



中华人民共和国国家标准

GB/T 32945—2016

牛结核病诊断 体外检测 γ 干扰素法

Bovine tuberculosis diagnosis—Assay on IFN- γ in vitro

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

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 缩略语	1
3 原理	1
4 IFN- γ 体外检测法	1
4.1 仪器与耗材	1
4.2 试剂	2
4.3 操作步骤	2
附录 A (规范性附录) 试剂配制	4
附录 B (资料性附录) 采样与样品处理注意事项	6

订购号: 0100191212052132 防伪编号: 2019-1212-0303-0805-9987 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:华中农业大学、武汉科前动物生物制品有限责任公司、北京出入境检验检疫局、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心。

本标准起草人:郭爱珍、陈颖钰、涂玲玲、胡长敏、晁金、马贵平、胡巧云、陈焕春。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

引 言

牛结核病是主要由牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*, *M. bovis*)引起的一种人兽共患慢性传染病,呈世界性分布。世界动物卫生组织(OIE)将其列为必须通报疫病与国际贸易必检对象,我国将其列为二类动物疫病,是“国家中长期动物疫病防治规划(2012~2020年)”16种优先防治的国内重大动物疫病之一。临床上牛结核病以肺结核最为常见,但也可发生乳腺结核和肠结核等。健康牛可通过被污染的空气、饲料和饮水等经呼吸道和消化道感染;此外,牛结核病是人结核的重要传染源之一。由于牛分枝杆菌感染谱广、持续感染普遍、牛结核病程缓慢、临床症状不典型等原因,牛结核病净化相对困难。随着近年来我国现代奶牛业和肉牛业的蓬勃发展以及国内牛群交易日益频繁,我国牛结核病呈上升趋势。

国内外通用的牛结核病控制策略是“检疫—扑杀”,因此,准确检测是控制和净化牛结核病的前提。目前法定的检疫方法为牛结核菌素皮内变态反应,该方法的优点是灵敏度高,缺点是:操作费时繁琐,结果判断主观性强,可与环境分枝杆菌感染出现交叉反应,免疫抑制者或结核病后期对结核菌素的反应性降低。牛结核病诊断体外检测 IFN- γ 法是用牛结核菌素与禽结核菌素分别刺激外周血淋巴细胞释放 IFN- γ 、通过检测 IFN- γ 浓度判断牛结核病感染状态的一种方法,是一种敏感性与特异性均高的方法,且能实现高通量检测。发达国家已成功利用该方法辅助诊断与监测牛结核病。建立我国牛结核病诊断 IFN- γ 体外检测法国家标准,能为牛结核病的早期诊断、检疫、监测和流行病学调查等提供技术支撑,促进我国牛结核病的控制和净化,保障我国养牛业的健康可持续发展。

牛结核病诊断 体外检测 γ 干扰素法

1 范围

本标准规定了牛结核病诊断 体外检测 γ 干扰素法的缩略语、原理、试剂、采样和操作步骤。
本标准适用于牛结核病的早期诊断、检疫、监测与流行病学调查。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

A-PPD:禽结核菌素(avian purified protein derivative)

B-PPD:牛结核菌素(bovine purified protein derivative)

ELISA:酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay)

HRP:辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)

IFN- γ : γ -干扰素(interferon gamma)

IgG:免疫球蛋白 G(immunoglobulin G)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution)

OD:光密度值(optical density)

3 原理

感染牛分枝杆菌的结核阳性牛,其外周血淋巴细胞已被牛分枝杆菌致敏并产生免疫记忆。当体外遇到牛分枝杆菌特异性抗原(牛结核菌素)刺激时,淋巴细胞将被激活,发生再次细胞免疫反应,大量释放 IFN- γ 。通过夹心 ELISA 检测 IFN- γ 浓度水平,即可诊断牛分枝杆菌感染。禽分枝杆菌属于非结核分枝杆菌,以禽结核菌素刺激淋巴细胞作为对照,可有效排除环境分枝杆菌感染导致的非特异性反应。

