ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA X—20XX

羊布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测方法

Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay Techniques for Caprine Brucella Antibody.

（征求意见稿）

中国兽医协会 CVMA

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》的规定起草。

本文件不涉及专利。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国兽医药品监察所、中国动物疫病预防控制中心、中国食品药品检定研究院。

本文件主要起草人：冯宇、毕一鸣、董浩、王传彬、张莹辉、蒋卉、彭小薇、丁家波、许冠龙、靳继惠、范学政、秦玉明。

中国兽医协会 CVMA

羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测方法

1 范围

本文件规定了羊布鲁氏菌间接ELISA抗体检测方法的试剂与耗材、仪器与设备、样品、试验步骤、试验数据处理。

本文件主要用于羊血清中光滑型布鲁氏菌（Brucella spp.）的抗体检测。

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 18646-2018 动物布鲁氏菌病诊断标准

世界动物卫生组织陆生动物手册—布鲁氏菌病（2018年版）

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。

布鲁氏菌 Brucella spp.

酶联免疫吸附试验 ELISA

5 试剂与耗材

5.1 抗原

商品化布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒或制备的抗原，抗原的提取和包被见附录1。

5.2 其他试剂

包被液、封闭液、稀释液、洗涤液、显色液、终止液的配制见附录2。

5.3 质控血清

布病阳性参考血清（羊源）和布病阴性参考血清（羊源）应使用国家动物布病参考实验室制备的血清。

6 仪器与设备

96 微孔聚苯乙烯板，单道移液器，多道移液器，灭菌移液器吸头，酶标仪或分光光度计（具备 450 波长或全波长滤光片），旋转振荡器，保湿盒，盖板，洗板机，37℃恒温培养箱等。

7 样品

羊血清，血清应清亮，无溶血。

8 试验步骤

8.1 布病阳性参考血清（羊源，1000IU）的稀释

布病阳性参考血清（羊源，1000IU）用布病阴性参考血清（羊源）作 1∶100、1∶400 倍稀释。

8.2 商品化试剂盒操作方法

如使用商品化布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒，应按试剂盒说明书要求进行操作。其中 1∶100、1∶400 倍稀释的布病阳性参考血清作为待检血清样品同时按照要求稀释。后续实验步骤按照说明书要求进行。

8.3 自行建立方法

如使用自行制备试剂盒，可按照下列步骤进行：

a) 加样 取抗原包被板（根据样品多少，可拆开分次使用），以洗涤液 300μL/孔洗板 1 次，弃去洗涤液。将稀释好的待检血清、阳性对照血清和阴性对照血清分别加入到 ELISA 板中，100μL/孔，其中阳性对照血清和阴性对照血清各加 2 孔（孔 1、孔 2）。加样结束后，37℃作用 30 分钟。取出反应板，弃去反应液，每孔加入 300μL 1×洗涤液，洗涤 3 次，最后 1 次甩干或拍干。

b) 加酶标抗体 将酶标抗体用稀释液作 1:200 稀释后，每孔加入 100μl，37℃作用 30 分钟。按 a)中的方法洗涤 3 次，甩干。

c） 显色与终止 将底物溶液 A 和 B 按 1：1（V/V）混合后，立即加入到 ELISA 反应板中，100μL/孔，室温避光显色 15 分钟后，每孔加 50μL 终止液终止反应。反应终止后，15 分钟内用酶标仪测定 OD450nm 值。

8.4 结果判定

8.4.1 商品化试剂盒应按说明书的结果判定要求进行结果判定。但同时需满足 1∶100 倍稀释的布病阳性参考血清（羊源）结果为阳性，1∶400 倍稀释的布病阳性参考血清（羊源）结果为阴性。

8.4.2 使用非商品化试剂盒，判定标准可按照自行建立的方法判定。但同时需满足 1∶100 倍稀释的布病阳性参考血清（羊源）结果为阳性，1∶400 倍稀释的布病阳性参考血清（羊源）结果为阴性。

