



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 18644—2020  
代替 GB/T 18644—2002

---

## 猪囊尾蚴病诊断技术 Diagnostic techniques for porcine cysticercosis

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

---

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 目 次

前言 .....	III
引言 .....	IV
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 缩略语 .....	1
4 显微镜检查 .....	1
4.1 试剂 .....	1
4.2 仪器设备 .....	1
4.3 虫体采集 .....	2
4.4 压片制备 .....	2
4.5 显微镜检查 .....	2
4.6 显微镜检查结果判定 .....	2
5 PCR 法 .....	2
5.1 试剂 .....	2
5.2 仪器设备 .....	2
5.3 引物 .....	3
5.4 样品 .....	3
5.5 PCR操作程序 .....	3
5.6 扩增产物电泳检测 .....	4
5.7 试验成立条件 .....	4
5.8 PCR结果判定 .....	4
6 间接 ELISA .....	4
6.1 试剂 .....	4
6.2 仪器设备 .....	4
6.3 样品 .....	5
6.4 试验步骤 .....	5
6.5 试验成立条件 .....	6

6.6	ELISA结果判定 .....	6
7	Dot-ABC-ELISA .....	6
7.1	试剂 .....	6
7.2	仪器设备 .....	7
7.3	样品 .....	7
7.4	试验步骤 .....	7
7.5	试验成立条件 .....	8
7.6	Dot-ABC-ELISA结果判定 .....	8
8	综合判定 .....	8



附录 A (规范性附录) 生理盐水及猪囊尾蚴头节形态特征 .....	9
附录 B (规范性附录) PCR 引物位置、溶液配制及电泳结果 .....	10
附录 C (规范性附录) ELISA试剂及其配制 .....	12
附录 D (资料性附录) 猪囊尾蚴 TS-CC18 重组蛋白的制备 .....	14
附录 E (资料性附录) 间接酶联免疫吸附试验的加样 .....	16
附录 F (资料性附录) 猪囊尾蚴 TS-CC18 和烯醇化酶单克隆抗体的制备 .....	17
附录 G (资料性附录) Dot-ABC-ELISA相关试剂配制及结果判定 .....	20

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18644—2002《猪囊尾蚴病诊断技术》，与 GB/T 18644—2002 相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 范围部分增加了 PCR 和 Dot-ABC-ELISA 技术（见第 1 章）；
- 增加了缩略语部分（见第 3 章）；
- 增加了病原的 PCR 检测方法（见第 5 章）；
- 修改了酶联免疫吸附试验的检测抗原和检测步骤，直接对血清样品进行抗体检测（见第 6 章，2002 年版的第 3 章）；
- 增加了检测循环抗原的 Dot-ABC-ELISA 方法（见第 7 章）；
- 增加了综合判定（见第 8 章）；
- 增加了生理盐水及猪囊尾蚴头节图片（见附录 A），PCR 引物位置、溶液配制及电泳图片（见附录 B），ELISA 试剂及其配制（见附录 C，2002 年版的附录 A），猪囊尾蚴 TS-CC18 重组蛋白的制备（见附录 D），间接酶联免疫吸附试验加样示例（见附录 E），猪囊尾蚴 TS-CC18 和烯醇化酶单克隆抗体的制备（见附录 F），Dot-ABC-ELISA 相关试剂配制及结果判定（见附录 G）。

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农村部提出。

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：中国农业科学院兰州兽医研究所。

## 引 言

猪囊尾蚴病(porcine cysticercosis)是由猪带绦虫 (*Taeniasolium*) 的幼虫所引起的一种危害严重的人兽共患寄生虫病。世界动物卫生组织将该病列为需申报的疾病之一。目前,该病广泛存在于发展中国家,而且发达国家的病例也有逐年增加的趋势,不仅影响养猪业的发展,造成巨大的经济损失,而且还严重威胁人类健康。

猪囊尾蚴病的诊断包括病原学诊断与血清学诊断。病原学诊断的目的在于确定临床剖检样本中虫体的形态特征,在显微镜下观察头节顶突上有内外两圈排列整齐的小钩,即可判为猪囊尾蚴。若囊尾蚴主要寄生于肝脏,则要注意与亚洲带绦虫囊尾蚴相区别。目前,该病的生前诊断主要采用血清学方法,所用的抗原有机体抗原、囊液抗原或分泌代谢抗原等,虽然这些抗原的检测敏感性较高,但特异性差,而且抗原来源非常有限。鉴于以上原因,本次对 GB/T 18644—2002《猪囊尾蚴病诊断技术》的修订,除间接 ELISA所用抗原改为猪囊尾蚴期特异性 18 ku基因(TS-CC18)重组蛋白外,还增加了血清循环抗原(CAg)检测方法和病原的 PCR检测方法,以满足猪囊尾蚴病流行病学调查、药物治疗效果评价和动物流通风险评估等不同需求。

