

团 体 标 准

T/CAAA XXXX—201X

兔病毒性出血症 2 型防控技术规程

Code of Practice of Prevention and Control for
Rabbit Hemorrhagic Disease Type 2

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国畜牧业协会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则编制。

本标准由中国畜牧业协会提出并归口。

本标准主要起草单位：江苏省农业科学院兽医研究所、青岛康大兔业发展有限公司、贵州福斯特生物科技有限公司

本标准主要起草人：王芳、宋艳华、魏后军、胡波、范志宇、薛家宾、陈萌萌、仇汝龙、李明勇、许俊才。

本标准为首次发布。

兔病毒性出血症 2 型防控技术规程

1 范围

本标准规定了兔病毒性出血症 2 型的诊断、预防措施和疫情处理等技术标准。

本标准适用于兔病毒性出血症 2 型的实验室诊断、临床诊断、流行病学调查、分离毒株的鉴定和对无特定病原体(SPF)兔的监控,也适用于兔病毒性出血症 2 型的预防及暴发后的紧急处理。

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 16548-2006 病害动物和病害动物产品生物安全处理规程

NY/T 541-2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 572-2016 兔病毒性出血病血凝和血凝抑制试验方法

NY/T 2960-2016 兔病毒性出血病病毒RT-PCR检测方法

NY 5131-2002 无公害食品 肉兔饲养兽医防疫准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 兔病毒性出血症2型 rabbit hemorrhagic disease type 2

由杯状病毒科、兔病毒属兔出血症病毒2型(RHDV2)引起的家兔和野兔的高度传染性、急性致死性疫病。

4 诊断

依据兔病毒性出血症2型流行病学特点、临床症状、病理学变化和实验室检验等可做出诊断。

4.1 流行病学特点

4.1.1 易感动物

RHDV2可感染15日龄以上的家兔和野兔,其中最易感的是家兔,感染兔有明显的临床症状和死亡率。对其他动物未见有感染性。

4.1.2 传染源 感染RHDV2的兔子是主要的传染源,包括感染病死兔和带毒未死的兔子。

4.1.3 传播途径

RHDV2通过直接和间接途径传播,经鼻、结膜、口腔感染家兔和野兔。传染源是病死兔和带毒兔,通过其排泄物、分泌物、内脏器官、血液、兔毛等污染饮水、饲料、用具、笼具、空气,引起易感兔发病和疫病流行。人、昆虫、鼠、其它畜禽等也可机械性地传播病毒,其中昆虫被认为是感染或传播的重要媒介,也是长距离传播的主导因素。这种情况在野兔疫病传播中尤为明显。

4.2 临床症状及病理学变化

4.2.1 临床症状

兔病毒性出血症 2 型 (RHD2) 具有高度传染性和致死率, 感染兔的死亡率为 5%~70%, 潜伏期为 1d~3d, 兔子常在体温升高后 12h~36h 死亡。急性 RHD2 的症状主要有突然死亡、神经和呼吸症状、迟钝和厌食。亚临床-慢性 RHD2 的症状主要为严重的黄疸、体重减轻和嗜睡, 可能在疫病发生 1 周或 2 周后死亡, 但也有一些兔子在血清抗体转阳后存活。RHDV2 感染多呈现亚急性和慢性感染过程。但是感染 RHDV2 的 15 日龄以上的哺乳仔兔, 可见有临床症状和死亡发生, 通常病程为 3d~5d。

4.2.2 病理学变化

RHD2 以实质器官出血、淤血为主要特征。尸检感染致死的兔子, 可见胸腔和腹腔有血液样渗出物, 肺脏肿大出血, 气管充血和出血, 心脏淤血、心包膜有点状出血, 胸腺出血, 肝脏灰白肿大出血, 肾脏淤血并有出血点, 脾脏肿大, 肠道出血, 小肠肠道绒毛有局灶性坏死等现象并伴有黄疸。

4.3 实验室检验

4.3.1 病原学诊断

4.3.1.1 样本采集、保存和运输

样本采集、保存和运输参照 NY/T 541-2016 执行, 并按照 GB 16548-2006 处理病死家兔。

4.3.1.2 红细胞凝集试验 (HA)