4 IFN- γ 体外检测法

4.1 仪器与耗材

- 4.1.1 II 级生物安全柜。
- 4.1.2 二氧化碳培养箱。
- 4.1.3 酶标仪。
- 4.1.4 混匀器。
- 4.1.5 冰箱。
- 4.1.6 天平。
- 4.1.7 高压消毒锅。
- 4.1.8 微量可调移液器及枪头。
- 4.1.9 一次性无菌离心管(2 mL)。
- 4.1.10 一次性肝素钠抗凝采血管。
- 4.1.11 一次性注射器(5 mL)。

4.1.12 微孔滤膜(0.22 μm)。

4.2 试剂

B-PPD 工作液、A-PPD 工作液、PBS、牛 IFN- γ 单克隆抗体、兔抗牛 IFN- γ 多克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 酶标二抗、底物液、包被液、封闭液、洗涤液和终止液。

试剂配制方法见附录 A。

4.3 操作步骤

4.3.1 样品收集

无菌采集待检牛血液 4 mL~5 mL,立即转移至含肝素钠抗凝剂的一次性无菌采血管中(肝素钠终浓度为 15 U/mL),轻轻缓慢颠倒 3 次~5 次使血液与肝素钠混匀,18 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 保存,30 h 内送达实验室进行刺激培养。

样品收集过程中应防止样品的污染,注意个人安全防护,具体注意事项见附录 B。

4.3.2 样品处理

将抗凝血加入 2 mL 无菌离心管中,每管 1 mL,每份血液样品设 3 个管,分别标记为 B-PPD、A-PPD 和 PBS 管。向标记管中相应加入 100 μL 的 B-PPD、A-PPD 和 PBS,盖严,轻摇使血液与加入的刺激物充分混合,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中静置培养 16 h~20 h。收集细胞培养上清,立即用于 IFN- γ 检测,或置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待检。

样品处理过程中应防止样品的污染,注意个人安全防护,具体注意事项见附录 B。

4.3.3 夹心 ELISA 测定 IFN- γ 浓度

4.3.3.1 试剂配制

见附录 A。

4.3.3.2 包被

用包被液将牛 IFN- γ 单克隆抗体稀释至工作浓度,加入酶标板孔中,每孔 100 μL (每孔含抗体约 35 ng),在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12 h。

4.3.3.3 洗涤

弃去孔内包被液,用洗涤液洗板 3 次。每次 300 μL /孔,每次静置 1 min 后弃去洗涤液,洗涤完毕后在吸水纸上拍干。

4.3.3.4 封闭

每孔加入 200 μL 封闭液,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。重复 4.3.3.3。

4.3.3.5 加入待检样品

将 4.3.2 步骤收集的待检培养上清分别加入封闭好的酶标板孔中,100 μL /孔,其中 B-PPD 刺激上清标记为 B 孔,A-PPD 刺激上清标记为 A 孔,PBS 刺激上清标记为 P 孔;同时设置 1 个空白对照孔,孔中直接加入 100 μL PBS。37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 45 min,洗涤 3 次,方法见 4.3.3.3。

4.3.3.6 加入兔抗牛 IFN- γ 多克隆抗体

用洗涤液将兔抗牛 IFN- γ 多克隆抗体稀释至标定的浓度,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min,洗涤 3 次,

方法见 4.3.3.3。

4.3.3.7 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 酶标二抗

用洗涤液将 HRP 标记的羊抗兔 IgG 酶标二抗稀释至标定的浓度,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min,洗涤 5 次,方法见 4.3.3.3。

4.3.3.8 显色和终止反应

每孔先加入底物液 A 50 μL ,再加入底物液 B 50 μL ,室温避光显色 10 min。每孔加入 50 μL 终止液。5 min 内在酶标仪上测定 630 nm 波长处的吸光度(OD 值),测定前须用空白对照孔调零。

4.3.3.9 结果判定

B-PPD 刺激上清孔的 $\text{OD}_{630\text{ nm}}$ 值记作 $\text{OD}_{\text{B-PPD}}$,A-PPD 刺激上清孔的 $\text{OD}_{630\text{ nm}}$ 值记作 $\text{OD}_{\text{A-PPD}}$,PBS 刺激上清孔的 $\text{OD}_{630\text{ nm}}$ 值记作 OD_{PBS} 。计算 $\text{OD}_{\text{B-PPD}}$ 、 $\text{OD}_{\text{A-PPD}}$ 及 OD_{PBS} 之间的差值,当 $\text{OD}_{\text{B-PPD}} - \text{OD}_{\text{PBS}} \geq 0.2$ 且 $\text{OD}_{\text{B-PPD}} - \text{OD}_{\text{A-PPD}} \geq 0.2$ 判为阳性;其他情形均判为阴性。

