



中华人民共和国国家标准

GB/T 23239—2009

伊氏锥虫病诊断技术

Diagnostic techniques for *Trypanosomosis evansi*

2009-03-09 发布

2009-05-01 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

本标准的制定参照了世界动物卫生组织(OIE)编写的《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)》(第五版,2004)。

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国农业科学院上海兽医研究所。

本标准主要起草人:周金林、沈杰。

伊氏锥虫病诊断技术

1 范围

本标准规定了新鲜血片、薄血涂片染色、毛细管集虫、实验动物接种等病原鉴定方法和乳胶凝集试验、间接血凝试验和酶联免疫吸附试验等血清学试验技术。

本标准适用于伊氏锥虫病的诊断、检疫、流行病学调查。

2 临床诊断

依家畜种类不同,临床症状表现不同。马(骡、驴)一般呈急性经过,感染后,体温突然升高到 40℃ 以上,稽留数日,而后经短时间的间隙,再行发作,体表水肿为常见症状,结膜和第三眼睑常有出血斑。黄牛、水牛及骆驼等一般呈慢性经过,有不定期的间歇发热,食欲不振,消瘦,肿脚和耳、尾干枯症状,许多慢性感染病例无明显病变。

有以上临床症状者,可以怀疑感染,确诊需要实验室检验。

3 病原鉴定

3.1 采血样

可从耳静脉或尾静脉采取外周血,从颈静脉或其他大静脉采取深部血液,因伊氏锥虫喜欢寄生于深部血液,处于低虫血症时,外周血检出率常低于深部血的 50%。

3.2 新鲜血片检查

在干净载玻片上滴上一小滴鲜血,盖上盖玻片,使血液扩散成为细胞单层,再用光学显微镜(200 倍)观察活动锥虫。为防止血液在观察时干涸,也可先在载玻片滴血时加一滴生理盐水或 3% 柠檬酸三钠生理盐水。

3.3 薄血膜染色检查

将一小滴血放在清洁载玻片一端约 20 mm 处,按常用方法推成薄血膜,迅速风干,用甲醇固定 2 min,干燥后,再加姬氏染色液(配法参见附录 A)染色 25 min,倾去染色液,自来水冲洗,干燥后用 400 倍~1 000 倍显微镜检查。

3.4 毛细管集虫检查

3.4.1 材料准备

肝素处理过的毛细管(管内径 1.5 mm,长 75 mm 的玻璃或无色透明的硬质塑料管,在拟进血的一端吸入 3% 肝素钠 10 mm,用烤箱 70℃~80℃ 烤干后备用),显微镜一台,离心机一台,载玻片,盖玻片,12 号以上注射针头(或金属针),塑泥(橡皮泥)。

3.4.2 采集待检血样

从动物耳静脉或尾静脉穿刺获得血液。先用酒精棉擦净拟采血处皮肤,干后用针头穿刺血管,血流时用毛细管吸入达 40 mm 深(即 70 μL 血),封闭未沾染血的另一端(可用塑泥或火焰加热封闭)。

3.4.3 集虫

以 3 000g 离心 10 min,待红细胞全部沉积于毛细管下半部,上层为黄色血浆时即可。

3.4.4 检查

在毛细管的血浆与红细胞分界线下 1 mm 处将管折断(切断、剪断),将带有少量红细胞的血浆滴于载玻片上,盖上盖玻片,使血液扩散成细胞单层。在 350 倍~400 倍放大的光学显微镜下检查活锥虫,如需进一步详细观察虫体,可再除去盖玻片,晾干血片后,用姬氏染色液染色后,在 800 倍~1 500 倍放大的显微镜下观察确定。

3.5 动物接种

采被检动物血 0.25 mL,加入灭菌阿氏液(或 3%柠檬酸三钠生理盐水)0.25 mL,经腹腔注射入小白鼠(大白鼠则加倍量),每周 3 次从尾部采血检查活寄生虫,为提高锥虫在小鼠体内培养繁殖的敏感性,可用环磷酰胺或醋酸氢化可的松抑制小白鼠的免疫力。

4 血清学试验

4.1 乳胶凝集试验

4.1.1 材料准备

4.1.1.1 器材:乳胶凝集试验反应板,为具黑色背景的玻璃板。用漆或油性色笔将板面分成(20 mm~30 mm)×(20 mm~30 mm)的方格若干个。25 μL 移液器(或 5 μL~200 μL 可调移液器)或滴管。具凹井的有机玻璃(或玻璃)血凝反应板。

