

ICS XX.XXX

CCS X XX

T/HBAAV

河北省畜牧兽医学会团体标准

T/HBAAV XXXX—XXXX

口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

河北省畜牧兽医学会 发布

河北省畜牧兽医学会

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。

本文件由河北省畜牧兽医学会提出并归口。

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、商靓、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。

口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法

1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒定量磁微粒化学发光抗体检测方法的技术原理、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。

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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 技术原理

采用磁微粒化学发光——竞争法原理进行检测。待测血清中的FMDV抗体与吖啶酯标记的FMDV单克隆抗体竞争性的结合生物素标记的FMDV灭活液抗原，同时FMDV灭活液抗原标记的生物素与磁珠上的链霉亲和素发生特异性亲和反应，形成磁珠-抗原-抗体复合物；预激发液和激发液催化该复合物上的吖啶酯发出光子，发光强度与待检血清中FMDV抗体的含量成反比。

5 试剂与耗材

5.1 磁微粒工作液

偶联链霉亲和素的磁性微粒，按照附录 A 制备。

5.2 抗原工作液

生物素标记的 FMDV 病毒灭活液，按照附录 B 制备。

5.3 抗体工作液

吖啶酯标记的 FMDV 单克隆抗体，按照附录 C 制备。

5.4 校准品、阳性对照和阴性对照

按照附录 D 制备。

5.5 20×浓缩洗涤液

按照附录 E.1 制备。

5.6 样品稀释液

按照附录 E.2 制备。

5.7 预激发液

按照附录 E.4 制备。

5.8 激发液

按照附录 E.5 制备。

5.9 其他相关试剂

按照附录 E.6、E.7 制备。

5.10 试剂船

适用于全自动化学发光免疫分析系统 CY-918、CY-968、CY-3000、CY-6000、CY-9000。

5.11 1.5 mL/2 mL 离心管

5.12 一次性采血器（5 mL、10 mL）

5.13 1.5 mL 无菌离心管

6 仪器设备

6.1 离心机

6.2 全自动化学发光免疫分析仪

6.3 2℃~8℃冰箱

6.4 -20℃冰箱

6.5 恒温培养箱（温度 37℃）

6.6 专用样品架

6.7 可调单道移液器（20 μL~200 μL, 100 μL~1000 μL）

6.8 电子天平

7 试验前准备及样品检测

7.1 样品采集、保存与运输

按照《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》（NY/T 541）进行。

样品保存和运输时应确保样品有效按照《兽医实验室生物安全要求通则》（NY/T 1948）进行样品的生物安全标识。

检测前样品处理应在 BSL-II 级生物安全柜中操作，处理过程应符合生物安全规定。

7.2 样品准备

将待检样品从 2℃~8℃或-20℃冰箱取出，静置至室温。

7.3 溶液配制

洗涤液：将 20×浓缩洗涤液用无离子水或蒸馏水 1:20 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。

7.4 仪器准备

按设定的反应程序设置仪器参数，放置反应杯，扫描含有本方法反应程序等信息的二维码并导入仪器系统，放置底物和系统维护液，开机自检，待仪器自检、系统维护完成后，方可进行样品检测。

7.5 试剂准备

将磁微粒工作液、抗原工作液、抗体工作液分别装入试剂船上的对应试剂瓶中,将磁微粒吹打混匀,试剂瓶盖换为胶盖;将试剂船装入试剂仓中。

7.6 样品检测

取待检样品/阴性对照/阳性对照/校准品于 1.5 mL/2 mL 离心管中(样品量需 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 15 μ L 待测样品,20 μ L 磁微粒工作液、50 μ L 抗体工作液、50 μ L 抗原工作液,分别加入反应杯中,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min;

b) 清洗:使用磁铁吸附磁微粒 30 s,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 30 s 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 30 s 悬浮磁微粒,检测发光值 RLU。

d) 检测完毕则清空废液、废料桶,管路清洗后关闭电源。

8 结果判定

8.1 结果计算

PI 值=(样品发光值/阴性对照发光值) \times 100%。

将样品发光值代入拟合的四参数标准曲线中,计算样品中的口蹄疫病毒抗体效价。

8.2 试验成立条件

阳性对照平均 PI 值 $<$ 20%,阴性对照平均 PI 值 $>$ 90%,试验结果成立。

8.3 建立标准曲线

将校准品1~校准品6上机,仪器自动识别检测,生成标准曲线。

8.4 阴阳性判定依据

抗体效价 \geq 1:64 时,判为 FMDV 病毒抗体阳性;抗体效价 $<$ 1:64 时,判为 FMDV 病毒抗体阴性。

附录 A
(规范性)
磁微粒工作液的制备

10 mg/mL的链霉亲和素磁珠使用样品稀释液稀释40倍，混匀后，无菌分装，置于2 ℃~8 ℃保存。

附录 B
(规范性)
抗原工作液的制备

B.1 生物素标记抗原的制备

在制备前，取1 mg Biotin平衡至室温后加入180 μ L超纯水，溶解混匀后，加入含13.5 mg FMDV的灭活病毒液，充分混匀后室温静置60 min。向超滤管中加入上述偶联液，PBS补齐至管顶的白线，12000 rpm，4 $^{\circ}$ C离心10 min，弃掉废液，PBS洗三次，回收偶联液。将回收的偶联液转移至干净的离心管中，然后加入等体积甘油，记录终体积及终浓度，贴好标签，置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

