ICS 11.220
B 41

# 团　　体　　标　　准

T/CVMA 94—2022

# 布鲁氏菌感染和免疫时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法

TRFIA for detection of antibodies against Brucella

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、中国动物疫病预防与控制中心、中国动物卫生与流行病学中心、中国农业科学院都市农业研究所、洛阳莱普生信息科技有限公司。

本文件主要起草人：郎洪武、王善普、范伟兴、孙雨、原小燕、李明、吴彬、耿玉静、白雪、王德迪、刘慧芳。

中国兽医协会
CVMA

# 布鲁氏菌感染和免疫时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法

## 1 范围

本文件规定了布鲁氏菌感染和免疫时间分辨荧光免疫层析抗体检测试纸检测布鲁氏菌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、结果判定。

本文件适用于检测动物全血或血清中的布鲁氏菌抗体，可用于区分动物全血或血清中的布鲁氏菌S2疫苗免疫或自然感染产生的抗体，用于动物种群布鲁氏菌免疫或感染的筛查、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。

S-LPS抗原：脂多糖抗原
NH抗原：天然半抗原
BSA：牛血清白蛋白

## 5 试剂与耗材

5.1 布鲁氏菌荧光微球抗体（鉴别）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 微量毛细采样管（10 μL）。

中国兽医协会 CVMA

5.4　移液枪（10 μL～100 μL）。

5.5　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 C 操作。

5.6　注射器（5 ml）。

## 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原理制成，样本与荧光微球标记物一起沿层析膜移动，若样本中存在布鲁氏菌免疫抗体则与荧光微球标记物及检测线（T1）上的抗原结合而产生荧光信号值（T1值）；若样本中存在布鲁氏菌感染抗体则与荧光微球标记物（T1）及检测线（T2）上的抗原结合而产生荧光值（T1值和T2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T1/C、T2/C值，即Bru-LPS抗体检测值和Bru-NH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。要求血清清亮，无溶血、无污染。

若无上述条件分离血清，可直接用全血检测。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。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

中国兽医协会 CVMA

将微量毛细管取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。

### 7.3 样品检测

#### 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（T1线、T2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（T1值、T2值和C值），根据T1/C值和T2/C值判定样本中布鲁氏菌免疫抗体和感染抗体（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Bru-LPS抗体检测值＜0.1且Bru-NH抗体检测值＜0.1时，样品应判定为布鲁氏菌感染抗体和疫苗（S2株）免疫抗体均为阴性；

当Bru-LPS抗体检测值≥0.1且Bru-NH抗体检测值＜0.1时，判为布鲁氏菌疫苗免疫抗体阳性；

当Bru-LPS抗体检测值和Bru-NH抗体检测值均≥0.1时，判为布鲁氏菌感染抗体阳性。

中国兽医协会 CVMA

# 附 录 A
（规范性）
布鲁氏菌荧光微球抗体（鉴别）检测卡的制备

## A.1 S-LPS（脂多糖）抗原制备

用超纯水重悬16 M布鲁氏菌菌种，加热至66 ℃；同时将等体积的90%酚水溶液加热到66 ℃；将菌液与酚水混合，66 ℃搅拌20 min；4 ℃冷却，10000 r/min离心125 min；将含有脂多糖的上清于室温静置24 h，回收酚相(底层)并过滤，加入3体积的饱和醋酸钠1%甲醇液，4 ℃沉淀2 h；10000 r/min离心15 min，蒸馏水重悬沉淀，室温孵育2.5 h；4 ℃、10000 r/min离心15 min，上清液保留；沉淀加入蒸馏水搅拌1 h，4 ℃、10000 r/min离心15 min；收集上清液，与上述保留的上清液混合，0.45 μm滤器过滤；加入三氯乙酸终浓度为50 mg/ml，室温孵育10 min；10000 r/min离心15 min，上清透析、冻干、称重后备用。

