

ICS XX.XXX

X XX

团 体 标 准

布鲁氏菌竞争磁微粒 CLIA 抗体检测方法

Competitive magnetic particle based chemiluminescence immunoassay for detecting antibodies against Brucella

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 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专利的责任。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

布鲁氏菌竞争磁微粒 CLIA 抗体检测方法

1 范围

本文件规定了布鲁氏菌竞争磁微粒CLIA抗体检测方法的试剂、仪器设备及耗材、技术原理、检测前准备、操作步骤、结果判定。

本文件适用于定量检测牛羊血清中布鲁氏菌的特异性抗体，并且实现自动化、高通量、高敏感性、高重复性检测。

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 19489 样品处理的生物安全措施、实验室生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18646 动物布鲁氏菌病诊断技术

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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件

CLIA：化学发光免疫分析法（Chemiluminescence Immunoassay）

ELISA：酶联免疫吸附试验（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）

5 试剂

- 5.1 25×浓缩洗液，按照附录A.1配制。
- 5.2 磁微粒工作液（偶联布鲁氏菌脂多糖的磁微粒悬浮液）。
- 5.3 校准品稀释液，按照附录A.2配制。
- 5.4 酶标抗体工作液（碱性磷酸酶标记的布鲁氏菌单克隆抗体）。
- 5.5 布鲁氏菌抗体工作校准品：包括工作校准品1、工作校准品2、工作校准品3、工作校准品4、工作校准品5、工作校准品6，抗体含量分别为0 IU/mL、1.5 IU/mL、6.5 IU/mL、23.5 IU/mL、91.5 IU/mL、290.5 IU/mL，按照附录B制备。
- 5.6 布鲁氏菌抗体产品校准品：包括产品校准品1、产品校准品2，抗体含量分别为6.5 IU/mL、91.5 IU/mL，按照附录C.1制备。
- 5.7 布鲁氏菌抗体质控品：质控品1合格范围为2.56 IU/mL~ 8.08 IU/mL，质控品2合格范围为60.38 IU/mL~ 102.14 IU/mL，按照附录C.2制备。
- 5.8 化学发光底物。

6 仪器设备及耗材

实验操作所需设备及耗材如下：

- 全自动化学发光免疫分析仪：磁微粒和酶促化学发光检测设备；
- 电子天平：最大称量：Max=220g；最小称量：Min=10mg；显示分度值：d=0.1mg；
- 离心机：最高转速：16000 rpm；
- 可调单道移液器（100 μL、1 mL）；
- 1.5 mL尖底离心管；
- 反应杯；
- 试剂船。

7 技术原理

本方法使用磁微粒化学发光免疫分析法，将布鲁氏菌脂多糖作为抗原偶联于3μm羧基磁微粒上，采用竞争法原理，同时加入待检血清和布鲁氏菌单抗AP酶标记的酶标抗体工作液进行竞争反应；最后加入化学发光底物，读取发光值，待检样本抗体含量和发光值呈负相关。本方法通过检测国家标准品建立标准曲线，进而定标工作校准品浓度；再通过检测布鲁氏菌抗体工作校准品建立校准曲线，而后将待测样本结果代入校准曲线计算布鲁氏菌抗体含量，判定阴阳性结果。

8 检测前准备

8.1 样品采集及保存

样品采集按照NY/T 541进行。无菌注射器静脉采血，不少于2 mL，用自然析出法分离血清后，置于无菌血清管中，按照GB 19489 样品处理的生物安全措施、实验室生物安全通用要求处理样本，若在一周内检测，可置2°C~8°C条件下保存，若超过一周检测，应置于-20 °C以下冷冻保存。

血清样本运输时应注意冷藏。

8.2 样品处理

取8.1中的样品，8000 r/min，离心2 min，取上清放于1.5 mL离心管中，体积应大于300 μL，待检；若样品中存在沉淀或絮状物等杂质，应离心去除杂质，轻微操作，避免出现泡沫。