红细胞凝集试验可参照 NY/T 572-2016 进行, 具体操作见附录 A, HA 效价 $\geq 1:160$ 者判为阳性, 即可能为 RHDV2 感染样本。

4.3.1.3 核酸识别技术—RT-PCR 方法

核酸识别技术—RT-PCR 方法可参照 NY/T 2960-2016 进行, 具体操作见附录 B, 阳性对照有唯一一条 481 bp 左右的目的条带, 阴性对照、空白对照无相应的目的条带的情况下, 检测样品出现与阳性对照相同目的条带的判为阳性, 即为 RHDV2 感染样品。

4.3.1.4 免疫印迹

免疫印迹具体操作见附录 C, NC 膜上阳性对照出现大小约 60 kDa 的一条特异性条带, 阴性对照无相应条带; 检测样品的泳道出现大小约 60 kDa 的一条特异性条带, 则判为阳性, 即为 RHDV2 感染样品。

4.3.2 血清学检测

4.3.2.1 红细胞凝集抑制试验 (HI)

红细胞凝集抑制试验可参照 NY/T 572-2016 进行, 具体操作见附录 D, 当兔血清 HI $\geq 1:8$, 方可判血清样品为 RHDV2 抗体阳性。

4.3.2.2 竞争 ELISA

竞争 ELISA 具体操作见附录 E, 相对参考值 (稀释 1/10 阴性对照), 血清第一个稀释度 (1/10) 的光吸收值降幅 $< 15\%$ 时, 判为阴性; 光吸收值降幅 $\geq 25\%$ 时, 判为阳性; 光吸收值降幅为 $15\% \sim 25\%$ 时, 判为可疑。

4.4 结果判定

4.4.1 疑似 RHDV2 感染引起的 RHD

符合 4.1 和 4.2 的。

4.4.2 确诊 RHDV2 感染引起的 RHD

符合 4.4.1 和 4.3.1.2 且符合 4.3.1.3 或者 4.3.1.4 的。

5 预防

5.1 进口家兔检疫

对从国外引进的家兔进行病原学和血清学检查，凡是4.3.1.3或者4.3.1.4检测为阳性，或者4.3.2.1或者4.3.2.2检测为阳性的，禁止引进。

5.2 疫情处理

5.2.1 家兔处理

一旦发生RHDV2感染引起的RHD疫情，应对发病兔进行隔离、扑杀和销毁；对死亡兔进行消毒和无害化处理；未发病兔可注射4~5倍剂量的含RHDV2抗原的疫苗进行紧急免疫接种。

5.2.2 环境控制与饲养管理

一旦发生RHDV2感染引起的RHD疫情，应对兔舍、兔场环境、用具、饮水等进行严格消毒；对兔场实施灭蚊蝇、灭鼠等生物安全防控措施；限制家兔及其产品和有关物品出入。

5.3 免疫

免疫应符合NY 5131-2002。

附录A

(规范性附录)

红细胞凝集试验 (HA)

A.1 材料

A.1.1 试剂及反应板 1%人“O”型红细胞悬液、U型微量凝集板。

A.1.2 样品 待检兔肝脏、阳性对照 RHD2 病死兔肝脏（或 RHDV2 重组 VP60 蛋白）、阴性对照健康兔肝。

A.2 方法

A.2.1 1% “O”型红细胞悬液的制备 取人“O”型红细胞以20倍量PBS（0.01 mol/L，pH值7.0~7.2）混匀洗涤红细胞，以400×g离心5 min，弃上清，重复洗涤4次，最后一次离心前，记录红细胞的体积（在离心后扣减弃去上清液的体积，即为红细胞的体积）。洗涤后的红细胞用PBS配成1%悬液，置2℃~8℃备用。

A.2.2 肝脏悬液的制备 取兔肝脏，剪碎，按 1:10 加入 PBS 后匀浆，反复冻融 3 次，再以 1000×g 离心 30 min，取上清液备用。

A.2.3 RHDV2 重组 VP60 蛋白的制备 将重组 2 型兔出血症病毒 VP60 杆状病毒接种 Sf9 昆虫细胞，5 日后，收集细胞培养物，反复冻融 3 次后，以 1000×g 离心 5 min，取上清即为 RHDV2 重组 VP60 蛋白，置 2℃~8℃备用。

