

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4645—2025

裂谷热诊断技术

Diagnostic techniques for Rift Valley fever

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



目 次

前言 III

引言 IV

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 生物安全措施 2

6 临床诊断 2

 6.1 流行病学 2

 6.2 临床症状 2

 6.3 临床判定 3

7 样品的采集、运输与保存 3

 7.1 样品的采集 3

 7.2 样品的运输与保存 3

8 病毒分离与鉴定 3

 8.1 主要仪器与设备 3

 8.2 主要试剂与材料 3

 8.3 样品处理 3

 8.4 病毒分离 3

 8.5 病毒鉴定 4

 8.6 结果判定 4

9 RT-PCR 4

 9.1 主要仪器与设备 4

 9.2 主要试剂与材料 4

 9.3 操作方法 4

 9.4 试验成立条件 5

 9.5 结果判定 5

10 实时荧光 RT-PCR 5

 10.1 主要仪器与设备 5

 10.2 主要试剂与材料 5

 10.3 操作方法 6

 10.4 试验成立条件 6

 10.5 结果判定 6

11 IgM 捕获 ELISA(仅用于检测牛、羊血清) 6

 11.1 主要仪器与设备 6

 11.2 主要试剂 6

 11.3 操作方法 7

 11.4 计算 7

 11.5 试验成立条件 7

 11.6 结果判定 8

12 综合判定 8

附录 A(规范性) 病毒分离鉴定溶液的配制 9

附录 B(资料性) 核酸检测用引物、探针序列信息 10

附录 C(规范性) 核酸检测相关溶液的配制 13

附录 D(规范性) 酶联免疫吸附试验溶液的配制 14

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。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

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：中国动物卫生与流行病学中心。

本文件主要起草人：王淑娟、张永强、王清华、包静月、徐天刚、王莹、郑东霞、王华、李林、吕艳、孙成友、邹艳丽、胡永新、刘雨田、赵永刚、赵云玲、戈胜强、任炜杰、刘春菊、左媛媛、王英丽、于小静、宋芳芳、王云霞、李金明、王志亮。



引 言

裂谷热(Rift Valley fever, RVF)是由裂谷热病毒(Rift Valley fever virus, RVFV)引起的经蚊媒或接触传播的一种人兽共患急性、热性传染病。RVFV 为布尼亚病毒目白纤病毒科白蛉病毒属成员,单股负链 RNA,基因组分 L、M、S 三节段,只有一个血清型,主要感染绵羊、山羊、牛、骆驼、野生动物等,感染动物以高流产率和新生动物的高死亡率为特征。人对该病普遍易感,可通过接触感染性动物材料(体液或组织)、食用未煮熟的肉奶或被携带病毒的蚊媒叮咬而感染,通常无症状或伴有中度至重度非致死性流感样症状,甚至死亡。从事采样、实验的工作人员处理病料时,应备有高级别生物防护设施。该病多发于蚊子滋生季节,主要流行于非洲大陆和阿拉伯半岛,对绵羊、山羊和牛的危害较为严重。世界动物卫生组织(WOAH)将该病列为必须通报动物疫病,我国将其列为重点防范的外来动物疫病之一。

本文件的实施将提高我国裂谷热的诊断和监测水平,及时采取防控措施,更有效地做好裂谷热的防控工作。

本文件的制定参考了《陆生动物诊断试验与疫苗手册》,并结合了国内外相关文献和我国相关技术有关研究新成果。

裂谷热诊断技术

1 范围

本文件描述了裂谷热的临床诊断、样品的采集、运输与保存、病毒分离与鉴定、RT-PCR、实时荧光 RT-PCR、IgM 捕获 ELISA 等诊断方法。

本文件适用于羊、牛、骆驼和野生动物等 RVF 的诊断、检疫、监测与流行病学调查等。

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 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

GB/T 27401 实验室质量控制规范动物检疫

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

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。

BHK:乳仓鼠肾(细胞)(baby hamster kidney cell)

CPE:细胞病变效应(cytopathic effect)

Ct:循环阈值(cycle threshold)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)

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

ELISA:酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay)

FAM:6-羧基荧光素(6-carboxy-fluorescein)

HRP:辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)

MEM:最低限度必需营养液(minimum essential medium)

OD:光密度(optical density)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline)

S/P:样品与阳性对照比值

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

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

RVF:裂谷热(rift Valley fever)

RVFV:裂谷热病毒(rift Valley fever virus)

TAE:三羟甲基氨基甲烷-乙酸-乙二胺四乙酸缓冲液(tris-Acetic acid-EDTA buffer)

TAMRA:四甲基罗丹明(tetramethylrhodamine)

TMB:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)

TBST:含吐温的 Tris 盐缓冲液(tris buffered Saline with Tween 20)

Vero:非洲绿猴肾细胞(verda reno)

