

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1466—2007

动物棘球蚴病诊断技术

Diagnostic techniques for animal echinococcosis

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C，均为规范性附录。

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：中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人：贾万忠、田广孚、才学鹏。

动物棘球蚴病诊断技术

1 范围

本标准规定了用于绵羊和牛棘球蚴病间接血球凝集试验(IHA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)两诊断方法的要求。

本标准用于检测血清抗体,适用于绵羊和牛棘球蚴病大批量样品的普查,包括棘球蚴病的流行病学调查、动物生前诊断和检疫。

2 间接血球凝集试验(IHA)

2.1 材料

2.1.1 待检样品的采集和处理

采集动物血清作为检测材料。加 NaN_3 (终浓度 0.01%)或硫柳汞(终浓度 0.01%)防腐。4℃冷藏保存。

2.1.2 囊液采集与处理

以无菌方法从直径在 3 cm 以上含有棘球蚴育囊的包囊中抽取囊液,采集多个包囊的囊液混合后使用。囊液应清亮,呈无色或淡黄色。4℃,3 000 r/min 离心 20 min;取上清液,4℃用 40%的聚乙二醇(分子相对质量 8 000~20 000)浓缩 10 倍;再用无离子水和生理盐水交替透析 48 h 充分除盐;4℃,3 000 r/min 离心 20 min;取上清液,用紫外吸收法测定蛋白含量,调整浓度为 5 mg/mL;加 NaN_3 (终浓度为 0.01%),分装后-20℃保存备用。

2.1.3 阳性参考血清制备

用棘球蚴囊液抗原免疫羊和牛制备,血清抗体的 IHA 效价为 1:1 024~1:4 096。

2.1.4 阴性参考血清制备

健康羊、牛血清,抗体 IHA 效价在 1:16 以下。

2.1.5 IHA 诊断液制备

制备方法见附录 A。

2.1.6 微量反应板

72 孔(12×6)或 96 孔(12×8)V 型。

2.2 操作方法

2.2.1 试验设置

将血凝板的一行或两行作为对照孔,其余各行为加样孔。

2.2.2 稀释血清和加样

用 pH 7.2、0.15 mol/L PBS 稀释液将待检样品按 4 倍系列稀释为 1:4、1:16、1:64 和 1:256 四个滴度,每个滴度在加样孔各加 1 孔。阳性参考血清按 4 倍系列稀释为 1:4、1:16、1:64、1:256、1:1 024、1:4 096 和 1:16 384 共 7 个孔,加至对照孔;阴性参考血清稀释同待检血清,加至对照孔。稀释液对照孔只将稀释液加 1 孔至对照孔。每孔加样量均为 25 μL 。

2.2.3 加诊断液

各孔加 IHA 诊断液,加样量每孔 25 μL 。

2.2.4 血凝反应

试验微量板置振荡器上振荡 1 min~2 min,使诊断液中的血球分布均匀,从振荡器上取下,用干净

的玻璃板盖住反应板,放室温(18℃~25℃)反应 2 h~3 h。

2.3 结果判定

2.3.1 试验成立条件

当稀释液对照不出现凝集,阴性参考血清不高于 1:16 和阳性参考血清抗体效价为产品规定值(1:1024~1:4096)三项条件同时满足时,试验成立。

2.3.2 判定

“++++”100%的血球在孔壁下形成呈均质膜样凝集。边缘整齐,致密。

“+++”75%的血球在孔壁下形成呈膜样凝集,不凝集的血球在孔底中央集中成很小的圆点。

“++”50%的血球在孔壁更下部形成呈稀疏凝集,不凝集的血球在孔底中央集成较大圆点。

“+”25%的血球在孔底凝集,不凝集的血球在孔底中央集中成大圆点。

“-”所有血球均不凝集,并集中于孔底中央成最大的圆点。

2.3.3 阳性判定标准

使用 V 型板,以“++”为阳性终点。待检样品抗体滴度等于或高于阳性规定值(1:64)时,判定为阳性;待检样品抗体滴度低于 1:64 即第三孔(1:64 稀释)为“+”或“-”者,判定为阴性。

