ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 24-2020

猪圆环病毒 2 型抗体荧光免疫层析检测法

The detection of antibody for porcine circovirus type 2 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，成都微瑞生物科技有限公司。

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

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ZL201620058318.X专利权利要求“第1条 一种猪圆环病毒抗体检测卡，包括装配在外壳内的检测卡。其特征在于：所述检测卡本体包括底板，在底板上从左至右依次粘贴样品垫、标记垫、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述标记垫由载体基层和标记物组成，标记物为载体基层上喷涂镧系荧光检测微球和镧系荧光质控微球组成的一层膜，所述硝酸纤维素膜上包被猪圆环抗原为检测线，包被羊抗鸡抗体为质控线，在外壳上对应样品垫开设加样孔，对应硝酸纤维素膜上的检测线和质控线开设视窗孔。”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

猪圆环病毒 2 型抗体荧光免疫层析检测法

1 范围

本文件规定了猪圆环病毒 2 型抗体荧光免疫层析检测法的原理、仪器设备、操作步骤、结果判定。

本文件适用于猪圆环病毒 2 型抗体水平的检测。

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

采用双抗原夹心法和高敏荧光免疫层析法相结合技术，检测动物血清样本中的猪圆环病毒 2 型抗体。当血清样本中抗体与荧光纳米微球标记的猪圆环病毒 2 型特异性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猪圆环病毒 2 型特异性抗原形成复合物反应，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，最后用荧光检测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，量程（规格）分别为 20 uL~200 uL 和 0.5 uL~10 uL

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　猪圆环病毒 2 型抗体阳性血清、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 猪圆环病毒 2 型抗体荧光免疫层析法检测试剂卡（图 1）：硝酸纤维膜上包被有猪圆环病毒 2 型特异性抗原（具体浓度和含量根据原材料的情况进行梯度试验确定），用于样品中猪圆环病毒 2 型抗体与高敏荧光纳米微球标记猪圆环病毒 2 型特异性抗原反应后，再与硝酸纤维素膜上包被的猪圆环病毒 2 型特异性抗原反应。

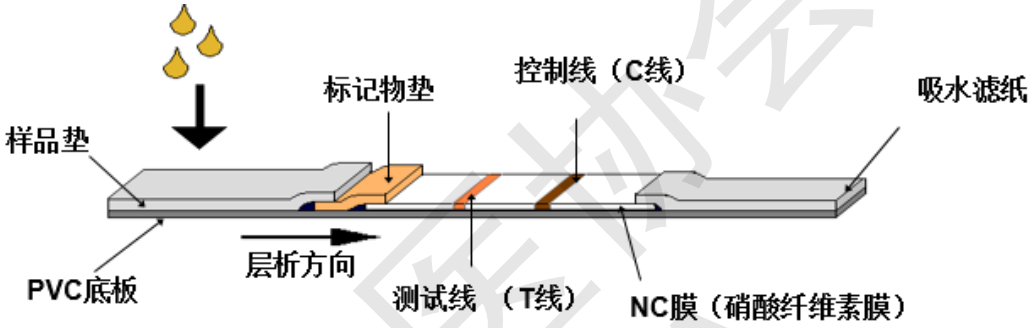

图1　猪圆环病毒 2 型抗体荧光免疫层析法检测试剂卡示意图

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。

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

待检血清样本和猪圆环病毒 2 型抗体荧光免疫层析法检测试剂卡从 2 ℃~8 ℃取出，平衡到室温(25 ℃左右）。于离心管中用样品稀释液将待测血清样本按 1：50 稀释。

7.2 加样

从原包装铝箔袋中取出猪圆环病毒 2 型抗体荧光免疫层析法检测试剂卡，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，以猪圆环病毒2型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圆环病毒2型抗体效价。

注：软件自带计算功能，能准确算出当前样本 T/C 值所对应的猪圆环病毒 2 型抗体效价。

9 判定标准

猪圆环病毒 2 型抗体效价：检测结果≤16 抗体水平为阴性，≥24 时抗体水平为阳性，16~24 之间为可疑区。

定量检测猪圆环病毒 2 型抗体的含量与样本效价成正比。

中国兽医协会 CVMA

附录 A
（规范性）
样品稀释液的配制

A.1 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.68 g

A.2 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1 g

A.3 NaN_3 1 g

A.4 硫酸葡聚糖（MW:40000） 5 g

A.5 800 mL 双蒸水放入 1 000 mL 烧杯。

A.6 按顺序将 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 1 000 mL。

A.8 混匀后分装，置4 ℃备用。

中国兽医协会
CVMA