ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X37—2019

禽白血病病毒抗原化学发光免疫分析检测方法

Chemiluminescent Immunoassay for Detection of Avian Leukusis Virus Antigen

中国兽医协会 CVMA

2019- XX-XX 发布　　2019- 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：中国动物疫病预防控制中心、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、洛阳现代生物技术研究院有限公司、甘肃省动物疫病预防控制中心、新疆维吾尔自治区动物疫病预防控制中心、云南省动物疫病预防控制中心、西藏自治区动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、江西省动物疫病预防控制中心、四川省动物疫病预防控制中心、广东省动物疫病预防控制中心、黑龙江省动物疫病预防控制中心、重庆市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：孙雨、王传彬、王笑梅、李秀梅、宋晓晖、赵晓春、蒋菲、肖颖、曹丽萍、王睿男、杨林、高玉龙、央珍、康文彪、魏润生、刘近、杨晓帆、央珍、王文、林汉亮、肖开提.阿不都克里木、曾邦权、邹联斌、阳爱国、陈冬、韦正吉、甘平、李硕、徐亚东、康新华、王文莉、顾贵波、贾俊元、徐峥嵘、郑红飞、豆玲、张登基、张莉、毋艳萍、刘明瑞、耿玉静、任雪建、吴彬、韩焘、赵柏林、吕园园、董浩、周智、张硕、马英、毕一鸣、汪葆月、顾小雪、杨天意、孙航、闫西平、李凯、王岩保、沈艳丽、赵全邦。

中国兽医协会 CVMA

禽白血病病毒抗原化学发光免疫分析检测方法

1 范围

本标准规定了禽白血病病毒抗原化学发光检测试剂盒检测禽白血病病毒抗原的检测方法。

本标准适用于化学发光法检测泄殖腔拭子、蛋清、胎粪样品中的禽白血病病毒 p27 抗原，可用于带毒种鸡的筛查。

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。

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 禽白血病病毒 p27 蛋白单克隆抗体，见附录 A。

3.2 禽白血病病毒 p27 蛋白酶标单克隆抗体，见附录 B。

3.3 PBST（pH 值 7.2），见附录 C.1。

3.4 包被缓冲液，见附录 C.2。

3.5 封闭液，见附录 C.3。

3.6 酶结合物稀释液，见附录 C.4。

3.7 阴性对照，见附录 C.5。

3.8 阳性对照，见附录 C.6。

3.9 化学发光底物 A，见附录 C.7。

3.10 化学发光底物 B，见附录 C.8。

4 器材与设备

4.1　化学发光免疫分析仪。

4.2　分析天平。

4.3　洗板机。

4.4　37℃温箱。

4.5　2℃～8℃冰箱，－20℃冰箱。

4.6　单道微量移液器（0.5 μL～10 μL；10 μL～100 μL；20 μL～200 μL；100 μL～1000 μL）。

4.7　多道移液器（300μL）。

4.8　NUNC 反应板。

4.9　血清稀释板：96孔一次性U型血凝板或96孔细胞培养板。

4.10 一次性注射器（5mL～10mL）。

5　技术原理

采用双抗体夹心反应原理，包被板上包被禽白血病病毒2E5株单克隆抗体，待检样品中的待检抗原和酶标记抗体形成固相抗体-抗原-酶标抗体免疫复合物，洗涤除去未结合酶标抗体，加底物显色来判定样品中的抗原含量。

6　实验前准备工作

6.1　样本采集及处理

6.1.1 蛋清样品

取全蛋，破碎后取蛋清，置－18℃以下冻融1次，用塑料吸头吸取蛋清直接进行检测。

6.1.2 泄殖腔拭子

用棉签于待检鸡只泄殖腔取样后，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分钟，挤出棉签中的液体，弃棉签。液体在2～8℃下，以12000r/min离心1分钟，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分钟，挤出棉签中的液体，弃棉签。液体在2～8℃下，以12000r/min离心1分钟，取上清直接进行检测。

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。采集的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 包被

根据生产工艺的研究结果，用包被缓冲液将2E5株单抗稀释至终浓度为0.85μl/ml制备包被液，将包被液以100μl/孔加入发光板，置2～8℃包被22～24小时。

7.2 洗板

弃去包被液，使用280-300μl的PBST洗板2次。

7.3 封闭

每孔加入150μl封闭液，置2～8℃封闭22～24小时。

7.4 干燥

弃去封闭液，在吸水纸上拍干。置37±2℃干燥2～3小时，加入干燥剂，密封包装，置2～8℃保存。

7.5 加样

取出CLIA包被板（根据待检样品的多少，可将板条拆开分次使用），分别加入100μl阴性、阳性对照，每次检测各加两孔；在相应的样品孔中加入100μl样品。

7.6 温育

贴上封板膜，置37℃恒温培养箱中温育30分钟（±1分钟）。

7.7 洗板

中国兽医协会 CVMA

取出反应板，弃去反应液。用300μl洗涤液洗涤板孔，共洗涤5次。每次洗涤后应弃去孔内的液体。在最后一次洗涤液弃去后，将孔中残留的洗涤液在吸水纸上拍干。

7.8 加酶

每孔加入100μl酶结合物。

7.9 温育

贴上封板膜，置37℃恒温培养箱中孵育30分钟（±1分钟）。

7.10 重复步骤1.3.3。

7.11 加入底物

每孔加入50μL的化学发光底物A和50μL的化学发光底物B，振荡混匀（也可化学发光底物A、B等比例混匀后加100μL）

7.12 静置

在15～25℃条件下避光静置5分钟。

7.13 读值

静置后15分钟内用化学发光仪读取发光值。

8 结果判定

8.1 成立条件

阴性对照平均值（NC$\overline{X}$）　　NC$\overline{X}$=(NC1+NC2)/2
阳性对照平均值（PC$\overline{X}$）　　PC$\overline{X}$=(PC1+PC2)/2
试验成立判断标准：PC$\overline{X}$ > 10 NC$\overline{X}$；否则，试验不成立。