8.3 溶液配制

1×洗液：将25×浓缩洗液用无离子水或蒸馏水1:25倍稀释，装入洗涤液桶。

无离子水或灭菌蒸馏水应符合GB/T 6682的要求。

8.4 仪器准备

阅读仪器说明书，放置反应杯，扫码放置底物、系统维护液，开始自检。

8.5 试剂准备

将偶联磁微粒工作液、酶标抗体工作液，分别装入试剂船上对应的试剂瓶中，将磁微粒吹打混匀，轻微操作，避免出现泡沫，试剂瓶盖换为胶盖；然后将试剂船装入试剂仓中。

9 操作步骤

9.1 校准曲线拟合

将布鲁氏菌抗体工作校准品1~工作校准品6放入样本架，按照9.4进行样品检测，按9.5制作校准曲线并计算。校准曲线见附录D。

9.2 校准曲线校准

将布鲁氏菌抗体产品校准品1和产品校准品2放入样本架，按说明书对校准曲线进行校准。

以下情况需对校准曲线进行校准，然后再进行检测：

- a) 试剂成分发生改变；
- b) 同一批次试剂盒使用周期超过28 d；
- c) 根据具体需要：如质控结果不符合要求。

9.3 质控

需要时检测质控血清，检测值必须在参考范围内，方可继续样品检测。

如下情况需检测质控血清：

- a) 试剂成分发生改变或校准曲线校准后；
- b) 质控样品至少24 h内需检测1次。

9.4 样品检测

取待检样本于 1.5mL/2mL 离心管中（样本量需 300 μ L 以上），置于专用样品架，设置测试样品信息，进行检测。

整个检测过程在 LYC 系列全自动化学发光免疫分析仪上全自动进行，具体检测过程如下：

- a) 免疫反应：取25 μ L待测样本，25 μ L磁微粒工作液、50 μ L酶标抗体工作液，分别加入反应杯中，37 $^{\circ}$ C孵育10 min；
- b) 清洗：使用磁力架吸附磁微粒30 s，使其聚集于管壁，弃去上清液。加入1 \times 洗液300 μ L将磁微粒悬浮，混匀30s后磁力架吸附磁微粒，弃去1 \times 洗液。重复清洗4次。
- c) 检测：加入化学发光底物溶液100 μ L于清洗后的反应杯中，混匀30 s悬浮磁微粒，37 $^{\circ}$ C反应3min，检测发光值（RLU）。
- d) 计算：将发光值（RLU）代入校准曲线，计算样本中的抗体含量（IU/mL）。

9.5 计算结果

检测完成后，以工作校准品抗体含量（0 IU/mL、1.5 IU/mL、6.5 IU/mL、23.5 IU/mL、91.5 IU/mL、290.5 IU/mL）为横坐标、相应检测发光值为纵坐标拟合四参数为校准曲线，四参数模式为 $Y=(a-d)/[1+(x/c)^b]+d$ ，当 R^2 高于0.99时，可用于结果计算和判定。将待检样品检测发光值代入校准曲线，计算结果即为待检样本中布鲁氏菌抗体含量。

10 结果判定

10.1 质控血清参考范围

质控品 1 合格范围为 2.56 IU/mL~ 8.08 IU/mL，质控品 2 合格范围为 60.38 IU/mL~ 102.14 IU/mL。

10.2 阴阳性判定依据

抗体含量 ≥ 21.5 IU/mL 时，判为布鲁氏菌抗体阳性；抗体含量 < 21.5 IU/mL 判为布鲁氏菌抗体阴性。

中国兽医协会
CVMA

附录 A

(规范性)

试剂的配制

A.1 25×浓缩洗液配制

表A.1 25×浓缩洗液配方

名称	称量
丁二酸	1.98 g
六水丁二酸钠	62.16 g
氯化钠	225.00 g
吐温-20	13.75 g

加灭菌蒸馏水至600 mL，溶解，定容至1000 mL，置于2℃~8℃保存备用。使用时用灭菌蒸馏水稀释25倍为1×洗液使用。

A.2 校准品稀释液配制

表A.2 校准品稀释液配方

名称	称量
磷酸氢二钠	1.15 g
氯化钠	8.00 g
磷酸二氢钠	0.20g
牛血清白蛋白	1.00g
海藻糖	5.00g
吐温-20	0.50 mL

加灭菌蒸馏水至 600 mL，溶解，定容至 1000 mL，置于 2℃~8℃保存备用。蒸馏水均应符合 GB/T 6682 的要求。

附录 B

(规范性)

布鲁氏菌抗体工作校准品制备

B.1 布鲁氏菌高免血清制备

筛选布鲁氏菌病抗体为阴性的绵羊用于免疫试验。使用布鲁氏菌脂多糖免疫 3 月龄以上的绵羊，按 200ug/头份剂量，颈部肌肉注射接种。在初次免疫 21 天后，再次进行加强免疫，14 天后检测抗体水平，如抗体达不到要求，再进行第三、第四次免疫。

抗体水平达到要求后，采集颈部静脉血，用自然凝析法，3000 r/min 离心 10 min，分离血清，然后用 0.22 μm 过滤器过滤除菌，加入 proclin300，使终浓度为 0.05 % (V/V)，-20 °C 保存备用。

抗体水平合格标准：对采集的血清样品，按照 GB/T 18646 中的 ELISA 方法进行抗体水平检测，以检测样本为阳性的最大稀释梯度判断布鲁氏菌病抗体水平，若结果大于 ELISA 检测临界值，则为合格的原始高免血清。

