ICS 11.220
B 41

中华人民共和国国家标准

GB/T 34740—2017

动物狂犬病直接免疫荧光诊断方法

Diagnostic methods for animal rabies diagnosis with direct immunofluorescence assay

2017-11-01 发布　　2018-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会　发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参考世界动物卫生组织(OIE)2013 年版《陆生动物卫生手册》2.1.13 狂犬病的相关内容。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所。

本标准起草人:扈荣良、张守峰、刘晔、张菲、连海。

动物狂犬病直接免疫荧光诊断方法

1 范围

本标准规定了动物狂犬病直接免疫荧光诊断方法的材料和试剂、器械和设备、防护措施、动物脑组织样品采集、运输和保存、实验操作及镜检观察与结果判定。

本标准适用于动物狂犬病的病原学诊断。

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/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DFA：直接免疫荧光检测(Direct Immunofluorescence Assay)

FITC：异硫氰酸荧光素(Fluorescein Isothiocyanate)

PBS：磷酸盐缓冲溶液(Phosphate-Buffered Saline)

4 材料和试剂

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.1 水，GB/T 6682—2008，二级水。

4.2 狂犬病阳性对照脑组织(见 A.1)。

4.3 狂犬病阴性对照脑组织(见 A.2)。

4.4 FITC 标记的抗狂犬病病毒抗体(商品化的荧光抗体)，应由抗狂犬病病毒核蛋白的单克隆抗体或多克隆抗体制备而成，用 PBS(0.01 mol/L，pH 7.4，见 B.1)稀释成工作液，现用现配。

4.5 1%伊文思蓝溶液(见 B.2)。

4.6 固定液(80%丙酮溶液，见 B.3)。

警示——丙酮易燃，有害健康！

4.7 PBS(0.01 mol/L，pH 7.4，见 B.1)。

4.8 80%碱性缓冲甘油溶液(见 B.4)。

5 器材和设备

5.1 剖检采样及防护器材

手术刀、剪刀、钳、镊、乳胶手套、护目镜。

5.2 样品保存及冷冻设备

无菌螺口带盖离心管、—20 ℃以下冰箱。

5.3 样品消毒设备

高压灭菌器。

5.4 检测设备和器材

倒置荧光显微镜、37 ℃加湿培养箱、移液器及吸头、载玻片、盖玻片、染色缸、湿盒、吸水纸。

6 防护措施

样品采集人员应采取相应的个人防护措施及实验操作过程中污染物品的处理(见附录 C)。

7 动物脑组织样品的采集、运输和保存

7.1 采集

7.1.1 采集部位

用于检测的脑组织应包含脑干、小脑和海马角。

7.1.2 小动物脑组织的采集

鼠、兔等小动物可打开颅腔,采集全部脑组织。

7.1.3 中、大动物脑组织的采集

犬等中、大动物通常可通过枕骨大孔采样法,采集部分脑组织用于本检测:用一直径 5 mm 饮料吸管或一个 2 mL 一次性塑料移液管,朝一侧眼睛方向插入枕骨大孔,抵最深处后捏紧或堵住外口,小心抽出,管内脑组织即包含延髓、小脑基底部、海马角、大脑髓质和皮质等部位。

7.2 运输

样品装入无菌螺口带盖离心管,密封包装后,4 ℃以下冷藏或冷冻运输。样品运输应使用双层密封包装。在无法保证冷藏运输时,可将脑组织保存在含 50%甘油的 PBS(见 B.1)中,但仍应尽可能低温运输。

7.3 保存

在无菌螺口带盖离心管内,于—20 ℃以下保存。

8 实验操作

8.1 脑组织触片制备

在Ⅱ级生物安全柜中取小脑、脑干、海马角、大脑髓质和皮质等部位各米粒大小的待检组织,每个部位分别在同一载玻片不同位置上轻触,形成明显的印记,倒放在吸水纸上轻压吸去多余液体。同时制备已知阴、阳性脑组织触片。将触片在生物安全柜内室温干燥 10 min。

8.2 触片固定

警示——丙酮易燃，有害健康！

干燥后的触片置于载玻片架上，浸入冷的80%丙酮（见B.3）内固定30 min。室温自然干燥10 min。

8.3 荧光抗体染色、浸洗及封片

8.3.1 以PBS（0.01 mol/L，pH 7.4，见B.1）稀释荧光抗体至工作浓度，加终浓度0.002%的伊文思蓝（见B.2），混匀后吸取约200 μL滴加于组织触片表面。

8.3.2 将载玻片放入湿盒，在37 ℃温箱内温育1 h。

8.3.3 弃去载玻片上的染色液，于PBS浸洗2次，每次3 min。

8.3.4 以吸水纸小心吸去玻片边缘多余液体，样品表面滴加1滴（约30 μL）80%碱性缓冲甘油溶液（见B.4），加盖玻片，于1 h内在暗室中荧光显微镜下观察。

9 镜检观察与结果判定

9.1 镜检操作

荧光显微镜下判定检测结果。应使用200倍放大倍数观察。在对样品观察结果作出阴性结论前，每张触片应至少读取40个不同的视野。

9.2 染色强度及病毒抗原分布判定

9.2.1 荧光显微镜下的特异性荧光为大小不等的亮绿色尘埃样颗粒或稍大的团块，有时沿神经纤维走行，呈条索状分布。阳性样品应呈明亮的苹果绿色，组织炎性分泌物或腐败产物可导致荧光强度减弱。

