



中华人民共和国国家标准

GB/T 14926.46—2008
代替 GB/T 14926.46—2001

实验动物 钩端螺旋体检测方法

Laboratory animal—Method for examination of *Leptospira* spp.

2008-12-03 发布

2009-03-01 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

前 言

GB/T 14926《实验动物》共 54 个部分,为不同微生物和病毒检测技术方法。

本部分自实施之日起代替 GB/T 14926.46—2001《实验动物 钩端螺旋体检测方法》。

本部分与 GB/T 14926.46—2001 相比主要技术差异如下:

- a) 原理部分增加显微镜凝集试验原理;
- b) 原标准中“6.1 试管凝集实验”修改为“显微镜凝集实验”;“6.1.2.2 表 1 钩端螺旋体定量显凝试验操作方法”更改为“钩端螺旋体定量显微镜凝集试验操作方法”;
- c) 修改原标准中所有关于酶联免疫吸附试验的内容;
- d) 在原标准中增加了“7 结果判定”。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会提出并归口。

本部分由全国实验动物标准化技术委员会负责起草。

本部分主要起草人:范薇、田克恭、贺争鸣。

本部分所代替标准历次版本发布情况为:

——GB/T 14926.46—2001。

实验动物 钩端螺旋体检测方法

1 范围

GB/T 14926 的本部分规定了实验动物钩端螺旋体的检测方法。

本部分适用于犬钩端螺旋体的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 14926 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 14926.42 实验动物 细菌学检测 标本采集

GB/T 14926.43 实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂

GB/T 14926.50 实验动物 酶联免疫吸附试验

3 原理

钩端螺旋体抗原与相应特异性抗体相遇,在适宜的电解质存在下发生凝集现象,此种凝集一般须用暗视野显微镜检查。

钩端螺旋体抗原与待检血清中的特异性抗体结合,形成抗原抗体复合物。此抗原抗体复合物仍保持其抗原活性,可与相应的第二抗体酶结合物结合。在酶的催化作用下底物发生反应,产生有色物质。颜色反应的深浅与待检血清中所含有的特异性抗体的量成正比。

4 主要设备和材料

- 4.1 普通恒温培养箱。
- 4.2 实体显微镜。
- 4.3 恒温水浴箱。
- 4.4 高速离心机。
- 4.5 超声波细胞粉碎器。
- 4.6 酶标仪。
- 4.7 微量加样器,容量 $5\ \mu\text{L}$ ~ $50\ \mu\text{L}$ 和 $50\ \mu\text{L}$ ~ $200\ \mu\text{L}$ 。

5 培养基及试剂

- 5.1 犬型钩端螺旋体标准抗原。
- 5.2 标准阳性血清。
- 5.3 标准阴性血清。
- 5.4 生理盐水。
- 5.5 显微镜凝集抗原:各群钩端螺旋体标准株接种 Korthof 培养基,28℃培养 5 d~7 d。取样作暗视野显微镜检查,每 400 倍视野不少于 50 条,运动活泼并无自凝现象者,可作为抗原。
- 5.6 ELISA 抗原
 - 5.6.1 钩端螺旋体培养:各群钩端螺旋体标准株接种 Korthof 培养基,28℃培养 5 d~7 d。

- 5.6.2 生长良好的培养物用 10 000 r/min 离心 30 min, 沉淀用 PBS 在相同条件下洗 2 次。
- 5.6.3 上述沉淀用 PBS 悬浮, 超声波打碎后, 10 000 r/min 离心 20 min, 上清即为 ELISA 抗原。
- 5.7 酶结合物: 辣根过氧化物酶标记羊或兔抗犬 IgG 抗体, 辣根过氧化物酶标记葡萄球菌蛋白 A(SPA)。
- 5.8 阳性血清: 钩端螺旋体免疫 SPF 犬所获得的血清, 或自然感染犬后所获得的血清。
- 5.9 阴性血清: 无钩端螺旋体感染犬血清。
- 5.10 培养基和试剂溶液的配制: 参照 GB/T 14926.43 和 GB/T 14926.50 执行。

