

# 《口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法》

## 编制说明

### 一、工作简况

#### (一) 任务来源

口蹄疫 (food-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的急性、烈性、高度传染性和快速远距离传播的重大动物疫病。临床症状表现为发热, 口腔、舌面、蹄部等部位有水泡形成, 之后逐渐破溃形成结痂。成年动物感染口蹄疫后大部分可康复, 但有约 50% 甚至更多的感染动物会形成持续感染。近年我国主要流行 FMDV-O 型和 FMDV-A 型。其中, 我国流行最广泛、最频繁的是 FMDV-O 型, 呈地方性流行, 牛、猪、羊等多种偶蹄动物均易感, 部分 O 型流行毒株已出现变异, 影响部分疫苗防控效果。并且口蹄疫疫苗研发相对滞后, 难以确保疫苗与优势流行毒株高度匹配; 隐性感染动物可能无症状, 缺乏简便、快速、高效的检测试剂盒, 导致疫情发现滞后; 生物安全管理难度大。

因此, 建立科学快速有效的检测方法才能正确诊断和有效遏制口蹄疫的流行。鉴于此, 按照“河北省畜牧兽医学会关于启动 2025 年团体标准立项项目起草工作的通知”制定, 河北省畜牧兽医学会提出《口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法》团体标准制定申请, 经河北省畜牧兽医学会 2025 年团体标准立项研讨会审定, 予以立项, 立项编号 9。

#### (二) 起草单位

本文件起草单位: 河北省动物疫病预防控制中心、天津测易生物科技有限公司、唐山市动物疫病预防控制中心、廊坊市动物疫病预防控制中心、保定市动物疫病预防控制中心、沧州市动物疫病预防控制中心、邢台市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人: 韩庆安、张晓利、吴志国、董李学、王宏宇、李翀、叶

树华、刘天驹、刘志勇、张志刚、张腾帅、殷克勇、张承礼、何岩、杨刚、王猛、王小月、孙月川、陈彦丽、常丽云、商靛、王睿尧、郑润辉、李静、苏晓梅、张丽颖、董红艳、齐晓亮、郭艳霞、刘泽霖、严博悦、赵研、刘志昌、霍宏宇、李晓琳、陈锡俊、孙伟珊、赵秀英、曹琪、董建伟。韩庆安（河北省动物疫病预防控制中心）和张晓利（唐山市动物疫病预防控制中心）：负责标准编制方案的制定，主持和制订标准全面工作、任务分工及联系标准意见征求和技术复核专家与单位。吴志国（沧州市动物疫病预防控制中心）、董李学（唐山市动物疫病预防控制中心）、叶树华（廊坊市动物疫病预防控制中心）、刘天驹（河北省动物疫病预防控制中心）：负责实验设计方案与验证方案制订、标准初稿的起草与征求意见后的修订；刘志勇（唐山市动物疫病预防控制中心）、张志刚（廊坊市动物疫病预防控制中心）、王宏宇（河北省动物疫病预防控制中心）：负责样品的筛选与处理。李翀、张腾帅、殷克勇（河北省动物疫病预防控制中心）：负责实验方法的建立以及优化；张承礼（沧州市动物疫病预防控制中心）和何岩（河北省动物疫病预防控制中心）：负责特异性、敏感性、重复性试验等实验室操作；杨刚和王猛（河北省动物疫病预防控制中心）：负责标准背景资料收集、试验结果统计分析；王小月、孙月川和陈彦丽（唐山市动物疫病预防控制中心）：负责临床样品采集；常丽云、商靛、王睿尧、郑润辉、李静（唐山市动物疫病预防控制中心）：负责实验材料的准备，参与技术标准化、标准初稿修订；苏晓梅（沧州市动物疫病预防控制中心）、张丽颖（廊坊市动物疫病预防控制中心）、董红艳（廊坊市动物疫病预防控制中心）、齐晓亮（邢台市动物疫病预防控制中心）、郭艳霞（邢台市动物疫病预防控制中心）、刘泽霖（保定市动物疫病预防控制中心）：负责验证实验的组织汇总；严博悦、赵研、刘志昌、霍宏宇、李晓琳（保定市动物疫病预防控制中心）：负责征集意见的组织安排工作；陈锡俊、孙伟珊、赵秀英、曹琪、董建伟（天津测易生物科技有限公司）：负责征求意见后的修改等工作。

