ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 17-2020

新城疫病毒V蛋白抗体间接ELISA检测方法

Indirect ELISA detection method of newcastle disease virus V protein antibody

中国兽医协会
CVMA

2020-12-22 发布　　2020-12-22 实施

中　国　兽　医　协　会　发布

目　　次

前言 I
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语定义和缩略语 1
4 原理 2
5 试验条件 2
6 试剂 2
7 仪器和设备 3
8 样品采集、运输与保存 3
9 ELISA 试验步骤 3
10 试验数据处理 4
11 质量保证和控制 5
12 试验报告 5
附录 A（规范性） 7
附录 B（资料性） 9
附录 C（资料性） 10
附录 D（规范性） 12
附录 E（规范性） 13
附录 F（资料性） 15
附录 G（资料性） 16
附录 H（资料性） 18
参考文献 19

中国兽医协会 CVMA

前　　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》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：华南农业大学。

本文件主要起草人：任涛、徐成刚、廖明、于得水、梁健鹏、谢鹏、向斌、林秋燕。

中国兽医协会
CVMA

新城疫病毒V蛋白抗体间接ELISA检测方法

1 范围

本文件规定了鸡血清中新城疫病毒V蛋白抗体间接ELISA检测方法。

本文件适用于鸡群体新城疫病毒V蛋白抗体检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文本中的规范性引用而构成本文本必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该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。

GB/T 18936 高致病性禽流感诊断技术

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27418 测量不确定度评定和表示

GB/T 33087 仪器分析用高纯水规格及试验方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

SN/T 2984 检验检疫动物病原微生物实验活动生物安全要求细则

YY/T 1183 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)

3 术语定义和缩略语

下列术语定义和缩略语适用于本文件。

3.1

新城疫病毒 newcastle disease virus；NDV

副黏病毒科，副黏病毒亚科，禽腮腺炎病毒属，单股负链RNA病毒。

3.2

酶联免疫吸附试验 enzyme linked immunosorbent assay；ELISA

指将可溶性的抗原或抗体结合到聚苯乙烯等固相载体上，利用抗原抗体特异性结合进行免疫反应的定性和定量检测方法。

3.3

V 蛋白羧基端 carboxyl terminus of protein V；Vc

NDV V 蛋白是由 P 基因通过“RNA 编辑”的方式插入一个鸟嘌呤编码产生，Vc 是指 V 蛋白的第 101 位~240 位氨基酸。

3.4

光密度 optical density；OD

样品吸收掉的光密度。

3.5

辣根过氧化物酶 horseradish peroxidase；HRP

由无色的酶蛋白和棕色的铁卟啉结合而成的糖蛋白。

3.6

四甲基联苯胺 tetramethylbenzidine；TMB

与 HRP 活性中心反应产生深蓝色沉淀物，起显色剂作用。

4 原理

间接 ELISA 的原理：吸附于固相载体表面的抗原与被检样品中相应的抗体结合形成抗原抗体复合物，再加入酶标记的抗体（抗抗体），加入底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物颜色的深浅与样品中相应抗体的量呈正比，可根据颜色的深浅进行定性或定量检测。

NDV 复制过程中，P 基因经 RNA 编辑作用产生非结构蛋白 V。P 蛋白与 V 蛋白氨基端区域相同，而羧基端区域不同。为保证单一的抗原抗体反应，本方法利用大肠杆菌原核表达系统表达 NDV V 蛋白第 101 位~240 位氨基酸的重组蛋白 Vc，以其作为抗原建立 NDV V 蛋白抗体间接 ELISA 检测方法。

