

团 体 标 准

T/CVMA 250—2025

猪伪狂犬病毒 gE 抗体竞争磁微粒化学发光 检测方法

Competitive magnetic particle based chemiluminescence immunoassay for
detecting gE antibodies against porcine pseudorabies virus

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

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：天津测易生物科技有限公司、内蒙古自治区动物疫病预防控制中心（内蒙古自治区兽药检验中心）、辽宁省动物疫病预防控制中心、天津市动物疫病预防控制中心、山东省动物疫病预防与控制中心（山东省人畜共患病流调监测中心）、北京市动物疫病预防控制中心、黑龙江省动物疫病预防与控制中心、新疆维吾尔自治区动物疫病预防控制中心（新疆维吾尔自治区动物检疫所）、新疆生产建设兵团畜牧兽医工作总站（兵团动物疫病预防控制中心、兵团兽药饲料监察所、兵团畜禽繁育改良总站、兵团草原工作管理总站、兵团草原监理站）、海南省动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：陈锡俊、孙伟珊、董建伟、赵秀英、李文钢、徐国栋、朱向东、王犇、王镇、兰邹然、张月、薛瑞雪、孔祥华、徐晓菲、陈伟、梅力、殷雨晴、程汝佳、沈光年、王林、李树博、兰德松、顾贵波、郭宇、萨茹拉、韩佳岐、刘然、云涛、张智杰、张加勇、张君、王新、郝晓芳、古丽曼·木哈买提拜、彭叶龙、美热木古丽·巴依待拉提、居马别克·夏拉巴依、李舵、马晓艳、古丽娜尔、关团、苏贵成、李杰、迟安庆、林明梓、章瑶、王璟。

中国兽医协会
CVMA

猪伪狂犬病毒 gE 抗体竞争磁微粒化学发光检测方法

1 范围

本文件描述了猪伪狂犬病毒gE抗体竞争磁微粒化学发光检测方法。
本文件适用于猪血清中伪狂犬病毒gE抗体的检测。

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。

AE: 吖啶酯 (Acridinium Ester)

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

PR: 伪狂犬病 (Pseudorabies)

PRV: 伪狂犬病毒 (Pseudorabies Virus)

RLU: 相对光单位 (Relative Light Unit)

5 技术原理

采用磁微粒化学发光—竞争法原理进行检测。链霉亲和素磁珠、生物素标记的抗原、AE标记的抗体和待检血清混合孵育，发生特异性免疫反应；加入化学发光底物，读取RLU。依据样本RLU与标准品RLU的对比，判定结果。发光强度与PRV-gE 抗体的含量成反比。

6 试剂与耗材

6.1 20×浓缩洗液，按照附录 A 中 A.1 配制。

6.2 校准品稀释液，按照 A.2 配制。

- 6.3 磁微粒工作液，含有偶联链霉亲和素的磁微粒的溶液。按照附录 B 中 B.1 配制。
- 6.4 抗原工作液，含有生物素标记的 PRV-gE 重组蛋白的溶液。按照 B.2 配制。
- 6.5 AE 抗体工作液，含有吖啶酯标记的 PRV-gE 单克隆抗体的溶液。按照 B.3 配制。
- 6.6 PRV-gE 抗体校准品，包括 6 个工作校准品，抗体含量分别为 3.125 U、25 U、100 U、400 U、1600 U、6400 U，其中抗体含量分别为 100 U 和 1600 U 的工作校准品也用作产品校准品 1~2 使用。按照附录 C 制备。
- 6.7 PRV-gE 抗体质控品，包括质控品 1 和质控品 2，质控品 1 抗体含量 ≤ 50 U，质控品 2 抗体含量范围为 280U~520U，按照附录 D 制备。
- 6.8 化学发光底物。
- 6.9 1.5 mL 尖底离心管。
- 6.10 2 mL 尖底离心管。
- 6.11 反应杯。
- 6.12 试剂船。
- 6.13 一次性采血器。

7 仪器与设备

- 7.1 全自动化学发光免疫分析仪。
- 7.2 电子天平，最大称量：Max=220g；最小称量：Min=10mg；显示分度值：d=0.1mg。
- 7.3 离心机，转速：12000 r/min。
- 7.4 可调单道移液器，量程为 20 μ L~200 μ L，100 μ L~1000 μ L。
- 7.5 恒温培养箱。

