

ICS 11.220
CCS B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXX-XXXX

马脑脊髓炎诊断技术

Diagnostic techniques for equine encephalomyelitis (eastern, western and venezuelan)

(征求意见稿)

(注：文件编制各阶段草案的封面保留这句话)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国农业农村部 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 实验室生物安全措施.....	2
6 样品采集、保存与运输.....	2
7 病毒分离与鉴定.....	4
8 病毒 RNA 的提取.....	5
9 RT-PCR.....	5
10 实时荧光 RT-PCR.....	8
11 抗原捕获 ELISA.....	9
12 抗原捕获 ELISA 抑制试验.....	11
13 免疫组织化学（IHC）试验.....	13
14 原位杂交（ISH）试验.....	15
15 补体反应（CF）试验.....	17
16 血凝抑制（HI）试验.....	22
17 抗体 ELISA 试验.....	23
18 空斑减少中和（PRN）试验.....	26
19 综合判定.....	27
附录 A（规范性）试剂的配制.....	28
附录 B（资料性）常规和实时荧光 RT-PCR 引物和探针.....	34
附录 C（资料性）常规和实时荧光 RT-PCR 阳性对照质粒的制备.....	36
附录 D（资料性）标准比色孔的制备.....	38

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：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所，江苏农林职业技术学院，哈尔滨国生生物股份有限公司，黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站，广州海关技术中心，广州市动物卫生监督所，青岛海关技术中心、内蒙古自治区动物疫病预防控制中心，新疆维吾尔自治区动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：王晓钧、胡哲、那雷、董明奇、宋丽、郭奎、刘志玲、杜承、魏丽丽、王牟平、鱼海琼、沈丹、黄俊杰、张海冰、王群、刘永强、特列克·库拉别克。

引 言

东方型、西方型与委内瑞拉型马脑脊髓炎（EEE、WEE、VEE）病毒均属披膜病毒科（Togaviridae）甲病毒属（Alphavirus）。这三种甲病毒仅见于美洲，可感染人类与马属动物，多数临床病例表现为脑炎。病毒在自然界通过脊椎动物宿主与蚊媒的交替循环得以维持。在温带地区，马与人类的脑炎病例多散发于仲夏至晚秋；热带地区则全年均可发生，取决于支持蚊媒存活的气候条件。

马匹临床疾病以发热、厌食及重度沉郁为特征；重症可迅速发展为过度兴奋、失明、共济失调、极度精神沉郁、卧地不起、惊厥甚至死亡。EEE 病毒感染马匹常致死亡；WEE 病毒多引起亚临床或轻症，病死率低于 30%。EEE 与 WEE 的主要储存宿主为雀形目鸟类。鸟类感染多无症状，但已报道这两种病毒可致家禽、猎禽及平胸类发病。啮齿类小型哺乳动物亦可扩增 EEE 病毒，牛、绵羊、猪、鹿及犬亦有 EEE 散发报道。马与人类对 EEE、WEE 均为终末宿主，但在特定条件下，个别马匹的短暂病毒血症足以使蚊媒获得病毒并继续传播。

VEE 病毒被视为墨西哥、中美及南美最重要的马病原体之一。例如，哥伦比亚一次 VEE 流行导致约 10 万匹马死亡，25 万人发病。与 EEE、WEE 不同，马匹在 VEE 病毒扩增、传播及维持流行中起关键作用。VEE 复合群含 6 个抗原亚型（I-VI），亚型 I 又分 5 个抗原变异株（AB-F）。原认为的 I-A 与 I-B 现已视为同一株（I-AB）。I-AB 与 I-C 变异株与马及人类的流行活动相关，历史上曾造成成千上万的人、马感染病例。亚型 I 的其余变异株（I-D、I-E、I-F）及其他 5 个亚型（II-VI）在自然界呈地方性循环。

马属动物并非 VEE 病毒的终末宿主，而是流行株的扩增宿主；地方株主要在森林啮齿类与蚊媒间循环。地方株与亚型曾被视为对马无致病性，但可致人类发病。1993 与 1996 年，墨西哥马脑炎散发暴发证实由地方株 I-E 引起。近年，墨西哥、中美及南美北部与西部仍有 VEE 散发流行。人类感染地方亚型的分布范围可延伸至中美北部及南美更广阔地区。

在病原学检测方面，当易感马匹在吸血昆虫活跃地区出现典型嗜睡及其他神经症状时，可初步怀疑东方型、西方型或委内瑞拉型马脑脊髓炎（EEE、WEE、VEE）。眼观病变无特征性，组织病理学变化可供初步诊断。EEE 病毒通常可从死亡马匹的脑组织分离，偶见于其他脏器；WEE 与 VEE 病毒则极少分离成功。现场样品可通过接种鸡胚或细胞培养进行病毒分离，随后采用逆转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）、荧光 RT-PCR 进行核酸鉴定。对于 VEE 流行株变异株的特异性鉴定，可采用免疫荧光试验（IFA）、以亚型或变异株特异性单抗进行的空斑减少中和试验（PRN）。

在血清学检测方面，抗体检测可用补体结合试验（CF）、血凝抑制（HI）、IgM 捕获酶联免疫吸附试验（IgM-capture ELISA）或空斑减少中和（PRN）试验。

马脑脊髓炎诊断技术

1 范围

本文件描述了马脑脊髓炎的病毒分离与培养、RT-PCR、实时荧光 RT-PCR、抗原捕获 ELISA 及其抑制试验、IHC、ISH、CF、HI、ELISA、PRN 试验的方法。

本文件适用于马脑脊髓炎的诊断、检疫、监测和流行病学调查。

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 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

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-21 细胞：幼仓鼠肾细胞系

BSA：牛血清白蛋白（Bovine Serum Albumin）

cDNA：互补脱氧核糖核酸（Complementary deoxyribonucleic acid）

CEF：鸡胚成纤维细胞（Chicken Embryo Fibroblast）

CF：补体结合试验（Complement Fixation）

CH₅₀：补体溶血单位（50% complement hemolytic unit）

CPE：细胞病变效应（Cytopathic Effect）

DEF：鸭胚成纤维细胞（Duck Embryo Fibroblast）

EBSS：Earle 氏基础盐溶液（Earle's Balanced Salt Solution）

EEE：东方马脑脊髓炎（Eastern equine encephalomyelitis）

EEEV：东方马脑脊髓炎病毒（Eastern equine encephalomyelitis virus）

ELISA：酶联免疫吸附试验（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）

FBS：胎牛血清（Fetal Bovine Serum）

FFPE：福尔马林固定石蜡包埋（Formalin-Fixed Paraffin-Embedded）

FITC：荧光素（Fluorescein Isothiocyanate）

HA：血凝（Haemagglutination）

HI: 血凝抑制 (Haemagglutination Inhibition)
IFA: 免疫荧光实验 (Immunofluorescence Assay)
IHC: 免疫组织化学 (Immunohistochemistry)
ISH: 原位杂交 (In Situ Hybridization)
MEF 细胞: 小鼠胚胎成纤维细胞 (Mouse Embryonic Fibroblasts)
PBS: 磷酸盐缓冲盐水 (Phosphate Buffered Saline)
PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)
PFU: 空斑形成单位 (Plaque Forming Units)
PRN: 空斑减少中和试验 (Plaque Reduction Neutralisation)
RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic acid)
RT-PCR: 逆转录-聚合酶链式反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction)
SPF: 无特定病原体 (Specific Pathogen Free)
SLE: 圣路易斯脑炎 (St. Louis encephalitis)
SLEV: 圣路易斯脑炎病毒 (St. Louis encephalitis virus)
TAE: Tris-醋酸-EDTA 缓冲液 (Tris-Acetate-EDTA Buffer)
VEE: 委内瑞拉马脑脊髓炎 (Venezuelan equine encephalomyelitis)
Vero 细胞: 非洲绿猴肾细胞系 (Vero cells)
VEEV: 委内瑞拉马脑脊髓炎病毒 (Venezuelan equine encephalomyelitis virus)
WEE: 西方马脑脊髓炎 (Western equine encephalomyelitis)
WEEV: 西方马脑脊髓炎病毒 (Western equine encephalomyelitis virus)
WNV: 西尼罗病毒 (West nile virus)

5 实验室生物安全措施

进行马脑脊髓炎实验室诊断时,按照 GB 19489 的规定执行。样品采集、保存、运输执行 NY/T 541 的要求。本文件中各类试剂配制用水应符合 GB/T 6682 的要求。

6 样品采集、保存与运输

6.1 仪器设备

6.1.1 蚊帐/诱蚊灯/CO₂ 诱捕器。

6.1.2 -80℃低温冰箱。

6.1.3 组织研磨仪。

6.1.4 离心机。

6.1.5 研钵。

6.1.6 超声仪。

6.1.7 水浴锅。

6.2 试剂材料

- 6.2.1 一次性采血针。
- 6.2.2 一次性采血管（含有肝素抗凝剂）。
- 6.2.3 一次性采血管（不含抗凝剂）。
- 6.2.4 10%福尔马林，按照附录 A 中的 A.3.1 配制。
- 6.2.5 无菌采集袋。
- 6.2.6 组织匀浆缓冲液，按照附录 A 中的 A.3.3 配制。
- 6.2.7 样品稀释液，按照附录 A 中的 A.3.4 配制。
- 6.2.8 裂解缓冲液，按照附录 A 中的 A.3.5 配制。
- 6.2.9 血液采集袋（含抗凝剂）。
- 6.2.10 FBS，按照附录 A 中的 A.3.6 配制。
- 6.2.11 细胞维持液，按照附录 A 中的 A.3.7 配制。

6.3 样品采集

6.3.1 血液样品

6.3.1.1 核酸检测用全血样品

用一次性采血针于马颈静脉采集马匹血液至 5 mL 一次性采血管（含有肝素抗凝剂）中，轻轻水平晃动采血管使血液与抗凝剂充分混合。

6.3.1.2 病毒培养用全血样品

用一次性使用塑料血袋（附带针头，容量 250 mL）采集马颈静脉血液（全血）150 mL~200 mL，轻轻水平晃动采血袋使血液与抗凝剂充分混合。

6.3.2 组织样品

无菌采集马新鲜脑、肝脏、脾脏等组织、脑组织约 5 cm³ 见方的小块，置于无菌采集袋或其他灭菌容器中，密闭保存。

6.3.3 血清样品

采用一次性采血针于马颈静脉采集血液至一次性采血管（不含抗凝剂）中，每管采集 3~5 mL。若为配对样品，需分别采集发病初期及间隔数天至数周后的血清。采样过程严格遵循无菌操作规范，避免样品污染；采样工具需经灭菌处理，一次性使用；样品采集后及时标记，详细记录相关信息。

6.3.4 蚊媒样品

成蚊采集采用蚊帐、诱蚊灯、CO₂ 诱捕器等工具开展作业，采集所得成蚊需按种类、采集地点及采集日期严格分类存放，每批次样品数量不少于 25 只。

6.4 样品保存和运输

血液、组织、血清样品采集后，应尽快置于保温箱中，加入预冷的冰袋，密封，宜24 h内送实验室检测。待检样品应尽快处理，在4℃存放不超过24 h，在-20℃冷冻保存时间稍长。若需长期保存，应放置于-70℃以下条件。尽量避免反复冻融。蚊媒样品需置于-70℃条件下保存，采用干冰运输，全程避免反复冻融以防样品受损。

