



中华人民共和国国家标准

GB/T 18935—2018
代替 GB/T 18935—2003

口蹄疫诊断技术

Diagnostic techniques for foot and mouth disease

郑州中道生物技术有限公司 (仅供下载)
www.hnzdsw.com 0371-67856961

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会



目 次

前言	V
引言	VI
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 缩略语	1
4 临床诊断	1
4.1 易感动物	1
4.2 临床症状	2
4.3 病理变化	2
4.4 结果判定	2
5 实验室诊断样品采集	2
5.1 器材	2
5.2 试剂	2
5.3 样品采集	2
5.4 样品处理	3
6 病毒分离	3
6.1 器材	3
6.2 试剂	4
6.3 试验动物与细胞	4
6.4 试验程序	4
6.5 病毒鉴定	5
6.6 结果判定	5
7 定型酶联免疫吸附试验(定型 ELISA)	5
7.1 器材	5
7.2 试剂	5
7.3 试验程序	6
7.4 试验成立条件	6
7.5 结果判定	6
8 多重反转录-聚合酶链式反应(多重 RT-PCR)	6
8.1 器材	6
8.2 引物	7
8.3 试剂	7
8.4 样品准备	8
8.5 试验程序	8
8.6 试验成立条件	9
8.7 结果判定	9

9	定型反转录-聚合酶链式反应(定型 RT-PCR)	9
9.1	器材	9
9.2	引物	9
9.3	试剂	9
9.4	样品准备	9
9.5	试验程序	9
9.6	试验成立条件	10
9.7	结果判定	10
10	病毒 VP1 基因序列分析	10
10.1	器材	10
10.2	引物	10
10.3	试剂	10
10.4	样品准备	10
10.5	试验程序	10
10.6	试验成立条件	11
10.7	结果判定与分析	11
11	荧光定量反转录聚合酶链式反应(荧光定量 RT-PCR)	11
11.1	器材	11
11.2	引物和探针	11
11.3	试剂	11
11.4	样品准备	12
11.5	试验程序	12
11.6	试验成立条件	12
11.7	结果判定	12
12	病毒中和试验(VN)	12
12.1	器材	12
12.2	试剂	12
12.3	试验程序	13
12.4	试验成立条件	13
12.5	结果判定	13
13	液相阻断酶联免疫吸附试验(LPB-ELISA)	14
13.1	器材	14
13.2	试剂	14
13.3	对照血清	14
13.4	试验程序	14
13.5	试验成立条件	14
13.6	结果判定	14
14	固相竞争酶联免疫吸附试验(SPC-ELISA)	15
14.1	器材	15
14.2	试剂	15
14.3	试验程序	15

14.4	试验成立条件	15
14.5	结果判定	15
15	非结构蛋白 3ABC 抗体间接酶联免疫吸附试验(3ABC-I-ELISA)	15
15.1	器材	15
15.2	试剂	16
15.3	试验程序	16
15.4	试验成立条件	16
15.5	结果计算与判定	16
16	非结构蛋白 3ABC 抗体阻断酶联免疫吸附试验(3ABC-B-ELISA)	16
16.1	器材	16
16.2	试剂	16
16.3	试验程序	17
16.4	试验结果有效性判定	17
16.5	结果判定	17
17	综合判定	17
附录 A (规范性附录)	样品保存液和细胞培养液	18
附录 B (规范性附录)	酶联免疫吸附试验用溶液的配制	20
附录 C (规范性附录)	核酸检测用液体配制	22



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18935—2003《口蹄疫诊断技术》。本标准与 GB/T 18935—2003 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- 增加了临床诊断;
- 删除了微量补体结合试验;
- 取消了查毒试验部分,其相关内容在其他部分规定;
- 删除了病毒感染相关(VIA)抗原琼脂凝胶免疫扩散试验(VIA-AGID),增加了非结构蛋白3ABC抗体间接酶联免疫吸附试验(3ABC-I-ELISA)和非结构蛋白3ABC抗体阻断酶联免疫吸附试验(3ABC-B-ELISA)以替代 VIA-AGID;
- 增加了定型反转录-聚合酶链式反应;
- 增加了病毒 VP1 基因序列分析;
- 增加了荧光定量反转录-聚合酶链式反应。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAG/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:刘湘涛、张强、郭建宏、何继军、刘在新、卢曾军、包慧芳、常惠芸、田宏、郑海学、尚佑军、马军武、吴国华、靳野、林密、马维民、卢永干、朱彩珠。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 18935—2003。

引 言

口蹄疫(Foot and mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus, FMDV)感染引起偶蹄动物的一种急性、烈性、接触性传染病。口蹄疫可造成巨大经济损失和社会影响,世界动物卫生组织(OIE)将口蹄疫列为必须报告的动物传染病,我国规定口蹄疫为一类动物疫病。

口蹄疫的传染源主要为潜伏期感染及临床发病动物。易感动物可通过呼吸道、消化道、生殖道和伤口感染病毒,通常以直接或间接接触(飞沫等)方式传播,或通过人或犬、蝇、蜚、鸟等动物媒介,或经车辆、器具等被污染物传播。如果环境气候适宜,病毒可随风远距离传播。感染动物呼出物、唾液、粪便、尿液、乳、精液及肉和副产品均可带毒。牛羊等反刍动物感染后,病毒可在食道-咽喉部持续带毒。

口蹄疫病毒在分类上属小 RNA 病毒科(*Picornaviridae*),口蹄疫病毒属,有 7 个血清型,即 O、A、Asia 1、C、SAT 1、SAT 2 和 SAT 3 型,各血清型间无交叉免疫保护反应,免疫防控时相当于面临 7 种不同的疫病,血清型鉴定是免疫防控首先要解决的问题。适于口蹄疫诊断的样品是未破裂或刚破裂的水泡皮和水泡液。在不能获得水泡皮和水泡液的情况下,可采集血液和(或)用食道探杯采集反刍动物食道-咽部分泌物样品,这些样品中也存在病毒。未有组织样品的情况下,检测特异性抗体也用于诊断。对组织或液体样品进行病毒分离,检测是否存在口蹄疫病毒抗原或核酸可以作出阳性诊断。如果样品不足或检测结果不确定,可通过反转录聚合酶链反应(RT-PCR),和(或)用敏感细胞培养或吮乳小白鼠对样品中可能存在的核酸或活病毒进行增殖后再用酶联免疫吸附试验(ELISA)或 RT-PCR 进行检测。血清学诊断中,若未接种疫苗的动物体内检出特异性抗体,即可作出阳性诊断,这种方法对温和型病例和不易采到水泡性上皮样品的病例十分有用。检测口蹄疫病毒的某些非结构蛋白抗体可做为曾经或目前病毒感染的证据。用于口蹄疫病毒型别鉴定的方法有定型酶联免疫吸附试验(定型 ELISA)、定型反转录-聚合酶链式反应(定型 RT-PCR),用于口蹄疫病毒抗原和核酸诊断的方法有多重反转录-聚合酶链式反应(多重 RT-PCR)、病毒 VP1 基因序列分析和荧光定量反转录-聚合酶链式反应(荧光定量 RT-PCR),用于口蹄疫病毒结构蛋白抗体检测的方法有病毒中和试验(VN)、液相阻断酶联免疫吸附试验(LPB-ELISA)和固相竞争酶联免疫吸附试验(SPC-ELISA),用于检测口蹄疫病毒非结构蛋白抗体诊断的方法有非结构蛋白(NSP)3ABC 抗体间接酶联免疫吸附试验(3ABC-I-ELISA)和非结构蛋白(NSP)3ABC 抗体阻断酶联免疫吸附试验(3ABC-B-ELISA)。

