

团 体 标 准

T/CVMA 172—2024

猪繁殖与呼吸综合征病毒磁微粒化学发光 抗体检测方法

Magnetic particle chemiluminescent immunoassay detection of antibodies
against porcine reproductive and respiratory syndrome virus

2024-7-4 发布

2024-7-4 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

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。

本文件由洛阳现代生物技术研究院有限公司提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：洛阳现代生物技术研究院有限公司、洛阳莱普生信息科技有限公司、西南民族大学、河南科技大学、许昌市动物疫病预防控制中心、西藏自治区动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：王善普、汤承、李玉婉、岳华、张鹏翼、田中、董海岚、郭晓波、秦保亮、杨涛、王大民、马健、杜伟国、王润清、李歌、德吉玉珍、格桑央宗、边巴央拉、扎西卓玛、卓玛央吉、龚彦、姜利英、王留幸、韩妙层。

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

猪繁殖与呼吸综合征病毒磁微粒化学发光抗体检测方法

1 范围

本文件规定了猪繁殖与呼吸综合征病毒磁微粒化学发光抗体检测方法的试剂耗材与仪器设备、技术原理、实验前准备、操作步骤、试验成立条件、结果计算及判定标准等内容。

本文件适用于猪血清中猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的检测,用于猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体的免疫筛查、辅助诊断。

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

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

化学发光免疫分析 chemiluminescence immunoassay; CLIA

将化学发光系统与免疫反应相结合,用发光相关的物质标记抗体或抗原,与待测的抗原或抗体反应后,经过分离游离态的发光标记物,加入发光系统的其它相关物产生化学发光,进行抗原或抗体的定量或定性检测。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CLIA: 化学发光免疫分析 (chemiluminescence immunoassay)

PRRSV: 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus)

HRP: 辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase)

RLU: 相对光单位发光值 (Relative Light Unit)

EDC: 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (碳化二亚胺) [1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride]

5 技术原理

本文件采用磁微粒化学发光--间接法原理。用猪繁殖与呼吸综合征病毒NSP2重组蛋白包被磁微粒，HRP标记羊抗猪IgG制备酶标二抗，待测样本中的抗体与酶标二抗结合形成抗原--待检抗体-酶标二抗复合物，该复合物催化发光底物液发出光子，发光强度与待测抗体的含量成正比。根据样本发光值与阳性对照发光值的比值，判断猪繁殖与呼吸综合征抗体水平，比值越大，说明样本猪繁殖与呼吸综合征抗体水平越高；比值越小，说明样本中猪繁殖与呼吸综合征抗体水平越低。

6 试剂与耗材

- 6.1 包被磁微粒混悬液，按照附录 A 制备。
- 6.2 酶标二抗（HRP 标记羊抗猪 IgG）。
- 6.3 相关试剂的配制，按照附录 B 配制。
- 6.4 阳性对照和阴性对照的制备，按照附录 C 制备。
- 6.5 全自动化学发光免疫分析仪。
- 6.6 可调单道移液器（0.5 μL~20 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1000 μL）。
- 6.7 一次性采血器（5 mL、10 mL）。
- 6.8 离心机（15000 r/min）。
- 6.9 顶入式搅拌器。
- 6.10 恒温摇床。

7 实验前准备

7.1 样品采集及处理

按照NY/T 541中规定进行样品的采集与处理，期间做好个人防护。按常规方法抽取2 mL~3 mL血液置洁净干燥的试管中，静置约60 min，待血液凝固后4000 r/min离心10 min（也可将血液样本静置约120 min，待血液凝固自然析出血清），分离血清。血清清亮，无溶血、无污染。

7.2 血清样品的存放与运输

按照NY/T 541中规定进行血清样品的存放与运输。血清样本若在一周内检测，置2℃~8℃条件下保存。若超过一周检测，置于-20℃以下冷冻保存。运输时注意冷藏，确保样品清亮无污染。采集的血清样本可用冰袋或保温桶加冰密封等方式运输。按照GB 19489中的规定进行样品的生物安全标识。

