

蔡方舟,陈倩,佟巍,等. 小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 85-90.
Cai FZ, Chen Q, Tong W, et al. Establishment of an ELISA assay for the detection of mouse IgG antibody of rabies virus [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 85-90.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 013

小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法的建立

蔡方舟,陈倩,佟巍,李丹,王卫*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 建立小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法,用于狂犬病小鼠模型的检测和分析。**方法** 通过正交实验确定样品最佳稀释度和二抗最佳浓度等工作条件;并对该方法的特异性、灵敏性、稳定性等进行分析;与商品化试剂盒一同用于小鼠样品的检测,确定该 ELISA 方法的符合率。**结果** 该 ELISA 方法的样品最佳稀释度是 1:100,二抗最佳浓度是 40 ng/mL,阳性临界值为 0.121。该 ELISA 方法与小鼠常见病毒阳性血清无交叉反应;检测浓度下限为 129 μg/mL;样本三次重复的变异系数小于 10%。与商品化试剂盒的符合率为 100%。**结论** 成功建立小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法,可应用于狂犬病小鼠模型的分析以及疫苗效价的评估工作中。

【关键词】 狂犬病毒;IgG 抗体;小鼠;ELISA;检测方法
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0085-06

Establishment of an ELISA assay for the detection of mouse IgG antibody of rabies virus

CAI Fangzhou, CHEN Qian, TONG Wei, LI Dan, WANG Wei*
(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS);
Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Beijing Key Laboratory for
Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious Diseases; NHC Key Laboratory of Human
Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish an ELISA assay for the detection of mouse IgG antibody to rabies virus.
Methods Orthogonal experiments were used to determine the optimal dilution of the sample and optimal concentration of the secondary antibody. The stability, specificity and sensitivity test of the assay was determined. The assay result of these samples were compared with those of a commercial kit. **Results** The optimal dilution of the sample was 1:100, the optimal concentration of the secondary antibody was 40 ng/mL, and the cutoff value was 0.121. There was no crossover with the common mouse viruses, and the minimum detection sensitivity was 129 μg/mL, and the coefficient variation of the three replicates of the sample was less than 10%. The coincidence rate with the commercial kit was 100%. **Conclusions** An ELISA assay for the detection of a mouse IgG antibody to rabies virus was successfully established, which can be used for detection and analysis of rabies mouse models.

【Keywords】 rabies virus; IgG Antibody; mouse; ELISA; detection assay

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费课题(2018JT35001);国家传染病重大专项课题(2017ZX10304402-001)。
[作者简介] 蔡方舟(1997—),男,学士,实习技术员,生物技术专业。E-mail: caifangzhou11@sina.com
[通信作者] 王卫(1981—),副研究员,硕士生导师,研究方向:病原生物学。E-mail: wangw@cnilas.org

狂犬病是一种由狂犬病毒(rabies virus, RV)感染引起的急性传染病,是迄今为止唯一病死率高达 100%的烈性传染病^[1-2]。我国是世界第二大狂犬病高发国,仅次于印度;1949 年至 2015 年,我国大陆报告狂犬病 130494 例,平均每年 1977 例^[3]。近年来,在全社会的重视和努力下,我国狂犬病病例持续下降,但发病数和死亡数在法定传染病报告里依然排列前茅,不可忽视^[4]。狂犬病可防不可治,合格的疫苗可用于狂犬病毒暴露前或暴露后预防;一旦发病,则无有效的治疗方法或策略。因此,完善狂犬病动物模型,检定狂犬病疫苗效价,探索狂犬病发病机制,对于狂犬病的防治均具有非常重要的现实意义。实验小鼠具有遗传背景均一、实验操作简便、实验试剂完善等优点,常用于狂犬病的发病机制研究及预防疫苗的评价^[3]。

