

ICS 11.220

B 41

团 体 标 准

T/CVMA X12—2020

布鲁氏菌抗体荧光层析（鉴别）检测方法

TRFIA for detection of antibodies against Brucella

（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

20XX-XX-XX 发布

20XX - XX-XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

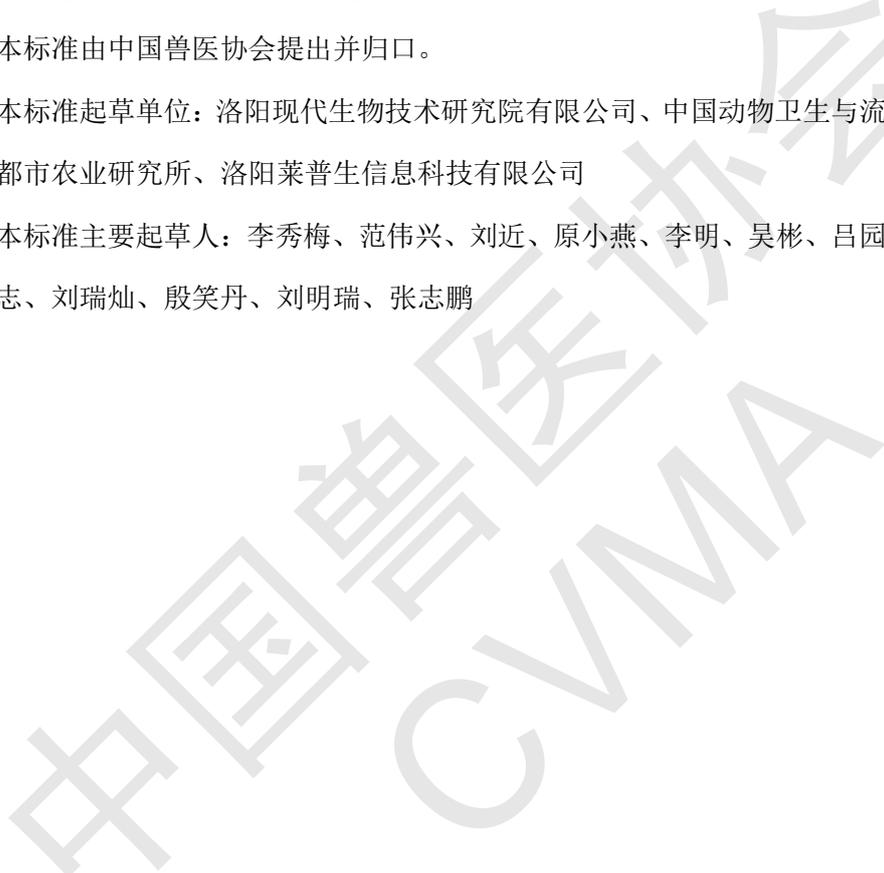
本标准按 GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：洛阳现代生物技术研究院有限公司、中国动物卫生与流行病学中心、中国农业科学院都市农业研究所、洛阳莱普生信息科技有限公司

本标准主要起草人：李秀梅、范伟兴、刘近、原小燕、李明、吴彬、吕园园、耿玉静、杨菁芳、杨志、刘瑞灿、殷笑丹、刘明瑞、张志鹏



布鲁氏菌抗体荧光层析（鉴别）检测方法

1 范围

本标准规定了布鲁氏菌荧光微球抗体（鉴别）检测试纸检测布鲁氏菌抗体的检测方法。本标准适用于以布鲁氏菌LPS抗原和NH抗原为主要活性材料制成的布鲁氏菌荧光微球抗体（鉴别）检测试纸，用于检测动物全血或血清中的布鲁氏菌抗体，可用于区分动物全血或血清中的布鲁氏菌S2疫苗免疫或自然感染产生的抗体，用于动物种群布鲁氏菌免疫或感染的筛查、辅助诊断等。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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实验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 实验原理

采用时间分辨荧光免疫层析试验（TRFIA）原理制成，样本加入到加样孔后与荧光微球标记物一起沿层析膜移动，若样本中存在布鲁氏菌免疫抗体则与荧光微球标记物及检测线（T1）上的抗原结合而产生荧光值；若样本中存在布鲁氏菌感染抗体则与荧光微球标记物及检测线（T1 和 T2）上的抗原结合而产生荧光值；若样本中不存在布鲁氏菌免疫抗体和布鲁氏菌感染抗体则不产生荧光值。