9.2.2 脑组织样品中的病毒抗原分布对应的染色强度分为4个等级，分别记为＋、＋＋、＋＋＋、＋＋＋＋，无特异性荧光颗粒时记为“－”。

9.2.3 ＋＋＋＋：样品的每个视野内几乎都有大量的不同大小和形状的特异性荧光颗粒。

9.2.4 ＋＋＋：样品的绝大多数视野内都有不同大小和形状的特异性荧光颗粒，数量不等。

9.2.5 ＋＋：10%～50%的视野内可见形状、大小不等的特异性荧光颗粒，且荧光颗粒数量较少。

9.2.6 ＋：＜10%的视野内可见形状、大小不等的特异性荧光颗粒，且荧光颗粒稀少。

9.2.7 －：各视野均无特异性荧光颗粒出现。

9.3 结果判定

9.3.1 阳性对照触片的抗原分布应判定为＋＋＋～＋＋＋＋，阴性触片应判定为－，作为对照成立的标准。

9.3.2 在对照成立的基础上，对待检样品进行判定。待检样品着染强度为明亮或明显的苹果绿色，抗原染色判定为＋＋～＋＋＋＋时判定为狂犬病感染阳性；＋判定为狂犬病感染可疑；无特异性荧光染色的样品判定为阴性。

9.3.3 可疑阳性样品应取多部位脑组织样品复检，复检仍为可疑的，判为阳性。

附 录 A
（规范性附录）
狂犬病阳性和阴性犬脑组织制备

A.1 狂犬病阳性对照脑组织

狂犬病阳性对照脑组织制备时首先取10%的狂犬病病毒SRV9株小鼠脑毒匀浆，0.03 mL/只脑内接种10日龄以下乳鼠，正常饲养。小鼠于第6天至第8天发病，濒死时以脱颈方式处死乳鼠，生物安全柜内无菌采集脑组织。以直接免疫荧光法进行脑组织狂犬病病毒抗原的检测。80%以上视野内存在亮绿色特异性荧光灶者可用作阳性对照组织。阳性对照脑组织置1.5 mL螺口离心管内，−20 ℃冰柜内保存，保存期24个月。

A.2 狂犬病阴性对照脑组织

狂犬病阴性对照脑组织制备时首先取普通家犬，在正常喂饲条件下笼养21 d，如无异常表现，肌肉注射0.1 mL/kg的0.5%戊巴比妥钠溶液0.4 mL/kg，待完全麻醉后，通过静脉注射气栓实施安乐死。剖检采取脑组织，无菌条件下切成约0.5 cm^3 大小，置1.5 mL螺口离心管内。随机取总份数的5%，以直接免疫荧光法进行脑组织狂犬病病毒抗原的检测。镜下所有视野内均不应有特异性荧光灶。阴性对照脑组织于−20 ℃冰柜内保存，保存期24个月。

附 录 B
（规范性附录）
试剂及其配制

B.1 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液（PBS）

称取氯化钠 85.00 g，磷酸氢二钠 15.49 g，磷酸二氢钠 2.03 g，加蒸馏水溶解，定容至 10 L。

B.2 1%伊文思蓝溶液

称取伊文思蓝 1 g，加蒸馏水溶解，定容至 100 mL。

B.3 固定液（80%丙酮溶液）

警示——丙酮易燃，有害健康！
量取丙酮 80 mL，加水（GB/T 6682—2008，二级）定容至 100 mL。

B.4 80%碱性缓冲甘油溶液

B.4.1 碳酸盐缓冲液的配制：称取碳酸钠 4.3 g，碳酸氢钠 8.6 g，加水（GB/T 6682—2008，二级），溶解定容至 500 mL。

B.4.2 80%碱性缓冲甘油溶液配制：量取甘油 80 mL，加入碳酸盐缓冲液（B.4.1）20 mL，混匀。

附 录 C
（规范性附录）
狂犬病诊断检测操作的个人防护措施及实验操作过程中污染物品的处理

C.1 进行狂犬病诊断检测的操作者应进行狂犬病暴露前免疫，每年进行 2 次血清狂犬病病毒中和抗体检测，中和抗体效价应不低于 1.0 IU/mL。

C.2 检测操作时应佩戴口罩、双层手套，着长袖工作服。采样时应在此基础上加戴护目镜。

C.3 应避免锐物刺伤和割伤。发生外伤后，应立即停止实验，以肥皂水冲洗伤口不少于 15 min，并加强免疫狂犬病疫苗 1 剂。

C.4 实验过程中接触被检病料的器械及一次性耗材应于 120 ℃湿热高压灭菌 20 min 后按常规清洗或废弃。