B.2 抗原工作液的制备

将制备好的生物素标记抗原用样品稀释液稀释至抗原终浓度为3 μ g/mL，经0.22 μ m滤器过滤除菌后，无菌分装，贴好标签，置于2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存备用。

附 录 C
(规范性)
抗体工作液的制备

C.1 吡啶酯标记抗体的制备

取7.89 mg处理好的(CB溶液溶解, 2 mg/mL) FMDV-0单抗/FMDV-A单抗, 加入2 mg/mL的吡啶酯工作液180 μ L, 充分混匀, 室温静置60 min。按照总体积1%的比例添加10% 甘氨酸, 充分混匀, 室温静置10 min, 终止反应。向超滤管中加入上述偶联液, PBS补齐至管顶的白线, 12000 rpm, 4 $^{\circ}$ C离心10 min, 弃掉废液, PBS洗三次, 回收偶联液。按85%的回收率计算质量。要求浓缩后的浓度在2 mg/mL~4 mg/mL范围内。将回收的偶联液转移至干净的离心管中, 然后加入等体积甘油, 记录终体积及终浓度, 贴好标签, 置于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

C.2 抗体工作液的制备

将制备好的吡啶酯标记抗体用样品稀释液稀释至抗体终浓度为2 μ g/mL, 经0.22 μ m滤器过滤除菌后, 无菌分装, 贴好标签, 置于2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存备用。

附录 D

(规范性)

校准品、阳性对照和阴性对照的制备

D.1 校准品的制备

D.1.1 免疫与采血

使用口蹄疫0型、A型二价灭活疫苗对3至6周龄的猪进行免疫，且该免疫猪群需为口蹄疫0型、A型抗原和抗体检测呈阴性的群体。按每头猪1头份的剂量耳背后肌肉注射，可进行3次~4次免疫。在初次免疫后21 d进行加强免疫，14 d后检测抗体水平，对采集的血清样品，按照 GB/T 18935 中的口蹄疫病毒中和试验(VNT)检测抗体水平。若抗体水平大于1:1024，则为合格的原始高免血清。如达不到要求，再进行第3次、第4次免疫。抗体水平达到要求后，采集颈部静脉血。

D.1.2 血清制备、分装及保存

3000 rpm离心10 min，分离血清，然后用0.22 μm滤器过滤除菌，加入Proclin300，使终浓度为0.05% (V/V)，无菌分装，置于-20℃保存备用。

D.1.3 校准品的制备

取已知抗体效价的原始高免血清，用新生牛血清作为稀释液，将原始高免血清稀释至抗体效价分别为1:1024、1:512、1:256、1:128、1:64、1:32，分别作为校准品1、校准品2、校准品3、校准品4、校准品5、校准品6，置于-20℃保存备用。

D.2 阳性对照的制备

D.2.1 免疫与采血

同附录D.1.1。

D.2.2 血清制备、分装及保存

3000 rpm离心10 min，分离血清，然后用0.22 μm滤器过滤除菌，加入Proclin300，使终浓度为0.05% (V/V)，无菌分装，作为阳性对照，置于-20℃保存备用。

D.3 阴性对照的制备

阴性对照为样品稀释液。其制备方法参见附录E.2。

附 录 E
(规范性)
试剂的制备

E.1 20×浓缩洗涤液制备

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

表1 20×浓缩洗涤液配方

名称	化学分子式	CAS号	称量
磷酸氢二钠	Na_2HPO_4	7558-79-4	58 g
磷酸二氢钠	NaH_2PO_4	7558-80-7	5.92 g
氯化钠	NaCl	7647-14-5	170 g
吐温-20	$\text{C}_{58}\text{H}_{113}\text{O}_{26}$	9005-64-5	10 mL

E.2 样品稀释液制备

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

表2 样品稀释液配方

名称	化学分子式	CAS号	称量
磷酸二氢钾	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26399-70-2	0.2 g
磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7558-79-4	2.9 g
氯化钠	NaCl	7647-14-5	8.0 g
氯化钾	KCl	7447-40-7	0.2 g
吐温-20	$\text{C}_{58}\text{H}_{113}\text{O}_{26}$	9005-64-5	0.5 mL
牛血清白蛋白	—	94349-60-7	10 g
蔗糖	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	57-50-1	10 g
海藻糖	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	99-20-7	30 g
ProClin 300	—	96118-96-6	2 mL