为了解狂犬病毒及疫苗对实验小鼠的免疫效果,常需要检测小鼠血清中抗狂犬病毒抗体水平。常用的检测方法包括世界动物卫生组织(OIE)推荐的荧光抗体病毒中和试验(FAVN),以及世界卫生组织(WHO)推荐的快速荧光灶抑制试验(RFFIT),可定量检测动物或人体内狂犬病中和抗体水平;但缺少规范的结合抗体检测方法。基于此,为完善狂犬病小鼠模型技术体系,本研究建立了一种基于间接 ELISA 法检测小鼠血清中抗狂犬病毒 IgG 抗体的方法,可用于狂犬病小鼠模型的分析以及疫苗效价的评估。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠(雌性,体重 12~14 g,3~4 周龄),由北京华阜康生物技术股份有限公司提供[SCXK(京)2014-0004],用于狂犬病毒阳性血清和阴性血清的制备。动物饲养与实验均在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全二级动物实验室(ABSL-2),遵照 3R 原则进行。动物实验方案得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准(批准号:WW18003)。

1.1.2 实验样品

狂犬病毒阳性血清和阴性血清由本课题组自行制备,具体方法详见 1.3.1。用于特异性实验的

小鼠肝炎病毒、小鼠呼肠孤病毒 III 型、小鼠细小病毒、小鼠多瘤病毒、小鼠腺病毒、小鼠仙台病毒、小鼠脑脊髓炎病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒的阳性血清来自中国医学科学院医学实验动物研究所检测中心,免疫荧光法(IFA)确认阳性,抗体效价均不低于 1:320。

1.2 主要试剂与仪器

狂犬病疫苗国家标准品购自中国食品药品检定研究院,批号为 250009-201108,效价为 6.61 U/mL。狂犬病毒抗原预包被微孔板(96 微孔板)、TMB 显色液、终止液(稀硫酸)、PBST 洗液等购自北京世纪元亨动物防疫技术有限公司(批号:20180906)。HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(货号:ZB-2305WW)购于北京中杉金桥生物技术有限公司,抗体浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 。PBS(货号:SH30256.01)购自 HyClone 公司。酶标仪(型号:FLUOStar Omega)由德国 BMG Labtech 公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠阳性血清及阴性血清的制备

狂犬疫苗国家标准品用 PBS 稀释成 1:125,每只小鼠腹腔注射 0.5 mL,0 d、7 d 免疫,共免疫 2 次。分离免疫后 14 d 小鼠血清,进行抗狂犬病毒中和抗体效价快速荧光灶抑制试验(RFFIT)测定。根据 WHO 指导原则,RFFIT 结果大于 0.5 IU/mL 的样品确定为阳性血清。阳性血清混合后,使用 BSA 方法测定其浓度为 64.5 mg/mL。阴性血清来自未免疫小鼠,RFFIT 实验确认对狂犬病毒没有中和效果。

1.3.2 ELISA 方法的基本流程

狂犬病毒抗原包被由北京世纪元亨公司具体操作,其简单流程如下:96 孔板使用纯化的狂犬病毒进行包被,包被时将包被液(0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液,0.05 mol/L 碱)稀释后加入微孔板中,每孔加 100 μL ,4℃孵育 24 h,甩干;加入封闭液(0.12% Tris 缓冲液,含蛋白),每孔加 200 μL ,4℃孵育 24 h,甩干。对包被板做干燥、密封等处理,保存于 4℃冰箱。获得狂犬病毒抗原包被板之后,向其中加入 PBS 稀释的血清标本,37℃培养箱中孵育 30 min;PBST 洗板 5 次,加入 PBS 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,37℃培养箱中孵育 30 min;PBST 洗板 5 次,加入显色底物 A(0.05 mol/L pH 5.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液,含 H_2O_2)及显色底物 B(0.01 mol/L pH 5.0 柠檬酸缓冲液,含

EDTA-Na₂、四甲基联苯胺 TMB), 37℃ 显色 15 min; 加入终止液(0.5 mol/L H₂SO₄), 用酶标仪测定波长 450 nm 处的 OD 值。

1.3.3 实验条件的优化

为确定样品的最佳稀释度及二抗的最佳浓度, 根据文献^[5], 使用正交实验法优化 ELISA 实验条件。样品使用 PBS 进行系列稀释, 根据实验经验, 稀释成 4 个稀释度, 分别为 1:50~1:400; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体也使用 PBS 进行系列稀释, 根据抗体说明书, 稀释为 5 个浓度, 稀释度为 1:2500~1:40 000, 浓度分别为 160 ng/mL、80 ng/mL、40 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL, 详见表 1。

