ICS 11.220

B 41

# 团 体 标 准

T/CVMA X25—2019

# 口蹄疫病毒 O 型、A 型抗体管式化学发光免疫分析检测方法

**Tubular Chemiluminescence Immunoassay For Detecting Antibodies Of Foot and Mouth Virus(FMDV) Tipe O、A**

中国兽医协会 CVMA

2019 - XX - XX 发布 2019 - 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。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：中国农业科学院兰州兽医研究所，中国动物疫病预防控制中心

本标准主要起草人：林密、包艳芳、孙雨、蒋韬、马军武、何继军、王传彬，陈夏辉、郭建宏、宋晓晖，刘湘涛、杨林、李峰松、李昕、孙燕燕、杨光、贺华丽

中国兽医协会
CVMA

# 引 言

口蹄疫（Food-and-Mouth Disease,FMD）是一种由口蹄疫病毒（Food-and-Mouth Disease Virus,FMDV）引起的偶蹄动物共患烈性传染病，被世界动物卫生组织（Office International Des Epizooties,OIE）列为法定报告病之一；《国家中长期动物疫病防治规划（2012—2020年）》（国办发〔2012〕31号）中，将口蹄疫（A型、亚洲I型、O型）列为优先防治的5种动物疫病之一；其易感动物种类多，传播迅速，可造成大量动物感染死亡，该病的流行严重危害我国养殖业发展，影响相关动物及动物产品的国际贸易，给我国相关产业造成了巨大损失。

口蹄疫病毒在分类上属于小RNA病毒科（*Picornaviridae*），口蹄疫病毒属，总共有7个血清型，在我国流行的主要有O型、A型和Asia1型，其中2009年后主要流行毒株为O 型 Mya-98 毒株、A 型 Sea-97 毒株，防控形势依然严峻。目前，国内外对于口蹄疫病毒O型、A型抗体检测方法主要包括VN、LBP-ELISA、SPC-ELISA、3ABC-I-ELISA等，相对比这些方法，化学发光酶联免疫分析检测方法（CLIA）是一种高灵敏度、高通量、高自动化、宽检测线的新型检测方法，也可用于口蹄疫病毒O型、A型抗体检测。

本标准参考我国现有的口蹄疫诊断技术的国标（GB/T18935-2003、GB/T18935-2018），并结合我国化学发光免疫分析方法研究新成果制定，在技术上与国内外先进技术保持一致。

中国兽医协会 CVMA

# 口蹄疫病毒 O 型、A 型抗体管式化学发光免疫分析检测方法

## 1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒O型、A型抗体化学发光免疫分析检测试剂、仪器设备及耗材、实验操作步骤、结果与分析。

本标准适用于检测猪、牛和羊等偶蹄动物血清中口蹄疫病毒O型、A型抗体。

## 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试验方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

## 3 缩略语

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

VN：病毒中和试验（Virus neutralization test）

ELISA：酶联免疫吸附（Enzyme linked immunosorbent assay）

LBP：液相阻断(Liquid phase block)

SPC：固相竞争(Solid phase competition)

## 4 试剂

4.1 1×浓缩洗液洗液；

4.2 1×浓缩洗针液

4.3 稀释液

4.4 口蹄疫病毒 O 型、A 型抗原

4.5 包被捕获抗体的磁性微粒（捕获抗体：口蹄疫病毒 O 型、A 型兔抗血清）

4.6 碱性磷酸酶标记的检测抗体（检测抗体：口蹄疫病毒 O 型、A 型豚鼠抗血清）

中国兽医协会 CVMA

4.7 口蹄疫病毒 O 型、A 型抗体标准血清：效价 1：4096，倍比稀释至 1:16

4.8 阳性对照血清：取标准血清中效价 1:512 为阳性对照。

4.9 阴性对照血清：健康牛血清

4.10 化学发光底物

## 5 仪器设备及耗材

高速离心机、全自动化学发光仪、-4℃冰箱、可调移液器。

反应杯、专用样本架、试剂船、1.5ml尖底离心管。

## 6 操作步骤

### 6.1 样品采集

样品采集按照NY/T 541进行。无菌注射器静脉采血，用自然凝结法分离血清，置于无菌血清管中备用。

### 6.2 样品处理

取5.1中采集的样品，12000r/min，离心2min，取上清放于1.5mL尖底离心管中，体积应大于300μL，待检；若样品中存在沉淀或絮状物等杂质，应离心去除杂质，应避免出现泡沫。

### 6.3 样品检测

按已经确定的条件设置好检测软件，开始检测样本。（具体设置方式参考仪器说明书）

#### 6.3.1 准备

将配制好的反应体系放置于仪器相应仓室，将配置好的洗液（1×洗液）和洗针液（1×洗针液）加注到洗液桶和洗针液桶，检查和仪器配套的化学发光底物是否在底物仓中，检查废液桶和垃圾箱，确保有足够的空间盛放新的废液、废反应杯。按仪器说明书开机，进行“日常检查”。

#### 6.3.2 标准曲线

取口蹄疫病毒O型、A型抗体标准血清各300μL于1.5ml尖底离心管，并置于专用样品架，放入样品仓，，效价分别是1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512、1:1024、1:2048，按仪器说明申请测试，反

