ICS
点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

牛结核γ干扰素磁微粒化学发光检测方法

Magnetic particle chemiluminescence method for detection of Bovine TB with γ interferon

征求意见稿

中国兽医协会
CVMA

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国兽医协会　　发布

中国兽医协会
CVMA

前　　言

本文件按照 GB/T 1.1－2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的的结构和起草规则》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。

本文件由禾旭（郑州）生物技术有限公司提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

牛结核γ干扰素磁微粒化学发光检测方法

1 范围

本文件规定了牛结核 γ 干扰素磁微粒化学发光检测方法的试剂与耗材、器材与设备、样本采集及处理、操作步骤、试验成立条件和结果判定标准等内容。

本文件适用于牛结核病的早期诊断、检疫、监测、流行病调查评估等工作。

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文件的必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅注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 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

反应杯 reaction cup

化学发光免疫分析仪配套使用的反应容器。

3.2

结合物 conjugates

吖啶酯标记的牛结核 γ 干扰素单克隆抗体。

3.3

激发液 excitation fluid

激发液由激发液 A 和激发液 B 组成，与化学发光免疫试剂配合使用，是一种辅助试剂，为发光过程提供碱性环境使用。

3.4

血细胞刺激物 blood cell stimuli

中国兽医协会 CVMA

包含 PBS、提纯牛型结核菌素和提纯禽型结核菌素，用于刺激血液中感染过结核的牛产生 γ 干扰素，并判断刺激产生源。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PBS：磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline）

MES：2-吗啉乙磺酸（2-Morpholinoethanesulphonic acid）

NHS：N-羟基琥珀酰亚胺（N-Hydroxysuccinimide）

EDC：1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺（1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide）

PPD：提纯结核菌素（purified protein derivative）

A-PPD：禽型结核菌素（Avian Tuberculin PPD）

B-PPD：牛型结合菌素（Bovine Tuberculin PPD）

5 技术原理

感染牛分枝杆菌的结核阳性牛，其外周血淋巴细胞已被牛分枝杆菌致敏并产生免疫记忆，当体外遇到牛分枝杆菌特异性抗原（牛结核菌素刺激时），淋巴细胞将被激活，发生再次细胞免疫反应，释放大量牛结核 γ 干扰素，通过磁微粒化学发光免疫检测(双抗夹心法)技术检测血清中牛结核 γ 干扰素。将待测样本、牛结核 γ 干扰素 4E8 单抗包被的磁性微球溶液以及吖啶酯标记的牛结核 γ 干扰素 2G5 单抗结合物混合；温育一段时间洗涤后，加入激发液；在碱性条件下，吖啶酯分子的发射光强度达到最大，通过测量的发光值结果和既定的判定方法判定待测样本的阴阳性。禽分枝杆菌属于非结核分枝杆菌，以禽型结核菌素刺激淋巴细胞作为对照，可有效排除环境分枝杆菌导致的非特异性反应。

6 试剂与耗材

6.1 血细胞刺激物，制备方法见附录 A。

6.2 磁性微球溶液，制备方法见附录 B。

6.3 结合物，制备方法见附录 C。

6.4 阴性对照和阳性对照，制备方法见附录 D。

6.5 其他相关试剂，制备方法见附录 E。

7 器材与设备

7.1 Ⅱ级生物安全柜。

7.2 恒温培养箱。

7.3 全自动化学发光免疫分析仪。

7.4 2 ℃～8 ℃ 冰箱，-20 ℃ 冰箱。

中国兽医协会 CVMA

7.5 5 mL 一次性注射器。

7.6 5 mL 一次性肝素钠采血管。

7.7 2 mL 灭菌离心管。

7.8 反应杯。

8 实验前准备工作

8.1 样本采集及处理

8.1.1 进行静脉无菌采血，每头 5 mL，立即转移至含肝素钠抗凝剂的一次性无菌采血管中，缓慢颠倒 3 次使血液与肝素钠混匀，然后放入 37 ℃ 保温盒，在 6 h 内送达实验室进行刺激培养。样品收集过程应防止样品污染，注意个人生物安全防护。

8.1.2 将每支抗凝血分别加入到 3 个 2mL 无菌离心管中，每管 1.5 mL，分别标记为 PBS、B-PPD、A-PPD 管。向标记管中相应加入 100μL 的 PBS、B-PPD 和 A-PPD，盖严。轻摇使血液与加入的刺激物充分混合，在 37 ℃ 恒温培养箱中静置培养 16 h。收集细胞培养上清，立即用于牛结核 γ 干扰素的检测。样品处理过程应防止样品污染，注意个人生物安全防护。

