

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口冻兔肉中“兔出血症”病毒检测样品的采集、检测方法和结果判断等。

本标准适用于出口冻兔肉中“兔出血症”病毒的检测。

2 术语

“兔出血症”

又称兔病毒性出血症，是兔的一种急性病毒性传染病，该病潜伏期短，发病快，死亡率高，流行范围广，是由一种新的病毒引起的传染病，该病毒的形态呈二十面体对称的球形，直径34nm，没有囊膜，对人红细胞有凝集作用，尤其对人“O”型红细胞较为敏感，但不能凝集牛、水牛、马属动物、犬、鸭、鹌鹑和小白鼠的红细胞。

3 样品采集

- 3.1 冻带骨肉：每只被采集样品的兔体取胫骨二支，装入干净的塑料袋内。
- 3.2 去骨兔肉：剪取同一兔体的肌肉20g，装入干净的塑料袋内，每件样品必须标记清楚(编号、名称、生产日期、采样时间、生产单位)。标签纸要防水，字迹不易褪色。样品采集后分别将每个样品袋封口，装入消毒容器内(可用铝饭盒)冷冻保存。采样工具必须经酒精火焰消毒后方能重复使用。
- 3.3 样品保存
- 样品应保持冷冻状态(可在冰内、冰箱的冰盒内、低温冰箱或冷库内保存)。阳性样品，发出报告后7d方能处理检样。

4 器材与试剂

- 4.1 器材
- 分析天平(百分之一)；
- 普通离心机；
- 168—TGL微型高速离心机；
- 均质器；
- 玻璃研磨器；
- 微型振荡器；
- 煮沸消毒器；
- 冰箱；
- 培养箱；
- 高压消毒器；
- 反应板清洗器；
- 微量移液器；
- 滴头(大，小若干)；
- 拳握式持针器；
- 血凝反应板；
- 酶标反应板；
- 酶标测定仪。
- 4.2 试剂
- 羧酸(A.R)；
- 磷酸氢二钾(A.R)；
- 磷酸二氢钠(A.R)；
- 柠檬酸(A.R)；
- 邻苯二胺；
- 30%双氧水；
- 硫酸(A.R)；
- 硫酸铵(A.R)；
- 辣根过氧化物酶；
- 过碘酸钠；
- 叠氮钠；
- 乙二醇；
- 聚乙二醇—6 000(PEG—6 000)；
- 三氯甲烷(A.R)；
- 氯化钠(A.R)；
- 氯化钾(A.R)；
- 吐温—80；
- 牛血清白蛋白；
- 硼氢化钠(A.R)；
- 乙酸钠(A.R)；
- 乙酸(A.R)；
- 磷酸氢二钠(A.R)。

4.2.1 HA、HI试验

- 4.2.1.1 PB(磷酸盐缓冲液)：由0.15mol/L的A、B两液配成。
- A液：磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)53.79g加蒸馏水至1 000mL。
- B液：磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)23.4g加蒸馏水至1 000mL。
- 几种常用PB不同pH的配合比例：
- | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| pH | 6.0 | 6.2 | 6.4 | 6.6 | 7.2 | 7.4 | 7.8 | 8.0 |
| A液 | 13 | 19 | 27 | 38 | 73 | 82 | 92 | 95mL |
| B液 | 87 | 81 | 73 | 62 | 27 | 18 | 8 | 5mL |

4.2.1.2 PBS(磷酸盐缓冲液)：其中PB为0.01mol/L，由4.2.1.1的PB稀释15倍而成。

S即为氯化钠，生理盐水浓度。

4.2.1.3 生理盐水

氯化钠8.9g加蒸馏水至1 000mL。

4.2.1.4 1%人红细胞悬液

新鲜人红细胞(O型)用20倍量生理盐水洗涤三次，最后以2 000r/min离心15 min，吸取压积细胞用生理盐水配成1%悬液。

4.2.2 ELISA试验

4.2.2.1 洗涤液(PBST pH7.4磷酸盐缓冲液+0.5%吐温20)：

- 氯化钠 8.0g
- 磷酸氢二钾 0.2g
- 磷酸氢二钠 2.9g
- 氯化钾 0.2g
- 吐温—20 0.5 mL
- 加蒸馏水溶解至1 000mL
- 4.2.2.2 稀释液(保温液)：于PBST内加入BSA(小牛血清白蛋白)使其浓度为0.1%。
- 4.2.2.3 底物液，
- 0.2mol/L磷酸氢二钠(28.4g/L) 25.7mL
- 0.1mol/L柠檬酸(19.2g/L) 24.3mL
- 蒸馏水 50.0mL
- 临用前，取上述缓冲液50mL，溶解20mg邻苯二胺，再加30%双氧水0.075mL，避光保存。

