

ICS 11.220

B 41

团 体 标 准

T/CVMA XXXXX—XXXX

炭疽杆菌 ELISA 抗体检测方法

Detection of antibodies against Bacillus anthracis by ELISA

(征求意见稿)

XXXX- XX - XX 发布

XXXX- XX - XX 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

前 言

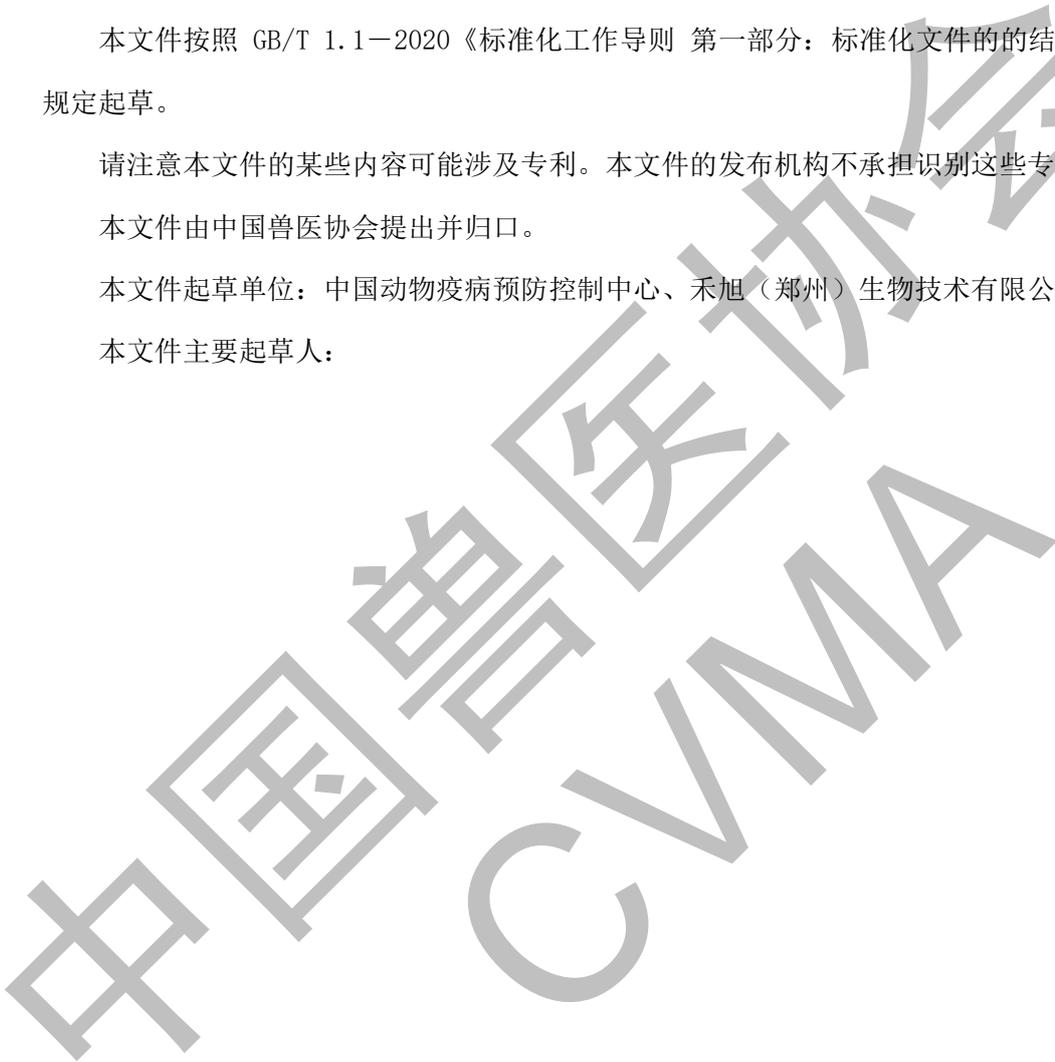
本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的的结构和起草规则》的规定起草。

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这些专利的责任。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、禾旭（郑州）生物技术有限公司。

