



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 27518—2011

---

## 西尼罗病毒病检测方法

Diagnostic of west Nile virus infections

2011-11-21 发布

2012-03-01 实施

---

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)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、北京百欧赛地生物工程技术开发中心。

本标准主要起草人：杨秀娟、孙福军、丁若愚、田茵、田睿、王飞、杨静。

## 西尼罗病毒病检测方法

### 1 范围

本标准规定了西尼罗病毒的反转录聚合酶链反应(Reverse Transcription—Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)、蚀斑减少中和试验(Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT)和西尼罗病毒的分离方法。

本标准适用于易感动物的西尼罗病毒病的检测。

### 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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ABTS diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate); 2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐

AMV: 鸟类成髓细胞白血病病毒(avian myeloblastosis virus)

BSA: 牛血清白蛋白(bovine serum albumin)

CPE: 细胞病变效应(cytopathic effect)

cDNA: 互补 DNA(complementary DNA)

DEPC: 焦碳酸乙二酯(diethylpyrocarbonate)

DNA deoxyribonucleic acid: 脱氧核糖核酸

dH<sub>2</sub>O: 双蒸水(double distilled water)

dNTP: 脱氧核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate)含有 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 四种脱氧核糖核苷

EDTA: 乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid)

6-FAM: 6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein)

HEPES: 羟乙基呱嗪乙磺磺酸(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-ethane-sulphonic acid)

MEM: 基础培养基(minima essential medium)

Oligo dT: 多聚 T 再加上一小段随机碱基(几个碱基)构成的引物,用于 RT-PCR

PBS: 磷酸盐缓冲生理盐水(phosphate balanced solution)

PFU: 蚀斑形成单位(plaque forming units)

PRNT: 蚀斑减少中和试验(plaque reduction neutralization test)

RNA: 核糖核酸(ribonucleic acid)

RNasin: 核酸酶抑制剂(RNA enzyme inhibitor)

TAE: 醋酸盐 EDTA(tris-acetate-EDTA Tris)

Taq 酶:耐热 DNA 聚合酶(thermus aquaticus polymerase)

TAMRA:四甲基罗丹明(carboxytetramethylrhodamine)

TRIzol:一种新型总 RNA 抽提试剂(trizol reagent),可以直接从细胞或组织中提取总 RNA

Vero 细胞:非洲绿猴肾细胞

WNV:西尼罗病毒(west nile virus)