本标准的修订参考了 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2017 版),并结合我国相关技术研究新成果制定,在技术上与国际先进技术保持一致。

口蹄疫诊断技术

1 范围

本标准规定了口蹄疫(Foot and mouth disease, FMD)临床诊断和实验室诊断的技术要求。
本标准适用于猪、牛、羊等偶蹄动物及其他易感动物口蹄疫的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 19489 实验室 生物安全通用要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE:致细胞病变(Cytopathic effect)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay)

FMD:口蹄疫(Foot and mouth disease)

FMDV:口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus)

HRP:辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)

ID₅₀:半数感染剂量(Median infective dose)

LPB:液相阻断(Liquid phase block)

MEM:最低必需培养基(Minimum essential medium)

NSP:非结构蛋白(Non structural protein)

O-P液:食道-咽喉部分泌物(Oesophageal-pharyngeal fluids)

OPD:邻苯二胺(O-Phenylenediamine)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline buffer)

RNA:核糖核酸(Ribonucleic acid)

RT-PCR:反转录-聚合酶链式反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction)

SPC:固相竞争(Solid phase competition)

TCID₅₀:半数细胞感染量(Median tissue culture infective dose)

TMB:四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine)

VN:病毒中和试验(Virus neutralisation test)

4 临床诊断

4.1 易感动物

偶蹄目动物,包括牛科动物(牛、瘤牛、水牛、牦牛)、绵羊、山羊及所有野生反刍动物和猪科动物对口蹄疫病毒均易感,骆驼科动物易感性较低。马属动物不感染口蹄疫。

4.2 临床症状

- 4.2.1 易感动物卧地不起或跛行,牛可见呆立流涎。
- 4.2.2 易感动物唇部、舌面、齿龈、鼻镜、蹄踵、蹄叉、乳房等部位出现水泡。
- 4.2.3 发病后期,水泡破溃、结痂,严重者蹄壳脱落,恢复期可见瘢痕、新生蹄甲。
- 4.2.4 传播速度快,发病率高;成年动物死亡率低,幼畜常突然死亡且死亡率高,仔猪常成窝死亡。

4.3 病理变化

- 4.3.1 消化道可见水泡、溃疡。
- 4.3.2 幼畜可见骨骼肌、心肌表面出现灰白色条纹,形色酷似虎斑。

4.4 结果判定

易感动物出现上述临床症状和病理变化,可判定为疑似口蹄疫。

确诊应采集有临床症状动物的水泡皮、水泡液,也可采集未见明显临床症状易感动物的血清、反刍动物 O-P 液进行实验室诊断。

5 实验室诊断样品采集

5.1 器材

- 5.1.1 食道探杯。
- 5.1.2 猪扁桃体取样器。
- 5.1.3 手术剪刀和镊子。
- 5.1.4 样品保存管。
- 5.1.5 离心管(2 mL, 10 mL)。
- 5.1.6 10 mL~20 mL 注射器。
- 5.1.7 防水标签。
- 5.1.8 医用防护服。
- 5.1.9 组织匀浆器。
- 5.1.10 高速组织匀浆机。

5.2 试剂

- 5.2.1 0.1 mol/L PBS(pH 7.4),配方见附录 A 的 A.1。
- 5.2.2 0.04 mol/L PBS(pH 7.4),配方见 A.2。
- 5.2.3 50%甘油-PBS 保存液,配方见 A.3。
- 5.2.4 O-P 液保存液,配方见 A.4。
- 5.2.5 0.2%柠檬酸或 2%氢氧化钠。
- 5.2.6 青霉素 1 000 IU/mL。
- 5.2.7 链霉素 500 IU/mL。
- 5.2.8 三氯三氟乙烷或氯仿。

5.3 样品采集

5.3.1 水泡液采集

典型临床发病动物水泡液用灭菌注射器吸出后装入样品保存管,加青霉素 1 000 IU/mL、链霉素

500 IU/mL, 加盖封口, 冷冻保存。

5.3.2 水泡皮采集

用 0.04 mol/L PBS(pH 7.4) 清洗水泡表面, 然后用灭菌手术剪刀剪取水泡皮, 2 g~5 g 为宜。采集到的水泡皮, 装入样品保存管, 加 50% 甘油-PBS 保存液, 使保存液液面没过样品, 加盖封口, 冷冻保存。

5.3.3 组织样品采集

若采集不到典型的水泡皮, 则采集病灶周围破溃组织 2 g~5 g, 装入样品保存管, 加 50% 甘油-PBS 保存液, 使保存液液面没过样品, 加盖封口, 冷冻保存。临床表现健康, 但需做口蹄疫病原学检测的动物, 可在屠宰时采集淋巴结、脊髓、扁桃体、心脏肌肉。对肉品进行口蹄疫病原学检测时, 可采集骨骼肌。组织样品应不少于 2 g, 装入样品保存管中, 密封、冷冻保存。

5.3.4 反刍动物 O-P 液样品采集

被检动物在采样前禁食(可饮水)12 h。食道探杯在使用前经 0.2% 柠檬酸或 2% 氢氧化钠浸泡 5 min 消毒, 再用洁净水充分冲洗。每采完一头(只)动物, 探杯都要进行消毒并充分清洗。采样时动物站立保定, 将探杯随吞咽动作送入被检动物食道上部 10 cm~15 cm 处, 轻轻来回移动 2~3 次, 然后将探杯拉出。如采集的 O-P 液被胃内容物严重污染, 用水冲洗被检动物口腔后重新采样。在 10 mL 离心管中加 3 mL~5 mL O-P 液保存液, 将采集到的 O-P 液倒入离心管中, 密封后充分摇匀, 冷冻保存。

5.3.5 血清样品采集

采集动物血液, 每头应不少于 5 mL。无菌分离血清, 装入 2 mL 离心管中, 加盖密封后冷藏或冷冻保存。

5.4 样品处理

5.4.1 生物安全措施

样品处理的生物安全措施按照 GB 19489 进行。

5.4.2 组织样品处理

将采集的动物机体组织, 置组织匀浆器中充分研磨, 加入青霉素 1 000 IU/mL、链霉素 500 IU/mL, 0.04 mol/L PBS(pH 7.4) 制成 1:5 的组织悬液, 4 ℃ 浸毒过夜。次日以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

5.4.3 水泡液样品处理

水泡液以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

5.4.4 O-P 液样品处理

将 O-P 液倒入灭菌塑料离心管内, 再加入不少于样品 1/3 体积量的三氯三氟乙烷或氯仿。用高速组织匀浆机以 10 000 r/min 搅拌 3 min, 然后以 3 000 r/min 离心 10 min。此时液体分成两相, 将上层水相分装入样品保存管中备用。

6 病毒分离

6.1 器材

6.1.1 倒置生物显微镜。

6.1.2 冰箱(2℃~8℃、-20℃、-70℃不同温度)。

6.1.3 恒温培养箱。

6.1.4 4℃离心机。

6.1.5 微量移液器(5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL等不同规格)。

6.1.6 1 mL注射器。

6.1.7 25 cm² 细胞培养瓶。

6.2 试剂

6.2.1 0.04 mol/L PBS(pH 7.4),配方见 A.2。

6.2.2 细胞培养液与细胞维持液,配方见 A.5。

6.3 试验动物与细胞

6.3.1 3日龄吮乳小白鼠(乳鼠)。

6.3.2 犍牛甲状腺细胞原代细胞。

6.3.3 仔猪肾细胞系(IB-RS-2)。

6.3.4 幼仓鼠肾细胞系(BHK-21)。

6.4 试验程序

6.4.1 乳鼠分离病毒

6.4.1.1 接种乳鼠:5.4中浸毒过夜后的组织悬液或水泡液上清液,或O-P液上层水相接种3日龄乳鼠,每只乳鼠颈背部皮下接种0.2 mL。同时设健康对照,对照乳鼠颈背部皮下接种0.2 mL 0.04 mol/L PBS(pH 7.4)。

