

团 体 标 准

T/CVMA 129—2023

口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体竞争磁微粒 CLIA 检测方法

Competitive magnetic particle based chemiluminescence immunoassay for detecting antibodies against 3ABC non-structural protein of foot and mouth disease virus

2023-11-15 发布

2023-11-15 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。

本文件由兰州兽研生物科技有限公司提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国农业科学院兰州兽医研究所、兰州兽研生物科技有限公司、广东省农业科学院动物卫生研究所、四川省动物疫病预防控制中心、浙江省动物疫病预防控制中心、上海市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：林密、付元芳、包艳芳、何莉、赵灵燕、罗胜军、裴超信、王建、袁红、蒋韬、卢曾军、李涛善、孙燕燕、李昕、杨光、孙铭飞、温肖会、陈斌、鞠厚斌、杨显超、赵洪进、张红丽、冯肖肖。

口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体竞争磁微粒 CLIA 检测方法

1 范围

本文件规定了口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体竞争磁微粒CLIA检测方法的试剂、仪器设备及耗材、操作步骤、结果判定。

本文件适用于定量检测猪、牛、羊等偶蹄动物血清中口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体。

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
- GB/T 18935 口蹄疫诊断技术
- 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

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

5 试剂

5.1 25×浓缩洗液，按照附录 A.1 配置。

5.2 磁微粒工作液（偶联口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 的磁性微粒）。

5.3 酶标抗体（碱性磷酸酶标记的 3A 蛋白单克隆抗体）。

5.4 稀释液，按照附录 A.2 配置。

5.5 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体工作校准品：包括工作校准品 1、工作校准品 2、工作校准品 3、工作校准品 4、工作校准品 5、工作校准品 6，抗体含量分别为 0 U、12.5 U、50 U、200 U、800 U、1600 U，按照附录 B 制备。

5.6 口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体产品校准品：包括产品校准品1、产品校准品2、产品校准品3，抗体含量分别为0U、100U、800U，按照附录C.1制备。

5.7 口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体质控品：质控品1 \leq 30 U，质控品2抗体含量范围应为180 U~300 U，按照附录C.2制备。

5.8 化学发光底物。

6 仪器设备及耗材

本方法应准备仪器设备及耗材如下：

——全自动化学发光免疫分析仪：磁微粒酶促化学发光检测设备；

——电子天平：最大称量：Max=220g；最小称量：Min=10mg；显示分度值：d=0.1mg；

——离心机：最高转速：16000rpm；

——可调单道移液器（100 μ L、1 mL）；

——1.5 mL尖底离心管；

——反应杯；

——试剂船。

7 技术原理

本方法使用磁微粒化学发光免疫分析法，采用竞争原理，将口蹄疫3ABC蛋白作为抗原偶联于3 μ m羧基磁微粒上，并同时加入待检血清和酶标抗体，二者竞争性的与3ABC蛋白上的相应表位结合。最后加入化学发光底物，读取发光值，通过检测口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体工作校准品建立校准曲线，将待检样本检测结果代入校准曲线计算非结构蛋白3ABC的抗体含量，判定阴阳性结果。

8 实验前准备

8.1 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，用自然析出法分离血清后，置于无菌血清管中，按照GB 19489 样品处理的生物安全措施、实验室 生物安全通用要求处理样本，若在一周内检测，可置2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C条件下保存，若超过一周检测，应置于-20 $^{\circ}$ C以下冷冻保存。

血清样本运输时应注意2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C冷藏。

8.2 样品处理

取8.1中的样品，8000 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 μ L，待检；若样品中存在沉淀或絮状物等杂质，应离心去除杂质，轻微操作，避免出现泡沫。

8.3 溶液配制

洗涤液：将25 \times 浓缩洗液用无离子水或蒸馏水1:25倍稀释，装入洗涤液桶。

无离子水或蒸馏水均应符合GB/T 6682的要求。

8.4 仪器准备

阅读全自动化学发光免疫分析仪说明书，放置反应杯，扫码放置底物、系统维护液，开始自检。

8.5 试剂准备

将偶联磁微粒工作液、酶标抗体、稀释液分别装入试剂船上对应试剂瓶中，将磁微粒吹打混匀、试剂船瓶盖换为胶盖；将试剂船装入试剂仓中。

9 操作步骤

9.1 校准曲线拟合

将口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体工作校准品1~工作校准品6放入样本架，按照9.4进行检测标定，按9.5制作校准曲线。校准曲线示例见附录D。

