

狂犬病诊断技术



涂长春 博士

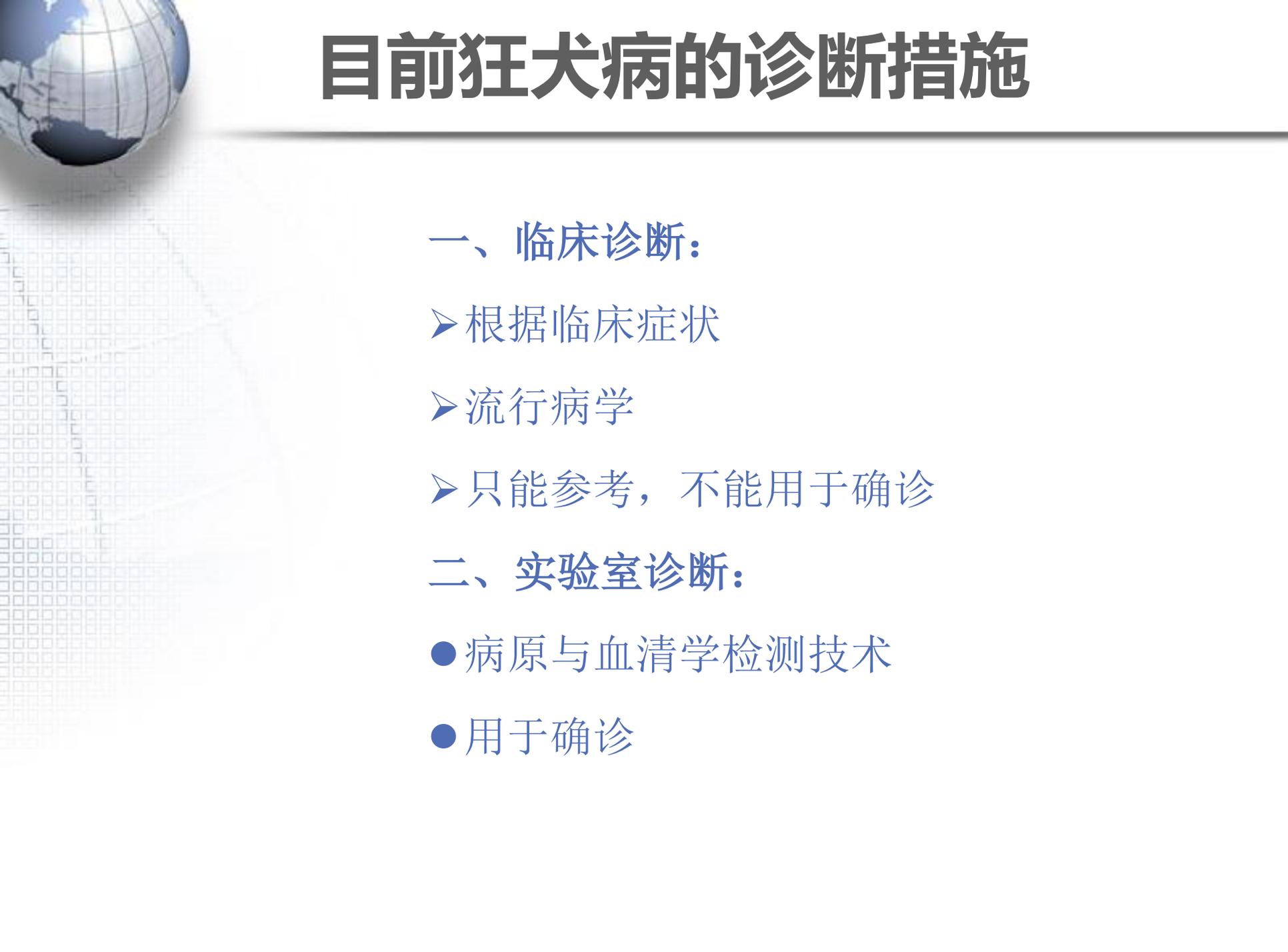
Email: changchun_tu@hotmail.com

<http://cvrirabies.bmi.ac.cn>

军事医学科学院军事兽医研究所

中国农科院长春兽医研究所

世界动物卫生组织（OIE）狂犬病参考实验室



目前狂犬病的诊断措施

一、临床诊断：

- 根据临床症状
- 流行病学
- 只能参考，不能用于确诊

二、实验室诊断：

- 病原与血清学检测技术
- 用于确诊



用于狂犬病检测的样品

一、病毒检测

- ✓脑组织：人和动物
- ✓唾液：人和动物
- ✓脑脊液：病人
- ✓皮肤活检：病人

二、抗体检测：

- ✓血清：人和动物



目前狂犬病诊断现状

- 现状：人主要靠临床诊断，动物主要靠实验室诊断
- 标准：实验室诊断是国际上确认狂犬病的唯一依据
- 结论：能否开展实验室检测是国际上判定一个国家狂犬病防治水平的重要指标，是狂犬病防治最基本的技术能力。



狂犬病实验室检测技术

三位一体检测技术
实验室诊断全覆盖

狂犬病实验室
诊断

1

病毒抗原检测

2

病毒核酸检测

3

血清学检测

狂犬病实验室检测技术国际标准

一、采样技术

- ✦ 吸管法（脑组织）

二、病原检测（抗原与核酸）

- ✦ 免疫荧光抗体检测（Fluorescent antibody test，FAT）
- ✦ 快速免疫诊断法（Rapid immunodiagnostic test，RIDT）：免疫酶技术，免疫组化法（dRIT）。只需普通光镜，不需荧光显微镜。
- ✦ 组织学检测：Negri bodies. 已淘汰。
- ✦ 核酸检测：RT-PCR，荧光定量PCR，基因探针或芯片等；
- ✦ 单抗测定、序列测定与系统发生分析