#### 4 试剂

- 4.1 水:符合 GB/T 6682 中一级水的规格,用 DEPC 处理以除掉 RNA 酶。
- 4.2 TRIzol 试剂或其他等效的商品化 RNA 抽提试剂。
- 4.3 AMV 逆转录酶:20 U/uL, -20 °C 保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。
- 4.4 5×AMV Buffer:AMV 逆转录酶的缓冲液。
- 4.5 RNasin:20 U/uL, -20 °C 保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。
- 4.6 Oligo(dT):RT-PCR 的引物。
- 4.7 10×Taq Buffer:Taq 酶的缓冲液。
- 4.8 Taq 酶:-20 °C 保存,不要反复冻融或温度剧烈变化。
- 4.9 dNTP 三磷酸脱氧核糖核苷,含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各 10 mmol/L。
- 4.10 琼脂糖:电泳级。
- 4.11 三氯甲烷:分析纯。
- 4.12 异丙醇:分析纯,使用前预冷到 -20 °C。
- 4.13 75%乙醇。
- 4.14 PBS:121 °C 高压 15 min 后,无菌加入青霉素和链霉素至 1 000 U/mL。
- 4.15 TAE:24.2 g Tris 碱、5.7 lg 冻乙酸、0.5 mol/L EDTA(pH8.0)10 mL,加水定容至 100 mL,使用前作 50 倍稀释,用盐酸调节 pH 值至 7.5~7.8。
- 4.16 WNV 标准毒株、WNV 阳性对照与 WNV 阴性对照。
- 4.17 MEM 细胞培养基。
- 4.18 Vero 细胞。
- 4.19 胎牛血清。
- 4.20 细胞维持液:含 2%~3%胎牛血清、青霉素和链霉素分别为 100 U/mL 的无菌 MEM。
- 4.21 中性红水溶液:中性红粉 0.1 g,用去离子水定容至 100 mL,pH7.4,高压除菌或 0.22 μm 滤膜过滤,无菌分装于褐色瓶内,4 °C 保存备用。
- 4.22 2 倍浓度不含中性红 MEM 液:10 倍浓度不含酚红的 MEM 20 mL,胎牛血清 4 mL,青霉素和链霉素各 10 000 U(μg),去离子水定容至 100 mL,0.22 μm 滤膜过滤,pH7.2~7.4,4 °C 保存备用。
- 4.23 不含中性红的营养琼脂:使用前配制 20 g/L 琼脂糖水浴融化后保持在 43 °C~45 °C,加入等量已加温至 43 °C~45 °C 的 2 倍浓度不含中性红 MEM 液,充分混合均匀,保存在 43 °C~45 °C 水浴中备用。
- 4.24 2 倍浓度含中性红 MEM 液:10 倍浓度不含酚红的 MEM 20 mL,胎牛血清 4 mL,青霉素和链霉素各 10 000 U(μg),中性红水溶液 6 mL,去离子水定容至 100 mL,0.22 μm 滤膜过滤,pH7.2~7.4,4 °C 保存备用。
- 4.25 含中性红的营养琼脂:使用前配制 20 g/L 琼脂糖水浴融化后保持在 43 °C~45 °C,加入等量已加温至 43 °C~45 °C 的 2 倍浓度含中性红 MEM 液,充分混合均匀,保存在 43 °C~45 °C 水浴中备用。
- 4.26 0.1%过氧化氢。
- 4.27 BSA:一般是在购置 PCR 试剂中带的,是在反应时保持酶活性的。不是必须的。不用自己配置。

也可不加入反应中。

- 4.28 0.5 mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液:碳酸钠 0.32 g,碳酸氢钠 0.586 g,加水溶解,定容至 200 mL。
- 4.29 抗马 IgM。
- 4.30 5%脱脂奶粉:5 g 的脱脂奶粉溶于 100 mL 的 PBS 缓冲液中。
- 4.31 0.05% tween-20;吐温-20。
- 4.32 辣根过氧化物酶结合的抗黄病毒单克隆抗体。
- 4.33 Rnase;RNA 酶(RNA polymerase)。

## 5 器材和设备

- 5.1 24 孔细胞培养板。
- 5.2 96 孔细胞培养板。
- 5.3 二氧化碳培养箱。
- 5.4 普通冰箱和超低温冰箱:规格 2℃~8℃, -20℃, -80℃。
- 5.5 研磨器/研钵。
- 5.6 离心机(规格 $\geq 15\ 000g$ )。
- 5.7 荧光 RT-PCR 检测仪。
- 5.8 PCR 仪。
- 5.9 可调移液器。
- 5.10 电泳仪。
- 5.11 细胞瓶。
- 5.12 微型滤器:装有 0.22  $\mu m$  滤膜,121℃高压 15 min。
- 5.13 5%脱脂乳封板。

## 6 WNV 的分离

### 6.1 实验室生物安全要求

实验室生物安全要求按照附录 A 执行。

### 6.2 样本采集

疑似死于西尼罗病毒病的动物可考虑采集血液、血清、脑脊液或组织,其中组织样品可优先采取脑组织和神经组织,其次可采集肾、脾和肝组织。

进行血样采集时避免使用阻碍 PCR 反应的肝素,可用抗凝剂 EDTA 采血。

### 6.3 样本运输与储存

血清样本应冷藏,24 h 内运送至实验室(血清标本可在 4℃存放 1 周,长期保存置 -20℃或以下)。其他样本送至实验室后,病毒分离样本应尽快进行接种分离,48 h 内进行接种的可置于 4℃保存,如未能接种应置 -70℃或以下保存,避免反复冻融。

