SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4087—2014

狂犬病检疫技术规范

Quarantine protocol for rabies

2014-11-19 发布　　2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

网站www.cnfw315.com
电话4000982315
刮涂层 查真伪

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中国兽医药品监察所、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：高志强、李宁、高峰、张伟、张鹤晓、吴晓薇、刘环、马贵平、朱事康、谷强、蒲静、乔彩霞、张利峰、汪琳、凌凤俊、尹羿。

狂犬病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了狂犬病病毒分离鉴定，血清学检测及核酸检测的技术方法。

本标准适用于狂犬病的检验检疫。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 19489 实验室 生物安全通用要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CNS：中枢神经系统(Central nervous system)

cDNA：互补 DNA(Complementary DNA)

DEPC：焦碳酸二乙酯(Diethyl pyrocarbonate)

DMEM：杜氏改良培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium)

DMEM-5：含 5%灭活胎牛血清的杜氏改良培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% fetal bovine serum)

DMEM-2：含 2%灭活胎牛血清的杜氏改良培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% fetal bovine serum)

DMEM-10：含 10%灭活胎牛血清的杜氏改良培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum)

dNTP：脱氧核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside triphate)

FAT：荧光抗体试验(Fluorescent antibody test)

M-MLV：莫洛尼鼠类白血病病毒(Moloney murine leukemia virus)

PBS：磷酸盐缓冲盐水(Phosphate buffered saline)

RT-PCR：反转录-聚合酶链反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

SPF：无特定病原体(Specific pathogen free)

VN：病毒中和试验(Virus neutralisation)

Taq 酶：*Taq* DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase)

4 临床诊断

4.1 流行病学

几乎所有的温血动物都对狂犬病病毒易感，但在自然界中，易感动物主要是犬科、猫科及鼬科动物。野生动物也是狂犬病病毒的自然贮存宿主。其中如狐狸、狼、豹类、熊、臭鼬、鼠、猫、鼬等多以健康带毒，

动物感染狂犬病病毒后，均可成为传染源；猪、牛、马等家畜也可感染狂犬病病毒（多无临床症状，但血检呈阳性）。在发达国家，人的狂犬病主要来源于犬狂犬病，有80%～90%的人狂犬病是由疯犬咬伤所引起，而少数病例来自野生动物，野生动物在感染狂犬病病毒后多数动物发病后死亡，部分动物病后恢复转为病毒携带者。中国人兽狂犬病的传染源中，犬占85%～95%，猫占4%左右，狼与其他野生动物和家畜也可造成狂犬病的传播。

狂犬病病毒的传染主要通过破损皮肤和黏膜。在已感染动物的唾液腺中，病毒含量极高，唾液中的病毒通过动物啃咬和舔舐进入机体，有些情况下，即使未发现的伤口也可成为病毒侵入的途径。人感染狂犬病最常见的方式是通过感染狂犬病的犬、猫、野生动物以及吸血蝙蝠的咬伤、挠抓、舔舐皮肤或粘膜，从而使狂犬病病毒侵入人体，之后经神经末梢上行进入中枢神经系统。发病时，人首先感到不安，头痛，发热，侵入部位有刺痛感，继而出现神经兴奋性增强，脉速增加、出汗、流涎、多泪、瞳孔放大，吞咽时咽喉肌肉发生痉挛，见水或其他轻微刺激可引起发作。最后转入麻痹、昏迷、呼吸及循环衰竭而死亡，病程大约5 d～7 d。此外，病毒还可以通过呼吸道传染或通过气溶胶传播。

4.2 临床症状

本病的潜伏期从数天、数月到数年不等。潜伏期的长度与咬伤位置、创伤严重性、病毒毒力以及宿主抵抗力相关，伤口在头部和神经丰富的部位，潜伏期通常较短。一般来说，临床症状可划分为三个阶段：前驱期，兴奋期和麻痹期。然而，这三个阶段有时并不明显。例如，对于某些犬，兴奋期相当明显，但另外一些犬，其兴奋期或许根本不明显。对于犬、猫和其他一些宠物，前驱期的表现通常为行为改变，野生动物也可出现这种表现，放任其自然本性，对人表现出恐惧。其他动物狂犬病临床症状通常较不明显。但一般来说，本病的特征为进行性神经紊乱。然而，本病的临床症状容易与其他一些传染病混淆（如脑脊髓炎或有神经症状的疾病），也可能与一些表现神经症状的中毒反应混淆。

4.3 病理变化

4.3.1 眼观病变

狂犬病病毒引起的脑炎可导致广泛的神经病变，但主要局限于神经细胞的病变。肉眼病变表现为一定程度的脑水肿。

4.3.2 组织学病变

无特定的组织学病理改变。有时血管周可出现套管现象或炎性反应，脑组织可出现炎性细胞浸润。有时狂犬病感染组织中可观察到嗜曙红细胞内的胞浆内包涵体，此类包涵体被命名为内基氏体。

5 实验室诊断

5.1 病原鉴定方法

5.1.1 总则

狂犬病固定毒的培养操作应在生物安全2级以上实验室条件下进行，涉及狂犬病街毒的分离培养应在具有生物安全3级条件的实验室中进行，实验室条件符合GB 19489的规定。

5.1.2 设备

高速台式冷冻离心机（离心速度12 000 r/min以上），台式离心机（离心速度3 000 r/min），漩涡振荡器，冰箱（2 ℃～8 ℃和－20 ℃两种），微量可调移液器（10 μL、100 μL、1 000 μL），荧光显微镜。