4 试剂与耗材

4.1 S-LPS抗原，见附录A.1。

警示—以下操作应为在三级及以上生物安全实验室从事的高致病性病原微生物实验活动。遵从《病原微生物实验室生物安全管理条例》。

4.2 NH 抗原, 见附录 A.2.

警示—以下操作应为在三级及以上生物安全实验室从事的高致病性病原微生物实验活动。遵从《病原微生物实验室生物安全管理条例》。

4.1 样品稀释液, 见附录 B.1。

4.2 MES 缓冲液, 见附录 B.2。

4.3 EDC 缓冲液, 见附录 B.3。

4.4 标记缓冲液, 见附录 B.4。

4.5 封闭液, 见附录 B.5。

4.6 硼酸缓冲液, 见附录 B.6。

4.7 1% 胭脂红色素, 见附录 B.7。

4.8 PB, 见附录 B.8。

4.9 标准阴性血清, 布鲁氏菌S2疫苗免疫阳性血清, 标准布鲁氏菌感染阳性血清, 见附录B.9。

5 仪器与设备

5.1 便携式免疫荧光分析仪

5.2 10 μL 微量毛细管

5.3 微量移液器 (1~10 μL 、20~200 μL 、100~1000 μL)

5.4 检测卡, 见附录 A。

6 操作步骤

6.1 样品采集

采集静脉血时, 每只动物使用一个注射器。进行静脉无菌采血, 按常规方法抽取 2~3 mL 血液置洁净干燥的试管中, 静置约 1 h 待血液凝固后于 4000 r/min 离心 10 min (也可将血液样本静置约 2 h, 待血液凝固自然析出血清), 分离血清。要求血清清亮, 无溶血、无污染。

若无上述条件分离血清, 可直接用全血检测。

6.2 仪器的准备

打开便携式荧光免疫分析仪, 选择待检项目; 结果如需打印, 同时打开蓝牙打印机, 并与便携式荧光免疫分析仪连接成功。

6.3 样品稀释

将微量毛细管取 10 μL 全血或血清样本加入到已备好的样本稀释液管中混匀, 稀释后的样品需在 1h 内完成检测。

6.4 样品检测

6.4.1 取检测卡

将恢复至室温的试纸卡从铝箔包装中取出，将检测卡放于平整、洁净的台面上。

6.4.2 加样及孵育

用配套吸管吸取已稀释好的样本，垂直而缓慢的滴加 2~3 滴（约 80 μ L）到加样孔内，室温下放置 10~15min。

6.4.3 仪器检测读数

将检测卡放入便携式荧光免疫分析仪检测，5min 内完成读值。

7 实验成立条件

7.1 阴性

用标准阴性血清检测，T1/C 值 < 0.1 时，试验成立。

7.2 阳性

用标准布鲁氏菌 S2 疫苗免疫阳性血清检测，T1/C 值 ≥ 0.2 且 T2/C 值 < 0.1 时，试验成立；用标准布鲁氏菌感染阳性血清检测，当 T1/C 和 T2/C 值均 ≥ 0.1 时，试验成立。

8 结果判定标准

8.1 当 T1/C 值 < 0.1 时，判为阴性。

8.2 当 T1/C 值 ≥ 0.1 且 T2/C 值 < 0.1 时，判为布鲁氏菌疫苗免疫抗体阳性；

8.3 当 T1/C 和 T2/C 值均 ≥ 0.1 时，判为布鲁氏菌感染抗体阳性。

附录 A

(规范性附录)