6.5 样品处理

6.5.1 血液样品处理

血液样品以3000 g 离心10 min，取上清液原液或稀释10倍后作为接种物待检。

6.5.2 核酸检测用组织样品处理

取待检组织样品约2 g，用组织研磨仪低温破碎后，加入20 mL组织匀浆缓冲液，制备10%组织悬液，以1500 g离心30 min，取组织悬液上清待检。

6.5.3 抗原检测用蚊媒样品处理

取25只蚊媒样品，加入1 mL样品稀释液，于冷研钵中充分研磨，匀浆液以14000 g离心2 min，取上清，经100 W超声仪处理10 sec，按每100 μL上清加10 μL裂解缓冲液的比例加液，室温孵育15 min，再次离心后取上清，作为待检样品。

6.5.4 抗原检测用血清样品处理

血清样品可直接使用，或用样品稀释液按1:10比例稀释，作为待检样品。

6.5.5 抗体检测用血清样品处理和灭活

室温静置2~4 h，分离血清；如血清尚未析出，可以4℃、3000 g离心10 min，分离血清，避免溶血。血清样品于56℃水浴锅灭活30 min，作为待检样品。

6.5.6 PRN 试验抗体检测用血清样品处理

用含2% FBS的细胞维持液对灭活后血清进行稀释（初筛时按采用1:10和1:100进行稀释；测定滴度时进行系列稀释，如2倍、5倍、10倍等倍比稀释）。

7 病毒分离与鉴定

7.1 仪器设备

7.1.1 CO₂ 培养箱。

7.1.2 倒置显微镜。

7.1.3 -80℃低温冰箱。

7.1.4 孵蛋箱。

7.2 试剂材料

7.2.1 PBS，按照附录 A 中的 A.1.1 配制。

7.2.2 FBS，按照附录 A 中的 A.3.6 配制。

- 7.2.3 1640 培养基。
- 7.2.4 CEF 或 DEF 或 Vero 细胞。
- 7.2.5 阳性对照：弱毒株病毒。
- 7.2.6 鸡胚（6~8 日龄 SPF 鸡胚）。
- 7.2.7 细胞维持液，按照附录 A 中的 A.3.7 配制。

7.3 病毒分离样品的选择

对于EEE疑似病例，脑组织是首选的病毒分离材料。对于VEE疑似病例，在发热早期采集的血液是比脑组织更可靠的病毒分离材料。对于WEE疑似病例，无论哪种样品均很难成功分离到病毒。

7.4 细胞培养分离法

将长满单层的敏感细胞（如CEF或DEF或Vero细胞，25 cm²培养瓶）用PBS轻轻洗涤后，每瓶接种1.0 mL处理好的组织悬液上清或全血样品，置37℃、含5% CO₂ 的培养箱中吸附1~2 h，期间轻轻摇动，吸附结束后吸弃接种物，用PBS轻柔洗涤细胞单层两次，随后加入含2% FBS的1640培养基，置于37℃、含5% CO₂ 的培养箱中培养，同时设立健康细胞对照和阳性对照，培养6~8 d，每日倒置显微镜下观察CPE，典型CPE包括细胞圆缩、脱落等。对于出现CPE的细胞瓶，收获培养物并冻存于-80℃低温冰箱，备用。若无CPE出现，应进行盲传（取培养上清接种新鲜细胞）；若盲传2~3代仍无CPE，则终止试验。

7.5 鸡胚接种分离法

选用6~8日龄SPF鸡胚，经卵黄囊途径接种0.2~0.5 mL组织悬液上清或全血样品，孵蛋箱37℃孵育7 d并每日照蛋检查。若鸡胚在接种后2~4 d死亡，收集卵黄囊和尿囊液待鉴定；若7 d内未死亡，收获卵黄囊和尿囊液混合后再次接种鸡胚进行盲传，通常只进行一次传代。

7.6 病毒鉴定

对于出现CPE的细胞培养物以及接种后2~4 d死亡鸡胚的卵黄囊与尿囊液，采用实时荧光RT-PCR、IHC、ISH及PRN进行鉴定。

8 病毒 RNA 的提取

- 8.1 待检样品按照 6.5.1 和 6.5.2 进行处理。
- 8.2 按商品化提取试剂盒说明书中方法提取样品 RNA，及时进行检测以免 RNA 降解，短期保存置于4℃，长期保存置于-80℃冰箱中，备用。

9 RT-PCR

- 9.1 仪器设备
 - 9.1.1 PCR 仪。
 - 9.1.2 混匀器。
 - 9.1.3 电泳槽。

9.1.4 紫外透射仪或凝胶成像系统。

9.2 试剂材料

9.2.1 PCR 试剂盒。

9.2.2 引物，按照附录 B 中的 B.1 制备。

9.2.3 溴化乙锭或新型核酸染料(溴化乙锭替代物)。

9.2.4 1.5%的琼脂糖溶液，按照附录 A 中的 A.2.1 配制。

9.2.5 1×TAE，按照附录 A 中的 A.2.2 配制。

9.2.6 分子量标准物。

9.2.7 PCR 反应管（透明薄壁）。

9.2.8 阴性对照：无核酸酶水。

9.2.9 阳性对照：EEEV、WEEV、VEE(I-AB/C/D 亚型)、VEEV (I-E 亚型) 和 VEEV (通用型) RT-PCR 阳性质粒转录的 RNA 阳性对照品名称分别为 R-EEE Nested、R-WEE Nested、R-VEE I-AB/C/D、R-VEE I-E 和 R-VEE all，按照附录 C 制备。

9.3 反转录（cDNA 的合成）

配制反转录反应体系：每管加入 8 μ L 上述制备的 RNA 模板和 2 μ L 5 \times RNA 反转录反应混合液（含 Buffer, dNTP, M-MLV, RNA 酶抑制剂, 通用反转录引物等），46~50 $^{\circ}$ C（根据所用酶的最适温度范围）水浴 30min 或置于 PCR 仪中 46 ~ 50 $^{\circ}$ C 30 min。反应结束后，经 85 $^{\circ}$ C 15 sec 灭活反转录酶，即为 cDNA，直接用于 PCR 扩增或置-20 $^{\circ}$ C 储存。如果使用一步法 RT-PCR 试剂盒，可以不单独进行 cDNA 反转录过程。

9.4 PCR 反应

9.4.1 反应体系

本方法为套式 PCR，其中引物名称（附录 B 中的表 B.1）“1st Stage”代表外套引物，“nested”代表内套引物。将 PCR 试剂盒中的试剂置于冰上融化，取 n+2 个 PCR 反应管（n 为待检样品数，1 管阳性对照和 1 管阴性对照），按表 1 配制相应反应体系（不同公司生产的 RT-PCR 试剂盒反应成分不同，体系不同，应根据其说明书进行修改使用），用混匀器振荡混合均匀后瞬时离心。

表 1 PCR 反应体系

组分	体积 (μ L)
2 \times PCR 缓冲液	25
上游引物 F (10 μ mol/L)	2
下游引物 R (10 μ mol/L)	2
cDNA/第一轮 PCR 产物	2

无核酸酶水	19
总体积	50

9.4.2 反应程序

将加样后的反应管放入 PCR 仪中，记录样品摆放顺序。第一轮反应：使用 50 μL 反应体系，反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 聚合酶激活 15 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 sec、58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 sec、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，共 35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 9 min。第二轮套式 PCR：使用 50 μL 反应体系，取 2 μL 第一轮 PCR 产物为模板，反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 聚合酶激活 15 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 sec、46 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 sec、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，共 35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 9 min。

对于 VEE 病毒变异株，可使用一对简并引物进行扩增。第一轮反应：94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 sec，64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 sec，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 sec，共 40 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。第二轮套式 PCR：使用 50 μL 反应体系，取 2 μL 第一轮 PCR 产物为模板，反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 sec，61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 sec，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 sec，共 40 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

9.5 扩增产物的电泳检测

9.5.1 凝胶板的制备

将配制的 1.5% 的琼脂糖溶液中按 1:10000 加入溴化乙锭或新型核酸染料(溴化乙锭替代物)，倒入胶槽制备凝胶板。

9.5.2 加样

在电泳槽中加入 1 \times TAE，使液面没过凝胶，取 8 μL 第二轮扩增产物加到各凝胶孔，取 8 μL DNA 分子量标准物加到另一凝胶孔中。

9.5.3 电泳

将电泳仪设置电压为 125V，时间为 25min，然后进行核酸电泳。

9.5.4 结果的观察

将电泳好的凝胶放到紫外透射仪或凝胶成像系统上观察，判定结果并做好记录。

9.6 试验成立条件

PCR 扩增产物电泳后，EEE、WEE、VEE 阳性对照孔出现预期大小的特异性条带，阴性对照无特异性条带，判为试验成立。

9.7 结果判定

9.7.1 阳性

待检样品 PCR 扩增出现阳性对照大小的特异性条带，判为核酸检测阳性。

9.7.1.1 EEE (nested) 引物扩增出约 140bp 的特异性条带，判定 EEEV 核酸阳性；

9.7.1.2 WEE (nested) 引物扩增出约 335bp 的特异性条带，判定 WEEV 核酸阳性；

9.7.1.3 VEE I-AB/C/D (nested) 引物扩增出约 136bp 的特异性条带, 判定 VEEV (I-AB/C/D 亚型) 核酸阳性;

9.7.1.4 VEE I-E (nested) 引物扩增出约 162bp 的特异性条带, 判定 VEEV (I-E 亚型) 核酸阳性;

9.7.1.5 VEE all (nested) 引物扩增出约 80bp 的特异性条带, 判定 VEEV 核酸阳性;

9.7.2 阴性

待检样品PCR未扩增出阳性对照大小的特异性条带, 判为核酸检测阴性。

10 实时荧光 RT-PCR

10.1 仪器设备

10.1.1 实时荧光 PCR 仪。

10.1.2 混匀器等同 9.1.2~9.1.4。

10.2 试剂材料

10.2.1 荧光 RT-PCR 试剂盒 (探针法)。

10.2.2 引物, 按照附录 B 中的 B.2 制备。

10.2.3 PCR 反应管 (透明薄壁)。

10.2.4 阴性对照: 无核酸酶水。

10.2.5 阳性对照: EEEV、WEEV 和 VEEV qPCR 阳性质粒转录的 RNA 阳性对照品分别为 R-EEE qPCR、R-WEE qPCR 和 R-VEE qPCR, 按照附录 C 制备。

10.3 实时荧光 RT-PCR 反应

10.3.1 反应体系

将实时荧光 RT-PCR 试剂盒中的试剂置于冰上融化, 取 $n+2$ 个 PCR 反应管 (n 为待检样品数, 1 管阳性对照和 1 管阴性对照), 按表 2 配制相应反应体系 (不同公司生产的实时荧光 RT-PCR 试剂盒反应成分不同, 体系不同, 应根据其说明书进行修改使用), 用混匀器振荡混合均匀后瞬时离心。