4.2.2.4 终止液：

2mol/L硫酸。

4.2.2.5 制备与纯化IgG：

取琼扩效价1：64的RHDV阳性血清用50%的硫酸铵盐析后，再经DE52或SephadexG—200层析后可以得到较纯化的RHDV IgG。

4.2.2.6 酶标抗体的制备：

取5mg辣根过氧化物酶溶于0.5mL蒸馏水中，加入新鲜配制的0.06mol/L的过碘酸钠水溶液0.5mL，混匀置冰箱30min。取出加入乙二醇水溶液0.5mL，于室温放置30min后加入含有5mg纯化抗体的水溶液1mL，混匀并装入透析袋内，以0.05mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液慢慢搅拌透析6h(或过夜)，使之结合。然后吸出加硼氢化钠溶液(5mg/mL)0.2mL，置冰箱2h。

将上述混合液加入等体积饱和硫酸铵溶液，冰箱放置30min后离心，将所得沉淀物溶于pH7.4PBS中透析过夜，次日再离心除去不溶物即得酶—抗体结合物。用0.02mol/L pH7.4PBS加置5mL，加入33.3%的甘油4℃保存备用。

4.2.2.7 兔出血症毒源性血清(RHDV阳性血清)制备：取健康兔，肌肉注射本病疫苗1mL。然后分别在第15d，30d时注射强毒1mL，最后一次注射后10天试血，当HI效价达到1：128时采血清即得。

