ICS
点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

牛传染性鼻气管炎病毒磁微粒化学发光抗体检测方法

Magnetic particle chemiluminescence method for detection of antibody against Infectious Bovine rhinotracheitis virus

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

牛传染性鼻气管炎病毒磁微粒化学发光抗体检测方法

1 范围

本文件规定了牛传染性鼻气管炎病毒磁微粒化学发光抗体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。

本文件适用于动物血清中的牛传染性鼻气管炎病毒抗体检测，适用于牛传染性鼻气管炎病毒的血清学监测、流行病学调查、免疫效果评估等工作。

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

吖啶酯标记的牛传染性鼻气管炎病毒抗体。

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。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

中国兽医协会 CVMA

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）

5 技术原理

采用磁微粒化学发光竞争 ELISA 检测技术检测牛传染性鼻气管炎病毒抗体。将待测样本、牛传染性鼻气管炎病毒抗原包被的磁性微球溶液以及吖啶酯标记的牛传染性鼻气管炎病毒抗体结合物混合；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。

6 试剂与耗材

6.1 磁性微球溶液，制备方法见附录 A。

6.2 结合物，制备方法见附录 B。

6.3 阴性对照和阳性对照，制备方法见附录 C。

6.4 激发液 A，制备方法见附录 D.1。

6.5 激发液 B，制备方法见附录 D.2。

6.6 浓缩洗涤液，制备方法见附录 D.3。

7 器材与设备

7.1 最大离心力 12，000 g 的离心机。

7.2 全自动化学发光免疫分析仪。

7.3 2 ℃～8 ℃ 冰箱，-20 ℃ 冰箱。

7.4 规格为 5 mL 和 10 mL 的一次性采血器。

7.5 1.5 mL 灭菌离心管。

7.6 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，不少于 2 mL。采集静脉血时，每只动物使用一个采血器。

8.1.2 将血液室温（15 ℃～25 ℃）静置于斜面 2 h～4 h，待血液自然凝固后，置 2 ℃～8 ℃ 冰箱中放置不少于 2 h，4000 g 离心 10 min。

中国兽医协会 CVMA

8.1.3 小心吸出上层血清保存备用。血清应清亮，无溶血、无污染。

8.2 血清样本的存放与运送

8.2.1 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，避免反复冻融。

8.2.2 运输时注意冷藏，采集的血清样本可用冰袋或保温桶加冰密封等方式运输，在 24 h 内完成样本运输。按照《NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》进行样本的保存。

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，再分别加入磁性微球溶液和结合物各 50 μL，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 分别加入 100 μL 激发液 A 和 100 μL 激发液 B。

9.4 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

阴性对照发光值与阳性对照发光值之比≥10，实验成立。

10.2 试验结果判定

10.2.1 阴性

样本与阴性对照发光值之比＞0.5，样本判定为阴性。

10.2.2 阳性

样本与阴性对照发光值之比≤0.5，样本判定为阳性。

中国兽医协会 CVMA

附录A
（规范性）
磁性微球溶液

A.1 取 0.2 mg 牛传染性鼻气管炎病毒抗原，装入透析袋中，置 PBS 中室温（15 ℃～25 ℃）透析 4 h。

A.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。

A.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。

A.4 抗原偶联上述磁珠用 800 μL 的 MEST 溶液分散，加入透析后的抗原溶液，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。

A.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。

A.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 B
（规范性）
结合物

B.1 标记单抗的制备

B.1.1 透析

取 500 μL 牛传染性鼻气管炎病毒单克隆抗体（浓度 2 mg/mL），装入透析袋中，置于 PBS 中透析，室温（15 ℃～25 ℃）透析 4 h。

B.1.2 标记

取出透析后的抗体溶液，加入洁净玻璃瓶中，再将吖啶酯溶液 20 μL（浓度 5.0 mmoL/L）加入抗体溶液中，避光，室温反应 2 h。

B.1.3 封闭

反应后入 10%（m/V）赖氨酸封闭，室温反应 1 h。

B.1.4 洗涤

将标记抗体溶液，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。

B.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。

B.2 结合物的制备

将得到牛传染性鼻气管炎病毒标记单抗用 PBS （0.01 moL/L，pH 值 7.4）按照 1:1000 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 C
（规范性）
阴性对照和阳性对照

C.1 阴性对照的制备

C.1.1 采血

对 1 头没有感染牛传染性鼻气管炎病毒的健康动物进行颈部静脉大量采血，经病毒中和实验检测为牛传染性鼻气管炎病毒抗体阴性血清。

C.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。

C.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“牛传染性鼻气管炎病毒抗体阴性血清”，同时注明制备日期等信息。

C.2 阳性对照的制备

C.2.1 免疫与采血

用牛传染性鼻气管炎病毒疫苗于每头牛耳后皮下注射，每头免疫 1 头份。免疫后每隔 3 个月，再次重复免疫四次，最后免疫一次后一个月，无菌采血，用病毒中和实验检测牛传染性鼻气管炎抗体阳性，免疫至检测抗体效价不低于 1:512 时，无菌采集免疫牛血液。

C.2.2 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。

C.2.3 分装、冻干及保存

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，1 mL/瓶，冷冻真空干燥，置 -70 ℃下保存，标记为“牛传染性鼻气管炎病毒抗体阳性血清”，同时注明制备日期等信息。

中国兽医协会 CVMA

附录 D
（规范性）
相关试剂

D.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。

D.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。

D.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。

D.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。

D.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。

D.6 NHS 溶液

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

D.7 EDC 溶液

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

D.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。

D.9 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，PBS 定容至 1000 mL，经 0.22 μm 过滤，置 2 ℃～8 ℃ 保存。

D.10 PBST

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，PBS 定容至 1000 mL。

中国兽医协会
CVMA