于预警和解决水产养殖中的无乳链球菌病至关重要。

传统上，无乳链球菌的诊断是基于病原体的分离和生理生化特征鉴定，然而使用快速生化鉴定盒或自动化设备时，因两者之间的表型相似可能导致错误识别，且检测时间长，至少需 2d~3 d。随着研究进展，基于分子生物学和血清学的检测新方法也在不断被提出及应用，包括聚合酶链反应（PCR）、单一实时荧光 PCR 方法（荧光 PCR）、环介导等温扩增技术（LAMP）和 ELISA 方法、胶体金免疫层析法等。为解决鱼类感染无乳链球菌的快速诊断，荧光 PCR 方法陆续被建立应用，用时在 1.5 h 左右。然而，在疾病控制过程中，仍然需要快速、灵敏且可以定量的检测方法来更好地抓住主要防控期和治疗期。

为了解决无乳链球菌病快速、准确诊断的难题，东莞市动物疫病预防控制中心于 2025 年 3 月向广东省畜牧兽医学会提出了《鱼类无乳链球菌超快速荧光 PCR 检测技术规范》的团体标准立项申请，广东省畜牧兽医学会组织了对该标准进行了预研，并于 2025 年 5 月 30 日组织专家就该标准进行了立项审查。经过专家充分的研讨论证，专家们一致认为，该项目所提供的资料基本齐全，立项标准符合国家产业政策，所申报的团体标准满足立项条件，同意该标准立项。目前，本标准研究团队已经完成了标准参数指标的验证，形成了标准文本初稿。

### 二、起草工作简要过程（含主要参加单位及工作组成员）

#### 1、标准起草阶段

为制定本标准，本项目组织有关技术人员参阅技术专著、国家、地方标准等大量文献，并进行了预讨论工作。本项目主要开展鱼类无乳链球菌超快速荧光 PCR 试验方法各项参数的验证，包括了方法的特异性、敏感性、稳定性和临床样品的验证。本研究使用的试剂均为同批次制品或者产品，尽可能确保了各要素效价的稳定性和一致性，保证了试验体系的稳定。2025 年 7 月，我们初步完成了标准的修订并送交同行专家审定。

### 三、标准参与单位和参与人员

文件起草单位包括东莞市动物疫病预防控制中心、广东省动物疫病预防控制中心、超快生物技术（广州）有限公司、深圳市动植物疫病预防控制中心、深圳海关动植物检验检疫技术中心、广州白云机场海关综合技术服务中心、广州国家实验室、广东省疾病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、广东海大集团股份有限公司、华润五丰肉类食品（河南）上海市动物疫病预防控制中心、广东省农业科学院动物卫生研究所、东莞市洪梅镇农业技术服务中心、东莞市厚街镇农业技术服务中心等多家单位联合起草。

本文件起草人为张险朋、林华剑、李敏、管知深、李秋剑、阮周曦、翁文川、徐强、李柏生、吴新伟、丁文桂、赖笑娴、王桂兰、王婉君、曹兰、林仰孝、蒋文武、李小军、叶毅飞、钟群芳、刘雪怡、龙海鹰、邓海燕、莫钻兰、谭铭光、林梦哲等。

文件起草的具体分工如下：

张险朋：项目负责人，负责标准的立项、整体方案确立及宣贯，负责标准的审阅、项目申报建议及相关技术文件的校订；

林华剑：负责标准技术指标确定、具体实施以及标准撰写，负责编制说明的起草及相关技术文件的整理；

李敏：负责标准中方法建立、实验数据分析起草，负责各版本标准稿的讨论和修订工作及征求意见后的修改工作；

管知深：负责各版本标准稿的讨论和修订工作及征求意见后的修改工作；

李秋剑、阮周曦：负责标准中部分方法的起草、验证；

翁文川、徐强：负责标准中部分方法的验证；

李柏生、吴新伟：负责标准中部分方法的验证；

丁文桂、赖笑娴、王桂兰、王婉君：负责部分标准方法的验证及检测方法的推广应用；

曹兰、林仰孝：负责标准中部分方法的试验方案设计及方法验证；

蒋文武、李小军：负责标准方法的推广应用；

叶毅飞、钟群芳、刘雪怡、龙海鹰：负责标准中部分实验室方法的建立、优化及验证；

邓海燕、莫钻兰、谭铭光、林梦哲、谭铭光、林梦哲：负责标准中实验方法的临床应用。

### 三、编写原则和确定标准主要内容的依据

#### （一）框架的确定

根据布鲁氏菌超快速荧光 PCR 检测技术规范的要求，结合标准撰写格式确定标准的框架为适用范围、规范性引用文件、术语和定义、缩略语、试剂和耗材、仪器设备、样品采集与处理、操作方法、结果判定。

#### （二）标准的编写原则

##### 1、标准引用

检测样品的采集、用水方面引用了已经发布的国家标准 GB/T 6682 《分析实验室用水规格和试验方法》、GB 19489 《实验室生物安全通用要求》，水产行业标准 SC/T 7014-2006 《水生动物检疫实验技术规范》、SC/T 7103-2008 《水生动物产地检疫采样技术规范》。

##### 2、实际科研和检测工作经验

项目组在人畜共患病检测和水生动物病害防治方面具有丰富的经验，在鱼类无乳链球菌病诊断方面开展了大量的研究工作，东莞市动物疫病预防控制中心在 2003 年通过了中国合格评定国家认可委员会（CNAS）认可，2023 年被认定为“东莞市人兽共患病重点实验室”，连续 5 年通过了全国水产技术推广总站组织的水生动物防疫系统实验室检测能力验证，每年平均检测动物样品近 10 万份，监测项目 70 多个。目前已建立了罗非鱼无乳链球菌超快速荧光 PCR 检测技术，并