5.1.3 采样、送检和处理

5.1.3.1 试验材料

5.1.3.1.1 棉拭子、剪刀、镊子、注射器、1.5 mL 离心管、研钵。采样工具应经 121 ℃，15 min 高压灭菌并烘干。

5.1.3.1.2 pH 7.2，0.01 mol/L PBS，配制方法见附录 A.1。

5.1.3.1.3 抗生素：青霉素、链霉素。

5.1.3.2 脑组织、唾液腺以及皮肤等组织样品

用无菌的剪刀和镊子剪取待检样品 1.0 g 于研钵中充分研磨，再加 5.0 mL PBS 混匀，然后将组织悬液转入无菌 1.5 mL 离心管中，编号备用。

5.1.3.3 唾液、脑脊髓液

直接吸取至无菌 1.5 mL 离心管中，编号备用。

5.1.3.4 存放与运送

采集或处理的样本在 2 ℃～8 ℃条件下保存应不超过 24 h；若需长期保存，应放置－70℃冰箱，但应避免反复冻融。采集的样品密封后，采用保温壶或保温桶加冰密封，尽快运送到实验室。

5.1.4 荧光抗体试验(FAT)

5.1.4.1 试验材料

5.1.4.1.1 适用标本：脑组织，皮肤组织，角膜，唾液和脑脊液。

5.1.4.1.2 FITC 标记的抗狂犬病病毒单克隆抗体。

5.1.4.1.3 常用稀释液：pH 7.2，0.01 mol/L PBS，1∶60 000 稀释的伊文思蓝(PBS 稀释)，90%甘油(PBS 稀释)。

5.1.4.2 操作步骤

5.1.4.2.1 液体标本直接涂片，组织标本可进行涂片，压片或冷冻切片。室温干燥数分钟，冷丙酮固定 7 min～10 min。

5.1.4.2.2 将 FITC 标记的单克隆抗体稀释至工作浓度，滴加于涂片，压片或冷冻切片之上，37 ℃湿盒温育 30 min。

5.1.4.2.3 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

5.1.4.2.4 将 90%甘油(PBS 稀释)滴加于涂片，压片或冷冻切片之上，用盖玻片封片，用荧光显微镜进行观察。

5.1.4.3 结果判定

细胞内病毒特异性荧光为黄绿色颗粒，分布在感染细胞的胞浆内。根据阳性细胞在细胞总数的比例，可将阳性结果判定为 1～4 个“＋”。阳性细胞数＜25%为“＋”，25%～50%为“＋＋”，51%～75%为“＋＋＋”，＞75%为“＋＋＋＋”；无特异性荧光者为“－”。

5.1.5 细胞培养分离病毒

5.1.5.1 试验材料

5.1.5.1.1 适用标本：脑组织，皮肤组织，唾液和脑脊液。

5.1.5.1.2 细胞系：鼠神经瘤细胞系（如 ATCC CCL-131），BHK-21，Vero 细胞。

5.1.5.1.3 培养基成分：DMEM，胎牛血清，7.5%碳酸氢钠（质量分数），10 000 IU/mL 青霉素及链霉素溶液。

5.1.5.1.4 配制 DMEM-5 和 DMEM-2：100 mL DMEM-5 中含有 90 mL DMEM 培养液，灭活胎牛血清 5 mL，10 000 IU/mL 青霉素及链霉素溶液 2 mL，用 7.5%碳酸氢钠（质量分数）调节 pH 值至 7.2～7.4；100 mL DMEM-2 中含有 93 mL DMEM 培养液，灭活胎牛血清 2 mL，10 000 IU/mL 青霉素及链霉素溶液 2 mL，用 7.5%碳酸氢钠（质量分数）调节 pH 值至 7.2～7.4。

5.1.5.2 操作步骤

5.1.5.2.1 用 DMEM-5 培养单层细胞，长满程度约为 80%，培养时可加入适当大小的飞片。

5.1.5.2.2 弃去培养液，加入 0.2 mL 液体样本或组织悬液，36 ℃吸附 1 h。

5.1.5.2.3 补加 DMEM-2，置于 36 ℃ 5% CO_2 培养箱中进行培养。

5.1.5.2.4 培养至第 4 天至第 5 天，取飞片或刮取细胞涂于载玻片上，用冷丙酮固定后，按免疫荧光法进行鉴定。

5.1.5.2.5 鉴定为阴性者，需要将培养物冻融 3 次，4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液继续按照上述连续传代 3 次。

5.1.5.3 结果判定

细胞传代出现病变，而且荧光抗体法检测病毒抗原为阳性者判定为细胞分离阳性，否则为阴性。

5.1.6 小鼠接种分离病毒

5.1.6.1 试验材料

5.1.6.1.1 适用标本：脑组织。

5.1.6.1.2 小鼠：5～10 只 3～4 周龄 SPF 小鼠（12 g～14 g）或 5～10 只 2 日龄 SPF 小鼠。

5.1.6.1.3 麻醉剂：1%戊巴比妥溶液。

5.1.6.2 操作步骤

5.1.6.2.1 在无菌条件下制成 20%悬液（质量浓度），将小鼠麻醉后，取 50 μL 悬液或液体样本进行脑内接种。

5.1.6.2.2 连续观察 28 d，4 d 内死亡的小鼠弃去。对于 2 日龄小鼠，可于接种后第 5 天，第 7 天，第 9 天和第 11 天取脑组织进行荧光抗体检测。