### 6.4 样本处理

取感染样本送专业实验室检测,样本的储存和运输应保持在低于 -70℃中。

组织样本取 1 g~2 g 在无菌研磨器或研钵中,加 5 mL~10 mL 含 10%胎牛血清的 PBS 溶液,磨

碎,冻融2次~3次,3 000g离心10 min,上清液用微型滤器过滤后备用。

血液样本直接冻融2次~3次,用含10%胎牛血清的PBS溶液稀释10倍,3 000g离心10 min,上清液用微型滤器过滤后备用。

脑脊液样本用含10%胎牛血清的PBS溶液稀释5倍~10倍,3 000g离心10 min,上清液用微型滤器过滤后备用。

## 6.5 病毒分离

处理好的样本悬液接种至已80%~90%满度单层Vero细胞,24孔细胞培养板每孔加0.2 mL~0.3 mL,100 mL细胞瓶每瓶加1 mL~2 mL,5%二氧化碳培养箱中37℃吸附1 h~2 h,倾去病理材料悬液,加入细胞维持液,5%二氧化碳培养箱中37℃吸附3 d~5 d,连续观察细胞病变(CPE),如出现典型CPE,可用RT-PCR、PRNT进行病原鉴定;盲传3代后如未观察到CPE,判为病毒分离阴性。

## 7 WNV的检测

### 7.1 引物与荧光探针

#### 7.1.1 荧光RT-PCR E基因扩增引物与探针

引物1:5'-TCA GCG ATC TCT CCA CCA AAG-3'(NT1160)。

引物2:5'-GGG TCA GCA CGT TTG TCA TTG-3'(NT1229)。

TaqMan探针:5'-TGC CCG ACC ATG GGA GAA GCT C-3'(NT1186),5'端标记FAM,3'端标记TAMRA。

#### 7.1.2 荧光RT-PCR NSI基因扩增引物与探针

引物1:5'-GGC AGT TCT GGG TGA AGT CAA-3'(NT3111)。

引物2:5'-CTC CGA TTG TGA TTG CTT CGT-3'(NT3239)。

TaqMan探针:5'-TGT ACG TGG CCT GAG ACG CAT ACC TTG T-3'(NT3136),5'端标记FAM,3'端标记TAMRA。

#### 7.1.3 套式RT-PCR外源引物

引物1:5'-TTG TGT TGG CTC TCT TGG CGT TCT T-3'(NT233-257)。

引物2:5'-CAG CCG ACA GCA CTG GAC ATT CAT A-3'(NT616-640)。

扩增片段大小:407 bp。

#### 7.1.4 套式RT-PCR内源引物

引物1:5'-CAG TGC TGG ATC GAT GGA GAG G-3'(NT287-308)。

引物2:5'-CCG CCG ATT GAT AGC ACT GGT-3'(NT370-390)。

扩增片段大小:103 bp。

## 7.2 模板RNA提取

血清、血液、脑脊液等液体样品直接取200 μL于1.5 mL离心管中编号备用;组织样品取2 g于无菌研钵中磨碎,加入10 mL PBS混匀,4℃中3 000g离心15 min,取200 μL上清于1.5 mL离心管中编号备用。

在1.5 mL离心管中加入被检样品、阴性对照、阳性对照各200 μL,加入TRIzol试剂600 μL,再加

入三氯甲烷 200  $\mu\text{L}$ , 混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$  中 12 000g 离心 15 min, 取上清加入 -20  $^{\circ}\text{C}$  预冷的异丙醇 400  $\mu\text{L}$ , 混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$  中 12 000g 离心 15 min, 轻轻倾去上清液, 加入 75% 乙醇 600  $\mu\text{L}$  洗涤, 4  $^{\circ}\text{C}$  中 12 000g 离心 15 min, 轻轻倾去上清液, 室温干燥 5 min~10 min, 加入 DEPC 水 20  $\mu\text{L}$  溶解 RNA, 冰上保存备用。提取的 RNA 最好在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增, 若需长期保存, 应放置 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### 7.3 反转录