4.1.1.2 试剂:化学交联锥虫抗原的乳胶诊断液,锥虫病阳性血清和阴性血清,生理盐水。

4.1.2 分析步骤

4.1.2.1 用移液器或滴管将生理盐水对被检血清、阳性血清和阴性血清作 1:40 稀释。

4.1.2.2 用滴管在乳胶凝集试验反应板上各方格中分别滴入已被稀释的血清一滴。

4.1.2.3 在各方格血清中分别加入同样量的乳胶诊断液,轻轻摇匀,8 min 内观察结果,室温低于 10℃时需延长 2 min~3 min 观察,高于 30℃时需提前 2 min~3 min 观察。

4.1.3 结果判定

反应液由均匀白色改变为整个液体清亮,并有细小白色凝集颗粒分散其中者为阳性,如仍为均匀白色则为阴性。如阳性血清未出现阳性反应,或阴性血清出现阳性反应属操作有误或器材准备不合格,需重做。

4.2 间接血凝试验

4.2.1 材料准备

4.2.1.1 器材:V形(90°角)微量血凝板,10 μL、50 μL 及 100 μL 移液器,温箱。

4.2.1.2 试剂:锥虫病间接血凝诊断液,包含抗原致敏血球悬液和非致敏血球悬液;阳性血清或阳性干燥血纸;磷酸缓冲液(PBS 配法参见附录 B)。

4.2.2 分析步骤

4.2.2.1 先在血凝板写上血清或血纸编号,每份血清取 2 排各 6 个孔,上排作测定排,下排为对照排。

4.2.2.2 于左边每上排第 1 孔内加缓冲液 200 μL,下排血清 50 μL(5 倍稀释),如用血纸则剪取 1.2 cm² 血纸剪碎,加缓冲液 200 μL,其浸出液相当血清 20 倍稀释。然后从每排第 2 孔开始每孔加入缓冲液 50 μL。

4.2.2.3 从第 1 孔内吸取已稀释的血清或血纸浸出液 50 μL 加入第 2 孔内,再向右按次序作倍比稀释,共稀释到 160 倍(血清)或 640 倍(血纸)。并吸取第 1 孔内液 50 μL 加入第 2 排第 2 孔内,按同样方法向右作倍比稀释。最后孔中吸取 50 μL 稀释液丢弃。

4.2.2.4 向测定排第 2 孔至第 6 孔中各加入致敏血球悬液 10 μL,向对照排第 2 孔至第 6 孔中各加入非致敏血球悬液 10 μL(如表 1)。

表 1

血清号	血清稀释倍数								
		5	10	20	40	80	160	320	640
1	测定								
	对照								
2	测定								
	对照								

表 1 (续)

血清号		血清稀释倍数							
		5	10	20	40	80	160	320	640
3	测定								
	对照								
4	测定								
	对照								
5	测定								
	对照								
6	测定							阴性血清	阴性血清
	对照							缓冲液	缓冲液

4.2.2.5 阳性血清也按上述方法操作,另设仅加缓冲液(1:1)的空白对照孔 2 个,分别加入致敏和非致敏血球悬液 10 μL 。

4.2.2.6 用微型血凝板振荡器或手指轻拍,将血液悬液与血清稀释液混匀。置于 26 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 1 h~2 h 有一小红色圆点,周围为淡红色晕状,为弱阳性,记录为“++”。红血球大部分沉于孔底中央,图像为孔底中央有一较大红色圆点,周围有少量面积淡红色,为弱阳性,记录为“+”。红血球全部沉于孔底中央,图像为孔底中央有一大的红色圆点,周围液体清亮无淡红色,为阴性,记录为“-”。

4.2.3 结果判定

凡测定排阳性反应孔不到 1:80 稀释时判为阴性,1:80 稀释孔及其以上为阳性反应,且测定排比对照排高出 2 个稀释度或更多时,该份被检血清判为阳性,仅用某一个稀释度判为可疑。测定排与对照排阳性反应孔稀释度相同者判为阴性。

4.2.4 注意事项

4.2.4.1 诊断液使用时要充分摇匀。

4.2.4.2 如到最高稀释度测定排与对照排不是阳性反应时,则应再连续稀释下去。一直稀释到第 12 孔为止。

4.2.4.3 血纸勿被潮霉或虫爬污,未干时也不能重复。

4.2.4.4 移液器在稀释时吸吹次数要一致,测定排与对照排应分别各用一个移液器头子。

4.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

4.3.1 材料准备

4.3.1.1 器材:聚苯乙烯酶标板、酶标仪(5 μL ~200 μL 的可调移液器(或 25 μL 、50 μL 、100 μL 、200 μL 移液器)。

4.3.1.2 试剂:锥虫可溶性抗原、辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 抗体、牛血清白蛋白、参考阴性血清、阳性血清、pH9.6 的 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液、pH7.4 的 PBS-吐温缓冲液、pH5.0 的柠檬酸盐缓冲液(以上 3 种缓冲液配方参见附录 C)、邻苯二胺、30% H_2O_2 、2 mol/L H_2SO_4 。

