ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

禽白血病磁微粒化学发光抗原检测方法

Detection of avian leukemia magnetic particle chemiluminescence antigen

（征求意见稿）

中国兽医协会 CVMA

XXXX- XX-XX 发布　　XXXX - XX -XX 实施

中　国　兽　医　协　会　发布

前　言

本文件按照GB/T 1.1－2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的的结构和起草规则》 的规定起草。

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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：禾旭（郑州）生物技术有限公司。

本文件主要起草人：

中国兽医协会 CVMA

禽白血病磁微粒化学发光抗原检测方法

1 范围

本文件规定了禽白血病磁微粒化学发光抗原检测方法的试剂与耗材、器材与设备、实验前准备、操作步骤、试验成立条件和结果判定标准等内容。

本文件适用于泄殖腔棉拭子、胎粪、蛋清样品中禽白血病病毒抗原的检测，适用于养殖场禽白血病净化水平评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成文件的必不可少的条款。其中注日期的引用文件，仅注日期对应的版本适用于本文件；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。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

T/CVMA 32 禽白血病病毒抗原化学发光免疫分析检测方法

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1 磁性微球溶液

包被禽白血病病毒抗原的磁性微球溶液，主要成分为禽白血病病毒抗原包被的磁性微球、缓冲液、牛血清白蛋白、防腐剂。

4 试剂与耗材

4.1 磁性微球溶液，见附录 A。

4.2 标记物，见附录 B。

4.3 禽白血病病毒标准阳性抗原、标准阴性抗原，见附录 C。

中国兽医协会 CVMA

4.4 浓缩洗涤液，见附录 D.1。

4.5 稀释液，见附录 D.2。

4.6 预激发液，见附录 D.3。

4.7 激发液，见附录 D.4。

5 器材与设备

5.1 高速冷冻离心机（最大离心力：15000 r/min）。

5.2 全自动化学发光免疫分析仪。

5.3 2 ℃～8 ℃冰箱，-20 ℃冰箱。

5.4 一次性采血器（5 mL、10 mL）。

5.5 1.5 mL 灭菌离心管。

5.6 专用样本架。

5.7 反应杯。

6 实验前准备工作

6.1 样本采集及处理

6.1.1 蛋清样本

取全蛋，破碎后取蛋清，置-18 ℃以下冻融一次，用塑料吸头吸取蛋清直接进行检测。

6.1.2 泄殖腔棉拭子

取泄殖腔棉拭子时,将棉拭子深人泄殖腔转 3 圈并沾取少量粪便;用棉签于待检鸡只泄殖腔取样后，放入 l mL 样品稀释液中，置-18 ℃以下冻融 1 次，恢复室温后，剧烈振荡 1 min，挤出棉签中的液体，弃棉签。将液体于 2 ℃～8 ℃下，以 12000 r/min 离心 1 min，取上清直接进行检测。

6.1.3 胎粪样品

用棉签取待检鸡只胎粪，放入1mL样品稀释液中，置-18 ℃以下冻融1次，恢复室温后，剧烈震荡1 min，挤出棉签中的液体，弃棉签。液体在2 ℃～8 ℃下，以12000 r/min离心1 min，取上清直接进行检测。按照《T/CVMA 32 禽白血病病毒抗原化学发光免疫分析检测方法》进行样品的采集及处理。

中国兽医协会 CVMA

6.2 样本的存放与运送

样本若在一周内检测，可置 2 ℃～8 ℃条件下保存。若超过一周检测，应置于-20 ℃以下冷冻保存。运输时注意冷藏，确保样品有效无污染。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《NY/T 541 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 将样品架置入相应样品仓内，仪器自动吸取50 μL待检样品、阴阳性对照加入反应杯。

7.2 加入20 μL磁性微粒溶液，加入100 μL标记物，仪器自动在37 ℃条件下温育10 min（±1 min）。

7.3 清洗3次。

7.4 加入100 μL预激发液和100 μL激发液，孵育3 min。

7.5 读取发光值。

8 结果判定

8.1 试验成立条件

PC/NC≥10 ……（2）

NC ——阴性对照发光值；

PC ——阳性对照发光值。

8.2 结果判定

样品的计算方法

S/P=（S/PC $\overline{X}$ ） ……（2）

式中：

S ——样品发光值；

PC $\overline{X}$ ——阳性对照发光值平均值。

S/P≥0.3，判定为阳性；

S/P＜0.3，判定为阴性。

中国兽医协会 CVMA

附录 A

（规范性）

磁性微球溶液

磁性微球溶液为商品化试剂。

中国医协会 CVMA

附录 B

（规范性）

标记物

取一定量禽白血病病毒单克隆抗体，采用 0.05 moL/L pH 9.5 CB 调整浓度为 1 mg/mL；按抗体:吖啶酯=1:10～1:20 摩尔比边搅拌边混匀,室温反应 0.5 h～1.5 h；透析纯化至少 3 次去除多余小分子,加入等量甘油,放置-20 ℃保存。

中国兽医协会 CVMA

附录 C

（规范性）

禽白血病病毒抗原阳性对照、阴性对照

禽白血病病毒抗原阳性对照为外购的禽白血病病毒重组蛋白；禽白血病病毒抗原阴性对照为禽白血病病毒抗原阴性血清。

中国兽医协会 CVMA

附录 D

（规范性）

相关试剂的配制

D.1 浓缩洗涤液

丁二酸	1.98 g
六水丁二酸钠	62.16 g
氯化钠	225 g
吐温-20	13.75 g

D.3 稀释液

称取 2.9 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾，加入 800 mL 双蒸水搅拌溶解，加入牛血清白蛋白 10 g、ProCLin-300 1 mL、吐温 1 mL，用双蒸水定容至 1000 mL，过滤除菌。

D.4 预激发液

含有 0.125%～1%的二甲基甲酰胺或乙醇和 0.125%～1% 吐温-20 的 H_2O_2。

3.8 激发液

含有0.125%～1%的二甲基甲酰胺或乙醇和0.125%～1% 吐温-20的NaOH。

中国兽医协会 CVMA