

附件 6:

全国狂犬病监测方案

(试行)

一、概述

狂犬病是由狂犬病病毒引起的一种人兽共患传染病,按《中华人民共和国传染病防治法》的规定为乙类传染病。许多种类的哺乳动物都与狂犬病的传播有关,犬是发展中国家人狂犬病最主要的储存宿主和传播宿主。人感染狂犬病最常见的方式是通过感染狂犬病毒的犬、猫、野生食肉动物以及食虫和吸血蝙蝠的咬伤、挠抓、舔舐皮肤或粘膜破损处而感染。狂犬病毒主要通过破损的皮肤或粘膜侵入人体,经神经末梢上行进入中枢神经系统,临床表现主要为急性、进行性、几乎不可逆转的脑脊髓炎,病死率 100%。

狂犬病在世界范围内广泛分布。据 1999 年世界狂犬病调查报告,145 个国家和地区中仅有 45 个无狂犬病报告。近年来,我国狂犬病疫情一直呈上升趋势,病死数居我国 37 种法定报告传染病首位。1996 年全国报告狂犬病发病数曾一度较低,为 159 例,而 2004 年全国狂犬病报告发病数上升至 2660 例,与 2003 年同期相比上升 30.58%。2004 年狂犬病死亡人数占我国法定报告传染病总死亡构成的 35.72%。我国的广西、湖南、江苏、安徽、湖北、广东和贵州等省份近年来疫情持续上升,疫情形势十分严峻。因此,建立全国狂犬病监测系统,在狂犬病多发地区开展监测,分析狂犬病流行因素、掌握狂犬病的疫情特点与流行趋势,对于狂犬病的预防和控制具有重要的意义。

二、监测目的

(一)掌握我国狂犬病的疫情动态和流行规律,分析流行因素,为制定有效的预防控制措施提供科学依据。

(二)了解狂犬病暴露后预防处置现状,评价预防处置效果,为进一步规范暴露后预防处置提供依据。

三、监测定义

(一)病例定义

根据流行病学史、临床症状和实验室检测结果三项指标确定病例的定义。

1、流行病学史

有被犬、猫或其他宿主动物舔、咬史。

2、临床症状

(1) 愈合的咬伤伤口或周围感觉异常、麻木发痒、刺痛或蚁走感。出现兴奋、烦躁、恐惧，对外界刺激如风、水、光、声等异常敏感。

(2) “恐水”症状，伴交感神经兴奋性亢进（流涎、多汗、心律快、血压增高），继而肌肉瘫痪或颅神经瘫痪（失音、失语、心律不齐）。

3、实验室检测

(1) 免疫荧光抗体法检测抗原：发病第一周内取唾液、鼻咽洗液或脑脊液涂片、角膜印片、皮肤切片，用抗狂犬病荧光抗体染色，狂犬病病毒抗原阳性。

(2) RT-PCR 方法检测病毒核酸：发病第一周内取唾液、鼻咽洗液、脑脊液、角膜或皮肤组织，用 RT-PCR 方法检测狂犬病毒核酸阳性。

(3) 死后脑组织标本分离病毒阳性或印片荧光抗体染色阳性、脑组织内检测到内基氏小体或 RT-PCR 方法检测脑组织标本中病毒核酸阳性。

4、病例分类

(1) 狂犬病疑似病例：指各级医疗单位临床医生上报的具有狂犬病临床表现，而难以确诊为狂犬病的病例。

(2) 临床诊断病例：流行病学史加上临床表现的任意一条。

(3) 确诊病例：临床诊断病例加上实验室检测的任意一条。

(二) 狂犬病暴露者定义

狂犬病暴露者指被狂犬、疑似狂犬或狂犬病宿主动物抓伤、咬伤、舔舐皮肤或粘膜破损处的所有人员。

四、监测内容

(一) 全国常规监测

1. 病例的发现与报告

按照《中华人民共和国传染病防治法》和《传染病疫情报告管理规范》，各级各类医疗机构、疾病预防控制机构和卫生检疫机构执行职务的医务人员发现疑似、临床诊断或实验室确诊病例应在诊断后 24 小时内填写报告卡进行网络直报。不具备网络直报条件的应在诊断后 24 小时内向相应单位送（寄）出传染病报告卡，县级疾病预防控制中心（以下简称疾控中心）和具备条件的乡镇卫生院收到传染病报告卡后立即进行网络直报。