5 生物安全措施

进行疑似 RVF 样品采集与处理、病毒分离、核酸提取等诊断、检测活动时,按照 GB 19489、GB/T 27401、NY/T 541、NY/T 1948 等的规定执行。病毒分离培养在生物安全三级(BSL-3)实验室进行。

6 临床诊断

6.1 流行病学

6.1.1 传染源

感染动物是最主要的传染源,其血液、体液或器官都具有传染性。感染的蚊虫(库蚊、白蛉、蜚等)既是传播媒介也是传染源。

6.1.2 传播途径

6.1.2.1 虫媒传播:该病主要通过带毒的库蚊、伊蚊、蜚、螨等吸血昆虫叮咬传播或虫媒的远距离移动传播。病毒可通过蚊子卵进行传播,病蚊产的卵可在泥土中存活很多年,遇到适宜的环境,就孵化成带有病毒的蚊子,再一次引起病毒的循环传播。

6.1.2.2 接触传播:直接或间接接触病畜组织、血液、唾液、体液、分泌物和排泄物等。

6.1.2.3 呼吸道传播:嗅闻流产的胎儿等吸入带病毒的气溶胶。

6.1.2.4 消化道传播:食用感染动物的未经煮过或消毒过的奶、肉制品,动物舔食污染的草料等。

6.1.2.5 垂直传播:可通过胎盘传播给胎儿。

6.1.3 易感动物

绵羊、山羊、牛、骆驼、羚羊、马、驴、猴、田鼠、蝙蝠、鹿、狗、猫、禽类以及人等。其中,绵羊最易感。

6.1.4 流行特点

6.1.4.1 RVF 常年均可发生,常暴发于蚊虫活跃的夏秋季节,特别是温暖、潮湿的雨季。其流行和传播与周期性的降水量有关,夏秋雨季为该病流行高发期,通常暴雨和洪涝灾害后在一个国家或地区呈地方性流行或暴发流行。

6.1.4.2 绵羊、山羊、牛、骆驼等动物出现大量孕畜流产和幼畜死亡并伴有密接人员发病是该病的主要特征。

6.1.4.3 多发生于农村和牧区,人发病通常都是在动物流产和发病 1 周~2 周后出现,以牧民、兽医、屠夫、农民为主,RVFFV 研究人员发病率也较高。

6.2 临床症状

6.2.1 动物感染后主要表现发热、厌食、呕吐、腹泻、肝炎、产奶量下降、流产等症状,常常出现大量幼畜突然死亡或成批母畜不明原因流产。

6.2.2 最急性的病例可能不出现任何症状,突然死亡。

6.2.3 急性病例潜伏期非常短,主要症状为发热、步态不稳、呕吐、可视黏膜瘀血斑或瘀血点、流黏液性鼻液、出血性腹泻等。羔羊出现症状后大多 36 h 内死亡,1 周龄内羔羊病死率高达 100%。山羊与绵羊相似,但症状稍轻。犊牛表现为精神萎靡、食欲不振,伴随高热、腹泻、呼吸困难、黄疸等。

6.2.4 亚急性病例主要发生在成年绵羊。出现发热并伴随有厌食和虚弱,部分羊出现呕吐和腹痛症状。怀孕母羊出现大批流产或产出弱羔。奶牛表现为产奶量下降,怀孕母牛流产。

6.2.5 成年牛、骆驼感染后通常表现为隐性感染。有的成年牛表现有流泪、流涎、产奶量下降等,骆驼会突发死亡、流产等。

6.2.6 人感染后,通常无症状或伴有中度至重度非致死性流感样症状,主要为发热、头痛、呕吐、腹泻、乏力、肌肉关节疼痛、畏寒等,少数病人可能出现畏光、视网膜病变、脑炎、严重的出血性肝病、白细胞减少甚至死亡。

6.3 临床判定

当易感动物出现 6.2 中的临床症状至少 1 条,并符合 6.1 流行病学特征至少 1 项,可判为裂谷热疑似病例,确诊需进一步采样进行实验室诊断。

7 样品的采集、运输与保存

7.1 样品的采集

7.1.1 每个疑似 RVF 畜群选择 3 只(头)~5 只(头)病畜采集样品。

7.1.2 对有发热、腹泻或流产等临床症状的活畜,无菌采集 EDTA 抗凝血以及无抗凝剂全血各 1 管,每管应不少于 5 mL,无抗凝剂全血按照常规方法制备血清。

7.1.3 无菌采集病死畜或流产胎畜的肝、脾、脑组织、淋巴结、流产物等 25 g~50 g,分别置于样品保存管(袋)中。如果样品需长途运输,应加入 50%甘油-PBS 保存液,使保存液液面没过样品,并加盖封口。