8 操作步骤

8.1 样品准备

将待检样品从2℃~8℃或-20℃冰箱取出，静置至室温。

8.2 仪器准备

参照磁微粒化学发光仪器系统操作说明，按设定的反应程序设置仪器参数，将分装有1×浓缩洗涤液、酶结合物、发光底物A和发光底物B的试剂瓶分别插入仪器相应试剂孔位置。开机自检，待仪器自检、管路清洗1次、底物灌注完成后，方可进行样本检测。

8.3 加样

在样本架上依次加入阴、阳性对照和待检样本，加样量均为20 μL/孔。当次猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体检测时，只需要在第一次加样检测时加入阴、阳性对照，直至本次检测结束。试剂成分发生改变或检测疫病种类发生改变时需重新检测阴、阳性对照。

8.4 仪器检测

将阴、阳性对照和待检样本的样本架放入仪器样本仓，选择“PRRS”项目，点击“开始”按钮进行检测。加样后反应步骤均在全自动化学发光免疫分析仪上自动完成，具体程序如下：

- a) 样品稀释。用样品稀释液进行10倍稀释。
- b) 加磁微粒混悬液。每孔分别加入磁微粒混悬液 20 μL。
- c) 孵育。混匀后37 °C温育20 min。
- d) 洗涤。使用磁铁吸附磁微粒10 s，使其聚集于孔壁，弃去上清液。加入洗涤液300 μL悬浮磁微粒混匀5s后吸附磁微粒，弃去洗涤液。重复清洗4~5次。
- e) 加酶。每孔分别加入酶结合物 50 μL。
- f) 孵育。混匀后37 °C温育20 min。
- g) 洗涤。使用磁铁吸附磁微粒10 s，使其聚集于孔壁，弃去上清液。加入洗涤液300 μL悬浮磁微粒，混匀5s后吸附磁微粒，弃去洗涤液。重复清洗4~5次。
- h) 显色。每孔加入发光底物A 和发光底物B各50 μL，混匀10 s悬浮磁微粒，37 °C反应15min检测发光值(RLU)。
- i) 读值。检测完成后，仪器自动计算并读取数据结果，打印报告。如本次检测完毕则清空废液、废料桶，管路清洗后关闭电源。

9 试验成立条件

阳性对照平均发光值 $\geq 5 \times 10^5$ RLU，且阴性对照平均发光值 $< 5 \times 10^3$ RLU，则实验成立。

10 结果计算

$S/P = \text{待检样本发光值} / \text{阳性对照平均发光值}$ 。

11 判定标准

$S/P \geq 0.4$ ，为猪繁殖与呼吸综合征抗体阳性； $S/P < 0.4$ ，为猪繁殖与呼吸综合征抗体阴性。

附录 A
(规范性)
包被磁微粒混悬液的制备

A.1 活化

取1 mL磁微粒原液进行磁分离至上清澄清，弃去上清；移液器移取1 mL磁微粒洗涤液加入反应容器内，将反应容器内的磁微粒用顶入式搅拌器以100 r/min搅拌5 min混合均匀，重复洗涤3次，最终进行磁分离至上清澄清，弃去上清。

加入1 mL 4 mg/mL EDC活化剂溶液，盖紧瓶盖/容器封口，室温条件下摇床温育反应60 min。

A.2 洗涤

将反应容器进行磁分离至上清澄清，弃去上清；移液器精确移取4 mL包被缓冲液加入反应容器内，以100 r/min洗涤10 min，重复洗涤3次，最终进行磁分离至上清澄清，弃去上清。

A.3 包被

先加入10 mL包被缓冲液，将反应容器内的磁微粒以100 r/min搅拌5 min，以1 μ g/mL的包被量加入猪繁殖与呼吸综合征病毒NSP2重组蛋白包被抗原。盖紧瓶盖/容器封器，2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C条件下反应120 min。

