



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 32948—2016

---

## 犬科动物感染细粒棘球绦虫粪 抗原的抗体夹心酶联免疫吸附 试验检测技术

Detection of coproantigen of canidae infected  
*Echinococcus granulosus* (E.g) by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

2016-08-29 发布

2017-03-01 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

订单号: 0100191212052131 防伪编号: 2019-1212-0301-5808-4477 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:新疆维吾尔自治区畜牧科学院兽医研究所、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准起草人:张壮志、张文宝、张旭、米晓云、古努尔·吐尔逊、石保新、范伟兴、吐尔洪·依米提、赵莉、巫剑、王进成。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

订单号: 0100191212052131 防伪编号: 2019-1212-0301-5808-4477 购买单位: 全国动物卫生标准化技术委员会

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

# 犬科动物感染细粒棘球绦虫粪 抗原的抗体夹心酶联免疫吸附 试验检测技术

## 1 范围

本标准规定了细粒棘球绦虫粪抗原的抗体夹心酶联免疫吸附试验(Sandwich ELISA)检测技术要求。

本标准适用于细粒棘球绦虫感染终末宿主(犬科动物)的诊断、检疫、效果考核及其相关流行病学调查。

## 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 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**细粒棘球绦虫粪抗原** fecal antigen of *Echinococcus granulosus*

细粒棘球绦虫寄生于犬科动物肠道,随粪便一同排出的虫体分泌物、代谢物和脱落孕节。

### 3.2

**抗体夹心** antibody sandwich

多克隆抗体与抗原免疫结合,抗原再与单克隆抗体发生特异性结合,形成抗体-抗原-抗体“三明治”式的复合物。

### 3.3

**细粒棘球绦虫成虫体表抗原** the surface antigen of *Echinococcus granulosus*

细粒棘球绦虫成虫经 1% Triton×100 作用后获得的体表抗原(EgsfAg)。

### 3.4

**兔抗 EgsfAg 的免疫球蛋白 G** the rabbit's immunoglobulin G against EgsfAg

纯化的抗 EgsfAg 多克隆兔抗体 IgG(蛋白含量为 11.12 mg/mL, 抗体滴度为 1:160 000 以上)。

### 3.5

**抗 EgsfAg 的鼠单克隆抗体** mouse monoclonal antibody against EgsfAg

抗 EgsfAg 的鼠单克隆抗体(蛋白含量为 14.4 mg/mL, 抗体滴度为 1:80 000 以上)。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

OD 值 某一物质在某一个特定波长下的吸光度(optical density)

PBS 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution)

PBST 含有 0.05% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline)

TMB 四甲基乙二胺联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)

EgsfAg 细粒棘球绦虫成虫体表抗原(the surface antigen of *Echinococcus granulosus*)

EgsfAgRIgG 兔抗 EgsfAg 的免疫球蛋白 G(the rabbit's immunoglobulin G against EgsfAg)

EgXJ09McAb 抗 EgsfAg 的鼠单克隆抗体(mouse monoclonal antibody against EgsfAg)

BSA 牛血清白蛋白(albumin from bovine serum)

PB 底物缓冲液(substrate buffer)

Triton X-100 聚乙二醇辛基苯基醚,非离子表面活性剂[polyethylene glycol mono(p-1,1,3,3-tetramethyl butyl)phenyl ether]

DMSO 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide)

## 5 原理

将 EgsfAgRIgG 固着在载体(PVC)表面,并保持其免疫活性,待检抗原(犬粪便样品中 Eg 粪抗原)与前述抗体结合,被吸附的 Eg 粪抗原再与 EgXJ09McAb 特异性结合,利用兔抗鼠(IgG)二抗 HRP 与前述被捕捉的单克隆抗体特异性结合,携带的酶催化底物显色。底物转化为有色产物的量与酶量及待检样品中抗原量成正比,故可根据颜色反应的深浅来定性或定量分析待检样品阴、阳性。阴性样品说明该被检终末宿主没有感染细粒棘球绦虫;阳性样品说明被检宿主感染了细粒棘球绦虫。

## 6 试剂材料与设备仪器

### 6.1 试剂与材料

本标准试剂除特殊规定外,均指分析纯试剂。

PBS(见附录 A):常温保存。

PBST(见附录 A):常温保存。

包被液(pH=9.6): $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.16 g, $\text{NaHCO}_3$  0.29 g, $\text{H}_2\text{O}$  100 mL,4 °C 保存。

封闭液:脱脂奶粉 5 g,PBS 100 mL,4 °C 保存。

EgsfAgRIgG:-20 °C 保存。

EgXJ09McAb:-70 °C 保存。

兔抗鼠(IgG)二抗 HRP:-20 °C 保存。

TMB 底物缓冲液(见附录 A):4 °C 保存。

TMB 底物显色剂(见附录 A):4 °C 保存。

TMB 底物显色液(见附录 A):4 °C 保存。

终止液:浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 mL, $\text{H}_2\text{O}$  80 mL,常温保存。

