



动物检验检疫技术

专业教学资源库

免疫胶体金技术和正向 间接血凝检测技术



一、猪瘟概述

猪瘟（Classical Swine Fever, CSF; Hog Cholera, HC）又名猪霍乱、烂肠瘟，是一种高度接触性传染病，遍及全世界，是目前威胁养猪业重要的疫病之一。世界动物卫生组织（OIE）将此病死为A类动物疫病之一，我国将此病列为一类动物疫病。

猪瘟能引起猪的大批死亡、母猪的繁殖障碍、继发感染等，危害级大。国家中长期动物疫病防治规划（2012—2020年）将此病列为**优先防治**的5个动物疫病之一。

（FMD、CSF、HP-PRRS、ND、HPAI）



二、猪瘟抗体检测的意义

1. 确定是否需要免疫

$Ab \geq 2^4$ 可以获得保护

$Ab < 2^4$ 不能获得保护

2. 确定免疫效果：（时间、疫苗、剂量、免疫抑制病）

3. 用于猪瘟的临床诊断

4. 非免疫无规定疫病（猪瘟）的确认



三、检测样本的制备

(一) 血清的制备:

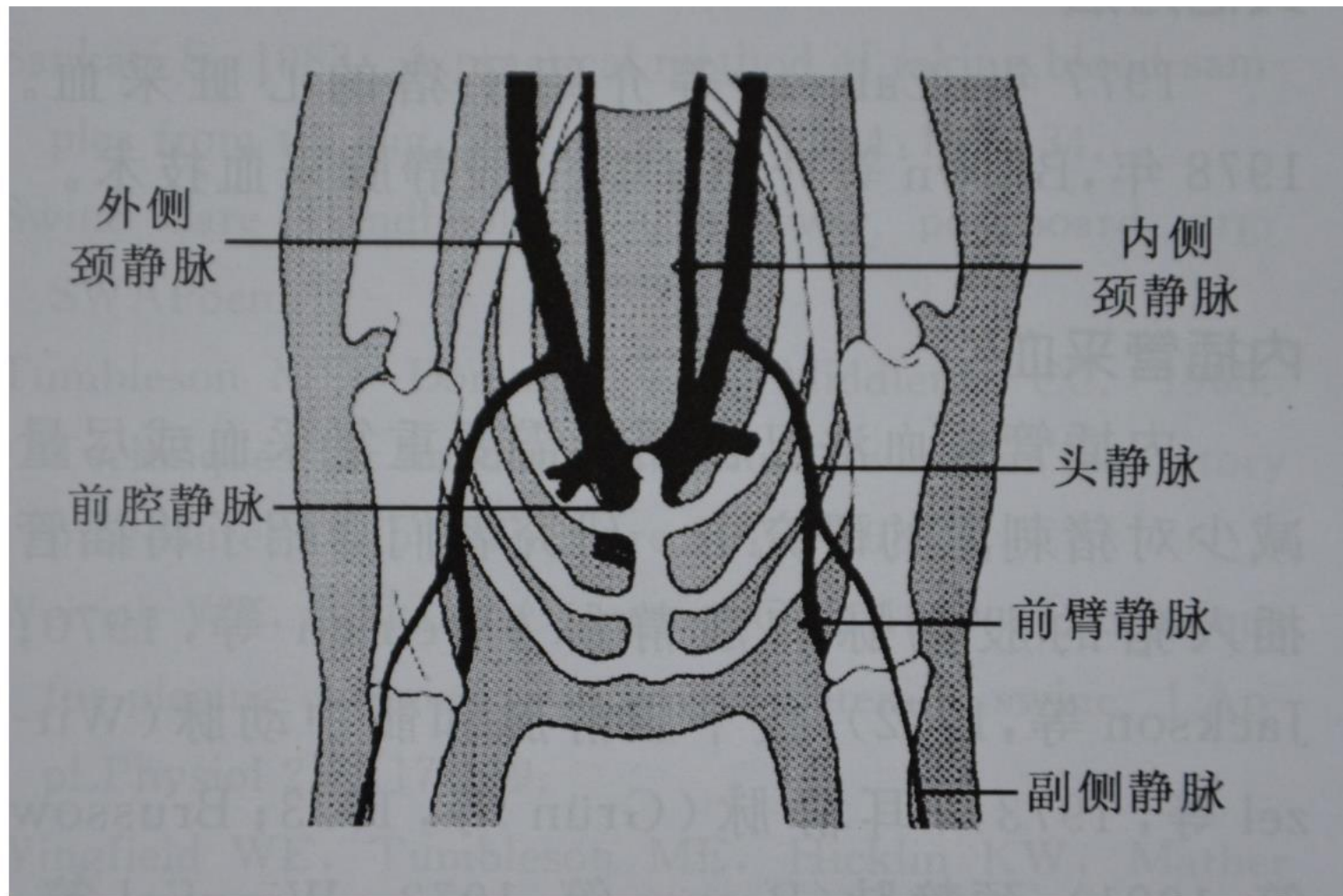
1. 采血：1-2ml（约0.5ml血清）
2. 凝固析出血清，不能出现溶血情况
3. 补体的灭活：检测前，56 °C水浴，灭活30min

