

中 华 人 民 共 和 国 国 家 标 准

GB/T 18639—2002

狂犬病诊断技术

Diagnostic techniques for rabies in animals

2002-02-19 发布

2002-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

狂犬病(rabies)是由弹状病毒科狂犬病病毒引起的一种人兽共患的急性接触性传染病。主要侵害中枢神经系统,引起狂暴不安和意识紊乱等症状,最后麻痹、衰竭而死。发病率不高,病死率几乎为百分之百。本病呈世界性分布,以亚洲最多发生。我国也不例外,近年来有增多的趋势。世界各国十分重视狂犬病的研究和检疫。世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizootic(法),OIE]和我国已将其列为重点防制的二类动物疾病。

狂犬病症状非常明显,却非十分特异,且无肉眼可见的特殊病变。狂犬病的确诊有赖于实验室的检查结果。但是,由于本病发病急,病程短,病死率高,使得实验室诊断通常以检查病毒抗原为主。例如,世界卫生组织(WHO)已把基于病原鉴定的内基氏个体(negribodies)检查、免疫荧光试验和小鼠及细胞培养物感染试验,作为诊断狂犬病的定性方法并将其标准化。OIE 予以采纳并向各成员国推荐使用。本标准是参照 WHO 和 OIE 推荐的这些方法,结合我国的研究成果和实际情况而制定的。本标准的实施,对提高狂犬病的诊断和检疫水平,及时采取防制措施,保证人畜健康,将起到重要作用。

需要指出的是,内基氏小体检查和免疫荧光试验分别可能产生 5%~10%和 2%~5%的假阴性结果。因此,在进行上述两项检查的同时,应进行小鼠感染试验,即把这三项检查视为狂犬病诊断的三个必要程序。

本标准的附录 A 为标准的附录,附录 B 为提示的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国人民解放军农牧大学。

本标准主要起草人:宣华、向华。

1 范围

本标准规定了狂犬病内基氏小体(negri bodies)检查、免疫荧光试验、小鼠和细胞培养物感染试验的技术要求。

本标准适用于各种易感动物的狂犬病的诊断和检疫。

2 内基氏小体检查

2.1 准备

2.1.1 器材:胶皮手套、口罩、防护眼镜等个人防护器具;骨锯、骨凿、骨剪、脑刀等动物解剖器具;切片机、染色缸等组织制片与染色器具;光学显微镜等。

2.1.2 标本保存液:10%(体积分数)福尔马林溶液,50%(体积分数)甘油生理盐水。

2.1.3 染色液:赛勒(Seller)氏染色液,曼(Mann)氏染色液,其配制方法见附录 A(标准的附录)。

2.1.4 人身防护:见附录 B(提示的附录)。

2.2 样品的采集和运送

2.2.1 对可疑为狂犬病而扑杀或死亡的动物(含实验感染小鼠),应在死亡后 3 h 内(越早越好)由大脑海马回(Ammon 氏角)、小脑皮质和延髓各切取 1 cm³ 组织数块,放入灭菌玻璃瓶,再置于冰瓶内于 24 h 内送达实验室。

2.2.2 不能立即送检者,应加 10%福尔马林溶液固定,或加 50%甘油生理盐水,4℃保存送检。

2.2.3 不能就地取脑时,小动物可送检完整的新鲜尸体,大动物可送检未剖开的头颅。

2.3 标本片的制备

2.3.1 对新鲜脑组织,可用外科刀切开,以通过火焰去脂的载玻片在其切面上触压一下制成压印片。每张载玻片可接触 2~3 个部位,每份材料做 3~4 张。

2.3.2 在甘油盐水中保存的新鲜病料,应先用生理盐水彻底洗去甘油,方可制片,制片方法同 2.3.1。

2.3.3 所有压印片于室温下干燥后,浸入甲醇溶液固定 2 min。

2.3.4 经 10%福尔马林溶液充分固定过的脑组织可按常规方法制备组织学切片。

2.4 染色

2.4.1 赛勒氏染色法

在经过甲醇固定并风干的压印片上,滴加赛勒氏染色液(以盖满压印面而不溢为度)着染 5 s~10 s,然后用蒸馏水冲洗,干燥后镜检。

2.4.2 曼氏染色法

2.4.2.1 将经过甲醇固定并风干的压印片,或者经过脱蜡、浸水、风干的切片浸入曼氏染色液中浸染。压印片浸染 5 min,切片浸染时间因温度而异(室温下 24 h,或 38℃温箱中 12 h,或 60℃温箱中 2 h)。