根据阴性血清的检测结果, 结合文献^[6], 并根据统计学方法确定临界值(cut-off 值)的计算公式: cut-off 值= $\bar{x} + (2 \times SD)$ 及数值。

1.3.4 方法特异性测试

使用该 ELISA 方法检测实验小鼠常见病毒的阳性血清, 包括小鼠肝炎病毒、小鼠呼肠孤病毒 III 型、小鼠细小病毒、小鼠多瘤病毒、小鼠腺病毒、小鼠仙台病毒、小鼠脑脊髓炎病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒的阳性血清, 以及小鼠阴性血清; 判断其结果是否为阴性, 从而确定该方法的特异性。

1.3.5 方法敏感性测试

使用 PBS 系列稀释阳性血清, 稀释度分别为 1:10、1:50、1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10 000、1:50 000、1:100 000、1:500 000、1:1 000 000, 浓度分别为 6.45 mg/mL、1.29 mg/mL、645 μg/mL、129 μg/mL、64.5 μg/mL、12.9 μg/mL、6.45 μg/mL、1.29 μg/mL、645 ng/mL、129 ng/mL、64.5 ng/mL。用建立的 ELISA 方法进行检测, 确定其能检测出阳性结果的最低样品浓度, 从而确定该方法的敏感性。

1.3.6 方法重复性测试

选择本课题组制备的阳性血清样本各 3 份, 经

3 次重复检测, 每次同一样本设 3 个复孔, 确定检测符合率, 并计算变异系数 ($CV = (SD \div MN) \times 100\%$)^[7], 从而确定该方法的重复性。

1.3.7 符合率检验

将本文建立的间接 ELISA 方法与美国 Alpha Diagnostic International 公司的间接法试剂盒 Mouse Anti-Rabies IgG ELISA (货号: 600-030-MRG) 比较, 分析两种方法检测结果的一致性及符合率。

2 结果

2.1 间接 ELISA 法工作条件的确定

为建立该 ELISA 方法, 使用正交实验方法(表 1), 确定检测样品的最佳稀释度和二抗最佳工作浓度。根据实验结果, 随着样品稀释度的提高, OD 值逐渐降低; 随着二抗浓度的降低, OD 值逐渐降低, 符合实验预期。按照阳性样品 OD₄₅₀ 值>1.0, 阴性结果 OD₄₅₀ 值<0.1, P/N 值最大的实验组合为最佳组合的标准^[8], 我们发现该 ELISA 的样品最佳稀释度是 1:100, 二抗最佳浓度为 40 ng/mL, 结果见表 2; 后续均使用该工作浓度进行实验。

2.2 临界值(cut-off 值)的确定

为确定该方法的临界值(cut-off 值), 使用建立的间接 ELISA 方法对 33 份阴性血清进行测定, 每份样品做 2 个复孔, 结果发现 OD 平均值($\bar{x}$)为 0.061, 标准方差(SD)为 0.03, 根据公式 cut-off 值= $\bar{x} + (2 \times SD)$ ^[6], 计算其临界值(cut-off 值)为 0.121(见图 1)。因此, 当待检血清样本满足 OD ≥0.121, 即可判定为阳性; 反之当 OD<0.121 则判断为阴性。

2.3 方法特异性

为了解该方法是否特异, 用所建立的间接 ELISA 方法检测小鼠肝炎、小鼠呼肠孤病毒 III 型、小鼠细小病毒、小鼠多瘤病毒、小鼠腺病毒、小鼠仙

表 1 正交实验实验设计表
Table 1 Level of the factors in the orthogonal experiment

序号 Serial numbers	样品稀释度 Sample dilution	二抗稀释度及浓度 Dilution and concentration of secondary antibody
1	1:50	1:2500 (160 ng/mL)
2	1:100	1:5000 (80 ng/mL)
3	1:200	1:10 000 (40 ng/mL)
4	1:400	1:20 000 (20 ng/mL)
5	/	1:40 000 (10 ng/mL)

表 2 不同稀释倍数血清与不同浓度二抗反应的 OD₄₅₀ 值

Table 2 OD₄₅₀ value of ELISA with different dilutions of serum and different concentrations of secondary antibody