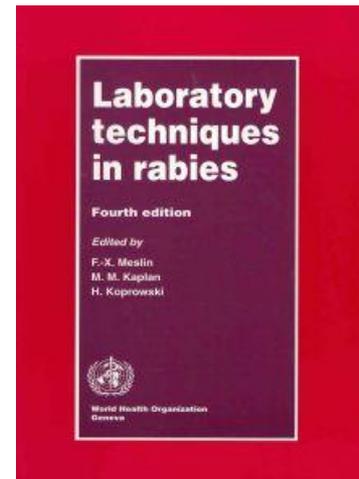
三、病毒分离

- ✦ 细胞培养（RTCIT）
- ✦ 小鼠接种试验（MIT）

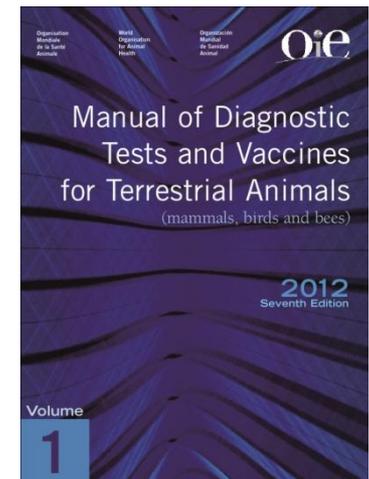
四、血清学检测

- ✦ 荧光抗体中和实验（FAVN）
- ✦ 快速荧光灶抑制试验（RFFIT）
- ✦ ELISA：各种抗体检测试剂盒

WHO标准



OIE标准



脑组织样品的采集

吸管采集法——WHO、OIE共同推荐

- 适合大规模的流行病学调查；
- 适于野外采样；
- 操作简单,不容易引起气溶胶。
- 污染面积小；
- 涉及到的实验器材少。



取直径0.5mm吸管，沿枕骨大孔向一只眼的方向插入，边插边轻轻旋转至不能深入为止，捏紧吸管后端并拔出，管里即含有脑组织样品（包括脑干、小脑、海马角和皮质）。

脑组织样品的采集



把死亡犬颈部往前弯曲，切开枕部和第一颈椎间的皮肤、韧带和肌肉。



暴露枕骨大孔

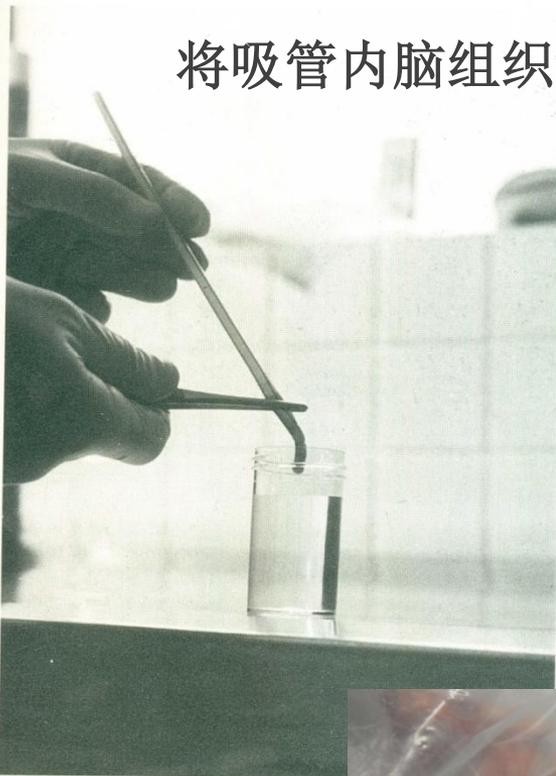


插入吸管

脑组织样品的采集

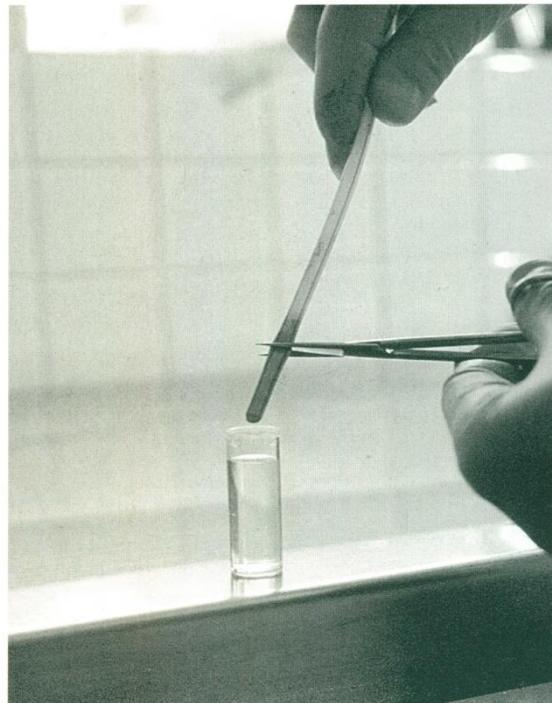
Fig. A1.6 Transferring a specimen from the straw solution

将吸管内脑组织移入样品管

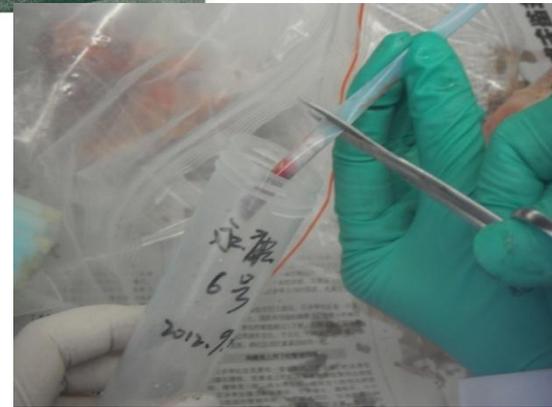


By courtesy of J. Barrat.

Fig. A1.7 Preserving a specimen collected by the straw in a glycerol solution



By courtesy of J. Barrat.



脑组织样品的采集

样品的包装



主容器



次级容器



吸收性材料



低温冷藏

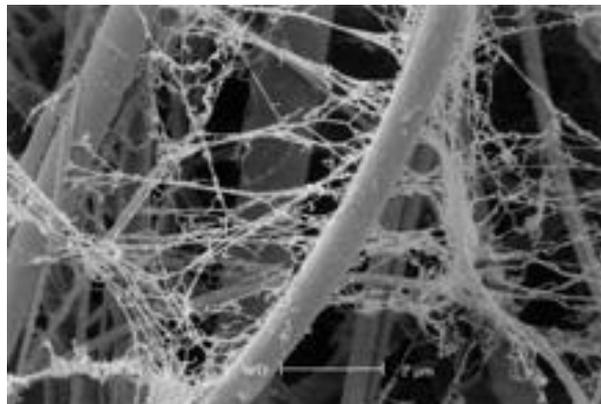


外包装



脑组织样品的采集

FTA卡片法



<http://www.whatman.com>

Picard-Meyer et al., 2007

优点:

- ✓ 灭活病毒，不破坏核酸
- ✓ 室温长期保存
- ✓ 方便运输，特别是国际样品寄送

缺点:

- ✗ 灵敏度较低，
- ✗ 重复点样



狂犬病病毒荧光抗体试验

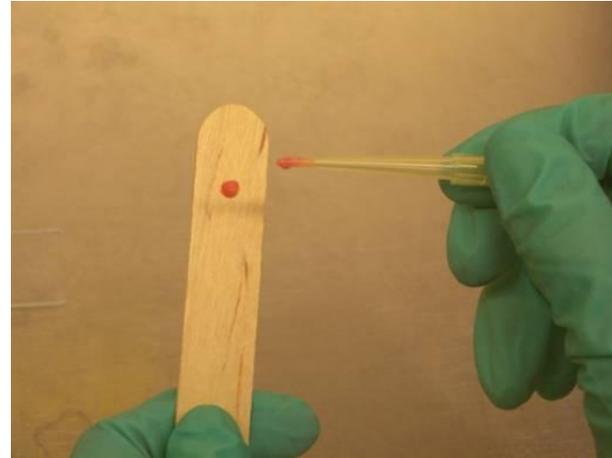
- 狂犬病病毒荧光抗体试验
Rabies fluorescent antibody test (FAT)
- 准确性98-100%，全球最常用的方法
- 国际金标准：WHO和OIE
- 国家标准GB/T18639-2002 “狂犬病诊断技术”。
- 每个实验室的必备技术

适用范围：适用于动物脑组织、延髓样品和感染病毒的细胞的检测。

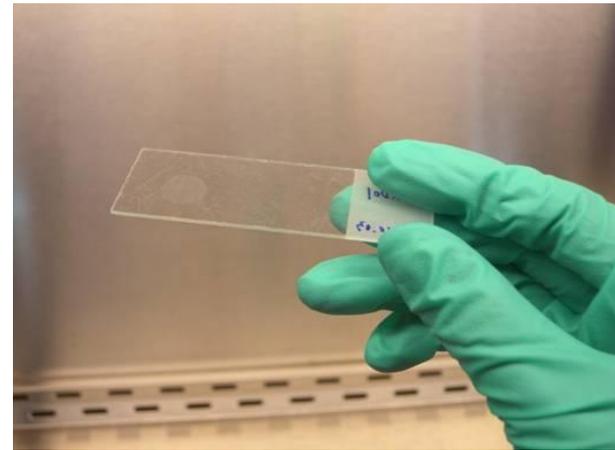
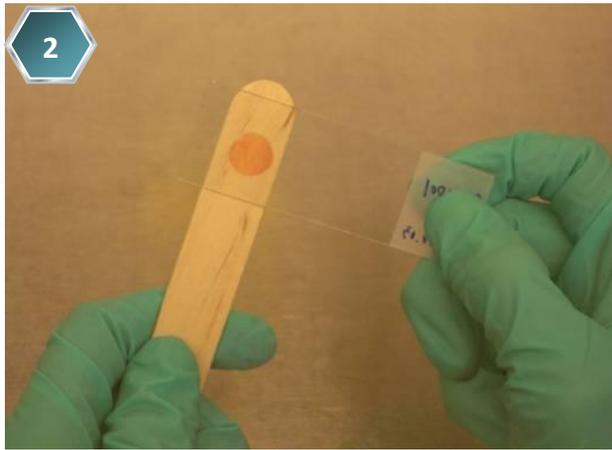
优点：特异性强、敏感性高、操作简单，能在2小时内得到检测结果。

