



中华人民共和国国家标准

GB/T 18639—2023

代替 GB/T 18639—2002

狂犬病诊断技术

Diagnostic techniques for rabies

2023-11-27 发布

2024-06-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 临床诊断	2
6 样品采集、保存和运输	2
7 直接免疫荧光检测(DFA)	3
8 直接快速免疫组化检测(dRIT)	3
9 巢式 RT-PCR 检测	5
10 实时荧光 RT-PCR 检测	6
11 实时荧光重组酶聚合酶扩增(RT-RPA)检测	7
12 细胞培养物病毒分离检测	8
13 小鼠脑内接种病毒分离检测	10
14 综合判定	10
附录 A (规范性) 狂犬病诊断检测的生物安全措施	12
附录 B (规范性) 试剂配制	13
附录 C (资料性) 狂犬病病毒阳性和阴性脑组织制备	14
附录 D (资料性) 狂犬病病毒实时荧光 RT-RPA 检测及结果判定参照图	15

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。

本文件代替 GB/T 18639—2002《狂犬病诊断技术》，与 GB/T 18639—2002 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了本文件所列各项诊断方法的适用范围(见第 1 章,2002 年版的第 1 章)；
- 增加了缩略语(见第 4 章)；
- 增加了临床诊断(见第 5 章)；
- 删除了“内基氏小体检查”(见 2002 年版的第 2 章)；
- 增加了直接快速免疫组化检测(见第 8 章)、巢式 RT-PCR 检测(见第 9 章)、实时荧光 RT-PCR 检测(见第 10 章)和实时荧光重组酶聚合酶扩增(RT-RPA)检测(见第 11 章)4 种检测方法；
- 将检测操作细化为细胞培养物病毒分离检测和小鼠脑内接种病毒分离检测(见第 12 章、第 13 章,2002 年版的第 4 章)；
- 增加了综合判定(见第 14 章)；
- 增加了狂犬病诊断检测的生物安全措施(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农业农村部提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所。

本文件主要起草人：扈荣良、张守峰、缪发明、陈腾、王晓虎、张菲、王颖、罗胜军、蒋依倩、米立娟。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2002 年首次发布为 GB/T 18639—2002。
- 本次为第一次修订。

引 言

作为病死率几乎 100% 的病毒性传染病,狂犬病的最终确诊依赖实验室诊断技术。

自 GB/T 18639—2002 首次颁布以来,狂犬病的实验室诊断技术不断发展。基于直接免疫荧光检测(DFA)的抗原检测方法被世界卫生组织(WHO)和世界动物卫生组织(WOAH)确定为“金标准”;通过对病毒核酸进行特异性扩增实现感染诊断的 RT-PCR 和实时荧光 RT-PCR 技术得到广泛应用;检测神经组织内病毒抗原的快速免疫组化检测(dRIT)获得 WHO 推荐;基于等温扩增的重组酶-聚合酶扩增技术(RPA)也在近几年获得大量应用。上述检测方法与 GB/T 18639—2002 规定的病毒分离技术共同成为当前狂犬病实验室诊断的常用和可靠方法,并在 WOAH《陆生动物诊断试验和疫苗手册》和 WHO《狂犬病实验室技术》中列举和推荐。同时,GB/T 18639—2002 第 2 章中基于组织病理学技术的内基氏小体(negri bodies)检查,因敏感性不高逐渐被淘汰。

我国卫生疾控、动物疫控、动物检疫和科研机构同步开展了上述狂犬病实验室诊断技术研究,目前已被广泛应用,相关设备和配套检测试剂均有稳定供应。基于上述进展,参考 WHO 和 WOAH 推荐技术,结合我国实际情况和相关研究成果对 GB/T 18639—2002 进行修订,旨在规范我国动物狂犬病诊断和检疫方法,提高检测水平,以有效指导防控措施的实施,保证人畜健康和安安全,并为我国逐步实现犬传播的狂犬病消除发挥积极作用。

本文件所列核酸扩增引物和探针序列均为通过对国内狂犬病流行毒株序列的综合分析设计获得,并经过大量试验验证,其检测敏感度和特异性均不低于国际组织推荐的引物和探针序列。另外,狂犬病中和抗体检测是动物免疫效果评估的重要手段,通常不用于动物狂犬病诊断,因此未列入本文件。

狂犬病诊断技术

1 范围

本文件描述了动物狂犬病诊断的临床诊断、样品采集、保存和运输、直接免疫荧光检测(DFA)、直接快速免疫组化检测(dRIT)、巢式 RT-PCR 检测、实时荧光 RT-PCR 检测、实时荧光重组酶聚合酶扩增(RT-RPA)检测、细胞培养物病毒分离检测、小鼠脑内接种病毒分离检测和综合判定的方法。

本文件适用于动物检疫、疫病监测和流行病学调查时的狂犬病诊断。

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)适用本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 34740—2017 动物狂犬病直接免疫荧光诊断方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AEC:3-氨基-9-乙基咔唑(3-Amino-9-Ethylcarbazole)

BHQ-dT:黑洞淬灭荧光标记的胸腺嘧啶脱氧核苷酸(Deoxythymidine nucleoside carrying a black-hole quencher 1)

Ct:循环阈值(Cycle threshold)

DFA:直接免疫荧光检测(Direct immunofluorescence assay)

DMEM:Dulbecco's 改良 eagle 培养基(Dulbecco's modified eagle medium)

DMF:*N,N*-二甲基甲酰胺(*N,N*-Dimethylformamide)

dNTP:脱氧核糖核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside triphosphate)

dRIT:直接快速免疫组化检测(Direct rapid immunohistochemical test)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetic acid)

FAM:羧基荧光素(Carboxyfluorescein)

FAM-dT:羧基荧光素标记的胸腺嘧啶脱氧核苷酸(Deoxythymidine nucleoside derivated with the fluorophore FAM)

FITC:异硫脲酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate)

HRP:辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)