7.1.4 采集样品的人员需穿戴个体防护装备,做好个人防护,以防感染。此外,由于带毒蚊虫的叮咬可以传播本病,野外采样时还应做好蚊虫叮咬的生物安全防护,也要防范动物的爪、骨头和利器的刺伤。

7.2 样品的运输与保存

7.2.1 样品采集后,应尽可能在 4℃ 容器内冷藏运输,24 h 内送至实验室。对于不能 24 h 内送达实验室但不影响检验结果的样品,应以冷冻状态运送。样品的包装应防渗、防漏、防溢出,避免包装穿刺或损坏。样品运输应符合 NY/T 541 的要求。

7.2.2 样品在 4℃ 保存应不超过 24 h。若需长期保存,应置于-70℃ 以下保存,冻融不超过 3 次。

8 病毒分离与鉴定

8.1 主要仪器与设备

8.1.1 生物安全柜。

8.1.2 CO₂ 培养箱。

8.1.3 倒置生物显微镜。

8.1.4 台式低温高速离心机。

8.1.5 研钵和研杵(或冷冻组织匀浆机)。

8.1.6 细胞培养瓶。

8.1.7 0.45 μm 滤器。

8.1.8 移液器(10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL 等不同规格)。

8.2 主要试剂与材料

8.2.1 0.01 mol/L PBS(pH7.4),按照附录 A 中的 A.1 配制。

8.2.2 50%甘油-PBS 保存液,按照 A.2 配制。

8.2.3 青霉素,浓度为 10 000 IU/mL。

8.2.4 链霉素,浓度为 10 000 μg/mL。

8.2.5 细胞完全营养液和维持液,按照 A.3 配制。

8.2.6 BHK 或 Vero 细胞。

8.3 样品处理

8.3.1 组织样品

在生物安全柜内研磨或匀浆处理受检样品。分别取肝、脾、脑组织、淋巴结、流产物等组织病料 1 g,剪碎后加入 10 mL PBS 或细胞完全营养液(含青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 μg/mL)充分研磨,制成 10%的组织悬浮液,3 000 r/min 4℃ 离心 10 min,取上清液,经 0.45 μm 滤膜过滤后作为接种材料。经处理的样品当天使用,使用前置 4℃ 保存,剩余样品置于-70℃ 保存。

8.3.2 血液样品

取抗凝血 500 μL , 冻融 3 次, 3 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清。经处理的样品当天使用, 使用前置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 剩余样品置于 -70°C 保存。

8.4 病毒分离

8.4.1 样品接种

接种前一天用 T25 细胞瓶传代 HK-21 或 Vero 等, 待第二天细胞长至 80%, 取处理好的样品按 1 mL/瓶接种, 每个样品接种 2 瓶细胞, 另外设对照细胞 1 瓶。

8.4.2 接种细胞后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 60 min, 弃去上清液并以无菌 PBS 清洗 1 次, 加入含 2% 胎牛血清的细胞维持液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 5 d~6 d 并逐日观察细胞状态。当出现细胞变圆或脱落等细胞病变效应 (CPE) 时, 及时收获细胞培养物, 进入 8.5 病毒鉴定程序。如果没有出现 CPE, 应继续盲传 3 代, 进入 8.5 病毒鉴定程序。

8.5 病毒鉴定

将出现 CPE 或盲传三代的细胞培养物反复冻融 3 次, 取 200 μL 按第 9 章或第 10 章的规定做进一步核酸鉴定和分析, 其余细胞培养物置于 -70°C 保存。

8.6 结果判定

8.6.1 细胞盲传三代未见 CPE, 且经第 9 章或第 10 章所述方法检测为阴性者, 判定为 RVFV 分离阴性。

8.6.2 出现 CPE 或细胞盲传三代未见 CPE, 经第 9 章或第 10 章所述方法检测为阳性者, 判定为 RVFV 分离阳性; 否则, 判定为 RVFV 分离阴性。

9 RT-PCR

9.1 主要仪器与设备

9.1.1 PCR 扩增仪。

9.1.2 台式低温高速离心机。

9.1.3 电泳仪和水平电泳槽。

9.1.4 凝胶成像仪 (或紫外透射仪)。

9.1.5 研钵和研杵 (或组织匀浆机)。

9.1.6 移液器 (10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

9.1.7 冰箱 (2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 、 -20°C 、 -70°C)。

