

团 体 标 准

T/CVMA 170—2024

口蹄疫病毒 O 型磁微粒化学发光抗体检测 方法

Magnetic particle chemiluminescent immunoassay detection of antibodies
against foot and mouth disease virus type 0

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有限公司、云南省畜牧兽医科学院、洛阳莱普生信息科技有限公司、华南农业大学、河南科技大学、中山市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：王善普、信爱国、李玉婉、苗海生、林森馨、张涛、林立波、赵明秋、朱鹤然、德吉玉珍、杨涛、格桑央宗、王永强、刘建东、张鹏翼、刘炜、赵书强、吴彬、杨晓盼、白晶晶。

中国兽医协会
CVMA
全国动物卫生大会

口蹄疫病毒 O 型磁微粒化学发光抗体检测方法

1 范围

本文件描述了口蹄疫病毒O型磁微粒化学发光抗体检测方法的试剂与器材、技术原理、操作步骤、试验成立条件、结果计算及判定规则等内容。

本文件适用于猪、牛、羊等动物血清中口蹄疫病毒O型抗体的检测，用于O型口蹄疫的免疫筛查、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)

FMDV-O: 口蹄疫病毒O型 (Foot and Mouth Disease Virus Type O)

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——竞争法原理，用口蹄疫病毒O型VP1重组蛋白包被磁微粒，酶标单克隆抗体与待检样品中的抗体竞争性的与包被抗原结合，通过抗原抗体反应，形成抗原-酶标抗体复合物、抗原-待测抗体复合物；抗原-酶标抗体复合物催化发光底物液发出光子形成发光值（RLU），其发光强度与口蹄疫病毒O型抗体的含量成反比。根据样本发光值与阴性对照发光值的比值，判断口蹄疫病毒O型抗体水平，比值越大，说明样本中口蹄疫病毒O型抗体水平越低；比值越小，说明样本中口蹄疫病毒O型抗体水平越高。

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 相关试剂的配制，按照附录 B 制备。
- 6.3 酶标单克隆抗体（HRP 标记的口蹄疫 O 型 VP1 单克隆抗体）。
- 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（20 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L）。
- 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

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。要求血清清亮，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 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C条件下保存。若超过一周检测，置于-20 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C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，设置仪器参数，将分装有1×洗涤液、酶结合物、发光底物A液和发光底物B液的试剂瓶分别插入仪器相应孔。开机自检，待仪器自检、管路清洗1次、底物灌注完成后，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。当次口蹄疫O型抗体检测时，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，进行样本申请，选择“FMDV-O”型项目，点击“开始”按钮进行检测。加样后反应步骤均在磁微粒化学发光仪上自动完成，具体程序如下。

- a) 加酶。每孔分别加入酶结合物 50 μL。
- 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 30 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。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) 显色。每孔加入发光底物 A 和发光底 B 各 50 μL，混匀 10 s 悬浮磁微粒，37 °C 反应 15min 检测发光值(RLU)。
- f) 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

阴性对照平均发光值在 1×10^6 RLU~ 5×10^6 RLU，且阳性对照平均发光值 $< 5 \times 10^4$ RLU，则试验成立。

10 结果计算

$S/N = \text{待测样本发光值} / \text{阴性对照孔平均发光值}$ 。

11 判定规则

$S/N \leq 0.8$ 为口蹄疫病毒O型抗体阳性； $S/N > 0.8$ ，为口蹄疫病毒O型抗体阴性。

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 μg/mL的包被量加入口蹄疫病毒O型VP1重组蛋白。盖紧瓶盖/容器封口，2℃~8℃条件下摇床反应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 储存

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℃~8℃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 5g、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

将制备的口蹄疫病毒 O 型酶标单克隆抗体用酶结合物稀释液按 1:2000 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（三羟甲基氨基甲烷）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 乙酸铵溶于 800 mL 纯水中，使用乙酸调 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

用口蹄疫病毒 O 型灭活疫苗耳背后肌肉注射免疫口蹄疫病毒抗体阴性健康羊，首次免疫剂量为 1 mL/只；28 日后第二次免疫，免疫剂量为 1 mL/只；第二次免疫 2 周后静脉采血，分离血清，经液相阻断 ELISA 测定血清抗体效价，抗体效价达到 1:1024 时，采血分离血清，经 56 °C 水浴灭活 30 min，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后，按血清量的 0.1% 加入 Proclin300 防腐，用对照品稀释液 1:5 稀释后作为阳性对照，置 2 °C~8 °C 保存备用。

C.2 阴性对照的制备

挑选健康未免疫口蹄疫 O 型灭活疫苗的羊。经检测口蹄疫病毒 O 型、口蹄疫病毒 A 型抗体均为阴性。颈静脉采血，分离血清，经 56 °C 水浴灭活 30 min 后，按血清量的 0.1% 加入 Proclin300 防腐，经 0.22 μm 滤膜过滤除菌，用对照品稀释液 1:20 稀释后作为阴性对照，置 2 °C~8 °C 保存备用。