2.4.2.2 以蒸馏水快速洗去染色液,至无浮色出现为止,用吸水纸吸干。

2.4.2.3 以无水乙醇稍洗,至标本区刚出现蓝色为度。

- 2.4.2.4 浸入碱性乙醇分化 15 s~20 s,至标本区出现红色。
- 2.4.2.5 依次通过无水乙醇和蒸馏水各数秒钟,分别洗去氢氧化钠和乙醇,再浸入微酸性水中 1 min~2 min。酸化期间,经常于显微镜下观察,至细胞核出现蓝色为宜;如果核蓝色过深,说明酸化过度,可退回至碱性乙醇,再作短时分化。

2.4.2.6 以蒸馏水水洗后,依次通过 95%乙醇和无水乙醇脱水,并经二甲苯透明,最后加香胶封固。

2.5 显微镜检查及判定

内基氏小体嗜酸性,位于神经细胞胞浆中,呈圆形、椭圆形或棱形,直径 $3\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$,一个细胞内通常含有一个内基氏小体,但也可含有几个。用赛勒氏染色时,内基氏小体呈桃红色,神经细胞为蓝紫色,组织细胞为深蓝色。用曼氏染色时,内基氏小体为鲜红色,神经细胞的胞核为蓝色、胞浆为淡蓝色,红细胞为粉红色。有时,在鲜红色的内基氏小体中还可以见到嗜碱性的蓝色小颗粒。

内基氏小体即狂犬病包涵体,为狂犬病所特有。因此,一旦检出内基氏小体,即可确诊。但在检查犬脑时,应注意与犬瘟热病毒引起的包涵体相区别。犬瘟热包涵体主要出现于呼吸道、膀胱、肾盂、胆囊、胆管等器官粘膜上皮细胞的胞浆和胞核内。在脑组织内,见于原浆细胞和一些小胶质细胞的核内,在神经原内很少见到。

3 免疫荧光试验

3.1 材料准备

3.1.1 器材

荧光显微镜,恒温箱,载玻片(片厚 2 mm 以下),盖玻片,冰冻切片机。

3.1.2 试剂

3.1.2.1 异硫氰酸荧光黄(FITC)标记抗狂犬病病毒丙种球蛋白(以下简称狂犬病荧光抗体)和未标记抗狂犬病病毒丙种球蛋白(以下简称狂犬病未标记抗体),由制标单位提供。使用时,用 0.02%伊文思蓝(Evans blue)染色液稀释成 2~4 个染色单位。例如,荧光抗体染色效价为 1:64,则作 1:32~1:8 稀释后使用。

3.1.2.2 丙酮(分析纯)使用前置普通冰箱内预冷至 4℃左右。

3.1.2.3 0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲盐水(PBSS)。

3.1.2.4 0.02%伊文思蓝染色液。

3.2 样品的采取和运送

同 2.2。

3.3 标本片的制备

3.3.1 病料标本片制备

3.3.1.1 按照 2.3 的方法和要求制得压印片,也可由切面刮取脑细胞泥均匀涂成直径约 1 cm 的圆形涂抹面,或者参经常规方法将被检脑组织制成厚度在 $5\ \mu\text{m}\sim 8\ \mu\text{m}$ 的冰冻切片。

3.3.1.2 标本片于空气中自然干燥,在冷丙酮中固定 4 h 或过夜,然后在冷磷酸盐缓冲盐水中轻轻漂洗,取出后干燥,在标本区周围用记号笔划圈,立即染色检查,或密封于塑料袋中,置 -20℃暂时保存。

3.3.2 细胞培养物标本片制备

接种了被检病料的细胞培养物(如神经母细胞瘤细胞),继续在二氧化碳恒温箱中培养 48 h,随后用橡皮刮子刮取细胞泥在载玻片上制成薄而均匀涂片。当以盖玻片为载体生长的细胞培养物时,则可直接取此长满细胞单层的盖玻片作为标本片。然后按 3.3.1.2 风干、固定和保存。

3.4 染色

3.4.1 用吸管吸取稀释的狂犬病荧光抗体,滴加 1~2 滴于经丙酮固定的标本片上,使其布满整个标本区。

3.4.2 将标本片置于搪瓷盘内(盘底垫以浸湿的纱布,纱布上放玻片架),放 37℃恒温箱内着染

30 min。

3.4.3 取出玻片,用磷酸盐缓冲盐水轻轻冲去玻片上多余的染色液,再将玻片连续通过 3 缸(或杯)磷酸盐缓冲盐水,每缸浸泡 3 min,并不时轻轻振荡。最后在蒸馏水中浸泡 3 min。

