



中华人民共和国国家标准

GB/T 22329—2008

牛皮蝇蛆病诊断技术

Diagnostic techniques for bovine hypodermosis

2008-08-22 发布

2008-12-01 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

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 均为规范性附录。

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：中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人：殷宏、罗建勋、关贵全。

牛皮蝇蛆病诊断技术

1 范围

本标准规定了牛皮蝇蛆病(bovine hypodermosis)诊断技术的要求,包括临床诊断、动物剖检和酶联免疫吸附试验(ELISA)。

本标准适用于牛皮蝇蛆病的诊断。

2 临床诊断及剖检检查

2.1 临床诊断

牛感染皮蝇后,一般不呈现明显的临床症状,但严重感染时,幼畜可表现出消瘦、生长缓慢、贫血,母牛产乳量下降,役畜的使役能力降低等症状。当皮蝇幼虫钻入脑部时,可引起神经症状,如作后退运动、突然倒地、麻痹或晕厥等,重者可造成死亡。此外,由于第三期幼虫在皮肤上形成穿孔,细菌感染而引起化脓,形成瘻管,常有脓液和浆液流出,瘻管逐渐愈合,形成斑痕。但上述症状只能作为诊断的参考指标,不能作为确诊的依据。只有当在牛的背部发现瘤肿状隆起和皮下蜂窝组织炎,且可挤出第三期幼虫时,方能确诊。

2.2 剖检检查

当对疫区开展流行病学调查时,经常采用此方法。重点检查部位为食道黏膜、背部皮下、瘤胃浆膜、大网膜、食道浆膜等部位,如发现第一期、第二期或第三期任一阶段的幼虫,便可确诊。

2.2.1 第一期幼虫的形态

呈乳白色,长 3.5 mm~12 mm,宽 0.75 mm~2 mm,前端稍尖。

2.2.2 第二期幼虫的形态

呈浅黄白色,长 11 mm~15 mm,宽 3 mm~6 mm。腹面微隆,背面平。外观口钩仅见两个黄褐色的小圆点,彼此分离。

2.2.3 第三期幼虫的形态

虫体长 19 mm~25 mm,宽 8 mm~11 mm,长宽比例(2.3~2.1):1,背面平,腹面隆起,侧面有疣状突,色泽因成熟程度不同而异,由淡黄白至淡褐色、黄褐色以至黑色,体具 11 节(胸部 3 节、腹部 8 节),伪头部具一对头感器,彼此分离。口钩退化为黑色圆点。

3 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)

3.1 试验材料

3.1.1 抗原

制备方法见附录 A。

3.1.2 标准阳性血清

自牛皮蝇蛆病流行区颈静脉采集背部有瘤包牛的血液,分离血清,经国外商品化试剂盒检测为阳性后,按 3:1(3 体积血清:1 体积甘油)加入甘油,混匀,分装于 1.5 mL 离心管,−20 ℃ 保存备用。

3.1.3 标准阴性血清

自无牛皮蝇蛆病流行的南方省份经颈静脉采集牛的血液,分离血清,经国外商品化试剂盒检测为阴性后,按 3:1(3 体积血清:1 体积甘油)加入甘油,混匀,分装于 1.5 mL 离心管,−20 ℃ 保存备用。

3.1.4 酶标记二抗

辣根过氧化物标记的兔抗牛 IgG,自生化试剂公司购买。

3.1.5 血清样品的采集和处理

颈静脉采集动物血清,加叠氮化钠(0.01%)或硫柳汞(0.01%)进行防腐,4℃冷藏保存。

3.1.6 溶液配制

自行配制,配置方法见附录 B。

3.2 操作方法

3.2.1 抗原包被

用抗原包被液将抗原按使用说明稀释至工作浓度;用加样器加工作浓度抗原至 ELISA 反应板各孔内,每孔 100 μL,加盖后在 37℃温箱内孵育 1 h,然后置 4℃冰箱过夜;将包被液甩净,用洗涤液在洗板上按 3×300 μL 程序,或用洗瓶重复洗涤 5 次。

3.2.2 封闭

每孔加入封闭液 200 μL,37℃温箱内孵育 30 min,甩干,按 3.2.1 方法洗涤。

3.2.3 血清稀释

用血清稀释液将待检血清和标准血清作 1:200 稀释。

3.2.4 加样

按照附录 C 格式每孔加 100 μL 待检血清,试验要同时设空白对照、酶标记二抗对照、标准阳性血清对照和标准阴性血清对照。空白对照孔(A1,A2,B1,B2)和酶标记二抗对照孔(C1,C2,D1,D2)各加 100 μL 血清稀释液,加盖后 37℃温箱内孵育 1 h。用 3.2.1 方法进行洗涤。

3.2.5 加酶标记二抗

按说明书用洗涤液将酶标记二抗稀释至工作浓度,每孔加入 100 μL,但空白对照孔只加相应稀释液,加盖后于 37℃温箱内孵育 1 h。用 3.2.1 方法进行洗涤。