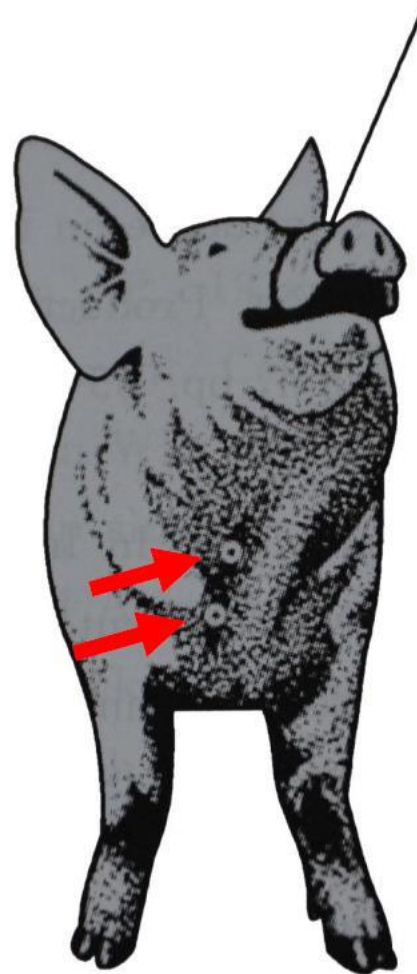
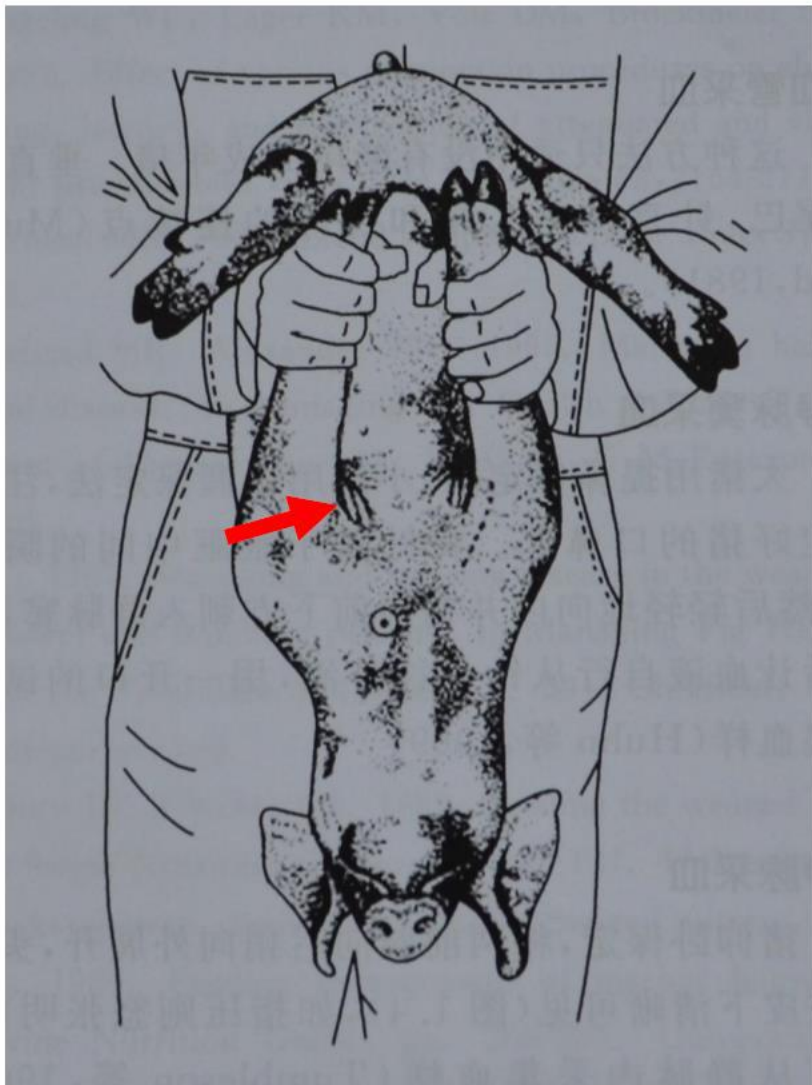