**警示：以上操作应为在三级及以上生物安全实验室从事的高致病性病原微生物实验活动。**

## A.2 NH（天然半抗原）抗原制备

16 M布鲁氏菌液，离心后经超纯水重悬；120 ℃高压30 min，8000 r/min离心30 min，取上清；上清与乙醇1∶3混合，4 ℃过夜，5000 r/min离心10 min；上清与乙醇1∶2混合，-20 ℃过夜，5000 r/min离心10 min；沉淀经超纯水重悬，核酸酶（浓度为50 μg/mL的DNaseII typeV（拓扑异构V型的II型核酸酶）、DNaseA（A型核酸酶））37 ℃处理18 h；蛋白酶K（50 μg/mL）55 ℃处理1 h，25 ℃处理24 h，处理3次；200000 g超速离心6 h，上清与苯酚1∶1混合，70 ℃处理30 min；8000 r/min离心15 min，酚相经滤器过滤除杂质，与乙醇1∶3混合，-20 ℃过夜，5000 r/min离心10 min；上清与乙醇1∶4混合，-20 ℃过夜，5000 r/min离心10 min；沉淀经超纯水重悬后，透析、冻干、称重后备用。

**警示：以上操作应为在三级及以上生物安全实验室从事的高致病性病原微生物实验活动。**

## A.3 S-LPS和NH抗原与BSA(牛血清白蛋白)的偶联

称取5 g无水硫酸钠，加入到5 mL吡啶中，密封静置5 h后，分别取100 μL加入到2 mgNH抗原和5 mgS-LPS抗原中，震荡混匀，充分溶解后备用。

将20 mg琥珀酸酐加入到400 μL吡啶中搅拌溶解后，分别取200 μL加入到上述NH和S-LPS抗原中，震荡混匀，密封。沸水浴120 min，真空干燥后分别加入1000 μL氯仿震荡溶解，再加入1 mL纯化水剧烈震荡，静置后吸出上层水相，重复此步骤四次，吸出的水相真空干燥备用。

称取11.5 mg(100 μmol)N-hydroxysuccinimide（N-羟基丁二酰亚胺），加入到1 mL二甲基甲酰胺溶解备用；

称取21 mg(100 μmol) DCC（二环己基碳二亚胺）加入到1 mL二甲基甲酰胺溶解备用，分别吸取上述二甲基甲酰胺溶液0.36 ml，将冻干的水相物质溶解，在NH水相溶解物钟加入120 μL（100 μmol）N-hydroxysuccinimide和120 μL(100 μmol)DCC，在S-LPS水相溶解物中加入150 μL（100 μmol）N-hydroxysuccinimide和150 μL(100 μmol)DCC，室温过夜搅拌溶解22 h。取10 mgBSA加入到2 mLCB（0.05 M，pH9.6）中溶解制成蛋白溶液，平均分成两管。将过夜搅拌的NH和S-LPS分别按30 μL每次慢慢加入到5 mg/mL蛋白溶液中，置

4 ℃搅拌过夜，超滤管离心后用PBS复溶，重复5次，最后加入PBS即为S-LPS和NH抗原与BSA(牛血清白蛋白)的偶联物。

### A.4 荧光微球垫的制备

#### A.4.1 荧光微球标记S-LPS抗原、荧光微球标记NH抗原的制备

##### A.4.1.1 洗涤

按需量取固体含量为1%的荧光微球分散液，加入5倍体积的BBS（0.05 mol/L，pH值8.0），以12000 r/min离心15 min，弃上清，再重复清洗2次，将洗涤后的荧光微球重悬于5倍体积BBS。

##### A.4.1.2 荧光微球活化

取50 μL荧光微 球加入1 mLMES缓冲液中，混匀，12000 r/min离心15 min，弃上清，重复上述步骤3次，并用1 mLMES缓冲液复溶；向上述溶液中加入250 μLEDC缓冲液，混匀，室温反应30 min；弃上清，加入4 mLMES缓冲液，混匀。

##### A.4.1.3 荧光微球标记

将S-LPS抗原和NH抗原分别加入到已活化的荧光微球中，使其终浓度为15 μg/mL，混匀后，将S-LPS抗原的荧光微球溶液和含NH抗原的荧光微球溶液，分别于室温条件下，避光反应1.5 h，分别按溶液总体积的3%加入封闭液（9%的酪蛋白）。于室温条件下，分别避光反应30 min，12000 r/min离心弃上清，分别用BBS（0.05 mol/L，pH值8.0）再清洗2次，并重悬已标记的荧光微球。分别以1%的量加入1%胭脂红色素，混匀，置2 ℃～8 ℃保存备用。

#### A.4.2 荧光微球垫的制备

从冰箱中取出荧光微球标记S-LPS抗原和荧光微球标记的NH抗原恢复至室温（15 ℃～25 ℃）。按以下步骤分别制备S-LPS抗原和NH抗原荧光微球垫：

取出玻璃纤维素膜并用辅料切条机裁切成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，逐一垂直放入辅料斩切机中切成0.7 cm×30 cm的荧光微球垫，置于装有干燥剂的密封袋中并进行室温（15 ℃～25 ℃）保存备用。