5.1.6.3 结果判定

小鼠脑组织经荧光法检测病毒抗原为阳性者判定为小鼠分离阳性，否则为阴性。

5.2 血清学检测方法

5.2.1 荧光抗体中和试验

5.2.1.1 设备

35 ℃～37 ℃的 5% CO_2 可加湿培养箱，37 ℃烘箱，生物安全柜，荧光显微镜。

5.2.1.2 **试剂**

5.2.1.2.1 pH 7.2,PBS,配方见 A.1,4 ℃储存备用。

5.2.1.2.2 胰酶-EDTA 溶液,配方见 A.2。

5.2.1.2.3 丙酮(生化级)80%(用去离子水稀释),4 ℃储存备用。

5.2.1.2.4 DMEM-10,100 mL DMEM-10 中含有 90 mL DMEM 培养液,灭活胎牛血清 10 mL,10 000 IU/mL青霉素及链霉素溶液 2 mL,用 7.5%碳酸氢钠(质量分数)调节 pH 值至 7.2～7.4。

5.2.1.2.5 FITC 标记的抗狂犬病病毒荧光抗体。

5.2.1.2.6 细胞株 BHK-21 C13(ATCC CCL-10),培养于含 10%胎牛血清、青霉素及链霉素的 DMEM 培养液。

5.2.1.2.7 病毒株 CVS-11。

5.2.1.2.8 标准阳性血清,一般为 6.7 IU/mL,OIE 提供。

5.2.1.2.9 阴性血清:阴性犬血清于－20 ℃储存备用。

5.2.1.3 **狂犬病病毒 CVS 株增殖**

5.2.1.3.1 细胞培养:BHK-21 C13 细胞用于增殖 CVS 病毒,细胞长成单层后应进行传代,勿使悬浮的细胞聚集,75 cm^2 细胞培养瓶细胞数约为 2×10^7,将细胞悬浮于 20 mL～30 mL DMEM-10 中。

5.2.1.3.2 细胞接种:将感染指数(每个细胞内的感染病毒粒子数量)调整到 0.1 到 0.5 之间,将细胞及病毒悬液在 35.5 ℃～37 ℃温育 1 h,期间每隔 10 min～15 min 摇匀一次。

5.2.1.3.3 病毒生长增殖:将病毒及细胞悬液 800 r/min～1 000 r/min 离心 15 min,将沉淀重悬于 DMEM-10 中,2 d 后收获病毒培养物。

5.2.1.3.4 收获和储存:将培养物上清 4 ℃条件下 800 g～1 000 g 离心 15 min。取上清混匀后进行分装,保存于－80 ℃。冻存至少 3 d 以后再进行感染滴度测定。

5.2.1.4 **病毒 $TCID_{50}$ 测定**

5.2.1.4.1 在 96 孔细胞培养板上使用 24 h 内长成的 BHK-21 C13 细胞单层进行测定。将 0.1 mL 病毒液加入 0.9 mL 培养液作 10 倍连续倍比稀释。每个稀释度接种 6 孔,每孔接种 50 μL。培养 72 h 后进行阴阳性判读。根据 Spearman-Kärber 法计算结果。

5.2.1.4.2 细胞悬浮,测定前 1 d,将细胞分散后用 DMEM-10 制成 10^5 细胞/mL 悬液,加入 96 孔培养板,200 μL/孔。将培养板在 35.5 ℃～37 ℃以及含 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。

5.2.1.4.3 病毒液稀释,用不含胎牛血清的 DMEM 培养液对病毒从 10^{-1} 到 10^{-12} 作 10 倍系列稀释。

5.2.1.4.4 感染细胞,吸弃 96 孔培养板中的培养液,将各个稀释度的病毒液 50 μL 加入各个培养孔,每个稀释度接种 6 孔。将培养板在 35.5 ℃～37 ℃以及含 5% CO_2 的培养箱中温育 1 h,然后加入 200 μL DMEM-5。

5.2.1.4.5 培养,将培养板在 35.5 ℃～37 ℃以及含 5%CO_2 的培养箱中温育 3 d。

5.2.1.4.6 染色和滴度计算,将细胞进行 FAT 染色,进行阴阳性判读,有特异性荧光的孔判为阳性,否则为阴性,根据 Spearman-Kärber 法计算结果,见式(1)。

$$\log_{10}(D_{50}) = -\left(x_0 - \frac{d}{2} + d\sum\frac{ri}{ni}\right) \quad \cdots\cdots(1)$$

式中:

$\log_{10}(D_{50})$——病毒 $TCID_{50}$ 的 log10 对数;

x_0——所有孔均为阳性的最大病毒稀释度的 log10 对数;

d——倍比稀释倍数的 log10 对数(本试验为 1);

ri——阳性孔数;

ni ——重复孔数(本试验为 6)；

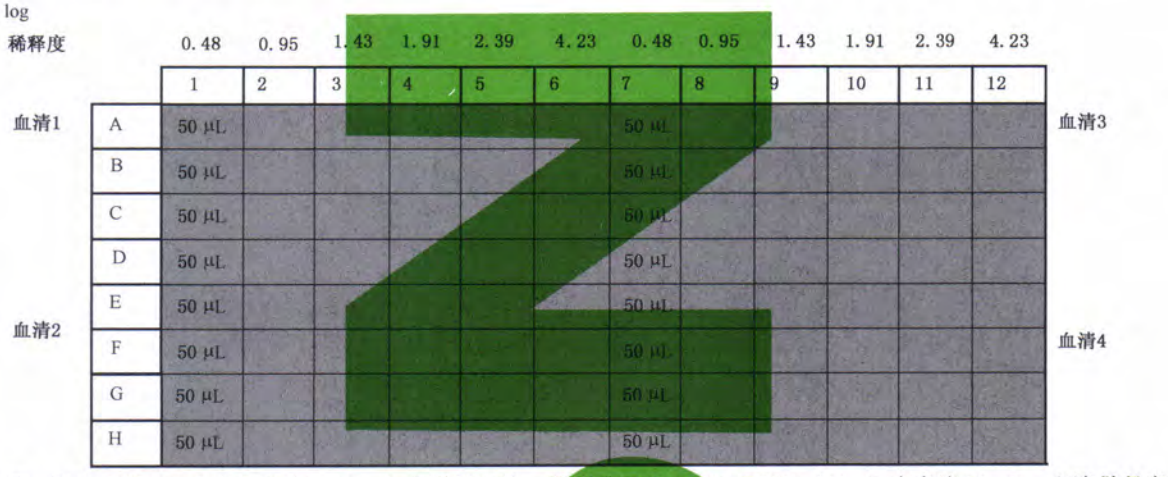
$\sum \frac{ri}{ni}$ ——所有孔均为阳性的最大稀释度开始，阳性孔数与重复孔数的比值之和。