表 2 实时荧光 RT-PCR 反应体系

组分	体积 (μL)
2×实时荧光 RT-PCR 缓冲液	12.5
上游引物 F (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.75
下游引物 R (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
探针 P (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8
反转录酶	0.5

模板 RNA	2
无核酸酶水	7.95
总体积	25

10.3.2 反应程序

将加样后的 PCR 反应管放入实时荧光 PCR 仪中，记录样品摆放顺序。EEE、WEE 与 VEE 按下列程序进行反应：46~50℃（根据所用酶的最适温度调整）逆转录 30 min；95℃预变性 15 min；95℃变性 15 sec，55℃退火 30 sec，72℃延伸 30 sec，共 45 个循环（反应程序需根据不同的实时荧光预混液的说明书进行调整）。

10.4 试验成立条件

阴性对照无 Ct 值且无特异性扩增曲线，阳性对照 Ct 值小于 38 且有典型扩增曲线，判为试验成立。

10.5 结果判定

10.5.1 阳性

待检样品 EEE、WEE 或 VEE 检测 Ct 值小于 40 且有典型扩增曲线，判为 EEE、WEE 或 VEE 核酸检测阳性。

待检样品 EEE、WEE 和 VEE 检测 Ct 值大于等于 40、小于等于 45 且出现典型扩增曲线，需重复检测。如重复检测结果 Ct 值小于 40 且有典型扩增曲线，判定为 EEE、WEE 或 VEE 核酸检测阳性；如仍为 Ct 值大于等于 40、小于等于 45 且出现典型扩增曲线，判为 EEE、WEE 和 VEE 核酸检测阴性。

10.5.2 阴性

待检样品 EEE、WEE 和 VEE 检测无 Ct 值，判为 EEE、WEE 和 VEE 核酸检测阴性。

11 抗原捕获 ELISA

11.1 仪器设备

11.1.1 恒温孵育箱。

11.1.2 酶标仪。

11.2 试剂材料

11.2.1 酶联反应板（96 孔）。

11.2.2 捕获抗体：单克隆抗体 1A4B-6（IgG2b 型），纯度大于等于 95%。

11.2.3 包被缓冲液，按照附录 A 中的 A.4.1 配制。

11.2.4 封闭液，按照附录 A 中的 A.4.2 配制。

11.2.5 洗涤缓冲液，按照附录 A 中的 A.4.3 配制。

11.2.6 阳性对照：纯化的 EEEV。

11.2.7 阴性对照：未感染 EEEV 的蚊子样品处理液，经验证无病毒干扰。

11.2.8 检测抗体：HRP 标记的单克隆抗体 1B5C-3（IgG1 型），纯度大于等于 95%。

11.2.9 底物缓冲液，按照附录 A 中的 A.4.4 配制。

11.2.10 底物显色液，按照附录 A 中的 A.4.5 配制。

11.2.11 终止液，按照附录 A 中的 A.4.6 配制。

11.3 操作方法

11.3.1 包被板制备

用包被缓冲液将捕获抗体按 1:20000 的比例进行稀释，加入酶联反应板中，每孔 100 μL ，置 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育或冷藏储存至使用（可提前包被并 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存）。

11.3.2 封闭

弃去孔中液体，每孔加入 300 μL 封闭液，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

11.3.3 洗涤

用洗涤缓冲液洗涤包被板 5 次，每次浸泡 30 sec 后甩干，备用。

11.3.4 抗原加样

每孔加入 100 μL 处理后的蚊媒样品抗原（混合样品做双份或三份检测），同时设阳性对照和阴性对照各 2 孔。

11.3.5 抗原孵育

置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育箱中孵育过夜。

11.3.6 洗涤

同 11.3.3。

11.3.7 检测抗体加样

用洗涤缓冲液将检测抗体按 1:1000 进行稀释，加入包被板中，每孔加入 100 μL 。

11.3.8 抗体孵育

置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育箱中孵育 1 h。

11.3.9 洗涤

同 11.3.3。

11.3.10 显色

每孔加入 100 μL 底物显色液，避光孵育 30 min。

11.3.11 终止

每孔加入50 μ L终止液，轻微振荡，使终止液与显色液充分混合。

11.3.12 吸光度检测

加入终止液后立即使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度值，记录数据。

11.4 试验成立条件

阳性对照血清两孔平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值大于 1.0，阴性对照血清两孔平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值小于或等于 0.2 时，判为试验成立。

11.5 结果判定

11.5.1 阳性

设定阳性判定阈值=2 \times 阴性对照孔平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值；待检样品孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 值大于判定阈值，判为疑似阳性。疑似阳性样品需按12抗原捕获ELISA抑制试验进行确认。

11.5.2 阴性

待检样品孔平均 $OD_{450\text{ nm}}$ 值小于判定阈值，判为阴性。

12 抗原捕获 ELISA 抑制试验

12.1 仪器设备，同 11.1。

12.2 试剂材料

12.2.1 同源抑制抗体，按照附录 A 中的 A.4.7 配制。

12.2.2 异源抑制抗体，按照附录 A 中的 A.4.8 配制。

12.2.3 其他试剂材料

同 11.2.1~11.2.11。

12.3 操作方法

12.3.1 待检抗原样品与抑制抗体混合

将11判为疑似阳性的样品分为两份：一份加入等体积同源抑制抗体，另一份加入等体积异源抑制抗体，室温静置孵育 30 min，备用。

12.3.2 包被板制备

同 11.3.1。

12.3.3 封闭

同 11.3.2。

12.3.4 洗涤

同 11.3.3。

12.3.5 抗原加样

将待检样品与同源抑制抗体混合物、待检样品与异源抑制抗体混合物加入包被板中，每孔加入 100 μL 。

12.3.6 抗原孵育

同11.3.5。

12.3.7 洗涤

同11.3.3。

12.3.8 检测抗体加样

同11.3.7。

12.3.9 抗体孵育

同11.3.8。

12.3.10 洗涤

同11.3.3。

12.3.11 显色

同11.3.10。

12.3.12 终止

同11.3.11。

12.3.13 吸光度检测

同11.3.12。

12.4 试验成立条件

阳性抑制对照孔（EEEV 阳性样品 + 同源抑制抗体）平均 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值较阳性对照孔降低大于等于 50%，异源抑制对照孔（EEEV 阳性样品 + 异源抑制抗体）平均 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值较阳性对照孔降低小于等于 20%，判为试验成立。阳性对照孔指 11 中未加抑制抗体的阳性抗原孔。

12.5 结果判定

12.5.1 阳性

抑制率（%）= [疑似阳性样品 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值 - （样品 + 同源抑制抗体平均 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值） / 疑似阳性样品 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值] $\times 100\%$ 。同源抑制率大于等于 50%，判为阳性。

12.5.2 阴性

同源抑制率小于 50%，判为阴性。

13 IHC 试验

13.1 仪器设备

- 13.1.1 石蜡切片机。
- 13.1.2 烘片台或温箱。
- 13.1.3 抗原修复仪。
- 13.1.4 光学显微镜。

13.2 试剂材料

- 13.2.1 PBS：按照附录 A 中的 A.1.1 配制。
- 13.2.2 10%福尔马林，按照附录 A 中的 A.3.1 配制。
- 13.2.3 正电荷载玻片。
- 13.2.4 抗体稀释液，按照附录 A 中的 A.5.1 配制。
- 13.2.5 小鼠抗 EEEV 单克隆抗体，按照附录 A 中的 A.5.2 配制。
- 13.2.6 小鼠抗 WNV 单克隆抗体，按照附录 A 中的 A.5.3 配制。
- 13.2.7 抗原修复液，按照附录 A 中的 A.5.4 配制。
- 13.2.8 封闭液，按照附录 A 中的 A.5.5 配制。
- 13.2.9 检测系统：碱性磷酸酶检测系统（如 Ventana V Red 检测试剂盒）。
- 13.2.10 V Red 显色底物，按照附录 A 中的 A.5.6 配制。
- 13.2.11 苏木素复染液，按照附录 A 中的 A.5.7~A.5.8 配制。
- 13.2.12 梯度乙醇（70%、80%、95%、100%）：按照附录 A 中的 A.5.9 配制。
- 13.2.13 二甲苯，按照附录 A 中的 A.5.10 配制。
- 13.2.14 中性树胶封片剂，按照附录 A 中的 A.5.11 配制。
- 13.2.15 阳性对照组织：经 RT-PCR 确认的 EEEV 或 WNV 感染马脑组织。
- 13.2.16 阴性对照组织：未感染马脑组织。
- 13.2.17 同源非免疫小鼠血清对照：按照附录 A 中的 A.5.12 配制。
- 13.2.18 蒸馏水。

13.3 样品采集

采集疑似EEEV或WNV感染马匹的脑组织样品，应包括大脑皮层、小脑、脑干等区域。组织块厚度不宜超过0.5 cm，采样后立即完全浸入足量10%福尔马林中进行固定，防止样品干燥或受到污染。

13.4 样品保存

样品在 10% 福尔马林中置4℃固定时间以 24~48 h为宜，避免超过 72 h，以防止抗原过度交联。固定后组织可转移至70%乙醇中4℃短期保存，或按常规操作流程直接进行脱水、包埋；已完成石蜡包埋的组织块，于室温、干燥、避光条件下长期保存即可。

13.5 样品处理

13.5.1 切片

使用石蜡切片机切取石蜡组织块 5 μm 厚度连续切片，贴附于正电荷载玻片上。60℃烘片台或温箱烘片 1~2 h，使组织紧密附着。

13.5.2 脱蜡

将 FFPE 组织切片放入二甲苯中，每次 10 min，共 2 次，彻底去除石蜡。

13.5.3 水化

依次将切片放入 100%、95%、80%、70% 梯度乙醇中，每次浸泡 5 min，最后用蒸馏水浸泡 5 min，实现切片完全水化。

13.5.4 抗原修复

将水化后的切片置于抗原修复液中，放入抗原修复仪，95℃ 修复 20 min，自然冷却至室温，用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

13.5.5 封闭

滴加封闭液覆盖组织切片，37℃ 孵育 30 min，去除封闭液，PBS 轻柔洗涤。

13.6 操作方法

13.6.1 一抗孵育

根据检测目标，分别滴加小鼠抗 EEEV 单克隆抗体或小鼠抗 WNV 单克隆抗体，确保覆盖整个组织切片，4℃孵育过夜或 37℃孵育 1h；同时设置阴性试剂对照（滴加同源非免疫小鼠血清对照替代一抗）、阳性组织对照和阴性组织对照切片。