应用于临床样品的检测，在无乳链球菌病快速诊断方面发挥了重要作用。在鱼类链球菌方面发表了论文 3 篇，其中《罗非鱼链球菌双重荧光 PCR 方法的建立及临床应用》在 2023 年 4 月发表于《中国动物检疫》，《尼罗罗非鱼无乳链球菌微滴式数字 PCR 检测方法的建立及临床应用》在 2023 年 6 月发表于《水产学杂志》，《罗非鱼链球菌检测方法研究进展》在 2024 年 1 月发表于《中国动物检疫》。2023 年 9 月主持发布了团体标准《罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 检测方法》T/GDSF003-2023。

标准编写人员为张险朋、林华剑、李敏、管知深、李秋剑、阮周曦、翁文川、徐强、李柏生、吴新伟、丁文桂、赖笑娴、王桂兰、王婉君、曹兰、林仰孝、蒋文武、李小军、叶毅飞、钟群芳、刘雪怡、龙海鹰、邓海燕、莫钻兰、谭铭光、林梦哲等，多年来一直从事鱼类流行病学研究和疫病防控工作，在本标准的编写过程中，结合实验室的实际工作经验，对试验操作的具体细节进行编写。

### (三) 主要研究内容

#### 1、研究的技术路线

详见图 1。

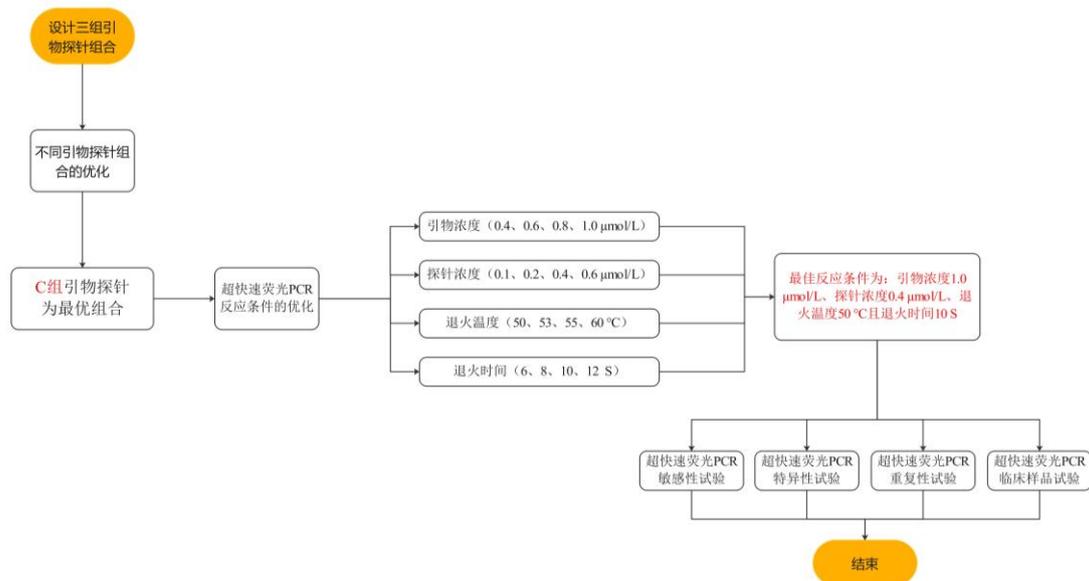


图 1. 标准研究的技术路线图

#### 2、引物、探针的设计及优化

根据 GenBank 收录的鱼源无乳链球菌菌株全基因组，利用 NCBI 网站筛选保守基因序列，即无乳链球菌 *LysM* 肽聚糖结合结构域蛋白质编码基因组中 *Sip* 基因序列片段，使用 Primer Premier 6.0 软件设计 3 组特异性引物/探针，探针 5'端标记报告荧光基团 FAM，3'端标记淬灭荧光基团 BHQ1。根据鱼类基因序列设计内参引物/探针，探针 5'端标记报告荧光基团 BHQ2，3'端标记淬灭荧光基团 Cy5（详见表 1）。根据 Ct 值、扩增效率、特异性选择 C 组的引物/探针为无乳链球菌超快速荧光 PCR 检测方法的最优组合（详见表 2、图 2）。

表 1 无乳链球菌和鱼内参的引物、探针序列

#### 无乳链球菌

组别	引物/探针 名称	序列 (5'-3')
A 组	F1	CTCCCAATTTTAAAAGCAATA
	R1	AGCTGTATTTCAATACCA
	P1	ACTCTTCAAGATAGCCACGACTCCA
B 组	F2	ACGGTTAATGAGGCTATTAC
	R2	AAGGCTTCTACACGACTA
	P2	AAGACTTCATTGCGTGCCAACC
C 组	F3	GGTCTTAATGAAGGGTTCTA
	R3	CAGCATTACGCAAAACAA
	P3	AGCCAACGAAGCCACTGTCTC

**鱼内参**

引物/探针 名称	序列 (5'-3')
F4	CCTGGAGAAGAGCTACGA
R4	CTGCTGGAGCTGATACATGC
P4	GAARGAAGGCTGGAAGAG

表 2 不同序列引物探针的超快速荧光 PCR 反应 Ct 值

组别	Ct 值	平均 Ct 值
A 组	-	-
	-	
	-	
B 组	24.114	24.056
	24.048	
	24.004	
C 组	<b>23.233</b>	<b>23.235</b>
	<b>23.147</b>	
	<b>23.325</b>	