5 试验条件

实验室环境的温度和相对湿度分别为：21 ℃~25 ℃，25 %~75 %。

6 试剂

6.1 NDV Vc 蛋白：按照附录 A 的方法制备，质检结果见附录 B 和附录 C。

6.2 阳性血清：按照附录 D.1 的方法制备。

6.3　阴性血清：按照附录 D.2 的方法制备。

6.4　酶结合物：商品化的 HRP 标记的抗鸡 IgG 抗体，工作浓度参照产品说明书。

6.5　抗原包被液：按照附录 E.1 的方法配制。

6.6　磷酸盐缓冲液：按照附录 E.2 的方法配制。

6.7　洗涤液：按照附录 E.3 的方法配制。

6.8　稀释液：按照附录 E.4 的方法配制。

6.9　封闭液：按照附录 E.5 的方法配制。

6.10　TMB 显色液：按照附录 E.6 的方法配制。

6.11　终止液：按照附录 E.7 的方法配制。

注：本实验所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 33087 的仪器分析用高纯水。

7　仪器和设备

7.1　37 ℃恒温培养箱

7.2　酶标仪

7.3　各种规格的微量移液器（200 μL 和 1 000 μL）和吸头

7.4　96 孔酶标反应板

7.5　微量离心管（1.5 mL）

7.6　一次性无菌注射器（1.0 mL）

7.7　封板膜

7.8　低温离心机

8　样品采集、运输与保存

8.1　基本要求

按照 NY/T 541 采集、制备、运输和保存鸡血清，按照 SN/T 2984 处理待检鸡，按照 GB 19489 生物安全相关规定进行检测。

8.2　样品采集与运送

用一次性无菌注射器经鸡翅静脉采集血液 0.1 mL~1 mL（按照 D.1.2 制备），凝固后在 24 h 内及冷藏条件下送往实验室。若不能及时送往实验室，则应分离血清后，用无菌微量离心管收集血清，-20 ℃保存，并在冻结状态下送往实验室。

8.3　血清分离与保存

中国兽医协会 CVMA

将凝固血液 2 000 r/min 离心 5 min，用无菌微量离心管收集上清，要求血清无溶血。应立即用于抗体检测，或置于-20 ℃保存。

9 ELISA 试验步骤

9.1 抗原稀释

用抗原包被液将 NDV Vc 蛋白稀释至工作浓度 1.6 μg/mL（见附录 F）。

9.2 抗原包被

将工作浓度的抗原加入 96 孔酶标反应板，100 μL/孔，贴封板膜，在 4 ℃条件下孵育 12 h。

9.3 洗涤

倾去孔中液体，用洗涤液洗涤，200 μL/孔，洗涤 5 次，每次室温放置 3 min，每次洗涤后于吸水纸上拍干。

9.4 封闭

每孔加入 200 μL 封闭液，封板膜封板，置于湿盒中，在 37 ℃条件下孵育 2 h；洗涤（按照 9.3）。

9.5 待检样品及对照血清孵育

待检样品、阳性血清和阴性血清分别与稀释液按 1:50 稀释（见附录 F），加入 96 孔酶标反应板，100 μL/孔，阳性血清和阴性血清分别设立 2 个对照；封板膜封板，置于湿盒中，在 37 ℃条件下孵育 1 h；洗涤（按照 9.3）。

9.6 孵育酶结合物

加入酶结合物，封板膜封板，置于湿盒中，在 37 ℃条件下孵育 1 h；洗涤（按照 9.3）。

9.7 显色

加入 TMB 显色液，100 μL/孔，室温 25 ℃避光显色 10 min~15 min。

9.8 终止显色

至阳性对照呈明显蓝色，阴性对照基本不显色时，加入终止液，100 μL/孔。

9.9 读数

将 96 孔酶标反应板置于酶标仪中，以 450 nm 波长测定吸光度 OD 值。

10 试验数据处理

10.1 精密度和测量不确定度

精密度和测量不确定度按照 GB/T 27418 测量计算。在同一实验室，由同一操作者使用相同设备，按相同的测试方法，并在短时间内对同一样品相互独立进行测试获得的 2 次独立测试结果 OD 值的绝对差值不超过 5 %为前提。