采血部位	猪的大小	采血量	方法评价
前腔静脉	小于 45 公斤	不限量	可能损伤迷走神经; 可用真空管
	45 公斤以上		
	成年猪		
颈静脉	所有年龄猪	不限量	难采; 可用真空管
耳静脉	成年猪	1-2ml	易形成血肿、血样易污染
尾	成年猪	5-10ml	要有经验, 可用真空管
眶静脉窦	小于 8 公斤	5-10ml	采样慢、不雅观、易造成采血后眶内出血而压迫眼球
	18-54 公斤		
	大于 54 公斤		



前腔静脉采血：适合所有年龄的猪。

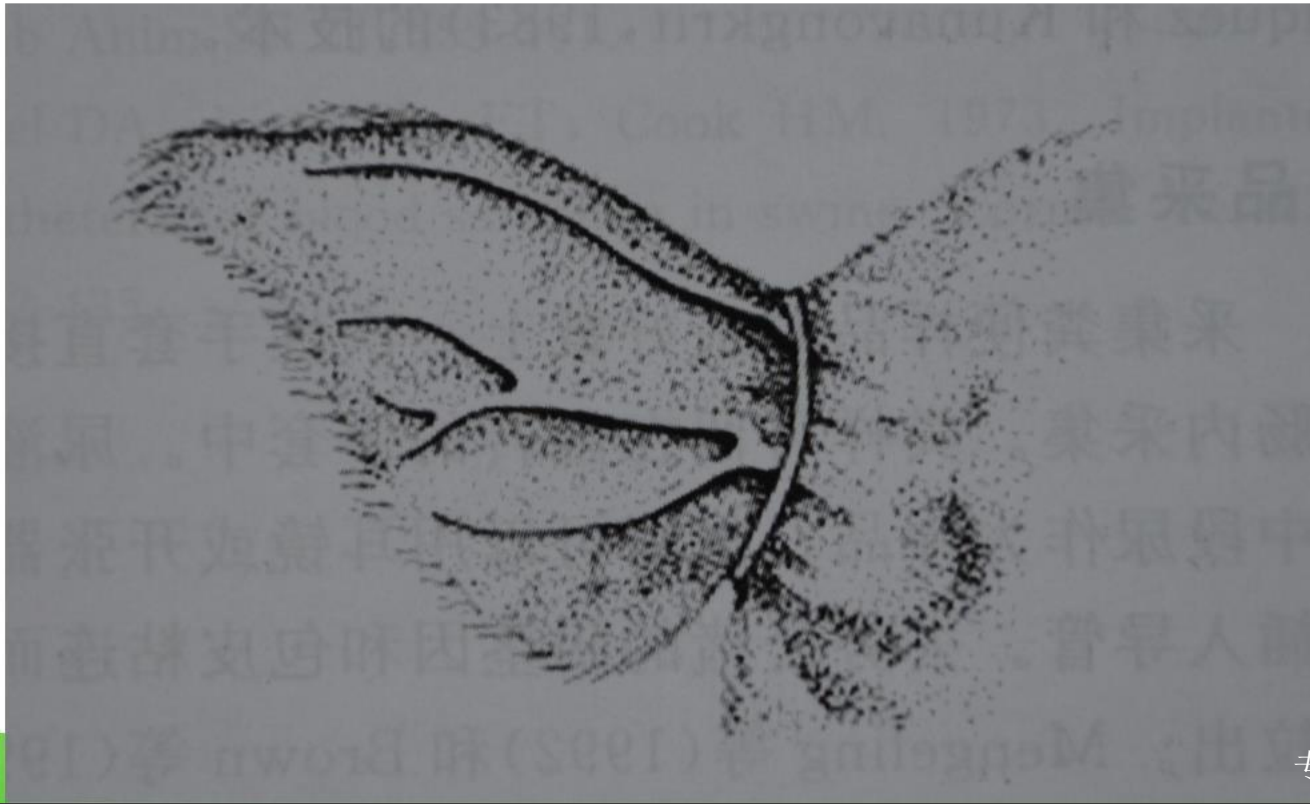






耳静脉采血：

用手压迫耳根静脉血管或用橡皮带绕耳基部环扎，使耳静脉怒张，适合大猪。





（二）猪唾液的提取

利用猪的唾液检测抗原或抗体，是一种较有发展前景的检测方法。

1.唾液的提取：

用一灭菌纱布悬挂于猪舍，猪会好奇咀嚼，纱布吸取猪的唾液。

2.将纱布中的唾液挤出至灭菌烧杯或离心管中

3.离心：10000转/分钟，离心1分钟，取上清液

4.进行抗原检测或抗体检测



注意：

唾液抗体与血清抗体不是一个概念。引入相对抗体概念

相对抗体指用同一种方法检测出血清抗体和唾液抗体量的相对大小（用%表示）。