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附 录 A
(规范性附录)
试 剂 配 制

A.1 血细胞刺激物

A.1.1 B-PPD 工作液

使用前将 20 000 IU 的牛结核菌素与 PBS 按 1 : 19 混合,备用。

A.1.2 A-PPD 工作液

使用前将 25 000 IU 的禽结核菌素用 PBS 按 1 : 11.5 混合,备用。

A.1.3 PBS(0.1 mol/L, pH 7.4)

将下列试剂按次序加入 1 000 mL 规格的容器中,加 800 mL 蒸馏水充分溶解,用 1 mol/L 盐酸(HCl)或 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)调节至 pH 7.4,定容至 1 000 mL。

氯化钠 (NaCl)	8.0 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	2.9 g
吐温-20 (Tween-20)	0.5 mL
加蒸馏水至	1 000 mL

A.2 洗涤液

含 0.05% 吐温-20(Tween-20)的 PBS(pH 7.4)。

A.3 包被液

包被液为碳酸盐缓冲液(0.025 mol/L, pH 9.6)。将下列试剂按次序加入 1 000 mL 规格的容器中,加 800 mL 蒸馏水充分溶解,用 1 mol/L 盐酸(HCl)或 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)调节至 pH 9.6,定容至 1 000 mL。

碳酸钠 (Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠 (NaHCO_3)	2.93 g
加蒸馏水至	1 000 mL

A.4 封闭液(5%脱脂奶)

洗涤液	100 mL
脱脂奶粉	5 g

A.5 底物 A

将下列试剂按次序加入 1 000 mL 规格的容器中,加 800 mL 蒸馏水充分溶解,用 1 mol/L 盐酸 (HCl)调节 pH 至 5.0~5.4,定容至 1 000 mL。

磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	14.6 g
柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	9.33 g
过氧化氢脲 (H_2O_2)	0.52 g
加蒸馏水至	1 000 mL

A.6 底物 B

四甲基联苯二胺	20 mg
无水乙醇 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	10 mL
加蒸馏水至	1 000 mL

A.7 终止液

氢氟酸 (HF)	250 μL
加蒸馏水至	100 mL

全国动物卫生标准化技术委员会 专用

附录 B

(资料性附录)

采样与样品处理注意事项

B.1 防止样品和环境污染措施

B.1.1 采血及血样处理过程,应进行无菌操作,防止样品污染。

B.1.2 存放血样的容器应洁净、无菌。

B.1.3 所有与样本接触的待用器材如带滤芯枪头、普通枪头、离心管等器材均应洁净无菌。

B.1.4 血样处理与 ELISA 检测应在不同的区域进行,应在不同区域配备独立的加样工具和器材。血样处理在生物安全柜或超净工作台中进行,ELISA 可在敞开的干净空间内进行。操作区应有专门的固体和液体废弃物收集容器。

B.1.5 废弃物经高压灭菌后应按有关规定处理。

B.2 个人防护措施

B.2.1 采样及实验过程中应注意个人防护,戴口罩和手套、穿工作服。

B.2.2 在无污染环境中操作,包括:每次使用血样处理与 ELISA 检测操作区域后应及时清理物品,用 75%酒精或 10%次氯酸钠溶液消毒;生物安全柜或超净工作台在清洁消毒后,再用紫外线照射 30 min。

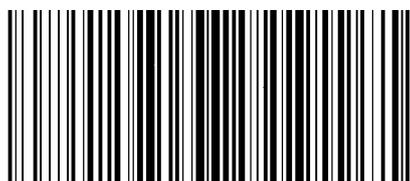
全国动物卫生标准化技术委员会 专用

 **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 32945-2016
购买者: 全国动物卫生标准化技术委员会
订单号: 0100191212052132
防伪号: 2019-1212-0303-0805-9987
时 间: 2019-12-12
定 价: 21元



GB/T 32945-2016

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
牛结核病诊断 体外检测 γ 干扰素法
GB/T 32945—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10月第一版

*

书号: 155066·1-53155

版权专有 侵权必究