13.6.2 洗涤

用 PBS 洗涤切片 3 次，每次 5 min。

13.6.3 二抗孵育

滴加检测系统中的二抗，37℃孵育 30 min。

13.6.4 洗涤

同13.6.2。

13.6.5 显色

滴加 V Red 显色底物，室温避光孵育 10~15 min，显色过程中可在光学显微镜下监控染色强度，直至出现明显红色标记，用蒸馏水终止显色。

13.6.6 复染

将切片放入苏木素复染液中复染 3~5 min，清水冲洗返蓝 5 min。

13.6.7 脱水透明

依次将切片放入 70%、80%、95%、无水乙醇中脱水，每次 3 min；再放入二甲苯中透明 2 次，每次 5 min。

13.6.8 封片

滴加中性树胶封片剂，盖上盖玻片，室温晾干后置光学显微镜下观察。

13.7 试验成立条件

阳性组织对照显示清晰的特异性红色染色（碱性磷酸酶显色）且定位准确（胞浆/胞膜），阴性组织对照及同源非免疫小鼠血清对照无非特异性染色，且组织形态结构完整，背景干净，无非特异性沉淀，判为试验成立。

13.8 结果判定

13.8.1 阳性

神经元、胶质细胞或炎症细胞的胞浆或胞膜出现红色颗粒状或弥漫性特异性染色，且染色定位与细胞形态一致，判为阳性。

13.8.2 阴性

无上述特异性染色，判为阴性。

14 ISH 试验

14.1 仪器设备

14.1.1 石蜡切片机。

14.1.2 全自动原位杂交染色系统（推荐 Leica Bond 或 Ventana Benchmark 系统）。

14.1.3 烘片台。

14.1.4 杂交仪或可密封湿盒。

14.1.5 恒温孵育箱。

14.1.6 水浴锅或 PCR 仪（用于控温杂交）。

14.1.7 光学显微镜。

14.2 试剂材料

14.2.1 梯度乙醇（70%、80%、95%、无水乙醇），按照附录 A 中的 A.5.9 配制。

14.2.2 纯二甲苯，按照附录 A 中的 A.5.10 配制。

- 14.2.3 蛋白酶 K 溶液，按照附录 A 中的 A.6.1 配制。
- 14.2.4 PBS：按照附录 A 中的 A.1.1 配制。
- 14.2.5 预杂交液：按照附录 A 中的 A.6.3 配制。
- 14.2.6 FITC 标记的 EEEV 和 WNV 特异性 DNA 寡核苷酸探针，按照附录 B.3 制备。
- 14.2.7 杂交液，按照附录 A 中的 A.6.4 配制。
- 14.2.8 0.1×SSC（含 0.1% 十二烷基硫酸钠）：按照附录 A 中的 A.6.2、A.6.5 和 A.6.6 配制。
- 14.2.9 V Red 显色底物：按照附录 A 中的 A.5.6 配制。
- 14.2.10 苏木素复染液：按照附录 A 中的 A.5.7~A.5.8 配制。
- 14.2.11 中性树胶封片剂：按照附录 A 中的 A.5.11 配制。
- 14.2.12 检测系统：碱性磷酸酶检测系统（如 Ventana V Red 检测试剂盒）。
- 14.2.13 阳性对照组织： EEEV 或 WNV 感染马脑组织。
- 14.2.14 阴性对照组织：未感染马脑组织。

14.3 样品采集

同13.3。

14.4 样品保存

同13.4。

14.5 样品处理

14.5.1 切片

同 13.5.1。

14.5.2 脱蜡

同13.5.2。

14.5.3 水化

同13.5.3。

14.5.4 蛋白酶消化

将切片放入蛋白酶 K 溶液中，37℃孵育 20 min，消化组织蛋白以暴露病毒核酸；用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，终止消化。

14.5.5 脱水

依次将切片放入 70%、80%、95%、100%梯度乙醇中脱水，每次 3 min，梯度脱水后晾干，备用。

14.6 实验步骤

14.6.1 预杂交

在全自动原位杂交染色系统中，向组织切片滴加预杂交液，42℃孵育 30 min，阻断非特异性杂交位点。

14.6.2 探针杂交

去除预杂交液，分别滴加含 FITC 标记的 EEEV 和 WNV 特异性 DNA 寡核苷酸探针（终浓度 10ng/μL）的杂交液，覆盖组织切片，42℃水浴锅或 PCR 仪中避光孵育过夜（16~18 h）；同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照（仅加杂交液，不加探针）。

14.6.3 高严格性洗涤

用 0.1×SSC 42℃洗涤 2 次，每次 15 min，去除未结合的探针。

14.6.4 封闭

同 13.5.5。

14.6.5 加二抗孵育

滴加检测系统中碱性磷酸酶标记的抗荧光素抗体，37℃孵育 30 min。

14.6.6 洗涤

用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，去除未结合的抗体。

14.6.7 显色及终止显色

滴加 V Red 显色底物，室温黑暗孵育 15~20 min，镜下观察直至特异性红色信号清晰，用蒸馏水终止显色。

14.6.8 复染

苏木素复染液复染 3~5 min，清水冲洗返蓝 5 min。

14.6.9 脱水

依次将切片放入 70%、80%、95%、无水乙醇溶液中脱水，每次 3 min；

14.6.10 透明

放入二甲苯中透明 2 次，每次 5 min。

14.6.11 封片

滴加中性树胶封片剂，盖上盖玻片，室温晾干后待显微镜观察。

14.7 试验成立条件

阳性对照组织显示明确的特异性核内或胞浆内红色颗粒状染色；阴性对照及空白对照应无非特异性信号，且组织背景清晰，无弥漫性沉淀，判为试验成立。

14.8 结果判定

14.8.1 阳性

神经元、胶质细胞或炎症细胞胞浆内出现红色颗粒状或弥漫性特异染色，且定位与细胞形态一致，判为阳性。

14.8.2 阴性

无特异性染色信号，判为阴性。

15 CF 试验

15.1 仪器设备

15.1.1 酶标仪。

15.1.2 离心机。

15.1.3 微量反应板（96孔、透明、平底）。

15.1.4 温箱。

15.1.5 振荡器。

15.1.6 水浴箱。

15.2 试剂耗材

15.2.1 生理盐水，按照附录 A 中的 A.7.1 配制。

15.2.2 稀释液，按照附录 A 中的 A.7.2 配制。

15.2.3 2.8%绵羊红细胞悬液：按照附录 A 中的 A.7.3 配制

15.2.4 溶血素，按照附录 A 中的 A.7.4 配制。

15.2.5 补体，按照附录 A 中的 A.7.5 配制。

15.2.6 马脑脊髓炎病毒阳性血清

15.2.7 马脑脊髓炎灭活抗原，按照附录 A 中的 A.7.6 配制。

15.2.8 1%明胶弗氏缓冲液，按照附录 A 中的 A.7.7 配制。

15.2.9 标准比色孔，按照附录 D 配制。

15.3 主要成分的效价测定

15.3.1 溶血素效价测定

15.3.1.1 溶血素稀释

15.3.1.1.1 将溶血素稀释成 1:100 的基础液（如溶血素以石炭酸防腐时，取 0.1 mL 加 9.9 mL 稀释液；如以甘油为保存液，则取 0.2 mL 加 19.8 mL 稀释液，混合均匀）。

15.3.1.1.2 按表 3 所示稀释溶血素。

表 3 溶血素稀释法

稀释倍数	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:
成分	500	1 000	1 500	2 000	2 500	3 000	3 500	4 000	5 000
1:100溶血素 (mL)	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
稀释液 (mL)	0.8	0.9	1.4	1.9	2.4	2.9	3.4	3.9	4.9
全量 (mL)	1.0	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	5.0

15.3.1.2 操作过程

15.3.1.2.1 将不同稀释度的溶血素、稀释液、补体（用稀释液将补体做 1:20 稀释）、2.8 %绵羊红细胞按表 4 所示组分配比加入微量反应板同一行的第 1 至第 12 孔。

15.3.1.2.2 37 °C 温育 20 min。

15.3.1.2.3 取出微量反应板，轻微振荡混合均匀后，使用酶标仪在 540 nm 波长下测定各孔吸光度值，记录数据。

15.3.1.2.4 比照标准比色孔（见附录 D），对照组应不溶血。

15.3.1.2.5 完全溶血的最大稀释倍数为溶血素效价。

表 4 溶血素效价的测定体系（总体积 125 μ L）

成分	不同稀释度的溶血素									对照		
	1:500	1: 1 000	1: 1 500	1: 2 000	1: 2 500	1: 3 000	1: 3 500	1: 4 000	1: 5 000	1:500 溶血素	补 体	红细 胞
稀释的溶血素(μ L)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	-	-
稀释液(μ L)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	75	75	100
1:20补体(μ L)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	-	25	-
2.8 %绵羊红细胞(μ L)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

15.3.1.3 溶血素工作浓度

按测定的溶血素效价稀释溶血素，在 125 μ L 反应体系中使用 25 μ L 溶血素，即为 1 个溶血素单位。测定补体效价、抗原效价和检测血清样品时，溶血素的使用浓度须提高一倍，使用 2 个单位，即为该溶血素工作浓度。表 4 中，如果溶血素的稀释度在 1:2000 时开始能完全溶血，则溶血素的效价为 1:2000；血清样品检测时，则应减少 1 倍稀释，为 1:1000 稀释。溶血素效价通常一个月测定一次。

15.3.2 制备致敏红细胞

按测定的溶血素效价稀释溶血素至 2 个单位，缓慢加入到等量的 2.8% 绵羊红细胞中，混合均匀，置 37 °C 水浴箱中温育 20 min，即制备成致敏红细胞悬液。

15.3.3 补体效价测定

15.3.3.1 每次进行 CF 试验时，应于当天测定补体效价。

15.3.3.2 用稀释液将补体做 1:20 稀释。

15.3.3.3 将补体（用稀释液将补体做 1:20 稀释）、稀释液按表 5 加入微量反应板同一行的第 1 至第 11 孔，其中第 11 孔为不加补体的对照。

- 15.3.3.4 每孔补加稀释液 25 μ L。
- 15.3.3.5 37 $^{\circ}$ C 温育 20 min。
- 15.3.3.6 每孔加致敏红细胞 50 μ L。
- 15.3.3.7 37 $^{\circ}$ C 温育 20 min。
- 15.3.3.8 取出微量反应板，轻微振荡混合均匀后，使用酶标仪在 540 nm 波长下测定各孔吸光度值，记录数据。
- 15.3.3.9 比对标准比色孔（见附录 D），对照组应不溶血。
- 15.3.3.10 出现完全溶血时补体的最高稀释倍数为补体的效价。

表 5 补体稀释法

成分	孔号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1:20补体(μ L)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	-
稀释液(μ L)	45	40	35	30	25	20	15	10	5	0	50

15.3.3.11 补体工作浓度

按测定的补体效价稀释补体，在125 μ L反应体系中使用25 μ L，即为1个补体溶血单位（CH₅₀）。血清样品检测时，补体应减少4倍稀释，使用5 CH₅₀），即为该补体工作浓度。

15.3.4 抗原效价测定

15.3.4.1 抗原抗体稀释法稀释抗原和阳性血清

将抗原按 1:10、1:50、1:75、1:100、1:150、1:200、1:300、1:400、1:500 稀释成 9 个稀释度，将阳性血清按 1:5、1:10、1:25、1:50、1:75、1:100 稀释成 6 个稀释度，按表 6 加入微量反应板，每孔 25 μ L。

