



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 18642—2021  
代替 GB/T 18642—2002

## 旋毛虫诊断技术

Diagnostic techniques for *Trichinella* spp.

2021-04-30 发布

2021-11-01 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 术语和定义 ..... 1

4 缩略语 ..... 1

5 压片镜检法 ..... 2

6 集样消化法 ..... 3

7 酶联免疫吸附试验法(ELISA 法) ..... 4

8 荧光免疫层析试纸卡法 ..... 7

9 多重聚合酶链式反应法(多重 PCR 法) ..... 9

10 综合判定 ..... 12

附录 A(规范性附录) 压片镜检法溶液配制及判定示意图 ..... 13

附录 B(规范性附录) 消化液配制 ..... 14

附录 C(资料性附录) 旋毛虫集样消化法流程图 ..... 15

附录 D(规范性附录) 酶联免疫吸附试验用溶液配制 ..... 16

附录 E(规范性附录) 荧光免疫层析试纸卡试验用溶液配制 ..... 18

附录 F(资料性附录) 荧光免疫层析试纸卡结构及判定示意图 ..... 19

附录 G(规范性附录) 多重 PCR 法用溶液配制 ..... 20

参考文献 ..... 21



## 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 18642—2002《猪旋毛虫病诊断技术》，与 GB/T 18642—2002 相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

- 增加了规范性引用文件(见第 2 章)；
- 增加了术语和定义(见第 3 章)；
- 增加了缩略语(见第 4 章)；
- 增加了酶联免疫吸附试验(ELISA)诊断方法、酶联免疫吸附试验用溶液的配制(见第 7 章、附录 D)；
- 增加了荧光免疫层析试纸卡诊断方法、荧光免疫层析试纸卡试验用溶液配制、荧光免疫层析试纸卡结构及判定示意图(见第 8 章、附录 E 和附录 F)；
- 增加了用于旋毛虫虫种鉴定的多重聚合酶链式反应(多重 PCR)诊断方法、多重 PCR 法用溶液配制(见第 9 章、附录 G)；
- 增加了综合判定(见第 10 章)；
- 增加了压片镜检法溶液配制及判定示意图(见附录 A)；
- 增加了消化液的配制(见附录 B)；
- 增加了旋毛虫集样消化法流程图(见附录 C)。

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：吉林大学、中国动物卫生与流行病学中心、中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所。

本标准主要起草人：刘明远、刘晓雷、王媛媛、吴秀萍、董雅琴、白雪、王学林、唐斌、杨勇、丁静。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 18642—2002。

## 引 言

旋毛虫(*Trichinella* spp.)由英国学者 James Panes Paget 于 1835 年首次在伦敦一人尸体内发现,同年 Richard Owen 把该病原定名为 *Trichinella spiralis*。目前,旋毛虫经种属鉴定已发现 9 个种及 3 个尚未明确的基因型。旋毛虫是一种危害严重的人兽共患寄生虫病,可感染人和 150 多种动物,主要通过生食或半生食寄生有活旋毛虫的肉类(如猪肉、马肉、犬肉及野生动物肉等)而引发。人旋毛虫病(Human Trichinellosis)的潜伏期长达 2 周~4 周,死亡率 2%~30%。该病被世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health,OIE)列为屠宰动物(尤其是猪、马)强制性必检病种,是目前世界范围内投入控制费用最高的人兽共患病。我国《一、二、三类动物疫病病种名录》将其列为二类动物疫病。

本标准的修订参考了 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》2017 版(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals,2017)、国际旋毛虫病委员会(International Commission on Trichinellosis,ICT)《血清学试验检测动物和人体旋毛虫感染的建议》2018 版(Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and humans,2018)和《旋毛虫肌幼虫基因分型建议》2018 版(Recommendations for genotyping *Trichinella* muscle stage larvae,2018)相关国际标准。血清学诊断增加了酶联免疫吸附试验(ELISA)和荧光免疫层析试纸卡两种技术,血清学诊断技术判定为旋毛虫感染阳性或疑似阳性的样本可进一步通过消化法确证;分子生物学诊断增加了多重聚合酶链反应(多重 PCR)技术。





# 旋毛虫诊断技术

## 1 范围

本标准规定了家畜（猪、马和犬属动物）和野生动物旋毛虫病原学诊断、酶联免疫吸附试验（ELISA）、荧光免疫层析试纸卡、多重聚合酶链式反应（多重 PCR）检测方法的技术要求和操作规范。

本标准适用于猪产地检疫、屠宰加工、流行病学调查和进出口检验检疫，以及其他动物及其肉类的旋毛虫诊断。所列方法包括病原学、血清学及分子生物学诊断，其中：

- 压片镜检法及集样消化法适用于猪及其他动物胴体的旋毛虫诊断；
- ELISA 及荧光免疫层析试纸卡方法适用于猪及其他动物活体及胴体的旋毛虫筛查；
- 多重 PCR 方法适用于旋毛虫分离株种属及基因型的鉴定。

## 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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**集样消化** pooled digestion

混合多个动物肌肉样本，在一定温度和 pH 值条件下，用一定浓度的胃蛋白酶溶液，溶解其肌细胞。

### 3.2

**排泄分泌物** excretory-secretory products

旋毛虫通过表皮分泌或通过消化道排出的各种分子产物。

### 3.3

**包囊** cysts

旋毛虫侵入宿主肌细胞后，在虫体周围形成的由胶原纤维构成的、逃避宿主免疫攻击的囊壁。

### 3.4

**肌幼虫** muscle larvae

寄生于宿主肌细胞时期的旋毛虫幼虫。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DMEM：杜氏改良伊格尔培养基（Dulbecco's modified Eagle medium）

EDC：1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide]

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

HEPES:4-羟乙基哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]

IL-ESP:肠道期幼虫排泄分泌物(intestinal larvae-excretory/secretory products)

MES:2-吗啉乙磺酸(2-morpholinoethanesulfonic acid)

ML-ESP:肌幼虫排泄分泌物(muscle larvae-excretory/secretory products)

