

团 体 标 准

T/CVMA X10—2020

猪瘟病毒抗体荧光层析检测方法

Detection method of swine fever virus antibody by TRFIA

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

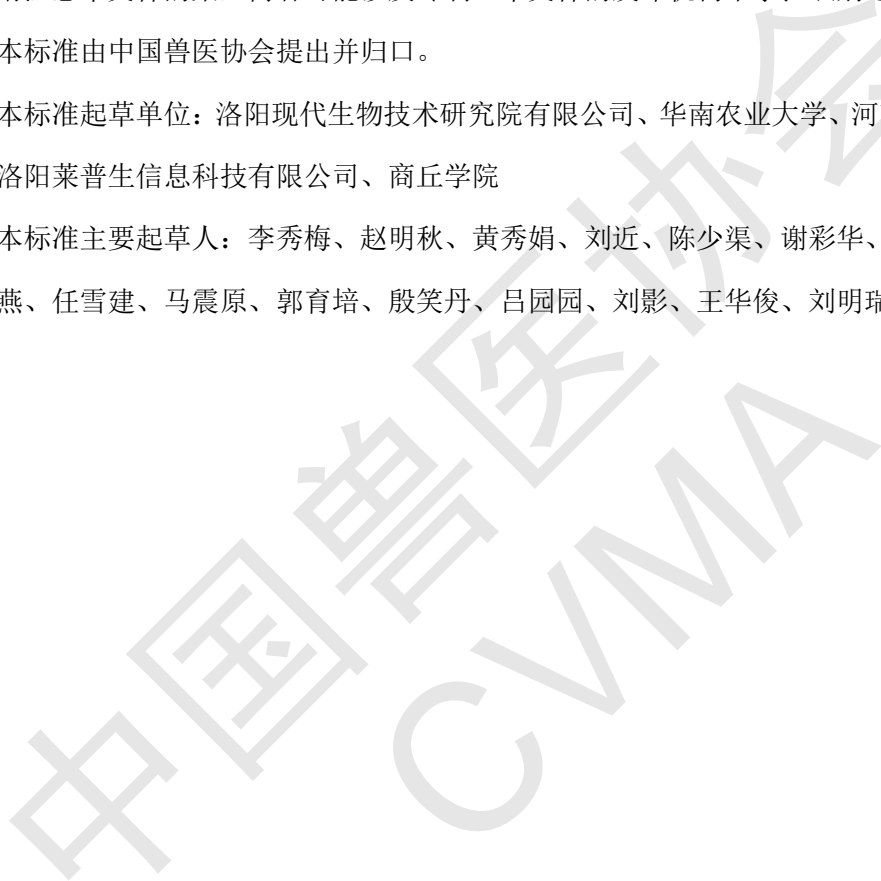
本标准按 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

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。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：洛阳现代生物技术研究院有限公司、华南农业大学、河南省动物疫病预防控制中心、洛阳莱普生信息科技有限公司、商丘学院

本标准主要起草人：李秀梅、赵明秋、黄秀娟、刘近、陈少渠、谢彩华、程果、杨菁芳、刘瑞灿、原小燕、任雪建、马震原、郭育培、殷笑丹、吕园园、刘影、王华俊、刘明瑞、吴彬



猪瘟病毒抗体荧光层析检测方法

1 范围

本标准规定了猪瘟病毒抗体荧光层析检测方法、试剂与耗材、器材与设备、技术原理、实验前准备工作、操作步骤、试验成立条件等内容。

本标准适用于以猪瘟抗原为主要活性材料制成的猪瘟感染抗体荧光微球检测试纸,可用于猪瘟病毒抗体的免疫筛查和辅助诊断等。

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 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法规范要求。

NY/T 541-2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范执行。

3 试剂与耗材

3.1 猪瘟病毒抗体荧光微球检测试纸,见附录 A。

3.2 硼酸缓冲液,见附录 B.1。

3.3 EDC 溶液,见附录 B.2。

3.4 NHS 溶液,见附录 B.3。

3.5 封闭液,见附录 B.4。

3.6 1%胭脂红色素,见附录 B.5。

3.7 磷酸缓冲液,见附录 B.6。

3.8 样品稀释液,见附录 B.7。

- 3.9 样品垫稀释液，见附录 B.8。
- 3.10 猪瘟病毒高免血清的制备，见附录 B.9。
- 3.11 猪瘟抗原为商品化 E2 重组蛋白。
- 3.12 标准阴性血清，标准猪瘟质控阳性血清，见附录 B10。