变异系数 CV 按照 YY/T 1183 计算。参考【S】GPH1-1，当 CV＜20 %时，精密度为良好，可进行结果计算。

10.2 判定标准

10.2.1 阳性结果

当检测样品 OD 值≥0.293（见附录 G）时判为阳性，NDV V 蛋白抗体阳性。

10.2.2 阴性结果

当检测样品 OD 值≤0.250（见附录 G）时判为阴性。

10.2.3 可疑结果

当 0.250＜检测样品 OD 值＜0.293（见附录 G）时判为可疑，应重新检测。

11 质量保证和控制

11.1 实验应设置阴阳性对照从而保证实验的可信性和质量。以阳性血清为阳性对照，OD 值≥0.293 时，阳性对照成立；以阴性血清为阴性对照，OD 值≤0.250 时，阴性对照成立。

11.2 所有冷藏试剂用前应室温平衡 15 min~30 min。

12 试验报告

试验报告应包含但不限于下列内容，试验报告示例见附录 H。

—样品详细信息：包括样品编号、采样日期、采样地点、采样人等；

—试验日期；

—OD 值结果；

—异常现象；

—结果判定；

—操作人员信息。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A
（规范性）
NDV Vc 标准抗原的制备方法

A.1 Vc 蛋白的原核表达

A.1.1 菌种

表达抗原蛋白的菌种为 BL21-Vc，由含 NDV V 蛋白第 101 位~240 位氨基酸基因原核表达质粒 pET-32a-Vc 转化大肠杆菌 BL21（DE3）获得。

A.1.2 菌液培养

取 BL21-Vc 种子液按培养基体积 1 %量接种于含 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，200 r/min，37 ℃摇床振荡培养 1.5 h~2 h，至菌液 OD 值在 600 nm 波长下测定时达到 0.6~0.8 时，加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L，16 ℃振荡培养 6 h~8 h。

A.1.3 菌体裂解与上清蛋白收集

将 A.1.2 收集的细菌样品 4 ℃ 8 000 r/min 离心 5 min，洗涤液（按照附录 E.3 配制）重悬，重复离心洗涤 2 次；弃上清，加入原菌液体积 10 %的洗涤液重悬，置于冰上，在功率 150 W 的条件下超声波裂解细菌，超声裂解 3 s，停顿 5 s，直至菌液变清亮；将上述裂解物 4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min，Vc 蛋白是可溶性蛋白，存在于上清液中，收集上清用 0.22 μm 滤器过滤后备用，用与上清等体积的稀释液（按照附录 E.4 配制）重悬沉淀。

A.2 Vc 蛋白的纯化

A.2.1 镍离子亲和层析法

使用镍离子亲和层析法商品化试剂盒对目的蛋白进行纯化，Vc 抗原可被 250 mmol/L~500 mmol/L 咪唑溶液洗脱。

A.2.2 蛋白胶切胶回收法

取 100 μL 通过 A.2.1 得到的目的蛋白样品，加入 25 μL 的 5×蛋白样品上样缓冲液，混匀，放入沸水中水浴 5 min，制备成电泳样品。10 %丙烯酰胺 SDS-PAGE 蛋白胶电泳，80 V 恒压条件下进行蛋白样品浓缩电泳，120 V 恒压条件下进行蛋白分离电泳，直至蛋白条带跑至胶底端，然后停止电泳；取出电泳后的蛋白胶，放入 0.25 mol/L KCl 溶液中浸泡染色 5 min；取出染色后的蛋白胶，将染成银白色的目的条带完整切下，移入新的容器，再使用 4 ℃预冷洗涤液（按照附录 E.3 配制）洗涤 3 次；将清洗后的胶块放入干净的研钵中，加适量液氮后研磨至粉末状；将研磨后的粉末移入干净 1.5 mL 微量离心管内，加入 1 mL 稀释液（按照附录 E.4 配制），4 ℃静置 12 h；4 ℃ 11 000 r/min 离心 5 min，收集上清液，获得纯化的 Vc

