XXX XX.XXX

X XX

团　　体　　标　　准

T/CVMA XX-20XX

口蹄疫 O 型病毒时间分辨荧光微球免疫层析检测方法

TRFIA for detection Strips of Foot and mouth Disease Virus Serotype O

征求意见稿

中国兽医协会 CVMA

20XX-XX-XX 发布　　20XX-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：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

口蹄疫 O 型病毒时分辨荧光微球免疫层析检测方法

1 范围

本标准规定了口蹄疫O型病毒时分辨荧光微球免疫层析检测方法的试剂与耗材、技术原理、操作步骤及结果判定等内容。

本标准适用于口蹄疫O型病毒定性以及口蹄疫O型疫苗定量快速检测。

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 T541-2016 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

时间分辨荧光微球（Time-resolved fluorescence microspheres）：是羧基聚苯乙烯微球经稀土镧系螯合物铕染色，形成可被光激发并发出荧光的物质。每个微球中可包裹成千上万个荧光分子，可提高标记效率，从而提高检测灵敏度；同时纳米荧光微球表面修饰有合适密度的羧基，用于与蛋白或抗体的共价偶联，可提高标记物的稳定性。

时间分辨荧光免疫层析技术（Time Resolved Fluorescence lmmunochromatography assay，TRFIA）：是以时间分辨荧光微球作为示踪物，将抗原抗体固定在硝酸纤维素膜上，通过层析来呈现免疫反应结果的一种新型免疫分析技术。

4 缩略语

中国兽医协会 CVMA

下列缩略语适用于本文件：

BSA：牛血清白蛋白。

IgG：免疫球蛋白G。

PB：磷酸盐缓冲液。

pH：pH值。

5 试剂

5.1 口蹄疫O型病毒时间分辨荧光定量试纸条，按照附录A制备。

5.2 相关试剂配置，按照附录B制备。

6 仪器设备及耗材

本方法应准备仪器设备及耗材如下：

— 三维划膜喷金仪

— 数控高速斩切机

— 隔水式恒温培养箱

— 磁力搅拌器

— 硝酸纤维素膜

— 玻璃纤维纸

— 吸水纸

— PVC背衬板

— 试纸卡壳

— 微量可调移液器（10 μL、50 μL、100 μL、200μL、1 000μL等不同规格）

7 技术原理

本方法采用时间分辨荧光免疫层析技术和双抗体夹心法结合技术，检测口蹄疫O型病毒抗原。通过样本与荧光微球标记物沿层析膜移动，样本中口蹄疫病毒与荧光微球标记物、检测线（T线）上的抗原结合而产生荧光信号值（T值），荧光微球标记物继续移动与质控线（C线）上的抗体结合产品荧光信号值（C值），仪器计算出T/C值即为FMDV检测值。

中国兽医协会 CVMA

8 操作步骤

8.1 实验前准备

8.1.1 样品采集及保存

未破裂水泡中的水泡液用灭菌注射器吸出后装入灭菌小瓶中（可加适量抗菌素），加盖并用胶带封口，严防进水，2℃~8℃冷藏。

剪取新鲜水泡皮放入灭菌小瓶中。加适量 50% PBS-甘油（pH7.4），加塞塞紧并用胶带封，-30℃以下保存。

每份样品的包装瓶上均要贴上标签，写明采集地点、动物种类、编号、时间等。

8.1.2 仪器准备

打开荧光免疫分析仪，检查电脑及网络连接正常。

8.2 样品处理

8.2.1 **定性检测样品处理：**无菌操作将待检水疱皮（采取新鲜未破裂、没有异味的水疱皮）用pH 7.5 0.05M PBS缓冲液洗2～3次，并用消毒滤纸吸去水分称重，加少许玻璃砂研磨，制成1:3（w/v）的悬液，室温浸毒1～2小时或2℃~8℃冰箱内浸毒一夜，振摇后以4000r/min离心10min，取上清液即为待检样品。水疱液可直接作为待检样品。

8.2.2 **定量检测疫苗样品处理：**将疫苗破乳剂与4倍体积的油乳剂灭活疫苗充分混匀，2℃~8℃，3 000 r/min离心10 min，离心后的最下层的病毒抗原作为待检样品。

8.3 样品检测

取20μL待检样品加入加样孔，之后加入70μL样品稀释液，当液体全部浸湿硝酸纤维素膜后，静置15分钟。将反应15分钟的试纸条插入荧光分析仪，填写对应的样本编号后，点击“检测”，电脑即时显示检测结果。

