ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

小反刍兽疫磁微粒化学发光抗体检测方法

Detection of magnetic particle chemiluminescence antibody against small ruminant disease

(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：昆明海关技术中心、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

小反刍兽疫磁微粒化学发光抗体检测方法

1 范围

本文件规定了小反刍兽疫磁微粒化学发光抗体检测方法的规范性引用文件、术语和定义、试剂与耗材、器材与设备、样品采集处理、实验操作和结果判定等内容。

本文件适用于动物全血或血清中的小反刍兽疫抗体检测。

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

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

包被小反刍兽疫病毒抗原的磁性微球溶液，主要成分为小反刍兽疫病毒抗原包被的磁性微球、缓冲液、牛血清白蛋白、防腐剂。

3.2 小反刍兽疫

由小反刍兽疫病毒引起的一种急性病毒性传染病，主要感染小反刍动物，以发热、口炎、腹泻、肺炎为特征。

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。

中国兽医协会 CVMA

4.3 小反刍兽疫病毒抗体标准阳性血清和标准阴性血清，见附录 C。

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：15000r/min）。

5.2 全自动化学发光免疫分析仪。

5.3 单道微量移液器（50μL～100μL）。

5.4 2 ℃～8 ℃冰箱，-20 ℃冰箱。

5.5 一次性采血器（ 5mL、10mL）。

5.6 1.5mL 灭菌离心管。

5.7 专用样本架。

5.8 反应杯。

6 实验前准备工作

6.1 样本采集及处理

6.1.1 进行静脉无菌采血，不少于 2 mL。采集静脉血时，每只羊使用一个采血器。

6.1.2 将血液室温静置于斜面 2 h，待血液自然凝固后，置 2 ℃～8 ℃冰箱中放置不少于 2 h，然后置高速冷冻离心机 4000 r/min 离心 10 min。

6.1.3 吸出上层血清保存备用。血清应清亮，无溶血、无污染。

6.2 血清样本的存放与运送

6.2.1 血清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，避免反复冻融。

6.2.2 运输时注意冷藏，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，

中国兽医协会 CVMA

确保样品有效无污染。按照《NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》进行样品的保存。

7 操作步骤

7.1.1 将样品架置入相应样品仓内，仪器自动吸取50μL待检样品、阴阳性标准血清加入反应杯。

7.1.2 加入20μL磁性微粒溶液、100μL标记物，在37 ℃条件下温育10 min（±1 min）

7.1.3 清洗3次，洗涤后分别加入100μL预激发液和100μL激发液，孵育3 min。

7.1.4 读取发光值。

8 结果判定

8.1 试验成立条件

$$NC/PC \geq 10 \quad \text{……（2）}$$

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

$$S/N=（S/NC\overline{X}） \quad \text{……（2）}$$

式中：

S ——样品发光值；

NC$\overline{X}$ ——阴性对照发光值平均值。

若S/N≥0.4，样品判为抗体阴性；

若S/N＜0.4，样品判为抗体阳性；

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

取一定量小反刍兽疫病毒单抗，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）

小反刍兽疫病毒抗体标准阳性血清和标准阴性血清

C.1 阴性对照的制备

C.1.1 采血

对 1 头健康羊进行颈部静脉大量采血（经竞争 ELISA 方法检测）。

C.1.2 制备血清

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

C.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“小反刍兽疫病毒抗体阴性血清”，同时注明制备日期等信息。

C.2 阳性对照的制备

C.2.1 免疫与采血

用小反刍兽疫病毒活疫苗于每头羊小反刍兽疫病毒抗体阴性亲耳背后肌肉注射，2 mL/头份。免疫后 1 周，每周无菌采血，用 IDVET 商品化的小反刍兽疫病毒抗体检测试剂盒检测，当抗体效价不低于 1∶512 时，无菌采集免疫羊血液。

C.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“小反刍兽疫病毒抗体阳性血清”，同时注明制备日期等信息。

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.2 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-20 1 mL，用双蒸水定容至 1000 mL，过滤除菌。

D.3 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。

D.4 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