本文件主要起草人：



炭疽杆菌 ELISA 抗体检测方法

1 范围

本文件规定了炭疽杆菌ELISA抗体检测方法的术语与定义、耗材与仪器、样品采集处理、实验操作和结果判定等内容。

本文件适用于牛、羊的炭疽杆菌抗体的检测。

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文件的必不可少的条款。其中注日期的引用文件，仅注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。

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

以下术语和定义适用于本文件。

3.1 炭疽病：炭疽病是炭疽杆菌引起的人畜共患的急性动物源性传染病。炭疽主要发生于食草动物炭疽病，比如牛、羊、马等。人接触患炭疽的动物后，可以受染而患病，主要表现为皮肤炭疽，其次为肺炭疽和肠炭疽，还有脑膜型炭疽和败血型炭疽。炭疽对机体的损害主要是感染组织或器官的出血性浸润、坏死和严重水肿，并同时引起全身毒血症状。

3.2 炭疽杆菌：炭疽杆菌（*Bacillus anthraci*）属于需氧芽胞杆菌属，能引起羊、牛、马等动物及人类的炭疽病。平时，牧民、农民、皮毛和屠宰工作者易受感染。

4 试剂与耗材

4.1 炭疽杆菌 PA 抗原，制备方法见附录 A。

4.2 酶标结合物，制备方法见附录 B。

- 4.3 阴性对照和阳性对照，制备方法见附录 C。
- 4.4 包被缓冲液，制备方法见附录 D.1。
- 4.5 封闭液，制备方法见附录 D.2。
- 4.6 样品稀释液，制备方法见附录 D.3。
- 4.7 酶标结合物稀释液，制备方法见附录 D.4。
- 4.8 25 倍浓缩洗涤液，制备方法见附录 D.5。
- 4.9 显色液 A，制备方法见附录 D.6。
- 4.10 显色液 B，制备方法见附录 D.7。
- 4.11 终止液，制备方法见附录 D.8。

5 器材与设备

- 5.1 酶标仪。
- 5.2 分析天平。
- 5.3 高速冷冻离心机（最大转速 15000 r/min）。
- 5.4 37 °C 温箱。
- 5.5 2 °C~8 °C 冰箱，-20 °C 冰箱。
- 5.6 单道微量移液器（0.5 μL~10 μL；10 μL~100 μL；20 μL~200 μL；100 μL~1000 μL）。
- 5.7 多道移液器（300 μL）。
- 5.8 酶联反应板。
- 5.9 血清稀释板。
- 5.10 一次性采血器（5 mL~10 mL）。

6 实验前准备工作

6.1 样本采集及处理

- 6.1.1 进行静脉无菌采血，不少于 2 mL。采集静脉血时，每个动物使用一个采血器。
- 6.1.2 将血液室温静置于斜面 2 h，待血液自然凝固后，置 2 °C~8 °C 冰箱中放置不少于 2 h，然后置高速冷冻离心机 4000 r/min 离心 10 min。

6.1.3 用单道微量移液器小心吸出上层血清。血清应清亮，无溶血、无污染。

6.2 血清样本的存放与运送

6.2.1 血清样本若在一周内检测，可置 2 °C~8 °C 条件下保存。若超过一周检测，应置于-20 °C 以下冷冻保存，避免反复冻融。

6.2.2 运输时注意冷藏，采集的血清样本可用冰袋或保温桶加冰密封等方式运输，运输时间应尽量缩短，确保样品有效无污染。按照《NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》进行样品的保存。

7 操作步骤

7.1 抗原包被

7.1.1 包被

用 0.05 M pH 值 9.0 的碳酸盐包被缓冲液将提取的炭疽杆菌 PA 抗原稀释至蛋白含量为 1 μg/mL。在酶标板的每个反应孔中加 100 μL，4 °C 过夜。

7.1.2 洗板

弃去孔内溶液，用洗涤缓冲液（1×）洗板5次，将板拍干。也可使用全自动洗板机洗涤，将聚苯乙烯酶标板放入托盘中，打开开关；设置“冲洗”程序和洗涤参数，校正洗头位置，按下清洗键进行清洗；洗板完成后，蒸馏水冲洗管路，关闭开关，排空废液。