2. 病例个案调查

县级疾控中心接到狂犬病例报告后，应及时对病例进行流行病学调查，调查内容见《狂犬病病例个案调查表》（附表1）。

（二）监测点监测

1. 监测点的选择原则

- （1）在近五年疫情持续高发的省，选取高发县区作为国家级监测点；
- （2）监测点具有一定的狂犬病防制工作基础，能够承担并完成监测任务；
- （3）监测点的确定：在近年来疫情持续高发的广西、湖南、安徽、贵州 4 省，选择高发地市或县区作为国家监测点。

2. 监测内容

（1）常规疫情监测

① 病例的发现与报告

同全国常规监测。

② 病例个案调查

监测点所在的县级疾控中心接到狂犬病病例报告后，应对所有病例进行个案调查，填写《狂犬病病例个案调查表》（附表1）。

（2）实验室监测

①标本采集、保存和送检：严格按照《狂犬病标本采集技术指南》（见附件1）要求，采集监测点报告的所有临床诊断病例的唾液、脑脊液、尿液、鼻咽洗液、皮肤组织或病死者脑组织等标本，送至省级疾控中心进行检测（送检表见附表2《狂犬病人标本送检登记表》）。

②标本检测：省级疾控中心负责本省监测点标本的实验室检测，采用RT-PCR方法检测狂犬病毒特异性核酸，采用免疫荧光法或酶联免疫吸附实验检测狂犬病毒抗原，对病毒抗原和核酸阳性的标本进行病毒核酸测序和分析。详细操作过程见《狂犬病实验室检测技术指南》（附件2）。

③结果鉴定：各省疾控中心将核酸测序和分析结果上报至国家疾控中心进行鉴定和分析。

④实验室检测结果的汇总、反馈：省疾控中心每季度末将本季度检测结果汇总并反馈到各监测点，国家疾控中心接到标本后一个月之内将鉴定结果向各省反馈。

（3）狂犬病暴露后预防处置情况监测

各监测点选择1所县区级疾控中心预防门诊、1所县及县以上综合医院和1

所高发乡的卫生院进行狂犬病暴露后预防处置情况监测，由诊治大夫负责填写《狂犬病暴露人群门诊登记表》（附表 4），收集前来就诊的所有狂犬病暴露者的预防处置相关信息。

（4）宿主动物监测

监测点所在地的疾控中心通过当地畜牧、兽医、公安等相关部门调查、了解所辖地区的犬等宿主动物情况，包括犬和其它有关动物的数量、种类和免疫覆盖等情况（调查表见附表 5）。在可能情况下，对犬及其他宿主动物进行带毒情况调查。

五、数据收集、分析、反馈

（一）数据收集

1. 狂犬病疫情法定报告信息

各级各类医疗机构、疾病预防控制机构和卫生检疫机构执行职务的医务人员按照《中华人民共和国传染病防治法》和《传染病疫情与突发公共卫生事件报告管理规范》的相关规定，对狂犬病病例进行报告。

2. 狂犬病病例个案信息

县级疾控中心指定专人负责收集狂犬病病例个案信息，于每月 10 日以前将上月所有个案调查表录入狂犬病监测数据库，并上报省级疾控中心。省级疾控中心每月 20 日前将本省上月的狂犬病监测数据上报中国疾控中心。

3. 狂犬病实验室监测信息

省级疾控中心负责收集、汇总辖区内狂犬病实验室检测结果，每季度末将本季度的结果录入狂犬病监测数据库，上报中国疾控中心。

4. 狂犬病暴露者门诊汇总数据

监测点所在的县级疾控中心负责收集辖区内狂犬病门诊的《狂犬病暴露人群门诊登记表》（附表 4），于每月 10 日前进行汇总并将汇总结果录入狂犬病监测数据库，报告上级疾控中心。

5. 狂犬病宿主动物基本情况调查数据

监测点所在的县级疾控中心负责收集辖区内狂犬病宿主动物的基本情况，每年 1 月 15 日将上年的《狂犬病宿主动物基本情况调查表》（附表 5）的内容录入狂犬病监测数据库，并将数据报告上级疾控中心，各省疾控中心负责收集省内所有狂犬病监测点的数据，并于每年 2 月 15 日前上报上年监测数据。

