



中华人民共和国国家标准

GB/T 18644—2002

猪囊尾蚴病诊断技术

Diagnostic techniques for cysticercosis cellulosae



2002-02-19 发布

2002-05-01 实施

S85
79

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布



Z0007406

中动卫图

前 言

猪囊尾蚴病(cysticercosis cellulosae)(俗称猪囊虫病),是由寄生在人体小肠内的猪带绦虫(taenia solium)的幼虫(cysticercus cellulosae)所引起的,是一种危害严重的人兽互源性寄生虫病。世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizootic(法),OIE]将该病列为B类疾病。目前,该病还广泛存在于发展中国家,不仅严重地影响着养猪业的发展,造成巨大的经济损失,而且还威胁着人类身体健康,乃至生命。因此,1993年联合国卫生组织将该病列为需要根除的六大疾病之一。

猪囊尾蚴病多不表现临床症状。目前,该病的检疫方法有舌检查法和免疫学检查法。前者仅适用于舌上寄生(27%~30%)的病猪。后者包括皮内变态反应、炭粒凝集试验、间接红细胞凝集试验、补体结合反应、琼脂扩散试验、免疫电泳和酶联免疫吸附试验(ELISA)等等。其中,ELISA法具有高敏感性和特异性,是最常用的一种方法。

本标准从病原分离、鉴定和血清学(ELISA方法)两方面规定了猪囊尾蚴病检查方法,结果更为可靠。

本标准规定的ELISA法,适用于感染猪的定性,最早可以检出感染9天的囊尾蚴病猪。也适用于免疫猪群抗体水平的评估。

本标准的附录A为本标准的附录。

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:吉林农业大学。

本标准主要起草人:韩宇、姜秀云、赵权。

1 范围

本标准规定了猪囊尾蚴病的病原分离与鉴定和酶联免疫吸附试验(ELISA)两种诊断技术。

本标准适用于猪囊尾蚴病的诊断和流行病学调查以及检疫。

2 病原分离与鉴定

2.1 病原分离

2.1.1 样品采集

采集猪的咬肌、舌肌、内腰肌、膈肌、肋间肌、肩胛肌等,亦可采集脑、心脏、肝脏、肺脏等。

2.1.2 样品分离

成熟的猪囊尾蚴为长椭圆形 $[(6\text{ mm}\sim 10\text{ mm})\times 5\text{ mm}]$,半透明的囊壁内充满液体,上有一个黍粒大小的白色小结节即为头节(scolex)和颈节(neck)。脑内寄生的则为圆球形 $\phi 8\text{ mm}\sim 10\text{ mm}$ 。

将上述任何部位的囊尾蚴,以手术刀和镊子剥离后,以生理盐水洗净,并用滤纸吸干。

2.2 病原鉴定

2.2.1 分离样品的压片制备

以剪刀剪开囊壁,取出完整的头节,再以滤纸吸干囊液后,将其置于两张载玻片之间并压片,于两张载玻片间加入1~2滴生理盐水后置于显微镜下镜检。

2.2.2 镜检

以低倍(物镜8倍、目镜5倍)观察囊尾蚴头节的完整性。

2.2.3 结果判定

低倍镜检,可见到头节的顶部有顶突,顶突上有内外两圈排列整齐的小钩,顶突的稍下方有四个均等的圆盘状吸盘,即判为猪囊尾蚴。

3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

3.1 材料准备

3.1.1 器材

ELISA反应板、酶联免疫检测仪、加样器、洗瓶、 $10\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ 普通滤纸条等。

3.1.2 试剂

猪囊尾蚴层析抗原、葡萄球菌A蛋白(SPA)辣根过氧化物酶(HRP)标记物(HRP-SPA)、猪囊尾蚴标准阴性和阳性全血滤纸片等。

3.1.3 被检猪全血血片

将 $10\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ 普通滤纸条的一端标记被检猪号码,另一端吸取被检猪任何部位血液1~2滴,于室内阴干后,置于 4°C 冰箱内(可保存6个月)。

3.1.4 溶液配制

溶液配制的方法见附录 A(标准的附录)。

3.2 操作方法

3.2.1 抗原包被

3.2.1.1 首先以抗原包被液(见附录 A 中 A1)洗涤 ELISA 反应板各孔三次。

3.2.1.2 以抗原包被液将抗原按使用说明书稀释至工作浓度。

3.2.1.3 用加样器加工作浓度抗原至 ELISA 反应板各孔内,每孔 0.1 mL,加盖后置于室温(11℃~29℃)过夜。

注:包被过夜的 ELISA 反应板加盖后置于冰箱冷冻室内(可保存 6 个月)。或将包被过夜的 ELISA 反应板按 3.2.2 方法洗涤后,晾干,装入塑料袋内密封,置于 4℃冰箱内(可保存 4 个月)。