NHS:*N*-羟基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide)

PBS:磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline buffer)

SD:标准差(standard deviation)

## 5 压片镜检法

### 5.1 器材

5.1.1 正置生物显微镜。

5.1.2 手术剪、镊子。

5.1.3 夹压玻璃板。

5.1.4 微量可调移液器(200  $\mu$ L)。

### 5.2 试剂

5.2.1 盐酸溶液,见附录 A 的 A.1。

5.2.2 本标准所有试验用水均应符合 GB/T 6682 中一级水标准。

### 5.3 操作方法

#### 5.3.1 样本采集

从完整胴体两侧的横膈膜肌脚部各采样一块,记为一份肉样,其质量不少于 50 g,编号与胴体号码相同。不完整胴体,可从肋间肌、腰肌、咬肌、舌肌采样。

#### 5.3.2 样本处理

剥离脂肪和结缔组织,用剪刀顺肌纤维方向,按随机采样的要求,从样本上至少剪取 28 粒燕麦粒(2 mm $\times$ 10 mm)大小的肉样,将肉样均匀地放置在夹压玻璃板上,排成一排,每个夹压玻璃板可放置 16 粒。

#### 5.3.3 压片

将另一夹压玻璃板重叠在放有肉样的玻璃板上,并旋动螺丝,加压使肉粒压成半透明薄片。

#### 5.3.4 镜检

将制好的压片放在低倍显微镜下(放大倍数 4 $\times$ 10),从压片一端边沿开始观察,直到另一端为止。不清晰处,可在 10 $\times$ 10 的放大倍数下进一步观察。

### 5.4 结果判定

5.4.1 肌细胞内有圆形或椭圆形包囊,且包囊中央有蜷曲的虫体,判定为形成包囊的旋毛虫。旋毛虫包囊镜下判定示意图见图 A.1。

5.4.2 肌细胞内有呈直杆状或略蜷曲状态虫体,判定为无包囊的旋毛虫。无包囊旋毛虫镜下判定示意图见图 A.2。

- 5.4.3 发现数量不等、浓淡不均的黑色钙化物,可开启夹压玻片,加入少许 10%的盐酸溶液,静置 1 min~2 min 后,再行观察,结果判定同 5.4.1 和 5.4.2。
- 5.4.4 发现形成包裹的旋毛虫和无包裹的旋毛虫均判定为旋毛虫感染。

6 集样消化法

6.1 器材

- 6.1.1 手术剪。
- 6.1.2 不锈钢筛网(筛孔直径 180 μm)。
- 6.1.3 漏斗。
- 6.1.4 分液漏斗。
- 6.1.5 烧杯(1 L 和 3 L)。
- 6.1.6 离心管(50 mL)。
- 6.1.7 电动刀式绞肉机或碎肉机(孔径≤3 mm)。
- 6.1.8 温度计。
- 6.1.9 磁力搅拌器和转子。
- 6.1.10 恒温培养箱。
- 6.1.11 倒置显微镜。
- 6.1.12 培养皿(带标尺)。

6.2 试剂

- 6.2.1 盐酸水溶液,见附录 B 的 B.1。
- 6.2.2 消化液,见 B.2。

6.3 操作流程

操作流程见附录 C 的图 C.1。

6.4 操作方法

6.4.1 样本采集

6.4.1.1 采集部位

猪主要采集膈肌脚和舌肌,其他动物采集部位见表 1。

表 1 不同被检宿主可选择的肌肉样本

宿主种类	主要选择的肌肉	检测质量/g
猪	膈肌、舌肌	3~5
马	咬肌、舌肌	5~10
犬	膈肌、咬肌、舌肌	5~10
野猪	膈肌、腓肠肌、舌肌	5~10
熊	膈肌、咬肌、舌肌	10
海洋哺乳动物 (海豹、海象)	膈肌、舌肌、鳍肌	10
鳄鱼	咬肌、肋间肌	10
其他野生肉食动物	舌肌、腓肠肌	10

#### 6.4.1.2 样本数量

每只动物可采集 100 g 肌肉组织样本,或将数只动物肌肉样本混合为 100 g(混合动物数量 $\leq$ 30 个)。生食或半生食肉类习俗以及旋毛虫病高发地区,混合动物数量 $\leq$ 20 个。

#### 6.4.2 样本处理

剥离脂肪和结缔组织,与 100 g 肉样同等体积的盐酸水溶液(B.1)混合,用刀式电动绞肉机短时间(5 s~10 s)绞碎 10 次~20 次或用碎肉机搅碎,至样本无可见细碎块为止。

#### 6.4.3 样本消化

6.4.3.1 将搅碎样本取出,放入 3 L 烧杯中,用预热的  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  消化液冲洗绞肉机或碎肉机中残留样本,并用预热的消化液补足至 2 L(即每克样本加入 20 mL 消化液)。

6.4.3.2 用锡箔纸覆盖烧杯防止溶液飞溅,置于加热磁力搅拌器上(烧杯内放入磁力搅拌转子),或置于普通搅拌器并将搅拌器放入  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中,持续加热搅拌 30 min~60 min(可根据实际情况适当延长或缩减时间),至消化液中无肉眼可见碎肉为止。

#### 6.4.4 样本过滤

6.4.4.1 取不锈钢筛网(筛孔直径 180  $\mu\text{m}$ ),放置于漏斗上方,漏斗下方接一分液漏斗,消化完成后 5 min 内将样本混悬液倒入筛网。

6.4.4.2 过滤后的烧杯和筛网用至少 100 mL 的温水( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ )冲洗,以确保筛网上没有虫体残留(允许存留少量不易消化的脂肪和结缔组织)。

6.4.4.3 若筛网上有碎肉残渣,则需将碎肉残渣重新消化。

#### 6.4.5 样本沉淀及漂洗

6.4.5.1 将滤液在分离漏斗中沉淀 30 min,使旋毛虫沉到底部,此时完全开启漏斗开关,将底部混悬液(约 40 mL)移入 50 mL 的离心管中。

6.4.5.2 将离心管中的混悬液静置 10 min,弃去部分上清液,保留 10 mL 底部混悬液。

6.4.5.3 如底部混悬液仍较为混浊,则向底部混悬液中加入 30 mL 温水( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),重复 6.3.5.2,直至底部混悬液清澈。

