

团 体 标 准

T/CVMA 95—2022

小反刍兽疫病毒时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法

TRFIA for detection of antibodies against Peste des Petits Ruminants
Virus

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、青海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、孙雨、袁忠勋、王善普、蔡金山、张志平、阚威、游潇倩、耿玉静、吴彬、原小燕、白雪、张鹏翼、李勤楠。

中国兽医协会
CVMA

小反刍兽疫病毒时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法

1 范围

本文件规定了小反刍兽疫病毒时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法的试剂与耗材、器材与设备、技术原理、操作步骤、实验成立条件、结果判定等内容。

本文件适用于检测羊全血或血清中的小反刍兽疫病毒抗体,用于小反刍兽疫病毒抗体的免疫筛查和辅助诊断。

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 小反刍兽疫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 小反刍兽疫抗体阳性血清,按照附录 C 制备。
- 5.4 微量毛细采样管(10 μ L)。

5.5 移液枪（10 μL~100 μL）。

5.6 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。

5.7 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，检测小反刍兽疫抗体。通过样本与荧光微球标记物沿层析膜移动，样本中羊小反刍兽疫病毒抗体与荧光微球标记物、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）上的抗体结合产生荧光信号值（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中规定进行样品的采集与处理，并做好个人防护。进行被检羊只静脉无菌采血，不少于2 mL。室温静置于斜面2 h，待血液自然凝固后，置2℃~8℃冰箱中放置不少于2 h，4000 r/min离心10 min。用移液枪小心吸出上层血清。血清应清亮，无溶血、无污染。

若无上述条件分离血清，可直接用被检羊只全血检测。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。按照相关规范要求对样品进行生物安全标识。

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。按照相关规范要求对样品进行生物安全标识。

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 样品稀释液

将微量毛细采样管取10 μL 全血或血清样本加入到已准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

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、洁净的实验台面上。

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值即为样本中小反刍兽疫抗体检测值（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PPRV抗体检测值 <0.1 时，判为小反刍兽疫病毒抗体阴性。

当PPRV抗体检测值 ≥ 0.1 时，判为小反刍兽疫病毒抗体阳性。

附录 A (规范性)

小反刍兽疫病毒荧光微球抗体检测卡的制备

A.1 小反刍兽疫病毒pET-30a-(N)蛋白的制备

A.1.1 生产用菌液繁殖

用接种环挑取-70℃保存的基础种子批pET-30a-(N)-BL21(DE3)菌株划线于含30 μg/mL卡那霉素抗性的LB固体培养基, 37℃±2℃温箱倒置培养12 h~16 h。挑取单菌落, 接种于1 mL LB液体培养基(含30 μg/mL卡那霉素), 在37℃±2℃条件下、以200 r/min振荡培养8 h~12 h。

A.1.2 重组蛋白的诱导表达

将菌液以1%的接种量转接至LB液体培养基(含30 μg/mL卡那霉素), 在37℃±2℃条件下, 以200 r/min振荡培养至OD₆₀₀ nm值达到0.6时, 加入IPTG至终浓度为0.75 mmol/mL, 16℃下继续诱导12 h, 收集诱导表达菌液。

A.1.3 重组蛋白提取和纯化

将诱导后的菌液, 在2℃~8℃条件下、以8000 r/min离心10 min, 弃上清, 收集菌体沉淀, 用PBS(0.01 mol/L, pH值7.4)洗菌体沉淀三次, 以8000 r/min离心10 min, 用6 mL PBS(0.01 mol/L, pH值7.4)重悬菌体沉淀, 在150 W功率的超声波的作用下冰浴裂解, 有效时间为10 min, 工作时间为5 s, 间隔5 s。将超声裂解物在2℃~8℃、以12000 r/min离心15 min, 保留上清液。

将制备的上清液穿过预处理过的树脂柱, 重复5~7次, 依次用10 mmol/L咪唑缓冲液、20 mmol/L咪唑缓冲液、40 mmol/L咪唑缓冲液、60 mmol/L咪唑缓冲液、80 mmol/L咪唑缓冲液、100 mmol/L咪唑缓冲液、200 mmol/L咪唑缓冲液及500 mmol/L咪唑缓冲液对重组蛋白进行洗杂和洗脱, 收集洗脱液, 并洗脱产生的滤液通过Superdex200凝胶柱分子筛进行进一步精细纯化, 最后将纯化后的蛋白吸出加到透析袋中(8 kd)浸泡在2 L的透析液中, 过夜透析, -70℃保存。

