

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

马传染性贫血病病毒抗体胶体金免疫层析 检测方法

Method of the immunochromatographic assay for the detection of equine
infectious anemia virus antibody

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-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》的规则起草。

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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、北京亿森宝生物科技有限公司、新疆维吾尔自治区动物疫病预防控制中心、新疆生产建设兵团动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、重庆市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：孙雨、宋晓晖、王传彬、王睿男、肖颖、王新杰、刘亚涛、王文、孙晓明、杨林、孙航、张旭、邹联斌、韦正吉、陈昭旭、白雪冬、胡祥钰、马英、毕一鸣、黄辉、姚强、张力、殷涛、凌洪权、武焯、彭强、董春霞。

马传染性贫血病病毒抗体胶体金免疫层析检测方法

1 范围

本文件规定了马传染性贫血病病毒抗体胶体金免疫层析检测方法的检疫技术规范。包括样品的采集和处理、免疫胶体金试纸卡的组装、样品检测、结果判定等方法和技术要求。

本文件适用于马属动物马传染性贫血病血清抗体快速检测盒现场检疫。

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，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执行。

3 术语及定义

4 缩略语

- 4.1 BSA: 牛血清蛋白
- 4.2 EIA: 马传染性贫血病
- 4.3 EIA-Ag1 号: 马传染性贫血标记抗原
- 4.4 EIA-Ag2 号: 马传染性贫血包被抗原
- 4.5 NC 膜: 硝酸纤维素膜
- 4.6 PVC 胶板: 聚氯乙烯胶板

5 试剂与耗材

- 5.1 稀释液, 见附件 A. 1
- 5.2 1%柠檬酸三钠溶液, 见附件A. 2
- 5.3 1%碳酸钾溶液, 见附件 A. 3

- 5.4 10%BSA, 见附件 A.4
- 5.5 10%氯金酸溶液, 见附件 A.5
- 5.6 EIA 阳性血清
- 5.7 EIA 阴性血清
- 5.8 NC 膜
- 5.9 玻璃纤维膜
- 5.10 PVC 胶板

6 仪器与设备

- 6.1 台式冷冻离心机
- 6.2 2°C~8°C冰箱, -20°C冰箱。
- 6.3 PH 计
- 6.4 划膜喷金仪
- 6.5 单道微量移液器 (0.1 μ L~2.5 μ L; 0.5 μ L~100 μ L; 10 μ L~100 μ L; 200 μ L~200 μ L; 100 μ L~1000 μ L; 1000 μ L~5000 μ L)
- 6.6 试纸条斩切机
- 6.7 250ml 锥形瓶

7 检测原理

将胶体金标记的EIA-Ag1号与兔IgG固定于金标垫, 检测线为EIA-Ag2号, 对照线为羊抗兔IgG。检测时, 阳性样品中的EIA抗体与胶体金标记的EIA-Ag1号特异性结合, 在NC膜上移动时, 被检测线上的EIA-Ag2号捕获, 胶体金颗粒聚集于此, 形成红色的条带, 即为检测线。相反, 阴性样品中不含EIA抗体, 在检测线处不形成红色条带。对照线上的羊抗兔IgG与胶体金标记的兔IgG结合, 形成对照线。

8 免疫胶体金试纸卡的组装

8.1 胶体金溶液的制备

准确的量取100ml三级水, 置于锥形瓶中, 加热至沸腾。加入10%氯金酸溶液, 维持沸腾后, 加入1%柠檬酸三钠溶液, 继续加热5-10min观察溶液颜色, 当溶液颜色为红色且完全透亮后停止加热, 冷却至室温。放入4°C冰箱避光保存。