6.4.1.2 观察记录:接种12 h以后,对乳鼠进行连续观察。健康对照乳鼠整个病毒分离期间应无异常表现。若被检样品中有口蹄疫病毒,通常在接种2 d~3 d后,实验乳鼠出现口蹄疫感染症状,表现为后腿运动障碍,麻痹,头部不能抬起,呼吸紧张,以致死亡。发病或发病死亡乳鼠在解剖时常见膀胱积尿现象。

6.4.1.3 盲传:若接种乳鼠第一代72 h后未见发病症状,则处死第一代乳鼠,按5.4.2所述方法将乳鼠胴体制成1:5组织悬液,按6.4.1.1所述方法在乳鼠上接种。如此盲传3代。

6.4.1.4 收集发病死亡乳鼠胴体,保存于50%甘油-PBS保存液中,置-70℃保存,用于病毒鉴定。

6.4.2 细胞分离病毒

6.4.2.1 制备单层细胞:按常规法将原代细胞(犍牛甲状腺细胞)或继代细胞(IB-RS-2、BHK-21)分装在25 cm² 细胞培养瓶中,每瓶分装细胞悬液5 mL,细胞浓度应为 2×10^5 个/mL~ 3×10^5 个/mL,37℃培养48 h。

6.4.2.2 接种细胞:5.4中浸毒过夜后的组织悬液或水泡液上清液,或O-P液上层水相接种细胞。牛源样品接种犍牛甲状腺细胞或BHK-21细胞,猪源样品接种IB-RS-2或BHK-21细胞,其他来源样品接种BHK-21细胞。每份样品接种2~4瓶细胞,另设细胞对照2~4瓶。接种前,先倒去细胞培养瓶中的营养液,加入1 mL已经处理好的病料液,室温静置30 min。然后再加4 mL细胞维持液。细胞对照瓶不接种样品,倒去营养液后加5 mL细胞维持液,37℃培养。

6.4.2.3 观察和记录:若被检样品中有口蹄疫病毒,通常在接种1 d~2 d后可出现CPE,主要呈现细胞圆缩、聚集,最后溶解脱落。对照细胞单层应完好,细胞形态基本正常或稍有衰老。收获细胞液,置-70℃保存,用于病毒鉴定。

6.4.2.4 盲传:如接种细胞第1代72 h后未出现CPE,收获细胞/病毒液按6.4.2.2所述方法再接种生长48 h的单层细胞进行盲传,即1 mL第1代细胞/病毒液加4 mL细胞维持液,37℃培养。如此盲传3代。

6.5 病毒鉴定

对发病死亡乳鼠和出现 CPE 的细胞培养液,选用第 7 章(定型 ELISA)、第 9 章(定型 RT-PCR)进行血清型鉴定,也可选用第 8 章(多重 RT-PCR)、第 10 章(病毒 VP1 基因序列分析)、第 11 章(荧光定量 RT-PCR)进行核酸鉴定和分析。

6.6 结果判定

6.6.1 乳鼠盲传 3 代无发病症状、细胞盲传 3 代未见细胞病变,且经 6.5 所述方法检测阴性者,判定病毒分离阴性。

6.6.2 对发病死亡乳鼠和出现 CPE 的细胞培养液,经 6.5 所述方法任一项检测阳性者,判为病毒分离阳性。

7 定型酶联免疫吸附试验(定型 ELISA)

7.1 器材

- 7.1.1 酶标仪。
- 7.1.2 与 96 孔酶标板配套使用的旋转振荡器。
- 7.1.3 恒温培养箱。
- 7.1.4 洗板机或洗涤瓶。
- 7.1.5 96 孔平底聚苯乙烯酶标板。
- 7.1.6 “U”型 96 孔稀释板。
- 7.1.7 微量可调移液器(5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。
- 7.1.8 与移液器匹配的吸头。
- 7.1.9 贮液槽。
- 7.1.10 封板膜。
- 7.1.11 吸水纸巾。

7.2 试剂

7.2.1 捕获抗体:各型兔抗 FMDV 146S 抗原抗血清,由提纯的各型 FMDV 146S 完整病毒粒子免疫兔子制备而成,用 pH 9.6 的包被缓冲液将捕获抗体稀释至工作浓度。

7.2.2 检测抗体:各型豚鼠抗 FMDV 146S 抗原抗血清,用与制备捕获抗体同源的各型 FMDV 146S 完整病毒粒子免疫豚鼠制备而成;或者是辣根过氧化物酶(HRP)标记的各型抗 FMDV 型特异性单克隆抗体,用酶标抗体稀释液稀释至工作浓度。

7.2.3 对照抗原:FMDV 灭活抗原。FMDV 于单层 BHK-21 细胞上繁殖,病毒培养液经二乙烯亚胺灭活后离心除去细胞碎片,上清液作为对照抗原,使用时用样品稀释液稀释至工作浓度。

7.2.4 包被缓冲液:碳酸盐缓冲液,0.05 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 , pH 9.6,配方见附录 B 的 B.1。

7.2.5 样品稀释液:含 0.05%(体积分数)吐温-20 的 0.01 mol/L PBS, pH 7.2~7.4,配方见 B.2。

7.2.6 酶标抗体稀释液:按 5%(质量浓度)比例在样品稀释液中加入脱脂奶粉。

7.2.7 洗涤缓冲液:含 0.01%(体积分数)吐温-20 的 0.002 mol/L PBS,配方见 B.3。

7.2.8 底物溶液:OPD 底物溶液,配方见 B.4.1;TMD 底物溶液,配方见 B.4.2。

7.2.9 终止液:1.25 mol/L 硫酸,配方见 B.5.1;2 mol/L 硫酸,配方见 B.5.2。

7.2.10 兔抗豚鼠 IgG HRP 标记物:用健康兔血清阻断,用酶标抗体稀释液稀释至工作浓度。

7.3 试验程序

7.3.1 包被酶标板:将工作浓度的捕获抗体分别包被 ELISA 板第 1 列至第 12 列(也可根据待检样品数量调整包被孔数),按 O、A、Asia 1 型的顺序包被酶标板,每个血清型包被 1 列,每孔加 50 μL ,用封板膜封板,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜(或 38 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 100 r/min~200 r/min 振荡孵育 2 h)。

7.3.2 洗涤:每孔中加满洗涤缓冲液,放置 30 s 后弃去,重复洗涤 6 次后在吸水纸巾上拍干酶标板。

7.3.3 加对照抗原和待检病原样品:ELISA 板第 1 列 A、B 两孔加 O 型抗原,第 2 列 A、B 两孔加 A 型抗原,第 3 列 A、B 两孔加 Asia 1 型抗原,以此类推,其余孔加被检样品,每份样品每个血清型加 2 孔,每孔加 50 μL 。每型设 2 孔阴性对照,阴性对照孔每孔加 50 μL 样品稀释液。用封板膜封板,置于 38 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 旋转振荡器中振荡 60 min。同 7.3.2 洗涤。