蛋白；用商品化 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度，若低于 400 μg/mL，则使用 10 kDa 超滤管在 4 ℃条件下浓缩至所需浓度，所得蛋白-70 ℃保存。

A.3 重组抗原质量鉴定

A.3.1 Vc 蛋白纯度鉴定

取 100 μL 通过 A.2.2 得到的 Vc 蛋白样品，加入 25 μL 的 5×蛋白样品上样缓冲液，混匀，放入沸水中 5 min，制备成电泳样品。用 10 %丙烯酰胺 SDS-PAGE 蛋白胶电泳（按照附录 A.2.2 电泳）。若仅在 35 kDa 处出现一条清晰条带，表明抗原纯度在 90 %以上。

A.3.2 Vc 蛋白 Western Blot 鉴定

将 A.3.1 制备的电泳样品进行 10 %丙烯酰胺 SDS-PAGE 电泳（按照附录 A.3.1 电泳）。按 A.2.2 电泳后切下 25 kDa~70 kDa 大小的蛋白胶，200 mA 恒流，湿转转印 1 h；用含 5 %脱脂奶粉的 TBS（按照附录 E.9 配制）在水平摇床上室温封闭 1 h，80 r/min；TBST（按照附录 E.10 配制）洗涤，加入稀释至工作浓度的 His 标签鼠单抗或 NDV 阳性血清（按照附录 D.1 配制），4 ℃静置孵育过夜后，回收抗体，TBST 洗涤，再加 1:20 000 稀释的羊抗鼠或羊抗鸡 IgG-HRP 作用 1 h，TBST 洗涤后加显色液于暗室曝光，应在 35 kDa 处出现一条清晰条带，且无其他杂带。

A.3.3 Vc 蛋白浓度的测定

通过商品化 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定标准抗原浓度应不低于 400 μg/mL。

A.4 分装及保存

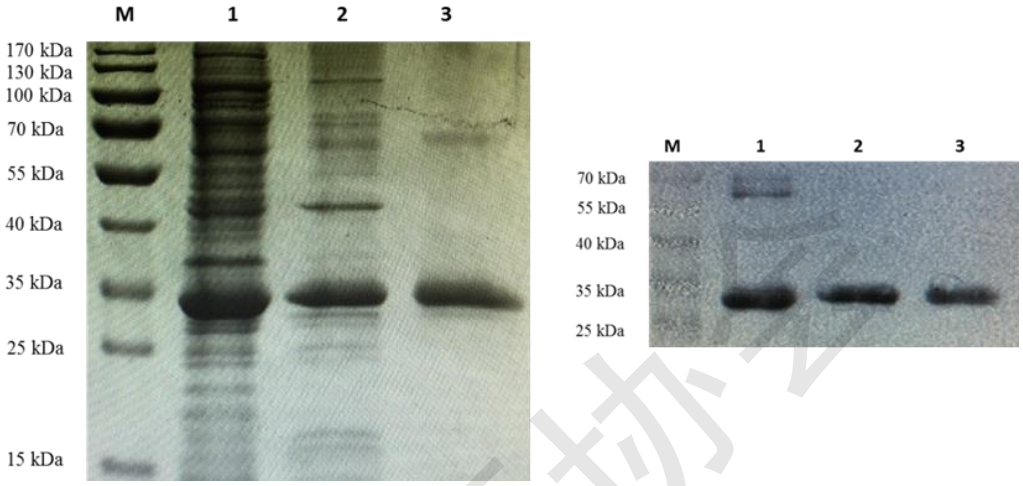
将检测合格的抗原分装到 1.5 mL 微量离心管中，分装量为 500 μL/管，置-70 ℃下保存，有效期为 12 个月。避免反复冻融和污染。