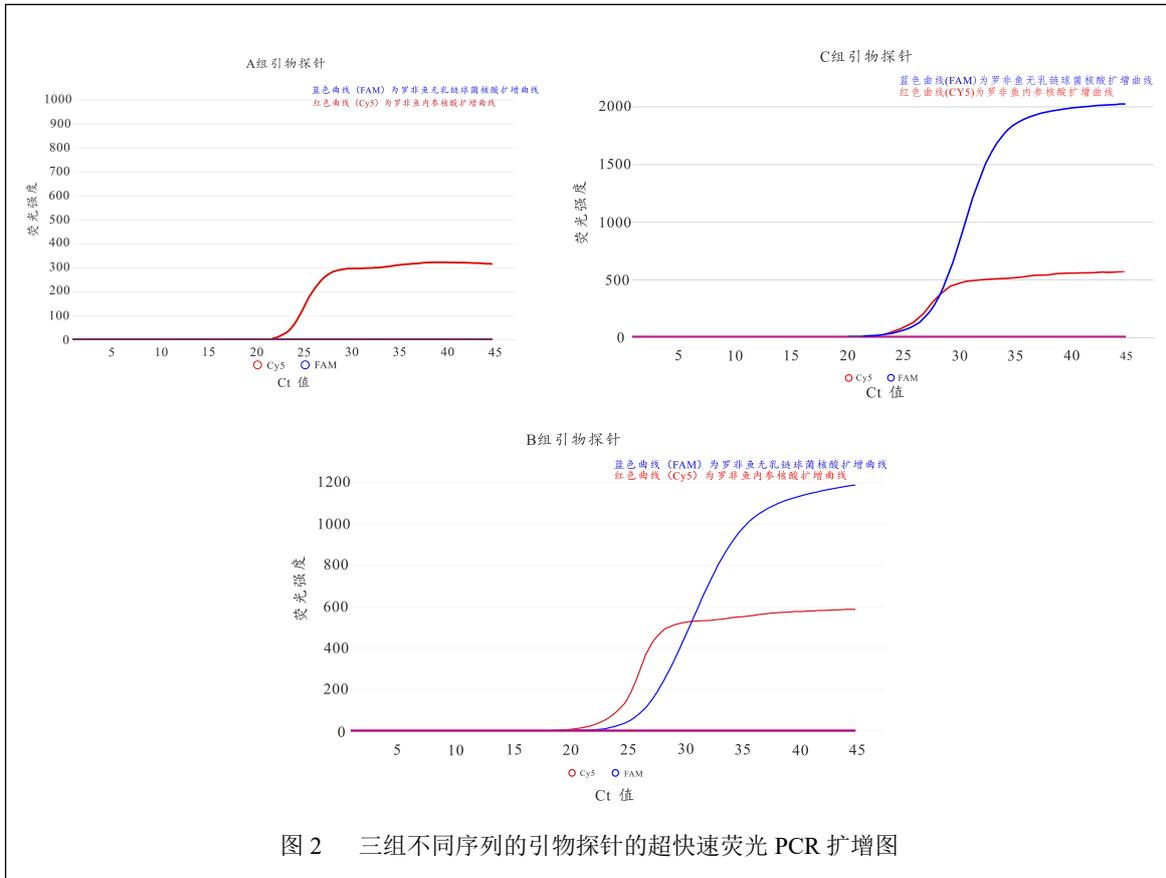


图2 三组不同序列的引物探针的超快速荧光 PCR 扩增图

### 3、标准菌株的来源、制备

#### 3.1 标准菌株的来源

无乳链球菌菌株，编号 DG210721，由东莞市动物疫病预防控制中心分离鉴定。

#### 3.2 标准菌株的制备

将无乳链球菌的标准菌株接种于灭菌的 BHI 液体培养基，210 r/min、36 °C 摇床培养 20 h 后进行细菌平板计数。用体积分数为 0.5 % 的甲醛溶液于 28 °C 条件下灭活 48 h，用磷酸盐缓冲液（PBS）将菌液洗涤 3 次，混匀，分装至 1 mL 冻存管保存，于 -80 °C 冰箱保存备用。

### 4、细菌核酸提取

按照方舟《磁珠法水生动物病原核酸超快速提取试剂盒》操作提取核酸。将核酸转移至灭菌的离心管中，于 -80 °C 冰箱保存备用。

### 5、反应条件的优化

反应体系（50  $\mu\text{L}$ ）：5 $\times$ PCR buffer（10  $\mu\text{L}$ ）、dNTP（0.8  $\mu\text{L}$ ）、快速启动聚合酶（4  $\mu\text{L}$ ）、模板（10  $\mu\text{L}$ ）、引物（体积根据优化后的浓度进行调整）、探针（体积根据优化后的浓度进行调整），内参上游引物（1  $\mu\text{L}$ ）、内参下游引物（1  $\mu\text{L}$ ）、内参探针（0.5  $\mu\text{L}$ ），dd-H<sub>2</sub>O 补充至 50.0  $\mu\text{L}$ 。反应体系及条件的优化包括引物、探针浓度、退火温度和退火时间 4 个因素，每个因素设 4 个水平（表 3），用 SPSS 16.0 软件对优化因素进行正交阵列设计，按退火温度由小到大排列，共设置 16 个试验方案（表 4），每个试验方案设置 3 个重复。Ct 值最小且荧光曲线标准，为最优条件。扩增程序：95 °C 1min；95 °C 1s，退火温度（50 °C、53 °C、55 °C、60 °C）退火