8.2 样本的保存

收集的细胞培养上清样本应立即检测。若暂时不检测，应置于 -20 ℃保存待检，避免反复冻融。

9 操作步骤

9.1 将样本、阴性对照、阳性对照分别各加 50 μL 至相应反应杯中，再分别加入 50 μL 磁性微球溶液，混匀后，37 ℃ 反应 15 min。

9.2 各反应杯中加入 300 μL 洗涤液，清洗 3 次。

9.3 在反应杯中加入 100 μL 结合物，混匀后，37 ℃ 温育 10 min。

9.4 重复步骤 9.2 后分别加入 100 μL 激发液 A 和 100 μL 激发液 B。

9.5 化学发光免疫分析仪自动测定各反应杯发光值。

10 结果判定

10.1 试验成立条件

阳性对照发光值与阴性对照发光值之比≥10，实验成立。

10.2 试验结果判定

10.2.1 阴性

中国兽医协会 CVMA

B-PPD 培养上清发光值-PBS 培养上清发光值＜3000 或 B-PPD 培养上清发光值-PBS 培养上清发光值≥3000 且 B-PPD 培养上清发光值-A-PPD 培养上清发光值＜3000，样本判定为牛结核 γ 干扰素阴性。

10.2.2 阳性

B-PPD 培养上清发光值-PBS 培养上清发光值≥3000，且 B-PPD 培养上清发光值-A-PPD 培养上清发光值≥3000，样本判定为牛结核 γ 干扰素阳性。

中国兽医协会
CVMA

附录 A
（规范性）
血细胞刺激物

A.1 B-PPD 工作液的制备

将 100,000 IU 的提纯牛型结核菌素，用 PBS 按照 1:99 稀释，即 1 份 100,000 IU 的提纯牛型结核菌素加 99 份 PBS。

示：1 mL 100,000 IU 的提纯牛型结核菌素加入 99 mL PBS。配制完成后用 0.22 μm 滤膜过滤，无菌分装，置 2 ℃～8 ℃ 保存。

A.2 A-PPD 工作液的制备

将 100,000 IU 的提纯禽型结核菌素，用 PBS 按照 1:99 稀释，即 1 份 100,000 IU 的提纯禽型结核菌素加 99 份 PBS。

示：1 mL 100,000 IU 的提纯禽型结核菌素加入 99 mL PBS。配制完成后用 0.22 μm 滤膜过滤，无菌分装，置 2 ℃～8 ℃保存。

A.3 PBS 的制备

称取十二水合磷酸氢二钠 2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8.0 g、氯化钾 0.2 g，加入 800 mL 纯化水搅拌溶解，加纯化水定容至 1000 mL，经 0.22 μm 过滤，置 2 ℃～8 ℃ 保存。

中国兽医协会
CVMA

附录B
（规范性）
磁性微球溶液

B.1 取 0.2 mg 牛结核 γ 干扰素单克隆抗体，装入透析袋，置 PBS 中室温（15 ℃～25 ℃）透析 4 h。

B.2 磁珠洗涤取 10 mg 羧基磁珠到离心管中，固定到磁力架上进行磁分离（或 10,000 g 离心 5 min），移除上清。向磁珠中加入 1 mL 的 MES 溶液，振荡分散均匀后，磁分离（或 10,000 g 离心 5 min）移除上清。重复用 MES 溶液磁分离洗涤 2 次，用 0.5 mL MES 溶液重悬。

B.3 磁珠活化向羧基磁珠重悬液中加入 250 μL 的 NHS 溶液，振荡分散均匀，再加入 125 μL 的 EDC 溶液，摇匀后固定在混匀器上室温（15 ℃～25 ℃）反应 30 min。反应结束后，磁分离，移除上清，用 MES 溶液磁分离洗涤 2 次。

B.4 抗体偶联上述磁珠用 800 μL 的 MEST 溶液分散，加入透析后的抗体溶液，补加 MEST 溶液至总体积 1 mL，摇匀后固定在混匀器上室温（15 ℃～25 ℃）反应 4 h。反应结束后，磁分离，移除上清，用封闭液磁分离洗涤 2 次。收集每次洗涤的上清液。