中国兽医协会 CVMA

附 录 B

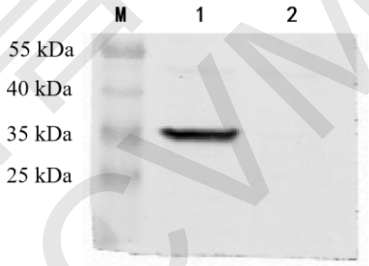
（资料性）

重组蛋白 Vc SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定结果



图B.1 重组蛋白Vc SDS-PAGE与Western Blot检测结果

M：低分子量蛋白 Marker；1：pET-32a-Vc/BL21 上清表达产物；2：经镍离子亲和层析法纯化后的 Vc；3：经 PAGE 胶蛋白回收法再次纯化后的 Vc；注：Western Blot 使用的一抗为 His 鼠单抗。



图B.2 纯化后的重组蛋白Vc Western Blot检测结果

M：低分子量蛋白 Marker；1：经 PAGE 胶蛋白回收法再次纯化后的 Vc；2：BL21（DE3）上清

注：Western Blot 使用的一抗为 NDV 阳性血清（按照 D.1 制备）。

中国兽医协会 CVMA

附　录　C

（资料性）

大肠杆菌 BL21（DE3）和 O78 血清型大肠杆菌接种 SPF 鸡后鸡血清的 OD 值

由于 Vc 抗原是通过大肠杆菌 BL21（DE3）表达制备，为排除大肠杆菌抗体的干扰，检测了接种大肠杆菌后，鸡血清中 NDV V 蛋白抗体水平。

分别用含 1.0×10^9 CFU 的大肠杆菌 BL21（DE3）和 O78 血清型大肠杆菌胸部肌肉注射 3 周龄 SPF 鸡各 10 只；在接种后 21 d 时，按照 D.1.2 采集血清，并用 NDV V 蛋白抗体间接 ELISA 方法检测血清。

接种大肠杆菌 BL21（DE3）后，鸡血清的 OD 值（见表 C.1）均＜0.250，判为 NDV V 蛋白抗体阴性。

接种 O78 血清型大肠杆菌后，鸡血清的 OD 值（见表 C.2）均＜0.250，判为 NDV V 蛋白抗体阴性。

表 C.1 大肠杆菌 BL21（DE3）接种后鸡血清的 OD 值

样品编号	OD 值
1	0.202
2	0.223
3	0.230
4	0.209
5	0.215
6	0.219
7	0.208
8	0.210
9	0.213
10	0.226
NDV V 蛋白抗体阳性血清	1.031
NDV V 蛋白抗体阳性血清	1.027
NDV V 蛋白抗体阴性血清	0.198
NDV V 蛋白抗体阴性血清	0.202

中国兽医协会 CVMA

表 C.2 O78 血清型大肠杆菌接种后鸡血清的 OD 值

样品编号	OD 值
1	0.199
2	0.227
3	0.220
4	0.226
5	0.231
6	0.222
7	0.213
8	0.237
9	0.207
10	0.215
NDV V 蛋白抗体阳性血清	1.029
NDV V 蛋白抗体阳性血清	1.025
NDV V 蛋白抗体阴性血清	0.201
NDV V 蛋白抗体阴性血清	0.207

中国兽医协会 CVMA

附 录 D
（规范性）
NDV Vc 标准抗原阳性血清及阴性血清的制备方法

D.1 阳性血清

D.1.1 NDV 接种

取 NDV 强毒株（如 GM 株）病毒液，胸部肌肉注射 3 周龄 SPF 鸡 10 只，1.0×10^2 EID_{50}/只。

D.1.2 血清制备

攻毒后 21 d~35 d 经翅下静脉采血 1 mL，收集于 1.5 mL 微量离心管中，不加抗凝剂，于 37 ℃倾斜放置 2 h 至凝固，室温 2 000 r/min 离心 5 min，收集上清，要求血清无溶血。56 ℃水浴 1 h 灭活血清，用 NDV V 蛋白抗体间接 ELISA 方法检测血清，当 OD 值≥0.293 时，即可用于采血分离血清。