3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

3.1 材料

3.1.1 动物血清样品的采集和处理

同 2.1.1。

3.1.2 抗原

为醋酸盐纯化抗原。

3.1.3 阳性参考血清

同 2.1.3。

3.1.4 阴性参考血清

同 2.1.4。

3.1.5 试验溶液

详见附录 B。

3.1.6 抗免疫球蛋白—酶结合物

可从生化试剂公司购买,也可自行制备(详细方法见附录 C)。

3.1.7 微量反应板

40 孔或 96 孔聚苯乙烯微量酶标板。

3.2 操作方法

3.2.1 抗原包被

用包被缓冲液将抗原稀释至工作浓度(1 μg/mL~10 μg/mL),每孔加 100 μL。空白对照孔加 100 μL 包被缓冲液(无抗原),4℃过夜。

3.2.2 洗涤

试验开始先洗涤包被的 ELISA 板,弃孔内包被液,拍干。用洗涤缓冲液洗 3 次,每次各孔加满洗涤缓冲液后停留 3 min,甩干。洗涤 3 次后,在吸水纸巾上拍干。

3.2.3 封闭

每孔加封闭缓冲液 100 μL,置 37℃封闭 1 h。弃孔内封闭液,洗涤 3 次,方法同上。

3.2.4 加待检血清

用洗涤缓冲液将待检样品和参考血清稀释至规定工作浓度(1:100)后各加2孔,酶结合物对照孔和空白对照孔加稀释缓冲液各1孔。加样量均为100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育1 h。弃孔内血清稀释液,洗涤3次,方法同上。

3.2.5 加抗免疫球蛋白—酶结合物

检测牛、羊动物血清样品,应使用相应动物种类的抗免疫球蛋白—酶结合物。用稀释缓冲液稀释至工作浓度(1:400~1:1000 或者按试剂盒产品说明),每孔加100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育1 h。洗涤3次,方法同上。

3.2.6 显色

加底物缓冲液,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育30 min。

3.2.7 终止反应

加50 μ L终止液,振荡混匀,静置5 min后,用酶标仪读取每孔492 nm 波长处的光吸收值(OD₄₉₂值)。

3.3 判定

3.3.1 计算

计算出每份待检样品两孔的平均 OD 值(P),再除以同板参考阴性血清两孔的平均 OD 值(N),则得出每份待检样品的 P/N 值。

3.3.2 结果判定

试验成立的条件:若酶结合物对照 OD 值小于 0.1,阳性参考血清 OD 值在 $1.0 \pm 2SD$ 范围,且 P/N 值大于 2,则试验成立,结果有效。

凡待检样品的 $P/N \geq 2$,则判定该样品为阳性; $P/N < 2$,则为阴性。

附录 A
(规范性附录)
IHA 诊断液制方法

A.1 红细胞的采集

无菌采集健康公绵羊血,与等体积 Alsever 氏液混匀,4℃冰箱内稳定 3 d~5 d 最好在 1 周内使用,不超过 2 周)。将全血经双层纱布过滤,3 000 r/min 离心 10 min(4℃),弃上清液。沉淀用灭菌 pH 7.2、0.15 mol/L PBS 离心洗涤 4 次(方法同前)后,仍用相同的 PBS 配成 5%红细胞悬液。

A.2 红细胞的醛化

取红细胞悬液,按 1:5 比例逐滴加入 2.5%戊二醛,用微型电动搅拌机缓慢搅拌,加完后继续在室温搅拌 1 h。4℃ 3 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀用 pH 7.2、0.15 mol/L PBS 离心洗涤 4 次。将红细胞积压后,用同样的 PBS 配成 5%的悬液。

A.3 红细胞的鞣化

量取一定量的 5%红细胞悬液,与等体积的鞣酸溶液混合,置 37℃恒温水浴箱温育 30 min,其间轻摇数次。4℃ 3 000 r/min 离心 5 min,沉淀用 pH 7.2、0.15 mol/L PBS 离心洗涤 4 次后,配成 2%悬液。

A.4 红细胞的致敏

量取一定量的悬液,加等体积的抗原溶液,混匀,37℃水浴 30 min,其间轻摇数次。3 000 r/min 离心 5 min,沉淀用 pH 7.2、0.15 mol/L PBS 离心洗涤 4 次。沉淀用 1%健康兔血清稀释为 1%的悬液,即为 IHA 诊断液。同时,在相同条件下制备一部分未经致敏的红细胞悬液作为非致敏对照血球。

