ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 26-2020

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 disease virus serotype O and A

中国兽医协会
CVMA

2020-12-22 发布　　2020-12-22 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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：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

本文件主要起草人：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

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

本文件规定了口蹄疫病毒O型、A型抗体管式化学发光免疫分析检测方法的试剂、仪器设备及耗材、操作步骤、结果判定。

本文件适用于检测猪、牛和羊等偶蹄动物血清中口蹄疫O型、A型病毒抗体的检测。

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/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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件

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

VNT：病毒中和试验（Virus Neutralization Test）

ELISA：酶联免疫吸附（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）

LPBE：液相阻断ELISA (Liquid Phase Block Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

SPCE：固相竞争ELISA (Solid Phase Competition Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

5 试剂

5.1 25×浓缩洗液洗液，按照附录 A.1 配置

5.2 100×浓缩洗针液,按照附录 A.2 配置

5.3 稀释液，按照附录 A.3 配置

5.4 口蹄疫病毒 O 型、A 型抗原

5.5 偶联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）

5.6 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）

5.7 口蹄疫病毒 O 型、A 型抗体标准血清：抗体含量均为 1280 U，按照附录 B.1、B.2 制备

5.8 口蹄疫病毒 O 型抗体质控血清 1：抗体含量范围应 144 U~176 U，按照附录 C.1 制备

5.9　口蹄疫病毒 A 型抗体质控血清 1：抗体含量范围应 144 U~176 U，按照附录 C.2 制备

5.10　口蹄疫病毒抗体质控血清 2：健康牛血清，抗体含量＜10 U，按照附录 C.3 制备，抗体含量的定义以及与效价的对应关系见附录 D

5.11　化学发光底物

6　仪器设备及耗材

—电子天平
—离心机
—可调单道移液器（100 μL、1 mL）
—1.5 mL尖底离心管
—全自动化学发免疫分析仪
—反应杯
—专用样本架
—试剂船

7　操作步骤

7.1　样品采集及保存

样品采集按照NY/T 541进行。无菌注射器静脉采血，不少于2 mL，用自然凝结法分离血清后，置于无菌血清管中，若在一周内检测，可置2 ℃~8 ℃条件下保存，若超过一周检测，应置于-20 ℃以下冷冻保存。

血清样本运输时注意冷藏，确保样品有效。按照《兽医实验室生物安全技术管理规范》进行样品的生物安全标识。

7.2　样品处理

取7.1中的样品，12000 r/min，离心2 min，取上清放于1.5 mL尖底离心管中，体积应大于300 μL，待检；若样品中存在沉淀或絮状物等杂质，应离心去除杂质，且避免出现泡沫。

7.3　检测前准备

7.3.1　溶液配制

洗液（1×洗液）：将本试剂盒配备的25×浓缩洗液用无离子水或蒸馏水做1:25稀释；
洗针液（1×洗针液）：将本试剂盒配备的100×浓缩洗针液用无离子水或蒸馏水做1:100稀释；
无离子水或蒸馏水均应符合GB/T 6682的要求。

7.3.2　仪器准备

阅读仪器说明书，按已经确定的条件设置好仪器参数，放置相关试剂、样本、所需耗材，开始检测。（具体设置方式参考仪器说明书）。

7.3.3　标准曲线拟合及校准

7.3.3.1　标准曲线拟合

倍比稀释口蹄疫病毒O型、A型抗体标准血清于1.5 mL尖底离心管，含量分别是1280 U、640 U、320 U、160 U、80 U、40 U、20 U、10 U、5 U，血清稀释液含量定位0 U，按照7.3.5进行检测，按7.3.6做标准曲线。标准曲线示例见附录E。

7.3.3.2 标准曲线校准

取抗体含量640 U、160 U、80 U、40 U、10 U高、中、低5个点，按仪器说明书对标准曲线进行校准。

以下情况需对标准曲线进行校准，然后再进行检测：

a) 试剂成分发生改变；
b) 同一批次试剂盒使用周期超过28 d；
c) 根据具体需要：如质控结果不符合要求。

7.3.4 质控

需要时检测质控血清，检测值必须在参考范围内，方可继续样品检测，如下情况需检测质控血清：

a） 每次试剂成分发生改变或定标后；
b） 至少24 h内需检测1次。

7.3.5 样品检测

a) 将样品架置入相应样品仓内，仪器自动吸取10 μL待检样品、标准品、阴阳性血清加入反应杯；
b) 加入25 μL偶联兔抗的磁性微粒溶液、180 μL口蹄疫病毒O型、A型抗原，37 ℃孵育10 min；
c) 清洗3次，加入100 μL碱性磷酸酶标记的豚抗，37 ℃孵育10 min；
d) 清洗3次，加入100 μL化学发光底物，孵育3 min；
e) 读取发光值，计算浓度。