布鲁氏菌荧光微球抗体（鉴别）检测卡制备

A.1 S-LPS 抗原制备

用超纯水重悬 16M 布鲁氏菌,加热至 66°C;同时将等体积的 90%酚水溶液加热到 66°C;将菌液与酚水混合,66°C搅拌 20min;4°C冷却,10000g 离心 125min;将含有脂多糖的上清于室温静置 24h,回收酚相(底层)并过滤,加入 3 体积的饱和醋酸钠 1%甲醇液,4°C沉淀 2h;10000g 离心 15min,蒸馏水重悬沉淀,室温孵育 2.5h;4°C 10000g 离心 15min,上清液保留;沉淀加入蒸馏水搅拌 1h,4°C 10000g 离心 15min;收集上清液,与上述保留的上清液混合,0.45 μ m 滤器过滤;加入三氯乙酸终浓度为 50mg/ml,室温孵育 10min;10000g 离心 15min,上清透析、冻干、称重后备用。

A.2 NH 抗原制备

16M 布鲁氏菌液,离心后经超纯水重悬;120°C高压 30min,8000g 离心 30min,取上清;上清与乙醇 1:3 混合,4°C过夜,5000g 离心 10min;上清与乙醇 1:2 混合,-20°C过夜,5000g 离心 10min;沉淀经超纯水重悬,核酸酶(浓度为 50 μ g/ml 的 DNaseII type V、RNase A)37°C处理 18h;蛋白酶 K (50 μ g/ml)55°C1h,25°C 24h,处理 3 次;200000g 超速离心 6h,上清与苯酚 1:1 混合,70°C处理 30min;8000g 离心 15min,酚相经滤器过滤除杂质,与乙醇 1:3 混合,-20°C过夜,5000g 离心 10min;上清与乙醇 1:4 混合,-20°C过夜,5000g 离心 10min;沉淀经超纯水重悬后,透析、冻干、称重后备用。

A.3 LPS 和 NH 抗原与 BSA 的偶联方案

首先,称取 5g 无水硫酸钠,加入到 5ml 吡啶中,密封静置 5 个小时。其次,分别取 100 μ l 吡啶溶解 2mgNH 和 5mgLPS,溶解后,震荡混匀。然后,称取 20mg 琥珀酸酐加入 400 μ l 无水吡啶溶解,溶解完毕后,分别取 200 μ l 加入到溶解好的 NH 和 LPS 中,震荡混匀,然后把瓶子密封,抽真空。沸水浴 120min。沸水浴完后,抽真空干燥,然后加入 1000 μ l 氯仿震荡溶解,然后加 1ml 纯水剧烈震荡,吸出上层水相。重复此步骤四次,把吸出的水相进行合并,然后真空抽干。再称取 11.5 mg (100 μ mol) N-hydroxysuccinimide,加入 1ml 二甲基甲酰胺溶解,称取 21 mg (100 μ mol) of DCC 加入 1mL 二甲基甲酰胺溶解,分别吸取 0.36ml 二甲基甲酰胺把吹干的物质溶解,然后 NH 加入 120 μ L (100 μ mol) N-hydroxysuccinimide 和 120 μ L (100 μ mol) DCC, LPS 加入 150 μ l (100 μ mol) N-hydroxysuccinimide 和 150 μ l (100 μ mol) DCC,室温过夜搅拌溶解 22h。下一步再称取 10mgBSA 加 2mlCB0.05M pH9.6 溶解,

然后平均分成两管，将反应好的 NH 和 LPS 分别按 30ul 每次慢慢加入 5mg/ml 蛋白溶液中，然后放置 4℃ 搅拌过夜。最终用超滤管离心 5 次，去除未反应的化学试剂及半抗原，每次都 用 PBS 复溶。

A.4 荧光微球垫的制备

A.4.1 荧光微球标记 S-LPS 抗原、荧光微球标记 NH 抗原的制备

A.4.1.1 洗涤

按需量取固体含量为 1% 的荧光微球分散液，加入 5 倍体积的 BBS (0.05mol/L, pH 值 8.0)，以 12000r/min 离心 15 分钟，弃上清，重复清洗 2 次，将洗涤后的荧光微球重悬于 5 倍体积 BBS。

A.4.1.2 荧光微球活化

取 50ul 荧光微球加之 1ml MES 缓冲液中，混匀，12000r/min 离心 15min；弃上清，加入 1ml MES 缓冲液，混匀离心；重复上述步骤 3 次，并用 1ml MES 缓冲液复溶；向上述溶液中加入 250ul EDC 缓冲液，混匀，室温反应 30min；弃上清，加入 4ml 标记缓冲液，混匀。