计算举例参见附录 B。

5.2.1.5 正式试验操作步骤

5.2.1.5.1 培养板布局

按照图 1 所示板式布局进行试验，1 号板为对照板，用于 CVS 病毒 $TCID_{50}$ 回归测定(1 列～4 列)，以及设立标准阴、阳性血清，空白对照。其余板子用于测定被检血清。



注：图中标明 50 μL 的孔应加入 50 μL 未稀释血清。阴影孔需加入 100 $TCID_{50}$/50 μL 病毒液 50 μL。血清稀释度以 log10 进行表示。

图 1 被检血清板布局(见 5.2.1.5.3)

5.2.1.5.2 加培养液

1 号板，1 到 4 列以及 A9 到 A12 的细胞对照孔，150 μL/孔，其余孔，100 μL/孔；被检血清板，第 6 和第 12 列，200 μL/孔。其余所有孔，100 μL/孔。

5.2.1.5.3 加被检血清

被检血清应 56 ℃灭活 30 min。如图 2 所示，每份被检血清(不作稀释)加入相应的 4 个孔内，50 μL/孔。

5.2.1.5.4 按以下方式在 96 孔培养板上稀释血清

标准阴、阳性血清：用 50 μL～200 μL 多通道加样器在首列稀释孔连续吹吸至少 8 次，吸取 50 μL 到下一排，连续操作直至最后一排，弃去 50 μL。

被检血清(所有板)：如上所述，从第一列开始，连续吸取 50 μL 进行系列稀释直至第 5 和 11 列(稀释度 $10^{-2.39}$)。使用 5 μL～50 μL 多通道加样器，从第 5 列和第 11 列分别移取 10 μL 到第 6 列和第 12 列，(稀释度从 $10^{-2.39}$ 到 $10^{-4.23}$)。将多通道加样器调整至 90 μL，将第 6 列和第 12 列液体混匀，然后弃去 180 μL，然后加入 70 μL 培养液到这 2 列孔中。

5.2.1.5.5 加病毒液

CVS 毒株储存于－80 ℃，1.0 μL/管。取出 1 管，用流动的冷水迅速溶解后置于冰水浴中。稀释病

毒至 100 $TCID_{50}$/50 μL。将此稀释度的病毒液 50 μL 加入各个已加血清的孔中。1 号对照板 H1 到 H4 各加入 50 μL 病毒液，然后依次移取 50 μL 进行系列稀释，最后第 1 列弃去 50 μL(1 号板，A1 到 A4 孔)。1 号板 A9 到 A12 孔不加病毒(细胞对照)。加入的病毒量允许范围为 30 $TCID_{50}$/50 μL～300 $TCID_{50}$/50 μL。将微量培养板置于含 5% CO_2 的 35 ℃～37 ℃加湿培养箱温育 1 h。

log 稀释度		0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	4.23	0.48	0.95	1.43	1.91	2.39	4.23	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
血清1	A	50 μL						50 μL						血清3
	B	50 μL						50 μL						
	C	50 μL						50 μL						
	D	50 μL						50 μL						
	E	50 μL						50 μL						
血清2	F	50 μL						50 μL						血清4
	G	50 μL						50 μL						
	H	50 μL						50 μL						

注：图中标明 50 μL 的孔应加入 50 μL 未稀释血清。阴影孔需加入 100 $TCID_{50}$/50 μL 病毒液 50 μL。血清稀释度以 log10 进行表示。

图 2 被检血清板布局

5.2.1.5.6 加细胞悬液

用胰酶消化长满单层的 BHK-21 细胞，用适当体积的 DMEM-10 重悬细胞，使得细胞数为 4×10^5/mL。每孔加入 50 μL 细胞悬液。将细胞培养板置于含 5% CO^2 的 35 ℃～37 ℃加湿培养箱进行培养。

5.2.1.5.7 固定和染色

培养 48 h 后，弃去培养液，然后分别用 pH 7.2 PBS 和 80%丙酮各漂洗 1 次，然后用 80%丙酮室温固定 30 min，在室温干燥至少 30 min。每孔加入 50 μL 工作浓度的 FITC 标记的狂犬病荧光抗体，轻轻摇晃培养板后在 35 ℃～37 ℃温育 30 min。弃去孔中的荧光抗体然后用 PBS 洗涤 2 次，然后在吸水纸上拍干板子。

5.2.1.5.8 结果判定

在荧光显微镜下逐孔进行观察，对结果进行定性判定(阴性或阳性)，观察到特异性荧光的孔判为阳性，否则为阴性。首先对细胞对照孔和病毒对照孔进行观察判定。CVS 滴度，阴性血清和标准阳性血清中和效价根据 Spearman-Kärber 方法进行计算。

将每次试验测得的 CVS 病毒滴度($TCID_{50}$)，阴性血清中和效价(D_{50})标准阳性血清中和效价(D_{50})记录于质控单。对于同一批次的质控对照品，每次测得的效价要与以往试验测得的效价进行对比，如果在统计学上与以往测定结果的平均值差异不显著(±2 SD)，表明测定结果有效，反之无效。