6 检测方法

6.1 显微镜凝集实验

6.1.1 检测程序

检测程序见图 1。

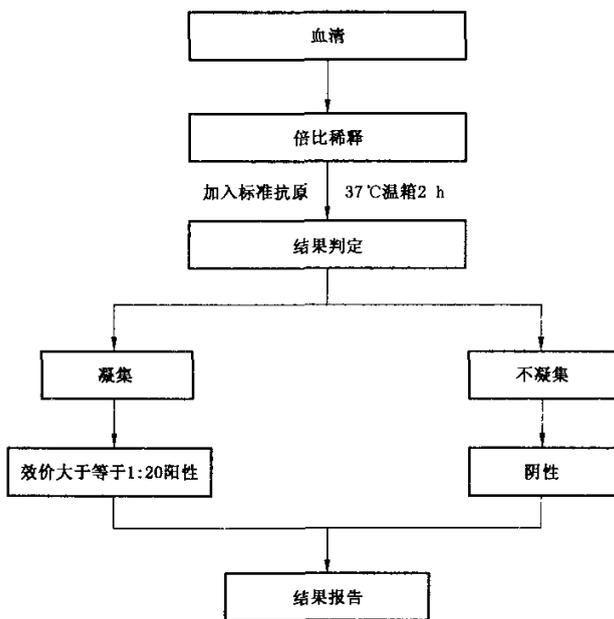


图 1 检测程序

6.1.2 操作步骤

6.1.2.1 采样

采血、分离血清。采样方法参照 GB/T 14926.42 执行。

6.1.2.2 血清稀释

参照表 1 进行。

表 1 钩端螺旋体定量显微镜凝集试验操作方法

凹孔板编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
生理盐水/mL	0.16	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			0.1
待检血清/mL	0.04 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	0.1 ↗	弃去	0.1	
阴性血清/mL										0.1		
阳性血清/mL											0.1	
标准抗原/mL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
血清最终稀释度	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280	1/2 560			

6.1.2.2.1 待检血清灭活：将待检血清以 56 ℃ 水浴灭活 30 min 后备用。

6.1.2.2.2 取 96 孔板，第 1 孔加入生理盐水 0.16 mL，以后每孔加入生理盐水 0.1 mL，一直加到第 9 孔。

6.1.2.2.3 在第 1 孔中加入血清 0.04 mL，混匀后，吸取 0.1 mL 到第 2 孔，如此类推，直到第 9 孔，弃去 0.1 mL。

6.1.2.3 对照

另标明 10、11、12 孔，第 10 孔加入阴性血清 0.1 mL，第 11 孔加入阳性血清 0.1 mL，第 12 孔加入生理盐水 0.1 mL。

6.1.2.4 加入抗原

将各孔加入标准抗原 0.1 mL，混匀，此时各孔血清稀释度为 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160, 1 : 320, 1 : 640, 1 : 1 280, 1 : 2 560。具体操作见表 1。置 37 ℃ 温箱 2 h，取出后摇匀，用接种环挑取各孔中的反应物置于载玻片上，在暗视野下观察结果。

6.1.2.5 结果判定

结果判定如下：

- a) ++++：几乎全部钩端螺旋体呈蝌蚪状或折光率高的团块，或有大小不等的点状或块状残片，仅有少数游离的钩端螺旋体；
- b) +++：75% 的钩端螺旋体被凝集，大部分呈块状或蜘蛛状，尚有 25% 菌体游离；
- c) ++：50% 左右的钩端螺旋体被凝集，尚有 50% 菌体游离；
- d) +：25% 左右的钩端螺旋体被凝集，尚有 75% 菌体游离；
- e) -：全部菌体正常，分散，无凝集块，菌数与对照相同。

待检血清凝集效价在 1 : 20 达到“++”或以上时，均判为阳性反应。

6.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)

6.2.1 包被抗原

根据滴定的最适工作浓度，将抗原用包被液稀释。每孔 100 μL，置 37 ℃ 1 h 后再 4 ℃ 过夜。

6.2.2 用洗涤液洗 3 次，每次 5 min，叩干。

6.2.3 加样

待检血清和阴性、阳性血清分别用稀释液做 1 : 160 稀释，每孔 100 μL，37 ℃ 1 h，洗涤同上。

6.2.4 加酶结合物

用稀释液将酶结合物稀释至适当浓度，每孔加入 100 μL，37 ℃ 1 h，洗涤同上。

6.2.5 加底物溶液

每孔加入新配制的底物溶液 100 μL，置 37 ℃，避光显色 10 min~15 min。

6.2.6 终止反应

每孔加入终止液 50 μL。

6.2.7 测 A 值

在酶标仪上，于 490 nm 处读出各孔 A 值。

6.2.8 结果判定

在阴性和阳性血清对照成立的条件下，进行结果判定。

6.2.8.1 同时符合下列 2 个条件者，判为阳性：

- a) 待检血清的 A 值大于等于 0.2；
- b) 待检血清的 A 值/阴性对照血清的 A 值大于等于 2.1。

6.2.8.2 均不符合上述 2 个条件者，判为阴性。

6.2.8.3 仅有 1 条符合者，判为可疑，需重试。如仍为阳性则判为阳性。

6.2.8.4 对阳性结果需重试，如仍为阳性则判为阳性。

7 结果判定

7.1 基础级犬

如接种疫苗后,经 ELISA 检测抗体效价大于等于 1:160,或显微镜凝集检测抗体效价大于等于 1:20 判为合格。被检动物免疫抗体合格率大于等于 70%可判为该犬群免疫合格。

$$\text{免疫抗体合格率} = (\text{被检动物抗体阳性数} / \text{被检动物总数}) \times 100\%$$

7.2 SPF 级犬

不应进行疫苗接种,或未进行免疫的基础级犬,对阳性检测结果,选用同一种方法或另一种方法重试。如仍为阳性则判为阳性。

8 结果报告

根据判定结果,作出报告。