#### 6.4.6 镜检

将滤清的沉淀物倒入有标尺的培养皿中,在倒置显微镜(放大倍数  $4\times 10$  或  $10\times 10$ )下观察有无虫体和钙化包裹。

### 6.5 结果判定

结果判定如下:

——显微镜下发现旋毛虫或钙化包裹,可确诊为旋毛虫感染。

——混合样本为阳性时,需对每个样本进行单独消化镜检,以最终确定感染动物个体。

## 7 酶联免疫吸附试验法(ELISA 法)

### 7.1 器材

#### 7.1.1 手术剪。

- 7.1.2 不锈钢筛网(筛孔直径 180  $\mu\text{m}$ )。
- 7.1.3 漏斗。
- 7.1.4 分液漏斗。
- 7.1.5 烧杯(1 L 和 5 L)。
- 7.1.6 离心管(15 mL 和 50 mL)。
- 7.1.7 注射器(10 mL)。
- 7.1.8 电动刀式绞肉机或碎肉机(孔径 $\leq 3$  mm)。
- 7.1.9 温度计。
- 7.1.10 磁力搅拌器和转子。
- 7.1.11 恒温培养箱。
- 7.1.12 显微镜。
- 7.1.13 一次性针头滤器(0.22  $\mu\text{m}$ )。
- 7.1.14 细胞培养箱。
- 7.1.15 超滤管或透析袋(截留分子量 5 000 Da)。
- 7.1.16 酶标板(48 孔或 96 孔)。
- 7.1.17 微量可调移液器(2.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$  等不同规格)。
- 7.1.18 培养皿(带筛网,网孔直径 180  $\mu\text{m}$ )。

## 7.2 试剂

- 7.2.1 培养液,见附录 D 的 D.1。
- 7.2.2 青霉素、链霉素。
- 7.2.3 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS),见 D.2。
- 7.2.4 包被缓冲液:超纯水。
- 7.2.5 洗涤缓冲液,见 D.3。
- 7.2.6 过氧化物酶标记的抗免疫球蛋白-酶结合物,见 D.4。
- 7.2.7 显色液,见 D.5。
- 7.2.8 终止液,见 D.6。

## 7.3 实验动物

Wistar 大鼠,体重 200 g $\pm$ 20 g。

## 7.4 操作方法

### 7.4.1 旋毛虫收集

将人工感染旋毛虫的 Wistar 大鼠去除皮肤、内脏、脂肪和结缔组织后,按照 6.4.2~6.4.5 所列方法,收集旋毛虫肌幼虫。

### 7.4.2 旋毛虫抗原制备

#### 7.4.2.1 旋毛虫肌幼虫排泄分泌物(ML-ESP)抗原制备

7.4.2.1.1 将收集的旋毛虫肌幼虫用含有青霉素(500 U/mL)和链霉素(500 U/mL)的培养液洗涤三次(每次静置 20 min)。

7.4.2.1.2 将其放入含青霉素(250 U/mL)和链霉素(250 U/mL)的培养液中(密度为 5 000 条/mL),37  $^{\circ}\text{C}$ ,10%二氧化碳,培养 18 h,收集上清液。



7.4.2.1.3 用一次性针头过滤器滤掉残留的肌幼虫及碎片后,用 PBS 通过超滤管或透析袋透析,去除分子质量小于 3 000 Da 的蛋白,将回收得到的旋毛虫 ML-ESP 抗原(终浓度为 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,吸光度 280/260 $>0.1$ )保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

7.4.2.1.4 培养过程中应保证培养基未被细菌、真菌等污染。

7.4.2.1.5 具体可参见 ICT《旋毛虫血清学诊断方法》(2018 版)。

#### 7.4.2.2 旋毛虫肠道期幼虫排泄分泌物(IL-ESP)抗原制备

7.4.2.2.1 将收集的旋毛虫肌幼虫经口感染 Wistar 大鼠(8 000 条/只),6 h 后将大鼠处死,并立即取出小肠。用装有磷酸盐缓冲液(PBS)的注射器清洗小肠,纵向剖开,并切割成 1 cm~2 cm 的碎片,置于筛网上,将筛网浸入含有培养液的培养皿中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h。

7.4.2.2.2 将培养皿底部的虫体收集到 15 mL 离心管中,用含有青霉素(500 U/mL)和链霉素(500 U/mL)的培养液洗涤 3 次,每次洗涤后 2 000 g 离心 10 min。将收集到的虫体按照 7.4.2.1.2~7.4.2.1.4 所列方法,制备 IL-ESP 抗原。

#### 7.4.3 抗原包被

用包被缓冲液分别将旋毛虫 ML-ESP 及 IL-ESP 抗原稀释至浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,将两种抗原按 1:1 比例充分混合(工作浓度均为 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )后,每孔加入 100  $\mu\text{L}$ 。封板膜密封后置入  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温箱孵育 60 min 或者  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温箱过夜。



#### 7.4.4 洗涤

揭掉封板膜,弃去孔内包被液,在吸水纸上拍干或吹风筒吹干。每孔加满洗涤缓冲液,静置 30 s 后弃去洗涤液,重复洗涤三次,拍干或吹干。

#### 7.4.5 加样

7.4.5.1 分别设空白对照孔、阳性对照孔、阴性对照孔和待测样本孔,每份样本各设 3 孔。

7.4.5.2 用洗涤缓冲液将待测血清稀释至工作浓度(1:50),加入待测样本孔中,每孔 100  $\mu\text{L}$ ;阳性血清和阴性血清按照同样比例稀释至工作浓度并分别加入阳性和阴性对照孔,加样量均为 100  $\mu\text{L}$ ;空白对照孔加 100  $\mu\text{L}$  洗涤液。