时间（6 s、8 s、10 s、12 s），45 个循环，升降温速率  $40\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 。根据 Ct 值、荧光强度、荧光曲线筛选出最优引物浓度、探针浓度、退火温度和退火时间。

表 3 优化因素及其水平

优化因素	反应水平			
	1	2	3	4
引物浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.4	0.6	0.8	1
探针浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.1	0.2	0.4	0.6
退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	50	53	55	60
退火时间/s	6	8	10	12

表 4 反应体系及条件优化正交阵列设计

方案号	引物浓度/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	探针浓度/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	退火时间/s
1	0.4	0.1		6
2	0.8	0.2		8
3	0.6	0.6	50	12
4	1	0.4		10
5	0.4	0.4		12
6	0.8	0.6		10
7	0.6	0.2	53	6
8	1	0.1		8
9	0.4	0.6		8
10	0.8	0.1		10
11	0.6	0.2	55	12
12	1	0.4		6
13	0.4	0.4		8
14	0.8	0.1		12
15	0.6	0.2	60	10
16	1	0.6		6

试验结果（表 5、图 3）显示：当反应体系中引物浓度为  $1.0\text{ }\mu\text{mol/L}$ ，探针浓度为  $0.4\text{ }\mu\text{mol/L}$ ，退火温度为  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，退火时间为  $10\text{ s}$  时，超快速荧光 PCR 检测结果的荧光曲线标准且 Ct 值最小，且与其它 15 个方案的 Ct 值存在显著差异 ( $P<0.05$ )。利用 SPSS16.0 软件计算得出，本次优化试验的 4 个因素交互效应的概率为 0.002，说明没有达到显著水平。因此，罗非鱼无乳链球菌超快速荧光 PCR 的最优体系的总体积  $50\text{ }\mu\text{L}$ ，其中： $5\times\text{PCR Buffer}$  $10\text{ }\mu\text{L}$ ，上、下游引物各  $5\text{ }\mu\text{L}$ ，

探针 2  $\mu\text{L}$ ，内参上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ，探针 0.5  $\mu\text{L}$ ；dNTP 0.8  $\mu\text{L}$ ；快速启动酶 4  $\mu\text{L}$ ；模板 10  $\mu\text{L}$ ；dd-H<sub>2</sub>O 补充至 50  $\mu\text{L}$ 。最优的反应条件：95  $^{\circ}\text{C}$  1 min；95  $^{\circ}\text{C}$  1 s，50  $^{\circ}\text{C}$  10 s（收集荧光信号），45 个循环（详见表 6）。

表 5 不同优化方案的超快速荧光 PCR 反应的 Ct 值

方案号	Ct-1	Ct-2	Ct-3	平均值 $\pm$ 标准差 <sup>1</sup>	评分 <sup>2</sup>
1	26.236	23.451	24.85	24.846 $\pm$ 1.393 <sup>cd</sup>	13
2	25.055	26.076	25.56	25.564 $\pm$ 0.511 <sup>de</sup>	9
3	24.844	24.308	24.6	24.584 $\pm$ 0.268 <sup>bc</sup>	14
4	22.652	22.931	22.8	22.794 $\pm$ 0.140 <sup>a</sup>	16
5	24.117	23.867	24.001	23.995 $\pm$ 0.125 <sup>b</sup>	15
6	27.376	25.962	26.67	26.669 $\pm$ 0.707 <sup>fg</sup>	4
7	26.303	26.281	26.3	26.295 $\pm$ 0.012 <sup>efg</sup>	5
8	25.682	25.39	25.54	25.537 $\pm$ 0.146 <sup>de</sup>	10
9	25.73	26.018	25.87	25.873 $\pm$ 0.144 <sup>ef</sup>	8
10	25.637	25.251	25.462	25.45 $\pm$ 0.193 <sup>de</sup>	12
11	26.166	26.09	26.13	26.129 $\pm$ 0.038 <sup>efg</sup>	6
12	27.127	26.698	26.92	26.915 $\pm$ 0.215 <sup>gi</sup>	2
13	27.175	26.611	26.895	26.894 $\pm$ 0.282 <sup>gi</sup>	3
14	25.551	25.467	25.534	25.517 $\pm$ 0.044 <sup>de</sup>	11
15	25.749	26.255	26.02	26.008 $\pm$ 0.253 <sup>ef</sup>	7
16	27.293	27.825	27.56	27.559 $\pm$ 0.266 <sup>i</sup>	1