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及到第 6 章间接酶联免疫吸附试验(ELISA)相关的专利使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

# 猪囊尾蚴病诊断技术

## 1 范围

本标准规定了猪囊尾蚴病的显微镜检查、聚合酶链式反应法(PCR法)、间接酶联免疫吸附试验(间接ELISA)、斑点生物素-亲和素复合物酶联免疫吸附试验(Dot-ABC-ELISA)诊断技术及综合判定。

本标准适用于猪和野猪的囊尾蚴病诊断。

## 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。

CNAS-GL 029:2018 基因扩增领域检测实验室认可指南

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Avidin-HRP:亲和素-辣根过氧化物酶(Avidin-Horseradish Peroxidase)

DAB:二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine)

Dot-ABC-ELISA:斑点生物素-亲和素复合物酶联免疫吸附试验(Dot-Avidin-Biotin-Complex-ELISA)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

HRP:辣根过氧化物酶(Horse Radish Peroxidase)

IPTG:异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(Isopropyl β-D-Thiogalactoside)

NC:硝酸纤维素(Nitrocellulose)

OPD:邻苯二胺(O-phenylenediamine)



PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline)

PBST: 洗涤液 (PBS containing 0.5% Tween-20)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

TMB: 四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-Tetramethyl Benzidine)

#### 4 显微镜检查

##### 4.1 试剂

生理盐水配制见附录 A 中的 A.1。

##### 4.2 仪器设备

4.2.1 正置生物显微镜。

4.2.2 手术剪、手术刀、镊子。

4.2.3 载玻片。

## 4.2.4 微量可调移液器 (量程为 20 $\mu\text{L}$ ~200 $\mu\text{L}$ )。

### 4.3 虫体采集

肉眼观察舌肌、咬肌、内腰肌、膈肌、肩胛肌及心脏、肝脏、肺脏等组织，采集有可疑虫体寄生部位的肌肉或内脏组织，用手术刀将其切成约 1 cm 厚的薄片，仔细检查切口有无虫体。成熟的猪囊尾蚴为长椭圆形，大小为(6 mm~10 mm)  $\times$  5 mm,半透明，囊内充满液体，上有一粟粒大小的白色头节。脑内寄生的则为圆球形，直径 8 mm~ 10 mm。以手术刀和镊子剥离肌肉等组织中的囊尾蚴，用生理盐水洗净。

### 4.4 压片制备

以手术剪剪开囊壁，取出完整的头节，以滤纸吸干囊液后，将其置于两张载玻片之间并压片。

### 4.5 显微镜检查

将压片置于低倍显微镜(40 $\times$ )下，仔细观察虫体头节的形态和特征。

### 4.6 显微镜检查结果判定

如虫体头节的顶部有顶突，顶突上有内外两圈整齐排列的小钩，顶突的稍下方有四个均等的圆盘状吸盘(见图 A.1)，即判为猪囊尾蚴；如顶突无小钩则判为亚洲带绦虫囊尾蚴。猪囊尾蚴虫体应于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。

## 5 PCR法

### 5.1 试剂

#### 5.1.1 PCR试剂

5.1.1.1 10 $\times$ PCR缓冲液。

5.1.1.2 dNTP 预混液(2.5 mmol/L)。

5.1.1.3  $\text{MgCl}_2$ (25 mmol/L)。

5.1.1.4 Ex Taq<sub>酶</sub>(5 U/ $\mu\text{L}$ )。

#### 5.1.2 电泳试剂

5.1.2.1 电泳缓冲液：50  $\times$  TAE 贮存液(见附录 B 中的 B.2.1),临用时加蒸馏水配成 1  $\times$  TAE 缓冲液(见 B.2.2)。

5.1.2.2 琼脂糖：核酸电泳用琼脂糖。

5.1.2.3 电泳加样缓冲液：见 B.2.3。

5.1.2.4 DNA Marker(DNA 标志物)：条带大小依次为 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1 000 bp 和 2 000 bp。

## 5.2 仪器设备

5.2.1 PCR扩增仪。

5.2.2 台式低温高速离心机。

5.2.3 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

5.2.4 凝胶成像仪 (或紫外透射仪)。

5.2.5 微量可调移液器 (量程为 0.1  $\mu\text{L}$ ~2.5  $\mu\text{L}$ 、0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ )。

