

ICS 65.020.30

CCS B 44

GB/T 14926.56—2026

代替 GB/T 14926.56—2008

实验动物 狂犬病病毒检测方法

Laboratory animal—Methods for examination of Rabies virus

（征求意见稿）

2026-XX-XX 发布

2026-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局

国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

- 实验动物 沙门菌检测方法(GB/T14926.1);
- 实验动物 耶尔森菌检测方法(GB/T14926.3);
- 实验动物 皮肤病原真菌检测方法(GB/T14926.4);
- 实验动物 多杀巴斯德杆菌检测方法(GB/T14926.5);
- 实验动物 支气管鲍特杆菌检测方法(GB/T14926.6);
- 实验动物 支原体检测方法(GB/T14926.8);
- 实验动物 鼠棒状杆菌检测方法(GB/T14926.9);
- 实验动物 泰泽病原体检测方法(GB/T14926.10);
- 实验动物 大肠埃希菌 0115a,c:K(B)检测方法(GB/T14926.11);
- 实验动物 嗜肺巴斯德杆菌检测方法(GB/T14926.12);
- 实验动物 肺炎克雷伯杆菌检测方法(GB/T14926.13);
- 实验动物 金黄色葡萄球菌检测方法(GB/T14926.14);
- 实验动物 肺炎链球菌检测方法(GB/T14926.15);
- 实验动物 乙型溶血性链球菌检测方法(GB/T14926.16);
- 实验动物 绿脓杆菌检测方法(GB/T14926.17);
- 实验动物 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒检测方法(GB/T14926.18);
- 实验动物 汉坦病毒检测方法(GB/T14926.19);
- 实验动物 鼠痘病毒检测方法(GB/T14926.20);
- 实验动物 兔出血症病毒检测方法(GB/T14926.21);
- 实验动物 小鼠肝炎病毒检测方法(GB/T14926.22);
- 实验动物 仙台病毒检测方法(GB/T14926.23);
- 实验动物 小鼠肺炎病毒检测方法(GB/T14926.24);
- 实验动物 呼肠孤病毒Ⅲ型检测方法(GB/T14926.25);
- 实验动物 小鼠脑脊髓炎病毒检测方法(GB/T14926.26);

- 实验动物 小鼠腺病毒检测方法(GB/T14926.27);
- 实验动物 小鼠细小病毒检测方法(GB/T14926.28);
- 实验动物 多瘤病毒检测方法(GB/T14926.29);
- 实验动物 兔轮状病毒检测方法(GB/T14926.30);
- 实验动物 大鼠细小病毒(KRV 和 H-1 株)检测方法(GB/T14926.31);
- 实验动物 大鼠冠状病毒/延泪腺炎病毒检测方法(GB/T14926.32);
- 实验动物 无菌动物生活环境及粪便标本的检测方法(GB/T14926.41);
- 实验动物 细菌学检测 标本采集(GB/T14926.42);
- 实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂(GB/T14926.43);
- 实验动物 念珠状链杆菌检测方法(GB/T14926.44);
- 实验动物 布鲁氏菌检测方法(GB/T14926.45);
- 实验动物 钩端螺旋体检测方法(GB/T14926.46);
- 实验动物 志贺菌检测方法(GB/T14926.47);
- 实验动物 结核分枝杆菌检测方法(GB/T14926.48);
- 实验动物 空肠弯曲杆菌检测方法(GB/T14926.49);
- 实验动物 酶联免疫吸附试验(GB/T14926.50);
- 实验动物 免疫酶试验(GB/T14926.51);
- 实验动物 免疫荧光试验(GB/T14926.52);
- 实验动物 血凝试验(GB/T14926.53);
- 实验动物 血凝抑制试验(GB/T14926.54);
- 实验动物 免疫酶组织化学法(GB/T14926.55);
- 实验动物 狂犬病病毒检测方法(GB/T14926.56);
- 实验动物 犬细小病毒检测方法(GB/T14926.57);
- 实验动物 传染性犬肝炎病毒检测方法(GB/T14926.58);
- 实验动物 犬瘟热病毒检测方法(GB/T14926.59);
- 实验动物 猕猴疱疹病毒I型(B 病毒)检测方法(GB/T14926.60);
- 实验动物 猴逆转 D 型病毒检测方法(GB/T14926.61);
- 实验动物 猴免疫缺陷病毒检测方法(GB/T14926.62);