注：1-不同字母的 Ct 值代表差异显著（ $P<0.05$ ）

2-根据荧光曲线标准且 Ct 值最小，在最佳（16 分）和最差（1 分）之间确定评分。

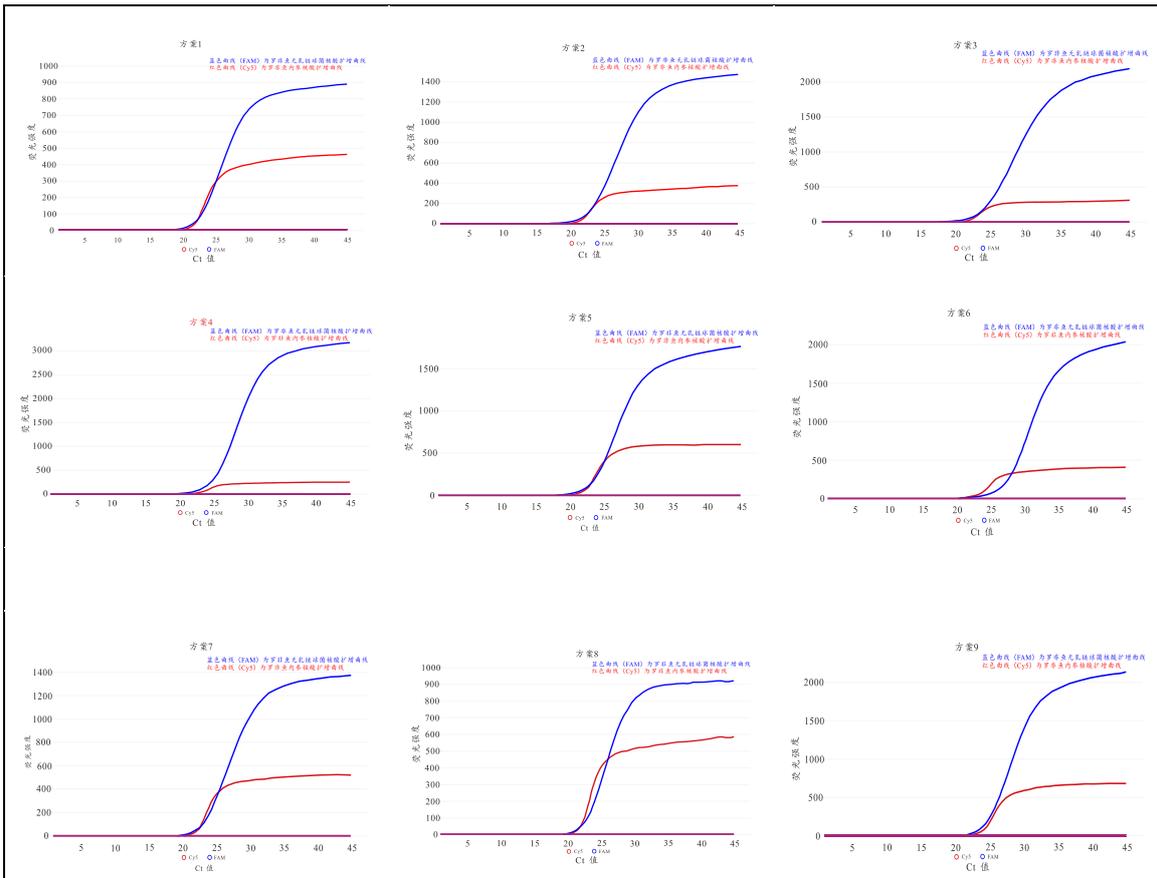
表 6 无乳链球菌超快速荧光 PCR 的反应体系和反应程序

反应体系		反应程序
组份	用量（ $\mu\text{L}$ ）	95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性，1 min ； 95 $^{\circ}\text{C}$ 、1 s，50 $^{\circ}\text{C}$ ， 10 s(收集荧光信号)（ 升降温速率 40
5 $\times$ PCR buffer	10.00	
dNTP	0.80	

	快速启动聚合酶 (5 U/ $\mu$ L)	4.00	$^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ ), 45 个循环。
无乳链球菌	F1 (10 $\mu$ mol/L)	5.00	
	R1 (10 $\mu$ mol/L)	5.00	
	P1 (10 $\mu$ mol/L)	2.00	
内参	F2 (10 $\mu$ mol/L)	3.00	
	R2 (10 $\mu$ mol/L)	3.00	
	P2 (10 $\mu$ mol/L)	1.50	
	模板	10.0	