相对抗体的修正参数是建立在大量检测数据基础上的，这些必须包括完全阴性值、低抗体滴度值、中抗体滴度值、高抗体滴度值



四、猪瘟抗体检测的方法

1. 正向间接凝集试验
2. 猪瘟抗体检测试纸卡（胶体金技术）
3. 酶联免疫吸附试验（ELISA）



五、优缺点

方法	猪瘟抗体检测试纸卡	正向间接凝集试验	酶联免疫吸附试验
操作	简单、方便	较简单、方便	相对复杂
时间	短, 5-20min	1.5-2h	2h以上
结果判断	肉眼可判定	肉眼可判定	借助仪器判定
结果准确度	低	中	高
检测成本	低 / 高	中	高
适用	单个或少数样本	批量检测	大批量检测



方法一：猪瘟正向间接凝集试验



猪瘟正向间接凝集试验

- (一) 试验原理
- (二) 适用范围
- (三) 试验器材
- (四) 试验方法
- (五) 结果判定
- (六) 注意事项



（一）试验原理

用**已知的抗原**检测**未知血清抗体**试验，称为正向间接凝集试验（IHA）。

猪瘟抗原与对应的抗体相遇，在一定的条件下会形成抗原抗体复合物，但这种复合物的分子团很小，肉眼看不见。

若将抗原吸附（致敏）在经过处理的红细胞表面，只需少量抗原就能大大提高抗原抗体的反应灵敏性，这种经过猪瘟抗原致敏的红细胞与猪瘟抗体相遇，红细胞便出现清晰可见的凝集现象。