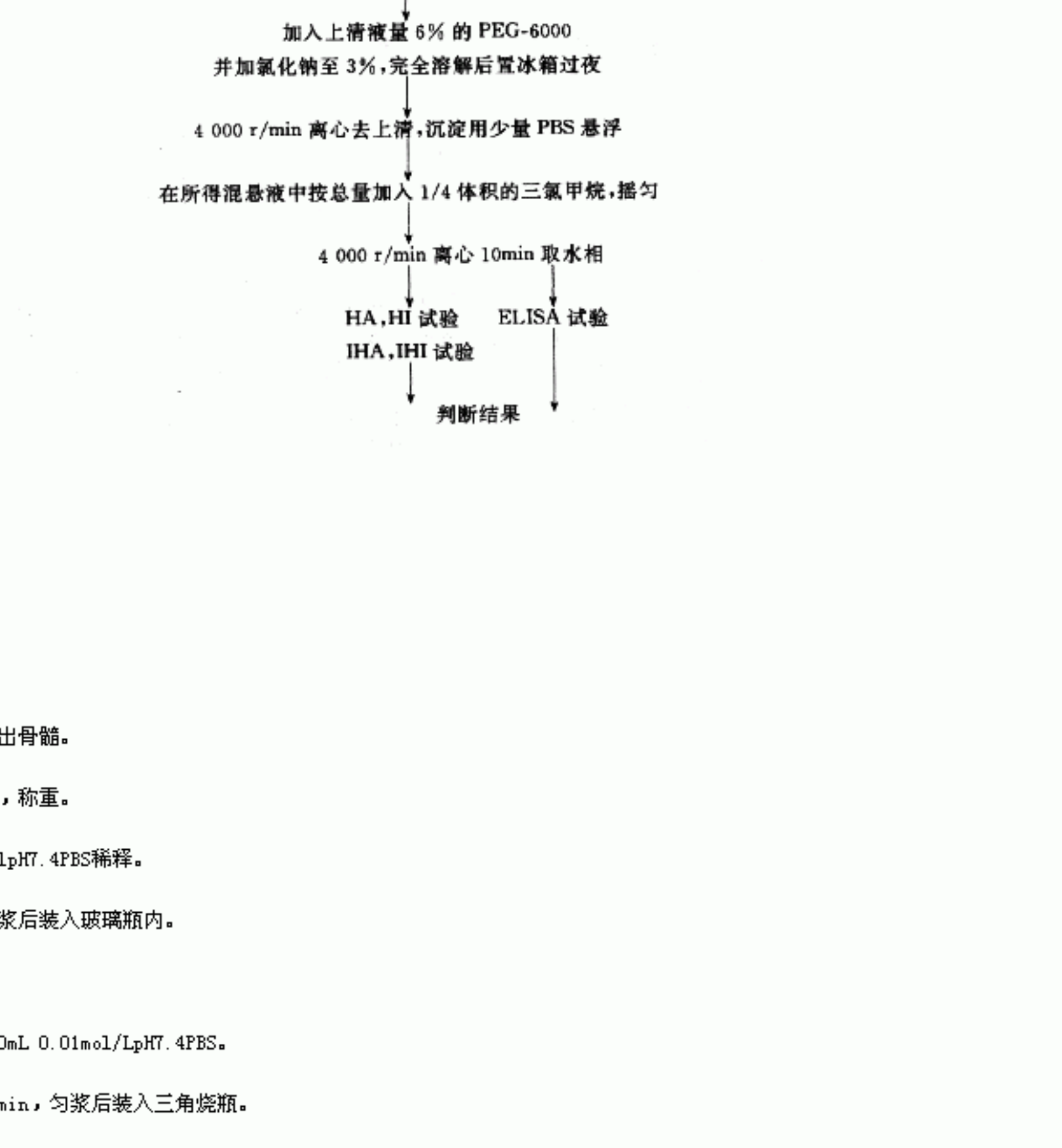
4.2.3 IHA、IHI试验

- 4.2.3.1 1%羧酸溶液。
- 4.2.3.2 乙酸缓冲液(pH4.3)：由0.1mol/L之乙酸钠、乙酸溶液按比例配制。
- 4.2.3.3 稀释液
- 在0.11 mol/LpH7.2的磷酸缓冲液中加入0.4%牛血清白蛋白，0.2%聚乙二醇—6 000，1%糊精。

4.2.4 双醛化绵羊红细胞的致敏

- 以1mL双醛化绵羊红细胞的致敏为例：
- 1 mL双醛化绵羊红细胞—离心，去上清—用pH7.4，0.01 mol/LPBS洗一次—离心，去上清—加入4.9 mL生理盐水，0.1 mL 1%羧酸，37℃水浴10 min—离心，去上清—加入pH4.3乙酸缓冲液5mL，提纯抗体0.05 mL，37℃水浴30 min—离心，去上清—生理盐水5 mL洗三次—用pH7.2，0.11 mol/LPBS配制或1%血球悬液备用。

5 检验程序



6 操作步骤

- 6.1 试样的制备
- 6.1.1 匀浆
- 6.1.1.1 骨髓试样
- 6.1.1.1.1 以持针器夹碎胫骨取出骨髓。
- 6.1.1.1.2 装入小型塑料离心管，称重。
- 6.1.1.1.3 用5倍量的0.01 mol/LpH7.4PBS稀释。
- 6.1.1.1.4 由玻璃研磨器研磨匀浆后装入玻璃瓶内。
- 6.1.1.2 肌肉试样
- 6.1.1.2.1 称重10g肌肉，加入50mL 0.01mol/LpH7.4PBS。
- 6.1.1.2.2 高速匀浆机匀浆1~3min，匀浆后装入三角烧瓶。
- 6.1.2 冻融
- 匀浆后试样置低温冰箱内反复冻融三次后，3 500r/min离心取上清。
- 6.1.3 浓缩
- 在所得上清液中，加入上清液量百分之六的聚乙二醇—6 000，并加氯化钠至百分之三，置4℃冰箱过夜。
- 6.1.4 悬浮
- 浓缩过的样品液3 500~4 000r/min离心10min去上清，沉淀物以少量0.01 mol/LpH7.4PBS悬浮，成混悬液(肌肉样用1 mL，骨髓样用0.3mL)。
- 6.1.5 去杂
- 在所得混悬液中加入1/4体积的三氯甲烷，摇匀，3 500~4 000r/min离心取水相，置冰箱冻结保存备用。
- 6.2 HA、HI试验
- 6.2.1 微量血凝试验(OA试验)
- 6.2.1.1 在96V型微量血凝反应板上，从第一孔至第十一孔，每孔加入0.01mol/LpH8.4PBS一滴(0.025mL)，然后在第一孔加入待检样品的浓缩液一滴，第十二孔加入阴性材料一滴，从第一孔开始用移液器，作等量稀释至第十孔，最后一滴弃去。
- 6.2.1.2 每孔再加PBS一滴，第十一孔是PBS对照，第十二孔是阴性材料(可用1：10正常兔肝悬液对照)。
- 6.2.1.3 每孔各加入1%人“O”型红细胞一滴，立即在微型混合器上摇匀，置温室。待对照孔血细胞完全沉淀后观察结果。
- 6.2.1.4 结果判定和血凝效价表示方法：
- 血凝程度以#、+++、++、+、-表示。#红细胞均匀铺于孔底，+++基本同上，但边缘不整齐，有下垂趋向，++红细胞于孔底形成一个环状，四周有小凝结块，+红细胞于管底形成一个小团，但边缘不光滑，四周有凝结块，-红细胞于孔底形成小团，边缘整齐，光滑。结果以#为凝结终点。
- 6.2.2 微量血凝抑制试验(OHI试验)
- 6.2.2.1 在96V型微量血凝反应板上，待检样品浓缩液稀释方法同上。一个样品作相同的二排。
- 6.2.2.2 第一排每孔加PBS一滴，第二排每孔加阳性血清一滴摇匀，37℃温箱放置10 min。
- 6.2.2.3 各孔加入1%人“O”型红细胞一滴，立即在微型混匀器上摇匀，置温室。待对照孔红细胞完全沉淀后观察结果。
- 6.2.2.4 结果判定：
- 血凝效价表示方法同6.2.1.4。