将病毒对照结果，血清对照结果以及被检血清结果进行比对，根据 Spearman-Kärber 公式计算出被检血清效价。将测得的被检血清中和效价与已知中和抗体滴度的标准阳性血清中和效价进行比较，可以计算出被检血清的中和抗体滴度(IU/mL)。可应用当天的 log D_{50} 值或标准阳性血清的平均值将被检血清中和抗体滴度换算为 IU/mL。

将 log D_{50} 值换算为 IU/mL，见式(2)和式(3)：

$$被检血清中和抗体滴度(IU/mL)=\frac{10^{被检血清的\log D_{50}}\times 0.5}{10^{0.5\ IU/mL标准阳性血清的\log D_{50}}} \quad \cdots\cdots(2)$$

式中：

IU/mL ——每 mL 血清的中和抗体国际单位数；

$\log D_{50}$ ——被检血清中和效价的对数；

0.51 IU/mL 标准阳性血清的 $\log D_{50}$ ——0.5 IU/mL 标准阳性血清中和效价的对数。

例如：被检血清的 $\log D_{50}=2.27$，标准阳性血清的 $\log D_{50}=1.43$（对于标准阳性血清的 $\log D_{50}$，可以采用当日的测定值或者平均值）。

$$血清中和抗体滴度(IU/mL)=\frac{10^{2.27}\times 0.5}{10^{1.43}}=3.46\ IU/mL \quad \cdots\cdots(3)$$

式中：

IU/mL——每 mL 血清的中和抗体国际单位数。

5.2.2 酶联免疫吸附试验 ELISA

5.2.2.1 设备、材料和试剂

ELISA 试验所需检测设备、材料和试剂如下：

——37 ℃±3 ℃温箱。

——酶标仪，具有 450 nm 的滤光片。

——洗板机。

——100 mL 和 1 000 mL 量筒。

——微量可调移液器(0.5 μL～10 μL、10 μL～100 μL、100 μL～1 000 μL)。

——已知国际单位数的标准阳性血清，一般为 6.7 IU/mL，由 OIE 提供。

——包被狂犬病病毒 CVS 株糖蛋白的 96 孔酶标板。

——阴阳性对照血清。

——辣根过氧化物酶标记的蛋白 A(HRP-Protein A)。

——稀释液(SD)，10×浓缩洗液，底物液和终止液。

5.2.2.2 预试验

5.2.2.2.1 将被检血清样品 56 ℃热灭活 30 min，然后用样品稀释液在 96 孔血清稀释板上先作 1∶10 的一级稀释(10 μL 血清样品加入 90 μL SD)。

5.2.2.2.2 在 1.5 mL 离心管中将标准阳性血清先作 1∶10 和 1∶100 稀释，然后按照表 1 将标准阳性血清作 7 个稀释度。

表 1 标准阳性血清的稀释(见 5.2.2.2.2)

标准阳性血清稀释度	稀释方法
1∶10	25 μL 标准阳性血清+225 μL SD
1∶25	40 μL 1∶10 标准阳性血清+60 μL SD
1∶60	25 μL 1∶10 标准阳性血清+125 μL SD
1∶80	20 μL 1∶10 标准阳性血清+140 μL SD
1∶170	10 μL 1∶10 标准阳性血清+160 μL SD
1∶400	25 μL 1∶100 标准阳性血清+75 μL SD
1∶800	20 μL 1∶100 标准阳性血清+140 μL SD

5.2.2.3 正式试验

5.2.2.3.1 取出96孔酶标板，每孔加入90 μL SD，按表2布局方式加样，在孔A1和A2各加入10 μL阴性对照血清，在孔B1和B2加入10 μL阳性对照血清。其余孔加入1∶10到1∶800稀释度的标准阳性血清和1∶10稀释的被检血清，在振荡器上轻轻振荡混匀。加封板膜后在37±3 ℃温箱内温育1 h±5 min。用工作浓度的洗液洗涤4遍。

表2 酶标板对照血清，系列稀释的标准阳性血清以及被检血清排布方式

	1	2	3	4
A	N 1∶10	N 1∶10	标准阳性血清 1∶8 000	标准阳性血清 1∶8 000
B	P 1∶10	P 1∶10	S1 1∶100	S1 1∶100
C	标准阳性血清 1∶100	标准阳性血清 1∶100	S2 1∶100	S2 1∶100
D	标准阳性血清 1∶250	标准阳性血清 1∶250	S3 1∶100	S3 1∶100
E	标准阳性血清 1∶600	标准阳性血清 1∶600	S4 1∶100	S4 1∶100
F	标准阳性血清 1∶800	标准阳性血清 1∶800	S5 1∶100	S5 1∶100
G	标准阳性血清 1∶1 700	标准阳性血清 1∶1 700	S6 1∶100	S6 1∶100
H	标准阳性血清 1∶4 000	标准阳性血清 1∶4 000	S7 1∶100	S7 1∶100

5.2.2.3.2 用稀释液将HRP-Protein A作1∶10稀释。从温箱中取出酶标板，揭开封板膜，用工作浓度的洗液洗涤4遍后，在吸水纸上拍干酶标板，每孔加入稀释好的酶结合物100 μL，加封板膜后在37 ℃±3 ℃温箱内温育60 min±5 min。

5.2.2.3.3 从温箱中取出酶标板，揭开封板膜，用工作浓度的洗液洗涤4遍后，在吸水纸上拍干酶标板，每孔加入100 μL底物液，轻轻振荡，不加封板膜在23 ℃±5 ℃条件下避光温育30 min±5 min。