缺点：需要荧光显微镜、荧光素标记的抗狂犬病病毒抗体和具有经验丰富的专业技术人员。

狂犬病病毒荧光抗体试验



Tip头挑取0.02 g待检脑组织置于压舌板上

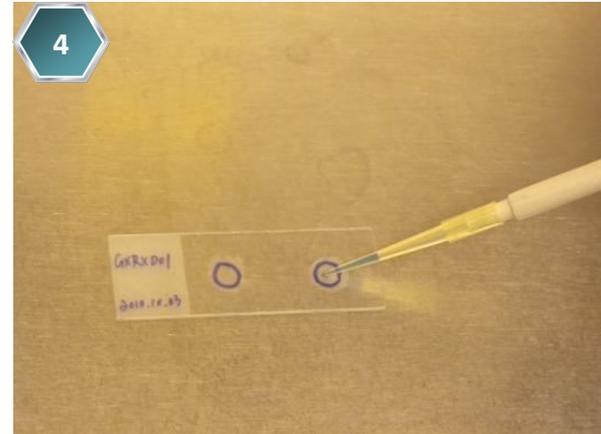


在载玻片上抹2个直径约1cm的印记

狂犬病病毒荧光抗体试验



3 冷丙酮固定至少 20 min



4 滴加荧光抗体工作液
(4 × 荧光抗体、10000 × 伊文思蓝)



5 37°C 孵育 至少 30 min



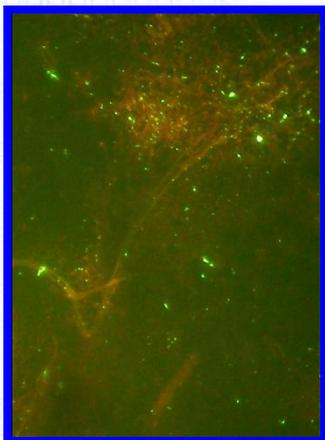
6 荧光显微镜下观察



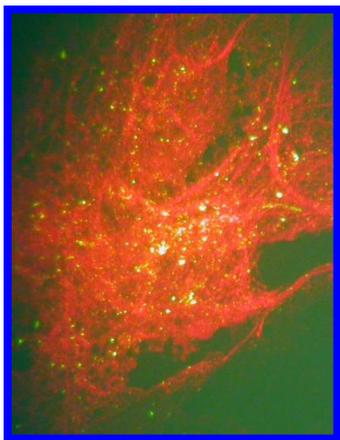
狂犬病病毒荧光抗体试验

实验结果的判定:

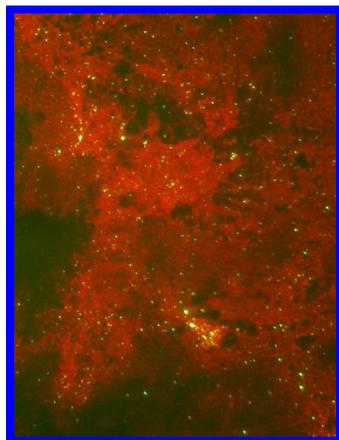
犬



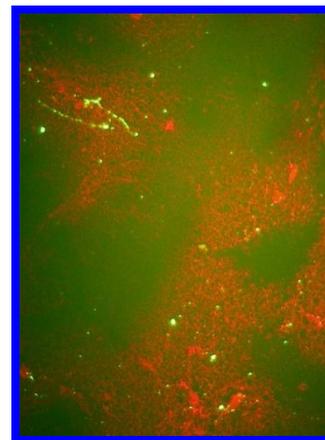
牛



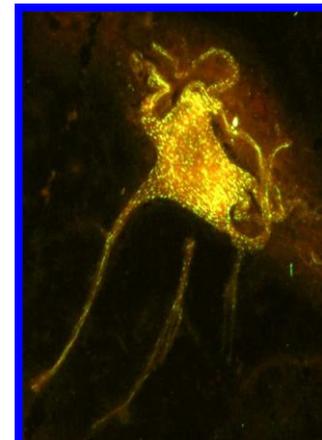
羊



猪



神经元



犬

阴性脑组织样品

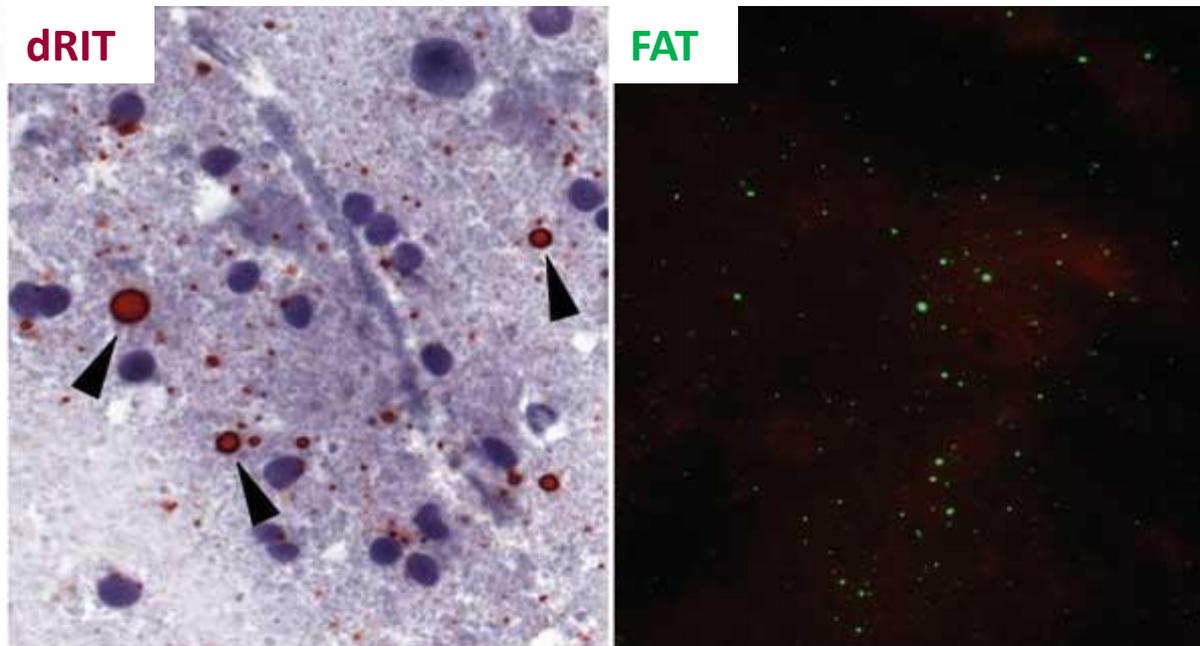




直接免疫组化法

直接免疫组化法 **Direct Immunohistochemistry test (dRIT)**

- 敏感性、特异性与FAT一样
- 不需荧光显微镜
- 特别适合现场检测或发展中国家实验室



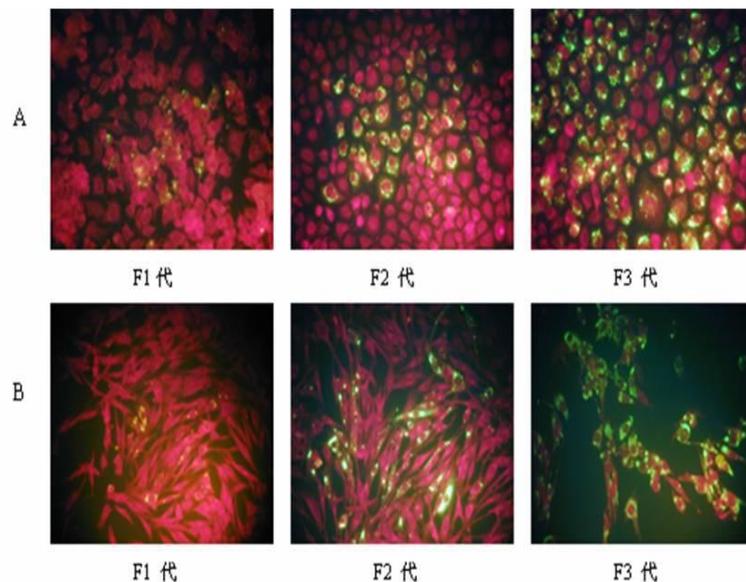
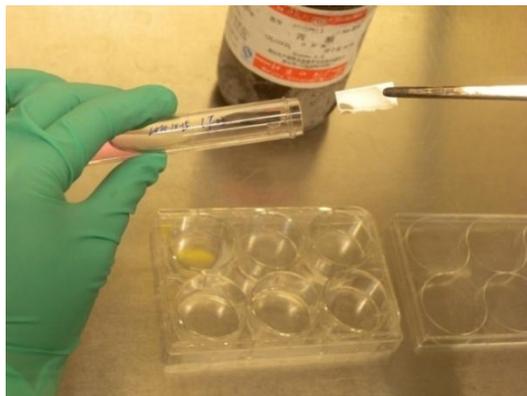
Lembo et al. 2006;
Niezgoda et al., 2009



狂犬病病毒组织培养感染试验

Rabies Tissue Culture Isolation Test (RTCIT)

- WHO和OIE推荐的狂犬病诊断的确诊方法
- 国家标准GB/T18639-2002 “狂犬病诊断技术”
- 优点：结果可靠、灵敏度高
- 缺点：费时，技术条件高





乳鼠脑内接种实验

- Mouse inoculation test (MIT)
- 国际标准、国家标准GB/T18639-2002 “狂犬病诊断技术”

使用可疑动物脑组织悬液通过颅内注射方式接种乳鼠，发病乳鼠的典型症状：竖毛，镊子夹其尾部倒提时出现震颤，行动时后腿运动失调、麻痹，最终死亡。

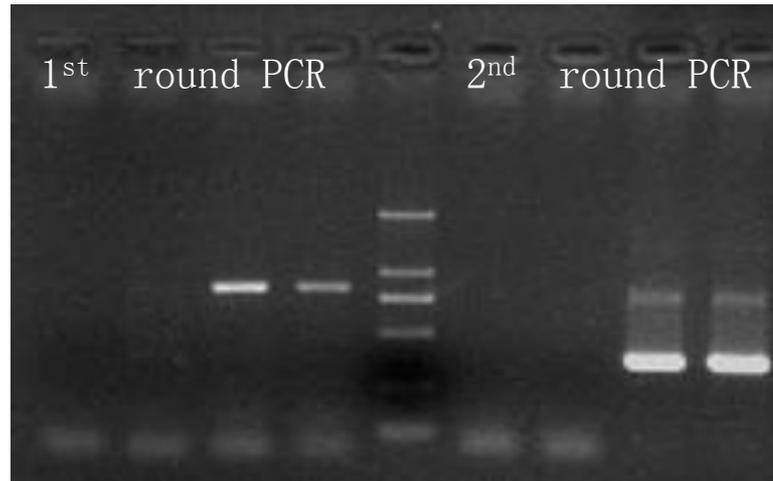
- 适用范围：用于确诊、病毒分离与毒力测定等方面。
- 优点：敏感、适用于不具备组织细胞培养条件的实验室进行狂犬病病毒的分离。
- 缺点：耗时长、生物安全条件高，不利于动物福利。



