



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

代替 GB/T 14926.21-2008

实验动物 兔出血症病毒检测方法

Laboratory animal—Method for examination of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)

（工作组讨论稿）

（本草案完成时间：2026-08-31）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 试剂或材料 1

6 仪器设备 2

7 试验步骤 2

8 结果判定 3

9 结果报告 3

10 附录 A 4

表 1 RT-PCR 引物 2

表 2 实时荧光定量 PCR 引物和探针 2

实验动物 兔出血症病毒检测方法

1 范围

GB/T 14926的本部分规定了兔出血症病毒（RHDV）的检测方法。
本部分适用于兔RHDV抗原、抗体和病毒核酸的检测。

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/T 14926.53 实验动物 血凝试验
GB/T 14926.54 实验动物 血凝抑制试验
GB/T 14926.50 实验动物 酶联免疫吸附试验
GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

4.1 抗原检测在一定条件下，RHDV能凝集人“O”型红细胞，产生可见的凝集反应。根据这一特性检测样本中RHDV抗原。

4.2 抗体检测根据免疫学原理，采用用RHDV抗原检测兔血清中RHDV抗体。

4.3 核酸检测根据RHDV特有的基因组核酸序列，可被基于聚合酶链式反应等的核酸扩增技术所识别。

5 试剂或材料

5.1 血凝素

人工感染或自然发病的兔肝组织，经研磨制成10% 悬液，3 000 r/min离心10 min而获得的上清液。

5.2 酶联免疫吸附试验（ELISA）抗原

将重组兔出血症病毒VP60杆状病毒接种Sf9昆虫细胞，5d后，收集细胞培养物，反复冻融3次后，以3000r/min离心5min，取上清液即为RHDV重组VP60蛋白，置于2℃~8℃条件下备用。

5.3 阳性血清

RHDV抗原免疫或RHDV自然感染恢复后的兔血清。

5.4 阴性血清

无RHDV感染、未经免疫的兔血清。

5.5 人“O”型红细胞。

5.6 核酸提取试剂

市售核酸提取试剂盒。

5.7 实时荧光定量PCR反应液

市售探针法荧光PCR预混液。

5.8 阳性对照样本

来源明确含有RHDV的兔组织样本。

5.9 阴性对照样本

不含有RHDV核酸的样本。

5.10 引物与探针

5.10.1 RHDV 1型RT-PCR引物

根据RHDV FDR株序列（GenBank登录号：NC_001543），针对VP60基因区段设计引物。引物在RHDV基因组中的位置、核苷酸组成及预期扩增目的基因长度见表1。

表 1 RT-PCR 引物

引物	位置	序列（5′-3′）	产物大小（bp）
正向引物P1	6254-6271	ATGCCAATGCTGGGTCTG	368
反向引物P2	6621-6602	TTGAGGCGTGTATGTGATGG	

5.10.2 RHDV 2型实时荧光定量PCR引物和探针（表2）

表 2 实时荧光定量 PCR 引物和探针

引物和探针名称	引物和探针序列（5′→3′）
正向引物	TGGAAGCTGGCTTGAGTGTGA
反向引物	ACAAGCGTGCTTGTGGACGG
探针	（FAM）5′ TGTCAGAACTGTGTGACATCCGCCC3′ （TAMRA）