9 结果判定

9.1 定性检测结果判定

T/C 值＜0.125 为阴性。

中国兽医协会 CVMA

T/C 值≥0.125 为阳性。

9.2 定量检测结果判定

根据试剂盒计算抗原含量的公式 y=6.1966x+25.529，将检测得到的 T/C 值带入公式中计算出疫苗样品含量。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A

(规范性)

A.1 口蹄疫 O 型病毒时间分辨荧光定量试纸条的制备

A.1.1 口蹄疫 O 型病毒纯化抗原 146S 的制备：（1）毒种的繁殖与灭活：将 O/MYA98/JSCJ/2010 细胞毒种，按维持液 5～10%的量接种生长良好的 BHK-21 单层细胞转瓶内，于 37℃培养 8～12 h，当达到 90%以上细胞病变时，用 7.5% $NaHCO_3$ 溶液调 pH 值至 7.6～7.8，加入青霉素（100 IU/mL）、链霉素（100 IU/mL），病毒液用 2 mmol/L 二乙烯亚胺在 30℃下灭活 24 h，加入 2% 硫代硫酸钠阻断，4000 r/min 离心 30 min，取上清（O/MYA98/JSCJ/2010 灭活制苗病毒抗原液），-20℃冻存。（2）抗原的去脂与浓缩：① -20℃保存的 O/MYA98/JSCJ/2010 灭活制苗病毒抗原液 10000 mL 按 80 g/L 加入 PEG 6000 和 40 g/L 加入 NaCl，充分搅拌 4 h，2～8 ℃过夜；② 将步骤（1）得到的病毒液 8000 r/min 离心 45 min，弃上清；③ PB 缓冲液（0.2 mol/L Na_2HPO_4, 0.2 mol/L NaH_2PO_4，pH7.4）悬浮步骤②获得的沉淀（冰上操作），匀浆器反复研磨，至终体积 100 mL；④ 向步骤③获得的溶液中加入 2 倍体积的三氯乙烯于密闭容器中，剧烈振荡充分乳化，然后 2～8 ℃、8000 r/min 离心 30min，收集上层液；⑤ 将步骤④获得的上层液，45000 r/min 离心 3 h，弃上清；⑥ PB 缓冲液悬浮沉淀，匀浆器中研磨，至终体积 6 mL；⑦ 向步骤⑥获得的溶液中加入 1%的脱氧胆酸钠溶液，充分摇匀，2～8 ℃过夜，即为浓缩病毒抗原。（3）蔗糖密度梯度离心：配制 50%蔗糖母液；用 50%蔗糖配制 45%、35%、25%、15%四种浓度梯度蔗糖溶液；离心管中先加入 45%蔗糖溶液 2.5 mL，依次叠加 35%、25%、15%蔗糖溶液 2.5 mL，制备 6 个蔗糖梯度柱，2～8 ℃静止平衡过夜；次日将浓缩病毒抗原液 6 mL 分别加入 6 个蔗糖梯度柱顶部（每个柱子加入 1mL），2～8℃、35000 r/min 离心 2.5 h。（4）抗原 146S 收集：离心结束后，取 1 管上述梯度离心纯化抗原，自上而下吸取梯度离心抗原，每 0.5 mL 作为 1 个收集级分，对收集的级分进行顺序编号，共收集 22 个级分。其余 5 支离心管重复上述操作，并分别将同层收集级分合并至 22 个级分管中。用紫外分光光度计测定 22 个级分 OD_{259nm} 值，按照 FMDV 完整病毒粒子 146S 可能存在的区域分析数值，当第 15～19 号收集级分出现明显吸收峰值，取该区域 OD_{259nm} 大于 2.0 的级分合并，作为口蹄疫 O 型病毒纯化抗原 146S。

A.1.2 豚鼠抗口蹄疫 O 型病毒抗体 IgG 的制备：取 A1.1 法制备的口蹄疫 O 型病毒纯化抗原 146S（稀释至 30μg/mL）与等量弗氏完全佐剂按充分混合后，取 0.6mL 于豚鼠后肢股内侧肌肉接种，10d 后取同等浓度抗原与等量弗氏不完全佐剂按充分混合后，取 0.8mL 进行二免，10d 后与二免程序相同，取 1.2mL 进行三免。第三次接种后 15d，心脏采血，收集血清，置 56℃水浴灭活 30min。豚鼠免疫血清按 1.2mL/