7.3.6 结果

检测完成后，按标准血清抗体含量为横坐标，检测RLU值为纵坐标做四参数拟合标准曲线。待检样品检测RLU值代入标准曲线，计算结果即为待检样本中口蹄疫O、A抗体含量。

a) 若质控血清检测结果在参考范围内，则试验成立，可按检测显示结果判定样本阴阳性。
b) 若质控血清检测结果不在参考范围内，则需校准标准曲线，再进行检测。

8 结果判定

8.1 质控血清参考范围

质控血清1含量为144 U~176 U，质控血清2含量＜10 U，实验结果成立。

8.2 阴阳性判定依据

抗体含量≥70 U 判为阳性；≤28 U 判为阴性；28 U＜含量＜70 U 判为可疑。可疑血清样品，可以重测，重测抗体含量≥70 U，判为阳性，＜70 U 判为阴性。

中国兽医协会 CVMA

附　录　A
（规范性）
试剂的配制

A.1　25×浓缩洗液，见表 A1：

表A1 25×浓缩洗液配方

名称	称量
丁二酸	1.98 g
六水丁二酸钠	62.16 g
NaCl	225 g
Tween-20	13.75 g

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。

A.2　100×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。

A.3　稀释液，见表 A2：

表A2 稀释液配方

名称	称量
Na_2HPO_4	1.15 g
NaCl	8 g
KH_2PO_4	0.2 g
Tween-20	0.5 mL

加灭菌蒸馏水至 600 mL，溶解，定容至 1000 mL，置于 2 ℃~8 ℃保存备用。蒸馏水均应符合 GB/T 6682 的要求。

中国兽医协会 CVMA

附　录　B
（规范性）
口蹄疫病毒 O 型、A 型抗体标准血清制备

B.1　口蹄疫病毒 O 型抗体标准血清制备

用毒株为O/MYA98/BY/2010的口蹄疫病毒O型疫苗免疫健康牛1头，每次2 mL/头份，在初次免疫21天后，加强免疫一次，采集免疫动物30日左右血液，用自然凝结法分离血清后，0.22 μm滤器过滤除菌，加入0.05 %（V/V）proclin300，分装于无菌血清管中，2 ℃~8 ℃条件下保存。

2 ℃~8 ℃条件下一周内应用病毒中和试验检测效价，若效价大于1:2048，则用健康新生牛血清稀释至1:2048（即1280 U，效价和相对含量对应关系见附录C），若效价小于1:2048，则需继续加强免疫，采集血清，重新检测。

制备好的口蹄疫病毒 O 型抗体标准血清分装于无菌血清管中，-20 ℃条件下保存备用。

B.2　口蹄疫病毒 A 型抗体标准血清制备

用毒株为 AF/72/1972 的口蹄疫病毒 A 型疫苗免疫健康牛 1 头，每次 2 mL/头份，在初次免疫 21 天后，加强免疫一次，采集免疫动物 30 日左右血液，用自然凝结法分离血清后，0.22 μm 滤器过滤除菌，加入 0.05%（V/V）proclin300，分装于无菌血清管中，2 ℃~8 ℃条件下保存。

2 ℃~8 ℃条件下一周内应用病毒中和试验检测效价，若效价大于 1:2048，则用健康新生牛血清稀释至 1:2048（即 1280 U，效价和相对含量对应关系见附录 D），若效价小于 1:2048，则需继续加强免疫，采集血清，重新检测。

制备好的口蹄疫病毒 A 型抗体标准血清分装于无菌血清管中，-20 ℃条件下保存备用。

中国兽医协会 CVMA

附　录　C
（规范性）
质控血清

C.1　口蹄疫病毒 O 型抗体质控血清 1

取口蹄疫病毒 O 型抗体标准血清（1280 U），用健康新生牛血清 8 倍稀释做为口蹄疫病毒 O 型抗体质控血清 1，此时蹄疫病毒 O 型抗体含量为 160 U，取 160 U±10%作为其参考范围，即口蹄疫病毒 O 型抗体质控血清 1 抗体含量参考范围为 144 U~176 U。