4 器材与设备

- 4.1 分析天平。
- 4.2 酸度计。
- 4.3 数显恒温磁力搅拌器。
- 4.4 电热鼓风干燥箱。
- 4.5 移液枪。
- 4.6 高速离心机。
- 4.7 微量毛细采样管。
- 4.8 可调式切条机。
- 4.9 高效连续点膜机。
- 4.10 便携式免疫荧光分析仪。

5 技术原理

本检测试纸采用时间分辨荧光免疫层析试验原理制成，样本加入到加样孔后与荧光微球标记物一起沿层析膜移动，若样本中存在猪瘟抗体，则与荧光微球标记物及检测线上的抗原结合而产生荧光信号；若样本中不存在抗体，则不产生荧光信号。

6 实验前准备工作

6.1 样本采集及处理

采集静脉血时，每头猪使用一个注射器。进行静脉无菌采血，按常规方法抽取 2~3 mL 血液置洁净干燥的试管中，静置约 1 小时待血液凝固后于 4000 转/分钟离心 10 分钟（也可将血液样本静置约 2 小时，待血液凝固自然析出血清），分离血清。血清应清亮，无溶血、无污染。

若无上述条件分离血清，可直接用全血检测。

6.2 血清样本的存放与运送

血清样本若在一周内检测，可置 2°C~8°C 条件下保存。若超过一周检测，应置于 -20°C 以下冷冻保存。运输时注意冷藏，确保样品清亮无污染。采集的血清样本可用冰袋或保温桶加冰密封等方式运输，运输时间应尽量缩短。按照《兽医实验室生物安全技术管理规范》进行样品的生物安全标识。

7 操作步骤

7.1 样品稀释

将微量毛细采样管取 10 μ L 全血或血清样本加入到已备好的样本稀释液管中混匀，稀释后的样品需在 1 h 内完成检测。可按照以下两种方式稀释。

7.1.1 离心管稀释

将检测样本在 1.5 mL 离心管中做 10 倍稀释并混匀。

7.1.2 稀释板稀释

将检测样本在稀释板上做 10 倍稀释并混匀。

7.2 取检测卡

将恢复至室温的试纸卡从铝箔包装中取出，将检测卡放于平整、洁净的台面上。

7.3 加样及孵育

用配套吸管吸取已稀释好的样本，垂直而缓慢的滴加 2~3 滴（约 80 μ L）到加样孔内，室温下放置 10~15 min。

7.4 仪器检测读数

读数前先将产品配套 ID 卡插入便携式荧光免疫分析仪，之后将反应到时间的检测试纸加样孔朝里插入便携式荧光免疫分析仪，点击“快速检测”进行读数，超过 25 分钟的结果无效。

8 试验成立条件

8.1 阴性

用标准阴性血清检测，检测线 T1 与质控线 C 的比值（T1/C 值） < 0.1 时，试验成立。

8.2 阳性

用标准猪瘟质控阳性血清检测，T1/C 值 > 0.2 时，试验成立。

9 结果判定

9.1 当 T1/C 值 < 0.1 时，判为猪瘟病毒抗体为阴性。

9.2 当 $0.1 \leq T1/C \leq 0.2$ 时，判为猪瘟病毒抗体为可疑。

9.3 当 T1/C 值 > 0.2 时，判为猪瘟病毒抗体为阳性。

中国兽医协会
CVMA

附录 A

(规范性附录)

猪瘟病毒抗体荧光微球检测试纸

A.1 荧光微球垫的制备

A.1.1 荧光微球标记猪瘟病毒 E2 蛋白的制备

A.1.1.1 洗涤

按需量取固体含量为 1% 的荧光微球洗涤液，即加入 5 倍体积的硼酸缓冲液（0.05 mol/L，pH 8.0），以 12000 r/min 离心 15 分钟，弃上清，重复清洗 2 次，将洗涤后的荧光微球重悬于 5 倍体积硼酸缓冲液。

