

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3h内(越早越好)由大脑海马回(Ammon氏角)、小脑皮质和延髓各切取1cm³组织数块,放入灭菌玻璃瓶,再置于冰瓶内于24h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2min。

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5s~10s,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5min,切片浸染时间因温度而异(室温下24h,或38℃温箱中12h,或60℃温箱中2h)。

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。