DEPC 水

将反应体系调整至 50.0  $\mu$ L



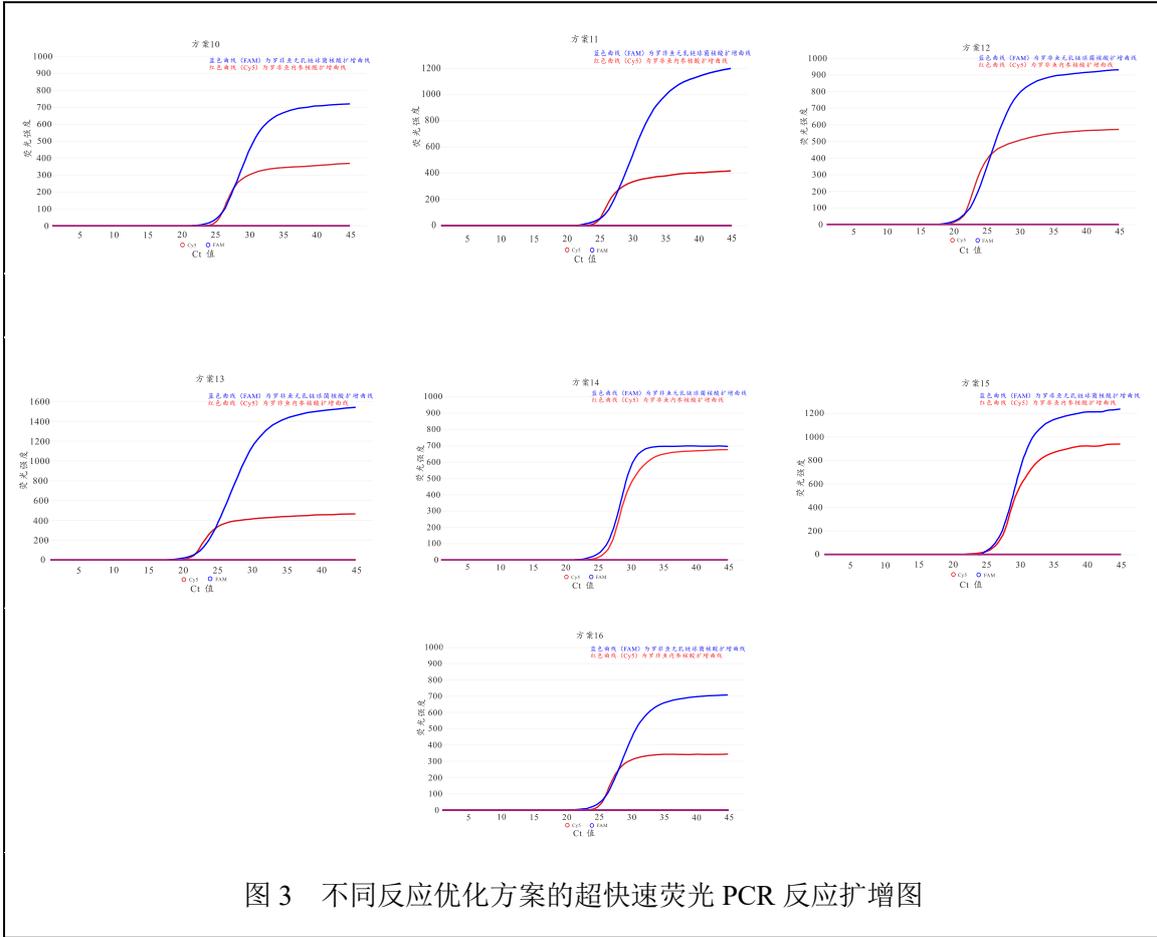


图3 不同反应优化方案的超快速荧光 PCR 反应扩增图

6、标准曲线的建立及敏感性试验

用 DEPC 水对无乳链球菌的核酸进行 10 倍梯度稀释，共设 7 个稀释度 ( $10^0 \sim 10^{-6}$ )，进行超快速荧光 PCR 方法检测，每个梯度设 3 个重复，同时设立阴性对照和空白对照，根据所得 Ct 值制作超快速荧光 PCR 和实时荧光定量 PCR 方法标准曲线，获得扩增效率 (E)、相关系数 ( $R^2$ ) 和本方法的检测下限。

以细菌数量的对数值为横坐标，超快速荧光 PCR 反应过程中样品扩增达到阈值循环数即 Ct 值为纵坐标，绘制无乳链球菌超快速荧光 PCR 反应标准曲线 (图 4)。无乳链球菌细胞数为  $3.4 \times 10^6 \sim 3.4 \times 10^0$  CFU/mL 时，得到标准曲线方程为  $y = -2.8494x + 37.837$ ， $R^2 = 0.9948$ ，有良好线性关系，且扩增效率均符合要求 (90%~110%)。