7.3.4 加豚鼠抗血清和兔抗豚鼠 IgG HRP 标记物或加各型抗 FMDV 型特异性单克隆抗体工作液:将工作浓度的豚鼠抗 FMDV 各型抗血清逐个加入与包被兔抗 FMDV 血清同型的各孔,即包被兔抗 O 型 FMDV 抗血清的孔则加豚鼠抗 O 型 FMDV 抗血清,包被兔抗 A 型 FMDV 抗血清的孔则加豚鼠抗 A 型 FMDV 抗血清,以此类推,每孔加 50 μL ,封板后同前振荡孵育 60 min,同 7.3.2 洗涤后加兔抗豚鼠 IgG HRP 标记物,每孔加 50 μL ,封板后同前振荡孵育 45 min,同 7.3.2 洗涤。或者将工作浓度 HRP 标记的各型抗 FMDV 型特异性单克隆抗体加入到包被同型兔抗血清的各孔和阴性对照孔,每孔加 50 μL ,封板后同前振荡孵育 60 min,同 7.3.2 洗涤。

7.3.5 加底物溶液、终止液,判读结果

加豚鼠抗 FMDV 各型抗血清和兔抗豚鼠 IgG HRP 标记物时,洗涤板子后加入预热至 38 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的 OPD 底物溶液,每孔加 50 μL ,封板,避光 38 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 15 min。每孔加 50 μL 1.25 mol/L 终止液,混匀后在酶标仪 492 nm 下判读结果。

加 HRP 标记的各型抗 FMDV 型特异性单克隆抗体时,洗涤板子后加入预热至 38 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的 TMD 底物溶液,每孔加 50 μL ,封板,避光 38 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 15 min。每孔加 50 μL 2 mol/L 硫酸终止液,混匀后在酶标仪 450 nm 下判读结果。

7.4 试验成立条件

7.4.1 结果计算:相对 OD 值=被检样品各血清型平均 OD 值-同型阴性对照(N)平均 OD 值。

7.4.2 某型阴性对照(N)平均 OD 值大于 0.20,试验不成立。

7.4.3 阳性对照 OD 值应大于或等于 0.6,阴性对照应小于或等于 0.20,试验成立。

7.5 结果判定

在试验成立的前提下:如果样品各型的相对 OD 值小于或等于 0.20,则该样品为阴性;如果样品某型的相对 OD 值大于或等于 0.3,则判定该样品此血清型阳性;如果样品某型的相对 OD 值大于 0.2 但小于 0.3,则判为可疑,需要重新测定,再次测定结果,若某型的相对 OD 值小于 0.30,则该样品为阴性,如果样品某型的相对 OD 值大于或等于 0.3,则判定该样品该型口蹄疫抗原阳性。

8 多重反转录-聚合酶链式反应(多重 RT-PCR)

8.1 器材

8.1.1 PCR 扩增仪。

8.1.2 台式低温高速离心机。

8.1.3 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

8.1.4 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。

8.1.5 微量可调移液器(5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL 等不同规格)。

8.1.6 无核酸酶水处理的离心管与吸头。

8.1.7 PCR 扩增管。

8.2 引物

8.2.1 上游引物

下列 3 条引物为上游引物:

- a) 5'GAC TCG ACG TCT CCC GCC AAC T 3'。
- b) 5'ACG ACG GGG GCT TTT GCT TTC AC 3'。
- c) 5'CGG GAA ACG CAC GAG CAG TAT C 3'。

8.2.2 下游引物

下列 3 条引物为下游引物:

- a) 5'TGC GGA CGG CCA CCT ACT ACT TC 3'。
- b) 5'AGC TCC ACG AAA AAG TGT CGAG 3'。
- c) 5'CGT GAT GTG GCG AGA ATG AAG AA 3'。

8.3 试剂

8.3.1 总 RNA 提取试剂

8.3.1.1 变性液:6 mol/L 异硫氰酸胍或 Trizol reagent。

8.3.1.2 2 mol/L 乙酸钠(pH 4.0)。

8.3.1.3 酚氯仿抽提液:苯酚-氯甲烷-异戊醇(25:24:1)混合液。

8.3.1.4 异丙醇(分析纯)。

8.3.1.5 无核酸酶水:可将焦碳酸二乙酯按 0.1%(质量浓度)的量加入双蒸馏水(ddH₂O)中制备。

8.3.1.6 75%乙醇:无水乙醇(分析纯)与无核酸酶水按 3:1 配制而成。

8.3.2 RT-PCR 试剂

8.3.2.1 10 $\times$ 一步 RNA PCR 缓冲液。

8.3.2.2 反转录酶(AMV):5 U/ μL 。

8.3.2.3 核糖核酸酶抑制剂(RNase inhibitor):40 U/ μL 。

8.3.2.4 AMV-Optimized Taq 酶:5 U/ μL 。

8.3.2.5 dNTP 预混液:包括 dATP、dTTP、dCTP、dGTP,各 10 mmol/L。

8.3.2.6 MgCl₂:25 mmol/L。

8.3.3 电泳试剂

8.3.3.1 电泳缓冲液:50 $\times$ TAE 贮存液(配方见附录 C 的 C.1),临用时加蒸馏水配成 1 $\times$ TAE 缓冲液(配方见 C.2)。

8.3.3.2 琼脂糖:国产或进口的低熔点琼脂糖。

8.3.3.3 电泳加样缓冲液:配方见 C.3。

8.3.3.4 DNA Marker(标准分子量):分子大小范围 100 bp~1 000 bp,100 bp 梯度。

8.4 样品准备

8.4.1 本方法适用所有的 FMD 病原样品种类,包括水泡皮、水泡液、O-P 液、扁桃体、淋巴结、骨髓、肌肉、病毒接种乳鼠与细胞培养物等。

8.4.2 阳性对照:已知病毒材料,如 FMDV 感染的乳鼠或细胞,与待检样品同时提取总 RNA,再反转录和 PCR 扩增,其扩增产物作为电泳对照样品。

8.4.3 阴性对照:未感染的乳鼠或细胞,与待检样品同时提取总 RNA,再反转录和 PCR 扩增。

8.5 试验程序

8.5.1 核酸提取

8.5.1.1 酚氯仿法抽提核酸

8.5.1.1.1 取待检样品、阴性对照、阳性对照各 300 μL 分别置于 1.5 mL 离心管中,每管加入 300 μL 变性液,反复混匀,冰水浴 5 min。

8.5.1.1.2 每管分别加入 60 μL 2 mol/L 乙酸钠(pH 4.0),混匀。

8.5.1.1.3 每管加 800 μL 苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)混合液,冰水浴 5 min。

8.5.1.1.4 8 000 r/min 离心 10 min。将上清液转入另一洁净离心管。

8.5.1.1.5 加 800 μL 异丙醇,混匀,室温放置 15 min。

8.5.1.1.6 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min,离心 10 min,小心的倒掉上清液。尽量倒干液体,留下 RNA 沉淀。

8.5.1.1.7 加 1 000 μL 75%乙醇颠倒洗涤沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min,离心 5 min,小心倒干液体,室温干燥 5 min~10 min。

8.5.1.1.8 每管加 10 μL 无核酸酶水,用于溶解 RNA。总 RNA 提取液可立即用于 PCR 扩增,也可 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

8.5.1.2 核酸提取等效方法

可采用等效 RNA 提取试剂和方法,如采用自动化核酸提取仪和配套核酸抽提试剂进行核酸提取。

8.5.2 核酸扩增

8.5.2.1 PCR 反应混合液配制:10 $\times$ 一步 RNA PCR 缓冲液 50 μL , MgCl_2 100 μL , dNTPs 50 μL , 上下游引物对各 30 μL , 无核酸酶水 110 μL , 在超净工作台中混匀,分装入 PCR 扩增管中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

8.5.2.2 多重 RT-PCR 扩增:在已分装有 PCR 反应混合液的 PCR 扩增管中分别加入已制备好的总 RNA 提取液 5 μL , 盖紧管盖,放入扩增仪中按照设定程序扩增:50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共进行 35 次循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。