A.5 保存

4℃可保存半年。或者制成冻干抗原:用冻干血球保存液制成 10%致敏红血球悬液,分装,冻干,4℃保存。

A.6 溶液配制

A.6.1 Alsever 氏液

NaCl	0.42 g
葡萄糖	2.05 g
柠檬酸	0.055 g
柠檬酸钠	0.8 g

加水至 1 000 mL,微加热溶解后过滤。在 1.034×10^5 Pa(15 lbf/in²)高压下灭菌 20 min,置 4℃保存,可用 1 周。

A.6.2 pH 7.2、0.15 mol/L PBS

NaCl	4.25 g
KH ₂ PO ₄	2.858 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	19.399 g

KCl 0.2 g

加水至 1 000 mL。在 1.034×10^5 Pa (15 lbf/in²) 高压下灭菌 20 min, 4℃ 保存备用。

A. 6. 3 鞣酸溶液

鞣酸必须为优质纯品, 用双蒸馏水配成 1/200 溶液, 置 4℃ 冰箱内保存, 1 周内使用。临用前, 用 pH 7.2、0.15 mol/L PBS 稀释为 1/20 000 溶液。

A. 6. 4 1% 健康兔血清

兔血清(56℃ 30 min 灭活) 1 mL

NaN₃ 10 mg

pH 7.2、0.15 mol/L PBS 99 mL

临用前配制。

A. 6. 5 冻干血球保存液

兔血清(56℃ 30 min 灭活) 10 mL

蔗糖 10 g

加 pH 7.2、0.15 mol/L PBS 至 100 mL, 临用前配制。

附 录 B
(规范性附录)
ELISA 溶液配制

B.1 抗原包被液(pH 9.6、0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液)

Na ₂ CO ₃	159 mg
NaHCO ₃	293 mg

加水至 100 mL, 4℃ 保存备用。

B.2 洗涤缓冲液(0.01 mol/L pH 7.4 PBS-0.05% Tween20, PBST)

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9 g
KCl	0.2 g
Tween-20	0.5 mL

加水至 1 000 mL, 置 4℃ 保存备用。

B.3 封闭缓冲液(0.2% Tween20 mol/L~0.01 mol/L, pH 7.4 PBST)

Tween-20	0.20 mL
----------	---------

加洗涤缓冲液 100 mL, 置 4℃ 保存备用。

B.4 抗免疫球蛋白—酶结合物稀释液

同 B.2 洗涤缓冲液。或者用 1% BSA-0.05% Tween 20-pH 7.4 0.01 mol/L PBST。在检测牛血清时, 抗免疫球蛋白—酶结合物稀释液只用洗涤缓冲液。

BSA(牛血清白蛋白)	1 g
加洗涤缓冲液	100 mL

置 4℃ 保存备用。

B.5 底物溶液**B.5.1 磷酸盐—柠檬酸缓冲液(pH 5.0)**

0.2 mol/L Na ₂ HPO ₄	25.7 mL
0.1 mol/L 柠檬酸	24.3 mL
H ₂ O	50 mL

临用前配制。

B.5.2 底物溶液

磷酸盐—柠檬酸缓冲液	100 mL
邻苯二胺	40 mg
30% H ₂ O ₂	0.15 mL

临用前配制。

B.6 终止液(2 mol/L H₂SO₄)

浓硫酸	11.1 mL
H ₂ O	88.9 mL

附录 C
(规范性附录)

抗免疫球蛋白-酶结合物的制备方法

C.1 抗免疫球蛋白(IgG)制备

C.1.1 健康动物血清的采集

方法同 IHA(见 2.1.4)。

C.1.2 IgG 的分离和纯化

先用硫酸铵盐析法初步提取 IgG,再用 DEAE-32 或 DEAE-22 纤维素进一步进行纯化。

C.1.3 抗 IgG 血清的制备:

选择健康雄性家兔,采用常量注射法进行免疫。取纯化的 IgG(20 mg/mL)溶液加等量弗氏完全佐剂,乳化后采取多点皮下和肌肉注射抗原,总量 0.5 mL~1 mL。3 周后,用同剂量弗氏不完全佐剂抗原再注射一次,方法同上。2 周后,用同剂量的抗原溶液免疫一次,方法同上。2 周后,用同剂量的抗原溶液免疫一次,静脉注射。末次注射后 1 周采血检验,抗体滴度达到要求后采集血液,分离血清。

C.1.4 抗 IgG 血清效价测定

采用双向琼脂扩散试验。琼脂浓度为 1%~1.5%,中心孔 IgG 蛋白浓度为 1 mg/mL~2 mg/mL。免疫兔血清作倍比稀释。将琼扩效价在 1:32 以上的血清混合,-20℃或-70℃处保存备用。

C.1.5 抗 IgG 的分离和纯化

方法同 C.1.2 IgG 的分离和纯化。

C.2 过碘酸钠法标记辣根过氧化物酶(HRP)与抗 IgG 复合物

C.2.1 称取 5 mg HRP(RZ>3.0)溶于新鲜配制的 pH 8.1、0.3 mol/L 碳酸氢钠 1.0 mL。

C.2.2 加 1% FDNB(氟二硝基苯)无水乙醇溶液 0.1 mL,室温轻轻搅拌 1 h。

C.2.3 加 0.06 mol/L NaIO₄ 1.0 mL,室温下轻轻搅拌 30 min,溶液呈现黄绿色。

C.2.4 加 0.16 mol/L 乙二醇 1.0 mL,室温轻轻搅拌 1 h。

C.2.5 在 4℃下,对 pH 9.5、0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液充分透析,将酶溶液体积调整至 3.0 mL。

C.2.6 将 5.0 mg 抗体溶于 pH 9.5、0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液 1.0 mL 中,然后加入酶溶液中,室温下轻轻搅拌 2 h。

C.2.7 加 5 mg 硼氢化钠,放置 4℃,过夜。

C.2.8 置 pH 7.2、0.01 mol/L PB-0.14 mol/L NaCl 溶液中透析,离心以除去可能形成的沉淀。

C.2.9 用 SephadexG-200 层析纯化。

C.2.10 加 BSA 至 1%,与等量中性甘油混合后分装,置-20℃保存。

C.3 改良过碘酸钠标记法

C.3.1 在 1 mL 双蒸水中溶解 HRP 4 mg,加入新鲜配制的 0.1 mol/L NaIO₄ 0.2 mL,室温下轻轻搅拌 20 min。

C.3.2 在 pH 4.4、1 mmol/L NaAC-HAC 缓冲液透析过夜(4℃),中间换液 1 次。

- C.3.3 加 pH 9.5、0.2 mol/L 碳酸盐缓冲液 20 μ L, 加入免疫球蛋白 1 mL (8 mg 溶于 pH 9.5、0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液 1 mL), 室温下搅拌 2 h。
- C.3.4 加 0.1 mL 新鲜配制的硼氢化钠溶液 (4 mg/L), 置于 4 $^{\circ}$ C, 过夜。
- C.3.5 加等量饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液, 4 $^{\circ}$ C 放 2 h 后, 3 000 r/min 离心 30 min, 沉淀用 5% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液洗涤 2 次后溶于 pH 7.2、0.02 mol/L PBS 中。
- C.3.6 经 Sephadex G-25 层析柱脱去 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。
- C.3.7 加 BSA 至 1%, 与等量中性甘油混合后分装, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

C.4 酶标记抗体的定量与克分子比值测定

将酶标记抗体分别于 403 nm 和 280 nm 波长处测 OD 值 (光程 1 cm), 按下列公式计算:

$$\begin{aligned}\text{酶量}(\text{mg}/\text{mL}) &= \text{OD}_{403} \times 0.4 \\ \text{IgG 量}(\text{mg}/\text{mL}) &= (\text{OD}_{280} - \text{OD}_{403} \times 0.42) \times 0.94 \times 0.62 \\ \text{克分子比值} &= \text{酶量} \times 4 / \text{IgG 量}\end{aligned}$$

标记抗体克分子比值应为 1~2。