7.4.5.3 用封板膜密封后放置室温孵育 30 min。阴性对照血清和阳性对照血清来源见 D.7。

#### 7.4.6 加过氧化物酶标记的抗免疫球蛋白-酶结合物

7.4.6.1 弃去液体,重复洗涤三次,方法同 7.4.4。检测猪、马、犬、熊等动物血清样本应使用相应动物种类的过氧化物酶标记的抗免疫球蛋白-酶结合物。

7.4.6.2 用洗涤缓冲液将抗免疫球蛋白-酶结合物稀释至工作浓度(1:5 000~1:10 000 或按照试剂的操作说明),每孔加入 100  $\mu\text{L}$ ,放置室温孵育 30 min。

#### 7.4.7 显色

弃去液体,重复洗涤三次,方法同 7.4.4,最后用蒸馏水再洗涤一次。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  显色液,室温避光孵育 5 min~15 min 后,加入 100  $\mu\text{L}$  终止液,终止反应。

#### 7.4.8 读数

加入终止液后 10 min 内,通过酶标仪检测各孔在波长 450 nm 处的光吸收值( $\text{OD}_{450}$  值)。

## 7.5 计算方法

计算出每份待测样本的平均  $OD_{\text{待测}}$  值( $P$ )和同板阴性参考血清的平均  $OD_{\text{阴性}}$  值( $N$ ),用  $OD_{\text{待测}}$  除以  $OD_{\text{阴性}}$ ,计算出每份待测样本的  $P/N$  值。

## 7.6 试验成立条件

若空白对照孔  $OD$  值小于 0.1,阳性参考血清  $OD$  值在  $1.0 \pm 2SD$  范围,且  $P/N$  值大于 4,则试验成立,结果有效。

## 7.7 结果判定

待测样本的  $P/N$  值  $\geq 4$ ,判定该样本为旋毛虫感染阳性血清;若  $3 \leq P/N$  值  $< 4$ ,则判定该样本为疑似旋毛虫感染血清。

# 8 荧光免疫层析试纸卡法

## 8.1 器材

- 8.1.1 恒温箱。
- 8.1.2 电子天平。
- 8.1.3 台式冷冻离心机。
- 8.1.4 pH 计。
- 8.1.5 试纸喷膜仪。
- 8.1.6 试纸条切割机。
- 8.1.7 超声波细胞粉碎机。
- 8.1.8 水平摇床。
- 8.1.9 手持紫外灯。
- 8.1.10 微量可调移液器(2.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$  等不同规格)。

## 8.2 试剂

- 8.2.1 时间分辨荧光微球(1%,避光)。
- 8.2.2 山羊抗猪 IgG。
- 8.2.3 兔抗山羊 IgG。
- 8.2.4 硝酸纤维素膜。
- 8.2.5 PVC 荧光专用底板。
- 8.2.6 玻璃纤维素膜。
- 8.2.7 吸水纸。
- 8.2.8 0.05 mol/L PBS 缓冲液,见附录 E 的 E.1。
- 8.2.9 0.01 mol/L PBS 缓冲液,见 D.2。
- 8.2.10 0.05 mol/L 2-吗啉乙磺酸(MES)溶液,见 E.2。
- 8.2.11  $N$ -羟基琥珀酰亚胺(NHS)。
- 8.2.12 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)。
- 8.2.13 0.1 mol/L 甘氨酸溶液,见 E.3。
- 8.2.14 偶联储存液,见 E.4。
- 8.2.15 样本稀释液,见 E.5。

### 8.3 荧光免疫层析试纸卡组装

#### 8.3.1 旋毛虫抗原制备

方法同 7.4.2,用 0.01 mol/L PBS 缓冲液分别将旋毛虫 ML-ESP 及 IL-ESP 抗原稀释至 2 mg/mL,将两种抗原按 1:1 比例充分混合(工作浓度均为 1 mg/mL)。

#### 8.3.2 时间分辨荧光微球偶联山羊抗猪 IgG

8.3.2.1 100  $\mu$ L 时间分辨荧光微球,加入 500  $\mu$ L MES 溶液。

8.3.2.2 加入 3 mg 的 EDC 和 NHS,混匀,室温孵育 1 h。

8.3.2.3 加入 40  $\mu$ L 的 5 mg/mL 山羊抗猪 IgG(0.01 mol/L PBS 缓冲液稀释),室温孵育 1 h。

8.3.2.4 加入 100  $\mu$ L 的 0.1 mol/L 甘氨酸溶液,室温孵育 30 min。

8.3.2.5 4  $^{\circ}$ C,8 100  $g$  离心 15 min,弃上清液。

8.3.2.6 加入 8 000  $\mu$ L 偶联储存液重悬。

8.3.2.7 4  $^{\circ}$ C 超声分散 1 min,4  $^{\circ}$ C 条件下避光保存。

#### 8.3.3 荧光免疫层析试纸条的组装

##### 8.3.3.1 结合垫的制备

将含有偶联抗体的荧光微球用试纸喷膜仪喷涂至 300 mm $\times$ 5 mm 玻璃纤维素膜上,喷涂量为 50  $\mu$ L/cm,4  $^{\circ}$ C 真空抽干,于 4  $^{\circ}$ C 干燥保存备用。

##### 8.3.3.2 检测线和对照线的制备

8.3.3.2.1 用浓度为 1 mg/mL 旋毛虫 ES 混合抗原和 0.625 mg/mL 兔抗山羊 IgG(0.01 mol/L PBS 缓冲液稀释)分别作为检测线和对照线试剂。

8.3.3.2.2 用试纸喷膜仪将两种试剂分别点在硝酸纤维素膜上,点样量为 1  $\mu$ L/cm。37  $^{\circ}$ C 干燥 2 h,4  $^{\circ}$ C 密封保存备用。

##### 8.3.3.3 试纸卡的组装

按附录 F 的图 F.1 示意图所示,将底板、样本垫、结合垫、吸水垫、硝酸纤维素膜粘在一起,并用试纸条切割机将其切成 3.5 mm 宽的试纸条,将试纸条放入试纸卡中,将试纸卡放入含有干燥剂的密封袋内,密封后于 4  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 8.4 样本检测