D.1.3 血清保存

血清分装到 1.5 mL 微量离心管中，分装量为 1 mL/管，置-70 ℃下保存，有效期为 12 个月。避免反复冻融和污染。

D.2 阴性血清

D.2.1 血清制备

对 3 周龄 SPF 鸡经翅下静脉采血 1 mL，收集于 1.5 mL 微量离心管中，不加抗凝剂，于 37 ℃倾斜放置 2 h 至凝固，室温 2 000 r/min 离心 5 min，收集上清，要求血清无溶血。56 ℃水浴 1 h 灭活血清，用 NDV V 蛋白抗体间接 ELISA 方法检测血清，当 OD 值＜0.250 时，即可用于采血分离血清。

D.2.2 血清保存

按照 D.1.3 方法保存血清。

中国兽医协会 CVMA

附　录　E
（规范性）
溶液配制

E.1 抗原包被液

按照 GB/T 18936，称取 1.59 g 碳酸钠和 2.93 g 碳酸氢钠，加入 800 mL 纯水溶解，用盐酸调节液（按照附录 E.8 配制）调 pH 值至 9.6，加入纯水定容至 1 000 mL，4 ℃保存。

E.2 磷酸盐缓冲液

PBS 配制：按照 GB/T 18936，称取 0.20 g 磷酸二氢钠、2.90 g 磷酸氢二钠、8.00 g 氯化钠和氯化钾 0.20 g，加入 800 mL 纯水溶解，用盐酸调节液（按照附录 E.8 配制）调 pH 值至 7.2~7.6 后，加入纯水定容至 1 000 mL，室温保存。

E.3 洗涤液

PBST 洗涤液配制：取 500 μL 吐温-20，加入 PBS（按照附录 E.2 配制）定容至 1 000 mL，混匀，室温保存。

E.4 稀释液

按照 GB/T 18936，称取 0.10 g 牛血清白蛋白，加入 PBST 定容至 100 mL，混匀，4 ℃避光保存。

E.5 封闭液

称取 7.50 g 脱脂奶粉，加入 80.0 mL PBS 溶解，加入 PBS（按照附录 E.2 配制）定容至 100 mL，现配现用。

E.6 TMB 显色液

A 液：取 0.02 g TMB、10.0 mL 无水乙醇，加入纯水定容至 1 000 mL。

B 液：取磷酸氢二钠 14.60 g、柠檬酸 9.33 g 和 30 % H_2O_2 2.0 mL，加入 800 mL 纯水溶解，用盐酸调节液（按照附录 E.8 配制）调 pH 值至 5.2 后，加入纯水定容至 1 000 mL。

使用前将 A 液和 B 液等体积混合，分装于棕色瓶内，20 mL/瓶，4 ℃避光保存。

E.7 终止液

将 5.43 mL 的 18.40 mol/L 浓硫酸沿烧杯壁缓慢注入 80 mL 纯水中同时不断搅拌，待溶液温度降至室温时，加入纯水定容至 100 mL，4 ℃保存。

E.8 盐酸调节液

将 8.60 mL 的 11.64 mol/L 浓盐酸沿烧杯壁缓慢注入 80 mL 纯水中同时不断搅拌，待溶液温度降至室温时，加入纯水定容至 100 mL，室温保存。

E.9 TBS

称取 8.00 g 氯化钠、0.20 g 氯化钾和 3.00 g 氨基丁三醇，加入 800 mL 纯水溶解，用盐酸调节液（按照附录 E.8 配制）调 pH 值至 7.2~7.6 后，加入纯水定容至 1 000 mL，室温保存。