15.3.4.2 微量反应板中另外单设 1 孔为对照孔，只加 1:10 稀释的抗原 25 μ L 和 25 μ L 稀释液。

15.3.4.3 37 $^{\circ}$ C 温育 20 min。

15.3.4.4 取出微量反应板，每孔加入 5 CH₅₀ 补体 25 μ L。

15.3.4.5 37 $^{\circ}$ C 温育 20 min。

15.3.4.6 取出微量反应板，每孔加入致敏红细胞 50 μ L。

15.3.4.7 37 $^{\circ}$ C 温育 20 min。

15.3.4.8 取出微量反应板，轻微振荡混合均匀后，使用酶标仪在 540 nm 波长下测定各孔吸光度值，记录数据。

15.3.4.9 比照标准比色孔（见附录 D），对照组应完全溶血，记录溶血度结果。

15.3.4.10 抗原效价的确定：在对照成立（完全溶血）时，与阳性血清各稀释度发生抑制溶血最强（溶血度 $<10\%$ ）的抗原最高稀释度为抗原效价。

表 6 抗原抗体稀释法

抗体稀释度 \ 抗原稀释度	1:10	1:50	1:75	1:100	1:150	1:200	1:300	1:400	1:500
1:5									
1:10									
1:25									
1:50									
1:75									
1:100									

15.3.4.11 抗原工作浓度

按测定的抗原效价稀释抗原，在 $125\mu\text{L}$ 反应体系中使用 $25\mu\text{L}$ ，即为1个单位抗原。血清样品检测时，抗原应减少1倍稀释，使用2个单位，即为该抗原的工作浓度。

15.4 血清样品检测

15.4.1 CF 试验中主要成分的准备

按 15.3 项的测定结果对 CF 试验中主要成分作稀释。

15.4.1.1 血清样品使用含 1%明胶弗氏缓冲液按 1: 4 比例稀释，并于 56°C 加热 30 min 进行灭活。

15.4.1.2 抗原工作液：按测定的效价稀释成工作浓度（2 个单位抗原）。

15.4.1.3 补体工作液：按测定的效价稀释后工作浓度（ 5 CH_{50} ）。

15.4.1.4 致敏红细胞悬液（同 15.3.2）。

15.4.1.5 阳性血清：灭活后进行 5 倍连续倍比稀释。

15.4.1.6 阴性血清：灭活后进行 5 倍连续倍比稀释。

15.4.2 操作方法

15.4.2.1 试验设置以下对照组：（a）血清与对照血清，分别加入 5 CH_{50} 和 2.5 CH_{50} 补体；（b）CF 抗原与对照抗原，分别加入 5 CH_{50} 和 2.5 CH_{50} 补体；（c）补体稀释度对照： 5 CH_{50} 、 2.5 CH_{50} 及 1.25 CH_{50} ；（d）细胞对照：仅含致敏红细胞悬液与含 1%明胶弗氏缓冲液。这些对照组分别用于检测血清抗补体效应、抗原抗补体效应、补体活性以及无补体条件下致敏红细胞悬液指示系统的完整性。

15.4.2.2 37°C 孵育 30 min，随后以 200 g 离心，观察各孔溶血情况并记录。

15.5 结果判定条件

各对照孔的溶血结果全部符合如下结果时，判为试验成立；否则，补体的效价应重新测定，并重做 15.4 的试验。

- 15.5.1 阴性血清试验对照孔：完全溶血（溶血度大于 90 %）。
- 15.5.2 阳性血清试验对照孔：不溶血（溶血度小于 10 %）。
- 15.5.3 血清抗补体对照孔：完全溶血（溶血度大于 90 %）。如果抗补体对照孔与试验孔的不溶血程度相同，说明该血清为抗补体，需要重新采样或用其他方法检测。
- 15.5.4 抗原对照孔：完全溶血（溶血度大于 90 %）。
- 15.5.5 1 CH₅₀ 补体对照孔：完全溶血（溶血度大于 90 %）。
- 15.5.6 0.5 CH₅₀ 补体对照孔：不完全溶血（溶血度大于等于 10 %，且小于等于 90 %）。
- 15.5.7 红细胞对照孔：不溶血（溶血度小于 10 %）。

15.6 结果判定

血清样品溶血度小于等于 50 %，判为阳性；溶血度大于 50 % 且小于等于 90 %，判为可疑；溶血度大于 90 % 判为阴性。判为阳性的血清最高稀释度为该血清的效价。

16 HI 试验

16.1 仪器设备

- 16.1.1 离心机。
- 16.1.2 水浴锅。
- 16.1.3 微量移液器。
- 16.1.4 振荡器。

16.2 材料试剂

- 16.2.1 96 孔圆底微量滴定板。
- 16.2.2 吐温-80。
- 16.2.3 乙醚。
- 16.2.4 过碘酸钾。
- 16.2.5 甘油。
- 16.2.6 pH 9.0 的硼酸盐盐水。
- 16.2.7 含 0.4% 牛白蛋白的 pH 9.0 硼酸盐盐水。
- 16.2.8 鹅红细胞，按照附录 A 中的 A.8.1 配制。
- 16.2.9 马脑脊髓炎灭活抗原，按照附录 A 中的 A.7.6 配制。
- 16.2.10 马脑脊髓炎病毒阳性血清。
- 16.2.11 马脑脊髓炎病毒阴性血清。

16.3 样品处理

待检血清应按如下方法进行预处理。

16.3.1 方法 1

用 pH 9.0 的硼酸盐盐水将血清按 1:10 进行稀释, 随后置 56℃ 灭活 30 min。采用高岭土处理法去除血清中的非特异性抑制剂。

16.3.2 方法 2

用 PBS 将血清按 1:10 进行稀释后用丙酮处理, 再复溶于 pH 9.0 的硼酸盐盐水中, 以此去除非特异性抑制剂。使用前, 需将预处理的血清与 0.05 μL 经洗涤的鹅红细胞沉淀在 4℃ 孵育 20 min, 完成吸附处理。

16.4 试验步骤

16.4.1 在进行本试验前, 将马脑脊髓炎灭活抗原进行稀释, 使得每个血凝单位 (HAU) 的用量是能凝集试验体系中 50% 红细胞用量的 4 到 8 倍。抗原的血凝滴度和最适 pH 值, 是通过在 pH 5.8 至 6.6 (间隔 0.2) 的溶液中稀释的鹅红细胞来测定的。

16.4.2 用含 0.4% 牛白蛋白的 pH 9.0 硼酸盐盐水将处理后的血清进行倍比稀释。

16.4.3 加 25 μL 倍比稀释的血清于 96 孔圆底微量滴定板各孔中, 同时设阴性对照和阳性对照血清。

16.4.4 加 25 μL 抗原于 96 孔圆底微量滴定板各孔中。

16.4.5 将滴定板置 4℃ 孵育过夜。

16.4.6 每孔加 50 μL 鹅红细胞, 将滴定板置 37℃ 孵育 30 min。

16.4.7 将滴定板倾斜 45° 角, 无凝集反应, 则沉淀的红细胞向下滑动, 呈流线状, 判为完全抑制凝集。

16.4.8 完全抑制凝集的抗体最高稀释倍数为血清的 HI 抗体效价。

16.5 结果判定

16.5.1 试验成立的条件

当阳性血清的 HI 效价与已知效价相差不超过 1 个滴度, 阴性血清为阴性时, 判为试验成立。

16.5.2 阳性

HI 效价为 1:10 和 1:20 时, 判为可疑; HI 效价不低于 1:40, 判为阳性。

16.5.3 阴性

HI 效价小于 1:40, 判为阴性。

17 抗体 ELISA 试验

17.1 仪器设备

17.1.1 酶标仪。

17.1.2 温箱。

17.1.3 振荡器。

17.2 试剂材料

17.2.1 包被抗原：抗马 IgM。

17.2.2 包被液：同 11.2.3。

17.2.3 病毒抗原。

17.2.4 酶标抗体：对应病毒的辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体。

17.2.5 PBS，按照附录 A 中的 A.1 配制。

17.2.6 洗涤缓冲液：同 11.2.5。

17.2.7 封闭液，按照附录 A 中的 A.9.1 配制。

17.2.8 血清稀释液及酶标抗体稀释液，即洗涤缓冲液。

17.2.9 阳性对照血清：对应病毒的阳性血清。

17.2.10 阴性对照血清：对应病毒的阴性血清。

17.2.11 ABTS 底物液（2,2'-联氮-二[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸]）（商品化试剂）。

17.3 操作方法

17.3.1 包被

将抗马 IgM 抗体用包被液稀释，取 50~100 μl 加入酶联反应板中，37℃ 孵育 1h，再于 4℃ 孵育过夜。

17.3.2 洗涤

同 11.3.3，重复洗涤 3 次。

17.3.3 封闭

每孔加入 200 μL 封闭液，室温孵育 1 h。

17.3.4 洗涤

同 17.3.2，重复洗涤 3 次。

17.3.5 加待检血清及对照血清

将待检血清用洗涤缓冲液按 1: 400 倍进行稀释，加入包被板中，每孔 50 μL，同时设阴性对照血清和阳性对照血清，每孔 50 μL，置 37℃ 恒温箱中孵育 90min。

17.3.6 洗涤

同 11.3.3，重复洗涤 3 次。

17.3.7 加病毒抗原

每孔加入 50 μ L 病毒抗原，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

17.3.8 加酶标抗体

每孔加入 50 μ L 酶标抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 60~90min。

17.3.9 洗涤

同11.3.3，重复洗涤6次。

17.3.10 加底物溶液

每孔加新配制的 ABTS 底物液与 0.1%过氧化氢混合液 50 μ L，在室温（20 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C）避光孵育 15 ~ 40 min。

17.3.11 检测

轻微振荡混合均匀后，使用酶标仪在 405 nm 波长下测定各孔吸光度值，记录数据。。

17.4 结果判定

若待测样品在病毒抗原孔中的吸光度值同时满足以下两个条件，则判为阳性：（1）不低于病毒抗原孔中阴性对照血清吸光度值的2倍；（2）不低于同一样品在阴性对照抗原孔中吸光度值的2倍。

18 PRN 试验

18.1 仪器设备

18.1.1 生物安全柜（II级）。

18.1.2 水浴锅。

18.1.3 CO₂ 培养箱。

18.1.4 倒置光学显微镜。

18.2 试剂材料

18.2.1 PBS，按照附录 A 中的 A.1.1 配制。

18.2.2 细胞系：CEF/DEF、Vero 细胞或 BHK-21 细胞，均需经质量验证，无支原体污染，生长状态良好。

18.2.3 细胞维持液：按照附录 A 中的 A.3.7 配制。

18.2.4 细胞培养瓶（25 cm²）。

18.2.5 毒株：经标定后 EEE、WEE、VEE 标准参考病毒株。病毒液使用前需经空斑试验标定滴度。

18.2.6 EBSS：按照附录 A 中的 A.10.1 配制。

18.2.7 FBS：按照附录 A 中的 A.3.6 配制。

18.2.8 庆大霉素储备液：按照附录 A 中的 A.10.2 配制。

- 18.2.9 制霉菌素储备液：按照附录 A 中的 A.10.3 配制。
- 18.2.10 碳酸氢钠：按照附录 A 中的 A.10.4 配制。
- 18.2.11 中性红储存液：按照附录 A 中的 A.10.5 配制。
- 18.2.12 酵母浸出物乳清蛋白水解物溶液：按照附录 A 中的 A.10.6 配制。
- 18.2.13 Noble 琼脂：按照附录 A 中的 A.10.7 配制。
- 18.2.14 2×细胞培养液：按照附录 A 中的 A.10.8 配制。
- 18.2.15 覆盖培养基：按照附录 A 中的 A.10.9 配制。覆盖培养基需在 47℃ 水浴中保温备用。