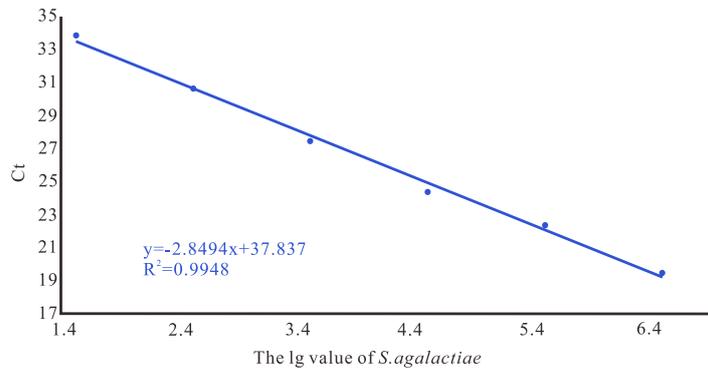


图4 无乳链球菌超快速荧光 PCR 检测方法标准曲线

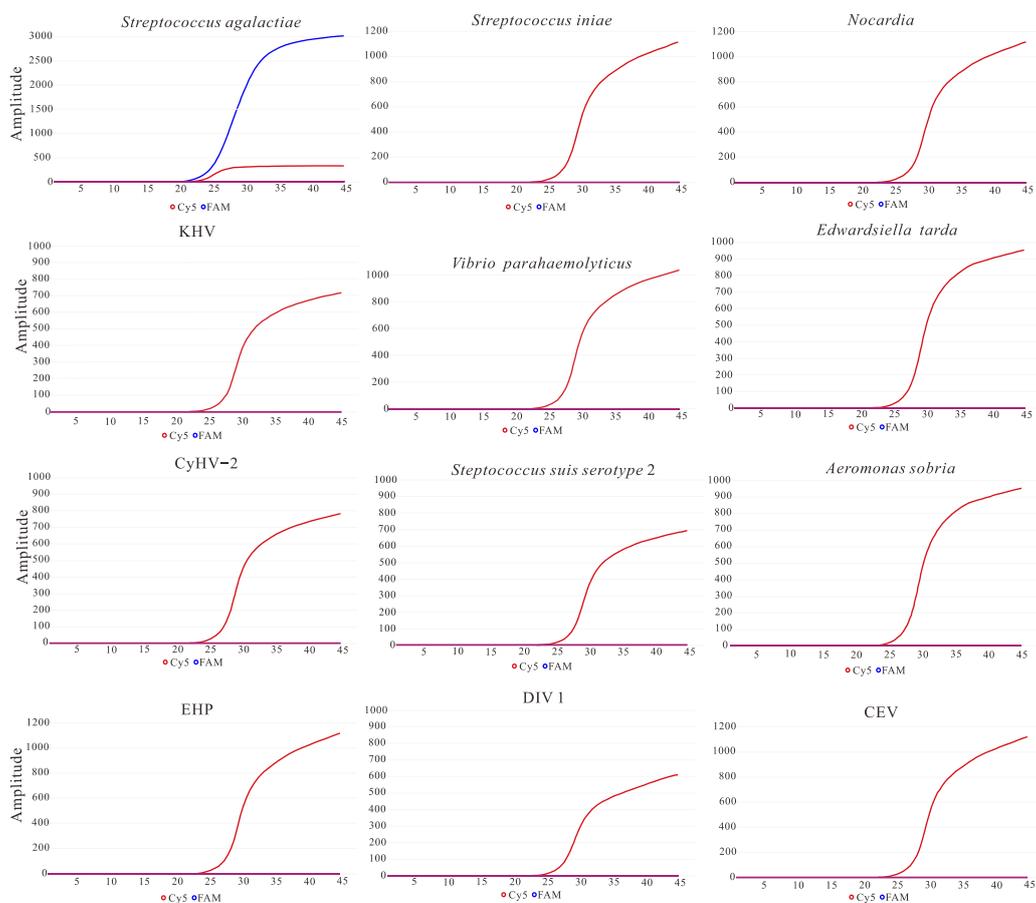
无乳链球菌菌液浓度为 34.0 CFU/mL, 可被稳定检出; 无乳链球菌菌液浓度为 3.40 CFU/mL, 未被检出。所以本标准建立的超快速荧光 PCR 检测方法中无乳链球菌最低检测限分别为 34.0 CFU/mL。根据最低检测限对应的 Ct 值确定临床样品阴、阳性判断标准: 无乳链球菌  $Ct \leq 35$ , 且有标准扩增曲线, 为阳性; 无扩增曲线或无 Ct 值或  $Ct > 40$ , 判为阴性 (详见表 7)。

表 7 无乳链球菌超快速荧光 PCR 方法敏感性试验结果

细菌量 (CFU/mL)	Ct 值	平均 Ct 值	标准差	变异系数 (%)
$3.40 \times 10^6$	19.47	19.48	0.01	0.07
	19.49			
	19.47			
$3.40 \times 10^5$	22.40	22.37	0.03	0.14
	22.36			
	22.34			
$3.40 \times 10^4$	24.42	24.36	0.07	0.29
	24.38			
	24.28			
$3.40 \times 10^3$	27.53	27.41	0.18	0.64
	27.21			
	27.49			
$3.40 \times 10^2$	30.68	30.64	0.27	0.90
	30.89			
	30.34			
$3.40 \times 10^1$	33.87	33.85	0.02	0.06
	33.83			
	33.86			
$3.40 \times 10^0$	-	-	-	-
	-			
	-			

## 7、特异性试验

同时检测无乳链球菌、海豚链球菌、猪链球菌 2 型、诺卡氏菌、迟缓爱德华氏菌、副溶血性弧菌、温和气单胞菌、十足目虹彩病毒、虾肝肠胞虫、鲤浮肿病毒、锦鲤疱疹病毒和鲫造血器官坏死病毒, 结果显示: 无乳链球菌 (FAM 通道) 有特异性扩增曲线 (图 5), 其余均未出现特异性扩增曲线, 无非特异性扩增的交叉反应。



注：蓝色曲线（FAM 通道）为无乳链球菌扩增曲线；红色曲线（Cy5 通道）为内参扩增曲线。

图 5 无乳链球菌超快速荧光 PCR 方法特异性试验结果

## 8、重复性试验

按照优化的检测方法,对 100 倍稀释的浓度核酸分别进行批内和批间重复试验(10 次重复),计算标准偏差(SD)和变异系数(CV)。试验结果显示:超快速荧光 PCR 检测无乳链球菌核酸的批内、批间重复试验变异系数分别为 0.24%、0.26% (详见表 8)。

表 8 无乳链球菌超快速荧光 PCR 方法重复性试验结果

样品	Ct 值	
	批内	批间
样品 1	24.326	24.324
样品 2	24.393	24.268
样品 3	24.296	24.301
样品 4	24.244	24.363