样品类型及稀释度 Sample type and dilution		二抗浓度 (ng/mL) Concentration of secondary antibody				
		160	80	40	20	10
1:50	阳性样品 Positive control	1.992	1.169	0.651	0.331	0.174
	阴性样品 Negative control	0.085	0.051	0.094	0.017	0.014
	阳性样品/阴性样品 P/N	23.435	22.921	6.625	19.470	12.428
1:100	阳性样品 Positive control	2.627	1.826	1.029	0.502	0.227
	阴性样品 Negative control	0.109	0.066	0.017	0.042	0.003
	阳性样品/阴性样品 P/N	24.100	27.666	60.529	11.952	75.666
1:200	阳性样品 Positive control	1.405	0.757	0.363	0.179	0.080
	阴性样品 Negative control	0.077	0.078	0.030	0.009	0.005
	阳性样品/阴性样品 P/N	18.246	9.705	12.100	19.888	16.000
1:400	阳性样品 Positive control	0.907	0.416	0.235	0.096	0.031
	阴性样品 Negative control	0.108	0.070	0.017	0.011	0.030
	阳性样品/阴性样品 P/N	8.398	5.942	13.823	8.727	1.033

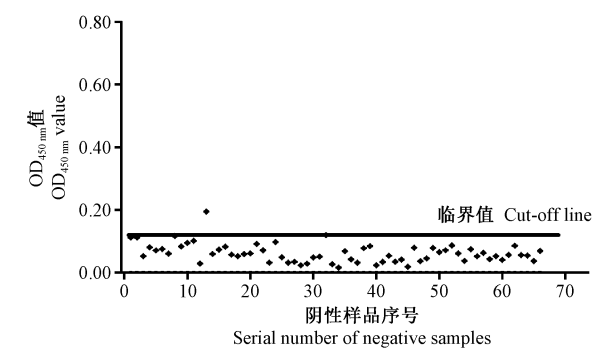


图 1 阴性血清间接 ELISA 检测结果

Figure 1 Indirect ELISA results of negative serum

台病毒、小鼠脑脊髓炎病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒等小鼠常见病毒的阳性血清,结果均为阴

性,见表 3,说明该 ELISA 方法与上述病毒抗体无交叉反应,具有较好的特异性。

2.4 方法敏感性

为了解该方法的检测灵敏度,本研究还进行了敏感性实验。将本科室制备的浓度为 64.5 mg/mL 的阳性样品进行稀释(1:10、1:50、1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10 000、1:50 000、1:100 000、1:500 000、1:1 000 000),浓度分别为 6.45 mg/mL、1.29 mg/mL、645 μg/mL、129 μg/mL、64.5 μg/mL、12.9 μg/mL、6.45 μg/mL、1.29 μg/mL、645 ng/mL、129 ng/mL、64.5 ng/mL,用建立的 ELISA 方法进行检测。经 3 次试验,发现样品稀释度在 1:500 时仍能检测出阳性(见图 2),说明该方法的最低检测灵敏度为 129 μg/mL。

表 3 方法特异性实验检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Result of specificity test

样品 Samples	OD ₄₅₀ 值 OD ₄₅₀ value	结果判断 Result judgment
小鼠肝炎 Mouse hepatitis virus	0.085±0.014	阴性 Negative
呼肠孤病毒 III 型 Respiratory enteric orphan virus III	0.020±0.019	阴性 Negative
小鼠细小病毒 Minute virus of mice	0.072±0.004	阴性 Negative
多瘤病毒 Polyma virus	0.049±0.009	阴性 Negative
小鼠腺病毒 Mouse adenovirus	0.120±0.014	阴性 Negative
小鼠仙台病毒 Sendai virus	0.031±0.015	阴性 Negative
脑脊髓炎病毒 Encephalomyelitis virus	0.069±0.018	阴性 Negative
淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 Lymphocytic choriomeningitis virus	0.055±0.016	阴性 Negative
样品稀释液 Sample diluent	-0.015±0.007	阴性 Negative
阴性对照 1 Negative control 1	0.053±0.011	阴性 Negative
阴性对照 2 Negative control 2	0.022±0.016	阴性 Negative
阴性对照 3 Negative control 3	0.039±0.019	阴性 Negative