(二) 适用范围

主要用于检测猪瘟血清抗体效价



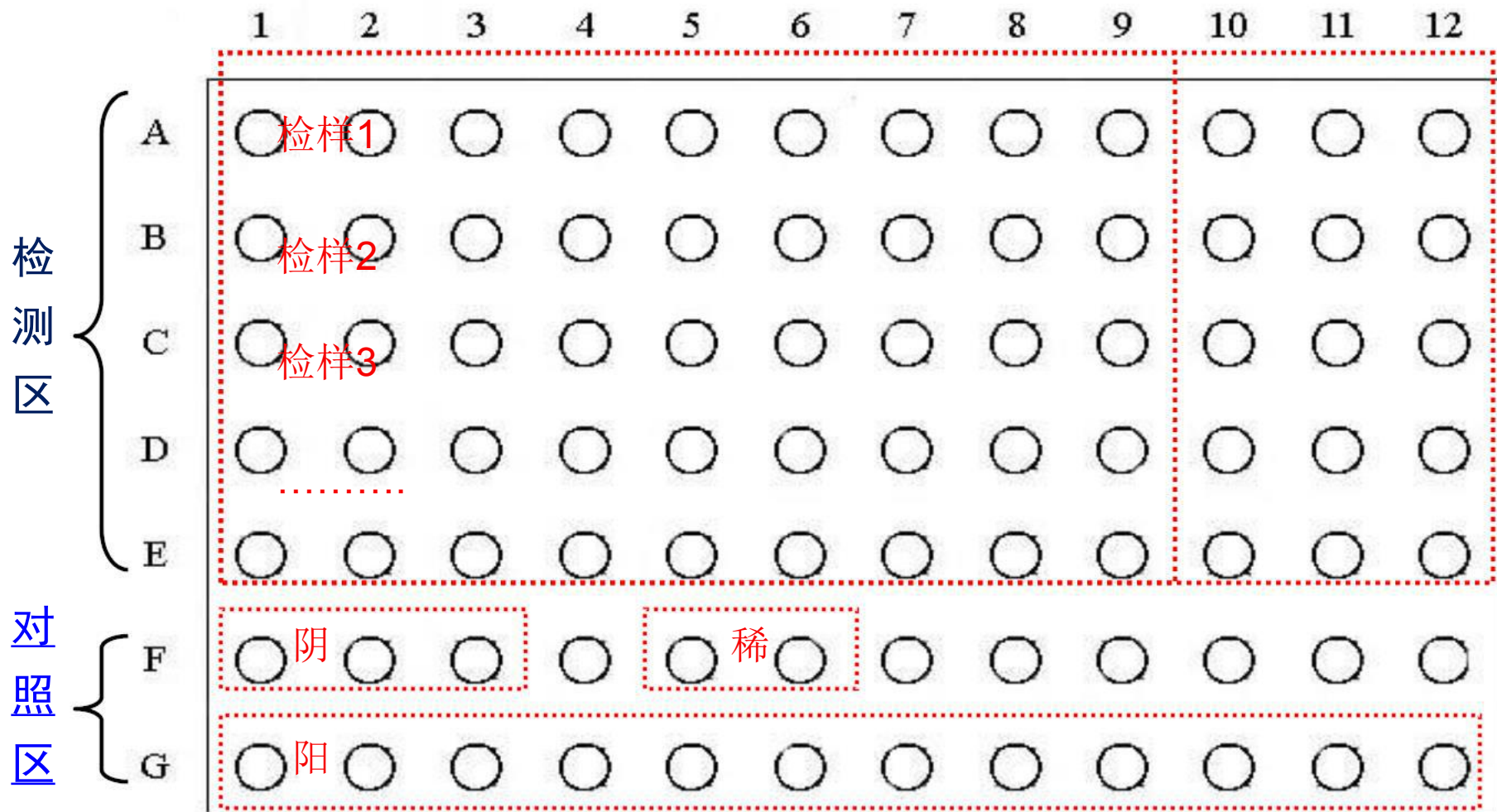
(三) 试验器材

1. 96孔110°V型血凝板，与血凝板大小相同的玻板
2. 微量移液器（50ul、25ul）、取液吸头
3. 微量振荡器
4. 猪瘟血凝抗原
5. 猪瘟阴性对照血清
6. 猪瘟阳性对照血清
7. 稀释液
8. 待检血清（每头猪采血0.5-1ml即可）

释出血清后56 °C水浴灭活30min，灭活其中的补体



(四) 试验方法





1. 加稀释液

在血凝板上1-6排的1-9（12）孔；第七排的1-3孔和5-6孔；第8排的1-12孔各加稀释液50ul。

2. 稀释待检血清

取1号待检血清50ul加入第1排第1孔，吹打1-2次混匀（避免产生过多的气泡），从该孔移出50ul移入第二孔，混匀后取出50ul移入第2孔，混匀后取出50ul移入第3孔……直至第9孔混匀后取出50ul丢弃。

