ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 92—2022

猪瘟病毒时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法

TRFIA for detection of antibodies against Swine Fever Virus

中国兽医协会
CVMA

2022－08－12 发布　　2022－08－12 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这些专利的责任。

本文件由洛阳现代生物技术研究院有限公司提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：洛阳现代生物技术研究院有限公司、华南农业大学、河南省动物疫病预防控制中心、洛阳莱普生信息科技有限公司。

本文件主要起草人：郎洪武、赵明秋、李玉婉、陈少渠、袁忠勋、谢彩华、程果、钱坤、李建西、原小燕、马震原、郭育培、刘影、王华俊、吴彬、李勤楠。

中国兽医协会
CVMA

猪瘟病毒时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法

1 范围

本文件规定了猪瘟病毒时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法的试剂与耗材、技术原理、操作步骤、结果计算、实验成立条件及结果判定等内容。

本文件适用于检测猪全血或血清中的猪瘟病毒抗体，可用于猪瘟病毒抗体的免疫筛查、辅助诊断等。

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。

NY/T 541-2016 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

时间分辨荧光免疫层析技术 Time Resolved Fluorescence Immunochromatography assay （TRFIA）

是以时间分辨荧光微球作为示踪物，将抗原抗体固定在硝酸纤维素膜上，通过层析来呈现免疫反应结果的一种新型免疫分析技术。

4 符号与缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA：牛血清白蛋白

5 试剂与耗材

5.1 猪瘟病毒荧光微球抗体检测卡，按照附录 A 制备。

5.2 相关试剂配制，按照附录 B 配制。

5.3 猪瘟病毒标准阳性血清，按照附录 C 制备。

5.4 移液枪（10 μL～100 μL）。

5.5 微量毛细采样管（10 μL）。

5.6 注射器（5 mL）。

中国兽医协会 CVMA

5.7 便携式免疫荧光分析仪及配套ID卡，能在荧光检测波段365/610 nm条件下检测，按照附录D操作。

6 技术原理

采用时间分辨荧光免疫层析技术和双抗原夹心法结合技术，检测猪瘟病毒抗体。通过样本与荧光微球标记物沿层析膜移动，样本中猪瘟病毒与荧光微球标记物、检测线（T线）上的抗原结合而产生荧光信号值（T值），荧光微球标记物继续移动与质控线（C线）上的抗体结合产品荧光信号值（C值），仪器计算出T/C值即为PPRV抗体检测值。

7 操作步骤

7.1 实验前准备

7.1.1 样品采集

按照NY/T 541-2016中规定进行样本的采集与处理，并做好个人防护。按常规方法抽取被检猪只2 mL～3 mL血液置洁净干燥的试管中，静置约1 h待血液凝固后于4000 r/min离心10 min（也可将血液样本静置约2 h，待血液凝固自然析出血清），分离血清。血清应清亮，无溶血、无污染。

若无上述条件分离血清，可直接用被检猪只全血检测。全血样品容器中应加0.1%肝素钠、阿氏液、3.8%～4.0%枸橼酸钠（0.1 mL可抗1 mL血液）或乙二胺四乙酸（EDTA）等抗凝剂，采血后充分混合。

7.1.2 血清样本的存放与运送

按照NY/T 541-2016中规定进行血清样本的存放与运输。血清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，确保样品清亮无污染。采集的血清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。按照相关规范要求进行样品的生物安全标识。

7.1.3 全血样本的存放与运送

按照NY/T 541-2016中规定进行全血样本的存放与运输。全血样本若在24 h内检测，应置于4 ℃条件下保存，若超过24 h检测，应置于-20 ℃以下冷冻保存。采集的全血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。按照相关规范要求进行样品的生物安全标识。

7.1.4 仪器的准备

打开便携式荧光免疫分析仪，选择待检项目；结果如需打印，同时打开蓝牙打印机，并与便携式荧光免疫分析仪连接成功。

7.2 样品稀释

用微量毛细采样管取10 μL全血或血清样本加入到已备好的样本稀释液管中混匀，稀释后的样品应在1 h内完成检测，可按照以下两种方式稀释：

a) 离心管稀释，将检测样品在1.5 mL离心管中做10倍稀释并混匀。

b) 稀释板稀释，将检测样品在稀释板上做10倍稀释并混匀。

7.3 样品检测

中国兽医协会 CVMA

7.3.1 取检测卡

将恢复至室温的试纸卡从铝箔包装中取出，将检测卡放于平整、洁净的台面上。

7.3.2 加样及孵育

用配套吸管吸取已稀释好的样本，垂直而缓慢的滴加2 ～3 滴（约80 μL）到加样孔内，室温下放置10 min～15 min。

7.3.3 仪器检测并读值

将检测卡放入便携式荧光免疫分析仪检测，5 min内完成读值。

8 结果计算

便携式荧光免疫分析仪通过365/610 nm光波激发和收集检测线（T线）和质控线（C线）上的荧光信号，仪器将荧光信号值转换成数值（T值和C值），T/C值即为样本中猪瘟病毒抗体检测值（软件自带计算功能，能准确计算出T/C值）。