（二）数据质量控制

1. 方法和标准的统一

- (1) 各项调查内容均使用统一调查表和调查方法；
- (2) 使用指定的实验室检测方法和检测试剂进行标本检测。

2. 数据库建立的质量控制

- (1) 使用统一的数据库录入数据；
- (2) 通过设计计算机软件来识辨调查表逻辑错误，减少录入错误；
- (3) 通过人工抽查核对，发现非逻辑错误。

(三) 资料分析

各级疾控中心每季度、每年对狂犬病监测资料进行分析，也可根据需要不定期地进行分析。

1. 病例的三间分布

从时间、地区、人群分布分析狂犬病的发病死亡特点。

2. 病例的暴露情况分析

对致伤动物的种类、病例的伤口状况、预防处置情况等进行分析。

3. 暴露人群治疗处置情况分析

对狂犬病暴露人群的特点，以及伤口处理、预防接种等情况进行分析。

4. 狂犬病宿主动物分析

对监测点狂犬病宿主动物的数量、密度、免疫情况以及不同伤人动物的情况进行分析。

5. 狂犬病病原学检测结果分析

分析狂犬病病原学及其遗传变异情况。

6. 流行因素分析

综合监测结果及当地收集到的相关信息对狂犬病的流行因素进行综合分析。

(四) 信息交流和反馈

各级疾控中心应由专人负责监测工作，定期将有关监测报告、统计分析和季度、年度总结以 E-Mail、传真或信函的形式报上级疾控部门和同级卫生行政部门。上级疾控部门接到报告后，应及时对分析结果进行反馈（以文件、信函、督导等方式）。

各监测点应定期将监测结果向邻近的地区及相关部门（如畜牧兽医部门）进行通报。

六、监测系统的组成和职责

（一）卫生行政部门

卫生部领导和组织协调全国狂犬病监测工作，各级卫生行政部门负责组织开展本辖区内狂犬病监测工作，并提供所需的监测经费，保证监测工作的顺利开展。

（二）疾病预防控制机构

1. 中国疾病预防控制中心

- （1）组织监测方案的起草、论证和完善，为全国狂犬病监测提供技术指导。
- （2）组织对全国各省级疾控中心和国家级监测点专业技术人员的培训。
- （3）负责全国监测数据的收集、整理，定期对数据进行分析、反馈。
- （4）负责狂犬病诊断试剂的标准化及各级网络实验室的质量控制。
- （5）负责各省分离的狂犬病病毒的实验室鉴定工作。
- （6）负责组织专家定期对全国狂犬病监测系统进行督导、评价。
- （7）每年组织召开全国狂犬病监测年度工作总结研讨会。

2. 省级疾控中心

- （1）根据全国监测方案，起草本省的监测实施方案，并组织实施。
- （2）有效组织实施本省的常规监测工作。
- （3）组织对市级疾控中心和国家级监测点的专业技术人员的培训与指导。
- （4）定期收集监测数据，并进行分析、反馈。
- （5）定期对本省的监测工作进行督导与评价。
- （6）每年对本省狂犬病监测工作进行年度总结。

3. 市级疾控中心

- （1）有效组织实施本市的常规监测工作。
- （2）指导本市国家级监测点的监测工作。
- （3）定期收集监测数据，并进行分析、反馈。
- （4）定期对本市的监测工作进行督导、质量控制与评价。
- （5）每年对本市狂犬病监测系统进行年度工作总结。

4. 县级疾控中心

（1）根据全国监测方案和省级的监测实施方案的要求，逐项落实各项监测工作。

- （2）接受上级疾控中心技术的培训与指导，规范各项监测工作。
- （3）安排专人定期收集、整理、汇总和上报监测数据。
- （4）定期对监测工作进行质量控制与评价。

(5) 每年对本地狂犬病监测工作进行年度工作总结。

(三) 医疗机构

各级各类医疗机构负责狂犬病病例的发现及报告工作，协助县、区级疾病预防控制中心进行流行病学调查及标本采集工作。对医护人员进行业务培训，尤其是传染病防治法及相关知识的培训。

七、保障工作

(一) 组织保障

1. 狂犬病监测应纳入当地疾控中心日常工作。
2. 各级疾控中心应明确一名业务领导负责监测工作。
3. 承担监测任务的各级疾控中心应指定责任心强、业务能力强的专业技术人员具体实施监测工作。
4. 参加监测工作的各单位应加强相关业务人员的培训。