应过程如5.3.4所示，结果以效价16、32、64、128、256、512、1024、2048为横坐标，以结果RLU值为纵坐标，做标准曲线。

6.3.3 样品检测

6.3.3.1 上样

取阳性对照、阴性对照、待检样本 300μL 于 1.5ml 尖底离心管，置于专用样品架，并放入样品仓，当一批样本加样完成，可连续放入下一批样本。

6.3.3.2 检测

按仪器说明书的样本检测流程进行申请，点击“样本”选项，选择项目种类，标注样本标识，开始检测，此时界面自动跳转至“监控”，约35min后，若“监控”页面对应的样本显示“已完成”，则检测结束。反应过程如5.3.4所示。

6.3.4 反应过程（均在全自动化学发光仪上自动完成）

a. 取一定量待检样品、标准品、阴阳性血清加入反应杯；

b. 加入一定量偶联兔抗的磁珠溶液、一定量口蹄疫病毒O型、A型抗原，37℃孵育10分钟；

c. 清洗3次，加入一定量碱性磷酸酶标记的豚抗，37℃孵育10分钟；

d. 清洗3次，加入100μL化学发光底物，孵育3分钟；

e. 读取发光值，计算浓度。

6.3.5 结果

检测完成后，点击“结果”页面，查看相应样本的检测结果(检测结果为：测得RLU值对应标准曲线计算得样本效价)。

a. 若阴阳性对照结果判定成立，则试验成立，可按检测显示结果判定样本阴阳性，结果也可导出为excel文件。

b. 若阴阳性对照不成立，则需校准标准曲线，再进行检测。

## 7 结果判定和分析

### 7.1 实验成立条件

阳性对照效价为512±1个滴度，阴性对照效价＜16，实验结果成立。

## 7.2 结果判定

抗体滴度≥1:100判为阳性；≤45判为阴性；45＜效价＜100判为可疑。

抗体效价与免疫动物攻毒保护的关系：

牛、羊：抗体滴度≥1:100，99%以上保护；<1:20不保护；1:22-100，50%保护。

猪：≥1:60，99%以上保护；<1:5 不保护；1:5-1:60，50%保护。

中国兽医协会
CVMA

# 附 录 A

(规范性附录)

试剂的配制

A1. 25×浓缩洗液洗液：

| | |
|---|---|
| 丁二酸 | 1.98g |
| 六水丁二酸钠 | 62.16g |
| NaCl | 225g |
| 超纯水 | 848g |
| Tween-20 | 13.75g |

加灭菌蒸馏水至600 mL，溶解，定容至1000 mL，置于2~8℃保存备用。使用时用无菌蒸馏水稀释25倍为1×洗液使用。

A2. 100×浓缩洗针液：

取50ml Tween-20，加灭菌蒸馏水至600 mL，摇匀，定容至1000 mL，置于2~8℃保存备用。使用时用无菌蒸馏水稀释100倍为1×洗针液使用。

A3. 稀释液：

| | |
|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 1.15g |
| NaCl | 8g |
| $KH_2PO_4$ | 0.2g |
| Tween-20 | 0.5ml |

加灭菌蒸馏水至600 mL，溶解，定容至1000 mL，置于2~8℃保存备用。

中国兽医协会 CVMA

# 附 录 B

（资料性附录）

## 标准曲线实例参照

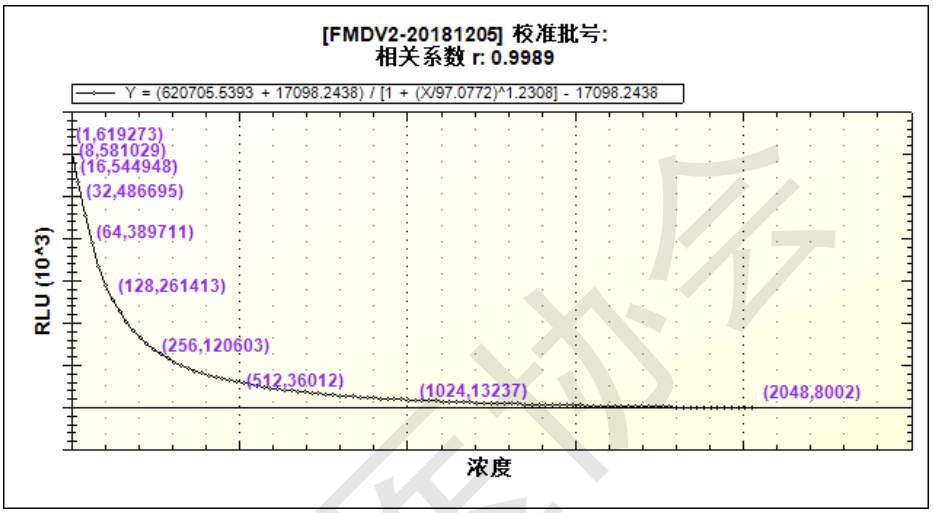


图 1 口蹄疫病毒 O 型抗体检测标准曲线

中国兽医协会 CVMA