7.1.3 封闭

每孔加入 150 μL 封闭液，置于 4 °C 封闭 16 h-24 h。

7.1.4 洗板

弃去封闭液，用 300 μL 多道移液器洗涤板孔，共洗涤 5 次。每次洗涤后应弃去孔内的液体。在最后一次洗涤液弃去后，将孔中残留的洗涤液在吸水纸上拍干。全自动洗板机操作步骤上同 7.1.2。

7.1.5 干燥

置于 37 °C 干燥 3 h-5 h。装入铝箔袋，加干燥剂，抽真空，置于 2 °C~8 °C 保存备用。

7.2 加样

取出包被板，所有检测孔中加入 90 μL 样品稀释液，然后加入 10 μL 样品、阴性对照、阳性对照。对照孔每次检测两孔，振荡混合均匀。

7.3 温育

置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中温育 30 min (± 1 min)。

7.4 洗板

将各孔的液体弃入废液筒，用 280 μL (± 20 μL) 洗涤液洗涤板孔，共洗涤 5 次，每次洗涤后应弃去孔内的液体。最后一次洗涤液弃去后，将孔中残留的洗涤液在吸水纸上拍干。全自动洗板机操作步骤上同 7.1.2。

7.5 加入酶标结合物

每孔加入 100 μL 酶标结合物。

7.6 温育

置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中温育 30 min (± 1 min)。

7.7 洗板

将各孔的液体弃入废液筒，用 280 μL (± 20 μL) 洗涤液洗涤板孔，共洗涤 5 次，每次洗涤后应弃去孔内的液体。最后一次洗涤液弃去后，将孔中残留的洗涤液在吸水纸上拍干。

7.8 加入底物

每孔加入 50 μL 显色液 A 和 50 μL 显色液 B (也可显色液 A、B 等比例混匀后加 100 μL)，须现配现用。

7.9 温育

置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中温育 15 min (± 1 min)。

7.10 终止反应

每孔加入 50 μL 终止液，终止反应。

7.11 读值

酶标仪测量并且记录样品和对照的 OD 值(450 nm)，15 min 内读值有效。

8 结果判定

8.1 试验成立条件

阴性对照平均值小于 0.2，阳性对照平均值与阴性对照平均值之差不小于 1.0，实验成立。

8.2 结果判定

样本 OD 值与阳性对照 OD 值之比小于 0.4，样品应判定为抗体阴性；样本 OD 值与阳性对照 OD 值之比大于等于 0.4，样品应判定为抗体阳性。

中国兽医协会
CVMA

附录 A

(规范性)

炭疽杆菌抗原

炭疽杆菌抗原为炭疽毒素 PA63 重组蛋白，纯化后分装置-80 ℃保存。

中国兽医协会
CVMA

附录 B

(规范性)

酶标结合物

- B.1 称取 5 mg HRP 溶解于 1 mL 蒸馏水中。
- B.2 于上述溶液中加入 0.2 mL 新配的 0.1 mol/L NaIO_4 溶液，室温下避光搅拌 20 min。
- B.3 将上述溶液装入透析袋中，使用 1 mmol/L 的醋酸钠缓冲液 (pH 值 4.4) 透析，2 °C~8 °C 过夜。
- B.4 立即加入 10 mg 炭疽杆菌抗原在 1 mL 碳酸盐缓冲液中 (0.01 mol/L)，室温避光轻轻搅拌 2 h。
- B.5 加新配的 NaBH_4 溶液 (4 mg/mL) 0.1 mL，混匀，置 2 °C~8 °C 放置 2 h。
- B.6 将上述溶液装入透析袋中，PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 透析，2 °C~8 °C 过夜。
- B.7 称取 100 g 硫酸铵，加入 90 mL 水加热溶解，然后放在室温冷却，等待硫酸铵结晶析出稳定后，加氨水调 pH 值至 7.6，然后在透析后的辣根过氧化物和抗体反应液中，边搅拌边逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置 2 °C~8 °C 静置 3 h。
- B.8 以 8000 r/min 离心 30 min，弃上清。沉淀物用 1 mL PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 溶解，最后边摇晃边逐滴加入 0.5 mL 饱和硫酸铵，使其终浓度达到 33%，置 2 °C~8 °C 静置 3 h，以 8000 r/min 离心 30 min，弃上清，沉淀用 1 mL PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 溶解。将上述溶液装入透析袋中，用 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 透析，去除铵离子后 (用茌氏试剂检测)，以 8000 r/min 离心 30 min 去除沉淀，上清液即为炭疽杆菌酶标抗原，分装后，-70 °C 以下保存备用。