A.2 荧光微球垫的制备

A.2.1 荧光微球标记羊小反刍兽疫病毒pET-30a-(N)蛋白的制备

A.2.1.1 洗涤

按需量取固体含量为1%的荧光微球分散液, 加入5倍体积的硼酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH值为8.0), 以12000 r/min离心15 min, 弃去上清液, 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中。

A.2.1.2 荧光微球活化

取50 μL荧光微球加入1 mL MES(2-吗啉乙磺酸)缓冲液中, 混匀, 12000 r/min离心15 min; 弃去上清液, 加入1 mL MES缓冲液, 混匀离心; 再重复上述步骤2次, 并用1 mL MES缓冲

液复溶；向上述溶液中加入250 μ LEDC缓冲液，混匀，室温反应30 min；弃去上清液，加入4 mL MES缓冲液，混匀。

A. 2. 1. 3 荧光微球标记

将制备的小反刍兽疫病毒pET-30a-(N)蛋白加入到已活化的荧光微球中，使其终浓度为15 μ g/mL，充分混匀。将混匀后含小反刍兽疫病毒pET-30a-(N)蛋白的荧光微球溶液，于室温（15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）条件下，避光反应1.5 h，于室温（15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）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 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C）避光反应30 min。离心弃去上清液，按A. 2. 1. 1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，置2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存备用。

A. 2. 1. 4 荧光微球垫的制备

待荧光微球标记羊小反刍兽疫病毒pET-30a-(N)蛋白恢复至室温（15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C），取出玻璃纤维素膜并用辅料切条机裁切成10 cm \times 30 cm规格。设置喷涂量为3 μ L/cm，每张玻璃纤维素膜（10 cm \times 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 $^{\circ}$ C（ \pm 2 $^{\circ}$ C）干燥2 h~3 h，用切条机将喷涂有荧光微球标记羊小反刍兽疫病毒pET-30a-(N)蛋白的部分裁切为0.7 cm \times 30 cm的条带，于4 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C密封保存备用。

A. 3 印膜的制备

A. 3. 1 印膜溶液的制备

A. 3. 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）将羊小反刍兽疫抗体阳性血清稀释至0.3 mg/mL作为质控线（C线）印膜溶液，置于棕色玻璃瓶中，2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存备用。

A. 3. 1. 2 检测线印膜溶液

用磷酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH值8.0）将羊小反刍兽疫病毒pET-30-(N)蛋白稀释至0.45 mg/mL作为检测线印膜溶液，置于棕色玻璃瓶中，2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存备用。

A. 3. 1. 3 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 μ L/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（ \pm 0.1 cm）处，检测线距膜顶端1.3 cm（ \pm 0.1 cm）处，质控线与检测线相距0.5 cm（ \pm 0.1 cm），并在膜的开始端、末端及不均匀处作标记。

A. 3. 2 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 $^{\circ}$ C（ \pm 2 $^{\circ}$ C）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 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C密封保存备用。

A. 4 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 °C（±2 °C）过夜干燥，用切条机将其裁切为2.0 cm×30 cm，于4 °C~30 °C密封保存备用。

A.5 检测卡的制备

A.5.1 制备环境

在室温（15 °C~25 °C）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.5.2 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.5.3 切条

在室温（15 °C~25 °C）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.5.4 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。

附录 B (规范性)

相关试剂的配制

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 μ L Proclin-300,纯化水定容至1 L。

B.2 样品垫处理液

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。

B.3 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至8.5。

B.4 EDC溶液 (2 mg/mL)

称取0.2 g EDC(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 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存备用。

B.5 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 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存备用。

B.6 封闭液

称取90 g酪蛋白,加入1 L纯化水溶解,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

B.7 1%胭脂红色素

称取1.0 g胭脂红色素,100 mL纯化水溶解。

B.8 磷酸缓冲液 (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。

中国兽医协会
CVMA

附录 C (规范性)

小反刍兽疫抗体阳性血清的制备

C.1 免疫与采血

用小反刍兽疫重组蛋白免疫于每头小反刍兽疫抗体阴性动物，腿部后肌肉注射，2 mL/头份，28日后二免，免疫后1周，每周无菌采血检测，经检测抗体效价达1: 512时，无菌采集免疫动物血液。

C.2 分装、冻干及保存

将采集的全血室温条件下静置于斜面，待血液自然凝固后，置2℃~8℃冰箱中放置2 h，4000 r/min离心10 min，吸出上层血清，经0.22 μm滤膜过滤除菌，无菌定量分装，1 mL/瓶，置-70℃下保存，标记并注明制备日期等信息。

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。