8.4.1 分别用样本稀释液将阳性血清、阴性血清和待检血清样本稀释 20 倍,即向 95  $\mu$ L 稀释液中加入 5  $\mu$ L 血清,用移液器混匀。

8.4.2 将试纸卡平放于操作台面,加样孔朝上,向加样孔中加入 100  $\mu$ L 稀释后的血清样本,室温静置 5 min~10 min。用紫外灯照射试纸卡观察结果。

### 8.5 试验成立条件

结果判定应在加样后 20 min 内进行。试验成立条件如下:

- 若阳性血清样本的对照线和检测线均显色,阴性血清仅对照线显色而检测线不显色,则试验成立;
- 若对照线不显色,则检测无效,应更换试纸卡重新检测。



## 8.6 结果判定

结果判定如下：

- 待测样本如果对照线和检测线均显色，则判定为阳性；
- 待测样本仅对照线显色，而检测线不显色，则判定为阴性；
- 荧光免疫层析试纸卡检测结果判定示意图见附录 F 的图 F.2。

## 9 多重聚合酶链式反应法(多重 PCR 法)

### 9.1 器材

- 9.1.1 PCR 扩增仪。
- 9.1.2 台式低温高速离心机。
- 9.1.3 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。
- 9.1.4 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。
- 9.1.5 微量可调移液器(2.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$  等不同规格)。
- 9.1.6 无核酸酶水处理的离心管与吸头。
- 9.1.7 PCR 扩增管。

### 9.2 引物

#### 9.2.1 上游引物

下列 5 条引物为上游引物：

- 5'-GTTCCATGTGAACAGCAGT-3'；
- 5'-GCTACATCCTTTTGATCTGTT-3'；
- 5'-GCGGAAGGATCATTATCGTGTA-3'；
- 5'-GTGAGCGTAATAAAGGTGCAG-3'；
- 5'-CAATTGAAAACCGCTTAGCGTGTTT-3'。

#### 9.2.2 下游引物

下列 5 条引物为下游引物：

- 5'-CGAAAACATACGACAACCTGC-3'；
- 5'-AGACACAATATCAACCACAGTACA-3'；
- 5'-TGGATTACAAAGAAAACCATCACT-3'；
- 5'-TTCATCACACATCTTCCACTA-3'；
- 5'-TGATCTGAGGTCGACATTTCC-3'。

#### 9.2.3 引物储存液

用双蒸水将每条引物配成 100  $\mu\text{mol/L}$  的储存液，置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  或更低温度冻存。

#### 9.2.4 引物混合工作液

9.2.4.1 分别取等量的 5 种上游引物储存液混合，加双蒸水，配制成终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  的上游引物混合工作液。

9.2.4.2 分别取等量的 5 种下游引物储存液混合，加双蒸水，配制成终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  的下游引物混合工作液。

9.3 试剂

9.3.1 PCR 试剂

9.3.1.1 10×PCR 缓冲液。

9.3.1.2 dNTP 预混液:2.5 mmol/L。

9.3.1.3  $\text{MgCl}_2$ :25 mmol/L。

9.3.1.4 *Ex Taq* 酶:5 U/ $\mu\text{L}$ 。

9.3.2 电泳试剂

9.3.2.1 电泳缓冲液:50×TAE 贮存液(见附录 G 的 G.1),临用时加蒸馏水配成 1×TAE 缓冲液(配方见 G.2)。

9.3.2.2 琼脂糖:国产或进口的普通核酸电泳用琼脂糖。

9.3.2.3 电泳加样缓冲液:见 G.3。

9.3.2.4 DNA 分子质量标准:分子大小范围 100 bp~500 bp,50 bp 梯度。

9.4 样本准备

9.4.1 旋毛虫肌幼虫虫体样本的制备方法同 6.4.2~6.4.5。

9.4.2 用 *T. spiralis* 虫体作为阳性样本。

9.4.3 用未感染旋毛虫的猪或其他动物的肌肉作为阴性样本。

9.5 PCR 操作程序

9.5.1 DNA 提取

使用经验证的商品化 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

9.5.2 PCR 反应体系

采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系,扩增体系包括:

10×PCR 缓冲液	2.5 $\mu\text{L}$
dNTP(2.5 mmol/L)	2 $\mu\text{L}$
$\text{MgCl}_2$ (25 mmol/L)	2 $\mu\text{L}$
上游引物混合工作液(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1 $\mu\text{L}$
下游引物混合工作液(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1 $\mu\text{L}$
<i>Ex Taq</i> 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.2 $\mu\text{L}$
DNA 模板	100 ng
双蒸水	补足至 25 mL

具体可参见参考文献[3]。

9.5.3 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 °C 预变性 4 min;

第二阶段,95 °C 变性 10 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共进行 35 个循环;

第三阶段,72 °C 延伸 3 min。

## 9.6 扩增产物电泳检测

### 9.6.1 2%琼脂糖凝胶板的制备

称取 2 g 琼脂糖,加入 100 mL 1×TAE 缓冲液中。加热融化后加 5  $\mu$ L(10 mg/mL)溴乙锭,混匀后倒入放置在水平面上的凝胶盘中,胶板厚 5 mm 左右。依据样本数选用适宜的梳子。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 缓冲液淹没胶面。

### 9.6.2 加样

取 10  $\mu$ L PCR 扩增产物和 2  $\mu$ L 加样缓冲液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。

### 9.6.3 电泳

电压 110 V~130 V 或电流 80 mA~100 mA,电泳 30 min~40 min。

## 9.7 试验成立条件

阳性对照样本有一条 173 bp 扩增条带,阴性对照没有条带或仅有引物二聚体条带,则试验成立,结果有效。

## 9.8 结果判定

### 9.8.1 扩增条带分析

不同大小扩增条带判定结果如下:

- 待测样本有一条 173 bp 的扩增条带,可判定该旋毛虫虫种为 *T. spiralis* (T1);
- 待测样本有一条 129 bp 的扩增条带,可判定该旋毛虫虫种为 *T. nativa* (T2);
- 待测样本有两条扩增条带,分别为 129 bp 和 253 bp,可判定该旋毛虫虫种为 *T. britovi* (T3) 或 T8;
- 待测样本在 292 bp~360 bp 之间有 1~3 条扩增条带,可判定该旋毛虫虫种为 *T. pseudospiralis* (T4);
- 待测样本有两条扩增条带,分别为 129 bp 和 316 bp,可判定该旋毛虫虫种为 *T. murrelli* (T5);
- 待测样本有两条扩增条带,分别为 129 bp 和 210 bp,可判定该旋毛虫虫种为 T6;
- 待测样本有两条扩增条带,分别为 155 bp 和 404 bp,可判定该旋毛虫虫种为 *T. nelsoni* (T7);
- 待测样本有两条扩增条带,分别为 135 bp 和 253 bp,可判定该旋毛虫虫种为 T9;
- 待测样本有一条 240 bp 的扩增条带,可判定该旋毛虫虫种为 *T. papuae* (T10);
- 待测样本有一条 264 bp 的扩增条带,可判定该旋毛虫虫种为 *T. zimbabwensis* (T11);
- 待测样本有一条 127 bp 的扩增条带,可判定该旋毛虫虫种为 *T. patagoniensis* (T12)。

### 9.8.2 序列分析

9.8.2.1 *T. britovi* (T3)、T8 和 T9 扩增条带相近,可通过测序比对分析,确定虫种或基因型。序列分析如下:

T3	GTTCCATGTGAACAGCAGTTGGACATGGGTCAGTCGATCCTAAGAAAACGGCGAAAGCTTGTTCGAATTT	70
T8	GTTCCATGTGAACAGCAGTTGGACATGGGTCAGTCGATCCTAAGAAAACGGCGAAAGCTTGTTCGAATTT	70
T9	GTTCCATGTGAACAGCAGTTGGACATGGGTCAGTCGATCCTAAGAAAACGGCGAAAGCTTGTTCGAATTT *****	70
T3	GCGACATGAATTGTAAGACTGTGTGT--TTATTGTGT----GTGTGCAGTTGTCGTATGTTTTCG	129
T8	GCGACATGAATTGTAAGACTGTGTGTGTTTATTGTGT-----GTGCAGTTGTCGTATGTTTTCG	129
T9	GCGACATGAATTGTAAGACTGTGTGTGTTTATTGTGTGTGCGTGTGCAGTTGTCGTATGTTTTCG *****	135

9.8.2.2 *T. nativa* (T2)和 *T. patagoniensis* (T12)扩增条带相近,可通过测序比对分析,确定虫种或基因型。序列分析如下:

T2	GGTTCATGTGAACAGCAGTTGGACATGGGTCAGTCGATCCTAAGAAAACGGCGAAAGCTTGTTCGAATT	70
T12	GGTTCATGTGAACAGCAGTTGGACATGGGTCAGTCGATCCTAAGAAAACGGCGAAAGCTTGTTCGAATT *****	70
T2	TGCGACATGAATTGTAAGACTGTGTG--AATTGTGTGTGTGCAGTTGTCGTATGTTTTC	129
T12	TGCGACATGAATTGTAAGACTGTGTGTGAATTGG---GTGTGCAGTTGTCGTATGTTTTC *****	127

10 综合判定

- 10.1 受检动物样本经压片镜检法(第 5 章)和集样消化法(第 6 章)任一项检测出旋毛虫虫体或包裹的,判定为该动物感染旋毛虫。
- 10.2 受检动物样本经 ELISA 法(第 7 章)和荧光免疫层析试纸卡法(第 8 章)任一项检测出旋毛虫特异抗体的,判定为该动物血清旋毛虫抗体阳性,需进一步通过集样消化法(第 6 章)进行确证。
- 10.3 经多重 PCR 法(第 9 章)鉴定,可区分旋毛虫不同种属和基因型。

附 录 A  
(规范性附录)

压片镜检法溶液配制及判定示意图

A.1 盐酸溶液

浓盐酸(37%,密度 1.179 g/cm <sup>3</sup> )	20 mL
加双蒸水至	100 mL

A.2 旋毛虫包囊及无包囊旋毛虫镜下判定示意图

旋毛虫包囊镜下判定示意图见图 A.1,无包囊旋毛虫镜下判定示意图见图 A.2。

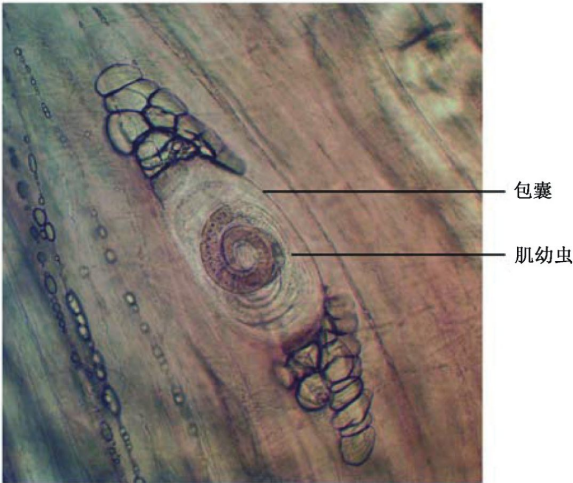


图 A.1 旋毛虫包囊镜下判定示意图

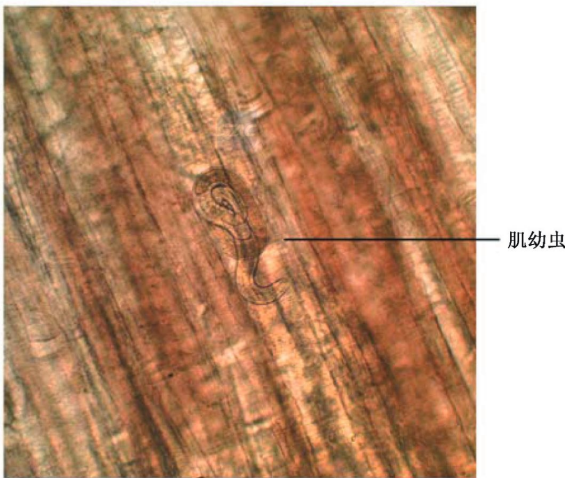


图 A.2 无包囊旋毛虫镜下判定示意图

附 录 B  
(规范性附录)  
消化液配制

B.1 盐酸水溶液

盐酸(37%,密度 1.179 g/cm <sup>3</sup> )	11 mL
加双蒸水至	2 000 mL

B.2 消化液

胃蛋白酶(1 : 10 000 NF/1 : 12 500 BP/1 : 2 000 FIP)	10 g
盐酸水溶液(B.1)	2 000 mL
消化液现用现配,用前预热至 45 ℃。	