B.2 布鲁氏菌抗体工作校准品制备

使用校准品稀释液梯度稀释布鲁氏菌国家标准血清（购自中国食品药品检定研究院，批号 230039-201401，规格 1000 IU/mL），即 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024 倍稀释，对应抗体含量为 500.0 IU/mL、250.0 IU/mL、125.0 IU/mL、62.5 IU/mL、31.2 IU/mL、15.6 IU/mL、7.8 IU/mL、3.9 IU/mL、1.9 IU/mL、0.9 IU/mL，使用建立的 CLIA 方法进行检测，以抗体含量为横坐标、相应检测发光值为纵坐标拟合四参数（四参数模式为 $Y=(a-d)/[1+(x/c)^b]+d$ ）为标准曲线。

使用校准品稀释液梯度稀释 B.1 所制备的布鲁氏菌高免血清，即 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024、1:2048、1:4096 倍稀释，再用建立的 CLIA 方法进行检测，代入上述标准曲线。最终选择校准品稀释液为工作校准品 1，为 0 IU/mL，将 1:2048、1:512、1:128、1:32、1:8 倍稀释，抗体含量为 1.5 IU/mL、6.5 IU/mL、23.5 IU/mL、91.5 IU/mL、290.5 IU/mL 的血清分别为工作校准品 2、工作校准品 3、工作校准品 4、工作校准品 5、工作校准品 6。工作校准品 -20 °C 保存备用，24 个月内有效。

附录 C

(规范性)

布鲁氏菌抗体产品校准品、质控品

C.1 布鲁氏菌抗体产品校准品制备

取 B.1 所制备的布鲁氏菌高免血清，用校准品稀释液稀释至抗体含量为 6.5 IU/mL、91.5 IU/mL，分别为布鲁氏菌抗体产品校准品 1、产品校准品 2，产品校准品-20℃保存备用，24 个月内有效。

C.2 布鲁氏菌抗体质控品制备

取 B.1 所制备的布鲁氏菌高免血清，用校准品稀释液稀释至抗体含量为 5.0 IU/mL、82.0 IU/mL，分别为布鲁氏菌抗体质控品 1、质控品 2。用布鲁氏菌竞争磁微粒 CLIA 抗体检测方法检测 10 次，计算平均值，质控品合格范围为 $\text{Mean} \pm 3\text{SD}$ 。质控品-20℃保存备用，24 个月内有效。

附录 D

(资料性)

校准曲线实例参照

布鲁氏菌抗体检测校准曲线，标定 1~标定 6 分别是工作校准品 1~工作校准品 6 的检测结果，校准 1 和校准 2 分别为产品校准品 1 和产品校准品 2 的检测结果，R 值为 0.9996， R^2 为 0.999，相关性较好，如图 D。其中标定 1~标定 6 的发光值范围如表 D.1 所示。

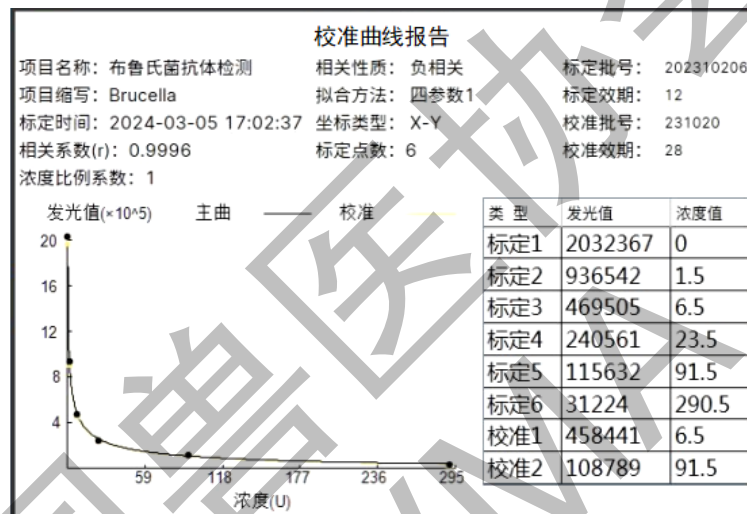


图 D.1 布鲁氏菌抗体检测校准曲线参考图

注：横坐标为校准品抗体浓度，纵坐标为检测发光值。

表D.1 工作校准品发光值范围

名称	范围
标定 1	1652769.6 ~ 2282696.2
标定 2	716251.7 ~ 1169460.8
标定 3	348736.6 ~ 538262.5
标定 4	135241.3 ~ 304383.3
标定 5	70614.67 ~ 132409.5
标定 6	18725.5 ~ 42847.3