A.4.1.3 荧光微球标记

将 S-LPS 抗原加入到已活化的荧光微球中，使其终浓度为 15 μ g/ml，混匀；将 NH 抗原加入到已活化的荧光微球中，使其终浓度为 15 μ g/ml，混匀。将混匀后含 S-LPS 抗原的荧光微球溶液和含 NH 抗原的荧光微球溶液，分别于室温条件下，避光反应 1.5 小时；分别按溶液总体积的 3% 加入封闭液（9% 的酪蛋白）。于室温条件下，分别避光反应 30 分钟。离心弃上清，分别按 A.4.1.1 用 BBS 清洗 2 次，并重悬已标记的荧光微球。分别以 1% 的量加入 1% 胭脂红色素，混匀，置 2~8℃ 保存备用。

A.4.2 荧光微球垫的制备

含 S-LPS 抗原荧光微球垫的制备，从冰箱中取出荧光微球标记 S-LPS 抗原恢复至室温（15~25℃）。取出玻璃纤维素膜并用辅料切条机裁切成 10cm×30cm 规格。设置喷涂量为 3 μ l/cm，每张玻璃纤维素膜（10×30cm）以 1.0cm 间隔喷涂 8 条。将完成喷涂的玻璃纤维素膜放置在干净纱窗网上，置 37 \pm 2℃ 干燥 2~3 小时，逐一垂直放入辅料斩切机中切成 0.7cm×30cm 的荧光微球垫，置于装有干燥剂的密封袋中并进行室温（15~25℃）保存备用。含 NH 抗原荧光微球垫的制备，步骤同上。

A.5 印膜的制备

A.5.1 印膜溶液的制备

A.5.1.1 质控线（C 线）印膜溶液

用 PB (0.05mmol/L, pH 值 8.0) 将抗 S-LPS 多抗稀释至 0.4mg/ml 作为质控线（C 线）印膜溶液，置于棕色玻璃瓶中，2~8℃ 保存备用。

A.5.1.2 检测线（T1 线）印膜溶液

用 PB (0.05mmol/L, pH 值 8.0) 将 S-LPS 抗原稀释至 0.45mg/ml 作为检测线 1 (T1 线) 印膜溶液, 置于棕色玻璃瓶中, 2~8℃保存备用。

A.5.1.3 检测线 (T2 线) 印膜溶液

用 PB (0.05mmol/L, pH 值 8.0) 将 NH 抗原稀释至 0.45mg/ml 作为检测线 2 (T2 线) 印膜溶液, 置于棕色玻璃瓶中, 2~8℃保存备用。

A.5.2 印膜

将印膜溶液分别吸至高效连续点膜机的质控线管线和检测线管线中, 按 0.8μl/cm 在硝酸纤维素膜上均匀划出质控线 (C 线) 和检测线 (T 线), 其中质控线 (C 线) 距硝酸纤维素膜顶端 0.8±0.1cm 处, 检测线距膜顶端 1.3±0.1cm 处, 质控线与检测线相距 0.5±0.1cm, 并在膜的开始端、末端及不均匀处作标记。

A.5.3 印膜干燥

将划线的 NC 膜逐一放置在干净纱窗网上, 忌重叠, 置于干燥间进行干燥, 37±2℃干燥 2 小时后。放入装有干燥剂的铝箔袋内, 封口, 贴上标签, 室温 (15~25℃) 保存备用。

A.6 样品垫的制备

将玻璃纤维素膜用辅料斩切机裁切成 2.0cm×30cm 的规格, 室温 (15~25℃) 密封保存备用。

A.7 检测卡的制备

在室温 (15~25℃) 及湿度≤30%RH 的洁净环境下, 按照以下步骤组装半成品试纸。

A.7.1 贴条

依次按印膜、吸水垫、荧光微球垫、样品垫的顺序将各中间制品粘贴于 PVC 底板上, 保证各中间品在相邻处均有 1~2mm 层叠, 并使印膜上的检测线靠近样品垫一侧、质控线靠近吸水垫一侧。