在 PCR 管中依次加入 5 $\times$ AMV Buffer 4  $\mu\text{L}$ 、dNTP(各 10 mmol/L)2  $\mu\text{L}$ 、RNase 20 U、Oligo(dT) 50 pmol、AMV 逆转录酶 10 U、RNA 模板 5  $\mu\text{L}$ 、DEPC 水至 20  $\mu\text{L}$ , 瞬间离心, 43  $^{\circ}\text{C}$  反转录 1 h 后, 立即迅速冷却至 4  $^{\circ}\text{C}$ , 瞬间离心, 分装, 立即用于荧光 PCR 或套式 PCR, 或于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 7.4 荧光 PCR

采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系, 在 PCR 毛细管或 PCR 反应管中依次加入 10 $\times$ Taq Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ 、dNTP(各 2.5 mmol/L)3  $\mu\text{L}$ 、氯化镁 ( $\text{MgCl}_2$ ) (25 mmol/L) 5.5  $\mu\text{L}$ 、引物 (7.1.1 或 7.1.2) (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ 、TaqMan 探针(在荧光 PCR 引物中已标出) (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、TaqDNA 聚合酶 0.25  $\mu\text{L}$ 、BSA (5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、cDNA(逆转录后的产物) 5  $\mu\text{L}$ 、dH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ 。瞬间离心后于定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。扩增条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min 后, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 45 个循环, 每次循环结束后检测每管扩增的荧光值。

### 7.5 套式 PCR

在 PCR 管中依次加入 10 $\times$ Taq Buffer 5  $\mu\text{L}$ 、dNTP(各 2.5 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ 、氯化镁 ( $\text{MgCl}_2$ ) (25 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ 、外源引物 (7.1.3, 20  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ 、TaqDNA 聚合酶 0.25  $\mu\text{L}$ 、cDNA 或外源引物扩增产物 5  $\mu\text{L}$ 、dH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu\text{L}$ 。瞬间离心后进行 PCR 扩增。扩增条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min 后, 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。取 15  $\mu\text{L}$  扩增产物用 16 g/L 琼脂糖电泳观察结果。如果观察到特异性扩增条带, 扩增产物用超纯水稀释至 100 倍~1 000 倍后用, 作为内源引物扩增模板, 如果未观察到特异性扩增条带, 扩增产物直接作为内源引物扩增模板。

内源引物扩增的反应体系配制方法参照外源引物扩增反应体系进行, 扩增条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min 后, 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 25 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。取 15  $\mu\text{L}$  扩增产物用 20 g/L 琼脂糖电泳观察结果。

### 7.6 结果判定

#### 7.6.1 荧光 PCR

阴性对照无 Ct 值(每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数), 并且无扩增曲线; 阳性对照 Ct 值应小于 30.0, 并出现典型扩增曲线。否则, 试验结果无效。

在试验结果成立的前提下, 如果样品的 Ct 值小于 37, 且出现典型扩增曲线为阳性, Ct 值 37~45 为可疑, 无 Ct 值且无扩增曲线为阴性。

#### 7.6.2 套式 PCR

阳性对照的 PCR 产物电泳后, 出现一条特异性条带; 阴性对照 PCR 产物电泳后没有条带, 试验结果成立; 否则, 结果不成立。

在试验结果成立的前提下, 如果样品 PCR 扩增产物经过电泳检测后, 出现特异性目的片段者为阳性; 无特异性扩增片段者为阴性。

#### 7.6.3 样品结果判定

7.6.3.1 样品同时用 E 基因和 NSI 基因进行荧光 PCR 后, 结果均为阳性者判定为含有西尼罗病毒核酸。

7.6.3.2 样品同时用 E 基因和 NSI 基因进行荧光 PCR 后,结果均为阴性者判定为不含有西尼罗病毒核酸。

7.6.3.3 样品同时用 E 基因和 NSI 基因进行荧光 PCR 后,其中之一结果均为阴性者,用套式 PCR 再次进行检测,结果为阳性者判定为含有西尼罗病毒核酸,结果为阴性者判定为不含有西尼罗病毒核酸。