4.3.2 分析步骤

4.3.2.1 用 pH9.6 的 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液将锥虫抗原液稀释到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,向酶标板各孔内加入 200 μL ,置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~10 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 20 h~24 h。

4.3.2.2 倒去抗原液,用 PBS-吐温缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min,甩干。用 PBS-吐温缓冲液溶解牛血清白蛋白至 1 g/20 mL,向各孔中加入 250 μL ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内 1 h。

4.3.2.3 倒去白蛋白液,同上方法洗涤,甩干。将阴性、阳性血清和被检血清均用 PBS 液作 1:200 稀释,各孔中分别加入 200 μL ,每份血清同样加入 2 个孔。另设空白对照孔 2 个,只加 PBS 液。置 37 $^{\circ}\text{C}$

湿盒中 1 h。

4.3.2.4 倒去血清,同上方法洗涤,甩干。将酶标记抗牛 IgG 抗体按工作浓度稀释后,向各孔中分别加入 200 μL ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中 1 h。

4.3.2.5 倒去酶标记物溶液,同上方法洗涤,甩干。加入各孔 200 μL 底物溶液(参见附录 C),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒 30 min。

4.3.2.6 向各孔中加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 ,以终止其反应。

4.3.3 结果判定

用酶标仪测各孔中液体光吸收值,计算同一血清 2 孔平均值,被检血清各孔值大于等于阴性参考平均值 2 倍者为阳性血清,低于阴性参考血清 2 倍者为阴性。但如 2 孔光吸收值中有 1 孔低于参考阴性血清值的 2 倍,1 孔等于或高于 2 倍者为可疑,需重做。

5 综合判定

伊氏锥虫病的诊断方法有多种。依据临床症状和病理变化只可作出初步诊断,确诊应依靠实验室检查。病原的分离与鉴定多用于急性病例的确诊和新疫区的确定。血清学方法主要用于检测伊氏锥虫抗体,在群体水平上进行血清学诊断较易操作、特异性强、敏感性高,但是对个体检测比较困难,有时出现非特异性反应。当在临床上怀疑有伊氏锥虫感染时,可根据实际情况,由上述几种方法中选用一种或两种方法进行确诊。

附 录 A

(资料性附录)

姬氏染色液的配制与染色方法

A.1 姬氏染色液的配制

姬氏染色粉 0.5 g;

甲醇 25 mL;

甘油 25 mL。

将姬氏染色粉置于研钵中,先加少量甘油充分研磨,再加甘油继续研磨,直至用完 25 mL 甘油,装入棕色瓶中,用 25 mL 甲醇分次洗涤剩余甘油,全部注入棕色瓶中,塞紧瓶塞,充分摇匀。置 65 ℃ 温箱内 24 h 或在室温中一周以后过滤待用。

A.2 染色方法

用中性蒸馏水或生理盐水按 1 : 1 稀释染液,用滴管将稀释染液滴于血膜上,染色 20 min~30 min。再用蒸馏水冲洗,晾干镜检。

附 录 B

(资料性附录)

间接血凝试验用的血清稀释液——磷酸缓冲液(PBS)

- B.1** 0.067 mol/L 磷酸氢二钠液:用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23.77 g,加入重蒸水溶解,再加入到 1 000 mL。
- B.2** 0.067 mol/L 磷酸二氢钾液:用 KH_2PO_4 9.08 g,加入重蒸水溶解,然后加到 1 000 mL。
- B.3** 取 0.067 mol/L 磷酸氢二钠液 72 份,加 0.067 mol/L 磷酸二氢钾液 28 份,再加入 0.85%氯化钠即成 PBS。为长期保存可分装后高压灭菌。

附录 C

(资料性附录)

酶联免疫吸附试验所需试剂溶液

C.1 pH9.6 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液

Na_2CO_3 1.59 g(或 $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 4.29 g);

NaHCO_3 2.93 g;

蒸馏水加至 1 000 mL。

C.2 pH7.4 PBS-吐温缓冲液

NaCl 8 g;

KCl 0.2 g;

吐温-20 0.5 mL;

Na_2HPO_4 2.9 g;

蒸馏水加至 1 000 mL。

C.3 pH5.0 柠檬酸盐缓冲液

0.1 mol/L 柠檬酸液 24.3 mL;

0.2 mol/L 磷酸氢二钠液 25.7 mL;

蒸馏水加至 100 mL。

以上各种溶液均可在 0 °C ~ 10 °C 中保存 10 个月。

C.4 底物溶液

邻苯二胺 10 mg;

pH5.0 柠檬酸盐缓冲液 25 mL;

溶解后再加 50 μL 30% H_2O_2 。

需在临用前 0.5 h 配制。