5.2.6 无核酸酶的离心管与吸头。

5.2.7 PCR扩增管。

5.3 引物

5.3.1 上游、下游引物序列

根据猪带绦虫线粒体 ND1 部分序列设计如下引物：

—上游引物：5'-CTA GGC CAC TTA GTA GTT TAG TTA-3';  
—下游引物：5'-CAT AAAACA CTC AAA CCT TAT AGA-3'。

PCR扩增片段的核苷酸序列及引物的位置见 B. 1。

5.3.2 引物储存液

用去离子水将每条引物配成 100  $\mu\text{mol/L}$  的储存液，置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存。

5.3.3 引物工作液

将上游、下游引物分别加去离子水配置为 10  $\mu\text{mol/L}$  的引物工作液。

5.4 样品

5.4.1 猪囊尾蚴虫体的采集，方法同 4.3。

5.4.2 阳性对照：用猪囊尾蚴虫体提取的 DNA。

5.4.3 阴性对照：依据虫体采集部位，用未感染猪肌肉或肝脏提取的 DNA。

5.5 PCR操作程序

5.5.1 DNA提取

用 DNA提取试剂盒提取囊尾蚴和肌肉的基因组 DNA。DNA提取应符合 CNAS-GL 029 : 2018 基因检测实验室区域的设置原则。

5.5.2 PCR反应体系

采用 50  $\mu\text{L}$  反应体系，扩增体系包括：

10 $\times$ PCR反应缓冲液	5 $\mu\text{L}$
dNTP(2.5 mmol/L)	4 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	4 $\mu\text{L}$
上游引物工作液(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1 $\mu\text{L}$

下游引物工作液(10  $\mu\text{mol/L}$ )

1  $\mu\text{L}$

Ex Taq<sub>酶</sub> (5 U/ $\mu\text{L}$ )

0.5  $\mu\text{L}$

DNA模板

100 ng

去离子水

补足至 50  $\mu\text{L}$

### 5.5.3 扩增程序

将 PCR扩增管放入扩增仪中，设定扩增程序：

—第一阶段，95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;

—第二阶段，95  $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 45  $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共进行 35 个循环；

—第三阶段, 72 °C延伸 5 min。

## 5.6 扩增产物电泳检测

**5.6.1 12%琼脂糖凝胶的制备**：称取 12 g 琼脂糖, 加入 100 mL 1×TAE 缓冲液 (见 B.2.1 和 B.2.2) 中。加热融化后加 5 μL 质量浓度为 10 mg/mL 的溴化乙锭, 混匀后倒入放置于水平台面上的凝胶盘中, 胶板厚 5 mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子 (胶中形成加样孔), 放入电泳槽中, 加 1×TAE 缓冲液浸没胶面约 3 mm。

**5.6.2 加样**：取 10 μL PCR 扩增产物和 2 μL 加样缓冲液 (见 B.2.3) 混匀后加入一个加样孔。每次电泳同时设标准 DNA Marker、阴性对照和阳性对照。

**5.6.3 电泳检测**：按 5 V/cm 恒压电泳至溴酚蓝染料距离凝胶底部约 1 cm 时, 停止电泳, 取出凝胶置于凝胶成像仪下观察。

## 5.7 试验成立条件

阳性对照样品有一条 474 bp 扩增条带, 阴性对照无条带或仅有引物二聚体条带 (<100 bp), 则试验成立。

## 5.8 PCR 结果判定

待测样品有一条 474 bp 的扩增条带, 可判定该虫种为猪囊尾蚴 (见图 B.1)。

## 6 间接 ELISA

### 6.1 试剂

**6.1.1 包被抗原**：猪囊尾蚴 TS-CC18 重组抗原。由构建的原核表达载体 pET-28a(+)-TS-CC18 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 筛选高表达菌株进行诱导表达, 采用 Ni 柱亲和层析纯化制备而成。使用时用碳酸盐包被缓冲液 (pH 9.6) 稀释至工作浓度。