### （三）主要工作过程

#### 1. 预研阶段

在研究项目的资助下，开展口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法规

范标准的起草工作。首先成立了标准起草技术专家小组，研讨标准框架、内容以及涉及技术方法；其次根据项目任务书的要求，按照技术专家小组研究确定的标准起草内容，组织相关技术领域专家，成立标准起草编制工作组，编制工作组根据要求和制定的方案，开展本标准制定工作。

## 2. 起草阶段

标准起草编制工作组对现有的文献和标准技术库的相关材料进行了查阅和梳理，明确了现有的口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法，这些技术资料主要有两类：（1）国内相关诊断技术标准、规范、法律、法规等，包括《口蹄疫病毒 O 型磁微粒化学发光抗体检测方法》（T/CVMA 170-2024）、《口蹄疫 A 型病毒磁微粒化学发光抗体检测方法》（T/CVMA 164-2024）等；（2）诊断技术研发资料，如间接血凝试验、化学发光抗体实验、免疫荧光抗体试验、酶联免疫吸附试验（ELISA）和聚合酶链式反应（PCR）等中、外文文章、专利等资料。

标准起草编制工作组成员结合自己实验室前期研究成果，按照标准撰写技术资料，包括《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1-2020）和《标准编写规则—第 4 部分：试验方法标准》（GB/T 20001.4-2015）的要求完成《口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法》初稿的撰写。

### 3. 征求意见阶段

### 4. 审查阶段（未经审查的不写本部分）

### 5. 报批阶段（未报批的不写本部分）

## 二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

### （一）标准的编写原则

- 1、本标准编制遵循“先进性、实用性、创新性、规范性”的原则，注重标准的通用性、适用性和可操作性，同时符合我国国情。
- 2、本标准编制格式符合 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。

### （二）提出本标准的依据

本标准依据起草单位科研成果、参考有关文献资料，采用磁微粒化学发光免疫分析技术，同时通过实验室研究验证并参考其他资料后经验证制定口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法。

本标准规定了口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测的技术原理、试剂与耗材、仪器设备、试验前准备及样品检测、结果判定等。

本标准适用于牛、羊和猪等偶蹄动物血清样品中口蹄疫病毒抗体定量检测。

### （三）制定本标准的基础

本项目起草人员为中国动物疫病预防控制岗位专家，本项目起草负责人所在实验室从事口蹄疫等疫病研究已达 20 余年，完成了多项省部级科研项目。系统开展了口蹄疫的病原学与流行病学、诊断、防控技术等研究，发表相关研究论文 30 余篇，因此在口蹄疫的病原检测与防控技术方面有雄厚的研究工作基础。同时本项目起草工作组依托山东省动物疫病预防与控制中心猪病检测实验室，联合天津市动物疫病预防控制中心，北京市动物疫病预防控制中心等多家省级动物疫病预防控制中心共同研究。具有良好的实验设备，具备制定本标准的技术水平与实力。

### （四）实验内容

本标准给出了口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测的技术原理、操作步骤与结果判定的指南，其主要目的是提出一个规范且快速高效的定量检测口蹄疫病毒抗体的方法，为兽医临床工作者提供参考。

### （五）实际应用效果

采用本标准定量磁微粒化学发光抗体检测方法，将检测实验室采集到的不同地区的 30 份临床样品进行试验，符合率 100%。

三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

## （一）主要试验或验证的分析

口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法是以前联链霉亲和素的磁微粒作为固相载体，以生物素标记的口蹄疫病毒重组蛋白为捕获抗原，吖啶酯（Acridinium ester, AE）标记的口蹄疫病毒抗体作为检测抗体，最后加入发光底物液，旨在建立一种新型的口蹄疫病毒全自动磁微粒 CLIA 抗体定量检测方法，同时配套全自动化学发光免疫分析仪，克服 ELISA、板式 CLIA 等检测方法重复性差、操作繁琐等缺点，实现对口蹄疫病毒抗体的定量、快速、自动化检测。并且灵敏度和特异性高，稳定性好，保存期长，检测效果好，适用于成组病原体的检测，可以为兽医临床工作者提供较为充分的诊断以及鉴别不同病原体感染的依据，缩短兽医临床工作者的诊断时间，加快实施疫病处理措施。

本标准中临床诊断方法，主要依据相关专业材料（中外文文献、书籍、标准等）和专业技术人员的经验经实际研究改进后建立。

本标准中口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法，主要是通过对猪、牛、羊等偶蹄动物血清中口蹄疫病毒抗体含量的检测，以达到实际生产中监测偶蹄动物免疫水平的目的。