依次稀释2号、3号……

注意！ 每取一份血清时，必须更换吸头。



3. 稀释阴性对照血清

在血凝板的第7排第1孔加阴性血清50ul，倍比稀释至第3孔，混匀后从该孔取50ul丢弃。

第5-6孔为稀释液对照。

4. 稀释阳性对照血清

在血凝板第8排第1孔加阳性血清50ul，倍比稀释至第12孔，混匀后从该孔取出50ul丢弃。

5. 加血凝抗原

被检血清各孔、阴性对照各孔、阳性对照各孔、稀释液对照孔各加血凝抗原（充分混匀，瓶底应无血球沉淀）25ul。



6. 混匀、孵育

将血凝板置于微量振荡器上振荡1-2min。如无振荡器，用手轻轻摇匀亦可，然后将血凝板放在白纸上观察各孔红细胞是否混匀，不出现血球沉淀为合格。

盖上玻板，室温下静置1.5-2h判定结果，也可延迟到翌日判定。



(五) 结果判定

移去玻板，将血凝板放在白纸上

先观察**阴性对照血清第3孔**、**稀释液对照孔**，均应无凝集（血球全部沉入孔底形成边缘整齐的小圆点），或仅出现“+”凝集（血球大部分沉于孔底，边缘稍有少量血球悬浮）。

阳性血清对照1—8各孔应出现“++++—++”凝集为合格，（少量血球沉于孔底，大部分血球悬浮于孔内）。

在对照孔合格的前提下，再观察待检血清各孔，以呈现“++”凝集的最大稀释倍数为该份血清的抗体效价。



“—”	表示完全不凝集或0-10%血球凝集
“+”	表示10-25%血球凝集
“++”	表示50%血球凝集
“+++”	表示75%血球凝集
“++++”	表示90-100%血球凝集



(六) 注意事项

1. 为使检测结果准确，检测前仔细阅读本说明书。
2. 严重溶血或严重污染的血清样品不易检测，以免发生非特异性反应。
3. 勿用90°和130°血凝板，严禁使用一次性血凝板，以免误判结果。
4. 用过的血凝板应及时在水龙头下冲净血球。再用蒸馏水或离子水冲洗2次，甩干水份放37°C恒温箱内干燥备用。检测用具应煮沸消毒，37°C干燥备用。血凝板应定期浸泡在洗液中也可浸泡在5%盐酸液内，48h捞出后清水冲洗。



5. 每次检测只做一份阴性、阳性和稀释液对照。
6. 用不同批次的血凝抗原检测同一份血清时，应事先用阳性血清准确测定各批次血凝抗原抗体的效价，取抗原效价相同或相近的血凝抗原检测待检血清抗体水平的结果是基本一致的，如果血凝抗原效价差别很大用来检测同一血清样品，肯定会出现检测结果不一致。
7. 收到本试剂盒时，应立即打开包装，取出血凝抗原瓶，用力摇动，使粘附在瓶盖上的红细胞摇下，否则易出现沉渣，影响使用效果。



方法二：猪瘟抗体检测试纸卡 (胶体金标记技术)



胶体金标记技术（GICA）是20世纪80-90年代继三大标记技术（荧光素标记、放射性同位素标记和酶标记）后发展起来的固相标记免疫测定技术。



胶体金标记技术是以**胶体金**为标记物，利用抗原抗体反应的特异性，对抗原或抗体物质进行定位、定性甚至定量研究的标记技术。



免疫胶体金技术的特点

优点	缺点
<p>快速：全部检测过程仅需 5-20分钟。</p> <p>简便：不需其它任何仪器设备，操作也极其简单，无需专业人员，携带方便，可随时随地进行。</p> <p>廉价：单个或少量样本测试成本低</p> <p>可单份和批量检测：对标本既能成批检测，又可单份检测。</p> <p>稳定性好：金标试剂稳定，可长期保存。</p> <p>检测标本种类多：血液、尿液、唾液、乳等。</p>	<p>质量不稳定</p> <p>定量问题</p> <p>灵敏度问题</p>



存在问题

(1) 产品质量相差大，不宜质控，不能确保质量。**硝酸纤维素膜**的性能和质量，膜孔径大小及均一性，选定膜孔径的适宜性，结合配体（抗原或抗体）容量的大小，非特异吸附性能，亲水性及液体的流动性和流动速度的均一性等；