中国兽医协会 CVMA

管分装，-80℃保存备用。采用 HiTrap ProteinA HP 亲和层析柱（GE），按使用说明进行操作。操作时用至少 8 倍柱体积的 pH 7.4、0.02mol/L PB 平衡 HiTrap ProteinA HP 亲和层析柱，流速 2mL/min，流洗至流出液 OD_{280nm} 不高于 0.1，用注射器将豚鼠抗口蹄疫 O 型病毒免疫血清注入加样阀，再用至少 4 倍柱体积的 pH 7.4、0.02mol/L PB 洗脱杂蛋白，用 0.1mol/L pH 3.0 柠檬酸缓冲液洗脱吸附于柱上的 IgG，同时收集样品。用 SDS-PAGE 电泳方法测定纯度不低于 95%；用紫外分光光度法测定豚鼠抗口蹄疫 O 型病毒抗体浓度，含量不低于 1.5 mg/mL，-20℃保存备用。

A.1.3 **兔抗口蹄疫 O 型病毒抗体 IgG 的制备：**将 A1.1 法制备的口蹄疫 O 型病毒纯化抗原 146S 加等量的弗氏完全佐剂初次免疫按 100μg/mL 分别给体重 3～4kg 家兔皮下多点注射，一个月后按初免同等剂量加弗氏不完全佐剂加强免疫，免疫三周后采血收集免疫血清。 制备的血清用免疫琼脂糖双扩散法（进行鉴定，与同型抗原的琼扩反应效价不低于 1:16；与异型抗原不高于 1:2 为合格。 检验合格的兔免疫血清按 2mL/瓶分装，-20℃保存备用。采用 HiTrap ProteinA HP 亲和层析柱（GE），按使用说明进行操作。操作时用至少 8 倍柱体积的 pH 7.4、0.02mol/L PB 平衡 HiTrap ProteinA HP 亲和层析柱，流速 2mL/min，流洗至流出液 OD_{280nm} 不高于 0.1，用注射器将兔抗口蹄疫 O 型病毒免疫血清注入加样阀，再用至少 4 倍柱体积的 pH 7.4、0.02mol/L PB 洗脱杂蛋白，用 0.1mol/L pH 3.0 柠檬酸缓冲液洗脱吸附于柱上的 IgG，同时收集样品。用 SDS-PAGE 电泳方法测定纯度不低于 95%；用紫外分光光度法测定兔抗口蹄疫 O 型病毒抗体浓度，含量不低于 2.0 mg/mL。检验合格纯化抗体按 200μL/管分装，-20℃保存备用。

A.2.1 **含检测线和质控线硝酸纤维素膜（NC 膜）的制备**

用 pH 7.4 的 0.02mol/L PB 将纯化的豚鼠抗口蹄疫 O 型病毒抗体调整至浓度为 214μg/mL，用点喷仪按 1.0μL/cm 喷于 280mm×25mm 的 NC 膜上作为检测带；将商品化羊抗兔抗体 IgG（浓度不小于 1.0 mg/mL）浓度调整至 250μg/mL，用点喷仪按 1.0μL/cm 喷于 280mm×25mm 的 NC 膜上为质控带。含有检测带和质控带的硝酸纤维素膜 37℃烘干 30min 取出。

A.2.2 **时间分辨荧光微球标记兔抗口蹄疫 O 型病毒抗体玻璃纤维（结合垫）制备**

时间分辨荧光微球活化，具体步骤如下：（1）超声分散微球，约 2min，然后手工摇匀；（2）在 2mL 的 EP 管中，加入 100μL 微球（固含 1%），再加超纯水 900μL，待用；（3）配制：10mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）乙醇溶液 A 液，10mg/mL 1-（3-二甲氨基丙基）-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）乙醇溶液 B 液；（4）在微球悬液中加入 5μL 的 A 液、混匀，再加入 5μL 的 B 液、再次混匀，室温反应 15～30min；（5）14000r/min，离心 15min，去上清，加入 1ml 0.02mol/L 硼酸盐缓冲液，然后超声分散均匀。

中国兽医协会 CVMA

取 1ml 活化后的微球悬液，超声分散，按 2.26μg/mL 将兔抗口蹄疫 O 型病毒抗体加入微球悬液，边搅拌边滴加抗体；室温下混匀 1 小时；加 10%BSA 至终浓度为 0.5%，封闭 1 小时；13000r/min 离心 15min，弃上清；取 1mL 微球稀释液加入到离心后的沉淀中，混匀，用点喷仪按 10μL/cm～20μL/cm，喷涂于玻璃纤维纸上，37℃烘干 30min 取出。

A.2.3 试纸条的组装

在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、涂覆有免疫胶体金的玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜以及吸水纸，按照要求切割成长不大于 60mm，宽不小于 3.8mm 的试纸，装入塑料卡壳中（图 1）。