病毒核酸检测方法

套式RT-PCR方法：OIE推荐，但不能用于确诊

PCR扩增结果



适用范围：

1. 满足兽医部门对狂犬病检测的需要。
2. 开展狂犬病分子流行病学研究，大规模筛查。

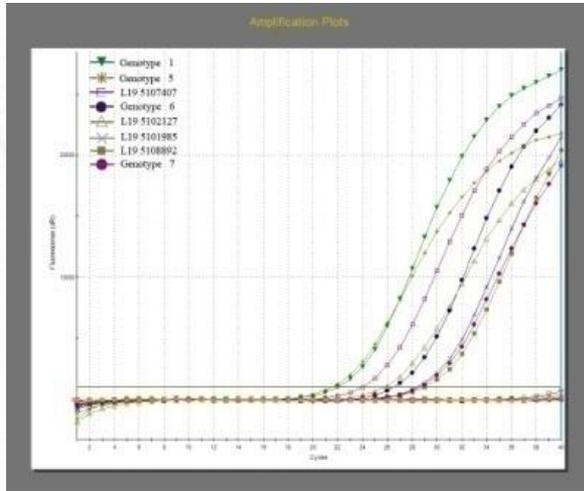
试剂盒特点：

1. 高检测灵敏度，检测底线为0.02个TCID₅₀。
2. 检测时间短，可在8个小时内完成96份样品的检测工作。

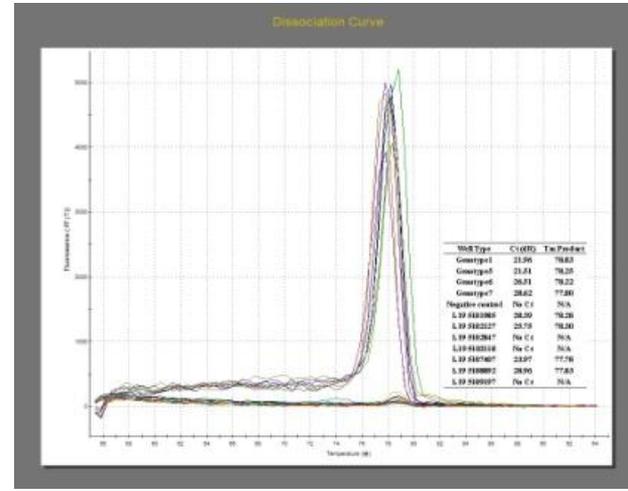


病毒核酸检测方法

荧光定量PCR（Taqman RT-PCR）方法：OIE推荐，但不能用于确诊



A



B

适用范围：

1. 满足兽医部门对临床样本快速检测的需要。
2. 将反转录与荧光定量PCR方法整合一步，降低交叉污染的几率，3h内就可完成。。

试剂盒特点：

1. 快速、灵敏、精确定量、可重复性好
2. 可检测4.68个TCID₅₀的细胞毒样品。

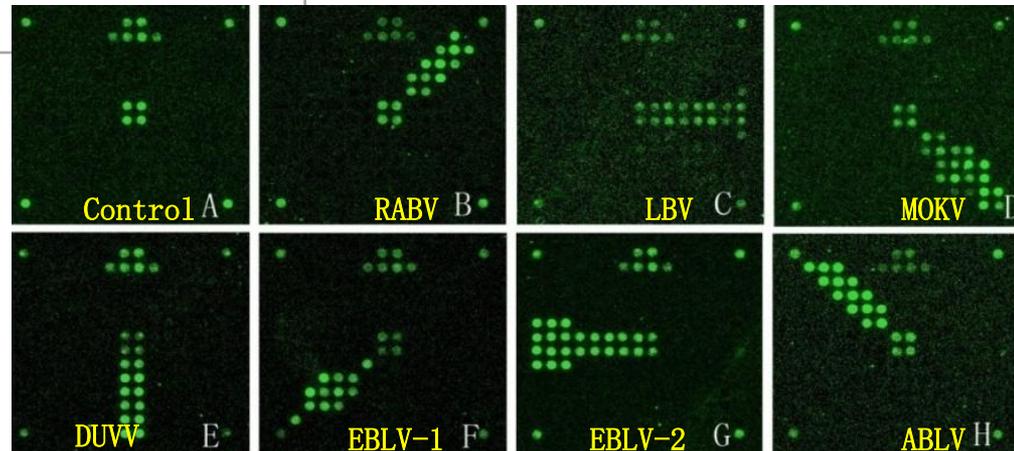
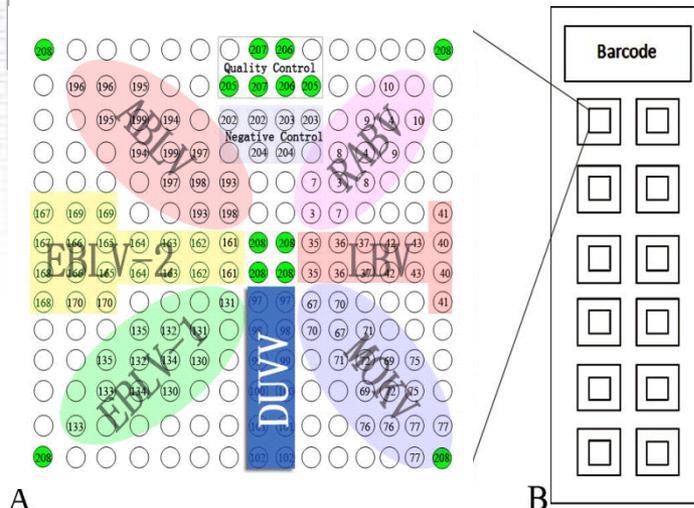


病毒核酸检测方法

新技术

基因分型芯片分型鉴定:

够特异性鉴别**狂犬病病毒属7种主要成员**的基因芯片方法 (LyssaChip), 快速、高通量检测和**分型**, 具有传统测序分型鉴别方法无法比拟的优势。



LyssaChip

J Clin Microbiol, 50(3): 619-25

不同检测方法灵敏度比较

套式RT-PCR、定量RT-PCR和基因芯片三种方法的检测SRV9株细胞毒RNA。结果：
基因芯片的检测灵敏度是另外两种检测技术的10倍，其最低检测滴度可达到0.158个TCID₅₀/ml
荧光定量RT-PCR方法与套式RT-PCR方法相比，灵敏度相当，均可灵敏的检测到10^{0.2} TCID₅₀/ml滴度的病毒。

细胞毒SRV9的滴度	检测方法		
	套式RT-PCR	荧光定量RT - PCR	基因芯片 LyssaChip
10 ^{2.2} TCID ₅₀ /ml	6/6	6/6	6/6
10 ^{1.2} TCID ₅₀ /ml	6/6	6/6	6/6
10 ^{0.2} TCID ₅₀ /ml	5/6	4/6	6/6
10 ^{-0.8} TCID ₅₀ /ml	0/6	0/6	2/6

不同检测方法检测人工腐败性样品

1. FAT能检测到腐败6天以内的脑组织样品
2. 定量RT-PCR和RT-PCR能检测到腐败17天以内的脑组织样品
3. MIT不能检测腐败的脑组织样品

腐败时间 (d)	FAT*	套式RT-PCR*	荧光定量RT-PCR*	MIT*
1	+/+	+/+	+/+	-/-
2	+/+	+/+	+/+	-/-
3	+/+	+/+	+/+	-/-
4	+/+	+/+	+/+	-/-
5	+/+	+/+	+/+	-/-
6	+/+	+/+	+/+	-/-
7	+/-	+/+	+/+	-/-
8	-/-	+/+	+/+	-/-
9	-/-	+/+	+/+	-/-
10	-/-	+/+	+/+	-/-
11	-/-	+/+	+/+	-/-
12	-/-	+/+	+/+	-/-
13	-/-	+/+	+/+	-/-
14	-/-	+/+	+/+	-/-
15	-/-	+/+	+/+	-/-
16	-/-	+/+	+/+	-/-
17	-/-	+/+	+/+	-/-

注：“+”为检测阳性；“-”为检测阴性。*分子为TJ105毒株、分母为CQQJ-09毒株



病毒核酸检测方法

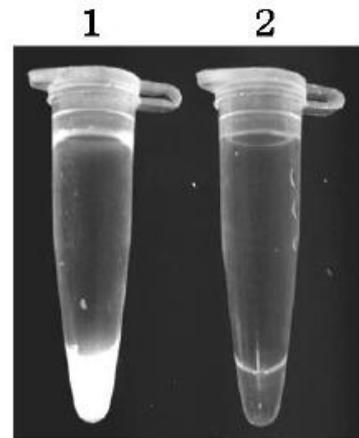
新技术

环介导的等温核酸扩增（LAMP）：

克服了PCR技术需要昂贵的仪器设备的缺点，只需使用等温水浴就可以完成所有的反应。产物可以**不需任何仪器即时观察**，非常适合于基层及现场使用。

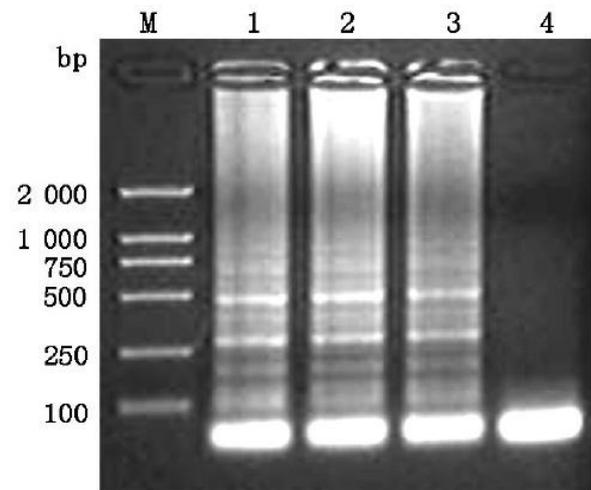
LAMP法和传统PCR法的敏感性一致，但整个试验过程比普通PCR法**节省时间**1.5 h。

中国兽医学报.2010,30(11):1476-1479.