捕捉配体的量及质量（配体的纯度，亲和力及滴度）及在膜上配体的包被量和均一性。

配体划线位置的固定一致性；

固相金标记膜中的胶体金和配体的含量和比度，条间的均一性，固相标记物的稳定性，复溶性，复溶速度及流动性，所含缓冲物质的种类及有效促溶剂的使用等；

各种膜，甚至包括样品垫是否经过预期处理以减少非特异吸附。

(2) **存在带现象**，标本需稀释测试。只能定性、不能定量、该方法只作为初筛诊断试剂，用于疾病诊断的辅助检查。硝酸纤维素膜的特性，主要反应在其流速上。存在带现象，标本需稀释测试。产品质量相差大，不宜质控。如：结合垫的性能，金标结合物的量，样品垫的特性，检测线的位置及宽度，硝酸纤维素膜和结合垫的叠压强度。捕获抗体的亲合力，检测线包被捕获抗体的量，胶体金颗粒的大小，浓度等，易出现判断结果的误差，不能确保质量。



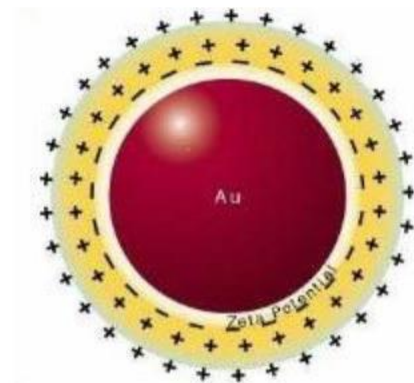
(一) 原理

胶体金是由**氯金酸** (HAuCl_4) 在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸等作用下，聚合成为特定大小的金颗粒 (10、15、20、30、50nm)，并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态，称为胶体金。

在适合的pH值下，胶体金可与蛋白质分子的基团形成牢固的结合，由于这种结合是静电结合，所以不影响蛋白质的生物特性。



氯金酸胶体呈红色，肉眼可见，用它标记某种Ag或Ab后，再与相应的Ab或Ag结合，形成Ag-Ab复合也呈肉眼可见的红色，可以直接观察结果。





免疫胶体金技术常用的反应模式

1. 夹心法
2. 间接法
3. 竞争抑制法



(二) 应用广泛

以猪瘟抗体（CFS-Ab）快速检测试纸卡为例介绍一下，胶体金标记技术在生产中的应用



技术应用

类别	应用领域	检测的物质
人类医学	各级医院、血站、疾病控制中心（CDC）、防疫站、诊断中心、家庭自检、商检系统、边检口岸、公安系统	传染病（乙肝五项、HIV、SARS等） 标志物（AFP、肌钙蛋白、粪便血红蛋白等） 女性妊娠（HCG、LH、FSH） 毒品（吗啡、K粉、摇头丸、冰毒）
农牧业	畜牧兽医站、商检系统、边检口岸、农牧类院系和研究所等	动物传染病 植物传染病
环境监测	环保监测部门、研究机构	有害物质超标
食品安全	食品安全检测中心、各监管部门	农药、兽药残留（磺胺类）、违禁药（瘦肉精等）、大肠杆菌、黄曲霉素等



CFS-Ab快速检测试纸卡

1. 试验原理
2. 适用范围
3. 试验方法
4. 结果判定
5. 注意事项



1. 试验原理

CFS-Ab快速检测试纸是以**夹心法**原理，采用胶体金标记技术，快速检测CFS-Ab水平。



2. 试验方法

- (1) 猪采血0.5-1ml，静置析出血清或离心析出血清。样品如果不能立即检测应冷藏保存。
- (2) 将检测卡和检测样品恢复至室温后，再从铝箔袋中取出，水平放置并做好标记。
- (3) 在检测卡的加样孔内加入2-3滴待检血清，无气泡。
- (4) 静置20分钟，将观察窗内色带与比色卡色带滴度进行对比，判断抗体效价水平。



3. 结果判定

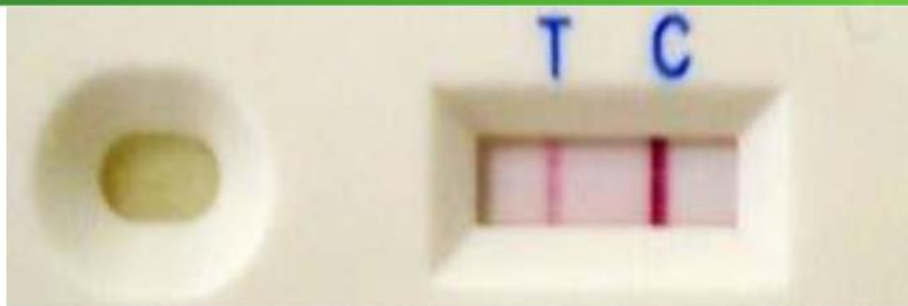
- (1) 先观察C线，如果C线无色带，则检测卡无效，重新检测。
- (2) C线有色带，再将T线的色带与比色卡色带比较，判断抗体效价水平。