### 1 材料

#### 1.1 试剂和材料

##### 1.1.1 反应杯。

1.1.2 猪瘟、猪伪狂犬、牛病毒性腹泻、牛传染性鼻气管炎、小反刍兽疫与口蹄疫阳性血清样品

##### 1.1.3 预激发液和激发液。

1.1.4 口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测配套试剂盒（天津测易生物科技有限公司）

##### 1.1.5 20×清洗液

#### 1.2 仪器和设备

##### 1.2.1 全自动化学发光免疫分析仪 CY-9000

##### 1.2.2 生物安全柜

##### 1.2.3 高速冷冻离心机（12000 rpm）

##### 1.2.4 电子天平

1.2.5 可调单道移液器（0.1 μL~2.5 μL，2 μL~20 μL，20 μL~200 μL，100 μL~1000 μL）

1.2.6 冰箱

## 2 方法

### 2.1 样品的采集及运输

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℃~8℃条件下保存，若超过一周检测，应置于-20℃以下冷冻保存。血清样本运输时应注意冷藏。

### 2.2 样品处理

取 7.1 中的样品，8000 rpm，离心 2 min，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，轻微操作，避免出现泡沫。

### 2.3 溶液配制

洗涤液：将 20×浓缩洗液用无离子水或蒸馏水 1:20 倍稀释，装入洗涤液桶。去离子水或蒸馏水均应符合 GB/T 6682 的要求。

### 2.4 曲线拟合

将 FMDV-O 抗体工作校准品 1~工作校准品 6 放入样本架，在全自动化学发光免疫分析仪上点击 FMDV-O-Ab 检测项目，所有工作校准品重复检测三次，点击“开始”进行检测。

将工作校准品 1~工作校准品 6 对应的抗体滴度和发光值代入到云平台进行曲线拟合计算表中生成标准曲线（如图 1）并生成试剂曲线后提交生成试剂曲线二维码。

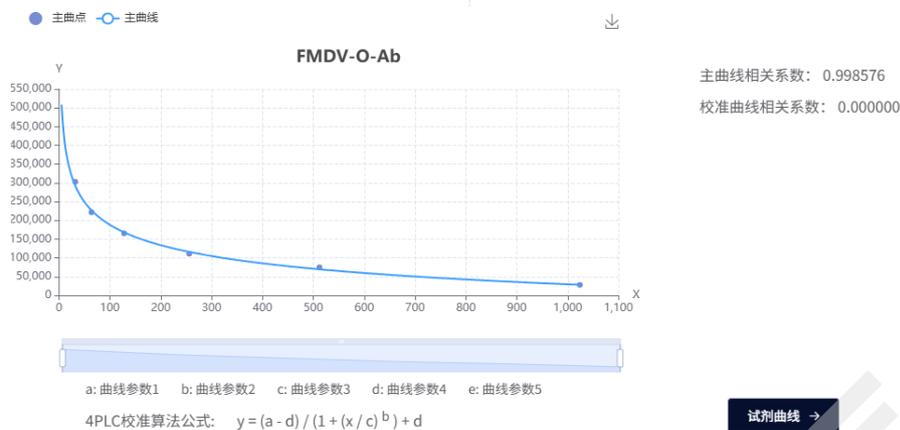


图 1. FMDV-O 抗体工作校准品标准曲线

## 2.5 试剂校准

将口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法的反应程序、标准曲线、校准品通过二维码扫描导入仪器系统，选择校准-选择校准试剂批号-选择校准品批号，将校准品 2、校准品 4 放入相应的样本位，点击开始，待仪器校准完成后进行重复性、敏感性和特异性试验。

## 2.6 重复性测试

校准完成后，按照口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法，将校准品

1、校准品3、校准品6放入样本位进行重复20次检测，计算方差，CV值≤3%

## 2.7 敏感性试验

分别采用行业内知名且高认可度公司的同类产品检测方法和口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法，对已知背景的 30 份临床血清样品进行检测，统计本方法对临床血清样品的检出率，并与行业内知名且高认可度公司的同类产品检测本方法检测结果进行对比。

## 2.8 特异性试验

按照口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法检测已知口蹄疫病毒阴性的猪瘟阳性血清、猪伪狂犬阳性血清、牛病毒性腹泻阳性血清、牛传染性气管炎阳性血清、小反刍兽疫阳性血清与口蹄疫阳性血清样品各 10 份，共 60 份血清临床样品。