A.2.4 红细胞凝集试验 (HA) 试验操作：

- a) 在U型微量凝集板上，从第2孔至第10孔，每孔加入25 μL PBS；
- b) 在第1、2孔加入1:10的待检兔肝悬液 25 μL；
- c) 从第2孔开始，充分混合后用25 μL移液器等量倍比稀释至第10孔，稀释后第10孔弃去25 μL；
- d) 第11孔加入RHD2病死兔肝脏悬液（或RHDV2重组VP60蛋白）25 μL作为阳性对照，第12孔加入健康兔肝脏悬液25 μL为阴性对照；
- e) 每孔各加1%人“O”型红细胞25 μL，立即置于微型振荡器上摇匀，于2℃~8℃冰箱静置45 min，待阴性对照孔中红细胞完全沉积后观察结果。

A.3 结果判定和红细胞凝集效价表示方法：

- a) “++++”符号为100%凝集，无红细胞沉积；
- b) “+++”符号为75%以上凝集，有少于25% 的红细胞沉积；
- c) “++”符号为50%~75%凝集，有少于50%的红细胞沉积；
- d) “+”符号为凝集的红细胞少于50%，沉积的红细胞多于50%；
- e) “-”符号为100%的红细胞沉积。

RHD2病死兔肝脏悬液阳性对照或RHDV2重组VP60蛋白应出现“++++”100%凝集，无红细胞沉积；被检样品出现“++”的最高稀释度作为其凝集价，凝集价 $\geq 1:160$ （即第5孔）的判为阳性，如在（1:20）~（1:80）之间，定为可疑，应重复试验，重复后仍为可疑的判为阳性。

附录B

(规范性附录)

核酸识别技术—RT-PCR 方法

B.1 材料

B.1.1 引物

上游引物：5'-ACTACTAGCGTGGTCACCACC-3'；

下游引物：5'-TTGTTATAAACGCTCAGGACCAAC-3'。

B.1.2 样本 待检兔肝脏、阳性对照RHD2病死兔肝脏、阴性对照无特定病原体（SPF）兔肝脏。

B.2 方法

B.2.1 肝脏样本 RNA 的提取 DEPC 水按 1:10 加入组织中，研磨成悬液，装入用 DEPC 处理过的 1.5 mL EP 管中，于-20℃反复冻融三次，在高速冷冻离心机上，以 7200 r/min 离心 20 min，取上清 200 μL，加入 Trizol 800 μL，振荡混匀后，室温放置 10 min，加入氯仿 210 μL，剧烈振荡后，室温放置 1 min，以 4℃ 10000 r/min 离心 15 min，取上层水相 750 μL，加入 0.5 mL 异丙醇，混匀，-20℃放置 15 min，以 4℃ 10000 r/min 离心 10 min，去上清，缓缓加入 75%乙醇 1mL 洗涤，以 4℃ 8000 r/min 离心 5 min，去上清，室温干燥 20 min，加入 DEPC 水 10 μL，使充分溶解。或者按 RNA 抽提试剂盒的方法进行。

B.2.2 RT-PCR

B.2.2.1 反转录反应：10×Buffer 2 μL、10mmol/L dNTPs 2 μL、下游引物 1 μL、RNA 酶抑制剂 0.5 μL、RNA 模板 12 μL，AMV 反转录酶 0.5 μL，H₂O（DEPC 处理）2 μL，总体积为 20 μL，瞬间离心混匀，65℃反应 15 min，42℃孵育 1 h，95℃ 5 min，同时设立阴性、阳性对照，产物于-20℃保存备用。