中国兽医协会 CVMA

附录 1（规范性附录）

酶联免疫吸附试验包被抗原的提取及包被方法

H.1 试剂与材料

H.1.1 菌株：猪布鲁氏菌 S2 株。

H.1.2 苯酚溶液：称取 90 g 苯酚溶于 10 mL 水中，混匀。

H.1.3 乙酸钠甲醇溶液：5 mL 饱和乙酸钠溶液中加入 495 mL 甲醇，混匀

H.1.4 三氯乙酸

H.1.5 透析袋（截流量 10000 以下）

H.2 仪器

恒温水浴锅、转速可达到 10000 g 的低温离心机(4 ℃±1 ℃)、冰箱。

H.3 抗原提取

H.3.1 抗原提取

警示——以下操作应为在三级、四级生物安全实验室从事的高致病性病原微生物实验活动。遵从《病原微生物实验室生物安全管理条例》第二十一条

将灭活检验合格的菌悬液以 10000g 离心 20 分钟，收集沉淀。称量并计算菌体湿重，将菌体湿重按 1:3（W/W）比例加入灭菌蒸馏水中，充分混匀后，加热至 66℃，然后加入等体积 66℃预热的 90%（V/V）苯酚溶液。在此温度下（66℃）持续搅拌 15 分钟，置室温自然冷却后，置 4℃以 10000g 离心 15 分钟。用一长管吸取下层棕红色的酚相，用 Whatman 1 号滤纸过滤去除大菌体碎片。用量筒量取酚相体积，然后加入 3 倍体积 2～8℃预冷的甲醇（含 1%饱和醋酸钠冷甲醇），2～8℃孵育 2 小时，置 4℃以 10000g 离心 10 分钟，弃上清，将沉淀用原水相 1/2 体积蒸馏水重悬，4℃以 10000g 离心 10 分钟。收集上清溶液于 2~8℃保存。将沉淀再用等体积灭菌蒸馏水重悬，2～8℃再搅拌 2 小时，依上法离心获上清液，并与前述上清液混合。随后，在上清液中加入终浓度为 5%的三氯乙酸，室温搅拌 15 分钟后，10000g 离心 15 分钟，弃去沉淀，上清液用蒸馏水透析过夜，换液 2 次（每一次至少 4000mL），收集透析袋内容物，此即纯化的 LPS。

H. 3. 2 抗原的包被

以包被缓冲液将抗原稀释至 10μg/mL，加入到酶标板中，每孔 100μL，2～8℃包被 16 小时。以 1×洗涤液洗涤 1 次，每孔加入封闭液 200μL，2～8℃封闭 24 小时。以 1×洗涤液洗涤 1 次，在吸水纸上拍干，自然风干后备用。

中国兽医协会 CVMA

附录 2（规范性附录）

酶联免疫吸附试验用试剂配制

I.1 抗原包被缓冲液(0.05 mol/L 的 pH 9.6 碳酸盐缓冲液)

称取 2.93 g 碳酸氢钠，1.59 g 碳酸钠，0.2 g 叠氮钠溶于 1000 mL 蒸馏水中，混匀。121 ℃，30 min 高压灭菌，4 ℃冰箱保存备用，保存不超过 1 个月。

I.2 封闭液（1% BSA 的 0.01 mol/L 的 pH 7.2 磷酸盐缓冲液）

称取 1.4 g 磷酸氢二钠、0.20 g 磷酸二氢钾、8.50 g 氯化钠，量取 0.5 mL 吐温-20 溶于 1000 mL 蒸馏水中，混匀。121 ℃高压灭菌 30 min，待其冷却后加入 1%牛血清白蛋白，调节 pH 值至 7.2，4 ℃冰箱保存备用，保存不超过 1 个月。

I.3 样品稀释液(0.01 mol/L 的 pH 7.2 磷酸盐缓冲液 PBST1)

称取 1.4 g 磷酸氢二钠、0.20 g 磷酸二氢钾、8.50 g 氯化钠，量取 0.5 mL 吐温-20 溶于 1000 mL 蒸馏水中，混匀。调节 pH 值至 7.2，121 ℃高压灭菌 30 min，待其冷却后加入 0.5 mL 吐温-20，混匀，4 ℃冰箱保存备用，保存不超过 1 个月。

I.4 洗涤液(0.01 mol/L 的 pH 7.2 磷酸盐缓冲体系 PBST2)

称取 1.4 g 磷酸氢二钠溶于 1000mL 蒸馏水中，混匀。调节 pH 值至 7.2，121 ℃高压灭菌 30min，待其冷却后加入 0.1 mL 吐温-20，混匀，4 ℃冰箱保存备用，保存不超过 1 个月。

I.5 显色液（TMB 显色液）

A 液：13.6 g 醋酸钠、1.6 g 柠檬酸、0.3mL 30%过氧化氢，加蒸馏水定容至 500 mL。4 ℃冰箱保存备用。

B 液：0.2 g 乙二胺四乙酸二钠、0.95 g 柠檬酸、50 mL 甘油、0.2 gTMB，加蒸馏水定容至 500 mL。4 ℃冰箱保存备用。

使用时将 A、B 液 1:1 混合后使用。

I.6 终止液（1mol/L 的盐酸溶液）

取 96mL 浓盐酸溶液，加蒸馏水定容至 1000 mL，室温保存。