6 仪器设备

6.1 酶标仪。

6.2 聚合酶链式反应（PCR）仪。

6.3 荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪。

6.4 电泳仪。

6.5 紫外透射仪。

6.6 37℃培养箱或水浴箱。

6.7 生物安全柜。

6.8 其他器械：离心机、微量移液器、离心管、PCR管等。

7 试验步骤

7.1 采用HA方法（见GB/T14926.53）进行病毒抗原检测。

7.2 采用HAI方法（见GB/T14926.54）进行病毒抗体检测。

7.3 采用ELISA方法（见GB/T14926.50）进行病毒抗体检测。

7.4 病毒核酸检测

7.4.1 RHDV 1型RT-PCR检测方法

7.4.1.1 样本处理 按照附录A4.1进行操作。

7.4.1.2 核酸提取 使用核酸提取试剂盒提取样本中RNA,提取的RNA应立即进行反转录(RT)或-70℃保存。

7.4.1.3 反转录

RT反应体系为25 μL,依次加入如下成分: 5 μL 5×AMV RT Buffer, 5 μL dNTP Mixture (2.5 mmol/L each), 1 μL随机引物 (500 μg/mL), 0.5 μL RNase inhibitor (40 U/ μL), 12.5 μL RNA模版, 1 μL AMV RTase (10 U/ μL)。

反转录反应条件为: 37℃ 90 min, 95℃ 5min, 所得cDNA可用作PCR反应模板。每次进行RT时均设标准阳性、阴性及空白对照。

7.4.1.4 RT-PCR

PCR反应体系为50 μL,依次加入如下成分: 5 μL 10×PCR Buffer, 2 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 2 μL dNTP Mixture, 1 μL正向引物P1 (50 pmol/L), 1 μL反向引物P2 (50 pmol/L), 2 μL cDNA, 0.5 μL Taq DNA Polymerase (5 U/ μL), 36.5 μL ddH₂O。

PCR反应参数为: 95℃预变性5 min; 94℃ 1min, 59℃ 1min, 72℃ 1 min, 共30次循环;最后一次循环后72℃再延伸10min。

每次进行RT-PCR时均设标准阳性、阴性及空白对照。

7.4.1.5 琼脂糖凝胶电泳

配制2%琼脂糖凝胶,取PCR扩增产物8 μl,分别与2 μl的6×载样缓冲液混匀,加到凝胶孔格中。电泳缓冲液为1×TAE缓冲液,电泳条件为100 V恒压电泳30~60 min,紫外透射仪下观察结果。

7.4.2 RHDV 2型实时荧光定量PCR检测,按照附录A中规定操作。

8 结果判定

8.1 HA

经研磨制成10%的兔肝上清液,HA滴度小于等于1:16判为阴性。对阳性(HA滴度大于1:16)检测结果,选用同一种方法重试,如仍为阳性则判为阳性。

8.2 HAI

8.2.1 普通级兔:如接种疫苗,HAI抗体效价大于1:10,同时免疫抗体合格率(被检动物抗体阳性数/被检动物总数×100%)大于等于70%判定该兔群免疫合格。

8.2.2 SPF兔:HAI抗体效价小于等于1:10判为阴性;对阳性(HAI抗体效价大于1:10)检测结果,选用同一种方法重试,如为阳性则判为阳性。

8.3 RT-PCR

每个样本均进行两次试验检测,以标准Marker及阳性对照为基准,在368 bp处见到电泳条带并测序结果正确者为阳性。

8.4 实时荧光PCR结果判定

对阳性或可疑结果,用同一种方法重试。如仍为阳性或可疑,则判为阳性。

9 结果报告

根据判定结果,做出报告。

10 附录 A

附录A（规范性附录）

实验动物 兔出血症病毒2型检测方法(荧光RT-PCR法)A.1 范围

本部分规定了实验兔出血症病毒2型荧光RT-PCR检测方法。

本部分适用于实验兔出血症病毒2型的检测。

A.2 原理根据兔出血症病毒2型保守区域的基因序列设计合成一对特异性引物和一条特异性探针，探针两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR扩增时，Taq酶的5'→3'外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，淬灭作用消失，荧光信号产生并被检测仪器接受，随着PCR反应的循环进行，PCR产物与荧光信号的增长呈对应关系。因此，可以通过检测荧光信号对核酸模板进行检测。

A.3主要试剂和器材

A.3.1试剂

A.3.1.1核酸提取试剂：QIAGEN Rneasy Mini Kit或其他等效产品。

A.3.1.2 Promega GoTaq Probo 1-Step RT-qPCR System或其他等效产品。

A.3.1.3 引物和探针

1. 上游引物：5' TGGAAGCTTGGCTTGAGTGTGA3'