18.3 实验步骤

18.3.1 病毒-血清混合

在生物安全柜中，将稀释好的待检血清与等体积的含 100 PFU 的病毒液（25 cm² 培养瓶为 100 PFU 病毒液，六孔板为 50 PFU）混合，同时设置病毒对照（标定后的 EEE、WEE、VEE 标准参考病毒株病毒液 100 PFU 与等体积细胞维持液混合）和细胞对照（仅加入细胞维持液），随后将所有混合液置于 37℃ 水浴中和 75 min。

18.3.2 接种与吸附

待细胞生长至状态稳定的致密单层后，弃去原有培养液，以 PBS 缓冲液轻柔漂洗细胞单层 2 次；随后将病毒-血清混合液均匀接种至细胞表面，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中吸附 1 h，吸附期间每 15 min 轻柔振荡 1 次，确保混合液全程均匀覆盖细胞单层，保障病毒吸附充分且一致。

18.3.3 覆盖琼脂层

吸附结束后，弃去细胞表面的接种液；随即向培养瓶中加入 6 mL 47℃ 覆盖培养基，确保培养基均匀覆盖细胞单层；置于室温条件下静置 10~15 min，待覆盖层培养基完全凝固。

18.3.4 培养与观察

将上述处理后的细胞培养瓶置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中，避光培养 48~72 h；培养期间每日在倒置光学显微镜下观察细胞生长状态及空斑形成情况。

18.4 试验成立条件

病毒对照形成清晰可数的空斑，数量应在 80~120 PFU 范围内；细胞对照细胞单层完整、健康，无任何空斑或病变出现，判为试验成立。

18.5 结果判定

18.5.1 终点判定标准

与病毒对照相比，能使空斑数减少 90% 或以上的最高血清稀释度，即为该血清的 PRN 抗体滴度。

18.5.2 阳性

血清 PRN 抗体滴度 $\geq 1/10$ ，判为阳性。

18.5.3 滴度测定

对系列稀释的血清，计算能引起 90%空斑减少的终点稀释度（如 1/40、1/160 等）。急性期与恢复期双份血清中和抗体滴度有 4 倍或以上升高，具有确诊意义。

18.5.4 血清型区分

一份血清可能对不同型病毒（EEEV、WEEV、VEEV）均产生中和反应，但通常对同型病毒的中和滴度最高。需通过比较对三种病毒的中和滴度来判定主要感染类型。

19 综合判定

19.1.1 经 7、9~17 任何一项检测为阳性，判为疑似感染。

19.1.2 经 18 检测为阳性，可直接判定为感染。

19.1.3 经 15、16 双份血清检测，效价升高 4 倍，可判定为感染。

19.1.4 经 9、10 任何一项检测为阳性，同时 12~18 任何一项检测为阳性，可判定为感染。

附 录 A
(规范性)
试剂的配制

A.1 常规试剂的配制

A.1.1 PBS (0.01mol/L, pH 7.4)

称取 8 g NaCl、3.6 g Na₂HPO₄·12H₂O、0.27 g KH₂PO₄ 和 0.2 g KCl, 加入 900 mL 双蒸水, 搅拌至完全溶解后, 用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 7.4, 用双蒸水定容至 1 L, 经 0.22 μm 滤器过滤除菌, 置室温 (20 °C±5 °C) 保存。

A.2 PCR 试验相关试剂

A.2.1 1.5%的琼脂糖溶液

称取琼脂糖 1.5g, 加入 100mL 的 1×TAE, 微波炉加热充分溶解混匀。

A.2.2 1×TAE

取 Tris 碱 24.2g、冰乙酸 5.7mL 和 0.5 mol/L EDTA (PH 8.0) 10 mL, 加蒸馏水至 100mL。使用时用蒸馏水作 50 倍稀释, 即为 1×TAE。

A.3 样品采集、保存与运输相关试剂

A.3.1 10% 福尔马林

称取 4 g 多聚甲醛, 加入 90 mL 双蒸水, 加热至 60°C 左右搅拌溶解, 冷却后加入 10 mL 1 mol/L pH 7.4 的 PBS (按照附录 A 中的 A.1 配制), 混匀后 4°C 保存, 有效期 1 个月。

A.3.2 双抗溶液

称取 100 mg 青霉素G钠盐和100 mg 硫酸链霉素, 溶于 10 mL 无菌双蒸水中, 充分混匀后经 0.22 μm 滤器过滤除菌, 分装为 1 mL / 份, -20°C 冷冻保存, 有效期 6 个月。

A.3.3 组织匀浆缓冲液

取 100 mL PBS (按照附录 A 中的 A.1.1 配制), 加入 0.75 g BSA V 组分和 1 mL 双抗溶液 (按照附录 A 中的 A.3.2 配制), 充分搅拌至完全溶解, 经 0.22 μm 滤器过滤除菌, 4°C 保存, 有效期 1 周。

A.3.4 样品稀释液

称取 24.2 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、8.77 g 氯化钠 (NaCl)、10 g 牛血清白蛋白 (BSA) 和 10 mg 酚红, 加入 900 mL 双蒸水, 搅拌至完全溶解后, 用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 8.0, 加入 50 μg 庆大霉素和1 μg 两性霉素 B (制霉菌素), 用双蒸水定容至 1 L, 经 0.22 μm 滤器过滤除菌, 置 4°C 保存, 有效期 1 个月。

A.3.5 裂解缓冲液

取1 L PBS (按照附录 A 中的 A.1.1 配制), 加入 50 mL 吐温 - 20, 充分混匀, 经 0.22 μm 滤器过滤除菌, 置 4°C 保存, 有效期 3 个月。

A.3.6 FBS

将商品化胎牛血清置于 56℃水浴中灭活 30 min，期间每 10 min 轻轻混匀 1 次，灭活后分装至无菌离心管中，-20℃冷冻保存，避免反复冻融，有效期按产品标注执行。

A.3.7 细胞维持液

取 100 mL 1640 培养基，加入 2 mL FBS（按照附录 A 中的 A.3.6 配制）和 1 mL 双抗溶液（按照附录 A 中的 A.3.2 配制），充分混匀，经 0.22 μm 滤器过滤除菌，4℃保存，有效期 1 周。

A.4 抗原捕获 ELISA 试验及抗原捕获 ELISA 抑制试验相关试剂

A.4.1 包被缓冲液（0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液，pH 9.6）

称取 1.59 g 碳酸钠（Na₂CO₃）和 2.93 g 碳酸氢钠（NaHCO₃），加入 900 mL 双蒸水，搅拌至完全溶解后，用双蒸水定容至 1 L，经 0.22 μm 滤器过滤除菌，置 4℃保存，有效期 6 个月。使用前恢复至室温，轻轻混匀。

A.4.2 封闭液（含 1% 脱脂奶粉和 0.1% Tween 20）

称取脱脂奶粉 5 g，溶解于 100 mL PBS（按照附录 A 中的 A.1.1 配制）中，经 0.22 μm 滤器过滤除菌，4℃密封保存，有效期 1 周。

A.4.3 洗涤缓冲液

取 1 L PBS（按照附录 A 中的 A.1.1 配制），加入 1 mL 吐温-20，充分混匀，现用现配（配好后使用不超过 7 d），置室温（20℃±5℃）保存。

A.4.4 底物缓冲液

称取 1.49 g 无水乙酸钠、1.66 g 柠檬酸，溶于 900 mL 双蒸水中，调节 pH 至 5.0，用双蒸水定容至 1 L，置 4℃避光保存，有效期 3 个月。

A.4.5 底物显色液（TMB 显色液）

取 100 mL A10 底物缓冲液，加入 10 mg 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB），充分溶解后，加入 10 μL 30% 过氧化氢（H₂O₂），现配现用，全程避光。

A.4.6 终止液（1 mol/L 硫酸溶液）

将 55.5 mL 浓硫酸（18.4 mol/L）缓慢加入 800 mL 双蒸水中，边滴加边搅拌，待溶液冷却至室温后，用双蒸水定容至 1 L，置室温（20℃±5℃）保存，有效期 12 个月（注意防腐、防腐蚀）。

A.4.7 同源抑制抗体工作液（1:100 稀释）

取抗 EEE 病毒鼠源超免疫腹水液（MHIAF，抗体滴度≥1:128000）10 μL，加入 990 μL 按 A.2 规定配制的洗涤缓冲液，充分混匀，现配现用。

A.4.8 异源抑制抗体工作液（1:100 稀释）

取抗圣路易斯脑炎（SLE）病毒鼠源超免疫腹水液 10 μL，加入 990 μL 按 A.2 规定配制的洗涤缓冲液，充分混匀，现配现用。

A.5 IHC 试验相关试剂

A.5.1 抗体稀释液（含胎牛血清的 PBS）

取胎牛血清 5 mL，加入 95 mL PBS（按 A.1.1 配制），充分混匀，4℃冷藏保存，有效期 1 个月。

A.5.2 小鼠抗 EEEV 单克隆抗体工作液（工作浓度 1:500）

取小鼠抗 EEEV 单克隆抗体原液 2 μL，加入 1 mL 抗体稀释液（按 A.5.1 配制），充分混匀，现用现配，4℃避光保存（24 h 内使用）。

A.5.3 小鼠抗 WNV 单克隆抗体工作液（工作浓度 1:2000）

取小鼠抗 WNV 单克隆抗体原液 0.5 μL，加入 1 mL 抗体稀释液（按 A.5.1 配制），充分混匀，现用现配，4℃避光保存（24 h 内使用）。

A.5.4 抗原修复液（柠檬酸盐缓冲液，pH 6.0）

称取柠檬酸钠 2.94 g，加入 900 mL 双蒸水溶解，用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 6.0，用双蒸水定容至 1 L，室温（20℃±5℃）保存。

A.5.5 封闭液（山羊血清封闭液）

取山羊血清 10 mL，加入 90 mL PBS（按 A.1.1 配制），充分混匀，4℃冷藏保存，有效期 1 个月。

A.5.6 V Red 显色底物

按照试剂盒说明书，将 V Red 显色底物试剂与配套缓冲液按比例混合，现用现配，避光保存。

A.5.7 苏木素复染液

称取苏木素 1 g，溶于 100 mL 无水乙醇中，搅拌至完全溶解；另称取硫酸铝钾 20 g，溶于 800 mL 双蒸水中，加热至沸腾后缓慢倒入苏木素乙醇溶液，搅拌均匀，煮沸 5 min，冷却后加入 0.5 g 氧化汞，快速搅拌至溶液呈紫红色，冷却至室温，用双蒸水定容至 1 L，密封后室温避光保存，静置 1~2 周后使用。