(二) 经费保障

1. 为保障监测工作的顺利进行，国家为监测点提供一定的监测启动经费。
2. 监测点所在的省、市、县应提供监测配套经费。
3. 监测经费必须实行专款专用。

(三) 物资保障

承担监测任务的各级疾控中心和医疗机构应保证监测所需的各种物资和技术支持。由中国疾控中心统一提供监测点检测试剂。

(四) 质量控制

1. 每年组织监测工作的质量评价。
2. 每年根据监测点疫情变化，对监测点和监测工作计划进行必要的调整。

八、附件

- 附表 1 狂犬病病例个案调查表
- 附表 2 狂犬病人标本送检登记表
- 附表 3 狂犬病病原学检测结果表
- 附表 4 狂犬病暴露人群门诊登记表
- 附表 5 狂犬病宿主动物基本情况调查表
- 附件 1 狂犬病标本采集技术指南
- 附件 2 狂犬病实验室检测技术指南

附表 1

狂犬病病例个案调查表

县（市）名称：_____ 国标码：□□□□□□ 病例编号：□□□□□□

1、一般情况

1.1 姓名：_____ 1.2 性别：□1 男 □2 女 1.3 年龄：_____ 岁
 1.4 职业：□1 农民 □2 工人 □3 学生 □4 散童 □5 其它_____

1.5 详细住址：_____ 省（自治区、直辖市）_____ 市（地区）_____ 县（区）
 _____ 乡（镇、街道）_____ 村（居委会）_____ 组（门牌号）

2、暴露（被伤）及伤口处理情况

2.1 暴露（被伤）日期：_____ 年 _____ 月 _____ 日 _____ 时

2.2 暴露详细地址：_____ 省（自治区、直辖市）_____ 市（地区）_____ 县（区）
 _____ 乡（镇、街道）_____ 村（居委会）_____ 组（门牌号）