9.1.8 核酸提取仪。

9.2 主要试剂与材料

9.2.1 引物 (序列信息见附录 B 中的 B.1)。

9.2.2 DEPC 处理水, 按照附录 C 中的 C.1 配制。

9.2.3 TAE 缓冲液, 按照 C.2 和 C.3 配制。

9.2.4 1.5% 琼脂糖凝胶, 按照 C.4 配制。

9.2.5 一步法 RT-PCR 试剂盒 (商品化)。

9.2.6 RNA 提取试剂盒 (商品化)。

9.2.7 上样缓冲液。

9.2.8 提取阳性对照: 灭活的 RVFV 细胞培养物等。

9.2.9 反应阳性对照: 人工合成的含有 RVFV 目的基因的质粒或体外转录法制备的 RVFV RNA 片段 (序列信息见 B.2) 等。

9.2.10 提取阴性对照: BHK-21 等正常细胞对照、RVF 阴性动物抗凝血。

9.2.11 反应阴性 (空白) 对照: DEPC 处理水等。

9.3 操作方法

9.3.1 病毒核酸提取

采用 RNA 提取试剂盒(商品化)提取各类样本中的病毒核酸,或用自动化核酸提取仪提取各类样本中的病毒核酸。每次提取核酸时应设置核酸提取阳性对照和阴性对照。

9.3.2 反应体系配制

用一步法 RT-PCR 试剂盒(商品化)配制 25 μL 反应体系:

——12.5 μL 的 2 $\times$ 一步法 RT-PCR 反应缓冲液;

——1.0 μL 的正向引物 NS2g(10 $\mu\text{mol/L}$);

——1.0 μL 的反向引物 NS3a(10 $\mu\text{mol/L}$);

——1.0 μL 的酶混合物;

——3.0 μL 模板;

——6.5 μL 的 DEPC 处理水。

瞬时离心后,置于 PCR 扩增仪内进行扩增。每次检测应设置阳性对照和阴性对照。

注:反应体系可依据所用试剂盒的不同而适当改变。

9.3.3 RT-PCR 反应程序

50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

注:反应程序可依据所用的试剂盒不同而适当改变。

9.3.4 RT-PCR 扩增产物电泳

取 8 μL PCR 扩增产物,按上样缓冲液比例要求加入上样缓冲液混匀,加入到用 1 $\times$ TAE 缓冲液配制的 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,100V 电泳 30 min 左右。电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪中观察结果。

9.4 试验成立条件

阳性对照应出现 668 bp 大小的特异性扩增条带,阴性对照应无任何扩增条带。RT-PCR 产物电泳图见 B.3。

9.5 结果判定

被检测样品出现与阳性对照条带分子量大小相符的 668 bp 大小的特异性扩增条带,且 PCR 扩增产物经测序后序列比对为 RVFV 核酸则判定该样品为 RVFV 核酸阳性;被检样品无特异性扩增条带,则判定为 RVFV 核酸阴性。

10 实时荧光 RT-PCR

10.1 主要仪器与设备

10.1.1 荧光 PCR 扩增仪。

10.1.2 台式低温高速离心机。

10.1.3 研钵和研杵(或自动匀浆机)。

10.1.4 核酸提取仪。

10.1.5 冰箱(2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-70 $^{\circ}\text{C}$)。

10.1.6 移液器(10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

10.2 主要试剂与材料

10.2.1 引物和探针(序列信息见 B.4)。

10.2.2 一步法 RT-qPCR Mix 试剂盒(商品化)。

10.2.3 商品化核酸提取试剂盒。

10.2.4 提取阳性对照:灭活的 RVFV 细胞培养物等。

10.2.4 反应阳性对照:人工合成的含有 RVFV 目的基因的质粒或体外转录法制备的 RVFV RNA 片段(序列信息见 B.5)等。

10.2.4 提取阴性对照:BHK-21 等正常细胞对照、RVF 阴性动物抗凝血。

10.2.4 反应阴性(空白)对照:DEPC 处理水等。

10.3 操作方法

10.3.1 病毒核酸提取

同 9.3.1。

10.3.2 反应体系配制

用一步法 RT-qPCR Mix 试剂盒(商品化)配制 20 μ L 反应体系:

——10.0 μ L 的 2 $\times$ 一步法 Real-time RT-PCR 反应缓冲液;

——0.8 μ L 的上游引物(10 μ mol/L);

——0.8 μ L 的下游引物(10 μ mol/L);

——0.4 μ L 的探针(10 μ mol/L);

——3.0 μ L 的模板;

——5.0 μ L 的 DEPC 处理水。

盖紧 PCR 管盖或封膜,瞬时离心后,置于荧光 PCR 扩增仪内进行扩增。每次检测时,应设置阳性对照和阴性对照。

注:反应体系可依据所用试剂盒的不同而适当改变。

10.3.3 反应程序

50 $^{\circ}$ C 反转录 10 min;95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,57 $^{\circ}$ C 退火延伸 35 s,45 个循环,在每一个循环的 57 $^{\circ}$ C 时收集 FAM 荧光信号。