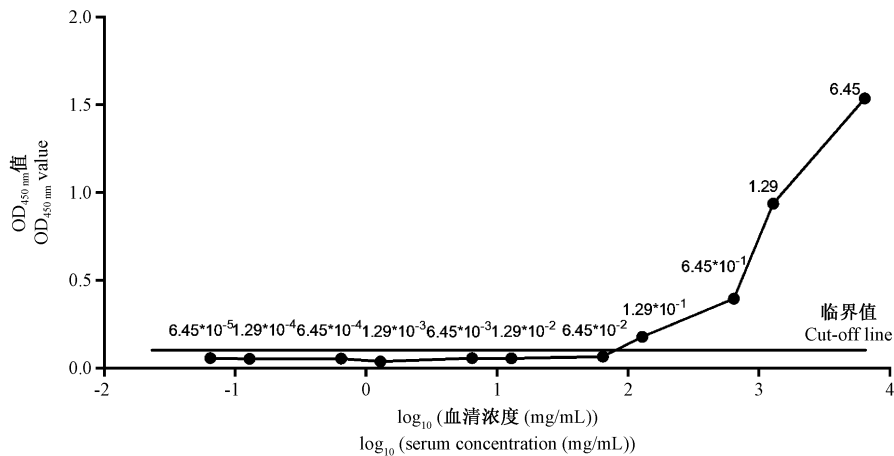


图 2 方法敏感性实验检测结果
Figure 2 Results of sensitivity test

表 4 重复性实验结果
Table 4 Results of reproducibility test

样品 Samples	1st		2nd		3rd	
	$\bar{x} \pm s$	CV%	$\bar{x} \pm s$	CV%	$\bar{x} \pm s$	CV%
1	0.572±0.126	3.6	0.456±0.044	9.7	0.430±0.059	7.6
2	1.216±0.108	8.9	1.115±0.082	7.3	1.034±0.061	5.9
3	0.903±0.170	1.5	0.769±0.081	6.1	0.657±0.025	3.8

2.5 可重复性

为了解本研究建立方法的可重复性,选择本科室制备的阳性血清样本各 3 份,经 3 次检测,每次同一样本设 3 个复孔,确定检测符合率,并计算变异系数(CV%)。结果发现,3 份阳性血清样本经重复检测,诊断符合率为 100%,变异系数为 1.5%~9.7%,小于 10%,见表 4;说明该方法具有较好的重复性。

2.6 符合率检验

将本文建立的间接 ELISA 方法与商品化的试剂盒进行比较,分别检测 18 个样品,本文建立的方法和商品化试剂盒均检出 10 例阳性,阳性率为 55.56%,与样品实际情况相符,两者总符合率为 100%。

3 讨论

为研究狂犬病毒的感染及致病机制,评价狂犬疫苗及药物的效果,动物模型是非常重要的研究工具。狂犬病毒几乎可以感染所有的温血脊椎动物,包括许多野生动物和常用的实验动物,如犬、仓鼠、小鼠、豚鼠、大鼠和家兔等(其敏感性递减)。实验研究和病毒分离时较常应用幼龄小鼠和仓鼠,因其敏感性高,潜伏期短且恒定(5~7 d)。家兔在感染

后,规律地显现麻痹症状。给 1 日龄雏鸡脑内接种狂犬病毒,可以使其发生致死性麻痹(初代街毒的潜伏期可能长达 1 个月左右),连续传代后的潜伏期缩短至 6 d。地鼠也常被用于狂犬病暴露后疫苗免疫动物模型^[9]。鉴于实验小鼠的诸多优点,小鼠模型被广泛应用于狂犬病感染及发病机制研究,以及狂犬病疫苗体内评价等工作中^[10]。

了解狂犬病毒或疫苗对小鼠的免疫效果,进行狂犬病小鼠模型分析,抗体水平检测是非常关键的一环。目前,检测狂犬病抗体的有很多种,如荧光抗体中和实验(FAVN)、小鼠中和实验(MNT)、快速荧光灶抑制试验(RFFIT)等^[11-13],但是这些实验都存在着相应的缺点,如仪器需求较高、成本较高、试验周期较长等;还需要使用狂犬病毒活毒,存在实验室生物安全风险。为完善狂犬病小鼠模型技术体系,了解结合抗体在小鼠体内的变化规律,急需建立一种简便易行的抗体检测方法。国际上只有少数公司能生产类似试剂盒,但也存在货期长、成本高等问题。