1%BSA:BSA 1 g,PBS 100 mL,4 °C 保存。

96 孔酶标反应板:-20 °C。

### 6.2 设备仪器及耗材

低温台式高速离心机;要求最大离心力在 12 000 g 以上。含有 450 nm 波长的酶标仪。37 °C 恒温培养箱。振荡混匀器。电子天平(精确度:0.01 g)。2 °C~4 °C 冰箱、-20 °C 冰柜和-70 °C 超低温冰箱。

可调移液器一套,12道微量移液器(50  $\mu\text{L}$ ~300  $\mu\text{L}$ ),与移液器配套的吸头。50 mL 塑料离心管、记号笔、塑料自封带、竹签、一次性手套、口罩、帽子、胶鞋、连体防护服等。

## 7 样品采集与处理

### 7.1 样品采集、运输和储存

用无菌竹签收集尽可能新鲜的犬粪便 2 g~3 g,装入 50 mL 离心管内,编号,登记。用塑料自封袋将其封闭后,置于加冰的保温箱中,冷冻运至实验室;保存  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下,待检。

### 7.2 样品处理

将犬粪样置  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,低温冷冻至少 1 周,以灭活病原。室温解冻,粪样加等量 PBST(按质量比),充分溶解混匀,静置 30 min,4 000 g,离心 15 min,上清液即可用于检测。该上清液可在  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下保存 1 周;若需长期保存,应分装放在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下冰柜内,避免反复冻融。

### 7.3 避免污染

采样和处理过程中样本不得交叉污染,采样及样品处理过程中应注意安全防护,应戴一次性手套、口罩、帽子,穿胶鞋(或鞋套)和连体防护服等。

## 8 操作方法

### 8.1 抗体包被

将适宜浓度的 EgsfAgRIgG(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )包被 96 孔酶标反应板,100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,反应板盖严,并在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜。

### 8.2 封闭反应板

用 PBST 洗涤 3 次,每次加入洗液后放置 1 min;倒出后拍打干净。加入封闭液,200  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,反应板  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  湿盒孵育 1 h。

### 8.3 加样

用 PBST 洗涤 3 次,每次加入洗液后放置 1 min;倒出后拍打干净。A1、A2 孔加入样品稀释液,100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ;B1、B2 至 E1、E2 孔加入标准阴性抗原 N1~N4(见附录 A),100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ;F1、F2 孔加入标准阳性抗原 P(见附录 A),100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ;其余孔先加入 PBST 80  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,然后加入检测样本上清,20  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,混匀,每个检测样品加 2 孔(建议加样参照附录 C 示意图), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  湿盒密闭孵育 30 min。按加样顺序应详细记录检测样本信息(包括编号、日期等)。

### 8.4 结合单克隆抗体

用 PBST 洗涤 3 次,每次加入洗液后放置 1 min;倒出后拍打干净。除空白孔外,加入 EgXJ09McAb(建议工作滴度为 1:4 000~1:6 000),100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  湿盒密闭孵育 30 min。

### 8.5 结合酶标二抗

用 PBST 洗涤 3 次,每次加入洗液后放置 1 min;倒出后拍打干净。除空白孔外,加兔抗鼠(IgG)二抗 HRP,100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  湿盒密闭孵育 30 min。

## 8.6 底物显色

用 PBST 洗涤 3 次,每次加入洗液后放置 1 min;倒出后拍打干净。加入 TMB 底物显色液 100  $\mu\text{L}$ /孔,37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 15 min。

## 8.7 终止反应和读值

加入终止液 50  $\mu\text{L}$ /孔,10 min 内读取 450 nm 的 OD 值,并计算空白孔、阳性孔、阴性孔和检测样品孔的平均 OD 值。

## 9 结果判定

### 9.1 有效原则

当 ELISA 反应结束并加入终止液后 10 min 内用酶标仪测量各孔在 450 nm 波长时的光吸收值 (OD 值)。并计算空白孔、标准阳性孔和每个标准阴性孔的 OD 平均值( $N_1$ 、 $N_2$ 、 $N_3$ 、 $N_4$ )。要求空白孔的 OD 平均值 < 标准阴性孔的 OD 平均值 < 标准阳性孔的 OD 平均值;标准阳性 OD 平均值( $P$ )与所有标准阴性 OD 平均值( $N$ )之比大于或等于 2.1 (即  $P/N \geq 2.1$ ),否则检查 ELISA 板是否合格,加样位置是否有错误等。

### 9.2 阴性、阳性判定

计算待测样品 OD 平均值和标准阴性 OD 值平均之比。当待测样品 OD 平均值( $P$ )与所有标准阴性 OD 平均值( $N$ )之比大于或等于 2.1 (即  $P/N \geq 2.1$ ) 时,定该待测样品为阳性,表示其含细粒棘球绦虫成虫抗原。

**附录 A**  
(规范性附录)  
相关试剂的配制

**A.1 PBS (pH=7.2)**

NaCl 4 g, KCl 0.1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.72 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.12 g, H<sub>2</sub>O 500 mL。

