ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

犬细小病毒时间分辨荧光免疫层析检测方法

Time Resolved Fluorescence Immunochromatography Assay for Detection of Antigen against Canine Parvovirus

征求意见稿

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

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 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专利的责任。

本文件由中国农业科学院特产研究所提出。

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

中国兽医协会
CVMA

犬细小病毒时间分辨荧光免疫层析检测方法

1 范围

本文件规定了犬细小病毒（Canine parvovirus, CPV）时间分辨荧光免疫层析抗原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。

本文件适用于检测犬粪便的 CPV 抗原，可用于 CPV 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。

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。

时间分辨荧光免疫层析技术 Time Resolved Fluorescence Immunochromatography Assay（TRFIA）是利用时间分辨荧光微球作为示踪物，将其标记到抗体（或抗原）上，在固相层析材料构建的体系中发生特异性免疫反应后形成复合物，通过测定荧光信号强度从而实现待测物快速定量的分析技术。

犬细小病毒 Canine parvovirus（CPV）是细小病毒科（*Parvoviridae*）、细小病毒亚科（*Parvovirinae*）、原型细小病毒属（*Protoparvovirus*）、食肉动物细小病毒 1（*Carnivore Protoparvovirus* 1）的成员，是一种单链脱氧核糖核酸病毒，临床上可引起出血性肠炎和急性心肌炎等。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPV：犬细小病毒（Canine parvovirus）

5 原理

中国兽医协会 CVMA

采用双抗体夹心法的原理，检测犬粪便样本中的 CPV 抗原。当粪便样本中 CPV 抗原与荧光纳米微球标记的 CPV 抗体反应后形成免疫复合物，继续与硝酸纤维素膜上检测线包被的 CPV 抗体形成双抗体夹心免疫结合物，其余物质继续向前层析，荧光微球标记物与质控线上的抗体结合形成免疫复合物，最后用荧光分析仪读取检测卡上的荧光信号。

6 仪器、材料与试剂

6.1 仪器

6.1.1 便携式荧光分析仪：适用于检测波长为 365 nm/610 nm 的荧光信号强度。

6.1.2 单道可调移液器，量程（规格）为 20 μL~200 μL。

6.1.3 冰箱 2℃~8℃、冰箱-70℃。

6.2 材料

6.2.1 CPV 阳性粪便、CPV 阴性粪便、采样用拭子。

6.2.2 CPV 时间分辨荧光免疫层析抗原检测卡（图 1）：在底板上依次衔接有样品垫、结合垫、硝酸纤维膜和吸水垫。硝酸纤维膜 T 线上包被有 CPV 抗体（具体浓度和含量根据原材料的情况进行梯度试验确定），用于捕获样本中与高敏荧光纳米微球标记 CPV 抗体特异性结合的 CPV 抗原。

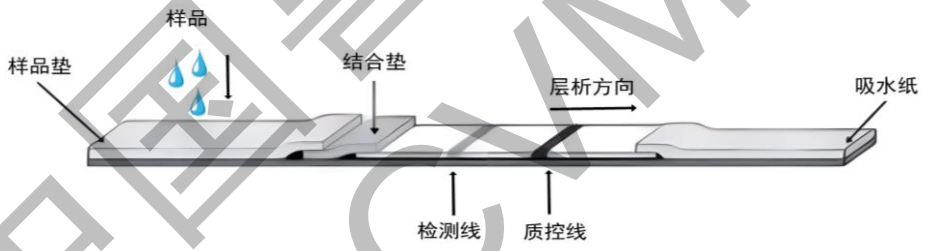

图 1 CPV 时间分辨荧光免疫层析抗原检测卡结构示意图

6.3 试剂

6.3.1 水按照 GB/T 6682 中的要求，二级。

6.3.2 样品稀释液，按照附录 A 的要求配制。

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。

握住肛拭子手柄端，将肛拭子插入犬肛门的 1~2 cm 处擦拭或在肛门内轻轻旋转 3~5 圈后取出。

7.1.2 样品的贮存

中国兽医协会 CVMA

样本在 2℃~8℃冷藏可保存 24 h，如需长期保存应置-70℃。

应按照 GB 19489 做好生物安全工作。

7.2 检测方法

7.2.1 样品处理

将采集样本的肛拭子放入含有至少 500 μL 样本稀释液的管中，充分搅拌混匀后静置 1 min，上清液即为检测液。

7.2.2 加样及孵育

从原包装铝箔袋中取出 CPV 时间分辨荧光免疫层析抗原检测卡，置于平坦干净的台面上，用移液器吸取样本稀释液管中的检测样本，垂直缓慢滴加 100 μL 于加样孔内，避光常温放置 15 min。

7.2.3 仪器检测

将孵育后的检测卡放入便携式荧光分析仪进行检测，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，仪器将检测线（T 线）和质控线（C 线）上的荧光信号值转换成数值（T 值和 C 值），T/C 值即为样本中 CPV 抗原的检测值（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，检测值显示“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

