

团体标准

T/CVMA XXXXX—XXXX

猪瘟病毒竞争磁微粒 CLIA 抗体检测方法

Competitive magnetic particle based chemiluminescence immunoassay for
detecting antibodies against classical swine fever virus

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

目 录

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 符号和缩略语 1

5 试剂 1

6 仪器设备及耗材 2

7 技术原理 2

8 检测前准备 2

9 操作步骤 3

10 结果判定 4

附 录 A 5

附 录 B 6

附 录 C 7

参考文献 8

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：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

猪瘟病毒竞争磁微粒 CLIA 抗体检测方法

1 范围

本文件规定了猪瘟病毒竞争磁微粒 CLIA 抗体检测方法的试剂、仪器设备及耗材、技术原理、操作步骤、结果计算和判定的要求。

本文件适用于定量检测猪血清中针对猪瘟病毒的特异性抗体。

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
GB/T 35906 猪瘟抗体间接ELISA检测方法
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 符号和缩略语

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)
CSFV: 猪瘟病毒 (Classical Swine Fever Virus)

5 试剂

- 5.1 20×浓缩洗液，按照附录 A.1 配制
- 5.2 磁微粒工作液（偶联链霉亲和素的磁性微粒）。
- 5.3 校准品稀释液，按照附录 A.2 配制。
- 5.4 抗原工作液（生物素标记的 CSFV 重组蛋白）。
- 5.5 抗体工作液（吖啶酯标记的 CSFV 单克隆抗体）。

5.6 CSFV 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 3.125U、12.5 U、50 U、200 U、800 U、3200 U，按照附录 B 制备。

5.7 CSFV 抗体产品校准品

包括产品校准品 1 和产品校准品 2，抗体含量分别为 50 U 和 800 U，按照附录 C.1 制备。

5.8 CSFV 抗体质控品

包括质控品 1 和质控品 2，质控品 1 抗体含量 ≤ 20 U，质控品 2 抗体含量范围为 140 U~260 U，按照附录 C.2 制备。

5.9 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=220g；最小称量：Min=10mg；显示分度值：d=0.1mg；
- 离心机：最高转速：16000rpm；
- 可调单道移液器（0.1 μ L~2.5 μ L，2 μ L~20 μ L，20 μ L~200 μ L，100 μ L~1000 μ L）；
- 1.5 mL 尖底离心管；
- 反应杯；
- 试剂船。

7 技术原理

本方法采用磁微粒化学发光—竞争法原理进行检测。首先将链霉亲和素磁珠、生物素标记的抗原、吡啶酯标记的抗体和待检血清混合孵育，发生特异性免疫反应；然后加入化学发光底物，读取发光值。通过检测吡啶酯标记的抗体工作校准品拟合校准曲线，通过产品校准品校准曲线，将待测样本代入校准曲线计算血清中的抗体含量，判定结果。发光强度与猪瘟病毒抗体的含量成反比。

8 检测前准备

8.1 样品采集及保存

样品采集按照 NY/T 541 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，按照 GB 19489 样品处理的生物安全措施、实验室生物安全通用要求处理样本，若在一周内检测，可置 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 条件下保存，若超过一周检测，应置于-20 $^{\circ}$ C 以下冷冻保存。

血清样本运输时应注意冷藏。

8.2 样品处理

取 8.1 中的样品，8000 rpm，离心 2 min，取上清放于 1.5mL 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，轻微操作，避免出现泡沫。

8.3 溶液配制

洗涤液：将20×浓缩洗液用无离子水或蒸馏水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。

8.4 仪器准备

阅读全自动化学发光免疫分析仪说明书，放置反应杯，扫码放置化学发光底物、系统维护液，开始自检。

8.5 试剂准备

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，将磁微粒吹打混匀、试剂船瓶盖换为胶盖；将试剂船装入试剂仓中。