A.1.1.2 荧光微球活化

取 50 μ L 荧光微球加之 1 mL MES 缓冲液中，混匀，12000 r/min 离心 15min；弃上清，加入 1 mL MES 缓冲液，混匀离心；重复上述步骤 3 次，并用 1 mL MES 缓冲液复溶；向上述溶液中加入 250 μ L EDC 缓冲液，混匀，室温反应 30 min；弃上清，加入 4 mL 标记缓冲液，混匀。

A.1.1.3 荧光微球标记

将 E2 重组蛋白加入到已活化的荧光微球中，使其终浓度为 50 μ g/mL，充分混匀，于室温（15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）避光反应 1.5 小时；按溶液总体积的 3% 加入封闭液，混匀，于室温（15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）避光反应 30 分钟。离心弃上清，按 A.2.1.1 用硼酸盐缓冲液清洗 2 次，并重悬已标记的荧光微球。以 1% 的量加入 1% 胭脂红色素，混匀，2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存备用。

A.1.2 荧光微球垫的制备

待荧光微球标记 E2 重组蛋白恢复至室温（15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C），取玻璃纤维素膜裁切为 10 cm \times 30 cm 规格，设置喷涂量为 3 μ L/cm，每张玻璃纤维素膜（10 cm \times 30 cm）以 1.0 cm 间隔喷涂 8 条，将完成喷涂的玻璃纤维素膜放置在干净纱窗网上，置 37 \pm 2 $^{\circ}$ C 干燥 2~3 小时，用切条机将喷涂有荧光微球标记 E2 重组蛋白的部分裁切为 0.7 cm \times 30 cm 的条带，于 4 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C 密封保存备用。

A.2 印膜的制备

A.2.1 印膜溶液的制备

A.2.1.1 质控线（C 线）印膜溶液

用 磷酸缓冲液（0.05 mmol/L，pH 值 8.0）将制备的猪瘟病毒的高免血清（其制备方法见附录 B）稀释至终浓度为 1.5 mg/mL 作为质控线（C 线）印膜溶液，置于棕色玻璃瓶中，2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存备用。

A.2.1.2 检测线印膜溶液

用磷酸缓冲液（0.05 mmol/L，pH 值 8.0）将猪瘟 E2 重组蛋白稀释至终浓度为 1.2 mg/mL 作为检测线印膜溶液，置于棕色玻璃瓶中，2°C~8°C 保存备用。

A.2.2 印膜

将印膜溶液分别吸至高效连续点膜机的质控线管线和检测线管线中，按 0.8 μ L/cm 在硝酸纤维素膜上均匀划出质控线（C 线）和检测线（T 线），其中质控线（C 线）距硝酸纤维素膜顶端 0.8 \pm 0.1 cm 处，检测线距膜顶端 1.3 \pm 0.1 cm 处，质控线与检测线相距 0.5 \pm 0.1 cm，并在膜的开始端、末端及不均匀处作标记。

A.2.3 印膜干燥

将已划线的硝酸纤维素膜逐一放置在干净纱窗网上，忌重叠，置于干燥间进行干燥，37 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C 干燥 2 小时后。放入装有干燥剂的铝箔袋内，封口，贴上标签，于 4 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C 密封保存备用。

A.3 样品垫的制备

将 20 \times 30cm 的玻璃纤维素膜平铺于洁净的玻璃平板上，倾倒 20 mL 样品垫处理液至玻璃纤维素膜中央，滚轮铺匀，37 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C 过夜干燥，用切条机将其裁切为 2.0 cm \times 30 cm，于 4 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C 密封保存备用。

A.4 检测卡的制备

在室温（15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）及湿度 \leq 30%RH 的洁净环境下，按照以下步骤组装半成品试纸。

A.4.1 贴条

依次按印膜、吸水垫、荧光微球垫、样品垫的顺序将各中间制品粘贴于 PVC 底板上，保证各中间品在相邻处均有 1~2 mm 层叠，并使印膜上的检测线靠近样品垫一侧、质控线靠近吸水垫一侧。

A.4.2 切条

在室温（15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）及湿度 \leq 30%RH 条件下，将已组装好的荧光微球大板修剪整齐后，用切条机将检验合格的半成品裁切为 3.0 \pm 0.1 mm 宽的试纸。