9 实验成立条件

当仪器完成读值后，如果“检测值”项显示“无效”，说明仪器未检测到荧光信号，则实验不成立，需重新检测。

如果“检测值”项显示数值，说明质控线和检测线荧光信号值正常，则实验成立。

10 结果判定

当猪瘟病毒抗体检测值＜0.1时，判为猪瘟病毒抗体阴性。

当猪瘟病毒抗体检测值≥0.1时，判为猪瘟病毒抗体阳性。

中国兽医协会 CVMA

附 录 A
（规范性）

猪瘟病毒荧光微球抗体检测卡的制备

A.1 荧光微球垫的制备

A.1.1 荧光微球标记猪瘟病毒E2蛋白的制备

A.1.1.1 洗涤

按需量取固体含量为1%的荧光微球洗涤液，即加入5倍体积的硼酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH 8.0），以12000 r/min离心15 min，弃上清，重复清洗2次，将洗涤后的荧光微球重悬于5倍体积硼酸盐缓冲液。

A.1.1.2 荧光微球活化

取50 μL荧光微球加之1 mL MES（2-吗啉乙磺酸）缓冲液中，混匀，12000 r/min离心15 min；弃上清，加入1 mLMES缓冲液，混匀离心；再重复上述步骤2次，并用1 mLMES缓冲液复溶；向上述溶液中加入250 μL EDC溶液，混匀，室温反应30 min；弃上清，加入4 mL标记缓冲液，混匀。

A.1.1.3 荧光微球标记

将E2重组蛋白加入到已活化的荧光微球中，使其终浓度为50 μg/mL，充分混匀，于室温（15 ℃～25 ℃）避光反应1.5 h；按溶液总体积的3%加入封闭液，混匀，于室温（15 ℃～25 ℃）避光反应30 min。离心弃上清，用硼酸盐缓冲液清洗2次，并重悬已标记的荧光微球。以1%的量加入1%胭脂红色素，混匀，2 ℃～8 ℃保存备用。

A.1.2 荧光微球垫的制备

待荧光微球标记E2重组蛋白恢复至室温（15 ℃～25 ℃），取玻璃纤维素膜裁切为10 cm×30 cm规格，设置喷涂量为3 μL/cm，每张玻璃纤维素膜（10 cm×30 cm）以1.0 cm间隔喷涂8条，将完成喷涂的玻璃纤维素膜放置在干净纱窗网上，置37 ℃（±2 ℃）干燥2 h～3 h，用切条机将喷涂有荧光微球标记E2重组蛋白的部分裁切为0.7 cm×30 cm的条带，于4 ℃～30 ℃密封保存备用。

A.2 印膜的制备

A.2.1 印膜溶液的制备

A.2.1.1 质控线（C线）印膜溶液

用磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH值8.0）将猪瘟病毒标准阳性血清（其制备方法见附录C.2）稀释至终浓度为1.5 mg/mL作为质控线（C线）印膜溶液，置于棕色玻璃瓶中，2 ℃～8 ℃保存备用。

A.2.1.2 检测线印膜溶液

用磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH值8.0）将猪瘟E2重组蛋白稀释至终浓度为1.2 mg/mL作为检测线印膜溶液，置于棕色玻璃瓶中，2 ℃～8 ℃保存备用。

中国兽医协会 CVMA

A.2.2　印膜

将印膜溶液分别吸至高效连续点膜机的质控线管线和检测线管线中，按0.8 μL/cm在硝酸纤维素膜上均匀划出质控线（C线）和检测线（T线），其中质控线（C线）距硝酸纤维素膜顶端0.8 cm（±0.1 cm）处，检测线距膜顶端1.3 cm(±0.1 cm)处，质控线与检测线相距0.5 cm(±0.1 cm)，并在膜的开始端、末端及不均匀处作标记。

A.2.3　印膜干燥

将已划线的硝酸纤维素膜逐一放置在干净纱窗网上，忌重叠，置于干燥间进行干燥，37 ℃(±2 ℃)干燥2 h后，放入装有干燥剂的铝箔袋内，封口，贴上标签，于4 ℃～30 ℃密封保存备用。

A.3　样品垫的制备

将20 cm×30 cm的玻璃纤维素膜平铺于洁净的玻璃平板上，倾倒20 mL样品垫处理液至玻璃纤维素膜中央，滚轮铺匀，37 ℃(±2 ℃)过夜干燥，用切条机将其裁切为2.0 cm×30 cm，于4 ℃～30 ℃密封保存备用。