——实验动物 猴 T 淋巴细胞趋向性病毒I型检测方法(GB/T14926.63);

——实验动物 猴痘病毒检测方法(GB/T14926.64);

——实验动物 肺孢子菌检测方法(GB/T14926.65)。

本文件代替 GB/T 14926.56—2008 《实验动物 狂犬病病毒检测方法》。

与 GB/T 14926.56—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，GB/T 14926.56—2008 第 1 章）；
- b) 增加了规范性引用文件（见第 2 章）；
- c) 增加了术语和定义一章（见第 3 章）；
- d) 保留了犬抗 RABV IgG 抗体间接酶联免疫吸附试验，并参照 GB/T 14926.50—2001 调整了相关内容和结果判定框架（见 4.1、5.1.1、5.2.1、6.1 和 7.1）；
- e) 增加了实时荧光定量 RT-PCR 检测法，包括检测原理、试剂和器材、样品采集与处理、RNA 提取、扩增、质量控制、结果判定和结果报告（见 4.2、5.1.2、5.2.2、6.2、7.2 和第 8 章）；
- f) 增加了 RABV 核酸检测样品采集、生物安全、保存和运输要求（见 6.2.1 和 6.2.2）；
- g) 增加了实时荧光定量 RT-PCR 检测法反应条件（见附录 A）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国科学技术部提出。

本文件由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC 281）归口。

本文件主要起草人：王卫、冯育芳、李丹、刘忠华、向志光、王吉、余文兰、佟巍、郭智、张云科。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：GB/T 14926.56—2001、GB/T 14926.56—2008。

实验动物 狂犬病病毒检测方法

1 范围

本文件描述了狂犬病病毒（rabies virus, RABV）的检测方法。

本文件适用于犬、猫、雪貂等实验动物 RABV 核酸和血清中抗 RABV IgG 抗体的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 14926.50—2001 实验动物 酶联免疫吸附试验

GB/T 18639—2023 狂犬病诊断技术

GB/T 36789—2018 动物狂犬病病毒核酸检测方法

GB/T 43051—2023 实验动物 动物实验生物安全通用要求

GB 19489—2008 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

4.1 间接酶联免疫吸附试验原理

将 RABV 抗原包被于微孔板。待检血清中的抗 RABV IgG 与固相抗原结合后，加入适用于相应动物种属的酶标抗 IgG 抗体或其他酶标结合物；经底物显色后，测定 450 nm 处吸光度（ A_{450} ），判定抗 RABV IgG 抗体检测结果。

4.2 实时荧光定量 RT-PCR 检测法原理

提取样品 RNA 后，以 RABV N 基因保守序列为靶标，进行一步法逆转录、扩增和荧光信号采集；根据扩增曲线形态和循环阈值（Ct）判定 RABV 核酸检测结果。

5 试剂和器材

5.1 试剂

除另有规定外，所用试剂均应为分析纯或适用于分子生物学检测的试剂；水应为蒸馏水、去离子水或无核酸酶水。

5.1.1 间接酶联免疫吸附试验检测试剂

5.1.1.1 RABV 抗原。

5.1.1.2 正常抗原。

5.1.1.3 相应动物种属的 RABV 阳性和阴性对照血清。

5.1.1.4 相应动物种属的酶标抗 IgG 抗体或其他酶标结合物。

5.1.1.5 包被缓冲液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、TMB 显色液和终止液。包被缓冲液为 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液（pH 9.6）；洗涤液为含 0.05%吐温-20 的 0.01 mol/L PBS（pH 7.2~7.4）；终止液为 0.5 mol/L 硫酸溶液。