2.3 暴露方式：□1 咬伤 □2 抓伤 □3 其它_____

2.4 暴露程度：□1 I 度 □2 II 度 □3 III 度

2.5 暴露部位（可多选）：□1 头面 □2 颈部 □3 躯干 □4 手臂
 □5 手部 □6 下肢膝以上 □7 下肢膝以下

2.6 伤口处理：□1 未处理（转至 3） □2 自行处理 □3 医疗机构处理

2.6.1 处理时间：_____ 年 _____ 月 _____ 日 _____ 时

2.6.2 处理单位：□1 村卫生室 □2 乡镇卫生院 □3 县级及以上医疗机构 □4 其他_____

2.6.3 处理方式（可多选）：
 □1 挤压出血 □2 冲洗 □3 消毒 □4 伤口缝合 □5 其他_____

3、预防注射

3.1 暴露免疫史：□1 有（免疫时间_____ 年 _____ 月 _____ 日， 免疫针次_____ 针），□2 无

3.2 暴露后抗血清注射：□1 有，□2 无（转至 3.3）

3.2.1 种类：□1 免疫球蛋白 □2 抗血清

3.2.2 注射时间：_____ 年 _____ 月 _____ 日

3.2.3 注射剂量：_____

3.2.4 有无过敏：□1 有（过敏表现：_____） □2 无

3.3. 暴露后人用狂犬病疫苗注射：□1 有，□2 无（转至 4）

3.3.1 注射单位：□1 村卫生室 □2 乡镇卫生院 □3 县级及以上医疗机构 □4 其他_____

3.3.2 种类：□1 Vero □2 地鼠肾

3.3.3 首针时间：_____ 年 _____ 月 _____ 日 _____ 时，首针剂量：□1 剂 □2 剂

3.3.4 免疫程序：□1 0-3-7-14-28 □2 其他_____

3.3.5 疫苗注射_____ 针次，如未全程，原因：_____

3.3.6 是否加强注射：□1 是（加强针次：_____ 针）， □2 否

3.3.7 疫苗生产单位: _____, 批号: _____, 失效期: _____年____月____日

4、临床资料

4.1 发病时间: _____年____月____日 4.2 死亡时间: _____年____月____日

4.3 诊断单位: 1 村卫生室 2 乡镇卫生院 3 县级及以上医疗机构 4 其他_____

4.4 发病临床症状 (可多选): 1 烦躁 2 恐水 3 怕风 4 畏光 5 抽搐 6 精神失常

5、实验室检测

5.1 采样时间: _____年____月____日

5.2 标本种类: 1 唾液 2 脑脊液 3 尿液 4 鼻咽洗液

5.3 检测项目: 1 病原检测 2 核酸检测

5.4 检测结果: 1 阳性 2 阴性

6、伤人动物情况

6.1 动物种类: 1 狗 2 猫 3 其它_____

6.2 伤人动物来源: 1 自家养 2 邻居养 3 流浪动物 4 野生动物 5 其它_____

6.3 若为家养动物, 是否接种兽用狂犬病疫苗: 1 是 (接种日期: _____年____月____日),
2 否

6.4 动物伤人原因: 1 主动袭击 2 自卫伤人 3 嬉逗 4 其他_____

6.5 是否同时咬伤多人: 1 是, 2 否

6.6 伤人后: 1 如常 (转至 7) 2 打死 3 失踪 4 病死 5 宰杀 6 其他_____

6.6.1 死亡时间: _____年____月____日

6.6.2 动物死后处理方式:

1 焚烧 2 深埋 3 出售 4 丢弃 5 屠宰剥皮 6 烹食 7 其它_____

7、如为一犬伤多人

7.1 共伤_____人

7.2 本例为第_____例次

7.3 共死亡_____人

被调查人与患者关系: _____

调查人签名: _____

调查人单位: _____

调查日期: _____年____月____日

填表说明

1. 在所选项目前的“□”中, 划“√”作为选择答案, 若无特殊说明, 所有选项均为单选。凡有“_____”的选项, 须填写相应内容;
2. 病例编号填写规定: 年号 (两位数)、流水号 (后边三位)
3. “2.4 暴露程度”参照 WHO 建议分类标准分为以下三类:
I 度: 被犬舔过无开放性伤口的健康皮肤和粘膜;
II 度: 裸露的皮肤或粘膜被轻轻咬过, 表面划伤, 但没有破口;
III 度: 任何部位的皮肤或粘膜, 一处或多处被咬破或抓穿。

附表 2

狂犬病人标本送检登记表

编号	患者姓名	性别	年龄	职业	住址	临床诊断	发病日期	采样日期	标本种类	检验项目	备注

送检单位：_____ 采样人：_____

送检人：_____ 送检日期：_____年____月____日

附表 3

狂犬病病原学检测结果登记表

检测项目	标本类型	采集日期	采集人	检测方法	检测结果	检测日期	检测人	备注
核酸检测								
抗原测定								

填表人：_____

填表日期：_____年____月____日

附表 4

狂犬病暴露人群门诊登记表

_____县(市、区、旗)_____乡(镇)

填表日期： 年 月 日 填表人签字： 页：

编号	姓名	性别	年龄(岁)	被伤地点	被伤日期	暴露部位及分级	伤口自行处理	门诊伤口处理	抗血清	疫苗种类、批号、厂家	接种日期						伤人动物				备注	
											D0	D3	D7	D14	D28	加强	名称	类别	免疫史	转归		

填表说明: 1 暴露分级分为三类: I 度: 被犬舔过无开放性伤口的健康皮肤和粘膜; II 度: 裸露的皮肤或粘膜被轻轻咬过, 表面划伤, 但没有破口; III 度: 任何部位的皮肤或粘膜, 一处或多处被咬破或抓穿。

2. 伤人动物种类: 可分为疯动物、可疑疯动物、正常动物(家养、无主动物、野生动物)、不知道等

附表 5

狂犬病宿主动物基本情况调查表

_____省（自治区、直辖市）_____市（地区）_____县（区）_____年

乡镇（办事处）	人口数	动物数量（只）			兽用疫苗数（份）		
		狗	猫	其它	狗	猫	其它
合计							

填表人：_____

填表日期：_____年___月___日

1、采集标本者个人防护

- (1) 从事标本采集和运送的工作人员均要经过专门培训方可进行此项工作。
- (2) 从事标本采集和运送的工作人员均要进行暴露前免疫。
- (3) 采集标本前要穿戴好防护服装、眼镜、手套，作好技术上的准备。

2、采集标本的包装：要求使用符合生物安全标准的包装盒盛放标本。

3、采集标本的时间、类型和存放

- (1) 在狂犬病病人入院后，尽可能早期采集标本。

(2) 用于病原学检测的标本：病人唾液、脑脊液、尿液、鼻咽洗液、咬伤处皮肤组织或病人死后的眼角膜、脑组织等均可用于病毒的检测和分离。以脑组织阳性率最高。

(3) 用于抗体检测的标本：无菌采集病例或免疫后血液 2~3 ml，分离血清后用于狂犬病特异性抗体的检测。

- (4) 标本的存放

a) 用于病毒检测和分离的标本在 -20℃ 或 -20℃ 以下低温（-70℃）、液氮、或放在含 50% 甘油的 PBS 中以保持标本的感染性，应将标本盛于无菌容器内，放在密封的盒内并注明其危险性以防病毒的扩散。