8.2 金标马传贫抗原及金标垫的制备

首先用1%碳酸钾溶液调节胶体金的pH值至弱碱性，向胶体金溶液中缓慢加入适量EIA-Ag1号，室温加入适量的兔IgG，搅拌后缓慢加入10%BSA使其最终浓度为0.9%，继续搅拌，将装有胶体金的离心管放入台式冷冻离心机，4℃16000r/min离心30min后，小心弃去上清，复溶后用划膜喷金仪将胶体金溶液喷于玻璃纤维膜上。37℃烘干12小时后于室温干燥保存备用。

8.3 检测线和对照线的制备

将NC膜贴在PVC胶板的中间部分室温保存备用。

用纯化的浓度为0.6mg/ml的EIA-Ag2号和羊抗兔IgG分别作为检测线和对照线试剂。用划膜喷金仪将两种试剂分别划在NC膜上。37℃烘干12小时后于室温干燥保存备用。

8.4 试纸卡的组装

按附录B图1所示，将贴有NC膜的PVC板和裁好的样品垫、吸水纸、金标垫粘在一起，并使用试纸条斩切机将其切成试纸条，将试纸条放入卡壳中。室温干燥保存备用。

9 样品采集、处理和保存

采集动物全血后，室温静置约30min，使血液自然凝固。5000×g离心10min，收集上清液转移至另一离心管中，于56℃水浴中作用30min后，待血清样品恢复室温后用于检测。血清样品也可放4℃暂时保存或者-20℃保存备用。

10 样品检测

10.1 样品稀释

分别用稀释液将EIA阳性血清、EIA阴性血清和待测血清样品稀释100倍，即向99μL稀释液加入1μL血清混匀。

10.2 试纸卡

打开试纸卡密封包装袋，检查试纸卡是否正常。如试纸条已变形、变色或受潮则不能使用。

10.3 检测

将试纸卡平放于操作台面，加样孔朝上，向加样孔中加入75μL 100倍稀释的血清样品，室温反应25min。

11 结果判定

参考附录B图2所示进行结果判定，如果对照线和检测线均显色，则为阳性，其中根据检测线深浅又分为强阳性、中阳性、弱阳性，颜色越深代表阳性越强；如果仅对照线显色，而检测线不显色，则为阴性；如果对照线不显色，则无论检测线显不显色，均为检测无效，应换用另一根试纸条再次检测。结果判定应为反应25min后的10min之内。

中国兽医协会
CVMA

附录 A

(规范性)

相关试剂的配制

A.1 稀释液

取磷酸二氢钠 5.8g，磷酸氢二钠 0.592g，氯化钠 8.5g，加入 1ml 蒸馏水中，充分震荡，使其完全溶解，并用 0.22 μ m 滤膜过滤。

A.2 1%柠檬酸三钠溶液

取二水合柠檬酸三钠 1.14g，加入 1ml 蒸馏水中，充分震荡，使其完全溶解，并用 0.22 μ m 滤膜过滤。该溶液需现用现配。

A.3 1%碳酸钾溶液

取碳酸钾 0.1g，加入 10ml 蒸馏水中，充分震荡，使其完全溶解，并用 0.22 μ m 滤膜过滤。该溶液需现用现配。

A.4 10%BSA

取 1gBSA 加入蒸馏水，定容至 10ml，并用 0.22 μ m 滤膜过滤。

A.5 10%氯金酸

取 1g HAuCl₄•4H₂O，加入 8.25ml 去离子水溶解，混匀。

附录 B

(规范性)

