

团 体 标 准

T/CVMA 247—2025

猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白间接磁微粒 CLIA 抗体检测方法

Indirect magnetic particle based chemiluminescence immunoassay for
detecting antibodies against pseudorabies virus gE glycoprotein

2025-5-19 发布

2025-5-19 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA
全国团体

前 言

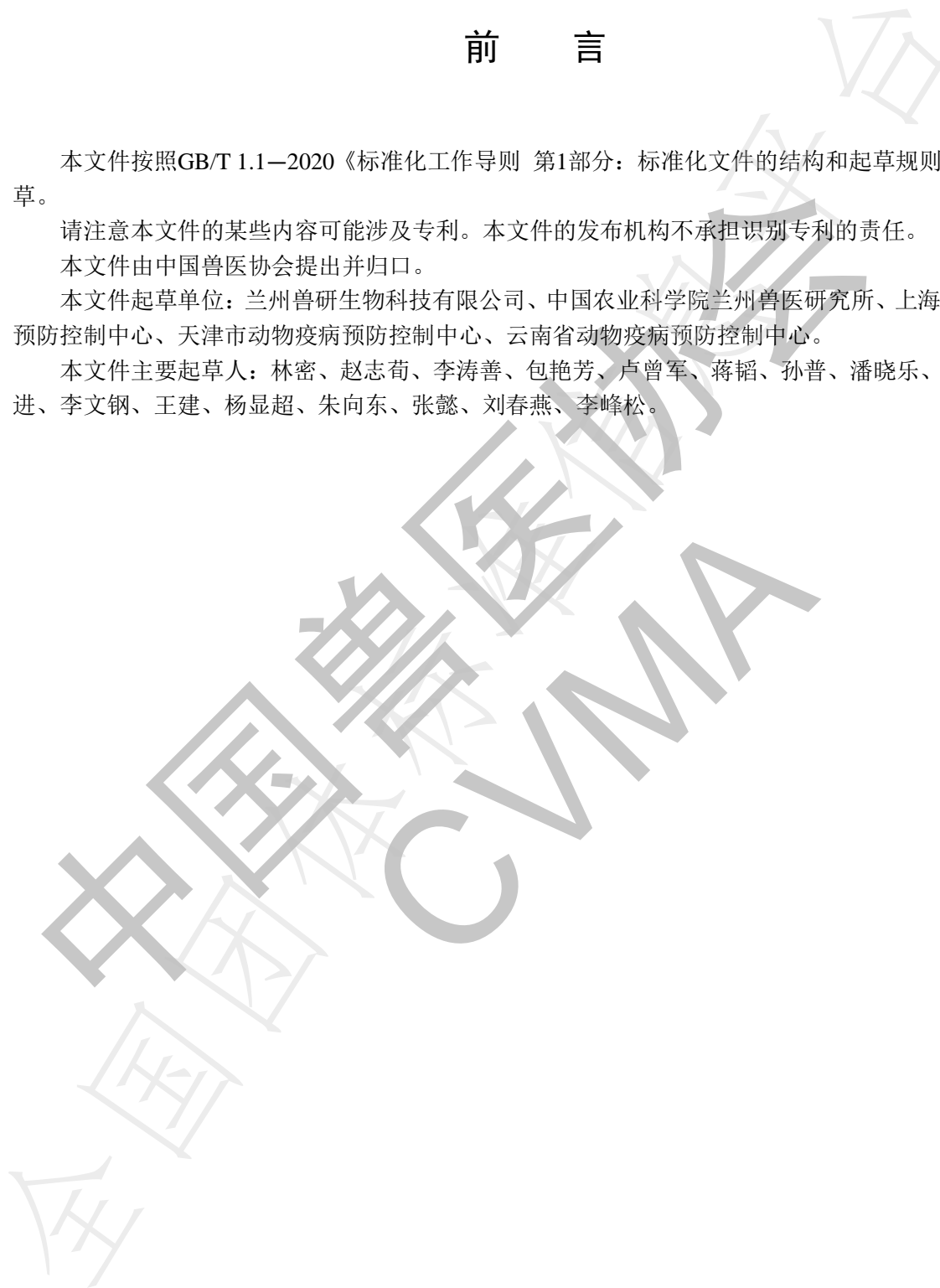
本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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：兰州兽研生物科技有限公司、中国农业科学院兰州兽医研究所、上海市动物疫病预防控制中心、天津市动物疫病预防控制中心、云南省动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：林密、赵志荀、李涛善、包艳芳、卢曾军、蒋韬、孙普、潘晓乐、李昕、赵洪进、李文钢、王建、杨显超、朱向东、张懿、刘春燕、李峰松。



