ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 22—2020

动物布鲁氏菌抗体荧光免疫层析检测法

The detection of animal brucella 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。

本文件涉及专利。

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、中国兽医药品监察所、成都微瑞生物科技有限公司

本文件主要起草人：阳爱国、彭小薇、丁家波、王泽洲、郭莉、周明忠、章建、贺冬梅、陈斌、侯巍、袁东坡、邓飞、邵靓、吴冠英。

中国兽医协会
CVMA

引　言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到CN201721431777.9专利权利要求“第1条一种布鲁氏杆菌抗体快速定量检测系统，其特征在于：包括层析检测卡、层析扫描仪、客户端和云平台”的相关专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：成都微瑞生物科技有限公司，地址：四川省成都市高新西区西芯大道26号。

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

中国兽医协会
CVMA

动物布鲁氏菌抗体荧光免疫层析检测法

1 范围

本文件规定了动物布鲁氏菌抗体荧光免疫层析检测法的原理、仪器设备、操作步骤、结果分析。

本文件适用于牛、羊（绵羊和山羊）、猪的布鲁氏菌抗体水平的检测。

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、保存与运输及技术规范

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

采用免疫竞争法和荧光免疫分析法相结合技术，检测动物血清样本中布鲁氏菌抗体。血清样品中与检测试纸条上包被的特异单抗竞争标记荧光LPS抗原形成复合物；其余物质继续向前层析在C线捕获住“荧光标记鸡IgY+兔抗鸡IgY ”免疫结合物，最后用荧光分析仪读取检测卡上的荧光信号，被测样品中的布鲁氏菌抗体水平与检测值成反比。

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）

5.1.3　分析天平：感量万分之一（0.0001 g）

5.1.4　普通离心机

5.1.5　冰箱

5.2　材料

5.2.1　布氏菌杆菌抗体阳性、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　动物布鲁氏菌抗体荧光免疫层析检测法试剂卡（图 1）：硝酸纤维膜上包被有布鲁氏菌特异性单抗（具体浓度和含量根据原材料的情况进行梯度试验确定），用于与样品中布鲁氏菌抗体竞争高敏荧光纳米微球标记的 LPS 抗原。

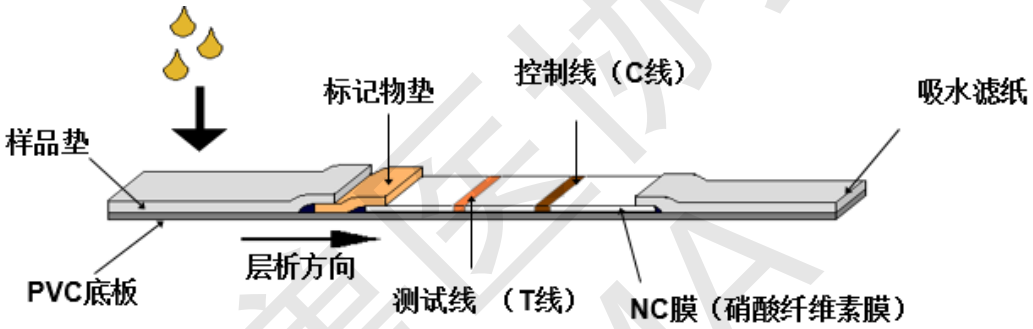

图1　布鲁氏菌抗体荧光免疫层析检测法试剂卡示意图

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　高敏荧光纳米微球：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 3 mL~5 mL 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

待检血清样本和布鲁氏菌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）。用样品稀释液将待测血清样本按 1:10 稀释。

7.2 加样

从原包装铝箔袋中取出布鲁氏菌病抗体层析检测法试剂卡，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，以布鲁氏菌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布鲁氏菌抗体效价。

注：软件自带计算功能，能准确算出当前样本 T/C 值所对应的布鲁氏菌抗体效价。

9 判定标准

效价≥50 为阳性，代表免疫抗体合格并对布鲁氏菌有保护或者对未免疫或免疫抗体消失期的个体判为布病感染；效价≤25 以下为阴性，代表保护抗体不保护或尚未被布鲁氏菌感染；效价 25~50 之间为可疑，需 30 d 后采血重检，如果仍为可疑，判为阳性。

中国兽医协会 CVMA

附录 A
（规范性）
样品稀释液的配制

A.1　$Na_2HPO4·12H2O$　2.68 g
A.2　NaH2PO4·2H2O　0.44 g
A.3　NaN3　1 g
A.4　硫酸葡聚糖（MW:40000）　5 g
A.5　硫酸葡聚糖 20000　10 g
A.6　800 mL 双蒸水放入 1 L 烧杯。
A.7　按顺序将 A.1、A.2、A.3、A.4、A.5 放入 A.6 烧杯中搅拌溶化。
A.8 用纯水或双蒸水将 A.7 烧杯溶液定容至 1 000 mL。
A.9 混匀后分装，置 4 ℃备用。

中国兽医协会
CVMA