试纸条结构示意图和结果判定方法图

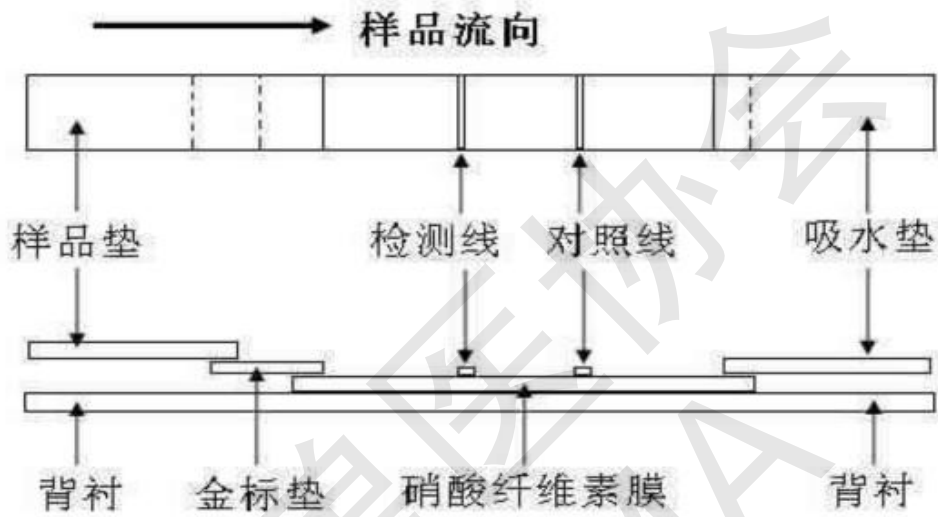


图 1: 胶体金试纸结构示意图

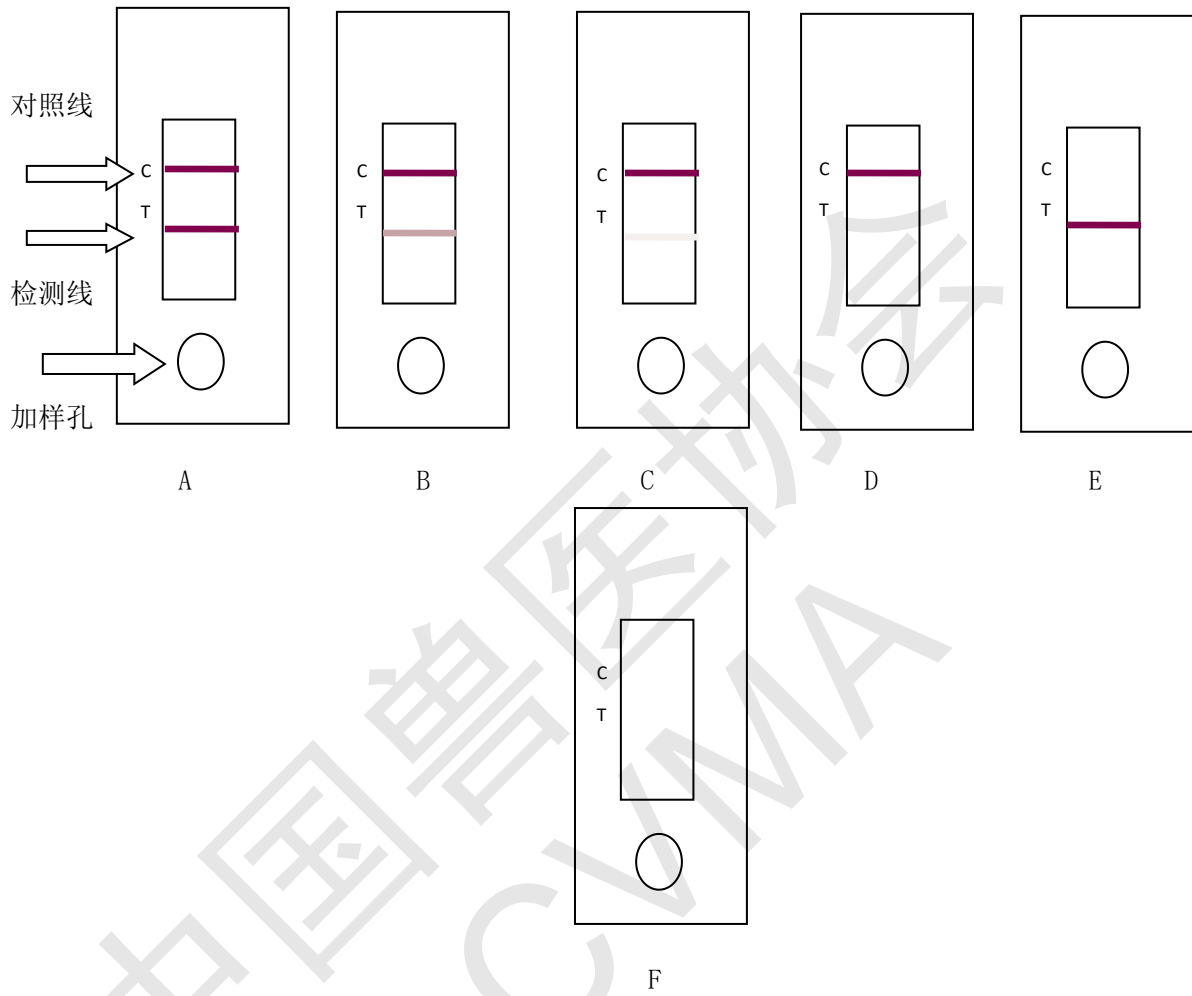


图 2：胶体金试纸条检测结果判定示意图

A: 强阳性 B: 中阳性 C: 弱阳性 D: 阴性 E、F: 失效

附 录 C

(资料性)

马传染性贫血概述

C.1 总则

马传染性贫血病，（Equine infectious anaemia）简称马传贫(EIA)，二类传染病、寄生虫病，由反录病毒科慢病毒亚科中的马传染性贫血病病毒引起的马、骡、驴传染病。其特征主要为间歇性发烧、消瘦、进行性衰弱、贫血、出血和浮肿；在无烧期间则症状逐渐减轻或暂时消失。

EIA 潜伏期一般为 1~3 周，有时能达到 3 个月。传染途径主要通过吸血昆虫（虻、刺蝇、蚊、蠓等）的叮咬，也可由被病毒污染的注射针头和诊疗器械等散播，微量病毒就能在易感动物中引起感染，经消化道的传染也有发生。仅能感染马属动物（马、骡、驴）。在自然条件下，以马的易感性最高，骡、驴次之。此外也曾有几例人感染此病的报道。