9.2 校准曲线校准

将口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体产品校准品1~产品校准品3放入样本架，对校准曲线进行校准。

以下情况应校准后再进行检测：

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

9.3 质控

需要时检测质控品，检测值在参考范围内方可继续样品检测。

如下情况应检测质控品：

- a) 试剂成分发生改变或校准曲线校准后；
- b) 质控品超过24 h需检测1次。

9.4 样品检测

取待检样本于1.5mL/2mL离心管中（样本量需300 μ L以上），置于专用样品架，设置测试样品信息，进行检测。

整个检测过程在全自动化学发光免疫分析仪上进行，具体检测过程如下：

- a) 免疫反应：取50 μ L待测样本，15 μ L磁微粒工作液、15 μ L酶标抗体、60 μ L稀释液，分别加入反应杯中，37 $^{\circ}$ C孵育20 min；
- b) 清洗：使用磁铁吸附磁微粒30s，使其聚集于管壁，弃去上清液。加入1 \times 洗涤液300 μ L悬浮磁微粒，混匀30s后吸附磁微粒，弃去1 \times 洗涤液。重复清洗3次。
- c) 检测：加入化学发光底物100 μ L于清洗后的反应杯中，混匀30s悬浮磁微粒，37 $^{\circ}$ C反应3分钟，检测发光值（RLU）。
- d) 计算：将发光值（RLU）代入校准曲线，计算样本中非结构蛋白3ABC抗体含量。

9.5 结果计算

检测完成后，以工作校准品抗体含量（0U、12.5U、50 U、200 U、800 U、1600 U）为横坐标、相应检测发光值为纵坐标拟合四参数为校准曲线，四参数公式为 $Y=(a-d)/[1+(x/c)^b]+d$ ，当 R^2 高于0.99时，可以用于结果计算和判定。将待检样品检测发光值代入校准曲线，计算结果即为待检样本中口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体含量。

10 结果判定

10.1 质控血清参考范围

质控品 1 抗体含量 ≤ 30 U，质控品 2 抗体含量在 180 U~300 U 范围内，实验结果成立。

10.2 阴阳性判定依据

抗体含量 ≥ 180 U时，判为口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体阳性；抗体含量 < 180 U判为口蹄疫病毒非结构蛋白3ABC抗体阴性。

附 录 A
(规范性)
试剂的配制

A.1 25×浓缩洗液配制

将表A.1中的试剂依次加入烧杯中，加灭菌蒸馏水至600 mL，溶解，定容至1000 mL，置于2~8 ℃保存备用。

表A.1 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 |
| 氯化钠 | 225.00 g |
| 吐温-20 | 13.75 g |

A.2 稀释液配制

将表A.2中的试剂依次加入烧杯中，加灭菌蒸馏水至600 mL，溶解，定容至1000 mL，置于2 ℃~8 ℃保存备用。

表A.2 稀释液配方

| 名称 | 称量 |
|-------|---------|
| 磷酸氢二钠 | 1.15 g |
| 氯化钠 | 8.00 g |
| 磷酸二氢钠 | 0.20 g |
| 吐温-20 | 0.50 mL |

A.3 校准品稀释液配制

按表A.3中的试剂依次加入烧杯中，加灭菌蒸馏水至600 mL，溶解，定容至1000 mL，置于2 ℃~8 ℃保存备用。

表A.3 校准品稀释液配方

| 名称 | 称量 |
|--------|---------|
| 磷酸氢二钠 | 1.15 g |
| 氯化钠 | 8.00 g |
| 磷酸二氢钠 | 0.20g |
| 牛血清白蛋白 | 1.00g |
| 海藻糖 | 5.00g |
| 吐温-20 | 0.50 mL |

附录 B (规范性)

口蹄疫病毒非结构蛋白抗体工作校准品制备

B.1 口蹄疫病毒非结构蛋白标准血清制备

筛选口蹄疫病毒抗原和抗体为阴性的牛用于感染试验,同时检测病毒性腹泻病毒(BVDV)抗原和抗体为阴性,所有进入生物安全三级实验室的牛筛查牛结核分枝杆菌为阴性。在生物安全三级动物舍,用 O/CHA/99 株口蹄疫病毒接种牛,舌皮下注射 2mL/头,于 2~5 日后出现口蹄疫症状,即蹄冠、蹄叉、蹄踵、鼻端发生水疱,体温升高至 41~42°C,拒食跛行,进行性消瘦等特征。无菌分离康复后 1 个月的动物血清,置于 56°C 水浴灭活 30~40 min 后,10000r/min 离心 10 min,取上清再用 0.22 μ m 滤器过滤除菌,剩余部分加入终浓度 20% 无菌甘油与适量防腐剂后分装, -20°C 以下保存备用。

