

ICS 11.220

B 41

# 团 体 标 准

T/CVMA X20—2019

## 猪伪狂犬病毒抗体荧光免疫层析检测法

The Detection of PRV Antibody by Hypersensitive Fluorescence

Immunoassay

(征求意见稿)

2019—XX—XX 发布

2019—XX—XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

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。

本标准由四川省兽医协会提出。

本标准由中国兽医协会归口。

本标准起草单位：四川省动物疫病预防控制中心，成都微瑞生物科技有限公司。

本标准主要起草人：陈斌、陈弟诗、周明忠、张毅、阳爱国、王泽洲、章建、邓飞、贺冬梅、丁梦蝶、裴超信、吴冠英、邱明双、张永宁、吴宣。

# 猪伪狂犬病毒抗体荧光免疫层析检测法

## 1 范围

本标准规定了猪伪狂犬病毒抗体(gB 和 gE) 荧光免疫层析检测法的原理、仪器设备、操作步骤、结果分析。

本标准适用于猪血清中猪伪狂犬病毒 gB 和 gE 特异性抗体的快速检测。

## 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 19489	实验室 生物安全通用要求
GB/T 6682	分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 18088	出入境动物检疫采样
NY/T 541	兽医诊断样品采集、保存与运输及规范

## 3 缩略语

HFIA 高敏荧光免疫分析方法  
(The Hypersensitive Fluorescence Immunoassay HFIA)

## 4 原理

采用免疫夹心法和高敏荧光免疫分析法相结合技术，检测动物血清样本中的猪伪狂犬病抗体(gB 和 gE)。当血清样本中抗体与高敏荧光纳米微球标记的伪狂犬重组抗原接触反应后形成复合物，继续与硝酸纤维素膜上检测线包被的伪狂犬重组抗原形成夹心复合物反应，其余物质继续向前层析在 C 线捕获住“荧光标记鸡 IgY+山羊抗鸡 IgY”免疫结合物，最后用高敏荧光分析仪读取检测卡上的荧光信号。

## 5 仪器、材料与试剂

### 5.1 仪器

5.1.1 高敏荧光分析仪：能在激发波长为(400±20)nm，检测波长为(615±10)nm 条件下检测。

5.1.2 单道可调移液器（20~200μL）和（0.5~10μL）。

5.1.3 分析天平：0.0001g。

5.1.4 离心机。

5.1.5 冰箱。

## 5.2 材料

5.2.1 猪伪狂犬病毒抗体(gB 和 gE)阳性血清。

5.2.2 猪伪狂犬病毒抗体(gB 和 gE)高敏荧光免疫分析法检测试剂卡（图 1）：硝酸纤维素膜上包被有猪伪狂犬病毒重组抗原，用于样品中猪伪狂犬病毒抗体与高敏荧光纳米微球标记伪狂犬重组抗原反应后，再与硝酸纤维素膜上包被的伪狂犬重组抗原反应。

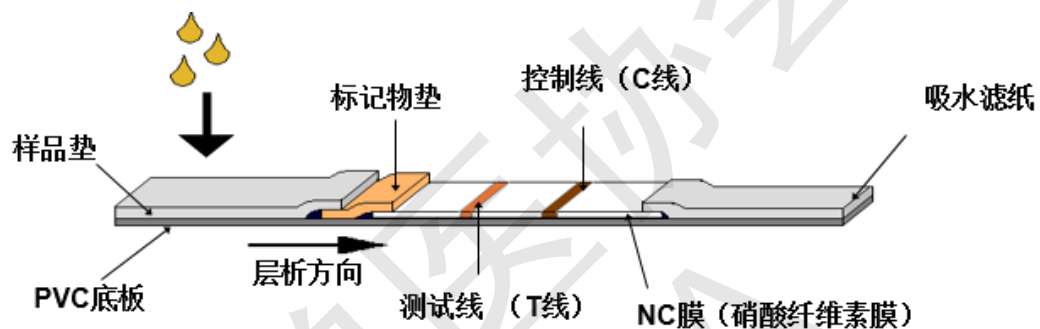


图1 猪伪狂犬病毒抗体荧光免疫层析检测法试剂卡示意图

## 5.3 试剂

5.3.1 水：按照 GB/T 6682 中的要求，二级。

5.3.2 样品稀释液（见附录 A）。

5.3.3 镧系荧光纳米微球：荧光寿命 $\geq 400\mu\text{s}$

## 6 样品采集与处理

### 6.1 样品的采集

应按照 NY/T 541-2002《动物疫病实验室检测采样方法》中的规定进行，并做好安全防护。按常规方法用干燥、洁净的离心管或适当容器采集 3~5mL 血液。

### 6.2 样品的处理

血液样本用离心机 3000r/m 离心 3min，血清量不少于 500 $\mu\text{L}$ 。

### 6.3 样品的贮存

血清样本在2-8℃冷藏可保存24小时，如需长期保存应置-20℃或-80℃。

## 7 检测方法

### 7.1 样品稀释

待检血清样本和猪伪狂犬病毒抗体荧光免疫层析检测法试剂卡从2-8℃取出，平衡到室温(25℃左右)。

用样品稀释液将待测血清样本按1:20稀释。

### 7.2 加样

从原包装铝箔袋中取出猪伪狂犬病毒抗体荧光免疫层析检测法试剂卡，置于平净平坦的台面上，用移液器吸取离心管中事先准备好的已稀释好的检测样本垂直滴加80μL于加样孔内。

### 7.3 检测

避光层析15min后用高敏荧光分析仪检测。

## 8 结果计算

$B$ —高敏荧光分析仪读取标准溶液或样本溶液的检测卡上的荧光信号T/C值

$B_0$ —高敏荧光分析仪读取稀释液检测卡上的荧光信号的T/C值

以标准品 $B-B_0$ 值的对数为纵坐标，以猪伪狂犬病毒抗体阳性血清效价对数为横坐标，绘制标准曲线图。将样本的荧光信号值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的样本中猪伪狂犬抗体效价。

注：软件自带计算功能，能准确算出当前样本T/C值所对应的猪伪狂犬病毒抗体效价。

## 9 检测结果判定标准

猪伪狂犬gB抗体效价检测：检测结果大于32时抗体水平为阳性，小于16时抗体水平为阴性，16~32之间为可疑区。

猪伪狂犬gE抗体效价检测：检测结果大于32时抗体水平为阳性，小于32时抗体水平为阴性。

## 附件 A

(规范性附录)

## 样品稀释液的配制

- |                    |       |
|--------------------|-------|
| A.1 硼酸             | 2.16g |
| A.2 硼砂             | 1.43g |
| A.3 $\text{NaN}_3$ | 0.25g |
| A.4 硫酸葡聚糖          | 1g    |
- A.5 800ml 双蒸水放入 1L 烧杯。
- A.6 B.1、B.2、B.3、B.4 同时放入 B.5 烧杯中搅拌溶化。
- A.7 用双蒸水将 B.6 烧杯溶液定容至 1L。
- A.8 混匀后分装，置4°C备用。
-