E.10 TBST

取 500 μL 吐温-20，加入 TBS（按照附录 E.9 配制）定容至 1 000 mL，混匀，室温保存。

中国兽医协会
CVMA

附 录 F

（资料性）

NDV Vc 标准抗原最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释倍数的确定

通过方阵滴定试验筛选 NDV Vc 标准抗原最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释倍数：取 96 孔酶标反应板，将 A.2.2 收集的 NDV Vc 标准抗原分别用抗原包被液 2 倍倍比稀释 5 次，横排抗原包被浓度分别为 0.2 μg/mL、0.4 μg/mL、0.8 μg/mL、1.6 μg/mL、3.2 μg/mL 和 6.4 μg/mL，按步骤 9.2~9.4 操作；竖排阴、阳性血清样品用稀释液按 1:25、1:50、1:100 和 1:200 稀释，按步骤 9.5~9.9 操作。每个稀释度设立 2 个对照孔。

试验结果表明，当抗原包被浓度为 1.6 μg/mL，血清稀释倍数为 1:50 时，阳性血清 OD 值的平均数约为 1.0，且此时阳性血清 OD 值平均数与阴性血清 OD 值平均数的比值最大，即确定为最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释倍数（见表 F）。

表 F 最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释倍数的确定

血清稀释度	血清 OD 值	抗原包被浓度（μg/mL）					
		12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4
1:25	阳性血清	1.324	1.449	1.500	1.648	1.594	1.358
	阴性血清	0.297	0.223	0.237	0.208	0.186	0.196
	阳性血清 / 阴性血清	4.458	6.498	6.329	7.923	8.570	6.926
1:50	阳性血清	0.935	1.017	1.109	1.047	0.991	0.778
	阴性血清	0.198	0.188	0.169	0.135	0.146	0.134
	阳性血清 / 阴性血清	4.722	5.410	6.562	7.756	6.788	5.806
1:100	阳性血清	0.631	0.550	0.439	0.440	0.440	0.458
	阴性血清	0.163	0.132	0.116	0.098	0.099	0.112
	阳性血清 / 阴性血清	3.871	4.167	3.784	4.490	4.444	4.089
1:200	阳性血清	0.372	0.290	0.258	0.210	0.267	0.250
	阴性血清	0.124	0.108	0.099	0.091	0.102	0.083
	阳性血清 / 阴性血清	3.000	2.685	2.606	2.308	2.618	3.012

中国兽医协会 CVMA

附　录　G
（资料性）
阴性和阳性临界值的确定

选择 60 份经血凝抑制（HI）试验确定为 NDV 阴性的 SPF 鸡血清，用附录 B 选择的最优 ELISA 反应条件进行检测，并计算这 60 份血清样品 OD 值的平均数（$\bar{x}$）和标准差（s）。然后利用统计学原理，来确定判定血清样品为阴性或阳性的临界值。

经计算 60 份阴性血清 OD 值（见表 G）的平均数（$\bar{x}$）为 0.164（见公式（1）），标准差（s）为 0.043（见公式（2）），根据统计学原理计算$\bar{x}+3s=0.293$，$\bar{x}+2s=0.250$。为了方便计算，确定当检测样品 OD 值≥0.293 时判定为阳性，当检测样品 OD 值≤0.250 时判定为阴性，当 0.250＜检测样品 OD 值＜0.293 时为可疑值，需做进一步验证。

表 G 60 份 NDV 阴性血清的 OD 值

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OD 值	0.227	0.126	0.190	0.224	0.181	0.161	0.205	0.177	0.177	0.091
样品编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OD 值	0.217	0.186	0.151	0.156	0.154	0.186	0.145	0.136	0.196	0.149
样品编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
OD 值	0.165	0.170	0.136	0.152	0.118	0.164	0.161	0.131	0.211	0.235
样品编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
OD 值	0.096	0.105	0.207	0.213	0.243	0.110	0.165	0.248	0.177	0.171
样品编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
OD 值	0.163	0.158	0.160	0.104	0.222	0.162	0.096	0.246	0.193	0.217
样品编号	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
OD 值	0.098	0.151	0.098	0.094	0.097	0.186	0.150	0.201	0.170	0.102

$$\bar{x} = (OD_1 + OD_2 + \ldots\ldots + OD_n)/n \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（1）$$