5.1.1.6 适用于相应动物种属的商品化 RABV IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒。

5.1.2 实时荧光定量 RT-PCR 检测试剂

5.1.2.1 RNA 提取或纯化试剂。

5.1.2.2 一步法实时荧光定量 RT-PCR 试剂。

5.1.2.3 RABV RNA 阳性标准品、阴性对照和无模板对照。

5.1.2.4 RABV N 基因引物和荧光探针，序列见表 1。

表 1 RABV N 基因引物和荧光探针序列

名称	序列（5'→3'）	标记说明
上游引物 F	CCCTACAATGGATGCCGAC	RABV N 基因
下游引物 R	AGCTTGGCAGCATTCA TRCC	RABV N 基因
荧光探针 P	AGTCAATAATCAGGTGGTCTC	5'-FAM； 3'-TAMRA

注：R 表示 A 或 G。

5.2 器材

5.2.1 间接酶联免疫吸附试验检测器材

5.2.1.1 酶标仪，具有 450 nm 波长检测功能。

5.2.1.2 37 °C 恒温培养箱或水浴箱。

5.2.1.3 微孔板洗板机或等效设备。

5.2.1.4 移液器。

5.2.2 实时荧光定量 RT-PCR 检测器材

5.2.2.1 实时荧光定量 PCR 仪，应具备与荧光探针相匹配的检测通道。

5.2.2.2 微量离心机、涡旋混匀器和移液器。

5.2.2.3 低温保存设备。

5.2.2.4 PCR 反应管。

6 检测方法

6.1 间接酶联免疫吸附试验（ELISA）

6.1.1 样品制备

采集受检动物血液，分离血清。对溶血、污染或脂血血清，应记录样品状态；不能及时检测时，按经确认的保存条件保存，避免反复冻融。

6.1.2 检测和结果判定

样品处理、微孔板包被、加样、温育、洗涤、酶结合物反应、吸光度测定、试验有效性判定和复检应按 GB/T 14926.50—2001 的规定进行。以 RABV 抗原包被微孔板，以正常抗原包被微孔板作为对照；待检血清按 1：10 稀释。每板应同时设置空白对照、阳性对照血清和阴性对照血清。显色液制备及显色步骤按 GB/T 14926.56—2008 的规定执行，即加入 TMB 显色液后，于 37 °C 避光显色 10 min，加入终止液终止反应后，以空白对照孔调零，于 450 nm 测定 A_{450} 。使用商品化 RABV IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒时，按说明书操作和判定。

6.2 实时荧光定量 RT-PCR 检测法

6.2.1 采样生物安全

RABV 样品采集、保存、运输、接收、消毒和废弃物处置应在风险评估的基础上进行，并符合 GB/T 18639—2023、GB/T 36789—2018、GB 19489—2008 和 GB/T 43051—2023 的有关规定。

采样人员应按规定完成狂犬病暴露前免疫，并经培训合格后方可从事采样操作。采样时应采取防咬伤、抓伤、锐器伤和气溶胶暴露措施，并配备与风险相适应的防护服、呼吸防护用品、眼面部防护用品和手套。

对疑似或确诊 RABV 感染动物实施安乐死、尸体剖检、开颅和脑组织采集等操作，应在生物安全三级（BSL-3）实验室内进行；活体动物唾液或口腔拭子采集应在生物安全二级（BSL-2）实验室或符合相应生物安全防护要求的场所进行。

