

# 国家标准

## 《实验动物 狂犬病病毒检测方法》

### 编制说明

联系人：王卫

联系电话：13811334494

编制单位：中国医学科学院医学实验动物研究所

编制时间：2026 年 9 月

# 国家标准《实验动物 狂犬病病毒检测方法》编制说明

## 一、工作简况，包括任务来源、协作单位

（一）任务来源。TC281 项目，任务编号 20260676-T-306。

（二）牵头单位。中国医学科学院医学实验动物研究所。

（三）协作单位。中国食品药品检定研究院、华南农业大学。

## 二、主要工作过程，标准主要起草人及其所做的工作

中国医学科学院医学实验动物研究所会同协作单位组建标准修订工作组，按照 GB/T 1.1-2020 的规定制定工作方案，开展资料调研、方法论证、文本起草和第三方验证，形成征求意见稿及本编制说明。

2026 年 1 月 28 日，标准修订任务正式下达。接到任务后，编写组经研究讨论，确定本轮 GB/T 14926 系列标准的修订方向：GB/T 14926.56-2008《实验动物 狂犬病病毒检测方法》在保留原有检测方法的基础上，新增灵敏度和特异性较高的实时荧光定量 PCR 检测方法。同时，成立由主要起草人组成的狂犬病病毒（RABV）检测方法标准修订工作组，负责标准修订的组织协调、技术研究和文本起草等工作。

2026 年 1 月-5 月，组建修订组，并组织修订工作组对新增方法进行资料调研及深入讨论，确定将实时荧光定量 RT-PCR 作为 RABV 新增检测方法，逐步确定引物、探针序列及检测步骤，并开始标准文本起草工作。

2026 年 5 月 12 日，参加实验动物检测标准修订进度汇报与方案评审会。会议对相关病原检测标准修订方案进行了评审，明确以实时荧光定量 PCR 作为核酸检测的主要技术路线，并部署了征求意见稿提交前的第三方验证、样本库建设等工作，计划于 8 月形成并提交征求意见稿。

2026 年 6 月 24 日，参加 GB/T 14926 系列标准修订研讨会。会议明确了系列标准修订中检测对象的物种适用范围及方法验证要求；各起草组汇报了泰泽菌、弓形虫等病原检测方法的验证进展，并就标准管理系统录入、征求意见稿提交等工作明确了时间节点和具体要求。

2026年7月-8月，组织开展新增检测方法的第三方验证。验证工作由4家单位分别实施，相关结果在本说明第六部分统一汇总。

2026年8月31日，起草组专家召开线上会议，就专家提出的修改意见进行讨论，并确定3天内修改完成，形成征求意见稿。

### 三、标准编写背景

狂犬病病毒（rabies virus, RABV）可感染多种哺乳动物。实验动物的 RABV 监测关系到实验动物质量、从业人员职业暴露防护和实验活动的生物安全。

GB/T 14926.56-2008 以犬抗 RABV IgG 抗体间接酶联免疫吸附试验（ELISA）为主要检测方法。血清学检测适用于动物群体抗体监测，但不能直接反映样品中 RABV 核酸；在感染早期或抗体应答不足时，宜结合病原学方法进行判定。

实时荧光定量 RT-PCR 具有靶标明确、灵敏、快速和便于质量控制的特点，已被国内外狂犬病实验室诊断技术文件采用。基于此，本次修订在保留原 ELISA 方法及其判定框架的基础上，增加靶向 RABV N 基因的一步法实时荧光定量 RT-PCR 方法，以满足实验动物 RABV 核酸检测需要。

### 四、标准编制原则

（一）科学性。以 RABV 流行病学、实验室诊断和方法学验证资料为依据，选择 N 基因保守序列作为核酸检测靶标，并设置完整的过程质量控制。

（二）连续性。保留 GB/T 14926.56-2008 中的间接 ELISA 方法及其结果判定框架；ELISA 操作格式参照 GB/T 14926.50-2001，显色和终止条件与原标准保持衔接。