9 操作步骤

9.1 校准曲线拟合

将CSFV抗体工作校准品1~工作校准品6放入样本架，按照9.4进行检测，按9.5制作校准曲线。

9.2 校准曲线校准

将CSFV抗体产品校准品1和产品校准品2放入样本架，按仪器说明书对校准曲线进行校准。

以下情况应校准再进行检测：

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

9.3 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24 h需检测1次。

9.4 样品检测

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

整个检测过程在全自动化学发光免疫分析仪上进行，具体检测过程如下：

- a) 免疫反应：取 25 μ L 待测样本，20 μ L 磁微粒工作液、50 μ L 抗体工作液、50 μ L 抗原工作液，分别加入反应杯中，37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min；
- b) 清洗：使用磁铁吸附磁微粒 30s，使其聚集于管壁，弃去上清液。加入 1×洗涤液 300 μ L 悬浮磁微粒，混匀 30s 后吸附磁微粒，弃去 1×洗涤液。重复清洗 3 次。
- c) 检测：加入化学发光底物 100 μ L 于清洗后的反应杯中，混匀 30s 悬浮磁微粒，检测发光值(RLU)。
- d) 计算：将发光值 (RLU) 代入校准曲线，计算样本中 CSFV 抗体含量。

9.5 结果计算

检测完成后，以工作校准品抗体含量（3.125 U、12.5 U、50 U、200 U、800 U、3200 U）为横坐标、相应检测发光值为纵坐标拟合四参数为标准曲线，四参数公式为 $Y=(a-d)/[1+(x/c)*b]+d$ ，当 R^2 高于0.99时，可以用于结果计算和判定。将待检样品检测发光值代入校准曲线，计算结果即为待检样本中CSFV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 ≤ 20 U，质控品2抗体含量在140 U~260 U范围内，实验结果成立。

10.2 阴阳性判定依据

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

附 录 A

附 录 B（规范性附录）

试剂的配制

B.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	称量
磷酸氢二钠	58 g
磷酸二氢钠	5.92 g
氯化钠	170 g
吐温-20	10 ml

B.2 校准品稀释液配制

按表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	称量
磷酸二氢钾	0.24 g
磷酸氢二钠	1.44 g
氯化钠	8.0 g
氯化钾	0.2 g
吐温-20	0.5 ml
牛血清白蛋白	10 g

附录 C

附录 D（规范性附录）

CSFV 抗体工作校准品制备

D.1 CSFV高免血清制备

使用 CSFV 疫苗免疫 3~6 周龄的猪,且确定免疫猪群是 CSFV 和牛病毒性腹泻病毒抗原和抗体阴性,按 500 ug/头份剂量,颈部肌肉注射接种。可进行 3~4 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,再进行第三、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,3000rpm 离心 10 min,分离血清,然后用 0.22 μ m 滤器过滤除菌,加入 proclin300,使终浓度为 0.05 % (V/V),分装, -20 $^{\circ}$ 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 35906 的猪瘟抗体间接 ELISA 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 CSFV 抗体水平。若抗体水平大于 1:4096,则为合格的原始高免血清。

D.2 CSFV抗体工作校准品制备

校准品稀释液梯度稀释 B.1 所制备的高免血清,按照 GB/T 35906 的猪瘟抗体间接 ELISA 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、12.5 U、50 U、200 U、800 U、3200 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,稀释的工作校准品 -20 $^{\circ}$ C 保存备用,36 个月内有效。

附 录 E

附 录 F（规范性附录）

F.1 CSFV抗体产品校准品制备

取B.1所制备的CSFV高免血清，用校准品稀释液稀释至抗体含量为50 U和800 U，分别为CSFV抗体产品校准品1和产品校准品2，产品校准品 - 20 ℃ 保存备用，36个月内有效。

F.2 CSFV抗体质控品制备

取B.1所制备的CSFV高免血清，用校准品稀释液稀释至抗体含量为6.25 U和200 U，分别为CSFV抗体质控品1和质控品2，用CSFV抗体磁微粒化学发光免疫分析方法检测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。

参考文献

- [1] GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
 - [2] GB 19489 实验室 生物安全通用要求
 - [3] GB/T 35906 猪瘟抗体间接ELISA检测方法
 - [4] NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
-

中国兽医协会
CVMA