

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

犬猫狂犬病抗体间接 ELISA 检测方法

Indirect ELISA method for detection of rabies antibody in dogs and cats

（征求意见稿）

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - - 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：上海市动物疫病预防控制中心、中国动物疫病预防控制中心、北京世纪元亨动物防疫技术有限公司。

本文件主要起草人：杨显超、王建、赵洪进、鞠厚斌、原霖、陶田谷晟、于慧茹、杨德全、迟立超、刘健、王晓旭、李鑫。

犬猫狂犬病抗体间接 ELISA 检测方法

1 范围

本文件规定了犬猫狂犬病抗体间接 ELISA 检测的操作方法。
本文件适用于实验室对犬猫血清中狂犬病抗体检测。

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/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

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。

Rabies: 狂犬病

ELISA: 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

HRP: 辣根过氧化物酶(hydrogen-peroxide oxidoreductase, HRP)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline buffer)

TMB: 四甲基联苯胺

OD: 光密度 (optical density)

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 总则：除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 的要求，所有试剂均用无 RNA 酶的容器分装。

5.1.2 包被抗原：狂犬病毒全病毒抗原（灭活纯化）。

5.1.3 酶标抗体：辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌 A 蛋白。

5.1.4 阴性血清。

5.1.5 阳性血清。

5.1.6 洗涤液：配置方法按附录 A 中 A.1。

5.1.7 抗原包被液：配制方法按附录 A 中 A.2。

5.1.8 封闭液：配制方法按附录 A 中 A.3。

5.1.9 底物：配制方法按附录 A 中 A.4。

5.1.10 终止液：配制方法按附录 A 中 A.5。

5.1.11 样品稀释液：配置方法按附录 A 中 A.6。

5.2 耗材

5.2.1 酶标板。

5.2.2 移液器吸头。

6 仪器设备

6.1 自动酶标检测仪。

6.2 高速冷冻离心机。

6.3 振荡器。

6.4 微量移液器（量程：0.5 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 和 200 μL ~1 000 μL ）。

6.5 冰箱（2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 和-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下）。

7 样品的采集与前处理

7.1 总则

样品的采集、保存与运输按照NY/T 541执行。生物安全要求按照GB 19489的规定。

7.2 样品的采集

血液采集分别按照 NY/T 541 中 6.1.2.7 中的规定执行。

7.3 样品处理

血清样品前处理：将采血管采集血液倾斜放置，室温放置 20 min 后以 4000 r/min 离心 10 min，分离血清，吸取 200 μL 至 1.5 mL 灭菌离心管中，要求血清清亮无溶血。

8 操作方法

- 8.1 包被：按照 $2\ \mu\text{g/mL}$ 的包被浓度，用抗原包被液包被，加入 $100\ \mu\text{L}$ 到酶标板中， $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜。
- 8.2 浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 20 倍稀释。洗板三次，拍干酶标板上残留的液体。按照 $100\ \mu\text{L}$ /孔的量，加入封闭液， $37\ ^\circ\text{C}$ 封闭 2 h。
- 8.3 稀释样品：将已分离好的血清用样品稀释液做 1:100 稀释（即取 $10\ \mu\text{L}$ 血清加入到 1mL 样品稀释液中），并充分混匀。
- 8.4 将板条固定于板架上，剩余的板条放入密封袋中保存。
- 8.5 每次实验每板须设空白孔、阳性对照、阴性对照各 1 孔，临界对照 3 孔。阳性对照、阴性对照、临界对照直接使用， $100\ \mu\text{L}$ /孔。其余每孔加入稀释后样品 $100\ \mu\text{L}$ 。置 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 30 min。
- 8.6 甩净孔中液体，将洗液注满每孔（约 $300\ \mu\text{L}$ /孔），甩净拍干，反复 3 次。除空白孔外每孔加酶标抗体 $50\ \mu\text{L}$ ，置 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 30 min。
- 8.7 甩净孔中液体，同上洗涤 3 次，拍干后各孔加底物 $100\ \mu\text{L}$ ，置 $37\ ^\circ\text{C}$ 避光 15 min，每孔加入终止液 $50\ \mu\text{L}$ ，轻微震荡微孔板以混合均匀。
- 8.8 以空白孔调零，用酶标仪读取 $450\ \text{nm}$ 处的 OD 值。

9 结果判定

9.1 结果分析条件设定

实验成立的条件

阈值设定原则：阴性对照 OD 值 ≤ 0.15 , $0.2 \leq$ 临界对照 OD 值平均值 ≤ 0.8 ，临界对照 OD 值平均值/阴性对照 OD 值 ≥ 2.0 ，阳性对照 OD 值 $>$ 临界对照 OD 值，证明实验成立。否则实验结果无效，需重新试验。

9.2 结果描述及判定

9.2.1 阴性

被检样品 OD 值与临界对照平均 OD 值的比值 < 1.0 判定为阴性。

9.2.2 阳性

被检样品 OD 值与临界对照平均 OD 值的比值 ≥ 1.0 判定为阳性。

附 录 A
(规范性)
溶液配制

A.1 洗涤液

洗涤液为含 0.05% 吐温-20 (Tween-20) pH 7.4 的磷酸盐缓冲液, 配制方法如下:
将下列实际依次加至容积为 1000 mL 容器中, 充分溶解即成。

氯化钠 (NaCl)	8.0 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g
十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)	0.2 g
吐温-20 (Tween-20)	0.5 mL
加蒸馏水定容至	1000 mL

A.2 抗原包被液

包被液为 25 mmol/L, pH 9.6 碳酸盐缓冲液, 配制方法如下:

碳酸钠 (Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠 (NaHCO_3)	2.93 g
加蒸馏水定容至	1000 mL

A.3 封闭液

在 100 mL 洗涤液中加入 0.1 g 牛血清白蛋白 (BSA) 即可。

A.4 底物溶液

A.4.1 pH 5.0 碳酸盐-柠檬酸盐缓冲液

将下列试剂依次加入 1000 mL 体积的容器中, 充分溶解即成。

十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	71.6 g
无水柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	19.2 g
加蒸馏水定容至	1000 mL

A.4.2 0.75% H_2O_2

取 30% H_2O_2 1.25 mL, 加入蒸馏水, 使总体积达到 50 mL。

A. 4. 3 四甲基联苯胺 (TMB) 母液

取 200.00 mg TMB 溶解于 100 mL 无水乙醇中。-20 °C 保存。

A. 4. 4 底物溶液 (临用时配制)

0.1 mol/L pH 5.0 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液	9.5 mL
TMB 母液	0.5 mL
0.75% H ₂ O ₂	42 μL

此底物液对光敏感，应避免强光照射，现配现用

A. 5 终止液

终止液为 2 mol/L 硫酸 (H₂SO₄)，配制方法如下：

浓硫酸 (H ₂ SO ₄)	22.2 mL
蒸馏水	177.8 mL

A. 6 样品稀释液

样品稀释液为 0.1 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液，配制方法如下：
将下列试剂依次加入容积为 1000 mL 的容器中：

氯化钠 (NaCl)	8.02 g
氯化钾 (KCl)	0.20 g
十二水合磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	3.87 g
磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	0.16 g
加蒸馏水定容至	1000 mL

混匀后，充分溶解，最后加入 0.10 g 叠氮钠 (NaN₃) 防腐 (其终浓度为 0.1 g/L)。