3.2.6 加底物

每孔加入现配制的底物溶液 100 μL,加盖后于 37℃避光温箱内孵育 40 min。

3.3 判定

3.3.1 酶联免疫检测仪测定

用空白对照调零,在 405 nm 波长处,测定每孔的光吸收值(OD 值),分别计算出每份被检样品孔、标准阳性孔和标准阴性孔的平均 OD 值。在 P/N 值(P 为标准阳性血清的平均 OD 值,N 为标准阴性血清的平均 OD 值)大于 2 时,测定结果方为有效。否则,应查明原因,重做。

3.3.2 结果判定

3.3.2.1 当结果有效时,利用式(1)求出 OD 比值。

$$\text{OD 比值} = \frac{\text{待检血清样品平均 OD 值} - \text{标准阴性血清平均 OD 值}}{\text{标准阳性血清平均 OD 值} - \text{标准阴性血清平均 OD 值}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

3.3.2.2 OD 比值小于或等于 15%,判定为 ELISA 法阴性(-);OD 比值在 16%~20%,判定为 ELISA 法疑似(±);OD 比值大于或等于 21%,判定为 ELISA 法阳性。疑似者复检一次,仍为疑似者判为阳性。

附 录 A
(规范性附录)
抗原的制备

- A.1 取 100 条新鲜采集或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的纹皮蝇二期幼虫,置于干净的 50 mL 烧杯中,用剪刀剪碎。
- A.2 加入 100 mL pH7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌过夜。
- A.3 第二天加入 15.54 g 硫酸铵, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 轻摇 30 min。
- A.4 10 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,丢弃沉淀,收集上清液。
- A.5 在上清液中加入 15.54 g 硫酸铵, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 轻摇 30 min,10 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,弃上清,收集沉淀。
- A.6 将沉淀重溶于 20 mL pH7.2 磷酸盐缓冲液中,装入透析袋,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 在清水中搅动透析 1 h,然后换用 pH7.2 磷酸盐缓冲液,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 透析过夜。
- A.7 取出透析产物,10 000 r/min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 50 min。
- A.8 收集上清,用紫外分光光度计测定蛋白含量,计算出抗原浓度,分装于 1.5 mL 离心管, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

附 录 B
(规范性附录)
溶 液 配 制

B.1 抗原包被液(pH9.6,0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液)

碳酸氢钠(NaHCO_3)	2.93 g
碳酸钠(Na_2CO_3)	1.5 g
蒸馏水	900 mL

用 1 mol/L 的盐酸调 pH 值至 9.6,加蒸馏水至 1 000 mL,于 4 ℃ 保存备用。

B.2 洗涤液(0.01 mol/L,pH 7.4 PBST)**B.2.1 磷酸盐缓冲液(pH7.2)**

氯化钠(NaCl)	40 g
氯化钾(KCl)	1 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	17.9 g
蒸馏水	4.9 L

用 1 mol/L 的盐酸或 1 mol/L 的氢氧化钠调 pH 值至 7.2,加蒸馏水至 5 L。

B.2.2 洗涤液

磷酸盐缓冲液(pH7.2)	999.5 mL
Tween-20	0.5 mL

B.3 封闭液

明胶	0.5 g
抗原包被液	100 mL

称取 0.5 g 明胶,加入 5 mL 抗原包被液,加热溶解,然后再加入 95 mL 抗原包被液,冷却至室温备用。

B.4 血清稀释液

明胶	0.5 g
洗涤液	100 mL

称取 0.5 g 明胶,加入 5 mL 洗涤液,加热溶解,然后再加入 95 mL 洗涤液,冷却至室温备用。

B.5 底物溶液**B.5.1 柠檬酸盐缓冲液(0.1 mol/L,pH4.0)**

柠檬酸	10.5 g
氢氧化钠	3.25 g
蒸馏水	400 mL

用 1 mol/L 的盐酸调 pH 值至 4.0,加蒸馏水至 500 mL,4 ℃ 保存备用。

B.5.2 底物储存液

ABTS	0.1 g
蒸馏水	4.5 mL

分装，-20 ℃保存备用。

B.5.3 过氧化氢(H₂O₂)稀释液(临用前配制)

30%过氧化氢	25 μL
柠檬酸盐缓冲液	725 μL

B.5.4 底物工作液(临用前配制)

柠檬酸盐缓冲液	15 mL
过氧化氢(H ₂ O ₂)稀释液	60 μL
ABTS 储存液	75 μL

附 录 C
(规范性附录)
酶标板使用格式

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	稀释液 对照		样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
B			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	酶标记 二抗对照		样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
D			11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
E	标准阴性 对照		样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
F			21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
G	标准阳性 对照		样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品	样品
H			31	32	33	34	34	36	37	38	39	40

图 C. 1