A.7.2 切条

将已组装好的荧光微球大板修剪整齐后, 用切条机裁切为 4.0±0.1mm 的试纸。

A.7.3 装卡

挑取印膜无划痕、无污染, 边缘整齐的试纸, 将试纸放入底卡中, 盖上卡盖。

附录 B

(规范性附录)

相关试剂的配制

B.1 样品稀释液

称取氯化钠(NaCl)8 g, 氯化钾(KCl)0.2 g, 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)1.44 g, 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.24 g, 加 800 mL ddH₂O, 用 1M 的 HCl 或 NaOH 调 pH, 定容 1 L。

B.2 MES 缓冲液

MES 1.95 g/L, 纯化水溶解, 1M NaOH 调节 pH 至 6.0。

B.3 EDC 缓冲液

EDC 76.68 g/L, 纯化水溶解, 置于 4°C 保存。

B.4 标记缓冲液

十水合硼砂 3.814 g/L, 硼酸 0.619 g/L, 纯化水定容至 1 L 即可。

B.5 封闭液

牛血清白蛋白 100 g/L, 纯化水溶解后置于 4°C 保存。

B.6 BBS (0.05 mol/L, pH 值 8.5)

称取 6.7 g 硼酸, 13.4 g 硼砂 (含 10 个结晶水), 溶解于 800 mL 纯化水, 定容至 1 L, 调节 pH 值至 8.5。

B.7 1% 胭脂红色素

称取 1.0 g 胭脂红色素, 100 mL 纯化水溶解。

B.8 PB (0.05 mol/L, pH 值 8.0)

甲液 (0.2 mol/L Na_2HPO_4): 称取 2.84 g 磷酸氢二钠加纯化水定容至 100 mL; 乙液 (0.2 mol/L NaH_2PO_4): 称取 3.12 g 磷酸二氢钠 (含 2 个结晶水) 加纯化水定容至 100 mL; 分别量取甲液 94.7 mL 和乙液 5.3 mL, 混匀后量取 25 mL 加入 75 mL 纯化水, 混匀。

B.9 阴性及阳性血清的制备

B.9.1 标准阴性血清的制备

B.9.1.1 采血

对 1 只健康动物进行静脉采血。

B.9.1.2 制备血清

室温 (15°C~25°C) 待血液凝固后, 37°C 静置 2 小时后, 然后 2°C~8°C 静置 1 小时, 将析出的血清转移到离心瓶中, 以 2000r/min 离心 5 分钟, 收集上清。

B.9.1.3 血清的分装及保存

将制备的血清混合均匀后，0.22 μm 滤膜过滤除菌，将血清与冻干保护剂按 8.5 : 1 比例混匀，无菌定量分装，1 mL/瓶，冷冻真空干燥，置-70 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，标记为“标准阴性血清”，同时注明制备日期等信息。

B.9.2 标准布鲁氏菌 S2 疫苗免疫阳性血清的制备

B.9.2.1 免疫与采血

用布鲁氏菌 S2 疫苗于每只布鲁氏菌抗体阴性动物腿部肌肉注射，2 mL / 头份。免疫后 1 周，每周无菌采血检测，当抗体效价达 1 : 512 时，无菌采集免疫动物血液。

B.9.2.2 分装、冻干及保存

将制备的血清混匀后，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌，将血清与冻干保护剂按 8.5 : 1 比例混匀，无菌定量分装，1 mL/瓶，冷冻真空干燥，置-70 $^{\circ}\text{C}$ 下保存，标记为“标准布鲁氏菌 S2 疫苗免疫阳性血清”，同时注明制备日期等信息。

B.9.3 标准布鲁氏菌感染阳性血清的制备

B.9.3.1 免疫与采血

用 S-LPS 蛋白于每只布鲁氏菌抗体阴性动物腿部肌肉注射，2 mL / 头份。免疫后 1 周，每周无菌采血检测，当抗体效价达 1 : 512 时，无菌采集免疫动物血液。

B.9.3.2 分装、冻干及保存

将制备的血清混匀后，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌，将血清与冻干保护剂按 8.5 : 1 比例混匀，无菌定量分装，1 mL/瓶，冷冻真空干燥，置-70 $^{\circ}\text{C}$ 下保存，标记为“标准布鲁氏菌感染阳性血清”，同时注明制备日期等信息。