注:反应体系、反应程序可依据所用试剂盒及荧光定量 PCR 仪的不同而适当改变。

10.4 试验成立条件

提取阳性对照和反应阳性对照的 Ct 值应 ≤ 32 且出现特异性扩增曲线,提取阴性对照和反应阴性对照无 Ct 值且无特异性扩增曲线,试验结果有效。

10.5 结果判定

被检样品无 Ct 值或无特异性扩增曲线,判为 RVFV 核酸阴性;被检样品 Ct 值 ≤ 36 且出现特异性扩增曲线,判定为 RVFV 核酸阳性;被检样品 Ct 值 > 36 且出现特异性扩增曲线需复检,复检 Ct 值若 > 36 且出现特异性扩增曲线,判定为 RVFV 核酸阳性,若无特异性扩增曲线则判为 RVFV 核酸阴性。扩增曲线示意图见 B.6。

11 IgM 捕获 ELISA(仅用于检测牛、羊血清)

11.1 主要仪器与设备

11.1.1 酶标仪。

11.1.2 恒温培养箱。

11.1.3 冰箱(2 $^{\circ}$ C $\sim$ 8 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C、-70 $^{\circ}$ C)。

11.1.4 洗板机。

11.1.5 移液器(10 μ L、100 μ L、200 μ L、300 μ L、1 000 μ L 等不同规格)。

11.2 主要试剂

11.2.1 包被抗原:兔抗牛-羊 IgM 多克隆抗体。

11.2.2 重组 RVFV N 蛋白。

11.2.3 酶标抗体:HRP 标记抗 RVFV N 蛋白单克隆抗体。

11.2.4 对照:RVF 阳性对照血清、RVF 阴性对照血清。

- 11.2.5 包被缓冲液:磷酸盐缓冲液,按照附录 D 中的 D.1 配制。
- 11.2.6 洗涤缓冲液:0.05M TBST(含 0.1%吐温-20), pH 8,按照 D.2 配制。
- 11.2.7 封闭/稀释液:含 3%牛血清白蛋白(BSA)的 0.01 mol/L PBS, pH 7.4,按照 D.3 配制。
- 11.2.8 底物溶液: TMB 溶液,按照 D.4 配制。
- 11.2.9 终止液: 2 mol/L H₂SO₄,按照 D.5 配制。
- 11.3 操作方法
- 11.3.1 样品处理:常规方法分离血清。用无菌注射器直接采集血液至灭菌离心管或用一次性采血管采血,将样品室温静置 1 h,再于 4℃冰箱放置 1 h 或过夜,5 000 r/min 离心 5 min~10 min,无菌吸取上层血清,编号备用。
- 11.3.2 包被酶标板:用包被缓冲液将兔抗牛-羊 IgM 多克隆抗体稀释至终浓度 1 μg/mL,每孔 100 μL 包被 96 孔酶标板,室温孵育过夜。
- 11.3.3 洗板:每孔加 300μL 洗涤缓冲液洗涤 3 次,将酶标板在吸水材料上拍干。
- 11.3.4 封闭:酶标板每孔加入 300 μL 封闭/稀释液,于 37℃孵育 1 h。弃去孔内液体,将酶标板在吸水材料上拍干。
- 11.3.5 加样:将待检血清、阳性对照血清和阴性对照血清用抗体稀释液 1:5 稀释后按表 1 加入相应孔,表中 NC 为阴性血清,PC 为阳性对照血清,1—44 为待检血清样品,每孔加入 50μL,37℃孵育 1 h。按 11.3.3 洗板。

表 1

序号	封闭/ 稀释液	RVFV N 蛋白	封闭/ 稀释液	RVFV N 蛋白	封闭/ 稀释液	RVFV N 蛋白	封闭/ 稀释液	RVFV N 蛋白	封闭/ 稀释液	RVFV N 蛋白	封闭/ 稀释液	RVFV N 蛋白
1	NC	NC	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
2	NC	NC	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
3	PC	PC	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
4	PC	PC	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40
5	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41
6	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42
7	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43
8	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44

- 11.3.6 加重组 RVFV N 蛋白:用封闭/稀释液将重组 RVFV N 蛋白稀释至终浓度 1 μg/mL 加入偶数列孔,将封闭/稀释液加入奇数列孔,每孔加入 50 μL,37℃孵育 1 h。按 11.3.3 洗板。
- 11.3.7 加 HRP 标记的酶标抗体:每孔加入 50 μL 工作浓度的 HRP 标记的酶标抗体,37℃置于湿盒中作用 1 h。按 11.3.3 洗板。
- 11.3.8 加底物溶液:每孔加入 100 μL 底物溶液,室温孵育 15 min。
- 11.3.9 加终止液:每孔加入 100 μL 终止液,终止显色反应。
- 11.3.10 读值:在酶标仪 450 nm 波长读取结果。

11.4 计算

按以下公式计算样品与阳性对照比值百分比 (S/P):

$S/P = \text{样品净 OD 值} / \text{PC 净 OD 平均值}$ 。

式中:

净 OD 值=偶数列孔 OD 值-奇数列孔 OD 值。

阳性对照净 OD 值表示为:PC 净 OD。

阴性对照净 OD 值表示为:NC 净 OD。

11.5 试验成立条件

PC 净 OD 平均值>0.35,且 PC 净 OD 平均值/NC 净 OD 平均值>3,说明试验条件成立。

11.6 结果判定

$S/P \geq 0.5$, 判为裂谷热抗体阳性; $S/P \leq 0.4$, 判为裂谷热抗体阴性; $0.4 < S/P < 0.5$, 判为可疑, 可疑样品应进行复检, 如复检结果仍为可疑则于 2 周后重新采样检测。

12 综合判定

12.1 经 6.3 判定为疑似 RVF 病例时, 第 8 章、第 9 章、第 10 章、第 11 章任何方法检测为阳性者, 均可判为 RVF 确诊病例。

12.2 无明显临床症状的动物如羊、牛、马、骆驼等, 第 8 章、第 9 章、第 10 章任何方法检测为阳性者, 可判为 RVF 隐性感染。

12.3 当第 11 章判定为阳性, 若同时第 8 章、第 9 章、第 10 章任何方法检测为阳性者, 判为 RVF 确诊病例; 若第 8 章、第 9 章、第 10 章所有方法检测均为阴性, 判为曾经感染过 RVFV。

附录 A

(规范性)

病毒分离鉴定溶液的配制

A.1 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)

称取 8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.20 g 氯化钾(KCl)、1.42 g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.27 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),加去离子水溶解至 1 000 mL,调整 pH 至 7.4,103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min,室温保存。PBS 一经使用,于 4 ℃ 保存不超过 3 周。

A.2 50%甘油-PBS 保存液(pH 7.4)

将 0.01 mol/L PBS 与纯甘油(分析纯)等量混合,调整 pH 至 7.4,分装为小瓶,103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。室温或 4 ℃ 保存。

A.3 细胞完全营养液和维持液

A.3.1 MEM 基础营养液

称取 9.5 g MEM 干粉和 2.2 g 碳酸氢钠(NaHCO_3),加去离子水溶解至 1 000 mL,充分混匀,过滤除菌后 4 ℃ 保存备用。

A.3.2 200 mmol/L 谷氨酰氨溶液(母液)

称取 2.923 g 谷氨酰氨(L-glutamin),加去离子水配制成 100 mL 的溶液。

A.3.3 细胞完全营养液(pH 7.2)

900 mL 的 MEM 基础营养液加 100 mL 的灭活胎牛血清混合,配制成 1 000 mL 的溶液,加入青霉素至终浓度 100 IU/mL,链霉素至终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,谷氨酰氨至终浓度 2 mmol/L,4 ℃ 保存备用。

A.3.4 细胞维持液(pH 7.2)

1 000 mL 的 MEM 基础营养液,加入青霉素至终浓度 100 IU/mL,链霉素至终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,谷氨酰氨至终浓度 2 mmol/L,4 ℃ 保存备用。

附 录 B

(资料性)

核酸检测用引物、探针序列信息

B.1 RT-PCR 引物

表 B.1 列出了 RT-PCR 引物信息。

表 B.1 RT-PCR 引物信息

引物名称	序列 (5' - 3')	位置	产物大小	基因
NS2g	GATTTGCAGAGTGGTCGTC	62~80	668 bp	NSs 基因
NS3a	ATGCTGGGAAGTGATGAGCG	710~729		