A.4.3 装卡

挑取印膜无划痕、无污染，边缘整齐的试纸，将试纸装入卡壳中，使用压卡机进行压卡，单卡与干燥剂、滴管装入铝箔袋并封口。

附录 B

(规范性附录)

相关试剂的配制

B.1 硼酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 8.5)

称取 6.7g 硼酸, 13.4g 硼砂 (含 10 个结晶水), 溶解于 800ml 纯化水, 定容至 1 L, 调节 pH 至 8.5。

B.2 EDC 溶液 (2 mg/mL)

称取 0.2g 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (碳化二亚胺), 100mL 纯化水溶解, 2~8°C 保存。

B.3 NHS 溶液 (4 mg/mL)

称取 0.4 g 羟基琥珀酰亚胺, 100 mL 纯化水溶解, 调节 pH 值至 6.0。

B.4 封闭液

称取 90 g 酪蛋白, 加入 1 L 纯化水溶解, 2 °C~8°C 保存。

B.5 1% 胭脂红色素

称取 1.0 g 胭脂红色素, 100 mL 纯化水溶解。

B.6 磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 8.0)

甲液 (0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液): 称取 2.84 g 磷酸氢二钠加纯化水定容至 100 mL; 乙液 (0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液): 称取 3.12 g 磷酸二氢钠 (含 2 个结晶水) 加纯化水定容至 100 mL; 分别量取甲液 94.7 mL 和乙液 5.3 mL, 混匀后量取 25 mL 加入 75 mL 纯化水, 混匀。

B.7 样品稀释液 (0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 值 7.2)

称取 3.0 g 磷酸氢二钠 (含 12 个结晶水)、0.5 g 磷酸二氢钾、8.0 g 氯化钠、0.5 g 氯化钾, 溶于 800 mL 纯化水, 再加入 400 μ L Proclin-300, 纯化水定容至 1 L。

B.8 样品垫处理液

称取 17 g 无水磷酸氢二钠, 0.414 g 磷酸二氢钠 (含 2 个结晶水), 5.0 g 蔗糖, 3.0 g 酪蛋白, 5.0 g 聚乙二醇 20000, 5.0 g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-K30), 20 mL 吐温-20, 加入 1 L 纯化水溶解。

B.9 猪瘟病毒高免血清的制备

选取 6 只断乳雌性豚鼠, 将纯化的重组蛋白按 0.5 mg /只的剂量对其中 3 只 (1~3 号) 进行免疫接种, 免疫部位为腹腔、颈部皮下和大腿肌肉, 共免疫三次, 每次间隔 2 周; 其余 3 只 (4~6 号) 作为非免疫对照。初次免疫时, 重组蛋白用弗氏完全佐剂进行乳化, 第二、三次免疫则改用弗氏不完全佐剂, 其余程序不变。分别在免疫前、二免后 1、2、3 周及三免后 1、2 周进行心脏采血, 分离血清。

B.10 阴性及阳性血清的制备

B.10.1 标准阴性血清的制备

B.10.1.1 采血

对 1 头健康猪进行静脉采血。

B.10.1.2 制备血清

室温（15℃~25℃）待血液凝固后，37℃静置 2 小时后，然后 2℃~8℃静置 1 小时，将析出的血清转移到离心瓶中，以 2000r/min 离心 5 分钟，收集上清。

B.10.1.3 血清的分装及保存

将制备的血清混合均匀后，0.22μm 滤膜过滤除菌，将血清与冻干保护剂按 8.5 : 1 比例混匀，无菌定量分装，1 mL/瓶，冷冻真空干燥，置-70℃以下保存，标记为“猪瘟标准阴性血清”，同时注明制备日期等信息。

B.10.2 标准猪瘟质控阳性血清的制备

B.10.2.1 免疫与采血

用猪瘟病毒 E2 蛋白于每只猪瘟阴性血清猪耳背后肌肉注射，2 mL / 头份。免疫后 1 周，每周无菌采血检测，当抗体效价达 1 : 512 时，无菌采集免疫猪血液。

B.10.2.2 分装、冻干及保存

将制备的血清混匀后，经 0.22μm 滤膜过滤除菌，将血清与冻干保护剂按 8.5 : 1 比例混匀，无菌定量分装，1 mL/瓶，冷冻真空干燥，置-70℃下保存，标记为“标准猪瘟质控阳性血清”，同时注明制备日期等信息。
