ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 23-2020

猪伪狂犬病毒抗体荧光免疫层析检测法

The detection of PRV antibody by fluorescence immunochromatography assay

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

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。

本文件由四川省兽医协会提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：四川省动物疫病预防控制中心，成都微瑞生物科技有限公司。

本文件主要起草人：陈斌、陈弟诗、周明忠、张毅、阳爱国、王泽洲、章建、邓飞、贺冬梅、丁梦蝶、裴超信、吴冠英、邱明双、张永宁、吴宣。

中国兽医协会
CVMA

猪伪狂犬病毒抗体荧光免疫层析检测法

1 范围

本文件规定了猪伪狂犬病毒抗体(gB 和 gE) 荧光免疫层析检测法的原理、仪器设备、操作步骤、结果分析。

本文件适用于猪血清中猪伪狂犬病病毒 gB 和 gE 特异性抗体的快速检测。

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本文件必不可少的条款。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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

荧光免疫层析检测法 The Fluorescence Immunochromatography Assay FICA

是以镧系荧光纳米微球作为示踪物，标记抗原或抗体与待测物进行免疫反应，经荧光免疫分析仪测定最终产物的荧光强度，从而得出待测物浓度的检测方法。

4 原理

采用抗原夹心法和荧光免疫层析法相结合技术，检测动物血清样本中的猪伪狂犬病抗体(gB 和 gE)。当血清样本中抗体与荧光纳米微球标记的伪狂犬重组抗原接触反应后形成复合物，继续与硝酸纤维素膜上检测线包被的伪狂犬重组抗原形成夹心复合物反应，其余物质继续向前层析在 C 线捕获住“荧光标记鸡 IgY+山羊抗鸡 IgY ”免疫结合物，最后用高敏荧光分析仪读取检测卡上的荧光信号。

5 仪器、材料与试剂

5.1 仪器

5.1.1 高敏荧光分析仪：能在激发波长为 380 nm~420 nm，检测波长为 605 nm~625 nm 条件下检测

5.1.2 单道可调移液器（20 μL~200 μL）和（0.5 μL~10 μL）

5.1.3 分析天平：感量万分之一（0.0001 g）

5.1.4　离心机
5.1.5　冰箱

5.2　材料

5.2.1　猪伪狂犬病毒抗体(gB 和 gE)阳性血清、阴性血清，有兽用诊断检测试剂生产资质企业生产的合格产品。
5.2.2　猪伪狂犬病毒抗体(gB 和 gE)荧光免疫层析法检测试剂卡（图 1）：硝酸纤维膜上包被有猪伪狂犬病毒重组抗原，用于样品中猪伪狂犬病毒抗体与荧光纳米微球标记伪狂犬重组抗原反应后，再与硝酸纤维素膜上包被的伪狂犬重组抗原反应。

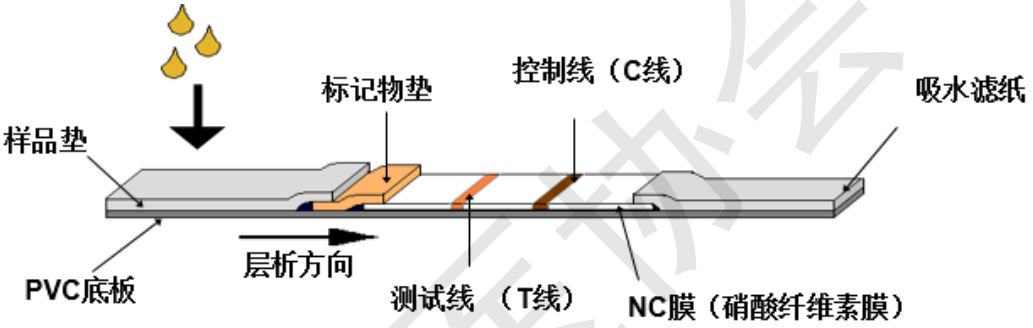

图1　猪伪狂犬病毒抗体荧光免疫层析检测法试剂卡示意图

5.3　试剂

5.3.1　水：按照 GB/T 6682 中的要求，二级
5.3.2　样品稀释液，按照附录 A 的要求配置
5.3.3　镧系荧光纳米微球：荧光寿命≥400 μs

6　样品采集与处理

6.1　样品的采集

应按照NY/T 541中的规定进行，并做好安全防护。按常规方法采集3mL~5mL血液。

6.2　样品的处理

血液样本用离心机3 000 rpm/min离心3 min，血清量不少于100 μL~500 μL。

6.3　样品的贮存

血清样本在2 ℃~8 ℃冷藏可保存24 h，如需长期保存应置-20 ℃或-80 ℃。
应按照GB 19489做好生物安全工作。

7　检测方法

7.1　样品稀释

待检血清样本和猪伪狂犬病毒抗体荧光免疫层析检测法试剂卡从 2 ℃~8 ℃取出，平衡到室温(25 ℃左右）。

中国兽医协会 CVMA

用样品稀释液将待测血清样本按 1:20 稀释。

7.2 加样

从原包装铝箔袋中取出猪伪狂犬病毒抗体荧光免疫层析检测法试剂卡，置于平净平坦的台面上，用移液器吸取离心管中事先准备好的已稀释好的检测样本垂直滴加 80 μL 于加样孔内。

7.3 检测

避光常温层析 15 min 后用高敏荧光分析仪检测。

8 结果计算

B—高敏荧光分析仪读取标准溶液或样本溶液的检测卡上的荧光信号T/C值

B_O—高敏荧光分析仪读取稀释液检测卡上的荧光信号的T/C值

以标准品$B-B_O$值的对数为纵坐标，以猪伪狂犬病毒抗体阳性血清效价对数为横坐标，绘制标准曲线图。将样本的荧光信号值代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的样本中猪伪狂犬抗体效价。

注：软件自带计算功能，能准确算出当前样本 T/C 值所对应的猪伪狂犬病毒抗体效价。

9 检测结果判定标准

猪伪狂犬 gB 抗体效价检测：检测结果大于 32 时抗体水平为阳性，小于 16 时抗体水平为阴性，16~32 之间为可疑区。

猪伪狂犬 gE 抗体效价检测：检测结果大于 32 时抗体水平为阳性，小于 32 时抗体水平为阴性。

中国兽医协会 CVMA

附录 A
（规范性）
样品稀释液的配制

A.1 硼酸 2.16 g
A.2 硼砂 1.43 g
A.3 NaN_3 0.25 g
A.4 硫酸葡聚糖 1 g
A.5 800 mL 双蒸水放入 1 000 mL 烧杯。
A.6 分别将 A.1、A.2、A.3、A.4 放入 A.5 烧杯中搅拌溶化。
A.7 用纯水或双蒸水将 A.6 烧杯溶液定容至 1 L。
A.8 混匀后分装，置4 ℃备用。

中国兽医协会
CVMA