A.4　检测卡的制备

在室温（15 ℃～25 ℃）及湿度≤30% RH的洁净环境下，按照以下步骤组装半成品试纸。

A.4.1　贴条

依次按印膜、吸水垫、荧光微球垫、样品垫的顺序将各中间制品粘贴于PVC底板上，保证各中间品在相邻处均有1 mm～2 mm层叠，并使印膜上的检测线靠近样品垫一侧、质控线靠近吸水垫一侧。

A.4.2　切条

在室温（15 ℃～25 ℃）及湿度≤30% RH条件下，将已组装好的荧光微球大板修剪整齐后，用切条机将检验合格的半成品裁切为3.0 mm±0.1 mm宽的试纸。

A.4.3　装卡

挑取印膜无划痕、无污染，边缘整齐的试纸，将试纸装入卡壳中，使用压卡机进行压卡，单卡与干燥剂、滴管装入铝箔袋并封口。

中国兽医协会 CVMA

附 录 B
（规范性）

相关试剂配制

B.1 样品稀释液（0.01 mol/L磷酸盐缓冲液，pH值 7.2）

称取3.0 g磷酸氢二钠（含12个结晶水）、0.5 g磷酸二氢钾、8.0 g氯化钠、0.5 g氯化钾，溶于800 mL纯化水，再加入400 μLProclin-300，纯化水定容至1 L。

B.2 硼酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH值 8.5）

称取6.7 g硼酸，13.4 g硼砂（含10个结晶水），溶解于800 mL纯化水，定容至1 L，调节pH至8.5。

B.3 EDC溶液（2 mg/mL）

称取0.2 g 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，100 mL纯化水溶解，2 ℃～8 ℃保存。

B.4 MES（2-吗啉乙磺酸）缓冲液

称取2.0 g吗啉乙磺酸（MES），溶解于800 mL纯化水，定容至1L，调节pH值至6.0，置2 ℃～8 ℃保存备用。

B.5 封闭液

称取90 g酪蛋白，加入1 L纯化水溶解，2 ℃～8℃保存。

B.6 1%胭脂红色素

称取1.0 g胭脂红色素，100 mL纯化水溶解。

B.7 磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH值 8.0）

甲液（0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液）：称取2.84 g磷酸氢二钠加纯化水定容至100 mL；乙液（0.2 mol/L磷酸二氢钠溶液）：称取3.12 g磷酸二氢钠（含2个结晶水）加纯化水定容至100 mL。

分别量取甲液94.7 mL和乙液5.3 mL，混匀后量取25 mL加入75 mL纯化水，混匀。

B.8 样品垫处理液

中国兽医协会 CVMA

称取17 g无水磷酸氢二钠，0.414 g磷酸二氢钠（含2个结晶水），5.0 g蔗糖，3.0 g酪蛋白，5.0 g聚乙二醇20000，5.0 g聚乙烯吡咯烷酮（PVP-K30），20 mL吐温-20，加入1 L纯化水溶解。

中国兽医协会
CVMA

附　录　C
（规范性）

猪瘟病毒标准阳性血清的制备

C.1　猪瘟病毒标准阳性血清的制备

C.1.1　免疫与采血

用猪瘟病毒E2蛋白免疫猪瘟病毒抗体阴性猪，耳背后肌肉注射，2 mL/头份。免疫后1周，每周无菌采血，用ELSIA抗体检测试剂/方法进行检测，当抗体效价达1∶512时，无菌采集免疫猪血液。

C.1.2　分装、冻干及保存

按常规方法抽取以上被检猪只2 mL～3 mL血液置洁净干燥的试管中，静置约1 h待血液凝固后于4000 r/ min离心10 min（也可将血液样本静置约2 h，待血液凝固自然析出血清），分离血清。将制备的血清混匀后，经0.22 μm滤膜过滤除菌，将血清与冻干保护剂按8.5∶1比例混匀，无菌定量分装，冷冻真空干燥，置-70 ℃下保存，标记并注明制备日期等信息。

中国兽医协会 CVMA

附　录　D
（规范性）

便携式免疫荧光分析仪及配套ID卡

D.1　ID卡准备

将检验项目信息（项目名称、编号、临界值等）录入ID卡。

D.2　检测前准备

检查便携式免疫荧光分析仪电源显示正常。点击分析仪开关，将其打开，进入检测界面后，将产品配套ID卡插入相应插孔。

D.3　检测

D.3.1　检测读值

待检样品加入检测卡计时15 min后，将检测卡加样孔端插入仪器检测插孔中，点击仪器界面中的“快速测试”，确认待检项目信息无误后，再次点击“快速测试”，仪器开始读值。

完成读值后，仪器界面显示检测结果：“检测项目”、“检测值”、“结论”。

D.3.2　结果处理

结果如需上传或打印，点击仪器界面下端上传或打印。

中国兽医协会 CVMA