附录 C

(规范性)

阴性对照和阳性对照

C.1 阴性对照的制备

C.1.1 采血

对 1 头健康牛或羊进行颈部静脉大量采血。

C.1.2 制备血清

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

C.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 °C 以下保存, 标记为“炭疽杆菌阴性血清”, 同时注明制备日期等信息。

C.2 阳性对照的制备

C.2.1 免疫与采血

用炭疽杆菌疫苗于每头羊炭疽杆菌抗体阴性亲耳背后肌肉注射, 2 mL / 头份。免疫后 1 周, 每周无菌采血, 用 IDVET 商品化的炭疽杆菌抗体检测试剂盒检测, 当抗体效价达 1: 512 时, 无菌采集免疫羊血液。

C.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 °C 下保存, 标记为“炭疽杆菌阳性血清”, 同时注明制备日期等信息。

C.3 酶标记抗体稀释液

洗涤缓冲液 100 mL, 加入 100 mg 白明胶加热溶解, 冷却后取其 90 mL 与健康牛血清 10 mL 混匀。

附录 D
(规范性)
相关试剂

D.1 包被缓冲液

准确称取 1.59 g 碳酸钠、2.93 g 碳酸氢钠，量取 1000 mL 纯化水，使用搅拌器搅拌使其完全溶解，使用酸度计测定 pH 值（要求 pH 9.6~9.8）。

D.2 封闭液

称取 2.9 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾，量取 1000 mL 纯化水，搅拌溶解，使用酸度计测定 pH 值（要求 pH 值 7.2~7.4），再称取牛血清白蛋白 20 g，蔗糖 50 g，加入其中，搅拌溶解后，再加入 0.5 mL ProClin-300 0.5 mL 吐温-20，搅拌混匀。

D.3 样品稀释液

加入 2.9 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾，量取 1000 mL 纯化水，搅拌溶解，使用酸度计测定 pH 值（要求 pH 值 7.2~7.4），再称取牛血清白蛋白 10 g 加入其中，搅拌溶解后，再加入 0.5 mL ProClin-300，0.5 mL 吐温-20，搅拌混匀。

D.4 酶标结合物稀释液

加入 2.9 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾，量取 1000 mL 纯化水，搅拌溶解，使用酸度计测定 pH 值（要求 pH 值 7.2~7.4），再称取牛血清白蛋白 10 g 加入其中，搅拌溶解后，再加入 0.5 mL ProClin-300 0.5 mL 吐温-20，搅拌混匀。

D.5 25 倍浓缩洗涤液

称取十二水磷酸氢二钠 72.5 g、磷酸二氢钾 5 g、氯化钠 200 g、氯化钾 5 g，加入 700 mL 双蒸水加热搅拌溶解，再加入 12.5 mL 的吐温-20，而后加双蒸水定容至 1000 mL。使用前将 25 倍浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 25 倍稀释。1 份 25 倍浓缩洗涤液加 24 份蒸馏水。例如：40 mL 25 倍浓缩洗涤液加入 960 mL 蒸馏水。

D.6 显色液 A

称取柠檬酸 5.76 g、过氧化脲 0.5 g、乙酸钠 6.21 g，加入 800 mL 纯化水搅拌溶解，再加入 ProClin 300 1 mL，而后加纯化水定容至 1000 mL，定量分装，2 °C~8 °C 保存。

D.7 显色液 B

称取柠檬酸 5.76 g、TMB 0.2 g，加入甲醇 100 mL 溶解，再加入 ProClin-300 1 mL，最后加纯化水定容至 1000 mL，定量分装，2 °C~8 °C 保存。

D.8 终止液

量取纯化水 876 mL，缓慢加入浓硫酸（2 mol/L）124 mL，搅拌均匀，而后加纯化水定容至 1000 mL，定量分装，2 °C~8 °C 保存。