A.5.8 苏木素染液工作液

取 A.5.7 储备液 100 mL，加入 900 mL 双蒸水，再加入 2 mL 冰醋酸，充分混匀，室温避光保存，使用前过滤。

A.5.9 梯度乙醇

量取 70、80 和 95 mL 无水乙醇，分别加入 30、20 和 5 mL 双蒸水，混匀后室温保存，配制成 70%、80% 和 95% 的乙醇。

A.5.10 二甲苯

直接使用分析纯二甲苯，室温密封保存，避免挥发。

A.5.11 中性树胶封片剂

直接使用商品化中性树胶，室温密封保存，避免阳光直射。

A.5.12 同源非免疫小鼠血清对照

取同源非免疫小鼠血清 10 mL，加入 90 mL PBS（按附录 A 中 A.1.1 配制），充分混匀，4℃冷藏保存，有效期 1 个月。

A.6 ISH 试验相关试剂

A.6.1 蛋白酶 K 溶液

称取蛋白酶 K 粉末 2 mg，加入 100 mL PBS（按附录 A 中 A.1.1 配制），充分溶解后，经 0.22μm 滤器过滤除菌，分装为 1 mL / 份，-20℃冷冻保存，使用前解冻。

A.6.2 20×SSC

取 NaCl 175.3 g 和柠檬酸钠 88.2 g，加入 900 mL 双蒸水，搅拌至完全溶解，用浓盐酸调节 pH 至 7.0，用双蒸水定容至 1 L，室温密封保存，有效期 6 个月。

A.6.3 预杂交液

取甲酰胺 50 mL、20×SSC 25 mL、载体 DNA（10 mg/mL）1 mL 和封闭剂 5 g，加入双蒸水定容至 100 mL，充分混匀后，分装为 10 mL / 份，-20℃冷冻保存，使用前 42℃预热解冻。

A.6.4 杂交液

取预杂交液 9 mL，加入特异性探针（终浓度 10 ng/μL），充分混匀，现用现配，避光保存。

A.6.5 2×SSC

取 20×SSC（按附录 A 中 A.6.2 配制）100 mL，加入 900 mL 双蒸水，再加入 1 g 十二烷基硫酸钠，搅拌至完全溶解，室温保存。

A.6.6 0.1×SSC（含 0.1% 十二烷基硫酸钠）

取 2×SSC（按附录 A 中 A.6.5 配制）50 mL，加入 950 mL 双蒸水，再加入 1 g 十二烷基硫酸钠，搅拌至完全溶解，室温保存。

A.7 CF 试验相关试剂

A.7.1 生理盐水

称取 8.5 g NaCl，加入 900 mL 蒸馏水，搅拌至完全溶解后，用蒸馏水定容至 1 L，121℃高压灭菌 15 min。

A.7.2 稀释液：巴比妥缓冲液（VBS）的制备

溶液 1：称取氯化钠 85 g、六水合氯化镁 1.68 g 和氯化钙 0.28 g，加入 1000 mL 蒸馏水，搅拌至完全溶解。

溶液 2：称取 5, 5 二乙基巴比妥酸 5.75 g 和 5, 5 二乙基巴比妥钠 3.75 g，溶解于 500 mL 热蒸馏水中，冷却，待用。

将溶液 1 和溶液 2 混合后，用蒸馏水定容至 2 000 mL，0.104 MPa ~ 0.112 MPa 灭菌 20 min，分装储存于 4℃备用。

使用前将所配液体用蒸馏水作 1:5 稀释，调 pH 值至 7.4。

A.7.3 2.8%绵羊红细胞

采健康绵羊颈静脉血至灭菌的装有玻璃珠的脱纤瓶内，振荡15~20 min，使其失去凝固性，脱去纤维蛋白，即为脱纤血。

将脱纤血用两层纱布过滤后，移入离心管内，加2~3倍量的稀释液（按照附录A中A.7.2配制），混匀，以300 g离心10 min后，吸去上清液，再加稀释液（按照附录A中A.7.2配制），用玻璃棒搅匀，再离心沉淀，如此反复三次（第一次除外），直到上清液透明为止，然后吸去上清液，所剩沉淀，即为红细胞泥（压积红细胞）。用稀释液（按照附录A中A.7.2配制）将红细胞泥配成2.8%的浓度（即1:40稀释），即为试验用的红细胞悬液。

A.7.4 溶血素

即抗绵羊红细胞抗体（如兔抗绵羊红细胞抗体），可购买商用试剂。用前需测定效价。

A.7.5 补体

可用冻干补体，也可应用豚鼠的新鲜血清作补体。新鲜补体须在实施反应的前一天，自3只以上健康豚鼠心脏采血，根据体重不同，每只采血5 mL~8 mL左右。将采集的血液置培养皿中凝固（每个培养皿约盛15 mL为宜），随后用玻璃棒划破血凝块，置于37℃水浴箱中15 min后再放于冰箱中过夜，次日吸取血清，离心沉淀后，其上清即为补体。新采集的补体可当天使用，或置于4~8℃冰箱，可使用2 d；如果-20~-25℃冷冻保存，可供一个月使用。可购买商用试剂。

A.7.6 马脑脊髓炎灭活抗原

常用蔗糖/丙酮小鼠脑提取物作为抗原。阳性抗原经0.1%β-丙内酯处理灭活。在实验室使用该抗原前，需通过体内或体外培养进行活力检测，以确认灭活效果。

A.7.7 1% 明胶弗氏缓冲液（VBSG）

称取明胶 1 g，先用少量 VBS 浸泡 10~15 min 使其充分吸水膨胀。将悬液加热至 50~60℃ 并间歇搅拌，直至明胶完全溶解。补足 VBS 至 100 mL，混匀后趁热经 0.22 μm 滤膜（或 115℃/10~15 min）灭菌。冷却至室温后 4℃ 保存，1 周内使用完毕；使用前可 37℃ 复温使溶液均匀。

A.8 HI 试验相关试剂

A.8.1 鹅红细胞

红细胞取自健康的雄性白鹅，在葡萄糖 / 明胶 / 维罗那缓冲液（DGV）中洗涤三次，随后在 DGV 中制备成 7.0% 的悬液。将该 7.0% 悬液在适宜的 pH 溶液中按 1:24 稀释。

A.8.2 马脑脊髓炎灭活抗原

常用蔗糖/丙酮小鼠脑提取物作为抗原。阳性抗原经0.1%β-丙内酯处理灭活。在实验室使用该抗原前，需通过体内或体外培养进行活力检测，以确认灭活效果。

A.9 ELISA 试验相关试剂

A.9.1 封闭液

称取脱脂奶粉 5 g，溶解于 100 mL PBST 中，经 0.22 μm 滤器过滤除菌，4℃ 密封保存，有效期 1 周。

A.10 PRN 试验相关试剂

A.10.1 Earle 氏基础盐溶液

按照商品试剂说明书配制或自行配制，核心成分符合无酚红、无菌标准，配制完成后经 0.22 μm 滤器过滤除菌，4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存，有效期 1 个月。

A.10.2 庆大霉素储备液

称取 100 mg 庆大霉素粉末，溶于 10 mL 无菌双蒸水中，混合均匀后经 0.22 μm 滤器过滤除菌，分装为 1 mL/份，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期 6 个月。

A.10.3 制霉菌素储备液

称取 200 mg 制霉菌素粉末，加入 10 mL 无菌双蒸水，超声助溶至完全溶解，经 0.22 μm 滤器过滤除菌，分装为 1 mL/份，-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期 6 个月。

A.10.4 碳酸氢钠溶液

称取 4.5 g 碳酸氢钠粉末，加入 1000 mL 无菌双蒸水，搅拌至完全溶解后，经 0.22 μm 滤器过滤除菌，室温（20 $^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ）保存，有效期 14 d。

A.10.5 中性红储存液

称取 0.2 g 中性红粉末，加入 100 mL 无菌双蒸水，搅拌至完全溶解后，经 0.22 μm 滤器过滤除菌，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光密封保存，有效期 3 个月。

A.10.6 酵母浸出物乳清蛋白水解物溶液

称取 6.6 g 酵母浸出物乳清蛋白水解物，加入 100 mL 无菌双蒸水，搅拌至完全溶解后，经 0.22 μm 滤器过滤除菌，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期 7 d。

A.10.7 Noble 琼脂溶液

称取 2 g Noble 琼脂粉末，加入 100 mL 无菌双蒸水，加热煮沸并不断搅拌至琼脂完全溶解，121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 20 min，自然冷却至约 47 $^{\circ}\text{C}$ 后恒温水浴保温备用，现配现用。

A.10.8 2 \times 细胞培养液

按以下比例混合各成分：2 \times Earle 氏基础盐溶液（按附录A中 A.10.1配制）、4% FBS（按附录A中 A.3.6配制）、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素（按附录A中 A.10.2配制）、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制霉菌素（按附录A中 A.10.3配制）、0.45% 碳酸氢钠溶液（按附录A中 A.10.4配制）、0.002% 中性红储存液（按附录A中 A.10.5配制）；若使用 DMEF 细胞，需额外添加 6.6% 酵母浸出物乳清蛋白水解物溶液（按附录A中 A.10.6配制）。混合后调节 pH 至 7.2~7.4，无菌过滤，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期 7 d。

A.10.9 覆盖培养基

使用前将等体积的 Noble 琼脂溶液（按附录A中A.10.7配制）和2 \times 细胞培养液（按附录A中A.10.8配制）均调节至约47 $^{\circ}\text{C}$ ，快速混匀，现配现用。

附 录 B
(资料性)
引物和探针序列

B.1 普通 RT-PCR 引物和探针序列见表 B.1。

表B.1 EEE、WEE、VEE RT-PCR引物和探针序列

病毒	扩增长度	引物序列
EEE (1 st Stage)	565	F: AGGGCTTACCTGATTGAC R: GTAACGCCAGGAGTATTG
EEE (nested)	140	F: GGCTCAAGAGTCAGGAGA R: CGGATGTGACACAAGAGA
WEE (1 st Stage)	590	F: TAAGTGTGGCGACTACAG R: TCAGGCAGTCTCTTCTTG
WEE (nested)	335	F: CTCACACGCCTACAGTCA R: AGTGCCTACCAGGATAGC
VEE I-AB/C/D (1 st Stage)	562	F: AGCCAGTGCACAAAGAAG R: TAGGTGTTAGCCGGTAAG
VEE I-AB/C/D (nested)	136	F: GGGTGGGAGTTTGTATGG R: CCAGGATGGTGGACATAG
VEE I-E (1 st Stage)	475	F: GTAATCCCCACGGACTGC R: GCATAACCCGCTCTGTTG
VEE I-E (nested)	162	F: GCATGCCTCTGTGCTTAG R: ATTCAGCAAGCGGGTAG
VEE all (1 st Stage)	156	F: ATGGAGAARGTTCACGTTGAYATCG R: YTCGATYARYTTNGANGCYARATGC
VEE all (nested)	80	F: ARGAYAGYCCNTTCCTYMGAGC R: CRTTAGCATGGTCRTRTRCNGTNAC

