

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/HBAAV

河北省畜牧兽医学会团体标准

T/HBAAV XXXX—XXXX

生鲜牛乳中布鲁氏菌抗体 ELISA 检测技术 规程

ELISA Technical protocol for detection of antibodies to brucella in fresh raw milk

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

河北省畜牧兽医学会 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。

本文件由石家庄圣博生物科技有限公司提出。

本文件由河北省畜牧兽医学会归口。

本文件起草单位：石家庄圣博生物科技有限公司、河北省动物疫病预防控制中心、沧州市动物疫病预防控制中心、河北科技师范学院、唐山市动物疫病预防控制中心、唐山市动物检疫站、河北新世纪药业有限公司。

本文件主要起草人：王振华、韩庆安、张承礼、蒋桂娥、马宏伟、史秋梅、吴同垒、陈丽、董李学、张晓利、陶嵘、苏洪军、蔡敬、唐欣浩、廉改红、柴希曼、周红霞。

生鲜牛乳中布鲁氏菌抗体 ELISA 检测技术规程

1 范围

本文件规定了检测生鲜牛乳中布鲁氏菌抗体的术语、定义与缩略语、仪器、设备与试剂、生物安全措施、检验方法、结果判定的要求。

本文件适用于生鲜牛乳中布鲁氏菌抗体的检测。

检测技术规程应用间接酶联免疫吸附试验原理检测牛奶样品中布鲁氏菌抗体。

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 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 18646 动物布鲁氏菌病诊断技术

布鲁氏菌病防治技术规范（农医发【2007】12号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 布鲁氏菌病（Brucellosis）

又称布氏杆菌病、布病、波状热，是一种由布鲁氏菌（Brucella）引起的人畜共患传染病，该病可通过感染动物的排泄物传播至人类，通常由消化道、呼吸道、皮肤和黏膜接触等途径传播。该病属二类动物疫病，也是我国法定报告的乙类传染病。

3.1 生鲜牛乳（Fresh raw milk）

指由奶牛健康乳房中挤出的未经任何处理的新鲜乳汁。

4 缩略语

4.1 ELISA 酶联免疫吸附试验

4.2 PBST 含吐温-20的磷酸盐缓冲液

5 仪器、设备与试剂

5.1 仪器和设备

5.1.1 冰箱

5.1.2 恒温培养箱

5.1.3 洗板机

5.1.4 酶标仪

5.1.5 微量移液器

5.1.6 酶标板

5.1.7 移液器吸头

5.1.8 灭菌带盖塑料管

5.1.9 封板膜

5.1.10 吸水纸

5.2 试剂

除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂，水为灭菌双蒸水。

- 5.2.1 布鲁氏菌 LPS 抗原(见附录 A)
- 5.2.2 碳酸盐缓冲液(见附录 B)
- 5.2.3 PBST(见附录 B)
- 5.2.4 辣根过氧化物酶标记抗牛 IgG
- 5.2.5 TMB 显色液
- 5.2.6 2M 硫酸溶液
- 5.2.7 标准阴性血清
- 5.2.8 标准阳性血清
- 5.2.9 灭菌双蒸水

6 生物安全措施

为了保障实验室人员安全，应由具备资质的专业技术人员检测布鲁氏菌抗体，应规范操作，按照 GB 19489 中的有关规定进行。

7 检测方法

7.1 样品准备

采集新鲜牛奶样品约 2-3 毫升置于灭菌的带盖塑料管中，备用。

7.2 抗原包被板准备

7.2.1 以碳酸盐缓冲液按适宜浓度稀释布鲁氏菌 LPS 抗原，混合均匀，100 微升/孔加入酶标板中，置于 37℃ 恒温培养箱，温育 2 小时。

7.2.2 以 PBST 洗板 3 次，吸水纸上拍干，备用。

7.3 样品检测

7.3.1 加样

设空白对照孔一孔，不加液体；阳性对照孔、阴性对照孔各 2 孔，分别加入阳性对照、阴性对照 100 μ l；检测孔每孔依次加入牛奶样品稀释液 80 μ l、待检牛奶样品 20 μ l，轻轻振荡混匀。