## 3 结果

带格式的：缩进：首行缩进： 2 字符

### 3.1 重复性实验结果

将校准品 1、校准品 3、校准品 6 按照口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法进行重复性检测。结果表明口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法稳定性符合预期，CV 值均小于 5%。如表 1 所示。

表 1. 工作校准品重复性检测结果

样品名称	样品编号	口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测		
		发光值 RFU	抗体效价 (1:X)	CV 值
校准品 1	1	29966	995.72	3.52%
	2	29460	1004.70	
	3	27630	1037.98	
	4	29184	1009.64	
	5	29761	999.35	
	6	27139	1047.12	
	7	29728	999.93	
	8	29121	1010.77	
	9	27091	1048.02	
	10	27203	1045.93	
	11	27117	1047.54	
	12	29056	1011.94	
	13	27487	1040.63	
	14	27792	1034.98	
	15	29019	1012.60	
	16	27452	1041.28	
	17	28626	1019.71	
	18	28055	1030.14	
	19	28829	1016.03	
	20	29076	1011.58	
校准品 3	1	70248	507.29	2.29%
	2	70371	506.30	
	3	69703	511.69	
	4	68710	519.81	
	5	69614	512.41	
	6	68236	523.75	

7	72477	489.76		
8	67399	530.78		
9	68723	519.71		
10	66991	534.24		
11	71411	498.05		
12	70512	505.17		
13	71078	500.68		
14	67557	529.44		
15	70008	509.22		
16	70757	503.22		
17	71598	496.58		
18	68265	523.50		
19	70124	508.29		
20	67145	532.93		
<hr/>				
1	287587	33.64		
2	302334	29.07		
3	298372	30.23		
4	286544	34.00		
5	305065	28.31		
6	300027	29.74		
7	300332	29.65		
8	302459	29.04		
9	276528	37.63		
10	304295	28.52		
校准品 6	11	302564	29.01	2.47%
	12	299341	29.94	
	13	301501	29.31	
	14	301307	29.37	
	15	300913	29.48	
	16	300433	29.62	
	17	305603	28.16	
	18	301738	29.24	
	19	305773	28.12	
	20	304506	28.47	

### 3.2 敏感性试验结果

分别采用行业内知名且高认可度公司的同类产品检测方法和口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法，对已知背景的 30 份临床样品进行检测，结果显示口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法对临床样品的阳性检出率为 100%，与行业内知名且高认可度公司的同类产品检测结果一致。具体结果见表 3。

表 2. 口蹄疫病毒国家参考品敏感性试验结果

样本编号	行业内知名且高认可度公	口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测		
	司的同类产品检测结果	发光值 RFU	抗体效价 (1:X)	结果
1	360	86675	393.33	阳性
2	>64	218178	70.50	阳性
3	512	70357	506.41	阳性
4	360	82404	419.79	阳性
5	>512	30941	978.68	阳性
6	>512	41130	819.55	阳性
7	>64	195995	91.18	阳性
8	<32	311886	26.50	阴性
9	>256	86911	391.92	阳性
10	256	116096	255.84	阳性
11	45	262669	43.42	阴性
12	256	123299	231.32	阳性
13	>128	159702	142.51	阳性
14	128	177490	114.02	阳性
15	>512	52501	676.41	阳性
16	256	117471	250.93	阳性
17	<32	343423	19.71	阴性
18	64	258502	45.36	阴性
19	>64	180474	109.92	阳性
20	128	168415	127.62	阳性
21	>512	58842	609.35	阳性
22	32	291382	32.39	阴性
23	1024	29267	1008.15	阳性
24	32	277838	37.13	阴性
25	128	187283	101.19	阳性

26	64	229796	61.88	阴性
27	>128	133858	200.17	阳性
28	>128	137549	190.46	阳性
29	>256	77846	450.36	阳性
30	>1024	18289	1229.29	阳性

### 3.3 特异性试验结果

通过口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法对已知背景的 60 份血清临床样品的检测，发现该方法具有良好的特异性。结果如表 3 所示。