LAMP扩增产物荧光显色结果

1. 狂犬病病毒ERA株细胞毒; 2. 健康犬脑组织样本



LAMP扩增产物电泳结果

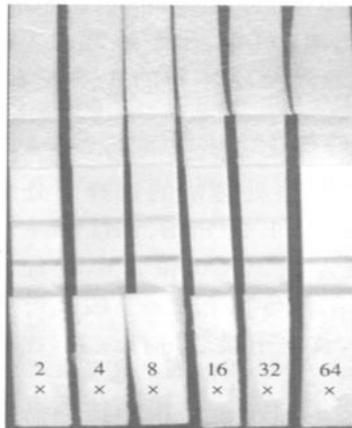


金标试纸条

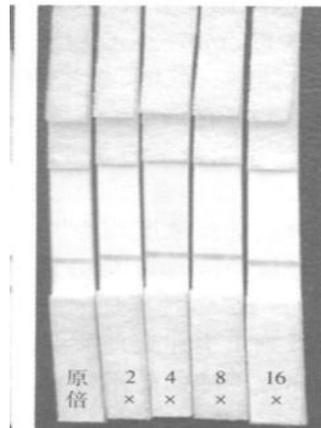
新技术

狂犬病病毒的金标试纸条

突破了实验仪器的限制，所需样品量少、检测速度快（仅需30min）、操作简单等无可比拟的优势，非常适于临床快速检测和现场应用。



狂犬病病毒阳性样品



阴性样品

灵敏度实验结果



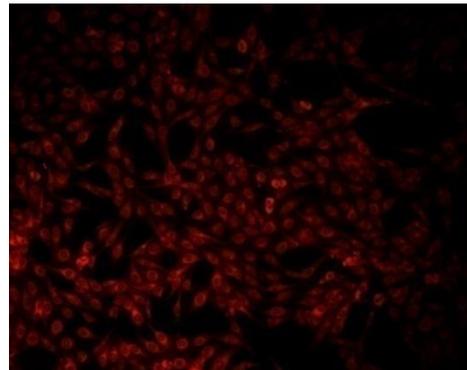
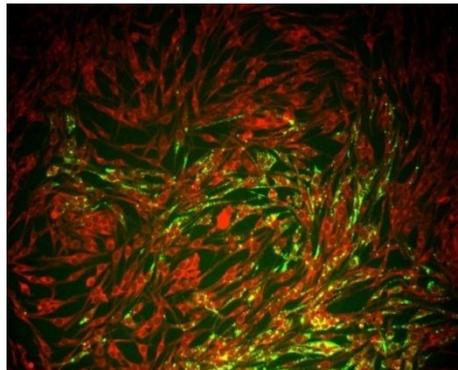
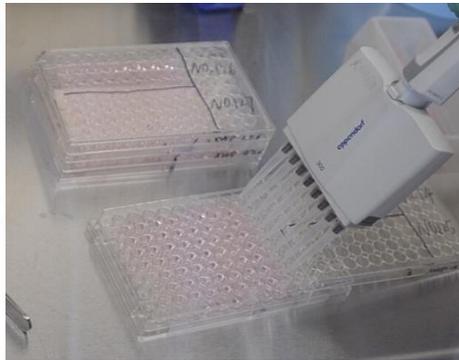
特异性实验结果

狂犬病抗体检测

荧光抗体中和试验 (FAVN)
快速荧光灶抑制试验 (RFFIT)

狂犬病抗体检测“金标准”

WHO和OIE共同推荐的标准方法，适合于国际贸易。可以准确定量血清中的抗体水平，因此特别适用于免疫效果评价、宠物出国抗体检测等。





狂犬病抗体检测

抗体ELISA

- OIE推荐方法，
- 定性，不能定量或定量不准确
- 大规模抗体普查，容易高通量、自动化
- 商业化试剂盒品种较多



狂犬病抗体检测

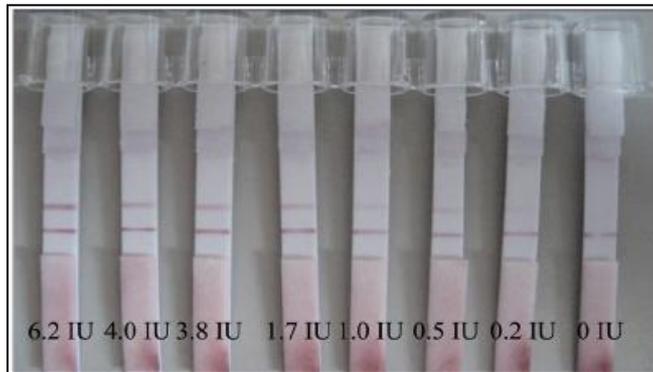
新技术

狂犬病抗体胶体金检测试纸

能在**20min**内快速判断抗体是否达到保护效力，
可以为犬免疫后的抗体监测提供参考。

➤目前试纸条已经获得国家专利，专利号：
200610016961.0，

➤该方法正在申请兽用新生物制品，临床批件号
200824。



中华人民共和国农业部 兽用生物制品临床试验批件

受理号：0702000249

批件号：200824

项目名称	狂犬病病毒抗体免疫金标检测试纸临床试验审批		
申请单位名称	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
申请单位地址	长春市青龙路1068号(130062)		
申请单位联系人	黄耕	联系电话	13894889069 0431-87983154
中试单位名称	吉林省五里动物保健药厂		
中试单位地址	吉林省长春市西安大路5333号(130062)		
中试单位联系人	王玉平	联系电话	13943065999 0431-87874999
试制产品的批号	080201、080202、080203、080301、080302		
试制产品的数量	5批(每批3000条)		
拟临床试验地点	宁德市畜牧兽医站、福清市畜牧兽医中心、泉州市畜牧兽医站		
有效期限	2008年07月23日—2009年07月22日		
审批结论	同意申请单位于规定时间内在拟定地点进行临床试验。		
主送单位	中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所		
抄送单位	福建省畜牧兽医局、吉林省农业管理局、中国兽医药品监察所		
备注	临床试验用制品只允许在指定地点进行试验，并按批准时间完成试验，不允许销售。试验中因制品质量而产生的不良后果由研制单位负责。福建省畜牧兽医局要做好临床试验的监督管理工作。		

盖章：
日期：



J Virol Methods.2010,80-85.



狂犬病抗体检测

新技术

重组狂犬病病毒rHEP-eGFP，建立狂犬病病毒中和试验检测方法FAVN-eGFP。

该方法不仅同标准FAVN一致性良好，而且无需固定、染色步骤，方便快捷。最重要的FAVN-eGFP与CVS-11株相比，更加安全稳定，在普通实验室中进行即可。

国家专利申请号：201210346779.3

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102864129 A
(43) 申请公布日 2013.01.09

(21) 申请号 201210346779.3 (51) Int. Cl.
 (22) 申请日 2012.09.19 C12N 7/01 (2006.01)
 (71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所 C12N 15/63 (2006.01)
 地址 130122 吉林省长春市净月经济开发区 G01N 33/269 (2006.01)
 柳莺西路 666 号 C12N 1/83 (2006.01)

(72) 发明人 夏威柱 杨松涛 薛向东 郑学星
 高玉伟 冯娜 王化磊 王承宇
 黄科 王铁成 赵永坤

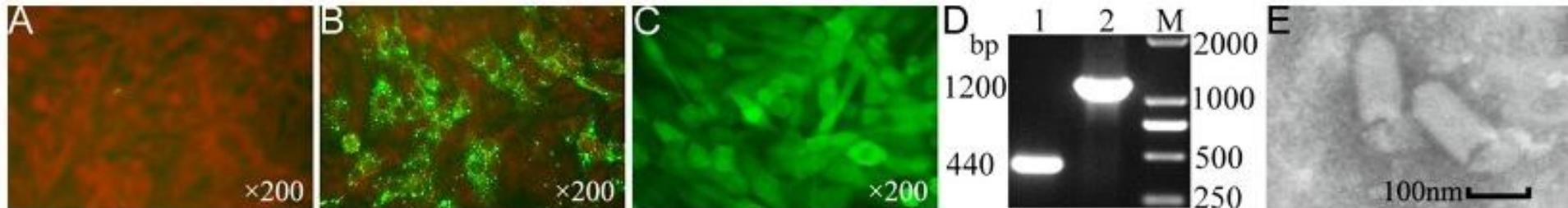
(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限公司 22100
 代理人 陈宏伟