附 录 C  
(资料性附录)  
旋毛虫集样消化法流程图

旋毛虫集样消化法流程图见图 C.1。

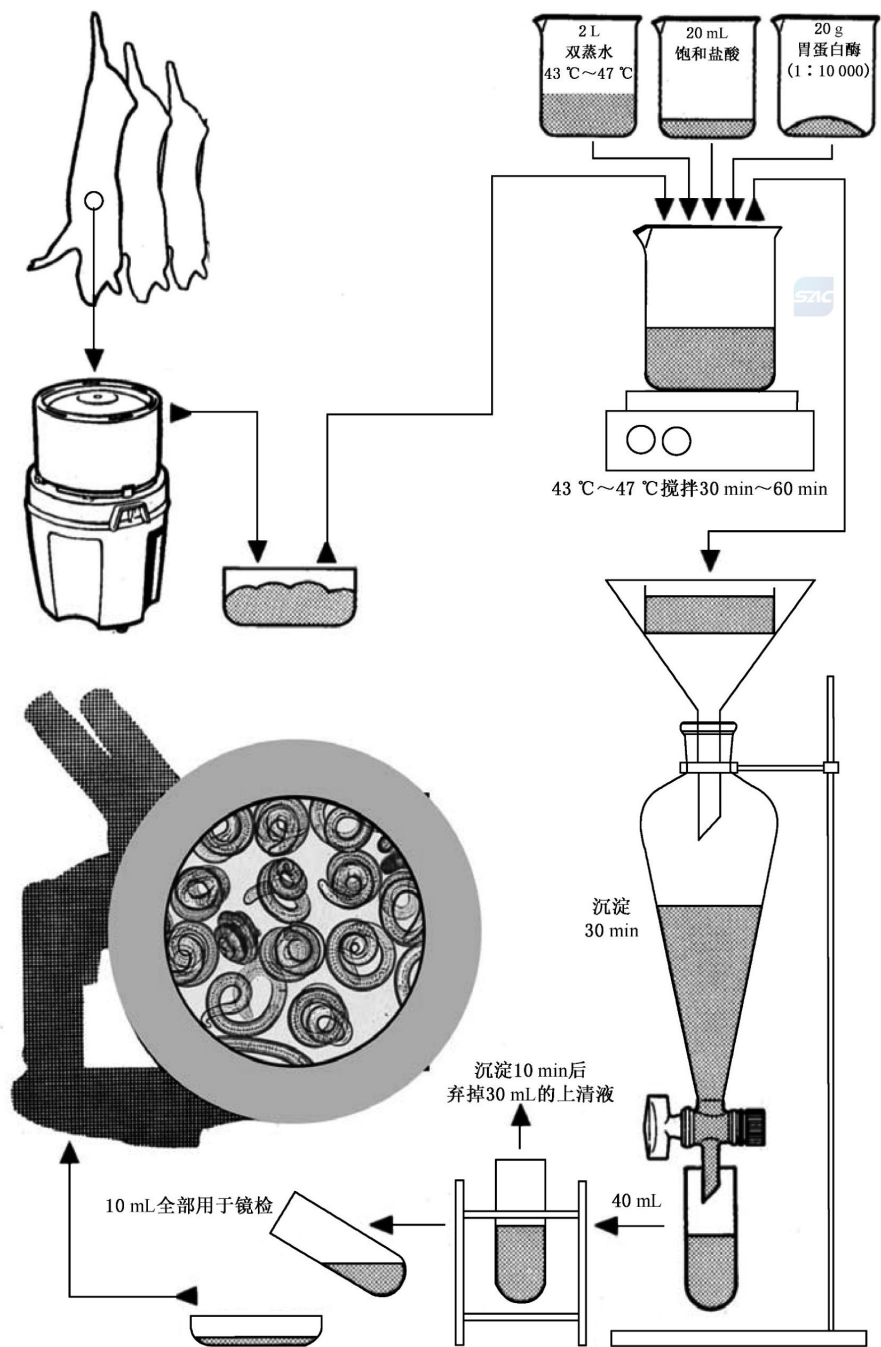


图 C.1 旋毛虫集样消化法流程图

## 附 录 D

(规范性附录)

## 酶联免疫吸附试验用溶液配制

## D.1 培养液

HEPES	2.38 g
谷氨酰胺	0.15 g
丙酮酸钠 ( $C_3H_3NaO_3$ )	0.05 g
DMEM 培养液	500 mL

## D.2 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	8 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ )	3.58 g
磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ )	0.24 g
加双蒸水至	1 000 mL
调 pH 值至 7.2。	

## D.3 洗涤缓冲液

Tris	6.057 g
氯化钠(NaCl)	8.772 g
脱脂奶粉	50 g
曲拉通 X-100	10 mL
加双蒸水至	1 000 mL
调 pH 值至 7.4。	