B.2.2.2 PCR 的反应：按 25 μL 体系进行，含 MgCl₂（25 mmol/L）1.5 μL，灭菌水 15 μL，反转录产物 4 μL，10×EX Taq DNA 聚合酶 buffer 2.5 μL，10 mmol/L dNTP 0.5 μL，上、下游引物 50 pmol/μL 各 0.5 μL，EX Taq DNA 聚合酶 0.5 μL。94℃ 3 min，然后进入循环 94℃ 30 s，60℃ 30

s, 72℃ 50 s, 40 循环, 于 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

B.2.3 结果观察 将PCR反应产物于1.2 %琼脂糖凝胶进行电泳, 电压为120V, 时间30 min, 紫外灯下观察结果, 并进行拍照。

B.3 结果判定

以RHD2病死兔肝脏(或含有RHDV2特异性VP60片段的质粒)作为阳性对照, 以无特定病原体(SPF)兔肝脏为阴性对照, 灭菌水作空白对照, 做RT-PCR, 所有样品同时电泳。阳性对照有唯一一条481 bp左右的目的条带, 阴性对照、空白对照无相应的目的条带的情况下, 检测样品出现与阳性对照相同目的条带的判为阳性, 即为RHDV2感染阳性样品; 检测样品未出现与阳性对照相同目的条带的判为阴性, 即为RHDV2阴性样品。如果阳性对照无相应的目的条带, 需要做重复试验; 如果阴性对照有相应的目的条带, 可能是阴性对照存在污染或是操作失误, 也需要做重复试验。

附录C
(规范性附录)
免疫印迹

C.1 材料

C.1.1 试剂 抗 RHDV2 单克隆抗体 1H6 (特异性识别 RHDV2), HRP 标记的羊抗鼠 IgG 或 HRP 标记的羊抗兔 IgG、ECL。

C.1.2 样品 待检兔肝脏、阳性对照 RHD2 病死兔肝脏 (或 RHDV2 重组 VP60 蛋白)、阴性对照健康兔肝脏。

C.2 方法

C.2.1 蛋白质电泳(SDS-PAGE) 将兔肝脏分别 1:9 加入 PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.0~7.2), 充分研磨, 分装于 1.5 ml 离心管中, 以 3000 r/min 离心 5min, 取上清, 加入上样缓冲液 (RHDV2 重组 VP60 蛋白直接加上样缓冲液), 煮沸 5min, 以 11000 r/min 离心 1min, 取上清 20 μ l, 进行 SDS-PAGE 电泳。

C.2.2 免疫转印(Western blotting) 采用半干转印法。将样品电泳后, 取下凝胶, 0.65 mA/cm², 转印 1.5 h, 将其转印于 NC 膜上, 用抗 RHDV2 单克隆抗体 1H6 为一抗, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 或 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 进行 Western blotting 鉴定。

C.3 结果判定

NC 膜上 RHD2 病死兔肝脏 (或 RHDV2 重组 VP60 蛋白) 的泳道应出现大小约 60 kDa 的一条特异性条带, 阴性对照健康兔肝脏无相应条带; 如待检兔肝脏样品的泳道出现大小约 60 kDa 的一条特异性条带, 则为阳性结果。否则为阴性。

附录D

(规范性附录)

红细胞凝集抑制试验 (HI)

D.1 材料

D.1.1 试剂及反应板 1%人“O”型红细胞悬液、U型微量凝集板。

D.1.2 抗原工作液 根据测定 RHD2 病死兔肝脏悬液 (或 RHDV2 重组 VP60 蛋白) 的红细胞凝集效价, 用 PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.0~7.2) 配制成 4 个血凝单位的抗原工作液。

D.1.3 样品 待检血清、阳性对照 RHDV2 阳性血清 (已知 HI 效价), 阴性对照为 SPF 兔血清。

D.2 方法

D.2.1 血清处理 取 100 μl 血清, 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min, 加入 10 μl 红细胞, 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 小时, 以 2500 r/min 离心 5 min, 收集上清待检。

D.2.2 红细胞凝集抑制试验 (HI) 操作程序:

a) 在 U 型微量凝集板上, 自第 1 孔至第 12 孔, 每孔加入 PBS 25 μL 。

b) 吸取血清 25 μL 于第 1 孔, 充分混匀后用 25 μL 移液器等量倍比稀释至第 12 孔, 稀释后第 12 孔弃去 25 μL 。

c) 第 1~12 孔, 每孔分别加 4 个血凝单位的抗原 25 μL , 摇匀, 37 $^{\circ}\text{C}$, 作用 30 min~60 min。

d) 每孔各加 1% 人 “O” 型红细胞 25 μL , 立即置于微型振荡器上摇匀, 于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 45 min~120 min, 待 PBS 对照孔的红细胞完全沉积后, 观察结果。