**6.1.2 阴性对照血清**：健康猪血清。采自 3 月龄非疫区健康猪, 剖检确认无猪囊尾蚴感染; 猪全血经自然凝结法分离血清。检测时用样品稀释液稀释至工作浓度。

**6.1.3 阳性对照血清**：猪高免血清。由 TS-CC18 纯化抗原免疫健康猪制备, 检测时用样品稀释液稀释至工作浓度。

**6.1.4 酶结合物**：兔抗猪 IgG-HRP 结合物。检测时用样品稀释液稀释至工作浓度。

**6.1.5 碳酸盐包被缓冲液**：0.05 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液 (pH 9.6), 见附录 C 中的 C.1。

**6.1.6 洗涤缓冲液**：含 0.5% 吐温-20 的 0.002 mol/L PBS (pH 7.2~7.4), 见 C.2。

**6.1.7 封闭液**：含 0.25% BSA 和 0.25% 酪蛋白等的 0.01 mol/L PBS (pH 7.2~7.4), 见 C.3 和 C.4。

**6.1.8 样品稀释液**：含 0.5% BSA 的 0.02 mol/L PBS (pH 7.2~7.4), 见 C.5 和 C.6。

**6.1.9 底物溶液**：OPD 底物溶液, 见 C.7。

6.1.10 终止液：20 mol/L 的硫酸溶液，见 C.8。

6.2 仪器设备

6.2.1 台式低温高速离心机。

6.2.2 酶标仪（带 450 nm、490 nm 和 630 nm 波长滤光片）。

6.2.3 酶标板(96 孔)。

6.2.4 与 96 孔酶标板配套使用的振荡器。

6.2.5 血清稀释板。

6.2.6 37 °C恒温培养箱、湿盒。

6.2.7 洗板机或洗涤瓶。

6.2.8 单道可调移液器(量程为 0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$  和 1 mL~5 mL)。

6.2.9 多道微量可调移液器(量程为 20  $\mu\text{L}$ ~300  $\mu\text{L}$ )。

6.2.10 与移液器匹配的各种吸头。

6.2.11 量筒(100 mL和 2 000 mL)。

6.2.12 计时器。

6.2.13 贮液槽。

6.2.14 封板膜。

6.2.15 纱布和吸水纸等。

### 6.3 样品

采集猪全血, 5 mL/头, 置 4 °C析出血清后, 3 000 g离心 15 min,取上层血清作为待测样品。

### 6.4 试验步骤

#### 6.4.1 猪囊尾蚴 TS-CC18 重组抗原制备

构建原核表达载体 pET-28a(+)-TS-CC18,转化大肠杆菌 BL21(DE3),筛选的阳性菌株用终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 进行诱导表达,获得带 6 个组氨酸(His) 标签的 TS-CC18 重组蛋白;采用 Ni Sepharose 6FF亲和层析法进行纯化。TS-CC18 重组抗原详细制备及鉴定方法参见附录 D。

#### 6.4.2 酶标板包被及封闭

将纯化的 TS-CC18 蛋白按终浓度 50  $\mu\text{g/mL}$ 稀释于 pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液(见 C.1)中;每孔 100  $\mu\text{L}$ 加入 96 孔酶标板,4 °C包被过夜。PBST洗板 3 次后,每孔加 120  $\mu\text{L}$ 封闭液 1(见 C.4)于 37 °C作用 2 h。PBST洗板 3 次,在干净纱布或吸收纸巾上拍干。经干燥仪充分干燥,用真空包装机密封于铝箔袋中(含干燥剂),贴签,4 °C保存备用。

#### 6.4.3 样品

将待检血清及阴性、阳性对照血清用样品稀释液分别作 1 : 50 稀释(294  $\mu\text{L}$  样品稀释液加血清 6  $\mu\text{L}$ ),混匀备用。

#### 6.4.4 加对照血清和待检血清

参照附录 E 中的图 E.1 加样示例图进行加样。ELISA 板 A1、A2 和 A3 设为空白对照孔,A4、A5 和 A6 加阴性对照血清;H10、H11、H12 加阳性对照血清;其余孔加待检血清样品,每份样品横向测 3 个



复孔, 每孔 100  $\mu\text{L}$ ,用封板膜封口, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min。

#### 6.4.5 洗涤

每孔中加 300  $\mu\text{L}$  PBST,重复洗涤 3 次后在吸水纸上拍干。

#### 6.4.6 加酶标抗体

用样品稀释液将兔抗猪酶标抗体稀释至工作浓度(1 : 20 000), 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 封板后同前孵育 60 min。

以上内容仅为本文档的试下载部分, 为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文, 请访问:

<https://d.book118.com/425031204244011300>