8 检测前准备

8.1 样品采集与处理

样品采集按照 NY/T 541 进行。采集静脉血后，将血样室温下倾斜 30° 静置 2 h~4 h，待血液凝固有血清析出时，无菌剥离凝血块，然后置 2℃ 冰箱过夜，待大部分血清析出后即可取出血清，必要时可低速离心（1000 g 离心 10 min~15 min）分离出血清。采集的血清样品在无法于 12 h 内送检的情况下，应放于 -20℃ 冻存。

血清样本运输时应注意 2℃~8℃ 冷藏。

样品检测前 3000 r/min 离心 2 min，取上清放于 1.5 mL 尖底离心管中，体积应大于 300 μ L，待检；若样品中存在沉淀或絮状物等杂质，应离心去除杂质，轻柔操作，避免出现泡沫。

8.2 溶液配制

洗涤液：将20×浓缩洗液用去离子水或蒸馏水1:20倍稀释，装入洗涤液桶。
去离子水或蒸馏水均应符合GB/T 6682的要求。

8.3 仪器准备

放置反应杯，扫描二维码导入反应程序、标准曲线及校准品信息，放置底物和系统维护液，开始自检。

9 操作步骤

9.1 装填试剂

将磁微粒工作液、抗体工作液、抗原工作液分别装入试剂船上对应试剂瓶中，磁微粒吹打混匀，试剂船瓶盖换为胶盖；将试剂船装入试剂仓中。

9.2 装填样本

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

9.3 免疫反应

取 25 μL待测样本，20 μL磁微粒工作液、50 μL抗体工作液、50 μL抗原工作液，分别加入反应杯中，37℃孵育 15 min。

9.4 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1×洗涤液300 μL悬浮磁微粒，混匀30 s后吸附磁微粒，弃去1×洗涤液。重复清洗3次。

9.5 检测 RLU

加入化学发光底物 100μL 于清洗后的反应杯中，混匀 30s 悬浮磁微粒，检测 RLU。

10 结果计算

10.1 标准曲线拟合

将PRV-gE 抗体工作校准品1~6放入样本架，按照 9 进行检测，检测完成后。以工作校准品抗体含量（3.125 U、25 U、100 U、400 U、1600 U、6400 U）为横坐标、相应检测RLU为纵坐标拟合四参数为标准曲线，四参数公式为（1），当 $R^2 \geq 0.99$ 时，可以用于结果计算和判定。

$$Y = \frac{a-d}{1+(\frac{x}{c})^b} + d \dots\dots\dots (1)$$

式中：

a ——当 x 趋近于负无穷时 Y 的极限值；

b ——斜率因子；

c ——拐点参数；

d ——当 x 趋近于正无穷时 Y 的极限值。

10.2 标准曲线校准

将PRV-gE 抗体产品校准品1和产品校准品2放入样本架，按照仪器说明书对标准曲线进行校准。
以下情况应先校准再进行检测：

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

10.3 质控

需要时检测质控品，检测值在参考范围内方可继续样品检测。

如下情况应检测质控品：

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

10.4 结果计算

待检样品检测RLU，代入标准曲线，计算结果即为待检样本中PRV-gE 抗体含量。

11 结果判定

11.1 质控血清参考范围

质控品1抗体含量 ≤ 50 U，质控品2抗体含量在280 U ~ 520 U范围内，实验结果成立。

11.2 阴阳性判定依据

抗体含量 ≥ 10 U时，判为PRV-gE 抗体阳性；抗体含量 < 10 U时，判为PRV-gE 抗体阴性。

附 录 A

(规范性)

试剂的配制

A.1 20×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。

表 A.1 20×浓缩洗液配方

名称	化学分子式	CAS 号	称量
磷酸氢二钠	Na_2HPO_4	7558-79-4	58 g
磷酸二氢钠	NaH_2PO_4	7558-80-7	5.92 g
氯化钠	NaCl	7647-14-5	170 g
吐温-20	$\text{C}_{58}\text{H}_{113}\text{O}_{26}$	9005-64-5	10 mL

A.2 校准品稀释液配制

按照表 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。

表 A.2 校准品稀释液配方

名称	化学分子式	CAS 号	称量
磷酸二氢钾	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26399-70-2	0.2 g
磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7558-79-4	2.9 g
氯化钠	NaCl	7647-14-5	8.0 g
氯化钾	KCl	7447-40-7	0.2 g
吐温-20	$\text{C}_{58}\text{H}_{113}\text{O}_{26}$	9005-64-5	0.5 mL
牛血清白蛋白	BSA	94349-60-7	10 g