3.4.4 在吸水纸上轻轻磕尽玻片上的蒸馏水,自然干燥后,于标本区上滴加 1 滴甘油缓冲液(分析纯中性甘油 9 份,pH7.4 磷酸盐缓冲盐水 11 份),覆盖玻片扣于载玻片上,然后镜检。

3.5 对照设置

3.5.1 已知狂犬病病毒标本片加狂犬病荧光抗体染色应有特异荧光出现。

3.5.2 已知狂犬病病毒标本加狂犬病未标记抗体阻抑后,再加狂犬病荧光抗体染色,应无特异荧光出现。

3.5.3 已知狂犬病病毒阴性标本片加狂犬病荧光抗体染色,应无特异荧光出现。

3.6 荧光显微镜检查及判定

一般用蓝紫光,激发滤光片用 BG₁₂,吸收滤光片用 OG₁ 或 GG₉,以满足异硫氰酸荧光黄的荧光谱要求为准。暗视野聚光器比明视野聚光器易于观察特异性荧光。物镜浸油须用无荧光镜油,也可以封片用的甘油缓冲液代替。先检查对照标本。只有在对照标本的染色结果符合 3.5.1~3.5.3 要求时才能去检查被检标本。特异性荧光呈亮绿至黄绿色,背景细胞染成淡黄或橙红色,细胞核成暗红色。狂犬病特异性荧光颗粒较大,数量不等,位于细胞浆内。凡在神经细胞胞浆内发现特异性荧光,均应判为狂犬病病毒感染。

4 小鼠和细胞培养物感染试验

4.1 材料准备

4.1.1 器材:细胞培养瓶(或管),二氧化碳恒温箱,微量超滤器(滤膜孔径 0.45 μm),微量组织研磨器,普通离心机及离心管,0.25 mL 注射器及针头等。

4.1.2 试剂:0.5%水解乳蛋白汉克氏(Hanks)液,伊格尔氏(Eagle)最低要素培养液(EMEM),犊牛血清,20 000 IU/mL 青霉素溶液,20 000 μg/mL 链霉素溶液等。

4.1.3 小鼠:无特定病原(SPF)易感小鼠,5~7 日龄(也可用 3~4 周龄者,但发病时间可能稍推迟)。

4.1.4 仓鼠肾传代细胞(BHK₂₁)或小鼠神经母细胞瘤(NAC1300)细胞。

4.2 样品的采取和运送

除可按照 2.2 的方法和要求送检新鲜脑组织外,还应采集唾液送检。方法是:用灭菌吸管吸取或用灭菌棉拭棒蘸取腮腺口附近的唾液,置入 1 mL~2 mL 内含 2%灭活豚鼠血清和抗生素的 Hanks 液中,低温保存备用。

4.3 样品的处理

脑组织用组织研磨器磨碎,加 0.5%水解乳蛋白 Hanks 液制成 20%(m/V)混悬液,以 3 000 r/min 离心 30 min,吸取上清液,加入青霉素 500 IU/mL 和链霉素 500 μg/mL,在 4℃处理 3 h~4 h,即可用于感染小鼠和细胞培养物的接种样品。唾液样品亦需经上述离心和杀菌处理。怀疑有污染的样品,可用 0.45 μm微孔滤膜过滤法处理。

4.4 感染方法

4.4.1 小鼠感染法

每份样品用小鼠 4~6 只。左手固定小鼠,在耳与眼之间用碘酒消毒。右手持吸取接种样品的 0.25 mL注射器在消毒部位刺入硬脑膜下,每只小鼠注射 0.03 mL。对照小鼠 2 只,按同法同剂量注射稀释液(即 0.3%水解乳蛋白 Hanks 液)。每天早晚各观察 1 次,记录是否有发病小鼠。至少观察 28 d。

4.4.2 细胞培养物感染法

每份样品接种 4~6 管细胞培养物。取接近长成单层的细胞培养物用 Hanks 液轻洗 3 次,每管接种样品 0.1 mL~0.2 mL,在 37℃恒温箱内吸附 1 h,用 Hanks 液洗 1 次(亦可可不洗)加入含有 1%~2%犊

牛血清的 EMEM 液(添加量随细胞瓶大小而定),放二氧化碳恒温箱(37℃)内继续培养。同时设细胞对照 2 管,以 0.5% 水解乳蛋白 Hanks 液替代样品上清液。每天观察 1 次,记录是否有致细胞病变作用(CPE)出现。至少观察 15 d。