8.2 结果判定描述

S/P=样品/PC ，其中S代表样本发光值。
若S/P≥0.2，样品应判定为阳性；
若S/P＜0.2，样品应判定为阴性。

中国兽医协会 CVMA

附录 A

（规范性附录）

禽白血病病毒 p27 蛋白单克隆抗体的制备

A.1　生产用细胞繁殖

从液氮中取出杂交瘤细胞 2E5 株和 3D5 株工作细胞，在 37℃水浴中迅速解冻，用含 20%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液制成细胞悬液，置 37℃、含 5% CO2 培养箱中培养 48～72 小时，使其稳定分裂繁殖，长成细胞单层。取长成良好单层的细胞 1 瓶，弃掉培养基，用 10ml 含 20%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液吹悬细胞，按照 1∶3 的比例接种到新的细胞瓶（75cm2）中，然后补充含 20%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液至 15ml/瓶，置 37℃、含 5% CO2 的培养箱中继续培养 48～72 小时。

A.2　腹水的制备

将扩大培养的杂交瘤细胞以 1000r/min 离心 10 分钟，弃上清，用 RPMI-1640 培养基重悬，细胞计数板进行细胞计数，用 RPMI-1640 培养基将细胞浓度稀释至 1.25×10^{7} 个/ml。取 BALB/c 小鼠，各经腹腔接种杂交瘤细胞，100μl/只，观察 10～15 日，待小鼠腹部明显肿大后，采集腹水。

A.3　腹水的纯化

采用辛酸-饱和硫酸铵沉淀方法，对制备的腹水进行纯化，纯化后的单克隆抗体无菌定量分装，-80℃以下保存备用。

中国兽医协会 CVMA

附录 B

（规范性附录）

禽白血病 p72 蛋白酶标单克隆抗体的制备

称取 2mgHRP 溶解于 0.5ml 蒸馏水中。于上液中加入 0.5ml 新配的 0.06M NaIO4 溶液，4 度避光 30 分钟。上液中加入 160MM 的乙二醇 0.5ml，室温 30 分钟。上液中加入 IgG 2mg，混匀。将上述溶液装入透析袋中，置 2000ml 的 0.05mM CB Buffer 中透析，4℃搅拌过夜。（0.05M CB Buffer：Na2CO3 3.18g ＋NaHCO3 5.88g，up to 2L 蒸馏水）透析液吸至 15ml 的离心管中，加 0.2ml 新配的 5mg／ml NaBH4 液，混匀，再置 4℃2 小时。加入等量的饱和硫酸铵溶液，4 度 30 分钟，4 度离心 4000rpmX20 分钟。弃上清，沥干。将沉淀溶于少量 PBS 中（0.02M，pH7.4），装入透析袋中，对 0.02M PH7.4 PBS 透析，4℃过夜（中途换 PBS 一次）。将透析液中液体吸至 EP 管中，离心，将上清液吸出，加等量甘油，混匀。-20 度保存即可。

中国兽医协会 CVMA

附录 C

（规范性附录）

相关试剂的配制

C.1 PBST（pH 值 7.2）

称取 2.9g 磷酸氢二钠（含 12 个结晶水），0.2g 磷酸二氢钾，8.0g 氯化钠，0.2g 氯化钾，溶于 800ml 纯化水，再加入 0.5ml 吐温-20，用 HCl 调节 pH 值至 7.2，纯化水定容至 1L。

C.2 包被缓冲液

称取 2.93g 碳酸氢钠，1.59g 碳酸钠，溶解于 1L 纯化水中。

C.3 封闭缓冲液

称取 15g 酪蛋白，加入 1L PBST，充分搅拌至完全溶解，2～8℃保存。

C.4 酶结合物稀释液

称取 6.06g Tris，8.2g 氯化钠，15g 酪蛋白，1.5g 氨基比林，加入 800ml 纯化水，待充分溶解加入终浓度为 0.02%的 Proclin-300，0.1g 胭脂红色素，纯化水定容至 1L。

C.5 阴性对照

用稀释液将制备的阴性标准品按 1∶20 稀释，无菌定量分装，置 2～8℃保存。

C.6 阳性对照

用稀释液将制备的阳性标准品按 1∶20 稀释，无菌定量分装，置 2～8℃保存。

C.7 化学发光底物 A

称取 24.23g 三羟甲基氨基甲烷溶于 800ml 纯水中，充分搅拌均匀，用 HCl 调节 pH 值至 8.0。加入 0.026g 鲁米诺干粉，待其完全溶解后，加入 0.086g 羟基香豆素，而后加纯化水定容至 1000ml，2～8℃保存。

C.8 化学发光底物 B

称取 15.42g 醋酸铵溶于 800ml 纯水中，用冰醋酸调 pH 值至 5.2，加入 0.021g 维生素 C，待其完全溶解后，加入 0.066g 氨基酸氧化酶，而后加纯化水定容至 1000ml，2～8℃保存。

中国兽医协会 CVMA