A.3 PBS配制

按照表 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。

表 A.3 PBS 配方

名称	化学分子式	CAS 号	称量
磷酸二氢钾	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26399-70-2	0.2 g
磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7558-79-4	2.9 g
氯化钠	NaCl	7647-14-5	8.0 g
氯化钾	KCl	7447-40-7	0.2 g

A.4 CB溶液

称取1.59g碳酸钠(Na_2CO_3 , CAS号: 497-19-8)和2.93g 碳酸氢钠(NaHCO_3 , CAS号: 144-55-8), 加纯化水至900 mL, 调pH到9.6, 定容到1000 mL。121 °C, 0.1 MPa高压蒸汽灭菌20 min后, 置于室温保存备用。

A. 5 10%甘氨酸溶液

称取100g甘氨酸($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$, CAS号: 56-40-6), 加纯化水至900 mL, 定容到1000 mL。经0.22 μm 滤器过滤, 无菌分装, 置于2 °C ~ 8 °C保存备用。

附 录 B
(规范性)
工作液的制备

B.1 磁微粒工作液的制备

10 mg/mL的链霉亲和素磁微粒使用样品稀释液稀释40倍，混匀后，无菌分装，2℃~8℃保存。

B.2 抗原工作液的制备

制备前，取1 mg Biotin平衡至室温后加入180 μL超纯水，溶解混匀后，加入处理好的PRV-gE 重组蛋白13.5 mg，充分混匀后室温静置60 min。向超滤管中加入上述偶联液，PBS补齐至管顶的白线，12000 r/min，4℃离心10 min，弃掉废液，PBS洗三次，回收偶联液。将回收的偶联液转移至干净的离心管中，然后加入等体积甘油，记录终体积及终浓度，贴好标签，置于-20℃保存备用。

B.3 AE抗体工作液的制备

取7.89 mg处理好的(CB溶液溶解，2 mg/mL) PRV-gE 单抗，加入2 mg/mL的吡啶酯工作液180 μL，充分混匀，室温静置60 min。按照总体积1%的比例添加10% 甘氨酸，充分混匀，室温静置10 min，终止反应。向超滤管中加入上述偶联液，PBS补齐至管顶的白线，12000 r/min，4℃离心10 min，弃掉废液，PBS洗三次，回收偶联液。按85%的回收率计算质量。要求浓缩后的浓度在2 mg/mL ~ 4 mg/mL范围内。将回收的偶联液转移至干净的离心管中，然后加入等体积甘油，记录终体积及终浓度，贴好标签，置于-20℃保存备用。

附 录 C

(规范性)

PRV-gE 抗体工作校准品制备

C.1 PRV-gE 高免血清制备

使用 PRV-gE 疫苗免疫 3 周龄~6 周龄的猪,且确定免疫猪群是猪伪狂犬病毒 gE 和牛病毒性腹泻病毒抗原和抗体阴性,按照 500 µg/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 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 3 次、第 4 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 的猪伪狂犬病病毒 gE-ELISA (阻断法) 检测方法检测抗体水平,以检测样本为阳性的最大稀释滴度判断 PRV-gE 抗体水平。若抗体水平大于 1:4096,则为合格的原始高免血清。

C.2 PRV-gE 抗体工作校准品制备

校准品稀释液梯度稀释 C.1 所制备的高免血清,按照 GB/T 18641 的猪伪狂犬病病毒 gE-ELISA (阻断法) 检测方法检测,计算检测结果,定义 ELISA 检测的阳性最大稀释滴度的样本抗体含量为 10 U,若此份血清为 1:32 稀释,则 1:64 稀释血清为 5 U,依次类推,校准品稀释液为 0 U,最终选择 3.125 U、25 U、100 U、400 U、1600 U、6400 U 分别为工作校准品 1~6,稀释的工作校准品-20 °C 保存备用,36 个月内有效。

C.3 PRV-gE 抗体产品校准品制备

C.2 所制备抗体含量为 100 U 和 1600 U,分别为 PRV-gE 抗体产品校准品 1~2,产品校准品 -20 °C 保存备用,36 个月内有效。

附 录 D

(规范性)

PRV-gE 抗体质控品制备

D.1 PRV-gE 抗体质控品制备

取C.1所制备的PRV-gE 高免血清，用校准品稀释液稀释至抗体含量为12.5 U和400 U，分别为PRV-gE 抗体质控品1 和抗体质控品 2，用PRV-gE 抗体磁微粒化学发光免疫分析检测方法检测5次，计算平均值，质控范围为 $\text{Mean} \pm 3\text{SD}$ 。质控品-20℃保存备用，36个月内有效。