（三）适用性。新增一步法实时荧光定量 RT-PCR，给出参考反应体系、扩增程序和复检规则；允许使用经确认的等效试剂和仪器。

（四）安全性。对采样、个人防护、样品转运、消毒和废弃物处置提出要求，并对疑似或确诊感染动物尸体剖检和脑组织采集明确相应生物安全条件。

### 五、确定国家标准主要内容的论据及新旧标准对比

#### 1. 范围

GB/T 14926.56-2008 仅规定实验用犬血清中抗 RABV IgG 抗体的间接 ELISA，未包括 RABV 核酸检测。

鉴于犬、猫和雪貂等均对 RABV 易感且存在传播及人员暴露风险，本次修订将适用对象扩展至犬、猫、雪貂等实验动物，检测内容扩展为 RABV 核酸及血清中抗 RABV IgG 抗体。标准方法由单一血清学检测调整为“抗体检测+核酸检测”：保留间接 ELISA 用于抗 RABV IgG 抗体检测，新增实时荧光定量 RT-PCR 用于 RABV 核酸检测。两类方法分别适用于免疫状态评价和 RABV 核酸检出，可提高标准的适用性和检测时效性。

## **2. 检测原理、主要试剂与器材**

间接 ELISA 以 RABV 抗原包被微孔板，检测血清中抗 RABV IgG 抗体；实时荧光定量 RT-PCR 以 RABV N 基因保守序列为靶标，检测 RABV 核酸。

GB/T 14926.56-2008 仅规定 ELISA 相关试剂和器材。本次修订保留 ELISA 基本试剂、对照血清和酶标仪等要求，新增 RNA 提取试剂、一步法 RT-PCR 试剂、核酸质量控制材料及实时荧光定量 PCR 仪等要求。适用动物种类扩展后，ELISA 酶结合物应经相应种属适用性验证。

## **3. 引物、探针及扩增条件**

新增方法采用 RABV N 基因保守区引物和荧光探针。标准规定参考反应体系和扩增程序；使用不同试剂、仪器或反应总体积时，应进行适用性确认。

GB/T 14926.56-2008 未规定核酸检测引物、探针和扩增条件。本次修订补充上述技术参数，以保证方法的可实施性和结果可比性。

## **4. 样品、质量控制和结果判定**

抗体检测采用血清；核酸检测中，死亡动物采集脑组织，活体动物可采集唾液或口腔拭子。核酸检测应设置阳性提取对照、提取阴性对照、阳性扩增对照、检出限附近阳性质量控制材料和无模板对照；每份样品至少设置 2 个平行反应孔。

质量控制符合要求时，典型 S 形扩增曲线且  $Ct \leq 33$  判为阳性；无  $Ct$  值或  $Ct > 37$  判为阴性； $33 < Ct \leq 37$  判为疑似阳性。疑似阳性或平行孔结果不一致时，应重新提取 RNA 复检；仍不能判定时，应采用其他经确认的方法复核。

GB/T 14926.56-2008 主要规定 ELISA 对照和抗体判定。本次修订增加核酸检测样品、全过程质量控制及复核要求。

## 5. 结果报告

检测报告应至少包括样品信息、检测方法、检测结果、检测日期、检测机构和检测人员。抗体结果应表述为“抗 RABV IgG 抗体阳性”或“抗 RABV IgG 抗体阴性”；核酸结果应表述为“RABV 核酸阳性”“RABV 核酸阴性”或“需复核”。

本次修订增加核酸检测结果及复核状态的报告要求，明确区分抗体和核酸检测结果。

## 6. 新旧标准主要技术内容对比

| 项目      | GB/T 14926.56-2008 | 本次修订稿                       |
|---------|--------------------|-----------------------------|
| 适用对象    | 实验用犬               | 犬、猫、雪貂等实验动物                 |
| 检测内容    | 血清中抗 RABV IgG 抗体   | RABV 核酸及血清中抗 RABV IgG 抗体    |
| 检测方法    | 间接 ELISA           | 间接 ELISA 和实时荧光定量 RT-PCR     |
| 核酸检测    | 未规定                | 增加引物、探针、反应条件、质量控制、结果判定和复核要求 |
| 生物安全与复核 | 未系统规定核酸检测相关要求      | 增加采样生物安全、样品转运和疑似结果复检/复核要求   |