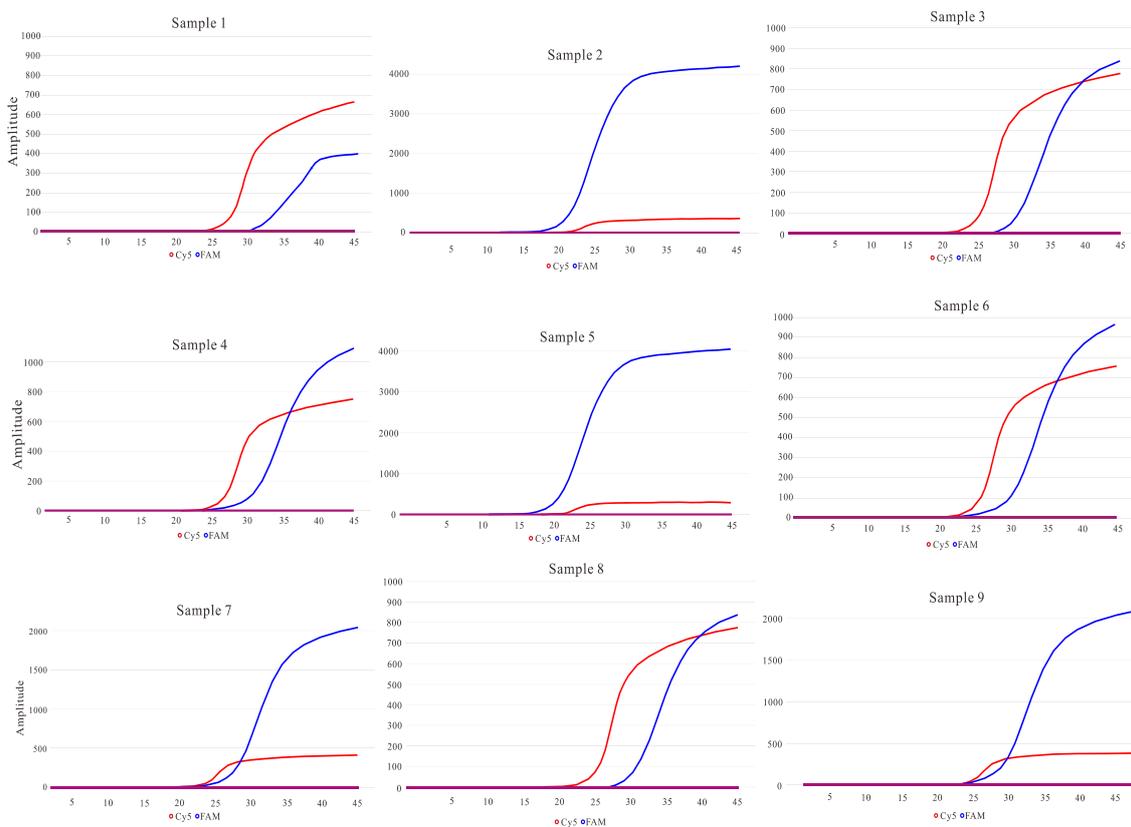
样品 5	24.262	24.185
样品 6	24.212	24.274
样品 7	24.347	24.379
样品 8	24.349	24.316
样品 9	24.256	24.35
样品 10	24.353	24.398
平均值±标准差	24.304±0.059	24.316±0.063
变异系数 (%)	0.24	0.26

### 9、临床样品检测

应用建立的超快速荧光 PCR 方法，对东莞市水产养殖场采集的 97 份临床样品（罗非鱼、四大家鱼）进行检测，同时，按照《罗非鱼链球菌病诊断规程》（SC/T 7235-2020）和《罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 检测方法》（T/GDSF 0003—2023），用细菌分离鉴定方法和实时荧光 PCR 方法进行检测。结果检出无乳链球菌阳性样品 9 份，与实时荧光 PCR 方法、细菌分离鉴定方法分离结果完全一致，符合率为 100%，表明建立的方法可应用于鱼类无乳链球菌的临床检测（表 9、图 6）。

表 9 无乳链球菌部分临床样品检测结果

样品编号	检测结果		
	超快速荧光 PCR	实时荧光 PCR	细菌分离鉴定
1	30.64	34.68	一致
2	20.68	20.31	一致
3	29.68	33.57	一致
4	26.06	28.12	一致
5	17.36	17.38	一致
6	27.74	30.24	一致
7	25.45	26.85	一致
8	28.12	31.69	一致
9	25.94	29.03	一致



注：蓝色曲线（FAM 通道）为无乳链球菌扩增曲线；红色曲线（Cy5 通道）为内参扩增曲线。

图 6 乳链球菌超快速荧光 PCR 方法临床样品特异性试验结果

#### 四、技术经济分析论证和预期的经济效益

项目组建立的鱼类无乳链球菌超快速荧光 PCR 检测方法，可以 15 分钟完成无乳链球菌核酸检测的超快速荧光 PCR 检测诊断方法，为预警和防控水产养殖样品中的鱼类链球菌病提供了新的技术手段。

#### 五、采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比

本文本所建立的鱼类无乳链球菌超快速荧光 PCR 检测方法为国内、外首创，未采用国际标准。

#### 六、与现行法律、法规、政策及相关标准的协调性

目前，关于鱼类链球菌方面的检测标准，有 1 个行业标准为《罗非鱼链球菌病诊断规程》SC/T 7235-2020；2 个地方标准分别为《罗非鱼链球菌病检测技术规程》DB46/T 280-2014、《罗非鱼无乳链球菌病双重 PCR 诊断规程》DB35/T 1354-2013；1 个团体标准《罗非鱼无乳链球菌和海豚链球菌双重荧光 PCR 检测方法》T/GDSF 003-2023。上述标准均未涉及罗非鱼无乳链球菌的超快速荧光 PCR 方法。

本标准建立的布鲁氏菌超快速荧光 PCR 方法，荧光 PCR 反应仅需 15min，加上样品前处理和核酸提取，可以在 30min 内完成检测，并且敏感性高、特异性强、重复性好，适合于临床快速诊断的需求。

#### 七、贯彻实施标准的措施和建议

本标准发布后，可以通过相关部门组织宣贯，推荐给有相应检测设施和检测项目的实验室使用，也可以委托项目起草单位或其他相关单位组织技术培训的方式推广应用本检测标准。

**八、其它应予说明的事项**

无。