中国兽医协会
CVMA
全国团体

猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白间接磁微粒 CLIA 抗体检测方法

1 范围

本文件描述了猪伪狂犬病病毒gE蛋白间接磁微粒CLIA抗体检测方法。
本文件适用于猪伪狂犬病病毒gE蛋白的抗体检测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 18641 伪狂犬病诊断方法
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）
RLU：相对发光值（Relative Light Unit, RLU）

5 试剂

5.1 25×浓缩洗液，按照附录A中的A.1配制。

5.2 稀释液，按照A.2配制。

5.3 磁微粒工作液（偶联猪伪狂犬病病毒gE蛋白的磁微粒悬浮液）。

5.4 酶标抗体工作液（碱性磷酸酶标记兔抗猪IgG）。

5.5 猪伪狂犬病病毒gE蛋白抗体工作校准品：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 U、10U、20 U、40 U、80 U、320 U，按照附录B制备。

5.6 猪伪狂犬病病毒gE蛋白抗体质控品：质控品1抗体含量<15 U，质控品2抗体含量为40 U~65 U，按照附录C制备。

5.7 化学发光底物。

6 仪器设备及耗材

本方法应准备仪器设备及耗材如下：

- 全自动化学发光免疫分析仪：磁微粒酶促化学发光检测设备；
- 电子天平：最大称量：Max=220 g；最小称量：Min=10 mg；显示分度值：d=0.1 mg；
- 离心机：最高转速：16000 r/min；
- 可调单道移液器（10 μ L ~ 100 μ L、100 μ L ~ 1000 μ L）；
- 1.5 mL/2 mL 离心管；
- 反应杯；
- 试剂船。

7 技术原理

本方法以磁微粒作为固相载体，在反应过程中形成磁微粒-抗原-抗体复合物，利用酶促化学发光作为免疫学反应的信号放大系统，读取发光值（RLU），通过四参数公式拟合的校准曲线计算猪伪狂犬病毒 gE 蛋白的抗体浓度。

8 检测前准备

8.1 样品采集及处理

样品采集按照NY/T 541的规定进行。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，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℃以下保存。血清样本运输时应注意2℃~8℃冷藏。

若样品中存在沉淀或絮状物等杂质，需8000 r/min，离心2 min后再进行检测。

8.2 溶液配制

8.2.1 洗液：将25 \times 浓缩洗液用无离子水或蒸馏水1:25倍稀释，装入洗液桶。

8.2.2 无离子水或灭菌蒸馏水应符合GB/T 6682的要求。

8.3 仪器准备

按全自动化学发光免疫分析仪器要求进行仪器准备。

8.4 试剂准备

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

9 操作步骤

9.1 检测步骤

9.1.1 取样品（工作校准品、质控品、待检样本）于1.5 mL/2 mL离心管中，置于专用样品架，设置测试样品信息，进行检测。

9.1.2 免疫反应：取20 μ L待测样本、25 μ L磁微粒工作液、55 μ L稀释液，分别加入反应杯中，37 $^{\circ}$ C孵育10 min；

9.1.3 清洗：使用磁铁吸附磁微粒30 s，使其聚集于管壁，弃去上清液。加入洗液300 μ L悬浮磁微粒，混匀30 s后吸附磁微粒，弃去洗液。重复清洗4次。

9.1.4 酶反应：取100 μ L酶标抗体工作液加入反应杯中，37 $^{\circ}$ C孵育10 min；

9.1.5 清洗：同步骤9.1.3

9.1.6 检测：加入化学发光底物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3 min，检测发光值（RLU）。

9.1.7 计算：将发光值（RLU）代入校准曲线，计算样本中的抗体含量。

9.2 质控

按9.1检测质控品，检测值在参考范围内，方可继续检测。

如下情况应检测质控血清：

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

9.3 校准曲线拟合

按9.1检测工作校准品1~工作校准品6，以工作校准品抗体含量（0 U、10 U、20 U、40 U、80 U、320 U）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，四参数按公式计算。

（ $Y=(a-d)/[1+(x/c)^b]+d$ ，其中：a表示反应的最大值； b表示曲线的斜率； c表示半效浓度； d表示反应的本底。）

校准曲线见附录D。

9.4 计算结果

检测完成后，将待检样本检测的发光值代入校准曲线，计算结果即为待检样本中猪伪狂犬病病毒gE蛋白抗体含量。

10 结果判定

10.1 质控血清参考范围

质控品 1 抗体含量 <15 U，质控品 2 抗体含量为 40 U~65 U，实验结果成立。

10.2 判定依据

若抗体含量 ≥ 35 U判为猪伪狂犬病病毒gE蛋白抗体阳性；若抗体含量 <35 U判为猪伪狂犬病病毒gE蛋白抗体阴性。

附 录 A
(规范性)
试剂的配制

A.1 25×浓缩洗液配制

将表A.1中的试剂依次加入烧杯中，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。

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

A.2 稀释液配制

将表A.2中的试剂依次加入烧杯中，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。

表A.2 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	0.20 g
吐温-20	0.50 mL

A.3 校准品稀释液配制

将表A.3中的试剂依次加入烧杯中，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。

表A.3 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	0.20 g
牛血清白蛋白	1.00 g
海藻糖	5.00 g
吐温-20	0.50 mL