8.5.3 扩增产物电泳检测

8.5.3.1 1.5%琼脂糖凝胶板的制备:称取 1.5 g 琼脂糖,加入 100 mL 1 $\times$ TAE 缓冲液中。加热融化后加 5 μL (10 mg/mL) 溴乙锭,混匀后倒入放置在水平台面上的凝胶盘中,胶板厚 5 mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔),放入电泳槽中,加 1 $\times$ TAE 缓冲液淹没胶面。

8.5.3.2 加样:取 6 μL ~8 μL PCR 扩增产物和 2 μL 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳同时设标准 DNA Marker、阴性对照、阳性对照。

8.5.3.3 电泳:电压 80 V~100 V 或电流 40 mA~50 mA,电泳 30 min~40 min。

8.6 试验成立条件

电泳结束后,取出凝胶板置凝胶成像仪(或紫外透射仪)上观察。阳性对照电泳结果应为三个条带,分别为 634 bp、483 bp 和 278 bp,阴性对照应无扩增条带。

8.7 结果判定

符合 8.6 的条件,被检样品至少扩增出一条 DNA 条带,且与阳性对照条带分子量大小相符,则该样品判定为 FMDV 核酸阳性。被检样品无扩增条带,判为 FMDV 核酸阴性。

9 定型反转录-聚合酶链式反应(定型 RT-PCR)

9.1 器材

同 8.1。

9.2 引物

下列为下游引物和分别检测 FMDV 7 个血清型的上游引物:

- a) 下游引物(通用): 5'-AGCTTGTACCAGGGTTTGGC-3'。
- b) 上游引物(O 型): 5'-GCTGCCYACYTCYTTCAA-3'。
- c) 上游引物(A 型): 5'-GTCATTGACCTYATGCAVACYCAC-3'。
- d) 上游引物(C 型): 5'-GTTTCTGCACTTGACAACACA-3'。
- e) 上游引物(Asia 1 型): 5'-GACACCACHCARRACCGCCG-3'。
- f) 上游引物(SAT 1 型): 5'-AGGATTGCHAGYGAGACVCACAT-3'。
- g) 上游引物(SAT 2 型): 5'-GGCGTYGARAAACARYTBTG-3'。
- h) 上游引物(SAT 3 型): 5'-TTCGGDAGAYTGTGTGTG-3'。

其中,Y、R、H、V、D 为简并碱基,Y 对应 C/T,R 对应 A/G,H 对应 A/T/C,V 对应 G/A/C,D 对应 A/T/G。

9.3 试剂

同 8.3。

9.4 样品准备

同 8.4。

9.5 试验程序

9.5.1 核酸提取

同 8.5.1。

9.5.2 一步法 RT-PCR 扩增

9.5.2.1 RT-PCR 反应体系配制,采用 25 μL 反应体系,扩增体系配制如下:

10 $\times$ 一步 RNA PCR 缓冲液	2.5 μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	5 μL
dNTP(各 10 mmol/L)	2.5 μL

RNase 酶抑制剂(40 U/ μ L)	0.5 μ L
AMV(5 U/ μ L)	0.5 μ L
AMV-Optimized <i>Taq</i> (5 U/ μ L)	0.5 μ L
下游通用引物(50 pmol/ μ L)	0.5 μ L
上游型特异性引物混合(各 50 pmol/ μ L)	0.5 μ L
总 RNA 水溶液	12.5 μ L

9.5.2.2 扩增程序。将 PCR 扩增管盖紧管盖,放入扩增仪中按照设定程序扩增:50 $^{\circ}$ C 反转录 30 min, 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,58 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,共进行 30 次循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

9.5.3 扩增产物电泳检测

同 8.5.3。

9.6 试验成立条件

电泳结束后,取出凝胶板置于凝胶成像仪(或紫外透射仪)上观察。阳性对照扩增产物电泳结果应分别为 O 型 400 bp, A 型 730 bp, C 型 600 bp, Asia 1 型 300 bp, SAT 1 型 430 bp, SAT 2 型 260 bp, SAT 3 型 380 bp,阴性对照应无扩增条带。

9.7 结果判定

符合 9.6 的条件。样品扩增产物的 DNA 条带与某型阳性对照条带分子量大小一致,则该待检样品为某型 FMDV。如被检样品无扩增条带,则该样品为 FMDV 核酸阴性。

10 病毒 VP1 基因序列分析

10.1 器材

同 8.1。

10.2 引物

FMDV O 型、A 型、Asia 1 型通用 VP1 扩增引物:VP1F:5'-GCGCTGGCAAAGACTTTGA-3'; VP1R:5'-GACATGTCCTCCTGCATCTGGTTGA-3'。

10.3 试剂

同 8.3。

10.4 样品准备

同 8.4。

10.5 试验程序

10.5.1 核酸提取

同 8.5.1。

10.5.2 RT-PCR 反应

10.5.2.1 RT-PCR 反应体系配制,采用 50 μ L 反应体系,扩增体系配制如下:

10×一步 RN A PCR 缓冲液	5 μ L
dNTP(10 mmol/L)	5 μ L
MgCl ₂ (25 mmol/L)	10 μ L
RNase 酶抑制剂(40 U/ μ L)	1 μ L
反转录酶(AMV)(5 U/ μ L)	1 μ L
Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)	1 μ L
正向引物 VP1F(25 pmol/ μ L)	1 μ L
反向引物 VP1R(25 pmol/ μ L)	1 μ L
总 RNA 提取液	10 μ L
无核酸酶水	15 μ L

10.5.2.2 扩增程序:将 PCR 扩增管盖紧管盖,放入扩增仪中按照设定程序扩增:42 $^{\circ}$ C 反转录 30 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 2 min;然后 95 $^{\circ}$ C 变性 60 s,55 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min,共进行 30~35 次循环。

10.5.3 扩增产物电泳检测

同 8.5.3。

10.6 试验成立条件

电泳结束后,取出凝胶板置于凝胶成像仪(或紫外透射仪)上观察。阳性对照扩增产物目标条带大小应为 810 bp,阴性对照应无扩增条带。

10.7 结果判定与分析

样品扩增产物的 DNA 条带与阳性对照条带分子量大小一致,则表明扩增出该样品 FMDV VP1 基因。扩增 DNA 片段测序:RT-PCR 产物纯化后,可直接用于 DNA 序列测定,测序引物与 RT-PCR 扩增引物相同。应用 DNA 序列分析软件(如 DNASTar、MEGA 等)进行序列分析。参考序列见 FAO/OIE 世界口蹄疫参考实验室网站 http://www.wrlfmd.org/fmd_genotyping/prototypes.htm。通过序列同源性分析,即可确定病毒的基因型,进行遗传关系分析。

11 荧光定量反转录聚合酶链式反应(荧光定量 RT-PCR)

11.1 器材

11.1.1 荧光定量 PCR 仪。

11.1.2 其余器材同 8.1。

11.2 引物和探针

下列两个引物和探针组合中,任一个都可以用于 FMDV 的荧光定量 PCR:

- 5'UTR 正向引物: CACYTYAAGRTGACAYTGRTACTGGTAC;反向引物: CAGATYCCRA GT-GWCICITGTTA;TaqMan 探针: CCTCGGGGTACCTGAAGGGCATCC。
- 3D 正向引物: ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA;反向引物: GCGAGTCCTGCCACGGA;TaqMan 探针: TCCTTTGCACGCCGT GGGAC。