2. 下游引物：5' ACAAGCGTGCTTGTGGACGG3'

3. 探针：（FAM）5' TGTCAGAACTTGTGACATCCGCCC3'（TAMRA）

A.3.1.4 阳性对照 兔出血症病毒2型阳性肝组织或人工合成的含兔出血症病毒2型基因片段（见A.7）的质粒

A.3.1.5 阴性对照 兔出血症病毒2型阴性兔组织

A.3.1.5 空白对照 蒸馏水或TE溶液

A.3.2 器材

A.3.2.1 实时荧光PCR仪

A.3.2.2微量移液器

A.3.2.3冷冻高速离心机

A.3.2.4组织匀浆器或手持式均质器

A.3.2.5水浴锅

A.3.2.6生物安全柜

A.3.2.7无RNase和DNase 污染的离心管(1.5 mL, 2 mL)，无RNase和DNase污染的吸头及PCR 扩增反应管

A.4 操作步骤

A.4.1 待检标本的处理（此步骤在生物安全柜进行）

A.4.1.1 采集待检动物的肝、脾等组织或血液、粪便、尿液等样本。

A.4.1.2肝、脾等组织或粪便 取待检动物样本0.1~0.5g，加入1mL 灭菌PBS，匀浆器充分匀浆后，10000g离心5min，取上清按核酸提取试剂操作说明提取RNA。

A.4.1.3血液 取待检动物血液1mL，5000g离心10min，取血清或血浆按核酸提取试剂操作说明提取RNA。

A.4.2 实时荧光RT-PCR实验

总体积20μL，内含GoTaq Probe qPCR Master Mix（2×）10μL，GoScrip RT Mix for 1-Step RT-qPCR（50×）0.4μL，上下游引物各1μM，探针0.2μM，待测RNA 4μL。反应条件：45℃逆转录15min，95℃聚合酶活化2min；95℃，15sec，60℃，1min（收集信号），共40个循环。

A.5 结果判断

A.5.1 结果分析条件设定

综合分析仪器给出的各项结果，基线以仪器给出的默认值作为参考，阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点为准，具体根据仪器噪音情况进行调整，选择FAM通道进行分析。

A.5.2 质控标准

阳性对照样品有对数扩增曲线，而且Ct值 <30 。

阴性对照和空白对照无Ct值并且无扩增曲线。

二者均成立才可判定试验成立。

A.5.3 结果描述及判定

被检样品Ct值 ≤ 35 ，且出现典型扩增曲线，判为兔出血症病毒2型阳性； $35 < \text{Ct值} \leq 40$ 且出现典型扩增曲线，判为可疑，需复检，复检仍出现 $35 < \text{Ct值} \leq 40$ ，并且曲线有明显的对数增长期，判为阳性。

无Ct值或Ct值 >40 且无特征性扩增曲线，判为阴性。

A.6 注意事项：

A.6.1 整个检测工作应遵循PCR实验室规范，加强安全防护，应有四个隔开的工作区域，分别从事试剂储存和准备、标本制备和扩增，以避免发生潜在的交叉污染。

A.6.2 整个检测工作应加强生物安全防护意识，特别是样品处理及制备模板RNA的工作，应在生物安全防护2级的条件下进行。

A.7 兔出血症病毒2型阳性质粒参考序列：

TCGGCACTTATGCCTGGGCAGTTCTTTGTTGGCAGCTGAACTTCGCTTCCGGCTTCATGGAAGTTGGCTTGAGTGTTGATGGATACTT
CTATGCGGGAACAGGGGCTTCAGCCACCCTTATTGACTTGTCAGAACTTGTTGACATCCGCCCTGTGGGACCCAGACCGTCCACAAGCA
CGCTCGTGTACAACTTGGGGGGCACAACCAATGGCTTTTCTTATGTCTGAATTTGTTGGACTTGGACTTGAGGTGCCAGCGTTTTGAG
CAGTGCTCTGCTCCGCAGGCAGGAGTTGCAACT