## 六、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证及预期经济效益

### 1. RT-qPCR 检测方法的建立

### 1.1 RNA 模板制备与浓度测定

采用 FineMag 磁珠法动物病毒 RNA 快速提取试剂盒（安捷伦，CAT# Animal Y503-G20）提取狂犬病病毒 CVS-11 株样本 RNA。

### 1.2 候选引物/探针组初筛

选取 LN34、GB/T 18639-2023、LysGT1、LysGT5、LysGT6 及 Hoffmann 等报道的泛丽沙病毒多重引物/探针组进行比较。以 CVS-11 株样本 RNA 为模板，采用 QuantiTect Probe RT-PCR Kit 和 HiScript III U+ One Step qRT-PCR Probe Kit 开展检测。各候选引物/探针组的反应体系中，上、下游引物工作液浓度均为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，每反应各加入 0.8  $\mu\text{L}$ ，终浓度均为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ ；荧光探针工作液浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，每反应加入 0.4  $\mu\text{L}$ ，终浓度为 0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。

表 5 候选 RABV 及泛丽沙病毒引物/探针组信息

| 引物/探针组               | 靶标及引物/探针序列 (5' →3' )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 扩增长度      | 来源及主要用途                                                            |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------|
| LN34<br>(TaqMan-LNA) | leader-N<br>Forward primer 1:<br>ACGCTTAACAACCAGATCAAAGAA<br>Forward primer 2:<br>ACGCTTAACAACAAAATCADAGAA<br>G<br>Reverse primer:<br>CMGGGTAYTTRTAYTCATAYTGRTC<br>Probe LN34: FAM-<br>AACACCYCTACAATGGA-TRAMA<br>Probe LN34a: FAM-<br>AAC+ACCYC+T+ACA+A+TGGA-<br>TRAMA<br>Probe LN34m: FAM-<br>ACACCYCTACAATGGAT-TRAMA<br>Probe LN34Lagos: FAM-<br>AACACTACTACAATGGA-TRAMA | 165<br>bp | Wadhwa 等,<br>2017;<br>WO2017200790<br>A1。用于 RABV<br>及其他丽沙病毒<br>检测。 |
| GB/T 18639-<br>2023  | N 基因<br>F: CCCTACAATGGATGCCGAC<br>R: AGCTTGGCAGCATTTCATGCC<br>P: FAM-<br>AGTCAATAATCAGGTGGTCTC-<br>TRAMA                                                                                                                                                                                                                                                                    | -         | GB/T 18639-2023<br>第 10 章。用于<br>狂犬病病毒实时<br>荧光 RT-PCR 检<br>测。       |
| LysGT1               | N 基因<br>JW12: ATGTAACACCYCTACAATG<br>N165-146:<br>GCAGGGTAYTTRTACTCATA<br>LysGT1 probe: FAM-<br>ACAAGATTGTATTCAAAGTCAATAA<br>TCAG-TRAMA                                                                                                                                                                                                                                     | 111<br>bp | Wakeley 等,<br>2005。用于基因<br>1 型 RABV 检<br>测。                        |
| LysGT5               | N 基因<br>JW12: ATGTAACACCYCTACAATG<br>N165-146:<br>GCAGGGTAYTTRTACTCATA<br>LysGT5 probe: FAM-<br>AACARGGTTGTTTTYAAGGTCCATA<br>A-TRAMA                                                                                                                                                                                                                                        | 111<br>bp | Wakeley 等,<br>2005。用于<br>EBLV-1 (基因 5<br>型) 检测。                    |