其中,Y、R、W 为简并碱基,Y 对应 C/T,R 对应 A/G,W 对应 A/T;I 为修饰碱基。

11.3 试剂

同 8.3。

11.4 样品准备

同 8.4。

11.5 试验程序

11.5.1 核酸提取

同 8.5.1。

11.5.2 荧光定量 RT-PCR 反应

11.5.2.1 在离心机中旋转平板或 PCR 管 1 min, 混匀每管内容物, 反应总体系 25 μL 。

2 $\times$ 一步 RT-PCR 缓冲液	12.5 μL
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μL)	0.5 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.5 μL
PCR 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
PCR 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
探针 (5 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
总 RNA	2 μL
无核酸酶水	7.5 μL

11.5.2.2 把平板或 PCR 管放在荧光定量 PCR 仪器上进行 RT-PCR 扩增, 按照下面的程序扩增: 42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 15 min; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共进行 40 次循环。

11.6 试验成立条件

11.6.1 阳性对照扩增曲线应呈标准的 S 曲线, 且 Ct 值应小于 25。

11.6.2 阴性对照扩增曲线应为基线下的水平线。

11.7 结果判定

若样品曲线呈标准的 S 形曲线, 且 Ct 值小于 35 为阳性; Ct 值大于或等于 35 为阴性。

12 病毒中和试验(VN)

12.1 器材

12.1.1 恒温 CO_2 培养箱。

12.1.2 倒置生物显微镜。

12.1.3 96 孔细胞培养板。

12.1.4 微量可调移液器及配套吸头。

12.2 试剂

12.2.1 阳性对照血清: FMDV 感染动物或口蹄疫疫苗免疫动物血清, 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min。

12.2.2 阴性对照血清: 未接触过 FMDV 的动物血清, 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min。

12.2.3 待检血清: 待检血清经 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min。

12.2.4 病毒: FMDV 分别适应于 BHK-21 或 IB-RS-2 单层细胞。收获的病毒液测定 TCID_{50} 后, 分装于小管, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

12.2.5 细胞:BHK-21 或 IB-RS-2 传代细胞。

12.2.6 细胞维持液:Eagle's MEM 与含 5% 水解乳蛋白的 Earle's 液等量混合配成, pH 7.6~7.8, 在中和试验中作稀释液用。

12.2.7 细胞营养液:含 10% 犊牛血清的细胞维持液(pH 7.4), 培养细胞用。

12.2.8 细胞染色液:用 10% 福尔马林配制的 0.05% 亚甲基蓝溶液。

12.3 试验程序

12.3.1 FMDV TCID₅₀ 预测定:将 FMDV 在 96 孔培养板上作 10 倍连续稀释, 即 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ..., 10^{-11} , 每孔 50 μ L 病毒液, 100 μ L 细胞悬液(细胞悬液的浓度以在 24 h 内长满单层为度, 一般每毫升 100 万个~150 万个细胞), 每个稀释度 8 孔。每块板的最后一列设 8 孔细胞对照, 每孔补加 50 μ L 稀释液(不加病毒)。置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 温箱培养。观察 CPE, 72 h 时将板固定并作常规染色(先用 10% 福尔马林固定 30 min, 然后置于用 10% 福尔马林配制的 0.05% 亚甲基蓝溶液中浸泡染色 30 min, 最后将培养板用水冲洗)。未病变细胞呈蓝色, 病变细胞脱落或不着色。依据 CPE 情况, 按 Reed-Muench 法计算病毒 TCID₅₀。

12.3.2 稀释血清:用细胞维持液将待检血清在培养板上从 1:4 开始作 2 倍连续稀释, 每份血清至少平行稀释 2 排孔, 每孔 50 μ L。

12.3.3 加入病毒:在上述每孔中加入 50 μ L 含 100 TCID₅₀ 的病毒液。

12.3.4 对照设立:每次试验每块培养板都应设立下列对照。

正常细胞对照:每块培养板上均设立 2~4 孔不接种病毒的正常细胞对照, 每孔加入 50 μ L。

阴性对照血清:设 2~4 孔, 每孔加 50 μ L 血清及 50 μ L 含 100 TCID₅₀ 的病毒液。

阳性对照血清:阳性对照血清与被检血清平行稀释(如:2 排孔), 每孔加入 50 μ L 含 100 TCID₅₀ 的病毒液。

病毒对照:另设一块培养板测定本次试验中病毒的实际滴度(TCID₅₀), 用以计算病毒的实际使用量。

12.3.5 中和反应:封闭培养板, 37 $^{\circ}$ C 培养 1 h。

12.3.6 加入细胞:血清与病毒中和 1 h 后, 每孔加入 50 μ L 细胞悬液, 置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 温箱培养。对照孔体积不足 150 μ L 时, 用稀释液补全体积。

12.3.7 染色:48 h 后, 显微镜下预先作适当判读。第 3 天, 将板固定并作常规染色。

12.4 试验成立条件

正常细胞对照:在整个试验中应一直保持良好的生长形态, 染色呈蓝色。

阴性对照血清:阴性对照血清孔应全部出现 CPE, 染色不着色。

阳性对照血清:阳性对照血清抗体滴度应在预期 2 倍以内。

病毒对照:根据试验中病毒的实际滴度(TCID₅₀), 计算病毒的实际使用量。每孔使用的病毒量应在 32 TCID₅₀~320 TCID₅₀ 范围内。

当以上对照均成立时, 试验有效。

12.5 结果判定

12.5.1 细胞层染色呈蓝色为阳性孔(病毒被中和), 不着色为阴性孔(病毒未被中和), 以血清能够中和 50% 病毒时的稀释度为血清最终滴度。

12.5.2 被检血清最终滴度为 1:45 或更高者为阳性。

12.5.3 被检血清最终滴度低于 1:16 为阴性。

12.5.4 被检血清最终滴度在 1:16~1:32 之间为可疑, 需要重复试验, 再次试验结果为 1:16 或更高时判定为阳性。

13 液相阻断酶联免疫吸附试验(LPB-ELISA)

13.1 器材

同 7.1。

13.2 试剂

同 7.2。

13.3 对照血清

13.3.1 阳性对照血清:用与制备兔抗 FMDV 抗血清抗原同源的 FMDV 灭活疫苗免疫正常牛制备的高免血清,预先测定其抗体效价。同待检血清一起作同样稀释。

13.3.2 阴性对照血清:阴性对照血清来自健康牛,各型口蹄疫 LB-ELISA 抗体效价均小于 1:4。

13.4 试验程序

13.4.1 ELISA 板每孔用 50 μ L pH 9.6 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释的兔抗血清包被,封板膜封板,置室温过夜。

13.4.2 洗涤:每孔中加满洗涤缓冲液,放置 30 s 后弃去,重复洗涤 6 次后在吸水纸巾上拍干酶标板。

13.4.3 在“U”型 96 孔稀释板内,按 50 μ L/孔的量用样品稀释液将待检血清从 1:4 开始做 2 倍连续稀释,每份待检血清都做 2 个重复,然后向每孔内加入相应的 50 μ L 同型病毒抗原,封板混合后置 4 $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。加入病毒抗原后血清的实际稀释度变为从 1:8 开始的 2 倍连续稀释度。

13.4.4 用洗涤缓冲液洗 ELISA 板 6 次,将各孔血清/抗原混合物从稀释板转移至兔抗血清包被的 ELISA 板中,每孔 50 μ L,封板,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

13.4.5 洗 ELISA 板 6 次,将与试验抗原同源的豚鼠抗血清用样品稀释液稀释至预定的最佳工作浓度,每孔 50 μ L,封板,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

13.4.6 洗 ELISA 板 6 次,每孔加 50 μ L 用酶标抗体稀释液稀释的兔抗豚鼠 IgG 辣根过氧化物酶结合物,封板,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