表 3. 60 份血清临床样品特异性试验结果

样品名称	口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测			
	样品编号	发光值 RFU	抗体浓度 (1:X)	判定结果
猪瘟阳性血清样品	1#	498103	0	阴性
	2#	485892	0	阴性
	3#	476265	0	阴性
	4#	479036	0	阴性
	5#	472519	0	阴性
	6#	476080	0	阴性
	7#	471294	0	阴性
	8#	488462	0	阴性
	9#	497630	0	阴性
	10#	490844	0	阴性
猪伪狂犬病阳性血清样品	1#	495995	0	阴性
	2#	496556	0	阴性
	3#	479455	0	阴性
	4#	493457	0	阴性
	5#	475027	0	阴性
	6#	477153	0	阴性
	7#	474097	0	阴性
	8#	481785	0	阴性
	9#	470200	0	阴性
	10#	480843	0	阴性
牛病毒性腹泻阳性血清样品	1#	490251	0	阴性
	2#	474946	0	阴性

	3#	485649	0	阴性
	4#	475587	0	阴性
	5#	473991	0	阴性
	6#	474955	0	阴性
	7#	473100	0	阴性
	8#	484470	0	阴性
	9#	474442	0	阴性
	10#	471683	0	阴性
<hr/>				
	1#	477240	0	阴性
	2#	484298	0	阴性
	3#	498342	0	阴性
	4#	497331	0	阴性
牛传染性鼻气管炎阳性血清样品	5#	483047	0	阴性
	6#	497834	0	阴性
	7#	481596	0	阴性
	8#	479230	0	阴性
	9#	487406	0	阴性
	10#	495832	0	阴性
<hr/>				
	1#	490707	0	阴性
	2#	482865	0	阴性
	3#	487445	0	阴性
	4#	493239	0	阴性
小反刍兽疫阳性血清样品	5#	477824	0	阴性
	6#	471499	0	阴性
	7#	498356	0	阴性
	8#	476723	0	阴性
	9#	474984	0	阴性
	10#	495028	0	阴性
<hr/>				
	1#	28682	1018.69	阳性
	2#	17376	1250.11	阳性
口蹄疫阳性血清	3#	28874	1015.22	阳性
	4#	19111	1210.89	阳性
	5#	47219	738.93	阳性

6#	37844	867.32	阳性
7#	24606	1095.83	阳性
8#	39645	840.75	阳性
9#	37825	867.61	阳性
10#	47753	732.31	阳性

### 3.4 CUT OFF 值设定

校准品稀释液梯度稀释制备的高免血清,按照 GB/T 18935 中的口蹄疫病毒 GB/T 18935 方法进行病毒中和试验(VNT)检测抗体水平,定义能中和 100 TICD<sub>50</sub> 的病毒的阳性孔对应的最大稀释倍数的样本效价为 1:64,则样本抗体效价 $\geq$ 1:64 时,判为 FMDV 抗体阳性;抗体含量 $<$ 1:64 判为 FMDV 抗体阴性。

#### (二) 预期的经济效果

口蹄疫可快速在猪、牛、羊等偶蹄动物中传播,导致动物口腔黏膜、蹄部出现水疱溃疡,引发高热、跛行、食欲废绝及幼畜高死亡率。因此,开展口蹄疫诊断对保障健康养殖和促进畜牧产业发展具有重要意义。本标准制定的口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法提升了该病的诊检效率,降低了该病导致的经济损失,提高了我国生猪养殖业的经济效益。

#### (三) 真实性验证

送审前,将本检测方法送至三家有资质实验室进行验证。

### 四、采用国际标准和国外先进标准的程度

目前国际/国外均无口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法的相关技术标准,本标准采用定量竞争磁微粒化学发光法,提出了口蹄疫病毒抗体阴阳性判定标准,根据判定标准的即可判定为口蹄疫病毒抗体的阴阳性。

### 五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

该项目遵循国内现行法律法规,与国家标准、行业标准无冲突和交叉。

### 六、重大分歧意见的处理经过和依据

无

### 七、标准性质(强制性,推荐性)的建议,特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

建议将本标准批为推荐性标准。

带格式的: 段落间距段前: 0.1 行, 段后: 0.1 行

八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）

标准发布后，为有效贯彻实施，建议农业部相关部门确定培训对象，委托标准起草单位举办全国技术培训班，对有关技术人员进行相关技术强化操作培训，培训效果要达到：懂原理、操作熟练、判定准确，回单位能够独立工作。

九、

九、废止现行有关标准的建议：

无

十、其他应予说明的事项。

无

十一、标准中涉及专利的情况说明

无