酶联免疫吸附试验(ELISA)只需要较短的时间(2~3 h)以及较低的成本,在定性分析上 ELISA 具有较大优势。而且,ELISA 与其他抗体检测技术具

有非常高的符合率。如 ELISA 和 FAVN 检测狂犬病疫苗免疫犬血清抗体的阳性符合率为 100%^[14]。RFFIT、FAVN 及 RVNA Kit 等三种方法可通用于人血清中抗狂犬病毒中和抗体的检测,而 ELISA 检测结果与中和抗体效价有一定差距,但在经过优化、校验后 ELISA 也可以在有效范围内用于狂犬病抗体的检测^[15-16]。为此,作者尝试建立一种基于间接 ELISA 法检测小鼠血清中抗狂犬病毒 IgG 抗体的方法,可用于狂犬病小鼠模型的分析以及疫苗效价的评估。

本研究建立的小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法具有良好的可重复性,且特异性良好,与小鼠常见病毒无交叉反应,能在抗体浓度大于 129 μg/mL 时检测出阳性结果。本实验以商品化的试剂盒作为对照进行比较,发现二者符合率很高,符合率达到 100%,证明自研试剂盒性能良好,可应用于狂犬病小鼠模型的抗体动力学追踪分析。综上所述,本文所建立的间接 ELISA 方法适于狂犬病小鼠模型的分析以及疫苗临床前的检测。

参考文献:

[1] Fisher CR, Streicker DG, Schnell MJ. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(4): 241-255.

[2] 王朝,周明,傅振芳,等. 狂犬病病毒逃逸宿主天然免疫反应的研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(3): 237-244.

[3] Ruan S. Modeling the transmission dynamics and control of rabies in China[J]. *Math Biosci*, 2017, 286: 65-93.

[4] 徐素萍,黄小芳,刘宇明,等. 4 株狂犬病毒感染小鼠的临床症状及脑组织病理学观察[J]. *南方农业学报*, 2018, 49(3): 586-591.

[5] 杜燕华,李懿,程宁宁,等. 新布尼亚病毒 IgG 抗体间接

ELISA 检测方法的建立[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2017, 52(2): 126-129.

[6] 陈武娟,贺美荣,杨蓉,等. 人类巨细胞病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂的研制[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(4): 349-353.

[7] 李一经,刘博,姜艳平,等. 双抗体夹心 ELISA 检测排泄物 PEDV[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(2): 1-10.

[8] 徐保娟,王丽萍,崔晓霞,等. 猪圆环病毒 2 型抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国动物传染病学报*, 2019, 27(2): 25-34.

[9] 汤重发,石磊泰,俞永新,等. 金黄地鼠作为狂犬病暴露后疫苗免疫动物模型的应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2016, 29(3): 225-230.

[10] 唐利军, Kuang KY, Zhao L, 等. 狂犬病小鼠模型的制作[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(5): 330-333.

[11] Mebatsion T, Sillero-Zubiri C, Gottelli D, et al. Detection of rabies antibody by ELISA and RFFIT in unvaccinated dogs and in the endangered Simien jackal (*Canis simensis*) of Ethiopia[J]. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1992, 39(3): 233-235.

[12] 吴小红,李加,唐建蓉,等. 抗狂犬病病毒中和抗体效价快速荧光灶抑制试验(RFFIT)的建立及应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(11): 1145-1148.

[13] 张守峰,张菲,刘晔,等. FAVN 与 RFFIT 在动物和人狂犬病中和抗体检测中的比较[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(9): 1161-1163.

[14] 孙招金,薛素强,刘晓慧,等. ELISA 与 FAVN 方法检测犬狂犬病抗体的比较[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(3): 204-206.

[15] 于鹏程,由淑珍,卢学新,等. RFFIT、FAVN、ELISA 及狂犬病中和抗体检测试剂盒对狂犬病抗体检测的比较研究[J]. *病毒学报*, 2017(2): 265-268.

[16] 章雨辰,何婉婷,张鸿宇,等. 狂犬病病毒实验室检测技术的研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(5): 416-421.

[收稿日期] 2018-12-11