5.2.2.3.4 每孔加入50 μL终止液，确保孔中没有气泡，用450 nm滤光片在酶标仪上读数。

5.2.2.4 结果判定

5.2.2.4.1 有效原则

满足以下3个条件，则认为结果有效：

——阳性对照(P)的 $OD \geqslant 0.300$。

——阴性对照(N)的 $OD < 0.50 \times P$。

——标准阳性血清中和抗体滴度自然对数(ln)与 OD 值自然对数(ln)的相关系数>0.95。

5.2.2.4.2 结果计算与判定

5.2.2.4.2.1 曲线回归计算中和抗体滴度：计算每个样品的平均 OD 值和每个稀释度标准阳性血清的平均 OD 值。计算每个平均 OD 值的自然对数值(ln)和对应的每个中和抗体滴度的自然对数值(ln)。

以ln(OD)值作Y轴，以ln(中和抗体滴度)作为X轴，进行线性回归，得出函数式，见式(4)：

$$\ln[\text{中和抗体滴度}] = a + b * \ln OD \quad \cdots\cdots (4)$$

式中：

ln[中和抗体滴度]——中和抗体滴度的自然对数；

a ——线性回归的截距；

b ——线性回归的斜率；

ln OD ——样品 OD 值的自然对数。

对于每个被检血清，将其平均 OD 值代入式(5)，换算出其中和抗体滴度的等价单位，表示为 EU/mL：

$$被检血清抗体中和滴度(EU/mL)=e^{(a+b*\ln OD)} \quad \cdots\cdots(5)$$

式中：

EU/mL ——每 mL 被检血清中的中和抗体等价单位数；

e ——数学常数，为自然对数函数的底数；

a ——线性回归的截距；

b ——线性回归的斜率；

ln OD ——样品 OD 值的自然对数。

5.2.2.4.2.2 判定如下：

——如果计算所得的滴度＞0.6，则判定动物具有保护力；

——如果计算所得的滴度＜0.6，则认为动物可能不具有保护力，需要进一步进行 FAVN 试验进行确认。

结果计算举例参见附录 C。

5.3 狂犬病病毒核酸检测方法

5.3.1 RT-PCR 检测方法

5.3.1.1 设备、材料和试剂

5.3.1.1.1 设备

高速台式冷冻离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。台式离心机(离心速度 3 000 r/min)。混匀器。冰箱(2 ℃～8 ℃和－20 ℃两种)。PCR 仪。

5.3.1.1.2 材料和试剂

需要准备以下材料和试剂：

——病毒 RNA 提取试剂 TRIZOL。

——M-MLV 反转录酶(200 U/μL)及相应 5×反转录反应缓冲液。

——RNA 酶抑制剂(40 U/μL)。

——*Taq* DNA 聚合酶及相应 10×缓冲液、25 mmol/L $MgCl_2$。

——DEPC 处理的灭菌双蒸水，配制方法见 A.3.1。

——50×TAE 缓冲液，配制方法见 A.3.2。

——1%琼脂糖凝胶板，配制方法见 A.3.3。

——10×电泳上样缓冲液，配制方法见 A.3.4。

——2.5 mmol/L each dNTP。

——DNA 分子量标准。

采用以下引物或其他等效引物来进行狂犬病病毒的检测：

——N1(＋)：(587)5′-TTTGAGACTGCTCCTTTTG-3′(605)

N2(－)：(1092)5′-CCCATATAGCATCCTAC-3′(1013)

以上引物浓度均为 50 pmol/μL。

5.3.1.2 采样、送检和处理

同 5.1.3。

5.3.1.3 操作方法

5.3.1.3.1 病毒 RNA 提取

病毒 RNA 的提取步骤如下：

a) 取 n 个 1.5 mL 灭菌离心管，其中 n 为待检样品数、一管阳性对照及一管阴性对照之和，对每个管进行编号标记。

b) 每管加入 600 μL Trizol，然后分别加入待测样本、阴性对照和阳性对照各 200 μL，一份样本换用一个吸头；再加入 200 μL 三氯甲烷，混匀器上振荡混匀 5 s。于 4 ℃条件下，12 000 *g* 离心 15 min。

c) 取与 a)中相同数量的 1.5 mL 灭菌离心管，加入 500 μL 异丙醇(−20 ℃预冷)，对每个管进行编号。

d) 吸取 b)离心后各管中的上清液，每个至少吸取 500 μL，不要吸出中间层，将上清液转移至已加入异丙醇的相应的管中，颠倒混匀。

e) 于 4 ℃条件下，12 000 *g* 离心 15 min。轻轻倒去上清液，倒置于吸水纸上，吸干液体，不同样品应在吸水纸不同地方吸干。

f) 加入 600 μL 75%乙醇，颠倒洗涤。于 4 ℃条件下，12 000 *g* 离心 10 min，轻轻倒去上清液，倒置于吸水纸上，吸干液体，不同样品应在吸水纸不同地方吸干。

g) 4 000 *g* 离心 10 s，将管壁上的残余液体甩到管底部，用微量加样器尽量将其吸干，一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥 3 min。不宜过于干燥，以免 RNA 不溶。

h) 加入 11 μL 经无 RNA 酶的灭菌纯化水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2 000 *g* 离心 5 s，冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增或放置于−70 ℃冰箱。

5.3.1.3.2 反转录

取 5 μL RNA，加 1 μL 反转录引物，70 ℃ 5 min；冰浴 2 min，继续加入：5×反转录反应缓冲液 4 μL，2.5 mmol dNTPs 2 μL，M-MLV 反转录酶 0.5 μL，RNA 酶抑制剂 0.5 μL，DEPC 处理的灭菌双蒸水 11 μL。42 ℃水浴 1 h，合成 cDNA 链。取出后可以直接进行 PCR。试验中同时设立阳性和阴性对照。