**A.2 PBST (pH=7.2)**

NaCl 4 g, KCl 0.1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.72 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.12 g, H<sub>2</sub>O 500 mL, 吐温-20 0.25 mL。

**A.3 TMB 底物缓冲液 (pH=6)**

A 液: NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O 27.6 g, H<sub>2</sub>O 1L。

B 液: Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>O 35.6 g, H<sub>2</sub>O 1L。

A 液 87.7 mL + B 液 12.3 mL。

**A.4 TMB 底物显色剂**

DMSO 10 mL TMB 粉 60 mg

**A.5 TMB 底物显色液 (临用前配制)**

TMB 底物缓冲液 10 mL

TMB 显色剂 100 μL

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 μL

**A.6 标准阴性抗原 N1~N4**

在实验室对实验犬用吡喹酮(5 mg/kg)和丙硫咪唑(20 mg/kg)联合驱虫,1 周后镜检无虫卵,其粪便按照粪抗原制备方法,即可作为标准阴性抗原 N(蛋白含量平均约为 0.032 mg/mL ~ 0.047 mg/mL)。

**A.7 标准阳性抗原 P**

在实验室人工感染细粒棘球绦虫实验犬获得的粪便样品,经虫卵灭活处理(-70 ℃,低温冷冻至少 1 周)后,按照粪抗原的制备方法,上清液即可作为标准阳性抗原 P(蛋白含量平均约为 0.033 mg/mL)。

## 附录 B

(规范性附录)

### 检测过程中生物安全和防止交叉污染的措施

#### B.1 实验室设备要求

B.1.1 实验室共分为两个独立的工作区域:样品处理区,ELISA 检测区,各区应有明确标识。

B.1.2 各区应有专用的仪器、设备,标识明确。

B.1.3 各区应使用单独颜色或有明显区别标识的工作服,只准在本区穿着。

B.1.4 各区应有各自的清洁用具以防止交叉污染。

#### B.2 工作区域仪器设备配置

##### B.2.1 样品处理区仪器设备配置

2℃~8℃冰箱;−20℃冰箱;−70℃超低温冰箱;台式离心机( $\geq 12\,000$  r/min);混匀器;电子天平(精度:0.01 g);微量加样器(20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ ,200  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ );可移动紫外灯。

##### B.2.2 ELISA 检测区仪器设备配置

恒温培养箱,混匀器,2℃~8℃冰箱,微量加样器(0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ ,5  $\mu\text{L}$ ~20  $\mu\text{L}$ ,20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ ,200  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ ,12道 20  $\mu\text{L}$ ~300  $\mu\text{L}$ ),全波长酶标仪,或有 450 nm 波长酶标仪,可移动紫外灯,电脑,打印机。

#### B.3 各工作区域功能及注意事项

##### B.3.1 样品处理区

B.3.1.1 样品处理、保存,酶标板上样均在样品处理区进行。

B.3.1.2 用过的加样器吸头应放入专门的消毒(例如含次氯酸钠溶液)容器内。实验室桌椅表面每次工作后都要清洁,实验材料(原始粪样、处理过程中样品与试剂的混合液等)如出现外溅,应消毒处理,并作出记录。

B.3.1.3 在本区开展实验时,操作者应穿一次性防护服、鞋套,戴一次性手套和帽子。工作结束后应立即对工作区进行消毒,所有废弃物品都应做高压处理,方可丢弃。本工作区的实验台表面应耐受诸如次氯酸钠等的化学物质的消毒清洁作用。

##### B.3.2 ELISA 检测区

B.3.2.1 在进行试验的过程当中,稀释溶液所使用的容器应保证洁净无污染。

B.3.2.2 每一步的洗涤要彻底,避免影响最后的显色读值。

## 附录 C

(规范性附录)

## 酶标板检测样品加样示意图

酶标板检测样品加样示意图见图 C.1。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	空白	空白										
B	N1	N1										
C	N2	N2										
D	N3	N3										
E	N4	N4										
F	P	P										
G												
H												

注：空白孔没包被，留作本底。

凡无特殊指出的孔，均可作为待检样品孔，待检样品加双孔。

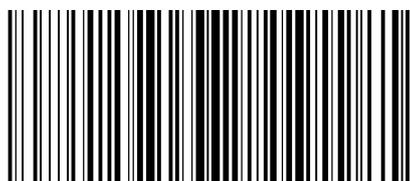
图 C.1 酶标板检测样品加样示意图

 **版权声明**

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网  
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 32948-2016  
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会  
订单号: 0100191212052131  
防伪号: 2019-1212-0301-5808-4477  
时 间: 2019-12-12  
定 价: 21元



GB/T 32948-2016

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
犬科动物感染细粒棘球绦虫粪  
抗原的抗体夹心酶联免疫吸附  
试验检测技术

GB/T 32948—2016

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2016年11月第一版

\*

书号: 155066·1-53348

版权专有 侵权必究