13.4.7 洗 ELISA 板 6 次,每孔加 50 μ L TMB 底物溶液。37 $^{\circ}$ C 温育 15 min 后每孔再加 50 μ L 1.25 mol/L 硫酸终止反应,混匀后在酶标仪 450 nm 下判读结果。

13.4.8 对照设立:每次试验,每块板设 8 孔连续 2 倍稀释的阳性血清对照,2 孔连续 2 倍稀释的阴性血清对照,设 4 孔抗原对照,抗原对照不加血清稀释液。

13.5 试验成立条件

病毒抗原对照至少两孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 值应在 1.0~2.0 范围内;阳性血清对照抗体滴度应在 1:512~1:2 048 之间;阴性血清对照抗体滴度应小于 1:4。

13.6 结果判定

13.6.1 以病毒抗原对照 $OD_{450\text{ nm}}$ 平均值的 1/2 为临界值,被检血清稀释孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 值大于临界值为阴性孔,小于或等于临界值为阳性孔。抗体滴度以 50% 终点滴度表示,即该稀释度 50% 孔的抑制率大于抗原对照孔抑制率的 50%。

13.6.2 被检血清抗体滴度大于或等于 1:128 判为阳性。被检血清抗体滴度小于 1:64 判为阴性。被检血清抗体大于或等于 1:64 并小于 1:128 判为可疑,可疑样品经再次测定后,如果有一个滴度为 1:64 或更高可判为阳性。

14 固相竞争酶联免疫吸附试验(SPC-ELISA)

14.1 器材

同 7.1。

14.2 试剂

14.2.1 检测抗体:口蹄疫型特异性 HRP 标记的单克隆抗体,用样品稀释液稀释至最佳工作浓度。

14.2.2 其余试剂同 7.2。

14.2.3 对照血清:同 13.3。

14.3 试验程序

14.3.1 酶标板每孔用 50 μL pH 9.6 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释的兔抗血清包被,封板膜封板,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

14.3.2 用洗涤缓冲液洗板 5 次。

14.3.3 酶标板每孔用 50 μL pH 9.6 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释的 FMDV 灭活抗原,封板膜封板,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

14.3.4 用洗涤缓冲液洗板 5 次。

14.3.5 在“U”型 96 孔稀释板内,按 50 μL /孔量用样品稀释液将待检血清从 1:4 开始做 2 倍连续稀释,每份待检血清都做 2 个重复,然后整体平移至已包被抗体抗原复合物的 ELISA 反应板中。向每孔内加入相应的 50 μL 同型酶标单抗工作液,封板混合后,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。加入酶标抗体工作液后血清的实际稀释度变为从 1:8 开始的 2 倍连续稀释度。

14.3.6 洗板 5 次,每孔加 50 μL TMB 底物溶液。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min 后,每孔再加 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应,混匀后在酶标仪 450 nm 波长下判读结果。

14.3.7 对照设立:每次试验,每块板设 8 孔连续 2 倍稀释的阳性血清对照、2 孔连续 2 倍稀释的阴性血清对照,以及不加血清稀释液的 4 孔酶标单抗对照。

14.4 试验成立条件

在酶标仪 OD_{450 nm} 波长处,测定酶标板的每孔光吸收值,求出每份被检血清和同板酶标抗体对照的平均光吸收值。酶标抗体对照孔的 OD_{450 nm} 值应大于 1.0;阳性血清抗体滴度应在 1:512~1:2048 范围内;阴性血清对照滴度应小于 1:8。

14.5 结果判定

14.5.1 以酶标抗体对照孔平均 OD_{450 nm} 值的 60% 为临界值,被检血清 OD_{450 nm} 值大于临界值的孔为阴性孔,小于或等于临界值的孔为阳性孔。以阳性孔的最高稀释倍数为被检血清的抗体滴度。

14.5.2 被检血清抗体滴度大于或等于 1:64 判为阳性。被检血清抗体滴度小于或等于 1:32 判为阴性。被检血清抗体滴度介于 1:32 和 1:64 为可疑,需再次测定;若再次测定抗体滴度大于或等于 1:64 判为阳性,小于 1:64 判为阴性。

15 非结构蛋白 3ABC 抗体间接酶联免疫吸附试验(3ABC-I-ELISA)

15.1 器材

同 7.1。

15.2 试剂

- 15.2.1 阴性对照血清:无 FMDV 非结构蛋白抗体的健康牛、羊、猪血清。
- 15.2.2 阳性对照血清:FMDV 非结构蛋白 3ABC 抗体阳性的牛、羊、猪血清。
- 15.2.3 洗涤缓冲液:配方见 B.6。
- 15.2.4 25 倍浓缩 PBS 缓冲液:配方见 B.7。
- 15.2.5 兔抗牛、羊或猪 IgG-HRP 酶结合物,使用时用血清稀释液稀释至工作浓度。
- 15.2.6 血清稀释液:配方见 B.8。
- 15.2.7 TMB 底物溶液:配方见 B.4.2。
- 15.2.8 终止液:0.3 mol/L 硫酸,配方见 B.5.3。
- 15.2.9 纯化的 3ABC 蛋白:将基因工程表达、纯化复性的 3ABC 蛋白,用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液包被至酶标板,抽真空密封包装,4 ℃保存备用。

15.3 试验程序

- 15.3.1 血清稀释板每孔加入血清稀释液 120 μL ,然后依次加入阳性对照血清、阴性对照血清和待检血清,每孔 6 μL (1:21 倍稀释);标准阴、阳性对照血清平行加两孔,待测血清加 1 孔,留两孔不加血清作为空白对照,轻振混匀;然后,将稀释好的血清按对应的位置转移至包被 3ABC 抗原的 ELISA 板上,每孔 100 μL ,用封口膜封口,37 ℃结合 30 min。
- 15.3.2 去掉封口膜,每孔加满洗涤缓冲液,洗涤 5 次,最后一次拍干。
- 15.3.3 准备工作浓度的酶结合物,每孔加入 100 μL ,用封口膜封口,37 ℃结合 30 min。
- 15.3.4 去掉封口膜,每孔加满洗涤液,洗涤 5 次,最后一次拍干。
- 15.3.5 每孔加入 100 μL TMB 底物,封口膜封口,37 ℃避光作用 10 min~15 min。显色过程中监测 $\text{OD}_{630\text{ nm}}$ 值接近 0.7 时终止反应。
- 15.3.6 每孔加入 100 μL 终止液(终止后测定阳性对照孔 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值应小于 2.1)。
- 15.3.7 轻轻摇振混匀,测定波长 450 nm 吸光值。

15.4 试验成立条件

阳性对照平均 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值应大于 0.6;阴性对照平均 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值应小于 0.2。

15.5 结果计算与判定

- 15.5.1 样品效价=($\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 样品 - $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 阴性对照) $\div$ ($\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 阳性对照 - $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 阴性对照)。
- 15.5.2 被检血清样品效价小于 0.2,判为阴性。被检血清样品效价大于或等于 0.3,判为阳性。被检血清样品效价介于 0.2~0.3 之间为可疑;可疑样品复测效价大于或等于 0.2,则判定为阳性。

16 非结构蛋白 3ABC 抗体阻断酶联免疫吸附试验(3ABC-B-ELISA)

16.1 器材

同 7.1。

16.2 试剂

- 16.2.1 阴性对照血清,来自无 FMDV 抗体的健康动物。
- 16.2.2 阳性对照血清,来自 FMDV 感染康复动物,血清经灭活检验后无传染性因子存在。
- 16.2.3 弱阳性对照血清,来自 FMDV 感染康复动物,血清经灭活检验后无传染性因子存在。
- 16.2.4 25 倍浓缩 PBS 缓冲液:配方见附录 B 的 B.7。