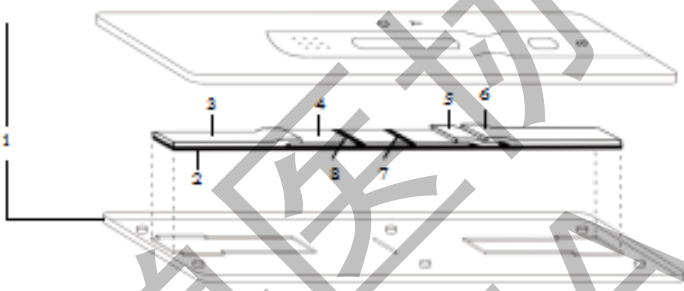

图 1　试纸卡装配示意图

1-8 分别代表卡壳、PVC 板、吸水纸、NC 膜、结合垫、样品吸收垫、检测带、质控带

A.3 标准曲线的建立

A.3.1 定量阈值

取口蹄疫 A 型阳性质控样品 AP1，口蹄疫 AsiaI 型阳性质控样品 ASP1，口蹄疫阴性质控样品 N1，每份样品检测 3 次。计算 3 次结果的均值 M 与标准差 SD，以阴性均值加三倍标准差（M+3SD）作为定量阈值，定量阈值为 0.125。

A.3.2 标准曲线的建立

取口蹄疫 O 型病毒 146S 含量分别为 225.2μg/mL、202.6μg/mL、184.0μg/mL、61.8μg/mL、47.6μg/mL 的样本进行测定，每个浓度重复测量 5 次，以试纸条结果 T/C 为横坐标，146S 含量为纵坐标（表 1），将测定浓度代入拟合标准曲线，得到线性方程 $y=196.27x+6.6945$，$R^2=0.9648$（图 2）。

中国兽医协会 CVMA

表1　口蹄疫O型病毒检测试纸条标准曲线建立

	稀释	原倍	5×	25×	125×	625×
O-146S	病毒含量	225.2μg/ml	202.6μg/ml	184.0μg/ml	61.8μg/ml	47.6μg/ml
	T/C	1.131/1.147/1.136/1.158/1.164	1.053/1.041/1.029/1.038/1.051	0.781/0.767/0.749/0.763/0.777	0.334/0.335/0.346/0.351/0.339	0.209/0.208/0.204/0.207/0.206

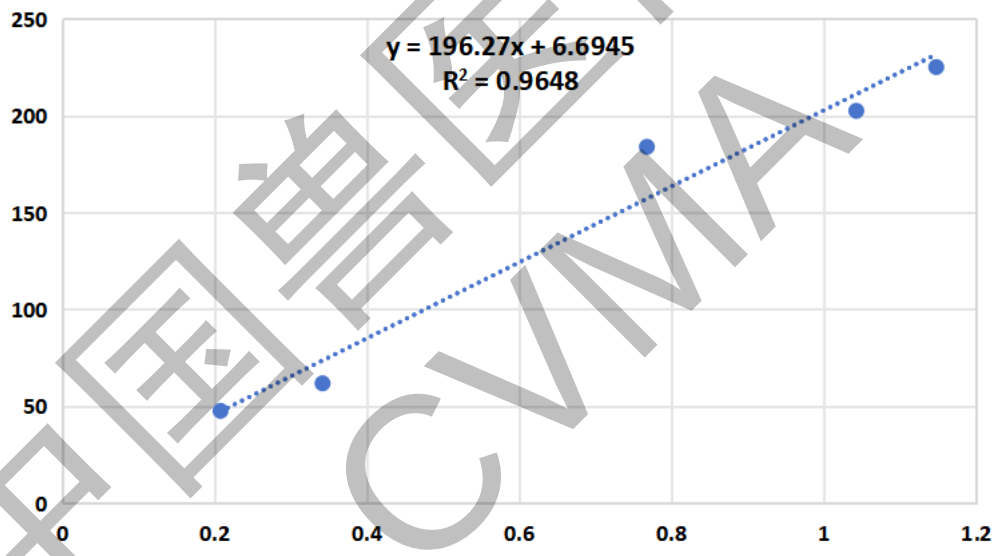

图 2　标准曲线

中国兽医协会 CVMA

附　录　B

(规范性)

相关试剂配置

B1 样品稀释液的制备

称取磷酸氢二钠 35.80g，磷酸二氢钠 1.56g，加灭菌去离子水定容至 1000mL，加入 1mLTween-20，0.5mL Proclin300，混匀后 2～8℃保存。

B2 PB 溶液的制备

磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）	15.49 g
磷酸二氢钠（NaH_2PO_4）	2.03 g
加蒸馏水至	1000 mL

中国兽医协会 CVMA