当检测值＜0.1 时，结果判定为 CPV 抗原为阴性。当检测值≥0.1 时，判定为 CPV 抗原为阳性。

中国兽医协会 CVMA

附录 A
（规范性）

犬细小病毒时间分辨荧光免疫层析抗原检测卡的制备

A.1 荧光微球垫的制备

A.1.1 荧光微球标记抗体的制备

取 200 μL 含量为 1%的镧系(铕)荧光微球溶液，加入 5 倍体积的硼酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH 8.2），以 12000 rpm 离心 15 min，弃上清，重复洗涤 2 次，将洗涤后的荧光微球重悬于 1 mL 的硼酸盐缓冲液中。加入 10 mg/mL EDC 溶液 15μL 和 10 mg/mL N-羟基琥珀亚胺溶液 30 μL 混匀，室温（15℃～25℃）活化 30 min，12000 rpm 离心 15 min，用 1 mL 硼酸盐缓冲液重悬后加入 100 μg CPV 抗体，室温（15℃～25℃）避光震荡 4 h，加入封闭液，4℃避光震荡 8 h～12 h，12000 rpm 离心 15 min，弃上清，加入 1 mL 硼酸盐缓冲液洗涤微球 1 次，并重悬已标记的荧光微球，混匀，2℃～8℃保存备用。

同上述步骤制备荧光微球标记羊抗兔二抗溶液，将荧光微球标记的 CPV 抗体溶液和荧光微球标记的羊抗兔二抗溶液以体积比为 10:1 进行混合，2℃～8℃保存备用。

A.1.2 荧光微球质量标准

1）镧系荧光微球液体避光保存，在 2℃～8℃中呈乳白色，荧光颜色为橙色。

2）纳米粒度仪检测镧系荧光微球粒径 200 nm～320 nm，单分散系数 PDI 为＜0.1。

3）材质及表面基团为聚苯乙烯-羧基。

4）最大激发光波长 345 nm，最大发射光波长为 614 nm。

A.1.3 荧光微球垫的制备

将荧光微球标记 CPV 抗体溶液，用喷金点膜仪设置喷量为 3 μL/cm，每张玻璃纤维素膜（10 cm×30 cm）以 7 mm 间隔喷涂，将喷好的荧光微球垫放置在干燥架上，置 37℃（±2℃）干燥 4 h～5 h，烘干后于切成 7 mm 于 4℃～30℃密封保存备用。

A.2 包被片材的制备

A.2.1 包被溶液的制备

A.2.1.1 质控线（C 线）包被溶液

将 100 μg 的兔 IgG 加入到 200 μL 磷酸缓冲液（0.02 mol/L，pH 值 7.4）中，作为质控线（C 线）包被膜溶液，2℃～8℃保存备用。

A.2.1.2 检测线（T 线）包被溶液

中国兽医协会 CVMA

将 400 μg 的 CPV 抗体加入到 200 μL 磷酸缓冲液（0.02 mol/L，pH 值 7.4）中，作为检测线（T 线）包被膜溶液，2℃～8℃保存备用。

A.2.2 包被片材

将质控线包被溶液和检测线包被溶液装入喷金点膜仪，按 1 μL/cm 划线量在 NC 模式均匀划出质控线（C 线）和检测线（T 线）。将已划线的 NC 膜放置于干燥架上，37℃（±2℃）干燥 2 h～3 h，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，将 20 mL 样品垫处理液倒入玻璃纤维素膜中央，用滚轮铺匀，37℃(±2℃)过夜干燥，用切条机将其裁切为 2.5 cm×30 cm，于 4℃～30℃密封保存备用。

A.4 检测卡的制备

A.4.1 贴条

在室温（15℃～25℃）及湿度≤30 %RH 条件下，依次按 NC 膜、吸水垫、荧光微球垫、样品垫的顺序将各中间制品粘贴于底板的各个位置上，保证各个中间品在相邻处均有 1 mm～2 mm 层叠，使 NC 膜的检测线（T 线）靠近样品垫一侧，质控线（C 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 2.7 mm±0.1 mm 宽的试纸。

A.4.3 装卡

选取 NC 膜无划痕、无污染，边缘整齐的试纸，将试纸装入卡壳中，压卡后，将单卡与干燥剂、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 配制 0.2M PB 液

称取 71.6 g 的 $Na_2HPO_4·12H_2O$ 溶于 1000 mL 纯化水中，配制出 0.2M Na_2HPO_4。称取 31.2 g 的 $NaH_2PO_4·2H_2O$ 溶于 1000 mL 纯化水中，配制出 0.2 M NaH_2PO_4。量取 81 mL 的 0.2M Na_2HPO_4 和 19 mL 的 0.2 M NaH_2PO_4，混匀后配制出 0.2M PB 液。

B.2 配制 20 mM PB 液

量取 100 mL 0.2 M PB 液，加水稀释至 1000 mL，配制出 20 mM PB 液。

B.3 配制样品稀释液

称取氯化钠 8.8 g 和 Proclin-300 500 μL，添加到 1000 mL 20 mM PB 液中，混匀后分装，置 4℃～30℃保存。

B.4 配制硼酸盐缓冲液

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 8.5，4℃～30℃保存。

B.5 配制封闭液

称取 100 g BSA，加入 1 L 纯化水溶解，2℃～8℃保存。

B.6 样品垫处理液

称取 3.0 g BSA，10.0 g 聚乙二醇 20000，10 mL 吐温-20，加入 1 L 硼酸盐缓冲液中，2℃～8℃保存。

中国兽医协会 CVMA