E.3 PBS 制备

按表3中的试剂依次加入烧杯中,加入800 mL纯化水搅拌溶解,调节pH至7.4,再加纯化水定容至1000 mL,21℃,0.1 MPa高压灭菌20 min后,置于室温保存备用。

表3 PBS 配方

名称	化学分子式	CAS号	称量
磷酸二氢钾	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26399-70-2	0.2 g
磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7558-79-4	2.9 g
氯化钠	NaCl	7647-14-5	8.0 g

氯化钾	KCl	7447-40-7	0.2 g
-----	-----	-----------	-------

E.4 预激发液

含有 0.125%~1%的二甲基甲酰胺 (C₃H₇NO, CAS 号: 68-12-2) 或乙醇 (C₂H₆O, CAS 号: 64-17-5) 和 0.125%~1%吐温-20 (C₅₈H₁₁₃O₂₆, CAS 号: 9005-64-5) 的 H₂O₂, 置于 2℃~8℃保存备用。

E.5 激发液

含有 0.125%~1%的二甲基甲酰胺 (C₃H₇NO, CAS 号: 68-12-2) 或乙醇 (C₂H₆O, CAS 号: 64-17-5) 和 0.125%~1%吐温-20 (C₅₈H₁₁₃O₂₆, CAS 号: 9005-64-5) 的 NaOH, 置于 2℃~8℃保存备用。

E.6 CB 溶液

称取 1.59 g 碳酸钠 (Na₂CO₃, CAS 号: 497-19-8) 和 2.93 g 碳酸氢钠 (NaHCO₃, CAS 号: 144-55-8), 加纯化水至 900 mL, 调 pH 值到 9.6, 定容到 1000 mL。121℃, 0.1 MPa 高压蒸汽灭菌 20 min 后, 置于室温保存备用。

E.7 10%甘氨酸

称取 100 g 甘氨酸 (C₂H₅NO₂, CAS 号: 56-40-6), 加纯化水至 900 mL, 定容到 1000 mL。经 0.22 μm 滤器过滤, 无菌分装, 置于 2℃~8℃保存备用。

附录 F
(资料性)
标准曲线的建立

以抗体效价的倒数为横坐标，以发光值RLU为纵坐标，拟合四参数标准曲线。

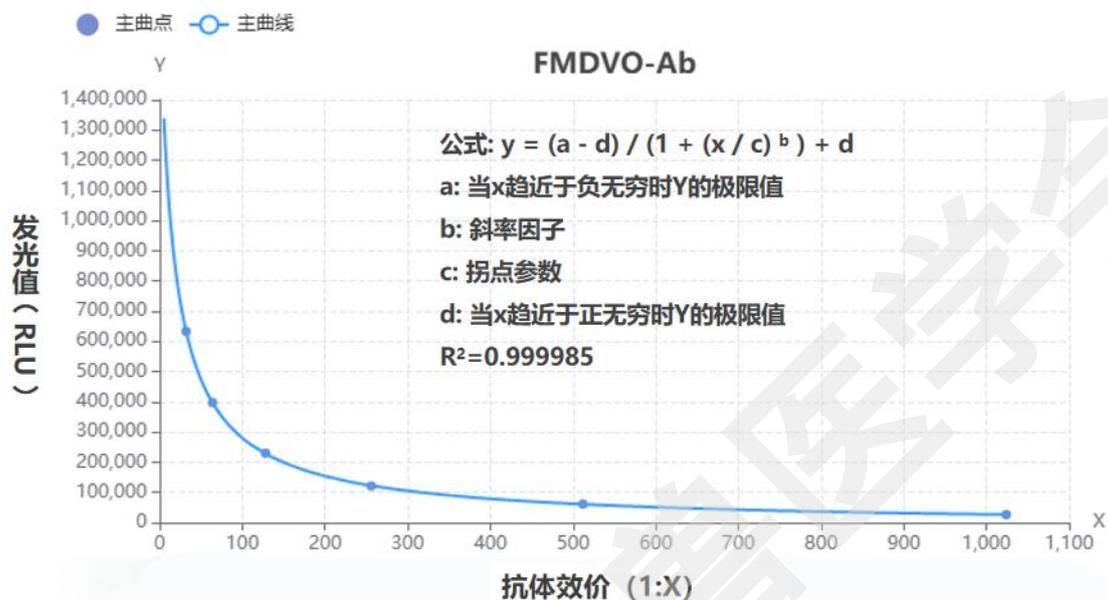


图 F. 1 标准曲线