B.2 NSs 基因序列

GenBank: KX785330.1

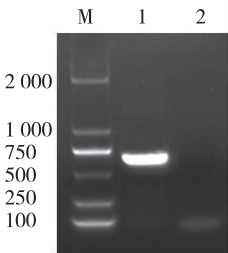
1 acacaaagac ccctagtgc ttatcaagta tatcatggat tactttcctg tgatatctgt
61 tgatttgcag agtggctgtc gtgttgtgtc agtggagtac attagagggtg atggctctcc
121 caggatacct tattctatgg ttgggccctg ttgtgtcttt ctcatgcacc atcgtcctag
181 tcacgagggt cgcttgcgat ttctgattt ctacaatgic ggagaattcc cgtaccgagt
241 cggacttgga gactttgcat caaacgttgc acctccacca gcaaagcctt ttcagagact
301 tattgatcta ataggccata tgactcttag tgatttcaca agattcccca atctgaaaga
361 agccatatcc tggcctcttg gagaaccctc cctggccttc ttgacctaa gctctactag
421 agtgcacagg aatgatgaca ttagaaggga tcagattgcc actctagcaa tgaggagctg
481 caagattacc aatgatctgg aagactcctt tgttggtta cacaggatga tagtgactga
541 ggctattctc agagggttg atctgtgcct gttgccagge tttgacctca tgtatgaggt
601 tgctcacgtc cagtgtgttc ggttcttgca ggcagcaaaa gaggacattt ctaatgctgt
661 agttccaaac tcagccctca ttgctcttat ggaggagagc ctgatgctgc gctcatcact
721 tcctagcatg atggggagaa acaactggat tccagtgtt cctccaatcc cagatgttga
781 gatggaatca gaggaggaga gtgatgatga tggatttgtt gaggttgact agaggttaat
841 gctgccccac cccccaccc ctaatcccg cgtaacccc aaccaccct tcccccaaa
901 cccctgggca gccacttagg ctgctgtctt gtacgectga gcagtgcca tgacagccgc
961 tgacggttc ccattagaat ccacaagccc aaaagcttc aggaattctc tctcttctc
1 021 atggcttata aagttgctat tcaatgctgc attcattggc tgcgtgaacg ttgcagcaac
1 081 ttctctcttt gttctacctc ggagggttgg gttgatgacc cgagagaact gcagcagata
1 141 cagagagtga gcatccaata tcgcccttag atagtctctt ggcagagaag ggtccaccat
1 201 gccagcaaag ctgggggtgca tcatatgcct tgggtatgca ggggatagge catccatggt
1 261 ggtccagctg acaggaagcc actcacttaa gacgaccaag gcctggcatg tccagccagc
1 321 caggggcgga gcgactcgtg atagagtcaa ctcatccgg gagggtatcc cctcttctag
1 381 cttgtacttg ttgatgagag cctccacagt agccttgccc tcttttgaca tttcatcat
1 441 catctccgg ggttgtgtgc cagagtttag agccagaaca atcattttct tggcctcctt
1 501 ctccagctcg gccccacat actgcttcaa gatttgata accctacggg catcaaatcc
1 561 ttgataagca aactctcgga ccaactgttc aatctcattg cggtcactg cttgagcagc
1 621 aaactggatc gcaagctctt gatagttgtc cattattgta atagtgtttg tatctctagg

1 681 gagctttgtg t

注:下划线加粗为引物序列。

B.3 RT-PCR 产物电泳图

RT-PCR 产物电泳图见图 B.1



标引序号说明:
M——DL 2000 DNA Marker;
1——阳性;
2——阴性。

图 B.1 RT-PCR 产物电泳图

B.4 实时荧光 RT-PCR 引物和探针

表 B.2 列出了实时荧光 RT-PCR 引物和探针信息。

表 B.2 实时荧光 RT-PCR 引物和探针信息

引物名称	序列(5′ - 3′)	位置	基因
RVS	AAAGGAACAATGGACTCTGGTCA	1164—1186	Gn
RVAs	CACTTCTTACTACCATGTCCTCCAAT	1233—1258	
RVP	FAM-5′-AAAGCTTTGATATCTCTCAGTGCCCCAA-3′-TAMRA	1204—1231	

B.5 Gn 基因序列

GenBank: KX785331.1 Gn 487—2087

481 aggacctca tctcagaaac agaccaggga agggacataa ctacattgac gggatgactc
541 aggaggatgc cacatgcaaa cctgtgacat atgctggggc atgtagcagt ttgatgttt
601 tgctcgaaaa gggaaaattc ccctcttcc agtcatatgc tcatcataga actctactag
661 aggcagtcca cgacaccatc attgcaaagg ctgatccacc tagctgtgat ctccagagtg
721 ctcatgggaa tccttgcacg aaagagaaac tcgtgatgaa gacacactgt ccaaatgact
781 accagtcagc tcattacctc aacaatgacg ggaaaatggc ttcagtcaag tgcctccta
841 agcatgagct tactgaggac tgcaactttt gtaggcagat gacaggtgct agcttgaaga
901 aggggtctta tcctctccag gacttatttt gtcagtcaag ttaggatgat ggatcaaaac
961 taaagacaaa aatgaaaggg gtctgcgaag tgggggttca ggcactcaaa aagtgtgatg
1 021 gccaaactcag cactgcacat gaggttgtgc ctttgcagt gtttaagaat tcaaagaagg
1 081 tttatcttga caagcttgac ctaagactg aagaaaatct gctaccagac tcatttgtct
1 141 gctttgagca taaggacag tataaaggaa caatggactc tggtcagact aagagggagc
1 201 tcaaaagctt tgatatctct cagtgcccca agattggggg acatggtagcaagaagtgca
1 261 ctggggacgc agcattttgc tctgcttatg agtgtactgc tcaatatgcc aatgcctatt
1 321 gttcacatgc taatgggtct gggattgtac agatacaagt atccggggtc tggaagaagc
1 381 ctttatgtgt ggggtatgag agagtgggtg tgaagagaga actctctgcc aagcccatcc
1 441 agagagttga gccttgaca acttgcataa ccaaatgtga gcctcatgga ttggtgtgcc