| 引物/探针组                    | 靶标及引物/探针序列（5' →3' ）                                                                                                                                        | 扩增长度                  | 来源及主要用途                                       |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|
| LysGT6                    | N 基因<br>JW12: ATGTAACACCYCTACAATG<br>N165-146:<br>GCAGGGTAYTTRTACTCATA<br>LysGT6 probe: FAM-<br>ACARAATTGTCTTCAARGTCCATAA<br>TCAG-TRAMA                    | 111<br>bp             | Wakeley 等,<br>2005。用于<br>EBLV-2（基因 6<br>型）检测。 |
| Hoffmann 泛<br>丽沙病毒多<br>重组 | N 基因<br>RABV1-forward:<br>GATCCTGATGAYGTATGTTTCCTA。<br>RABV1-reverse:<br>RGATTCCGTAGCTRGTTCCA。<br>RABV1-probe: FAM-<br>CAGCAATGCAGTTYTTTGAGGGGAC<br>-TRAMA | 约<br>80~<br>100<br>bp | Hoffmann 等,<br>2010。用于泛丽<br>沙病毒多重监<br>测。      |

表 6 候选 RABV 引物/探针组初筛结果

| 引物/探针组                | Ct 值         | RABV 检测结果 |
|-----------------------|--------------|-----------|
| LN34                  | Undetermined | 阴性        |
| GB/T 18639-2023       | 27.57、26.98  | 阳性        |
| LysGT1                | Undetermined | 阴性        |
| LysGT5                | Undetermined | 阴性        |
| LysGT6                | Undetermined | 阴性        |
| Hoffmann 泛丽沙病毒多重<br>组 | 21.58、21.50  | 阳性        |

### 1.3 不同步骤试剂盒的适配性比较

在初筛基础上，选取 GB/T 18639-2023 和 Hoffmann 泛丽沙病毒多重引物/探针组，分别采用 4 种一步法 RT-qPCR 试剂盒进行比较。

表 7 不同步骤试剂盒与两组引物/探针的适配性比较结果

| 一步法 RT-qPCR 试剂                             | 引物/探针组            | Ct 值        | RABV 检测结果 |
|--------------------------------------------|-------------------|-------------|-----------|
| QuantiTect Probe RT-PCR Kit                | GB/T 18639-2023   | 25.47、25.35 | 阳性        |
| QuantiTect Probe RT-PCR Kit                | Hoffmann 泛丽沙病毒多重组 | 19.32、19.57 | 阳性        |
| HiScript III U+ One Step qRT-PCR Probe Kit | GB/T 18639-2023   | 19.90、20.18 | 阳性        |
| HiScript III U+ One Step qRT-PCR Probe Kit | Hoffmann 泛丽沙病毒多重组 | 16.62、15.68 | 阳性        |
| TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix        | GB/T 18639-2023   | 18.19、18.07 | 阳性        |
| TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix        | Hoffmann 泛丽沙病毒多重组 | 13.91、13.52 | 阳性        |
| TaqMan RNA-to-CT 1-Step Kit                | GB/T 18639-2023   | 21.55、21.28 | 阳性        |
| TaqMan RNA-to-CT 1-Step Kit                | Hoffmann 泛丽沙病毒多重组 | 16.35、15.22 | 阳性        |

#### 1.4 GB/T 18639-2023 引物/探针组的样本检测验证

采用 HiScript III U+ One Step qRT-PCR Probe Kit，对 CVS-11 株阳性对照 RNA、3 份样本 RNA、阴性血清 RNA 和水对照进行检测，评价所选引物/探针组的样本检测表现。

表 8 GB/T 18639-2023 引物/探针组的样本检测结果

| 样本名称 | Ct 值         | RABV 检测结果 |
|------|--------------|-----------|
| 阳性对照 | 17.23        | 阳性        |
| 样本 1 | 18.30        | 阳性        |
| 样本 2 | 23.36        | 阳性        |
| 样本 3 | 22.23        | 阳性        |
| 阴性血清 | Undetermined | 阴性        |
| 水对照  | Undetermined | 阴性        |