- b) 标本要求无菌采集，-20℃ 保存待检。

4、采集标本的运送

用于病毒检测和分离的标本，应带冰、干冰或液氮条件下尽快运送至实验室。

5、采集标本的保存

负责标本接收和检测的实验室，接到标本以后若暂时不检测，应立即冷冻保存。用于病毒检测和分离的标本可以在 -70℃ 长期保存，没有条件的也可以在 -20℃ 条件下短期保存。

6、标本的检测和结果反馈程序

病例调查及标本 → 县 CDC 实验室：标本处理，病例调查 ↔ 省级 CDC 实验室：检测 ↔ 国家 CDC：疑难病例、分离毒株。

1、实验室条件及生物安全操作要求

- (1) 从事狂犬病临床和实验室的工作人员需要暴露前免疫,所有意外暴露于狂犬病毒时必需立即报告本部门负责人。
- (2) 操作所有潜在狂犬病感染的材料均应在 P2 或 P3 (实验室固定毒在 P2,病人或动物分离的街毒在 P3) 生物安全实验室内进行。
- (3) 当实验室对接收到的动物标本进行操作时,必须在 P3 以上条件的专业实验室中进行。没有安全实验室 (P3 级) 的单位,严禁从事病毒分离工作。
- (4) 实验前要穿戴好防护服装、眼镜、手套,作好技术上的准备。
- (5) 由于空气传播狂犬病毒已经得到证实,因此高速混悬或离心操作应在密闭状态下进行。
- (6) 实验后要作好善后消毒处理,狂犬病毒对脂溶剂 (肥皂水、醚、氯仿、丙酮), 45~70%乙醇,碘制剂和四铵化合物敏感,操作完毕对操作台、实验材料等要用相应的消毒剂或高压蒸汽进行消毒处理。

2、实验室检测网络组成及职责

- (1) 中国疾病预防控制中心牵头,全国各省级疾病预防控制中心及所辖区域内的各级疾病预防控制中心组成实验室检测网络。
- (2) 中国疾病预防控制中心职责
 - A. 诊断试剂的研制、标准化,并推荐质量稳定可靠的诊断试剂;
 - B. 负责毒株的鉴定和病毒变异性调查;
 - C. 对各级实验室检测人员进行技术培训。
 - D. 协助省级疾病预防控制中心完成标本的实验室检测。
- (3) 省级疾病预防控制中心职责
 - A. 收集、保存辖区内各监测点的各种待检测标本。
 - B. 辖区内各种标本的实验室检测。
 - C. 对本省监测点标本采集和运送给与技术指导 and 协助。
- (4) 县级监测点疾病预防控制中心职责
采集病例标本,运送病例标本至省级疾病预防控制中心。

3、实验室检测方法

(1) 病原检测:

- A. 免疫荧光法检测抗原:** 病人的脑脊髓液或唾液直接涂片、病人的角膜印片或咬伤部位皮肤组织或脑组织印片或冷冻切片, 丙酮固定, 抗狂犬病毒特异性荧光抗体染色检测狂犬病毒抗原。
- B. 快速狂犬病酶联免疫吸附法检测抗原:** 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释的抗狂犬病毒核衣壳 IgG 包被 96 孔酶标板, 4℃ 过夜; 用含 0.3% 牛血清白蛋白和 5% 蔗糖的 pH9.6 碳酸盐缓冲液封闭 30 分钟; 将采集到的标本研磨, 用 pH 7.4 PBS 制成 30% 的悬液, 离心取上清加入酶标板孔内, 同时设阴性、阳性对照, 200 μl/孔, 37℃ 孵育 1 小时; 洗板四次后加入纯化的酶标记抗狂犬病毒抗体 200 μl/孔, 37℃ 1 小时后洗板, 加入酶反应底物, 室温作用 30 分钟, 2M H₂SO₄ 终止反应, 肉眼观察或酶标仪测定结果。

(2) 核酸检测:

RT-PCR 方法: 以特异性扩增核蛋白 (N) 基因最保守区域为目的基因, 设计一对引物: N1 (+): 5'-₅₈₇TTT GAG ACT GCT CCT TTT G₆₀₅-3'; N2 (-): 5'-₁₀₉₂CC CAT ATA GCA TCC TAC₆₀₅-3。唾液、脑脊液、皮肤或脑组织标本以及感染病毒后的细胞培养物或鼠脑均可用于病毒核酸的检测。基本步骤为: 待检标本用细胞总 RNA 分离试剂提取病毒 RNA, 再通过逆转录反应合成与目的基因 RNA 序列互补的 cDNA, PCR 循环特异性扩增目的基因 cDNA, 电泳检测 PCR 扩增产物, 判断检测结果。

(3) 病毒分离: 抗原或核酸检测阳性标本可以进行病毒分离以便进行更深入的研究。

- A. 细胞培养法分离病毒:** 将唾液、脑脊液、皮肤或脑组织标本研磨后, 用 PBS 或 MEM 制成 30% 悬液→4℃ 2000r/min 离心 20 分钟→取上清接种在 96 孔或 24 孔培养板内已形成单层的敏感细胞 (鼠神经传代细胞、Vero 细胞或 BHK21 细胞) 上, 吸附 2 小时后补加含 2% 血清的维持液, 37℃ 5% CO₂ 孵育约 4~5 天, 丙酮固定感染后的细胞, 用抗狂犬病毒单克隆抗体观察特异性荧光包涵体判断结果。阳性时吸取上清至一无菌容器内 -70℃ 保存备用或继续传代。病毒通过细胞的多次传代可以适应细胞培养并得到扩增。
- B. 乳小白鼠接种法分离病毒:** 30% 的病人或动物脑组织悬液, 离心取上清, 接种 1~2 日龄乳鼠脑内, 每个样品注射一窝乳鼠; 注射后的乳鼠应在具有高效滤过装置的负压饲养柜内饲养。症状不典型时可于接种第一代后取脑继续传代, 连续传代后潜伏期逐渐规律, 一般为 5 天左右。发病乳鼠若确定为狂犬病毒感染, 无菌取脑, -70℃ 或用含 50% 甘油的 PBS -20℃ 保存, 也可研磨后加灭菌脱脂牛

奶制成 20%悬液，真空冷冻干燥，长期保存。未发病存活的鼠保留至 21 天后杀死作免疫荧光检测

(4)抗体检测

- A. 特异性抗体检测：**在自然感染情况下，狂犬病毒通常由被疯动物咬伤时通过其带有病毒的唾液进入机体伤口内，在入侵部位狂犬病毒基本上不增殖，一般也不侵入血流，故不能形成病毒血症。因此，在感染后的一段时间内狂犬病毒或其抗原不能与机体免疫系统广泛接触，不能有效刺激机体产生抗狂犬病毒感染的免疫应答反应。狂犬病的晚期因血脑屏障作用被破坏，脑内大量病毒抗原得以进入血流，可以刺激机体的免疫系统产生大量特异性抗体。因此，许多狂犬病人在发病早期血清中查不到抗体或抗体滴度很低，狂犬病特异性抗体只在临床疾病的晚期出现。
- B. 中和抗体检测：**狂犬病疫苗免疫后血清中和抗体水平是测定疫苗免疫力程度的评判指标，WHO 狂犬病专家委员会认为中和抗体水平等于或高于 0.5IU/ml 血清，表示能得到有效的保护。狂犬病毒中和抗体的检测可以用传统的小鼠中和试验或 WHO 推荐的快速荧光灶抑制试验（RFFIT）。RFFIT 试验时倍比稀释已经灭活的血清样品，同时设阴、阳性血清对照。病毒用标准固定毒 CVS 株，细胞用 BHK21 细胞系。首先将稀释的被检及对照血清 0.1ml 加入 96 孔细胞培养板中，再在各血清孔中加入 0.1 ml 标准病毒稀释液（100TCID₅₀），37℃中和 1.5 小时；然后每孔加入细胞，37℃、5% CO₂ 培养过夜后弃掉培养液，PBS 洗一次，丙酮固定。干燥后，加荧光素标记的抗狂犬病毒抗体，37℃ 30 分钟，PBS 洗 3 次，荧光显微镜观察结果：比较实验组和阴性血清组的荧光灶，实验组中能使荧光灶抑制≥50%的血清最高稀释倍数，即为被检血清的中和抗体滴度。