5.3.1.3.3 PCR

PCR 为 50 μL 体系，体系配制如表 3 所示。首先加入双蒸灭菌水，然后再按照顺序逐一加入上述成分，每一次要加入到液面下。全部加完后，混悬，瞬时离心，使液体都沉降到 PCR 管底。在每个 PCR 管中加入 1 滴液体石蜡(约 20 μL)。循环参数为 95 ℃ 5 min，94 ℃ 45 s，50 ℃ 45 s，72 ℃ 45 s，循环 30 次，72 ℃延伸 6 min 结束。设立阳性对照和阴性对照。

5.3.1.3.4 电泳

制备 2.0%琼脂糖凝胶板。取 5 μL PCR 产物与 0.5 μL 10×电泳上样缓冲液混合，加入琼脂糖凝胶板的加样孔中。加入分子量标准。盖好电泳仪，插好电极，5 V/cm 电压电泳，30 min～40 min。在紫外线灯下观察照相存档；或者用紫外凝胶成像仪扫描图片存档。用分子量标准比较判断 PCR 片段大小。

表 3　PCR 反应体系配制表

试剂	体积/μL
灭菌双蒸水	36
反转录产物	4
上游引物	0.5
下游引物	0.5
10×PCR 缓冲液	5
25 mmol/L $MgCl_2$	1.5
2.5 mmol/L each dNTP	2.0
Taq DNA 聚合酶 5 U/μL	0.5

5.3.1.3.5　结果判定

在阳性对照出现相应扩增带、阴性对照无此扩增带时判定结果。出现大小为 505 bp 左右扩增片段时，判定为阳性，否则判定为阴性。对于阳性扩增，必要时应对扩增片段进行序列测定分析确认。

5.3.2　荧光 RT-PCR 检测

5.3.2.1　设备、材料和试剂

5.3.2.1.1　设备

荧光 PCR 仪。其他见 5.3.1.1.1。

5.3.2.1.2　材料和试剂

所需材料和试剂如下：

——病毒 RNA 提取试剂 Trizol。

——狂犬病病毒荧光 RT-PCR 检测引物、探针及反应液，引物、探针序列及荧光 RT-PCR 反应液配方及注意事项见附录 D。

5.3.2.2　样本核酸的提取

见 5.3.1.3.1。

5.3.2.3　扩增试剂准备与配制

在反应混合物配制区进行。每个测试反应体系需要 14 μL RT-PCR 反应液和 0.5 μL M-MLV 反转录酶，0.25 μL RNA 酶抑制剂以及 0.25 μL *Taq* 酶。计算好各试剂的使用量，加入一适当体积试管中，充分混合均匀，向每个 PCR 管中各分装 15 μL，转移至样本处理区。

5.3.2.4　加样

在样本处理区进行。在各设定的 PCR 管中分别加入 5.3.2.2 中制备的 RNA 溶液 10 μL，使总体积达 25 μL。盖紧管盖后，500 r/min 离心 30 s。

5.3.2.5 荧光 PCR 反应

在检测区进行。将 5.3.2.4 中加样后的 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。反应参数设置：

——第一阶段，预变性 42 ℃/30 min，92 ℃/3 min；

——第二阶段，92 ℃/5 s，54 ℃/5 s，60 ℃/30 s 40 个循环，荧光收集设置在第三阶段每次循环的退火延伸时进行。

5.3.2.6 结果判定

5.3.2.6.1 结果分析条件设定

读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点。不同仪器可根据仪器噪音情况进行调整。

5.3.2.6.2 质控标准

阴性对照无 Ct 值并且无扩增曲线；阳性对照的 Ct 值应≤30.0，并出现特定的扩增曲线。如阴性对照和阳性条件不满足以上条件，此次实验视为无效。

5.3.2.6.3 结果描述及判定

阴性，无 Ct 值并且无扩增曲线，表明样品中无狂犬病病毒；阳性，Ct 值≤30.0，且出现特定的扩增曲线，表示样本中存在狂犬病病毒。若 Ct 值在 30 和 40 之间，判为可疑，应加大模板量重复试验，如果仍为阳性，则判为阳性，否则判为阴性。

附 录 A
（规范性附录）
相关试剂配制

A.1 PBS 配制

A.1.1 A 液

0.2 mol/L 磷酸二氢钠水溶液
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 27.6 g，溶于蒸馏水中，最后稀释至 1 000 mL。

A.1.2 B 液

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.6 g，（或 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.6 g 或 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 35.6 g）加蒸馏水溶解，最后稀释至 1 000 mL。

A.1.3 0.01 mol/L、pH 7.2 PBS 的配制

0.2 mol/L A 液 14 mL
0.2 mol/L B 液 36 mL
加氯化钠 8.5 g
用蒸馏水定容至 1 000 mL，高压灭菌后室温保存。

A.2 胰酶-EDTA 溶液配方

胰酶 0.5 g，NaCl 8 g，KCl 0.4 g，葡糖糖 1.0 g，$NaHCO_3$ 0.58 g，EDTA 0.2 g，用灭菌三蒸水定容至 1 000 mL，过滤除菌后，分装后于－20 ℃保存备用。

A.3 RT-PCR 相关溶液配方

A.3.1 DEPC 处理的灭菌双蒸水配制

灭菌双蒸水 100 mL，加入 DEPC 50 μL，室温过夜，121 ℃高压 15 min，分装到 1.5 mL 的无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中。