B.2 荧光 RT-PCR 引物和探针序列见表 B.2。

表B.2 实时荧光RT-PCR引物和探针序列

病毒	引物探针名称	序列 (5'→3')
EEE	EEE 9391 (上游引物 F)	ACACCGCACCCCTGATTTTACA
	EEE 9459c (下游引物 R)	CTTCCAAGTGACCTGGTCGTC
	EEE 9414 (探针 P)	FAM-TGCACCCGGACCATCCGACCT-BHQ1
WEE	WEE 10248 (上游引物 F)	CTGAAAGTCGGCCTGCGTAT
	WEE 10314c (下游引物 R)	CGCCATTGACGAACGTATCC
	WEE 10271 (探针 P)	FAM-ATACGGCAATACCACCGCGCACCC-BHQ1
VEE	AlphaVIR966 (上游引物 F)	TCCATGCTAATGCYAGAGCGTTTTTCGCA
	AlphaVIR966 (下游引物 R)	TGGCGCACTTCCAATGTCHAGGAT
	INEID-VEEV (探针 P)	FAM-TGATCGARACGGAGGTRGAMCCATCC-BHQ1
注：简并碱基 R 代表 A/G，简并碱基 Y 代表 C/T，简并碱基 M 代表 A/C，简并碱基 H 代表 A/C/T。		

B.3 DNA 寡核苷酸探针见表 B.3。

表B.3 原位杂交 (ISH) 试验用FITC标记的特异性寡核苷酸探针序列

病毒	寡核苷酸探针序列
EEEV	5'-ACGATGTGGTCTTTGGGTGCTTACAATCTCTTTGCAGG-3'
WNV	5'-AAATCCACCCATGTTGCTCCAGACACTCT-3'

附 录 C

(资料性)

普通和实时荧光RT-PCR阳性对照质粒的制备

C.1 普通 RT-PCR 和 qRT-PCR 阳性对照质粒的制备与鉴定

按照表 B.1 所列的引物, 通过 GeneBank 进行 Blast 分析, 找到 EEEV、WEEV、VEEV 的扩增片段, 送生物公司进行扩增子的合成。

EEEV RT-PCR 阳性质粒为 EEE Nested; WEEV RT-PCR 阳性质粒为 WEE Nested; VEEV (I-AB/C/D 亚型)RT-PCR 质粒为 VEE I-AB/C/D; VEEV (I-E 亚型)RT-PCR 质粒为 VEE I-E; VEEV (通用型) RT-PCR 阳性质粒为 VEE all。

EEEV qPCR 阳性质粒为 EEE qPCR; WEEV qPCR 阳性质粒为 WEE qPCR; VEEV qPCR 阳性质粒为 VEE qPCR。

C.2 普通 RT-PCR 和 qRT-PCR 阳性对照质粒的标定

用分光光度计测定合成质粒的浓度, 利用公式: $\text{DNA (copy)} = [6.02 \times 10^{23} (\text{copy/mol}) \times \text{DNA}] / [\text{DNA 长度}(\text{bp}) \times 660 (\text{g/mol/bp})]$ 计算质粒拷贝数, 作为阳性对照时, 拷贝数在 10^7 拷贝以下, 以免浓度过高造成污染。

C.3 普通 RT-PCR 阳性对照质粒的序列

C.3.1 EEE普通RT-PCR扩增子目的序列 (GenBank号: U01034.1)

```
AGGGCTTACCTGATTGACAACAAAAATGGGTGTACAACCTCTGGAAGACTGCCTCGAGGAGAGG
GCGACACTTTTAAAGGAAAACCTTCATGTGCCCTTTGTGCCTGTTAAGGCCAAGTGCATCGCCACG
CTGGCACCGGAGCCTCTAGTTGAGCACAAACACCGCACCTGATTTTACACCTGCACCCGGACCA
TCCGACCTTGCTGACGACCAGATCACTTGAAGTGATGCAAATCCAACCTCGACAATGGATTGAGC
GACCAACAACCTGTCAATTTACAGTCACCGGAGAAGGGTTGGAGTATACCTGGGGAAACCATCC
ACCAAAAAGAGTATGGGCTCAAGAGTCAGGAGAAGGGAACCCACATGGATGGCCGCACGAAGT
GGTAGTCTATTACTACAACAGATACCCGTTAACCACAATTATCGGGTTATGCACCTGTGTGGCTA
TCATCATGGTCTCTTGTGTACATCCGTGTGGCTCCTTTTCAGGACTCGCAATCTTTGCATAACCC
CGTATAAACTAGCCCCGAACGCTCAAGTCCCAATACTCCTGGCGTTAC
```

C.3.2 WEE普通RT-PCR扩增子目的序列 (GenBank号: GQ287647.1)

```
TAAGTGTGGCGACTACAGCACAGGTATCGTGAGCACGCGAACGAAGATGAACGGCTGCACTAAA
GCAAAACAGTGCATTGCCTACAAGAGCGACCAAACGAAATGGGTCTTCAACTCGCCGGATCTTA
TTAGGCACACAGACCACTCAGTGCAAGGTAAACTGCACATTCCATTCCGCTTGACACCGACAGTC
TGCCCGGTTCCGTTAGCTCACACGCCTACAGTCACGAAGTGGTTCAAAGGCATCACCCCTCCACCT
GACTGCAACGCGACCAACATTGCTGACAACGAGAAAATTGGGGCTGCGAGCAGACGCAACAGCA
GAATGGATTACAGGGACTACATCCAGGAATTTTTCTGTGGGGCGAGAAGGGCTGGAGTACGTAT
GGGGCAACCATGAACCAGTCAGAGTCTGGGCCAGGAGTCGGCACCAGGCGACCCACATGGATG
GCCGCATGAGATTATCATCCACTATTATCATCGGCATCCAGTCTACACCGTCATTGTGCTGTGTGG
```

TGTCGCTCTTGCTATCCTGGTAGGCACTGCATCGTCAGCAGCTTGTATCGCCAAAGCAAGAAGAG
ACTGCCTGA

C.3.3 VEE-I-AB/C/D型普通RT-PCR扩增子目的序列（GenBank号：L01442.2）

AGCCAGTGCACAAAGAAGGAGCAGTGCAGAGCATATCGGCTGCAGAACGATAAGTGGGTGTATA
ATTCTGACAAACTGCCCAAAGCAGCGGGAGCCACCTTAAAAGGAAACTGCATGTCCCATTCTTG
CTGGCAGACGGCAAATGCACCGTGCCTCTAGCACCAGAACCTATGATAACCTTTGGTTTCAGATC
AGTGTCACTGAAACTGCACCCTAAGAATCCACATATCTAACCACCCGCCAACTTGCTGATGAGC
CTCACTACACGCACGAGCTCATATCTGAACCAGCTGTTAGGAATTTTACCGTCACCGAAAAAGGG
TGGGAGTTTGTATGGGGAAACCACCCGCCGAAAAGGTTTTGGGCACAGGAAACAGCACCCGGAA
ATCCACATGGGCTACCGCACGAGGTGATAACTCATTATTACCACAGATACCCTATGTCCACCATC
CTGGGTTTGTCAATTTGTGCCGCCATTGCAACCGTTTCCGTTGCAGCGTCTACCTGGCTGTTTTGC
AGATCTAGAGTTGCGTGCCTAACTCCTTACCGGCTAACACCTA

C.3.4 VEE-I-E型普通RT-PCR扩增子目的序列（GenBank号：AF075252.1）

GTAATCCCCACGGACTGCCGCACGAGGTGATCACCCATTACTATCACAGGTATCCCATGTCCACC
ATTTTAGGCTTATCAATTTGTGCGGCGATAGTGACGACATCCATTGCAGCATCCGTATGGCTTTTC
TGCAAATCACGGATTTCTGCCTGACCCCTATCGCTTGACTCCAAATGCTCGTATGCCCTTGTGC
CTAGCAGTTTTGTGCTGCGCACGCACAGCCAGAGCCGAAACCACTTGGGAATCCCTGGATCACCT
TTGGAACCATAATCAGCAGATGTTCTGGAGCCAGTTGCTAATCCCGCTAGCAGCACTGATAGTCG
CTACCCGCTTGTGAAATGTGTGTGTTGTGTCGTGCCTTTTTTTAGTCGTGGCCGGCGCCGTAGGCG
CCGGCGCTTACGAACACGCGACCACGATGCCGAACCAAGTGGGGATCCCGTATAATACCATTGT
CAACAGAGCGGGTTATGC

C.3.5 VEE通用型普通RT-PCR扩增子目的序列（GenBank号：L01442.2）

ATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCTCAGAGCTTTCAGCAGCGGAGCT
TCCCGCAGTTTGTAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCAGTATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTT
TCGCATCTGGCTTCAAACCTGATCGAA

C.4 qRT-PCR 阳性对照质粒的序列

C.4.1 EEE qRT-PCR扩增子目的序列：（GenBank号：KX000199.1）（69bp碱基）

ACACCGCACCCCTGATTTTACACCTGCACCCGGACCATCCGACCTTGCTGACGACCAGGTCACTTG
GAAG

C.4.2 WEE qRT-PCR扩增子目的序列：（GenBank号：KJ554972.1）（67bp碱基）

CTGAAAGTCGGCCTGCGTATAGTATACGGCAATACCACCGCACACCTGGATACGTTTCGTCAATGG
CG

C.4.3 VEE qRT-PCR 扩增子目的序列：（GenBank号：KJ410017.1）（98bp碱基）

TCCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTTCAAACCTGATCGAAACGGAGGTGGACCCA
TCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCA

附录 D

(资料性)

标准比色孔的制备

D.1 0.5 %溶解红细胞液（血红素）

取红细胞泥（按照附录A中的A.7.3配制）2.5 mL，加入47.5 mL蒸馏水，使红细胞完全溶解后，再加1.7 % NaCl 50 mL，制成 2.5 %溶解红细胞（血红素），然后再用稀释液稀释5倍，即0.5 %溶解红细胞液，供配制标准比色管用。

D.2 0.5%红细胞悬液

取 2.5 mL的 2.8 %红细胞悬液（按照附录A中的A.7.3 配制），加入 10 mL稀释液（按照附录A中的A.7.2 配制）。

D.3 标准比色管的制备

按表C.1加0.5 %溶解红细胞液和0.5 %红细胞悬液，摇匀后，供配制标准比色孔用。

表 D.1 标准比色管制备

成分/mL	反应管溶血度(%)										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0.5 %溶解红细胞液	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2	2.25	2.5
0.5 %红细胞悬液	2.5	2.25	2	1.75	1.5	1.25	1	0.75	0.5	0.25	0

D.4 标准比色孔的配制

取0 % ~ 100 %溶血度溶液各125 μ L，分注相应的微量孔内，540 nm读取OD值。溶血度 > 90 %判为完全溶血，溶血度 < 10 %判为不溶血。如更换红细胞悬液，应重新配制标准比色孔。