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

(84) 发明名称
一种标准攻击毒株 CVS-11 的重组病毒及其制备方法

(87) 摘要
本发明提供一种标准攻击毒株 CVS-11 的重组病毒及其制备方法,利用反向遗传学方法建立了狂犬病病毒国际标准攻击毒株 CVS-11 的反向遗传操作系统,为进一步修饰或改造 CVS-11 基因组结构提供有效平台,为从分子水平上研究狂犬病病毒的致病机理、抗原位点及毒力决定位点等奠定了基础。在 CVS-11 反向遗传操作系统的基础上,构建了基于国际标准攻击毒株 CVS-11 的重组病毒 rCVS-11-eGFP。rCVS-11-eGFP 在增殖过程中表达 eGFP,可用于直接观察病毒的增殖状态及扩散。利用 eGFP 无毒性,可以不需依赖任何辅助因子或其他基质而自主发光等特点,将 rCVS-11-eGFP 作为检测抗原,用于测定狂犬病病毒中和抗体效价,结果判定时,无需固定染色等操作,经济便捷。

102864129/3





狂犬病诊断实验室能力与管理

- 标准方法
- 标准操作程序
- 规范管理
- 技术比对

实验室规范化管理

ISO/IEC 17025:2005

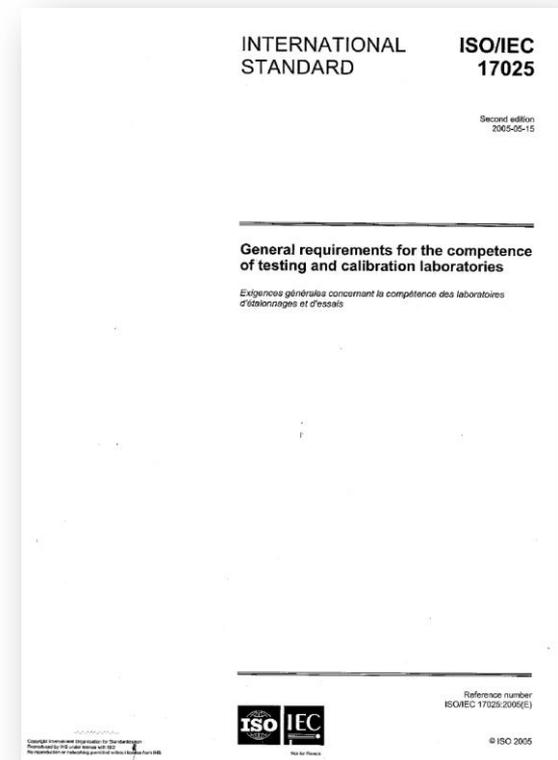
General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

ISO 17025 contains “*all of the requirements that testing and calibration laboratories have to meet if they wish to demonstrate that they operate a management system, are technically competent and are able to generate technically valid results*”

The ISO 17025 standard is comprised of 5 elements:

1. *Scope*
2. *Normative References*
3. *Terms and Definitions*
4. *Management Requirements*
5. *Technical Requirements*

Elements 4 and 5 contain the actual accreditation requirements.



实验室规范化管理

1

建立健全标准化操作程序

实验标准操作程序

1. 临床样品的处理
2. 荧光抗体实验 (FAT)
3. 套式RT-PCR方法
4. 荧光定量PCR方法
5. 荧光抗体中和实验 (FAVN)
6. 乳鼠脑内接种实验 (MIT)
7. 组织培养分离实验 (RTCIT)
8. 病毒滴度测定实验 (TCID₅₀测定)
9. 毒株保藏标准操作规程

实验室规范化管理

1

建立健全标准化操作程序

仪器设备使用标准 操作程序

1. 高速离心机操作规程
2. 显微镜操作规程
3. 荧光显微镜操作规程
4. 制冰机操作规程
5. 二氧化碳培养箱器操作规程
6. 超低温冰箱操作规程
7. 电子天平期间核查规程
8. 电热恒温培养箱操作规程
9. 自动化核酸提取工作站操作规程
10. 组织破碎仪操作规程
11. 全自动控温水浴锅操作规程
12. 生物安全柜操作规程
13. 实时定量PCR扩增仪操作规程
14. 多功能酶标仪操作规程
15. pH计使用操作规程
16. 浓度测定仪操作规程
17. 高压灭菌器操作规程
18. ISOCage通气笼操作规程



实验室规范化管理

2

建立健全规章制度

1. 检测实验监督工作计划
2. 实验室安全检查记录
3. 废弃物处理记录
4. 试剂采购申请
5. 供应品验收记录
6. 毒株使用记录
7. 细胞冻存记录

其他规定记录

样品登记表

毒株使用登记表

细胞冻存登记表

实验室试剂订购登记表

序号	试剂名称	生产商	规格	单位	数量	日期	使用人	用途	备注
001	DMEM	Gibco	细胞培养基	升	2	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
002	胎牛血清	Gibco	血清	升	2	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
003	青霉素	Amersham	抗生素	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
004	链霉素	Amersham	抗生素	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
005	胰岛素	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
006	转铁蛋白	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
007	硒蛋白	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
008	β-2微球蛋白	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
009	转铁蛋白	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
010	胰岛素	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
011	转铁蛋白	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
012	胰岛素	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
013	转铁蛋白	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
014	胰岛素	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml
015	转铁蛋白	Amersham	生长因子	支	1	2012.5.5	张明	细胞培养	100ml

实验室规范化管理

3

国际实验室间比对试验



Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife

EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR RABIES
EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR RABIES SEROLOGY



OE REFERENCE LABORATORY FOR RABIES
SMC COLLABORATING CENTRE FOR RESEARCH AND MANAGEMENT IN ZOOSES CONTROL

Lyssavirus Unit
EU-RL department

CHANGCHUN Tu
CVRI
Chinese Academy of Agricultural Sciences
1068 Qinglong Rd.
Changchun 130062
China

Malzéville, 10 January 2011

Object : Rabies diagnosis inter-laboratory test
Approval of the laboratory

File followed by:
Emmanuelle Robardet

Phone:
03 83 29 89 50

Fax:
03 83 29 89 58

E-mail:
Emmanuelle.robardet@anses.fr

Y. ref.:

Our ref.:

The Director of the European Union Reference Laboratory for Rabies and head of the Lyssavirus Unit (Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife, Anses, France), Dr Florence Cliquet, certifies that the Changchun Veterinary Research Institute (CVRI, Changchun, China) has obtained satisfactory results, compared to those expected, in the rabies diagnosis inter-laboratory test 2010 for:

- the Fluorescent Anti body Test,
- the Nested RT-PCR,
- the Micro array technique,
- the real time RT-PCR.

Dr Alain Berlioz-Arthaud

Dr Evelyne Picard

Le directeur du laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy

Deputy Head of the Lyssavirus Unit

A. BERLIOZ-ARTHAUD

French agency for food, environmental and occupational health safety – Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife
Technopole Agricole et Vétérinaire, Domaine de Pixerécourt, BP 40009, 54220 Malzéville - France.

2010年通过证明



Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy

Dr Feng
Changchun Veterinary Research Institute
666 Luying West Rd.
Jingyue Economic Development Zone
Changchun 130122

CHINE

Malzéville, 3rd September 2012

Unité lyssavirus
Service Sérologie-Virologie

EURL for rabies serology

Object : Technical report rabies serology PTL April 2012

Dear Dr Feng,

This report compiles the statistical analyses of results sent by all participating laboratories.