3.2.2 洗涤

用力甩净包被过夜的 ELISA 反应板孔内的抗原包被液,每孔加入洗涤液(见附录 A 中 A2),浸泡 3 min 后,用力甩去洗涤液,并用滤纸吸去残留的洗涤液和驱除孔内气泡,重新加入洗涤液,按同样方法共洗涤 3 次,即 3×3 min 冲洗。

3.2.3 血片的处理

将被检血片、标准阴性血片及标准阳性血片均剪成 1 cm×1 cm 大小,分别置于青霉素瓶内,每 1 cm×1 cm 血片加入稀释液(见附录 A 中 A2)0.3 mL,浸泡 20 min,即血片变白后即可。

3.2.4 加样

3.2.4.1 每份被检血片浸液加两孔,每孔 0.1 mL。

3.2.4.2 标准阴性、标准阳性对照孔加相应血片浸液两孔,每孔 0.1 mL。

3.2.4.3 空白对照孔加稀释液两孔,每孔 0.1 mL。

3.2.4.4 加样后加盖,于室温(11℃~29℃)放置 30 min。

3.2.5 洗涤方法同 3.2.2。

3.2.6 加酶标记 SPA

3.2.6.1 HRP-SPA 标准物按使用说明书以稀释液稀释至工作浓度。

3.2.6.2 被检孔、标准阴性孔和标准阳性孔每孔加 HRP-SPA 标记物 0.1 mL。

3.2.6.3 空白对照孔亦加 0.1 mL。

3.2.6.4 加完后加盖,于室温(11℃~29℃)放置 30 min。

3.2.7 洗涤方法同 3.2.2。

3.2.8 加底物

每孔加现配制的底物溶液(见附录 A 中 A3)0.1 mL,于室温(11℃~29℃)放置 10 min。

3.2.9 终止反应

每孔加终止液(见附录 A 中 A4)2 滴,以终止反应。

3.3 判定

在对照孔成立的前提下,即在标准阳性孔呈深黄色,标准阴性孔呈无色或浅黄色,空白孔呈无色,判定检测结果。

3.3.1 目测判定

与标准阴性孔相比,颜色深于标准阴性孔者,即判定为 ELISA 法阳性病猪(+)。

3.3.2 酶联免疫检测仪判定(490 nm)

以空白对照孔调零,测定被检孔透光(OD)值。当 $OD \leq 0.22$,判定为 ELISA 法阴性(-);当 $OD \geq 0.26$,判定为 ELISA 法阳性(+);当 $0.23 \leq OD \leq 0.25$,判定为 ELISA 法疑似(±),疑似者复检一次,仍为疑似则判为阳性。

附录 A
(标准的附录)
溶 液 配 制

A1 抗原包被液(碳酸盐缓冲液, pH9.6)

B: 碳酸钠(Na_2CO_3)	3.18 g
蒸馏水	300 mL
C: 碳酸氢钠(NaHCO_3)	5.86 g
蒸馏水	700 mL

B、C 两液混合即为抗原包被液, 测 pH(现用现配)。

A2 稀释液(吐温-磷酸盐缓冲液, pH7.4)

B: 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	14.5 g
蒸馏水	202.5 mL
C: 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.14 g
蒸馏水	47.5 mL

B、C 两液混合后, 加氯化钠(NaCl)19 g 和少许蒸馏水, 溶解后加蒸馏水至 2 500 mL, 然后再加入吐温-20(Tween-20)1.25 mL, 即为稀释液, 测 pH(现用现配)。

该试剂既是被检猪抗体的稀释液, 又是洗涤液。

A3 底物溶液(磷酸盐-柠檬酸缓冲液, pH5.0)

B: 柠檬酸(无水)	0.96 g
蒸馏水	50 mL
C: 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	3.50 g
蒸馏水	50 mL

取 B 液 24.3 mL、C 液 25.7 mL 和蒸馏水 50 mL, 混合后加邻苯二胺 0.04 g, 避光溶解后, 加 30% 过氧化氢(H_2O_2)0.45 mL, 混匀后立即使用。

A4 终止液[2 mol/L 硫酸(H_2SO_4)]

蒸馏水	177.8 mL
浓硫酸(96%~98%)	22.2 mL

混匀即可。



中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪囊尾蚴病诊断技术
GB/T 18644—2002

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

开本 880×1230 1/16 印张 1/2 字数 9 千字
2002年5月第一版 2002年5月第一次印刷
印数 1—1 500

*

书号: 155066·1-18475 定价 14.00 元
网址 www.bzcbs.com

版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 18644—2002