A.4 封闭

将反应容器进行磁分离至上清澄清，弃去上清；移液器精确移取4 mL磁微粒洗涤液加入反应容器内；以100 r/min洗涤10 min，然后进行磁分离至上清澄清，弃去上清。移液器精确移取4 mL磁微粒封闭液加入反应容器内；以100 r/min混合15 min，最终进行磁分离至上清澄清，弃去上清。

A.5 制备后储存

准确量取磁微粒保存液100 mL加入反应容器内，以100 r/min混合5 min。盖紧瓶盖/容器封口，贴上标示签，然后置于2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C贮存。

附录 B
(规范性)
试剂的配制

B.1 磁微粒保存液

称取磷酸氢二钠（十二水）2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8 g、氯化钾 0.2 g，加纯化水定容至 1000 mL，测 pH 为 7.4 ± 0.2 ，备用。

取 800 mL 制备好的磷酸盐缓冲液（ $\text{pH} 7.4 \pm 0.2$ ），加入 10 g 牛血清白蛋白，搅拌均匀后定容至 1000 mL， $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

B.2 对照品稀释液

称取磷酸氢二钠（十二水）2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8 g、氯化钾 0.2 g、海藻糖 10g，加入 800 mL 纯化水搅拌溶解，再称取牛血清白蛋白 15 g 加入，而后加纯化水定容至 1000 mL，过滤除菌，无菌定量分装， $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

B.3 1×洗涤液

称取磷酸氢二钠（十二水）72.5 g、磷酸二氢钾 5 g、氯化钠 200 g、氯化钾 5 g，加纯化水 800 mL，加入 25 mL 吐温-20，再加纯化水定容至 1000 mL，即为 25 倍浓缩洗涤液， $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。将 25 倍浓缩洗涤液用纯化水作 1:25 倍稀释，即为工作用稀释液。

B.4 酶结合物稀释液

称取磷酸氢二钠（十二水）2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8 g、氯化钾 0.2 g，加入 800 mL 纯化水搅拌溶解，再称取牛血清白蛋白 15 g 加入，而后加纯化水定容至 1000 mL，过滤除菌，无菌定量分装， $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

B.5 酶结合物

将 HRP 标记的羊抗猪 IgG 制备酶标二抗，用酶结合物稀释液按照 1:1500 进行稀释，加入 0.01% 的胭脂红色素，搅拌均匀，经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌，无菌定量分装，置 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

B.6 发光底物A

称取 24.23 g Tris 溶于 800 mL 纯水中，充分搅拌均匀，使用盐酸调节 pH 至 8.0。加入 0.026 g 鲁米诺干粉，待其完全溶解后，加纯化水定容至 1000 mL， $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

B.7 发光底物B

称取 15.42 g 醋酸铵溶于 800 mL 纯水中，使用冰醋酸调 pH 值至 5.2，待其完全溶解后，加纯化水定容至 1000 mL， $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

附录 C

(规范性)

阳性对照和阴性对照的制备

C.1 阳性对照的制备

用猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗免疫猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阴性健康猪，耳根后肌肉注射，首次免疫28日后进行第二次免疫，免疫剂量均为2 mL/头。二次免疫2周后静脉采血，分离血清，经检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体为阳性，则可经前腔静脉大量采血分离血清。将分离的血清经56 °C水浴灭活30 min后，经0.22 μm滤器过滤除菌，按血清量的0.04%加入Proclin-300防腐，无菌分装，作为阳性对照，置2 °C~8 °C保存备用。

C.2 阴性对照的制备

挑选猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阴性健康猪，经前腔静脉大量采血分离血清。将分离的血清经56 °C水浴灭活30 min后，按血清量的0.04%加入Proclin-300防腐，经0.22 μm滤器过滤除菌，无菌分装，作为阴性对照，置2 °C~8 °C保存备用。