发烧期的病马是最危险的传染源，其血液和脏器（肝、脾、骨髓、淋巴结等）含有大量病毒，常随同分泌物和排泄物排出体外而散播。慢性病马能长期甚至终身带毒。我国于 70 年代后期研制成功马传贫驴白细胞弱毒疫苗，经大规模野外接种试验，均取得较好效果。

C.2 临床症状

根据临床症状 EIA 分为三种：急性型、亚急性型、慢性型

急性型：马表现为高热稽留，常在 3-4 周内死亡，出现口渴、出虚、弱汗、抑郁症状。自然状况下可经常观察到舌下、鼻有瘀点，这是出血的表现，类似的出血可发生在外阴粘膜上。

亚急性型：间断性发烧，一个月 2-3 次，间期恢复到正常体温，这段时间可持续几周甚至几个月。

慢性型：体温升高更加缓慢，间期达到 1-3 月，甚至更长。马可能不表现出临床症状，并成为隐性携带者，体内长期带毒。阴性携带者在不利条件或者皮质类固醇的诱导下可表现出临床症状。

C.3 病理变化

急性型，主要表现出全身败血症变化，粘膜、浆膜出血，淋巴结、肝、脾充血肿大，肝切面呈槟榔状，

心脏呈水煮状，脾呈白髓颗粒状增生。亚急性型和慢性型，主要表现为网状内皮细胞增生，可视粘膜苍白，出血轻微，肝脏内见有多量吞铁细胞，心肌呈褐色煮熟状，脾脏肿大呈淡红色。慢性严重病例的骨髓呈乳白色胶冻状。

中国兽医协会
CVMA