抗体水平合格标准:对采集的血清样品,按照 GB/T 18935 中非结构蛋白 3ABC 阻断 ELISA 方法进行抗体检测,血清阻断率 PI 应大于 70%,判为非结构蛋白抗体强阳性;按照 GB/T 18935 中液相阻断 ELISA 方法检测,抗体滴度应不低于 1:90,判为合格。

B.2 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体工作校准品制备

校准品稀释液梯度稀释 B.1 所制备的高浓度血清,按照 GB/T 18935 中非结构蛋白 3ABC 阻断 ELISA 方法进行抗体检测,计算检测结果,定义检测 PI 为 50% 时的血清为 100U,若此时稀释比例为 1:128,则 1:256 稀释血清为 50U。依次类推,最终选择 0U (校准品稀释液)、12.5U、50 U、200 U、800 U、1600 U 分别为工作校准品 1、工作校准品 2、工作校准品 3、工作校准品 4、工作校准品 5、工作校准品 6,稀释的工作校准品 -20°C 保存备用,36 个月内有效。

附录 C (规范性)

口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体校准品、质控品

C.1 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体产品校准品制备

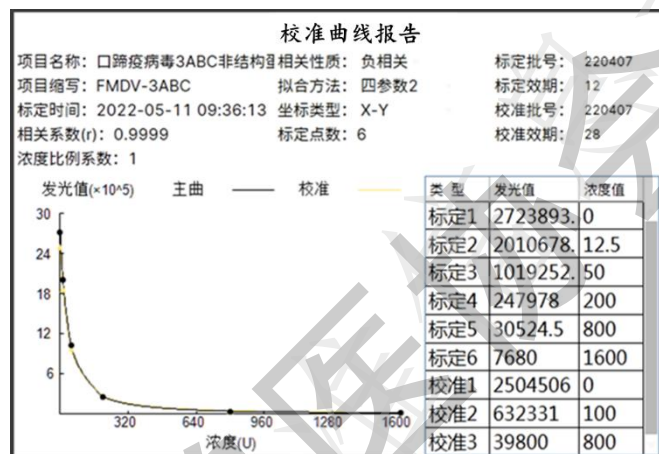
取 B.1 所制备的口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 高浓度血清，用校准品稀释液稀释至抗体含量为 100U、800U，分别为口蹄疫病毒 3ABC 非结构蛋白抗体产品校准品 2、工作校准品 3，工作校准品稀释液定义为 0U，作为工作校准品 1，产品校准品-20℃保存备用，36 个月内有效。

C.2 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体质控品制备

取 B.1 所制备的口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 高浓度血清，用校准品稀释液稀释至抗体含量为 12.5 U 和 200 U，分别为口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体质控品 1 和质控品 2，用口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 管式化学发光免疫分析方法检测 5 次，计算平均值，质控范围为 $\text{Mean} \pm 3\text{SD}$ 。质控品-20℃保存备用，36 个月内有效。

附录 D
(资料性)
校准曲线实例参照

口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体检测校准曲线, 标定 1~标定 6 分别是工作校准品 1~工作校准品 6 的检测结果, 校准 1~校准 3 分别为产品校准品 1~产品校准品 3 的检测结果, R 值为 0.9999, R₂ 为 0.9998, 相关性较好, 如图 D.1 为口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体检测校准曲线的参考图。其中标定 1~标定 6 发光值范围如表 D.1 所示。



注: 横坐标为校准品抗体浓度, 纵坐标为检测发光值。

图D.1 口蹄疫病毒3ABC非结构蛋白抗体检测校准曲线

表D.1 工作校准品标定发光值范围

| 名称 | 范围 |
|------|----------------------------|
| 标定 1 | 2523969.55 U~ 3546596.17 U |
| 标定 2 | 1245251.68 U~ 2989450.90 U |
| 标定 3 | 637722.68 U~ 1942262.46 U |
| 标定 4 | 121241.23 U~ 278123.34 U |
| 标定 5 | 10564.17 U~ 34009.54 U |
| 标定 6 | 925.25 U~ 10497.75 U |