7.6.4 荧光 PCR 和套式 PCR 的外源引物扩增可采用等效的一步法 RT-PCR 试剂盒进行检测,其操作和结果判定根据试剂盒的说明书进行,但应优化引物和 TaqMan 探针浓度,确保检测的特异性和灵敏度与本标准的方法等效。

7.6.5 应用荧光 PCR 和套式 PCR 检测西尼罗病毒核酸结果为阳性者,必要时应对扩增产物进行核酸序列分析验证。

## 8 蚀斑减少中和试验(PRNT)

### 8.1 操作程序

#### 8.1.1 病毒培养

WNV 标准毒株接种至处于对数生长期 80%~90% 满度非洲绿猴肾(Vero)细胞,37℃ 吸附 1 h 后,弃去病毒液,加入细胞维持液,5% 二氧化碳培养箱中 37℃ 培养 3 d~4 d,待 70%~80% 细胞出现 CPE,−20℃ 冻融 2 次,分装,−80℃ 冻存备用。

#### 8.1.2 PFU 测定

保存病毒用 MEM 连续 10 倍稀释,接种于 80%~90% 满度单层 Vero 细胞的 96 孔板,每个稀释度接种 8 孔,100 μL/孔,同时设 8 孔细胞对照,每孔加入 MEM 100 μL,5% 二氧化碳培养箱中 37℃ 孵育 1 h~2 h,弃去孔内病毒液,加入不含中性红的营养琼脂 100 μL/孔,5% 二氧化碳培养箱中 37℃ 培养 4.5 d,加入含中性红的营养琼脂 100 μL/孔,5% 二氧化碳培养箱中 37℃ 避光培养,12 h 后观察 CPE,计算病毒的 PFU。

#### 8.1.3 蚀斑减少中和试验

待检血清、标准阳性血清和标准阴性血清用 MEM 做连续 2 倍稀释后,加入等体积 50 μL 含有 100 PFU 的病毒悬液,充分混匀,37℃ 作用 1 h 后,将血清与病毒混合液接种至 80%~90% 满度单层 Vero 细胞的 96 孔板,每个稀释度接种 8 孔,100 μL/孔。同时将稀释好的 50 μL 中 100 PFU 的病毒悬液做 10 倍、100 倍、1 000 倍稀释,接种 80%~90% 满度单层 Vero 细胞的 96 孔板,每个稀释度接种 4 孔~8 孔,100 μL/孔,作为病毒回归对照。稀释好的 50 μL 中 100 PFU 的病毒悬液接种 4 孔~8 孔,100 μL/孔,作为病毒对照。MEM 接种 4 孔~8 孔,100 μL/孔,作为细胞对照。所有处理好的细胞于 5% 二氧化碳培养箱中 37℃ 孵育 1 h~2 h,弃去孔内液体,加入不含中性红的营养琼脂 100 μL/孔,5% 二氧化碳培养箱中 37℃ 培养 4.5 d,加入含中性红的营养琼脂 100 μL/孔,5% 二氧化碳培养箱中 37℃ 避光培养,12 h 后观察 CPE,按 Reed-Muench 方法计算血清的中和效价。

### 8.2 结果判定

8.2.1 回归对照的病毒浓度为每 50 μL 30 PFU~300 PFU 范围内,并且标准阴阳性对照血清的抗体效价在 1 个滴度误差范围内,试验成立,试验结果成立的条件下方能判定样品的结果,否则,试验结果不成立,查找原因,并重做试验。