血效试验和血凝抑制试验两排孔的血凝效价相差二个滴度以上者则为阳性。

6.3 IHA及IHI 试验(反相间接血凝试验和反相间接血抑试验)

- 6.3.1 IHA试验
- 6.3.1.1 反应在96V型微量血凝反应板上进行。根据被检材料的份数，按每份材料一排孔安排，在反应板上依顺序编号。
- 6.3.1.2 于计划各排的每孔中加pH7.20.01mol/L PB 稀释液0.025mL。
- 6.3.1.3 取被检材料一滴，对号加入该排第一孔，逐孔向后作倍比稀释至倒数第二孔为止，最后一孔为稀释液对照。
- 6.3.1.4 每板设已知阳性、阴性搞原对照各一排。
- 6.3.1.5 每孔加致每血球一滴，移反应板于混匀器上中速摇至至红细胞分散均匀(约1min)，然后将反应板置37℃温箱，经80~90 min 后观察结果。
- 6.3.1.6 结果判定
- #：红细胞均匀铺于孔底。
- +++：孔内凝结团大于孔面积50%，未遍及全孔者。
- ++：红细胞少许沉积孔底，周围有湿蚀带约占孔面积50%。
- ＋：红细胞大部分沉积孔底，沉淀边缘模糊者。
- ：红细胞于孔底形成小团，边缘整齐，光滑。
- 结果以#为凝结终点。
- 6.3.2 IHI试验
- 每份样品按两排孔安排，操作同前，唯IHI排每孔加1：50的阳性血一滴，而IHA排每孔稀释液一滴振荡均匀后，将反应板置37℃温箱中经80~90min 判定结果。IHI与IHA试验两排孔的血凝价相差二个滴度以上者为阳性。

6.4 ELISA 试验

- 6.4.1 将提纯抗体用稀释液作1：640稀释后加入酶标反应板，每孔0.1包被后置反应板于4℃冰箱过夜。
- 6.4.2 取出包被的反应板用洗涤液洗三次，每次3min(每次加洗涤液后，静置3min再倾去)，将板甩干净。
- 6.4.3 用稀释液将待检浓缩液作1：2和1：4稀释，每个检样的两种稀释液分别各加入二个孔，每孔0.1mL，每块板同时加阳性，阴性样品各二孔，作对照用，每块板同时加二孔稀释液留作空白对照，置37℃温箱120min。
- 6.4.4 取出反应板用洗涤液洗 三次，每次3min，将板甩干拍净。
- 6.4.5 各孔加酶标抗体0.1mL(用稀释液作1：40稀释)，置37℃温箱90min。
- 6.4.6 取出反应板用洗涤液洗三次，每次3min，将甩干拍净。
- 6.4.7 每孔加底物液0.1mL，置37℃温箱15min，要求避光。
- 6.4.8 取出反应板，每孔加2mol/L硫酸0.05mL终止反应。
- 6.4.9 测定光密度值或肉眼观察。
- 6.4.10 结果判定：
- 6.4.10.1 凡是待检样品孔的颜色比阴性孔深者为阳性，否则为阴性。
- 6.4.10.2 以酶标测定仪测定OD值，若待检样品OD值与已知阳性样OD值之比(P/N)≥2时，判定为阳性，否则为阴性。

7 报告结果

报告阳性结果：HA、HI试验，IHA、IHI试验及ELISA试验。三者任选一种检测方法进行检测，凡出现阳性者均可报告阳性结果。

附加说明：

- 本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。
- 本标准由中华人民共和国江苏进出口商品检验局负责起草。
- 本标准主要起草人潘钦荣。