### A.5 印膜的制备

#### A.5.1 印膜溶液的制备

##### A.5.1.1 质控线（C线）印膜溶液

用PB（0.05 mol/L，pH值8.0）将抗S-LPS多抗稀释至0.4 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.5.1.2 检测线（T1线）印膜溶液

用PB（0.05 mol/L，pH值8.0）将S-LPS抗原稀释至0.45 mg/mL作为检测线1（T1线）印膜溶液，置于棕色玻璃瓶中，2 ℃～8 ℃保存备用。

##### A.5.1.3 检测线（T2线）印膜溶液

中国兽医协会 CVMA

用PB（0.05 mol/L，pH值8.0）将NH抗原稀释至0.45 mg/mL作为检测线2（T2线）印膜溶液，置于棕色玻璃瓶中，2 ℃～8 ℃保存备用。

### A.5.2 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（1、2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（T1、T2线），其中质控线（C线）距硝酸纤维素膜顶端8.0 mm±1.0 mm处，检测线T1距膜顶端12.0 mm±1.0 mm处，质控线与检测线T1相距4.0 mm±1.0 mm，检测线T2距膜距硝酸纤维素膜底端6.0 mm±1.0 mm处，检测线T1与检测线T2相距4.0 mm±1.0 mm，并在膜的开始端、末端及不均匀处作标记。将已划线的NC膜在37 ℃（±2 ℃）及湿度≤30%条件下干燥2 h～3 h，室温（15 ℃～25 ℃）密封保存备用。

### A.5.3 印膜干燥

将划线的NC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，室温（15 ℃～25 ℃）保存备用。

## A.6 样品垫的制备

将玻璃纤维素膜用辅料斩切机裁切成20 cm×30 cm的规格，室温（15 ℃～25 ℃）密封保存备用。

## A.7 检测卡的制备

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

### A.7.1 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重叠，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.7.2 切条

将已组装好的荧光微球大板修剪整齐后，用切条机裁切为4.0 mm（±0.1 mm）的试纸。

### A.7.3 装卡

挑取印膜无划痕、无污染，边缘整齐的试纸，将试纸放入底卡中，盖上卡盖。

中国兽医协会 CVMA

# 附 录 B
（规范性）

## 相关试剂的配制

### B.1 样品稀释液

称取氯化钠(NaCl)8 g，氯化钾(KCl)0.2 g，磷酸氢二钠($Na_2HPO_4$)1.44 g，磷酸二氢钾($KH_2PO_4$)0.24 g，加800 mLdd$H_2O$，用1 M的HCl或NaOH调pH，定容1 L。

### B.2 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1 L，调节pH值至6.0，置2 ℃～8 ℃保存备用。

### B.3 EDC溶液（2 mg/mL）

称取0.2 gEDC（1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐），加入100 mL纯化水充分搅拌溶解后，置2 ℃～8 ℃保存备用。

### B.4 封闭液

称取9 g酪蛋白，加入100 mL纯化水充分搅拌溶解后，置2 ℃～8 ℃保存。

### B.5 BBS（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值至8.5。

### B.6 1%胭脂红色素

称取1.0 g胭脂红色素，100 mL纯化水溶解后备用。

### B.7 PB（0.05 mol/L，pH值 8.0）

甲液（0.2 mol/L $Na_2HPO_4$）：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$Na_2HPO_4$）：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 PBS（0.01 mol/L ，pH值 7.2）

中国兽医协会 CVMA

称取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3 g、$KH_2PO_4$ 0.5 g、NaCl 8 g、KCl 0.5 g，加双蒸水800 mL，搅拌溶解，再加入400 μLPROCLIN-300，而后加双蒸水定容至1000 mL。

中国兽医协会
CVMA

# 附 录 C
（规范性）

## 便携式免疫荧光分析仪及配套ID卡

### C.1 检测前准备

仪器使用前进行充电，确保检测期间仪器正常运行。

### C.2 检测读值

#### C.2.1 检测读值

点击荧光免疫分析仪开关，将其打开，进入检测界面后，将产品检测项目配套ID卡插入仪器ID卡插孔。

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”。

#### C.2.2 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