A.3.2 50×TAE 配方

A.3.2.1 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠（EDTA）溶液（pH 8.0）配制

二水乙二铵四乙酸二钠	18.61 g
灭菌双蒸水	80 mL

用固体氢氧化钠调 pH 至 8.0，灭菌双蒸水定容至 100 mL。

A.3.2.2 50×TAE 电泳缓冲液配制

三羟甲基氨基甲烷(Tris base)	24.2 g
冰乙酸	10 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	10 mL

加双蒸水至 100 mL,室温保存备用。使用时用双蒸水稀释为 1×TAE。

A.3.3 琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖凝胶:称取 0.8 g～1 g 琼脂糖于 100 mL 1×TAE 缓冲液中,加热融化后充分摇匀,待冷至 50 ℃～60 ℃时,加入 5 μL 10mg/mL 的溴化乙锭(EB)贮存液或其他商品化可用于琼脂糖凝胶电泳的 DNA 染料。摇匀,倒入插好梳子的电泳板上,凝固后取下梳子,备用。

A.3.4 10×电泳上样缓冲液配方

聚蔗糖	25 g
灭菌双蒸水	100 mL
溴酚蓝	0.1 g
二甲苯青	0.1 g

充分溶解后,分装到 1.5 mL 离心管中,−20 ℃保存。

附 录 B
（资料性附录）
Spearman-Kärber 法计算 $TCID_{50}$ 举例

B.1 FAT 染色结果统计举例

见表 B.1。

表 B.1 FAT 染色结果统计表

稀释度 log10	*ni*	*ri*
−1	6	6
−2	6	6
−3	6	6
−4	6	5
−5	6	3
−6	6	2
−7	6	0
−8	6	0

B.2 结果计算

根据表 B.1 统计结果，所有孔 FAT 染色均为阳性的最大病毒稀释度为 10^3，病毒系列稀释倍数为 10，重复孔数 *ni* 为 6，*ri* 为各个稀释度下 FAT 染色的阳性孔数。由此，可进行下面的计算：

$$x_0 = 3$$

$$d = 1$$

$$\sum \frac{ri}{ni} = 6/6 + 5/6 + 3/6 + 2/6 = 2.7$$

$$\log_{10}(D_{50}) = -(3 - 0.5 + 2.7) = -5.1$$

即将病毒液作 $10^{5.1}$ 稀释，每 50 μL 含 1 个 $TCID_{50}$ 的病毒。

附 录 C
（资料性附录）
ELISA 方法检测中和抗体结果计算举例

C.1 OD 值结果统计举例

按如下进行结果统计：
阳性对照孔 B1＝1.207；B2＝1.200；OD 平均值＝1.204
阴性对照孔 A1＝0.198；A2＝0.185；OD 平均值＝0.192
标准阳性血清和被检血清检测结果见表 C.1。

表 C.1 标准阳性血清和被检血清检测结果

标准阳性血清稀释度	抗体效价 IU/mL	OD1	OD2	OD 平均值	ln[抗体效价]	ln[OD 平均值]
1∶100	6.7	>2.0	>2.0	>2.0	1.902 1	—
1∶300	2.233	1.587	1.613	1.600	0.803 3	0.470 2
1∶1 000	0.67	1.085	1.135	1.110	−0.400 5	0.104 6
1∶1 500	0.447	0.967	0.996	0.982	−0.805 2	−0.018 3
1∶3 000	0.223 3	0.603	0.614	0.609	−1.499 2	−0.496 5
1∶10 000	0.067	0.341	0.345	0.343	−2.703 1	−1.069 9
1∶30 000	0.022 3	0.198	0.244	0.221	−3.803 2	−1.511 0
样品 1	未知	1.790	1.750	1.770	未知	0.571 0
样品 2	未知	0.350	0.390	0.370	未知	−0.994 3

C.2 结果计算

阳性对照 OD 平均值＝1.204＞0.300，而且阴性对照 OD 平均值＝0.192＜0.50×1.204＝0.602。
标准阳性血清回归线性函数式为：
ln[中和抗体滴度]＝−0.486＋2.178＊ln OD
相关系数 r＝0.993＞0.95，因此结果有效。
样品 1 中和抗体滴度

$$e^{(-0.486+2.178 * ln\ OD)} = e^{(-0.486+2.178 * 0.571\ 0)} = 2.13\ EU/mL$$

样品 2 中和抗体滴度

$$e^{(-0.486+2.178 * ln\ OD)} = e^{(-0.486+2.178 * -0.994\ 3)} = 0.07\ EU/mL$$

附 录 D
（规范性附录）
引物探针序列及荧光 RT-PCR 反应液配方

D.1 引物探针序列

见表 D.1。

表 D.1 引物探针序列

引物或探针名称	序列(5'-3')
上游引物	AGT TGC AAA GCA AAA ATG TAA C
下游引物	AGC AGG GTA CTT GTA CTC ATA TTG
探针	FAM-CTA CAA TGG ATG CCG ACA-TAMRA

注 1：探针为 LNA 修饰的荧光素双标记短探针，斜体加粗字母表示该碱基用 LNA 进行修饰。
注 2：引物和探针可由生物公司合成，用 DEPC 水溶解并稀释至终浓度 10 μmol/L，−20 ℃ 保存备用。

D.2 荧光 RT-PCR 反应液配方

见表 D.2。

表 D.2 荧光 RT-PCR 反应液配方

组分	1 个检测反应的加入量/μL
5×RT 缓冲液	2.5
10×PCR 缓冲液	1.25
$MgCl_2$(25 mmol/L)	2.5
dNTP(2.5 mmol/L)	0.5
上游引物(10 μmol/L)	0.5
下游引物(10 μmol/L)	0.5
探针(10 μmol/L)	0.25
补 DEPC 水至	14

D.3 注意事项

D.3.1 由于阳性样品中模板浓度相对较高，检测过程中不得交叉污染。

D.3.2 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。