1 501 gatcaacagg gttcaagata tcactgcag ttgcttgtc cagcggagtt tgcgtcacag
1 561 gatcgagag cccttctact gagatcactc tcaagtatcc agggatatcc cagtcctctg
1 621 ggggggatat aggggttcac atggcacatg atgatcagtc agttagctcc aaaatagtgg
1 681 ctactgccc ccccaggac ccgtgcctag tgcattgctg catagtgtgt gctcatggct
1 741 tgataaatta ccagtgtcac actgctctta gtgcttttgt tgttgtgttc gtattcagct
1 801 ctgttgcaat aatttgtctg gccattcttt ataaggtgct cagggtgccta aagattgccc
1 861 caaagaaagt tctgaatcca ctaatgtgga tcaatgctt catcagatgg gtgtataaga
1 921 agatgggtgc cagagtggca gacaatatca atcaagtga cagagaaata ggatggatgg
1 981 aaggaggcca gttggctcta gggaaccctg caccattcc tcgtcatgct ccgattccac
2 041 gttatagcac atacctaag ctactattga ttatctcata tgcacagca ttttcagaac

注：下划线加粗为引物序列。反向引物 RVAs 对应的此序列 1 238、1 250 位碱基分别是 g 和 c，为了和 WOH 推荐引物一致合成的时候可以将 1 238、1 250 位改为引物对应的 a 和 t，不改也可以，敏感性、特异性不受影响。

B.6 实时荧光 RT-PCR 扩增曲线图

实时荧光 RT-PCR 扩增曲线示意图见图 B. 2。

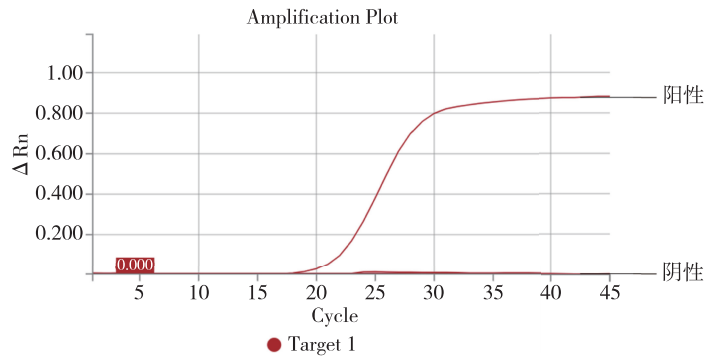


图 B. 2 RVFV 核酸荧光 RT-PCR 典型扩增曲线示意

附 录 C

(规范性)

核酸检测相关溶液的配制

C.1 DEPC 处理水

取 1 mL DEPC 加入去离子水至终体积 1 000 mL,充分混匀后将瓶盖拧松,置于 37 ℃放置过夜,高压灭菌。室温或 4 ℃保存备用。

C.2 50×TAE 储存液

取 242 g 的 Tris 碱、37.2 g 的 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、57.1 mL 的冰醋酸,加 800 mL 去离子水充分溶解,混匀后加去离子水定容至 1 000 mL。室温保存。

C.3 1×TAE 缓冲液

使用前,将 50×TAE 进行 50 倍稀释即可。

C.4 1.5%琼脂糖凝胶

称取 1.5 g 琼脂糖放入 100 mL 的 1×TAE 电泳缓冲液中,加热融化,待温度降至 50 ℃~60 ℃时,加入 2.5 μL 核酸染料 Gold View(10 mg/mL),混匀后制备凝胶块。

附 录 D

(规范性)

酶联免疫吸附试验溶液的配制

D.1 包被缓冲液

称取 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na_2HPO_4 和 0.24g KH_2PO_4 ，溶于 800 ml 蒸馏水中，用 HCl 调节溶液的 pH，至 7.4，加蒸馏水定容至 1 L。

D.2 洗涤缓冲液

称取 6.052 g Tris、8.766 g NaCl，加入 800 ml 纯水溶解，调节酸碱度至 pH8，加 1 mL 吐温-20，定容至 1 000 mL。

D.3 稀释及封闭液

称取 3 g 牛血清白蛋白(BSA)，溶于 100mL 的 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中，充分混匀，现配现用。

D.4 底物溶液(TMB)

A 液：称取 20 mg 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)，加入到 10 mL 无水乙醇(分析纯)中，待充分溶解后加去离子水定容至 100 mL。用 0.45 μm 滤膜过滤后，避光 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 棕色瓶保存。

B 液：取 7.17 g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.93 g 的柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)和 0.64 mL 的过氧化氢尿素溶液(0.75%)，加去离子水定容至 100 mL，调整 pH 至 5.0 ~ 5.4。

用法：使用时，将 A 液、B 液按 1 : 1 的比例混合，现配现用。

D.5 终止液(2 mol/L H_2SO_4)

将 11.10 mL 浓 H_2SO_4 缓慢加入到 88.90 mL 去离子水中，混匀，冷却至室温。