C.2　口蹄疫病毒 A 型抗体质控血清 1

取口蹄疫病毒 A 型抗体标准血清（1280 U），用健康新生牛血清 8 倍稀释做为口蹄疫病毒 A 型抗体质控血清 1，此时蹄疫病毒 A 型抗体含量为 160 U，取 160 U±10%作为其参考范围，即口蹄疫病毒 A 型抗体质控血清 1 抗体含量参考范围为 144 U~176 U。

C.3　口蹄疫病毒抗体质控血清 2

取健康新生牛血清作为口蹄疫病毒体质控血清 2，抗体含量＜10 U。

中国兽医协会
CVMA

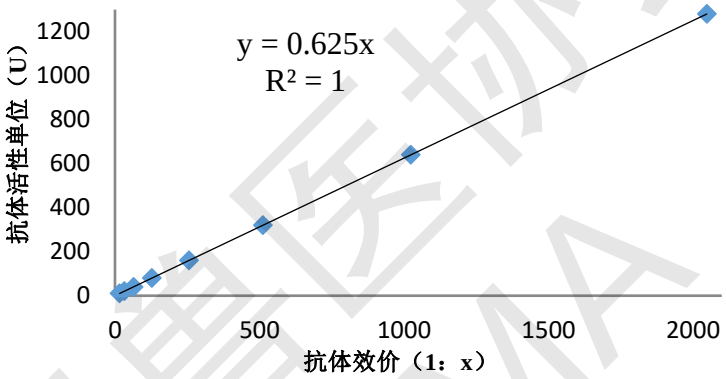
附　录　D
（资料性）
抗体含量的定义以及与效价的对应关系

D.1　抗体定量检测单位的定义

在经典的口蹄疫抗体病毒中和试验（VNT）中，抗体效价为 1:45 以上为阳性血清，1:16~1:32 为可疑血清，1:16 以下为阴性血清，我们定义相对应的 1:16 的抗体血清为 10 个活性单位，即 10 U，如效价 1：32 为 20 U，1:64 为 40 U 等，以此确定标准品的活性含量。

D.2　抗体和效价对应关系

以效价（1：x）为横坐标，活性含量（U）为纵坐标做线性关系图，其对应关系为 y = 0.0625x，R^2 = 1，如图 1。



图D 抗体效价及活性含量对应关系

中国兽医协会 CVMA

附　录　E
（资料性）
标准曲线实例参照

口蹄疫病毒 O 型抗体检测标准曲线，标准曲线 R 值为 0.9996，R^2 为 0.9992，故相关性较好，可用作口蹄疫病毒 O 型抗体检测的标准曲线，如图 E。

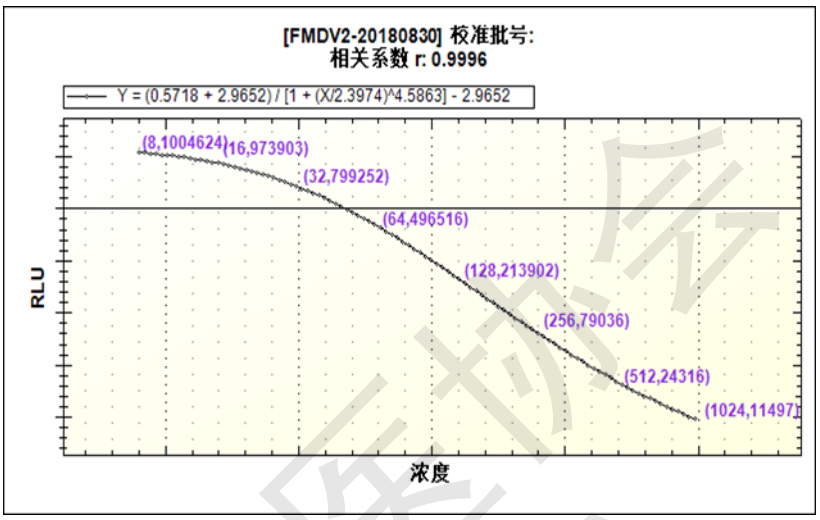


图 E　口蹄疫病毒 O 型抗体检测标准曲线

图注：图 E 为口蹄疫病毒 O 型抗体检测标准曲线的参考图，横坐标为标准血清抗体浓度，纵坐标为检测发光值（RLU）。

中国兽医协会 CVMA