## 2. 结果

6 组候选引物/探针组中，GB/T 18639-2023 组和 Hoffmann 泛丽沙病毒多重组均检出 RABV 阳性，其余 4 组未见特异性扩增；阴性血清和水对照均为 Undetermined。

## 3. 结论

综合引物/探针初筛、4 种一步法 RT-qPCR 试剂盒适配性比较及样本检测验证结果，GB/T 18639-2023 引物/探针组具有稳定的检出表现，并与现行动物狂犬病诊断技术标准相衔接，确定为本文档实时荧光定量 RT-PCR 的参考引物/探针组。

#### 4. 四家验证单位验证报告

新增方法由 4 家第三方单位采用统一 RABV N 基因引物/探针组开展独立验证。各单位阳性样品均检出 RABV 核酸，阴性样品、阴性对照或无模板对照均未见特异性扩增，定性结果与样品预期一致。不同单位采用的样品面板和试剂体系不同，故不合并计算 Ct 值均值和变异系数。验证结果见表 9。

表 9 四家验证单位验证结果汇总

| 验证单位            | 一步法 RT-qPCR 试剂                              | 阳性 Ct 值        | 阴性/对照结果                     | 验证结论        |
|-----------------|---------------------------------------------|----------------|-----------------------------|-------------|
| 广东省实验动物监测中心     | HiScript III U+ One Step qRT-PCR Probe Kit。 | 3 份阳性。         | 1 份阴性。                      | 与预期一致。      |
| 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 | HiScript III U+ One Step qRT-PCR Probe Kit。 | 24.527~27.248。 | 阴性样品：Undetermined。          | 与预期一致。      |
| 杭州医学院           | HiScript III U+ One Step qRT-PCR Probe Kit。 | 21.70~25.97。   | NEG、NTC 均为 N/A。             | 与预期一致。      |
| 中国食品药品检定研究院     | GoTaq Probe 1-Step RT-PCR System (Promega)。 | 18.842~29.765。 | 3 份阴性样品和 N 均为 Undetermined。 | 与预期一致。      |
| 汇总              | 4 家单位独立验证。                                  | 所有阳性结果均正确检出。   | 8 项阴性/对照均正确判定。              | 定性符合率 100%。 |

#### 5. 预期经济效益

5.1 本文件在保留原有间接 ELISA 的基础上增加 RABV 核酸检测方法，为实验动物生产、使用和质量检测机构提供血清学与核酸检测两类方法选择，提升实验用犬 RABV 检测的针对性和时效性。

5.2 新增方法采用常规实时荧光定量 PCR 平台即可实施，不需要专用定制设备；一步法 RT-qPCR 减少操作环节，有助于缩短检测时间并降低交叉污染风险。

5.3 标准实施后，有利于提高实验用犬 RABV 监测结果的可比性和可追溯性，为实验动物质量控制和生物安全管理提供技术支撑。

## 七、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

本文件未采用国际标准。编制过程中参考 WHO 《Laboratory techniques in rabies》和 WOAHA 《陆生动物诊断试验和疫苗手册》中有关狂犬病实验室诊断、分子检测和质量控制的技术原则。WOAHA 已将常规 PCR 和实时 PCR 等分子方法纳入狂犬病实验室诊断方法。经比对，未见与本文件适用对象、间接 ELISA 与实时荧光定量 RT-PCR 组合及结果判定规则完全对应的国际标准。本文件在保留我国原有实验动物血清学检测方法的基础上，增加 RABV 核酸检测方法，技术内容与国际实验室诊断原则相衔接。

## 八、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

本文件与现行法律、法规和强制性标准不冲突。文件中生物安全相关要求与 GB 19489-2008、GB/T 43051-2023 相衔接。

## 九、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

## 十、标准作为强制性标准或推荐性标准的建议

建议作为推荐性国家标准发布。

## 十一、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）

无

## 十二、废止现行有关标准的建议

本文件发布实施后，代替 GB/T 14926.56-2008。

## 十三、其他应予说明的事项

无。