附 录 B

(规范性)

猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体工作校准品制备

B.1 猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白高免血清制备

使用猪伪狂犬病病毒gE蛋白免疫3周-6周龄猪伪狂犬病病毒gE蛋白抗原、抗体检测均为阴性的猪，按500 ug/头份剂量，颈部肌肉注射接种。可进行3次~4次免疫，在初次免疫后21 d后进行加强免疫，14 d后检测抗体水平，如达不到要求，再进行第三次、第四次免疫。

抗体水平达到要求后，采集颈部静脉血，用自然析出法，3000 r/min离心10 min，分离血清，然后用0.22 μm滤器过滤除菌，加入proclin300，使终浓度为0.05 % (V/V)，分装，-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 18641中的猪伪狂犬病病毒gE-ELISA方法检测抗体水平，以检测样本为阳性的最大稀释滴度判为猪伪狂犬病病毒gE蛋白抗体水平。若抗体水平大于1:1024，则为合格的原始高免血清。

B.2 猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体工作校准品制备

用校准品稀释液梯度稀释 B.1 所制备的高免血清，按照 GB/T 18641 中的猪伪狂犬病病毒 gE-ELISA 方法检测，计算检测结果，定义 ELISA 检测阳性最大稀释滴度的稀释血清抗体含量为 40 U，若此血清为 1:1024 稀释，则 1:2048 稀释的血清为 20 U；1:512 稀释的血清为 80 U；依次类推。将校准品稀释液定义为 0 U，最终选择 0 U、10 U、20 U、40 U、80 U、320 U 分别为工作校准品 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。工作校准品-20 °C保存备用，36 个月内有效。

附 录 C
(规范性)

猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体质控品制备

取 B.1 所制备的猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白高免血清，用校准品稀释液稀释至抗体含量为 5 U、50 U，分别为猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体质控品 1、质控品 2，用猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白间接磁微粒 CLIA 抗体检测方法检测 5 次，计算平均值，质控范围为 $\text{Mean} \pm 3\text{SD}$ 。质控品 -20°C 保存备用，36 个月内有效。

附录 D
(资料性)
校准曲线实例参照

猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体检测校准曲线，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，R 值为 0.9999， R^2 为 0.999，相关性较好，如图 D.1 所示。其中标定 1~标定 6 的发光值范围如表 D.1 所示。

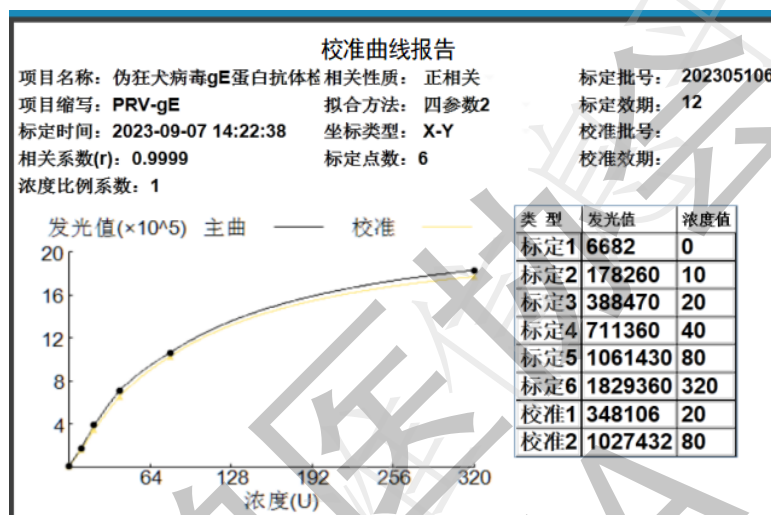


图 D.1 猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体检测校准曲线参考图

表 D.1 工作校准品标定发光值范围

名称	范围
标定 1	3270 ~ 9580
标定 2	145250 ~ 269450
标定 3	297800 ~ 428260
标定 4	601200 ~ 833320
标定 5	865050 ~ 1223400
标定 6	1389300 ~ 2085500