如果T线无色带，则猪瘟抗体水平为0

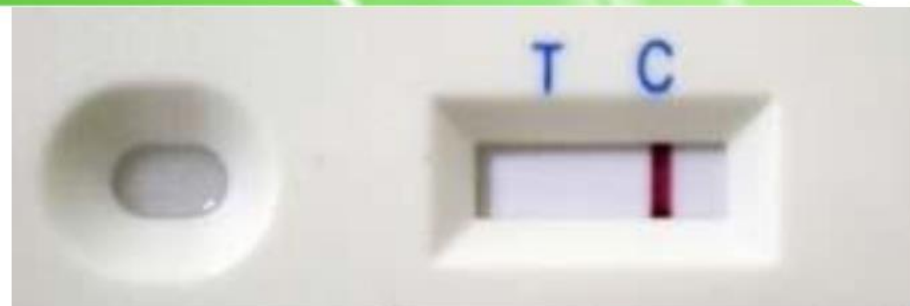
如果T线颜色很深，则刚接种疫苗或野毒感染

如果 $Ab \geq 2^4$ ，则Ab水平较高

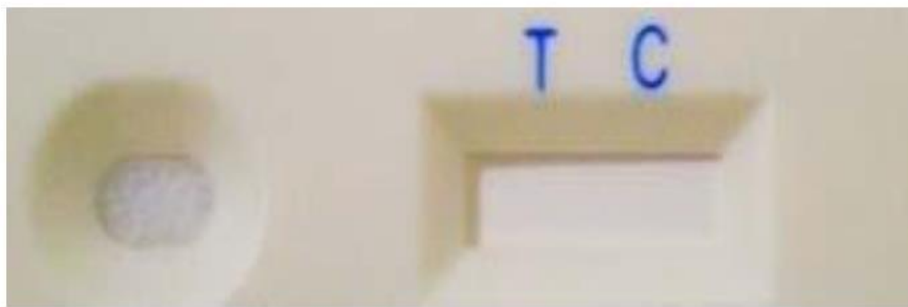
如果 $Ab < 2^4$ ，则Ab水平偏低，不能抵抗猪瘟病毒感染



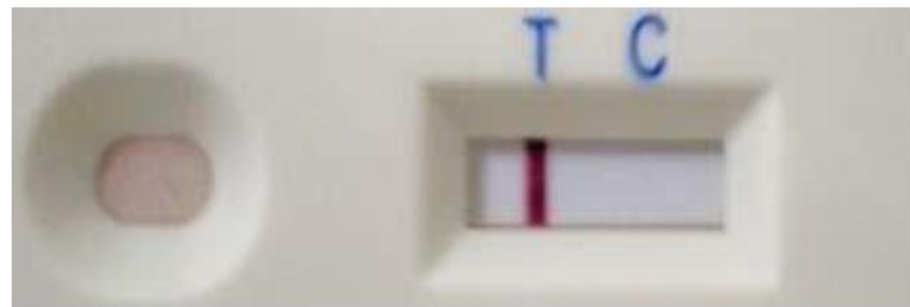
阳性



阴性



无效



无效



4. 注意事项

- (1) 注意检测卡的质量：如果发现过期、封口有破损、污染等，试纸可能已经失效。
- (2) 保存：室温避光保存，不可冷冻。注意有效期（18个月）
- (3) 所有检测卡一旦启封，须在1h内使用。
- (4) 检测卡及配套用品都是一次性，不可交叉及重复使用。
- (5) 请注意所用样品具有潜在传染性，注意防止交叉感染。
- (6) 本检测卡用于现场快速检测分析，仅提供定性检测结果，应结合临床症状或其它检测方法进行确诊，不作为确诊的唯一证据。



动物检验检疫技术

专业教学资源库

Thank You!