式中：

$\bar{x}$　——本次检测样品 OD 值的平均值；

OD_1 ——1 号检测样品对应的 OD 值；

OD_n ——本次检测 n 份样品中，n 号检测样品对应的 OD 值；

n　——本次检测样品的数量。

$$s=\sqrt{\frac{(\mathrm{OD}_1-\bar{x})^2+(\mathrm{OD}_2-\bar{x})^2+.....+(\mathrm{OD}_n-\bar{x})^2}{n-1}} \qquad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（2）$$

式中：

$\bar{x}$ ——本次检测样品 OD 值的平均值，按照公式（1）计算所得；

OD_1 ——1 号检测样品对应的 OD 值；

OD_n ——本次检测 n 份样品中，n 号检测样品对应的 OD 值；

s ——本次检测样品 OD 值的标准差；

n ——本次检测样品的数量。

中国兽医协会
CVMA

附　录　H

（资料性）

NDV V 蛋白抗体检测报告

<table>
<tr><td colspan="14">新城疫病毒 V 蛋白抗体检测报告（示例）</td></tr>
<tr><td>样品信息</td><td colspan="13">样品编号：1~30　　采样日期：××年××月××日　　采样地点：××省××市××养殖场　　采样人：张三</td></tr>
<tr><td>试验日期</td><td colspan="13">××年××月××日</td></tr>
<tr><td>使用标准</td><td colspan="13">新城疫病毒 V 蛋白抗体间接 ELISA 检测方法</td></tr>
<tr><td rowspan="6">结果</td><td>样品编号</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>阳性血清</td><td>阳性血清</td></tr>
<tr><td>OD 值</td><td>1.005</td><td>1.062</td><td>0.812</td><td>0.451</td><td>0.978</td><td>1.203</td><td>0.695</td><td>0.542</td><td>0.902</td><td>0.873</td><td>1.032</td><td>1.030</td></tr>
<tr><td>样品编号</td><td>11</td><td>12</td><td>13</td><td>14</td><td>15</td><td>16</td><td>17</td><td>18</td><td>19</td><td>20</td><td>阴性血清</td><td>阴性血清</td></tr>
<tr><td>OD 值</td><td>0.902</td><td>0.232</td><td>0.695</td><td>0.542</td><td>1.203</td><td>0.936</td><td>0.753</td><td>0.492</td><td>1.205</td><td>0.985</td><td>0.192</td><td>0.197</td></tr>
<tr><td>样品编号</td><td>21</td><td>22</td><td>23</td><td>24</td><td>25</td><td>26</td><td>27</td><td>28</td><td>29</td><td>30</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>OD 值</td><td>0.976</td><td>1.146</td><td>0.713</td><td>0.901</td><td>1.128</td><td>0.201</td><td>1.045</td><td>1.017</td><td>0.974</td><td>0.997</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>异常现象</td><td colspan="13">无</td></tr>
<tr><td>结果判定</td><td colspan="13">30 份鸡血清中，12 号和 26 号样品 OD 值＜0.250，结果判为新城疫病毒 V 蛋白抗体阴性；
1 号~11 号、13 号~25 号和 27 号~30 号样品 OD 值＞0.293，结果判为新城疫病毒 V 蛋白抗体阳性。</td></tr>
<tr><td>检测员</td><td colspan="13">李四</td></tr>
</table>

中国兽医协会 CVMA

参 考 文 献

[1] 【S】GPH1-1 生物制品质量控制分析方法验证技术审评一般原则.

中国兽医协会
CVMA