



中华人民共和国国家标准

GB/T 17494—2009
代替 GB/T 17494—1998

马传染性贫血病间接 ELISA 诊断技术

Diagnostic techniques of indirect ELISA technique
for equine infectious anemia disease

2009-04-23 发布

2009-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准参照世界动物卫生组织(OIE)最新公布的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》2004年版,并结合我国现有动物卫生法规及农业部对马传贫的相关政策和措施修订,其技术内容与OIE所推荐的基本一致。

本标准代替GB/T 17494—1998《马传染性贫血病间接ELISA技术规程》。

本标准与GB/T 17494—1998相比主要变化如下:

——“前言”部分作适当变动;

——删除第2章的内容;

——第4章“仪器设备”和第5章“试剂”部分改为“材料准备”,并对内容作较大的改动;

——第6章“配制溶液”部分放置在附录内;

——修订原标准中的所有语句和计量单位等错误用法。

本标准的附录A、附录B、附录C和附录D为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所负责起草。

本标准主要起草人:相文华、郭巍、赵立平、戴玉坤。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 17494—1998。

马传染性贫血病间接 ELISA 诊断技术

1 范围

本标准规定了马传染性贫血病间接 ELISA 诊断技术的测定原理、材料准备、操作方法和结果判定等。

本标准适用于检测马血清中的马传贫病毒抗体。可用于生产和经营马匹者对未注射马传贫疫苗马匹的检疫、马传贫病马的定性,也可用于对注射马传贫疫苗马匹的免疫状态进行测定。

2 测定原理

用制备的马传贫病毒抗原,包被聚苯乙烯微量板孔,使免疫反应在固相载体上进行。当被检血清中有马传贫病毒抗体存在时,则与孔壁上的抗原形成抗原-抗体复合物,再与酶标记的抗体(抗马免疫球蛋白)反应,最后通过测定酶作用底物催化后的产物,进行马传贫病毒抗体的定性、定量测定。

3 材料准备

3.1 器材

- 3.1.1 96 孔平底微量反应板。
- 3.1.2 微量移液器。
- 3.1.3 酶标测定仪。
- 3.1.4 恒温箱。
- 3.1.5 保湿盒等。

3.2 试剂

- 3.2.1 兔抗马 IgG 辣根过氧化物酶结合物(简称酶标抗体)为冻干品,见附录 A。
- 3.2.2 马传贫病毒抗原包被板见附录 B。
- 3.2.3 马传贫病毒标准阳性血清和标准阴性血清均为冻干品。
- 3.2.4 磷酸盐缓冲液(0.02 mol/L, pH7.2, PBS)配制方法见第 C.1 章。
- 3.2.5 洗涤缓冲液(0.02 mol/L, pH7.2, PBS-0.05%吐温-20)的配制方法见第 C.2 章。
- 3.2.6 血清及酶标记抗体稀释液(0.02 mol/L, pH7.2, PBS-0.05%吐温-20-0.1%白明胶-10%健康牛血清)的配制方法见第 C.3 章。
- 3.2.7 底物缓冲液(pH5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液,内含 0.04%邻苯二胺及 0.045%过氧化氢)的配制方法见第 C.4 章。
- 3.2.8 终止液(2 mol/L, 硫酸)的配制方法见第 C.5 章。

4 操作方法

- 4.1 冲洗包被板:向各孔注入洗涤缓冲液,浸泡 3 min,甩干,再注入洗涤缓冲液,重复 3 次。甩干孔内残液,在滤纸上吸干。
- 4.2 加被检血清及对照血清:将每份被检血清样品各取 50 μ L 加入到血清稀释板的各孔内,再将稀释液 0.95 mL 依次加入各孔内,作 1:20 倍稀释。混匀后分别取 100 μ L 依次加入抗原包被反应孔中,每份血清加两个孔。每块反应板设阴性血清和阳性血清对照各两孔,每孔 100 μ L。盖好包被板置 37 $^{\circ}$ C 湿盒内 1 h,冲洗同 4.1。
- 4.3 加酶标记抗体:用酶标抗体稀释液将冻干酶标记抗体稀释至工作浓度,每孔加 100 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 湿