发现疑似或确诊 RABV 感染动物时，按国家规定向所在地农业农村主管部门或动物疫病预防控制机构报告。

样品应采用防渗漏容器密封并清晰标识，外包装表面消毒后转运。采样完成后，应对操作区域、器具及可能受污染物品进行消毒；感染性废弃物应按有关规定处置。

6.2.2 样品制备

死亡动物宜采集脑组织；活体动物可采集唾液或口腔拭子。样品应按经确认的条件保存和运输，并避免反复冻融。

6.2.3 RNA 提取

应按 RNA 提取试剂说明书或经确认的方法提取 RNA。每批提取应至少设置阳性提取对照和提取阴性对照。RNA 宜即提即检；不能立即检测时，应在不高于-70 °C 条件下保存。

6.2.4 扩增

按附录 A 规定的反应体系和扩增程序进行检测。每批检测应同时设置 RABV RNA 阳性扩增对照、提取阴性对照和无模板对照。每份样品至少设置 2 个平行反应孔。

6.2.5 扩增曲线判读

典型扩增曲线应呈 S 形，基线平稳，指数期明显。非典型曲线、明显基线漂移或噪声曲线不得用于结果判定。

7 结果判定

7.1 间接酶联免疫吸附试验（ELISA）结果判定

7.1.1 阳性对照血清和阴性对照血清结果符合预期时，试验成立。

7.1.2 在试验成立的条件下，同时符合下列条件的待检血清，判为抗 RABV IgG 抗体阳性：

7.1.2.1 待检血清与 RABV 抗原和正常抗原反应有明显颜色区别；

7.1.2.2 待检血清与 RABV 抗原反应的 $A_{450} \geq 0.2$ ；

7.1.2.3 待检血清与 RABV 抗原反应的 A_{450} 与阴性对照血清和 RABV 抗原反应的 A_{450} 的比值 ≥ 2.1 。

7.1.3 阳性检测结果应采用同一方法复检；复检结果仍为阳性时，判定为抗 RABV IgG 抗体阳性。

7.1.4 使用商品化 RABV IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒时，按说明书判定。

7.2 实时荧光定量 RT-PCR 检测法结果判定

7.2.1 质量控制结果应符合下列要求：RABV RNA 阳性扩增对照、检出限附近阳性质量控制材料和阳性提取对照应出现典型 S 形扩增曲线；提取阴性对照和无模板对照不应出现典型扩增曲线。任一质量控制结果不符合要求时，本批检测结果无效。

7.2.2 在质量控制符合要求时，出现典型 S 形扩增曲线且 $C_t \leq 33$ 的反应孔，判为 RABV 核酸阳性；未出现 C_t 值或出现典型 S 形扩增曲线且 $C_t > 37$ 的反应孔，判为 RABV 核酸阴性；出现典型 S 形扩增曲线且 $33 < C_t \leq 37$ 的反应孔，判为疑似阳性。

7.2.3 两个平行反应孔均为阳性时，判为 RABV 核酸阳性；均为阴性时，判为 RABV 核酸阴性。任一反应孔判为疑似阳性，或两个平行反应孔结果不一致时，应从原始样品重新提取 RNA 进行复检。复检结果仍为疑似阳性或不一致时，应采用其他经确认的方法复核，必要时重新采集样品。

8 结果报告

根据判定结果，出具报告。

附录 A

(规范性)

实时荧光定量 RT-PCR 检测法反应条件

A.1 实时荧光定量 RT-PCR 检测法反应体系

表 A.1 给出了 20 μL 参考反应体系。使用不同反应试剂、仪器或反应总体积时，应对方法适用性进行确认。

表 A.1 实时荧光定量 RT-PCR 参考反应体系

组分	终浓度或用量
一步法实时荧光定量 RT-PCR 反应试剂	按说明书
上游引物 F (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8 μL (终浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$)
下游引物 R (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8 μL (终浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$)
荧光探针 P (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4 μL (终浓度 0.2 $\mu\text{mol/L}$)
RNA 模板	1.0 μL
无核酸酶水	补足至 20 μL

A.2 扩增程序

55 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 45 个循环, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 阶段采集荧光信号。