4.5 感染性鉴定

4.5.1 小鼠感染性鉴定

若对照小鼠健活,而样品接种小鼠在接种后 4 d~7 d 开始发病,呈现痉挛、麻痹等神经症状并死亡,可确诊为狂犬病感染者。如果症状不典型,可扑杀取脑,采用内基氏小体检查或免疫荧光试验鉴定之。如果 7 d 后不发病,可将其中 2 只小鼠放血致死,取脑作成 10%(m/V)混悬液,接种健鼠盲目传代;第 2 代在 7 d 左右还不发病时,再盲传 1 代;至第 3 代经 4 周观察仍不发病时,可报告狂犬病小鼠感染试验阴性。对观察期间死亡的小鼠,应进行内基氏小体检查或免疫荧光检查以鉴别之。

4.5.2 细胞培养物感染性鉴定

若对照细胞培养物正常,而样品接种的细胞培养物不论是否出现细胞病变,但经免疫荧光试验证实有特异性荧光时,可确诊为狂犬病感染者。为缩短检验时间,可在接种后 48 h 抽取 1~2 管细胞培养物进行免疫荧光试验。对既无细胞病变又无特异性荧光反应者,应再盲传 2 次。第 3 代经 15 d 观察仍无细胞病变和特异性荧光时,可报告狂犬病细胞培养物感染试验阴性。

附 录 A
(标准的附录)
染色液的配制

A1 塞勒(Seller)氏染色液

母液Ⅰ:美蓝饱和溶液		
碱性美蓝	2.0 g	
无水甲醇(分析纯)	100.0 mL	
母液Ⅱ:复红饱和溶液		
碱性复红	40.0 g	
无水甲醇(分析纯)	100.0 mL	

母液Ⅲ:无水甲醇(分析纯)

使用液:取母液Ⅰ 15 mL 与母液Ⅲ 25 mL 混合,再加入母液Ⅱ 2 mL~4 mL,充分混合,装入褐色瓶中,塞紧瓶塞保存备用。此染色液配制时间越久,染色效果越好。

A2 曼(Mann)氏染色液

1.0 g/100 mL 甲基蓝水溶液	35mL
1.0 g/100 mL 伊红水溶液	35mL
加蒸馏水至	100 mL。
配制时,在甲基蓝水溶液和伊红水溶液分别过滤后,各取 35 mL,再加蒸馏水补足 100 mL。	

A3 碱性乙醇溶液

取无水乙醇 30 mL,加 1.0 g/100 mL 氢氧化钠溶液 5 滴(约 0.3 mL~0.4 mL)即成。

A4 微酸性水溶液

取蒸馏水 30 mL,加纯冰乙酸溶液 4~5 滴(约 0.3 mL)即成。

附 录 B
(提示的附录)
人 身 防 护

- B1 从事狂犬病可疑动物解剖和检疫检验的人员,应穿戴工作服、手套、口罩和防护眼镜,防止感染性病料或气溶胶进入粘膜和伤口。工作期间不准吸烟、喝水、吃东西。工作结束时,要洗手洗脸和消毒。
- B2 被狂犬病可疑动物咬伤者,应立即用大量 20%肥皂水、0.1%新洁尔灭溶液或清水充分冲洗,再用 75%酒精或 2%~3%碘酒消毒,彻底清理伤口,注射狂犬病疫苗。必要时,应同时注射狂犬病免疫血清(或精制免疫球蛋白)。
- B3 尸体剖检工作应在病理解剖室内或其他安全地点进行。采完病料之后,应将尸体连同污物一起焚毁或深埋,不得留作它用。污染的场地、器械和工作服等应彻底消毒。
- B4 作活检的狂犬病可疑动物,在确诊为非狂犬病感染动物之前,应将之严格隔离,防止侵袭其他人畜。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
狂犬病诊断技术

GB/T 18639—2002

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

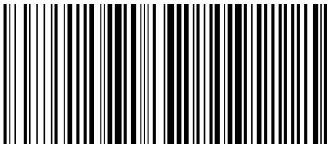
*

开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 12 千字
2002 年 6 月第一版 2002 年 6 月第一次印刷
印数 1—1 000

*

书号: 155066 • 1-18492 定价 10.00 元
网址 www.bzcbbs.com

版权专有 侵权必究
举报电话: (010)68533533



GB/T 18639-2002