## D.4 过氧化物酶标记的抗免疫球蛋白-酶结合物(从试剂公司购买)

选择使用相应动物种类的过氧化物酶标记的抗免疫球蛋白-酶结合物。

## D.5 显色液(TMB-过氧化氢尿素溶液)

底物①	
TMB	20 mg
无水乙醇	10 mL
加双蒸水至	100 mL
底物②	
$Na_2HPO_4$	1.46 g
柠檬酸	0.933 g



0.75%过氧化氢 0.64 mL  
加双蒸水至 100 mL  
调 pH 值至 5.0~5.4。  
底物①和底物②按 1 : 1 混合即为 TMB-过氧化氢尿素溶液,现用现混合。

D.6 终止液

双蒸水 200 mL  
浓硫酸 34 mL  
缓慢滴加浓硫酸,并不断搅拌  
加双蒸水至 300 mL

D.7 阴性对照血清和阳性对照血清

阴性对照血清和阳性对照血清可从以下 OIE 认证的旋毛虫病协作中心获得：  
——中国吉林大学人兽共患病研究所 OIE 亚太区食源性寄生虫病协作中心；  
——加拿大食品安全局食源性和动物寄生虫病研究中心；  
——意大利迪桑尼塔高级研究所寄生虫病研究中心；  
——法国食品、环境及职业卫生健康安全局 OIE 欧洲食源性寄生虫病协作中心。



## 附 录 E

(规范性附录)

## 荧光免疫层析试纸卡试验用溶液配制

## E.1 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	40 g
氯化钾(KCl)	1 g
磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	17.9 g
磷酸二氢钾( $\text{H}_2\text{PO}_4$ )	1.2 g
加双蒸水至	1 000 mL
调 pH 值至 7.4。	

## E.2 0.05 mol/L 2-吗啉乙磺酸(MES)溶液

MES	9.76 g
加双蒸水至	1 000 mL
调 pH 值至 6.0。	

## E.3 0.1 mol/L 甘氨酸溶液

甘氨酸	7.5 g
加双蒸水至	1 000 mL

## E.4 偶联储存液

Proclin300	0.5 mL
牛血清白蛋白(BSA)	10 g
聚乙二醇 400(PEG400)	20 g
加 0.05 mol/L PBS 溶液至	1 000 mL
4 ℃ 保存。	

## E.5 样本稀释液

氯化钠(NaCl)	9 g
牛血清白蛋白(BSA)	2 g
加双蒸水至	1 000 mL

附录 F  
(资料性附录)

荧光免疫层析试纸卡结构及判定示意图

F.1 荧光免疫层析试纸卡结构示意图

荧光免疫层析试纸卡结构示意图见图 F.1。

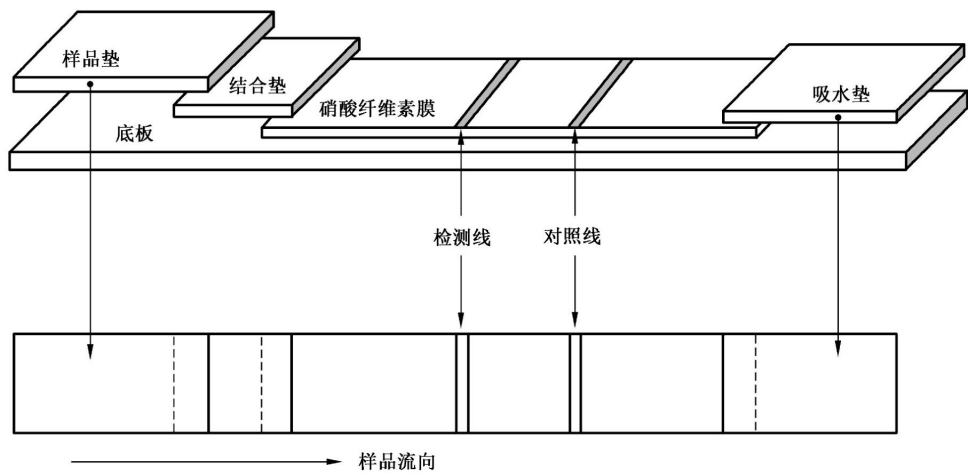


图 F.1 荧光免疫层析试纸卡结构示意图

F.2 荧光免疫层析试纸卡检测结果判定示意图

荧光免疫层析试纸卡检测结果判定示意图见图 F.2。

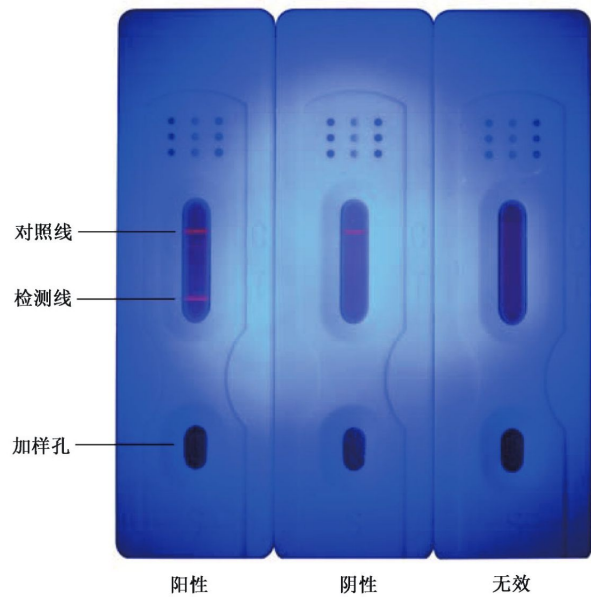


图 F.2 荧光免疫层析试纸卡检测结果判定示意图

**附 录 G**  
(规范性附录)  
**多重 PCR 法用溶液配制**

**G.1 50×TAE 贮存液**

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH8.0)	100 mL
加双蒸水至	1 000 mL

**G.2 1×TAE 缓冲液**

使用前用双蒸水将 50×TAE 作 50 倍稀释即可。

**G.3 电泳加样缓冲液**

溴酚蓝	0.25 g
丙三醇(甘油)	30 mL
双蒸水	70 mL

参 考 文 献

- [1] World Organization for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2017.
- [2] International Commission on Trichinellosis, Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and humans, 2018.
- [3] International Commission on Trichinellosis, Recommendations for genotyping *Trichinella* muscle stage larvae, 2018.
-