8.2.2 待检样品中和效价大于等于 1:10 者判为阳性。



## 9 IgM 捕获 ELISA

### 9.1 实验步骤

0.5 mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释抗马 IgM 作为捕获抗体包被平底 96 孔 ELISA 板每孔 100  $\mu\text{L}$ ; 包被板在 4  $^{\circ}\text{C}$  湿盒中孵育过夜。使用前, 用含有 0.05% 吐温-20 的 0.01 M pH7.2 PBS 洗板两次, 每孔用 200  $\mu\text{L}$ ~300  $\mu\text{L}$ ; 用 PBS 新配制的 5% 脱脂奶粉封板, 每孔加 300  $\mu\text{L}$ , 并在室温中孵育 60 min, 孵育后, 移去封闭液, 并用 PBS 洗板 3 次; 被检和对照血清用 PBS 作 1:400 稀释(脑脊髓液作 1:2 稀释), 每份样品加双排孔(每份样品共加 4 个孔), 每孔 50  $\mu\text{L}$ , 包括用和样品同样方法制备的对照阳性和阴性血清; 盖板上, 并在 37  $^{\circ}\text{C}$  湿盒中孵育 75 min; 移去血清, 并用 PBS 洗板 3 次; 用 PBS 稀释病毒和正常抗原, 加 50  $\mu\text{L}$  病毒抗原到每份被检血清和对照血清一排孔中, 并加 50  $\mu\text{L}$  正常抗原到每份被检血清和对照血清的第二排孔中; 盖板上, 并在 4  $^{\circ}\text{C}$  湿盒中孵育过夜; 移去孔中抗原, 并用 PBS 洗板 3 次; 用 PBS 稀释辣根过氧化物酶结合的抗黄病毒单克隆抗体, 每孔加 50  $\mu\text{L}$ ; 盖板上, 并在 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min; 移去结合物, 并用 PBS 洗板 6 次; 每孔加 50  $\mu\text{L}$  新配制的 ABTS 底物和过氧化氢(0.1%), 在室温中孵育 30 min。

### 9.2 结果判定

在 405 nm 测光密度值, 如果含有病毒抗原的被检样品孔的光密度至少是含病毒抗原的阴性血清对照孔的光密度的两倍, 并至少是含有对照抗原的被检样品平行试验孔的光密度的两倍, 该被检样品被认为是阳性。

## 10 结果判定

10.1 组织、血、脑脊液或其他体液中分离到西尼罗病毒, 说明动物感染了 WNV。

10.2 组织、血、脑脊液或其他体液中用 RT-PCR 检测到西尼罗病毒基因, 判定为西尼罗病毒 RT-PCR 检测结果阳性, 或判定为西尼罗病毒基因检测结果阳性。说明动物感染了 WNV。

10.3 IgM 捕捉 ELISA 检测到西尼罗病毒 IgM 抗体, 判定为西尼罗病毒 IgM 捕捉 ELISA 结果阳性。说明动物感染了 WNV。

10.4 IgM 捕捉 ELISA 结果判定为可疑, 并用蚀斑减少中和试验检测到西尼罗中和抗体, 判定为西尼罗病毒抗体检测结果阳性。说明动物感染了 WNV。

**附 录 A**  
**(规范性附录)**  
**实验室生物安全要求**

- A.1 PRNT:所有操作在 BSL-3 实验室中进行,操作人员防护、所有使用物品和废弃物按 BSL-3 要求进行。
- A.2 病毒分离:所有操作在 BSL-3 实验室中进行,操作人员防护、所有使用物品和废弃物按 BSL-3 要求进行。
- A.3 PCR:前期所有操作在 BSC(生物安全柜)内进行,病毒裂解液加入后可转移至生物安全 2 级(BSL-2)实验室进行操作。
- A.4 动物尸体解剖:所有操作在 BSL-3 实验室中进行,操作人员防护、所有使用物品和废弃物按 BSL-3 要求进行。
- A.5 其他有关西尼罗病毒的操作:前期所有操作在 BSC 内进行,能有效灭活病毒的去垢剂或病毒裂解液加入后,方可转移至 BSL-2 实验室进行操作。

注:BSL-3:生物安全 3 级实验室,BSL-2:生物安全 2 级实验室,BSC:生物安全柜。

---