B.5 封闭加入 1 mL 的封闭液，振荡分散均匀后，固定在混匀器上反应 4 h。

B.6 稀释离心，移除上清，用 PBST 磁分离洗涤 3 次，加入 500 mL 的 PBST 重悬偶联后的磁珠，2 ℃～8 ℃保存备用。

中国兽医协会
CVMA

附录 C
（规范性）
结合物

C.1 标记单抗的制备

C.1.1 透析

取 200 μL 牛结核 γ 干扰素单克隆抗体（浓度 4 mg/mL），装入透析袋中，置于 PBS 中透析，室温（15 ℃～25 ℃）透析 4 h。

C.1.2 标记

取出透析后的抗体溶液，加入洁净玻璃瓶中，再将 40 μL 吖啶酯溶液（浓度 5.0 mmoL/L）加入抗体溶液中，避光，室温反应 2 h。

C.1.3 封闭

反应后入 10%（m/V）赖氨酸封闭，室温反应 1 h。

C.1.4 洗涤

将标记的抗体溶液，装入透析袋内，置于PBS（0.05 moL/L ，pH 值 7.4）中透析，室温（15 ℃～25 ℃）透析过夜，中间换液 2 次～3 次。

C.1.5 保存

取出透析后的标记抗体溶液，加等体积甘油，放置 -20 ℃ 以下保存备用。

C.2 结合物的制备

将得到吖啶酯标记牛结核 γ 干扰素单抗用 PBS（0.01 moL/L，pH 值 7.4）按照 1:4000 稀释，加入 0.02% Proclin-300 混匀后经 0.22 μm 滤器过滤，无菌分装，于 2 ℃～8 ℃ 保存。

中国兽医协会 CVMA

附录 D
（规范性）
阴性对照和阳性对照

D.1 阴性对照的制备

D.1.1 采血

对 1 头没有感染牛结核的健康动物进行颈部静脉大量采血，经牛结核 γ 干扰素 ELISA 检测试剂盒为牛结核阴性血清。

D.1.2 制备血清

室温（15 ℃～25 ℃）待血液凝固后，37 ℃ 静置 2 h，然后 2 ℃～8 ℃ 静置 1 h，将析出的血清转移到离心瓶中，以 2000 g 离心 5 min，收集上清。

D.1.3 分装、冻干及保存

将制备的血清混合均匀后，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，1 mL/瓶，冷冻真空干燥，置 -70 ℃ 以下保存，标记为“牛结核 γ 干扰素阴性血清”，同时注明制备日期等信息。

D.2 阳性对照的制备

将真核重组表达的牛结核 γ 干扰素（2.6 mg/mL）按照 1:1000 的比例，稀释到阴性对照血清中，混合均匀后，0.22 μm 滤膜过滤除菌。无菌定量分装，1 mL/瓶，冷冻真空干燥，置 -70 ℃ 以下保存，标记为“牛结核 γ 干扰素阳性血清”，同时注明制备日期等信息。

中国兽医协会
CVMA

附录 E
（规范性）
相关试剂

E.1 激发液 A 的制备

量取 200 mL 纯化水，加入 37% 浓盐酸溶液 8.33 mL，加入 30% 过氧化氢溶液 5.46 mL，搅拌均匀，加纯化水定容至 1000 mL。定量分装，2 ℃～8 ℃保存。

E.2 激发液 B 的制备

量取 200 mL 纯化水，加入氢氧化钠 20 g、十六烷基三甲基溴化铵 5.7 g，搅拌溶解，加入曲拉通 X-100 2.5 mL，搅拌均匀，加纯化水定容至 1000 mL。定量分装，2 ℃～8 ℃保存。

E.3 浓缩洗涤液

称取十二水合磷酸氢二钠 72.5 g、磷酸二氢钾 5 g、氯化钠 200 g、氯化钾 5 g，加入700 mL双蒸水加热搅拌溶解，再加入 12.5 mL 的吐温-20，而后加双蒸水定容至 1000 mL。使用前将 25 倍浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 25 倍稀释。

示：40 mL 25 倍浓缩洗涤液加入 960 mL 蒸馏水。

E.4 PBS 溶液

称取十二水合磷酸氢二钠 2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8.0 g、氯化钾 0.2 g，加入 800 mL 纯化水搅拌溶解，再加纯化水定容至 1000 mL，经 0.22 μm 过滤，置 2 ℃～8 ℃ 保存。

E.5 MES 溶液

称取 9.76 g MES、29.22 g NaCL、5mL 10% 的 Brij35，溶于 1000 mL 纯化水，调节 pH 为 6.0，经 0.22 μm 过滤，置 2 ℃～8 ℃ 保存。

E.6 NHS 溶液

称取 20 mg 的 NHS，溶于1 mL MES 溶液中，临用配制 10 min 内使用。

E.7 EDC 溶液

称取 20 mg 的 EDC 溶于 1 mL MES 溶液中，临用配制 10 min 内使用。

E.8 MEST 溶液

取 800 mL MES 溶液（0.5 moL/L，pH 值 6.0），加入 0.5 mL 吐温-20，用 MES 溶液定容至 1000 mL。

A.7.6 封闭液

量取 800 mL PBS（0.01 moL/L，pH 值7.4），加入10 g BSA、0.5 mL 吐温-20、2 mL Proclin-300，搅拌均匀，用 PBS 定容至 1000 mL，经 0.22 μm 过滤，置 2 ℃～8 ℃ 保存。

E.9 PBST 溶液

中国兽医协会 CVMA

量取 800 mL PBS（0.01 moL/L，pH 值 7.4），加入 0.5 mL 吐温-20、2 mL Proclin-300，搅拌均匀，用 PBS 定容至 1000 mL。

中国兽医协会
CVMA