注: 每次测定须设已知效价的 RHDV2 阳性血清对照、SPF 兔阴性血清对照、4 个血凝单位对照、待检处理血清对照 (含 PBS 25 μL 、待检处理血清 25 μL 、1% 人 “O” 型红细胞 25 μL)、PBS 对照 (含 PBS 50 μL 、1% 人 “O” 型红细胞 25 μL)。

D.3 结果判定

将反应板倾斜后判定结果。当阳性血清 HI 效价与已知结果相比, 误差不高于 1 个滴度时, SPF 兔血清血凝抑制效价小于 1:2¹, 4 个血凝单位对照血凝效价为 1:2², 试验成立。以使红细胞凝集完全抑制的血清最高稀释度为被检血清 HI 抗体效价。兔血清 HI \geq 1:8, 方可判血清样品为 RHDV2 阳性抗体。

附录E
(规范性附录)
竞争 ELISA

E.1 材料

E.1.1 待检样本 待检血清样品。

E.1.2 抗原 RHDV2 或 RHDV2 重组 VP60 蛋白 (RHDV2 VLP_S)。

E.1.3 包被抗原 RHDV2 血清或 RHDV2 单克隆抗体 (RHDV2 MAbs)

E.1.4 对照血清 阴性血清为 SPF 兔血清, 阳性血清为用阴性血清稀释 100 倍的 RHDV2 康复期血清或免疫动物血清。

E.2 竞争 ELISA操作程序:

a) RHDV2 血清稀释至预定滴度, 用 pH 9.6 的 0.05M 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释 5000 倍, 加入吸附能力很强的 ELISA 微量板, 4℃ 过夜;

b) 含 0.05% 吐温-20、pH7.4 的 PBS (PBST) 洗板 3 次, 每次 3 min~5 min;

c) 反应板每孔加 25 μL 含 1% BSA 的 PBST (PBST-BSA)。前两孔 (A1 和 B1) 加 7 μL 第一份血清样品, 接下来两孔 (C1 和 D1 孔) 加 7 μL 第 2 份血清样品, 然后的两孔 (E1 和 F1 孔) 加第 3 份血清样品, 接下来两孔 (G1 和 H1 孔) 加第 4 份血清样品, 以此类推, 加完第一列。如需定性数据 (阳性/阴性), 按同样方法将第 5~8 份血清样品加到第二列各孔中, 第 9~12 份血清样品加入第三列中, 依此类推。如需测定血清滴度, 血清样品必须进一步稀释。振荡反应板, 用 8 通道排式微量移液器从第一列各孔吸取 7 μL 加入第二列对应孔, 相当于 4 倍稀释血清。这一操作可重复 1 次 (1:160)、2 次 (1:640) 或 4 次 (1:10240)。无论是为获得定性数据 (单次稀释) 还是最终滴度 (多次稀释), 每个反应板上都应留 12 个孔作为对照血清孔。G7 和 H7 孔加 7 μL 阳性血清, G10 和 H10 孔加 7 μL 阴性血清, 稀释 1 次和 2 次 (1/40~1/160);

d) 反应板各孔加 25 μL 悬浮于 PBST 的抗原悬液, 稀释度为确定的稀释度的 2 倍;

e) 反应板置振荡器上, 37℃, 作用 50 min~60 min;

f) 洗涤方法与第 2 步相同;

g) 每孔加 50 μL 稀释的兔抗 RHDV2 IgG-HRPO 结合物;

- h) 反应板置振荡器上，37℃，作用 50 min~60 min，按上述第 2 步洗涤后，再洗第 4 次；
- i) 每孔加 50 μL 邻苯二胺（OPD），配制方法如下：0.5 mg/mL OPD 溶于 0.1M 磷酸盐/柠檬酸缓冲液（pH5），加 0.02% H₂O₂。5 min 后，每孔加 50 μL 1M H₂SO₄，终止反应；
- j) 波长 492 nm，分光光度计读数。

E.3 结果判定

相对参考值（稀释 1/10 阴性对照），血清第一个稀释度（1/10）的光吸收值降幅<15%时，判为阴性；光吸收值降幅≥25%时，判为阳性；光吸收值降幅为 15%~25%时，判为可疑。