7.3.2 温育

贴封板膜后置 37℃ 恒温培养箱，温育 10 分钟。

7.3.3 洗板

以 PBST 加入酶标板 300 μ l/孔，浸泡 20-30 秒，弃掉液体，重复 5 次，最后在吸水纸上拍干。

7.3.4 加酶工作液

每孔加酶工作液 100 μ l（空白对照孔除外），贴封板膜。

7.3.5 温育

置 37℃ 恒温培养箱，温育 30 分钟。

7.3.6 洗板

以 PBST 加入酶标板 300 μ l/孔，浸泡 20-30 秒，弃掉液体，重复 5 次，最后在吸水纸上拍干。

7.3.7 显色

每孔加入显色液 100 μ l，轻轻振荡混匀，贴封板膜。

7.3.8 温育

置 37℃ 恒温培养箱，避光温育 10 分钟。

7.3.9 终止反应

每孔加 2M 硫酸溶液 50 μ l，轻轻振荡混匀。

7.3.8 读取结果

用酶标仪 450nm 波长(可用 630nm 作参比波长)测定 OD 值（以空白孔调零），读取结果。

7.4 结果判定

7.4.1 判定标准

7.4.1.1 $N < 0.3$ ，且 $P \geq 0.5$ ，否则需重新试验。

7.4.1.2 S/P 值 = $(S - N) / (P - N)$ 。

7.4.1.3 S/P 值 < 0.21 ，判定为阴性； $0.21 \leq S/P$ 值 < 0.45 判定为可疑； S/P 值 ≥ 0.45 ，判定为阳性。

S: 样品 OD 值, N: 阴性对照平均 OD 值, P: 阳性对照平均 OD 值

7.4.2 可疑结果的处理

对检测结果可疑的样品, 应追溯该样品对应的奶牛, 15 天后再次采集牛奶样品进行复检, 如结果仍为可疑, 则判定为阳性。

河北省畜牧兽医医学

附录 A
(资料性附录)
布鲁氏菌 LPS 抗原

- A. 1 将灭活检验合格的布鲁氏菌悬液 9000g 离心 10min, 弃上清。
- A. 2 对湿菌进行称重, 每 50g 湿菌加入 170ml 蒸馏水, 混匀后加热 66℃, 再加入 190ml 66℃的 90% (V/V) 的苯酚溶液。
- A. 3 在 66℃搅拌 15min, 置室温自然冷却后, 2-8℃ 10000g 离心 15min。
- A. 4 用长吸管吸取位于下层的酚相, 加入 500ml 含 1%饱和醋酸钠的冷甲醇, 2-8℃沉淀 2h 后 10000g 离心 15min, 弃去上清。
- A. 5 沉淀中加 80ml 蒸馏水, 2-8℃搅拌 18h, 10000g 离心 10min, 收集上清。
- A. 6 沉淀中继续加入 80ml 蒸馏水, 2-8℃搅拌 2h, 10000g 离心 15min, 收集上清, 与 A. 5 步骤中的上清合并。
- A. 7 在 160ml 上清中加入 8g 三氯乙酸, 搅伴 10min, 10000g 离心 15min, 取上清。
- A. 8 用蒸馏水 4000ml 透析 3h, 透析 4 次, 即得到布鲁氏菌 LPS 抗原。

附录 B
(资料性附录)
试剂

B.1 碳酸盐缓冲液

碳酸钠	0.159g
碳酸氢钠	0.293g
双蒸水定容至	100mL

B.2 PBST

磷酸氢二钠 (十二水合物)	3.6g
磷酸二氢钾	0.3g
氯化钠	9.0g
氯化钾	0.2g
Tween-20	0.5mL
双蒸水定容至	1000mL