Your laboratory code is L64.

As you will notice, your laboratory succeeded in the April 2012 proficiency test.

We hope this analysis will help everybody in identifying one's weakness and will contribute in enforcing our common professionalism.

If you have any question, do not hesitate to contact us.

Yours sincerely,

Dossier suivi par :

Marine Wasniewski

Ligne directe :

03 83 29 89 50

Fax direct :

03 83 29 89 58

E-mail :

marine.wasniewski@anses.fr

N. Réf. :

MWJ/R 141112

V. Réf. :

Florence Cliquet

Marine Wasniewski

Director of the European Union Reference Laboratory for Rabies Serology

Scientific Officer of the European Union Reference Laboratory for Rabies Serology

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail – Laboratoire de la faune sauvage de Nancy
Technopole Agricole et Vétérinaire, Domaine de Pixerécourt, BP 40009, 54220 Malzéville - France.

2012年通过证明



Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy

Dr Tu
Changchun Veterinary Research Institute
Laboratory on rabies, Ministry of Agriculture of China
666 Luying West Rd, Jingyue Economic Development Zone,
130122 Changchun,
CHINE

Malzéville, 15th September 2014

Unité Lyssavirus
Service Sérologie-Virologie

EURL for Rabies Serology

Object: rabies serology proficiency tests – 04/2014

Dear Dr Tu,

Dossier suivi par :

Marine Wasniewski

Ligne directe :

03 83 29 89 50

Fax direct :

03 83 29 89 58

E-mail :

marine.wasniewski@anses.fr

N. Réf. :

MWJ/R

V. Réf. :

The attached report compiles the statistical analyses of the results sent by the laboratories participating to the rabies serology proficiency test organized in April 2014.

Your laboratory code is L61.

As you will notice, your laboratory succeeded in the April 2014 proficiency test.

We hope this analysis will help everybody in identifying one's weakness and will contribute in enforcing our common professionalism.

If you have any question, do not hesitate to contact us.

Yours sincerely,

Florence Cliquet

Marine Wasniewski

Director of the European Union Reference Laboratory for Rabies Serology



Scientific Officer of the European Union Reference Laboratory for Rabies Serology

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail – Laboratoire de la faune sauvage de Nancy
Technopole Agricole et Vétérinaire, Domaine de Pixerécourt, CS 40009, 54220 Malzéville - France.

2014年通过证明

实验室规范化管理

4

实验室的安全级别

BSL-2实验室
II级生物安全柜

--自2006年卫生部[人间传染的病原微生物名录]

名称	狂犬病毒
危害程度分类	第二类
街毒病毒培养	BSL-3
街毒动物感染实验	ABSL-3
固定毒培养 (FAVN)	BSL-2
未经培养的感染材料的操作	BSL-2
灭活材料的操作	BSL-1
无感染性材料的操作	BSL-1





实验室规范化管理

5

狂犬病实验室安全防护

- 所有实验室工作人员务必进行狂犬病疫苗的暴露前免疫，
- 动物样品操作应该在**2级生物安全柜**中进行，操作时应带一次性乳胶手套和穿工作服等。
- 操作完毕应对工作台面以及样品可能沾染的仪器设备和工具等用消毒液擦洗消毒。
- 所有用后剩余的样品、废弃物和可能污染的实验用品等应进行高压灭菌处理后，再进行常规垃圾处理。

技术培训

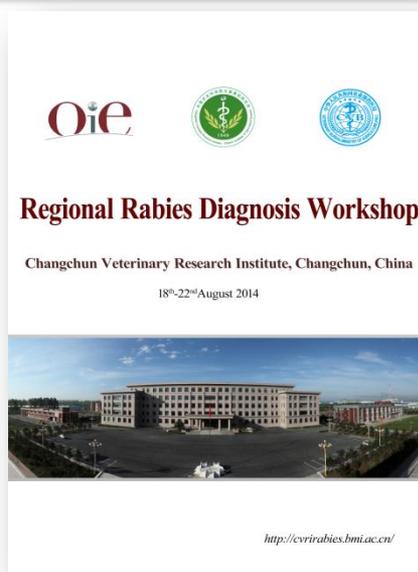
01

国际培训

东南亚地区培训

2014年受OIE和国家农业部兽医局委托、我实验室承办东南亚地区“区域狂犬病诊断培训班”。来自东盟10个国家级兽医实验室的11位部门主管或高级兽医师参加了本次培训。

这是我国有史以来，首次对外开办狂犬病诊断技术培训班，实现了技术输出。



Contents	
Introduction	1
1. Collection of specimens and epidemiological data	2
2. Transport of specimens	3
3. Choice of the tests to be used	4
4. Laboratory diagnosis of rabies	5
4.1. Identification of the agent	6
4.1.1. Collection of brain sample drinking-staw method	6
4.1.2. Fluorescent antibody test (FAT)	8
4.1.3. Mouse inoculation test	10
4.1.4. Molecular test	12
4.1.4.1. RNA Extraction with TIANamp Virus RNA Kit	12
4.1.4.2. One-step Real-time qPCR	15
4.1.4.3. Rabies Virus RT-nested PCR Detection	18
4.2. Laboratory diagnosis of rabies virus antibody	8
4.2.1. Fluorescence antibody virus neutralisation test (FAVN)	8
4.2.2. Rapid tests for rabies antibody diagnosis	29
4.2.2.1. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)	29
4.2.2.2. Colloidal gold test strip for rabies virus antibody detection	31
5. Management of biological safety in the laboratory	33
6. Disposal of biohazardous waste	29



技术培训

02

国内培训

全国动物狂犬病检测与诊断技术培训班：
2006年、2010年
农业部兽医局委托
各省级动物疫控部门狂犬病防控工作
负责人和技术人员共170余人次参加。

澳门培训
自2007年以来已连续5年
农业部兽医局的委托
澳门民政总署动物检疫监管处10人次。
目前澳门首家狂犬病监测实验室已经初具规模。



2010年全国动物狂犬病检测与诊断技术培训班

培训教材



主办：中华人民共和国农业部兽医局
承办：1.军事医学科学院军事兽医研究所农业部狂犬病及野生动物与人共患病诊断实验室
2.中国动物疫病预防控制中心
3.公益性行业（农业）科研专项“动物狂犬病监测防控技术研究示范”项目组
4.全国动物防疫专家委员会狂犬病专家组

2010年全国动物狂犬病检测与诊断技术培训班

目 录

第一部分 专家讲座

加强动物狂犬病防控研究 从源头上防治人类狂犬病（夏咸柱）.....
狂犬病（唐青）.....
狂犬病的流行病学（涂长春）.....
我国狂犬病的流行现状与应采取的防控措施（廖荣良）.....
狂犬病的实验室检测与抗体监测（杨松涛）.....

第二部分 诊断与检测技术

动物狂犬病脑组织、唾液样品的采集、贮存及运送.....
动物狂犬病脑组织样品的直接免疫荧光实验检测（DEA）.....
狂犬病毒反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）检测方法.....
狂犬病病毒荧光定量反转录聚合酶链式反应（FQ-PCR）快速检测方法.....
狂犬病荧光抗体病毒中和试验（FAVN）.....
狂犬病中和抗体的竞争ELISA检测.....
金标试纸条在狂犬病抗原抗体检测中的应用.....
乳鼠脑内接种实验（MIT）.....

第三部分 附录

中国狂犬病防治现状.....
狂犬病防治技术规范.....
卫生部狂犬病暴露预防处置工作规范（2009年版）.....
乳鼠脑内接种实验记录表.....
狂犬病临床样品记录表.....