16.2.5 3ABC 蛋白捕获抗体,利用 3A 蛋白免疫小鼠制备的可特异性捕获 3ABC 蛋白的单克隆抗体。

16.2.6 酶标检测抗体贮存液,利用 3B 蛋白免疫小鼠制备的针对保守的免疫优势抗原表位的单克隆抗体,经辣根过氧化物酶标记后,用作检测抗体,通常用酶标抗体保存液配制为 100 倍工作浓度。

16.2.7 血清稀释液:配方见 B.8。

16.2.8 ELISA 用 TMB 底物溶液:配方见 B.4.2。

16.2.9 终止液,0.3 mol/L 硫酸,见 B.5.3。

16.2.10 捕获 3ABC 抗原反应板:饱和浓度的 3A 单克隆抗体包被酶标板,与基因工程表达、纯化复性的 3ABC 蛋白结合,干燥酶标板后,抽真空密封包装,4 ℃ 保存备用。

16.3 试验程序

16.3.1 取出密封的捕获 3ABC 抗原反应板,所有的试剂在使用前应先恢复至 15 ℃~25 ℃,通过涡旋振荡器轻振血清样品混匀。

16.3.2 加血清:每孔加入 80 μL 血清稀释液,然后依次加入 20 μL 待测血清和阳、弱阳性与阴性对照血清。待测样品加 1 孔,阴性、弱阳性与阳性对照血清平行加 2 孔,振荡混匀,封口膜封口,在 15 ℃~25 ℃ 条加下振荡孵育。检测牛、羊血清时,孵育 1 h;检测猪血清时,孵育 16 h~20 h。小心去掉封口膜,每孔加约 300 μL 洗涤液洗板 5 次,最后一次拍干。

16.3.3 加酶标单抗:用血清稀释液 1:100 比例稀释 100 倍浓缩酶标单抗,每孔加入 100 μL,封口膜封口,置 15 ℃~25 ℃ 孵育 1 h。小心去掉封口膜,每孔加约 300 μL 洗涤液洗板 5 次,最后一次拍干。

16.3.4 加底物:每孔加入 100 μL TMB 底物溶液,封口膜封口,置 15 ℃~25 ℃ 避光孵育 10 min~15 min。

16.3.5 终止反应测吸光值:每孔加入 100 μL 终止液,在 450 nm 测量和记录各样品和对照品的吸光值。加终止液之前,可以测定 OD_{630 nm} 值,将 OD_{630 nm} 值控制在 0.5~0.6 之间,保证最佳的检测效果,终止前 OD_{630 nm} 值约为终止后 OD_{630 nm} 值的 1/3。

16.4 试验结果有效性判定

16.4.1 计算阴性、弱阳性与阳性对照血清平均 OD_{450 nm} 值。根据公式计算测试样本(弱阳性、阳性对照血清与待测血清)阻断率(PI), $PI = (1 - \text{测试样本 OD}_{450 \text{ nm}} \text{ 值} / \text{阴性对照平均 OD}_{450 \text{ nm}} \text{ 值}) \times 100\%$ 。

16.4.2 结果有效性判定:阴性对照平均 OD_{450 nm} 值应大于 1.0;弱阳性对照血清阻断率应大于 50%,阳性对照血清阻断率应大于 70%,试验有效。

16.5 结果判定

试验结果有效,被检血清样品 PI 值大于或等于 50%,判定为 FMDV NSP 3ABC 抗体阳性;被检血清样品 PI 值小于 50%,判定为 FMDV NSP 3ABC 抗体阴性。

17 综合判定

17.1 临床判定为疑似的易感动物,经第 6 章(病毒分离)分离出口蹄疫病毒,或经第 7 章(定型 ELISA)检测出口蹄疫病毒抗原,或经第 8 章(多重 RT-PCR)、第 9 章(定型 RT-PCR)、第 10 章(病毒 VP1 基因序列分析)、第 11 章(荧光定量 RT-PCR)任一项检测出口蹄疫病毒核酸的,可判定为口蹄疫发病。

17.2 临床无明显特异症状的非免疫动物经第 12 章(VN)、第 13 章(LPB-ELISA)、第 14 章(SPC-ELISA)、第 15 章(3ABC-I-ELISA)、第 16 章(3ABC-B-ELISA)任一项检测出口蹄疫病毒抗体的,或从免疫动物中检测出非免疫所致的口蹄疫病毒抗体的,可判定该动物曾经感染过口蹄疫病毒。

17.3 临床无明显特异症状的易感动物,采集 O-P 液或组织样品经第 6 章(病毒分离)、第 7 章(定型 ELISA)、第 8 章(多重 RT-PCR)、第 9 章(定型 RT-PCR)、第 10 章(病毒 VP1 基因序列分析)、第 11 章(荧光定量 RT-PCR)任一项检测出阳性的,可判定为口蹄疫带毒(潜伏感染或持续感染)。

附录 A

(规范性附录)

样品保存液和细胞培养液

A.1 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	85.00 g
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	1 000 mL
或者	
氯化钠(NaCl)	80.0 g
氯化钾(KCl)	2.0 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	30.0 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	2.0 g
加蒸馏水至	1 000 mL

A.2 0.04 mol/L PBS (pH 7.4)

0.1 mol/L PBS	400 mL
蒸馏水	600 mL
103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min, 室温或 4 °C 冰箱保存。	

A.3 50%甘油-PBS 保存液

0.04 mol/L PBS 与纯甘油等量混和, 调整 pH 至 7.4, 分装成小瓶。103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min。室温或 4 °C 冰箱保存。

A.4 O-P 液保存液

Eagle's-MEM 营养液	50 mL
0.5% 水解乳白蛋白/Earle's 液	50 mL
5% 碳酸氢钠(NaHCO_3)调整 pH 至 7.6~7.8。	

A.5 细胞培养液与细胞维持液

A.5.1 Eagle's-MEM

10×Eagle's-MEM 营养液: Eagle's-MEM 营养剂 9.5g, 加超纯水 100.0 mL。溶解后过滤除菌。用无菌超纯水将 10×营养液按 1:10 稀释, 即 100 mL 营养液中加入 900 mL 无菌超纯水中即为使用浓度营养液, 4 °C 保存备用。

A.5.2 0.5% 水解乳白蛋白/Earle's 液

氯化钠(NaCl)	6.8 g
氯化钾(KCl)	0.4 g
氯化钙(CaCl_2)	0.2 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.14 g
葡萄糖	1.0 g
10% 酚红	2.0 mL
水解乳白蛋白	5.0 g

按配方称取各成分并逐个溶解, 最后加超纯水至 1 000 mL, 过滤除菌。4 °C 保存备用。

A.5.3 细胞维持液

Eagle's -MEM 营养液	50 mL
0.5%水解乳白蛋白/Earle's 液	50 mL
5% 碳酸氢钠(NaHCO_3)调整 pH 至 7.6~7.8。	

A.5.4 细胞营养液

Eagle's -MEM 营养液	45 mL
0.5%水解乳白蛋白/Earle's 液	45 mL
犊牛血清	10 mL
5% 碳酸氢钠 (NaHCO_3)调整 pH 至 7.2~7.4。	

郑州中道生物技术有限公司 (仅供下载)
www.hnzdsw.com 0371-67896961

附录 B

(规范性附录)

酶联免疫吸附试验用溶液的配制

B.1 包被缓冲液:碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 , pH 9.6)

A 液: Na_2CO_3	1.68 g
蒸馏水	400 mL
B 液: NaHCO_3	2.86 g
蒸馏水	200 mL

将 400 mL A 液与 150 mL B 液混合,调整 pH 至 9.6,4 ℃ 放置 1 个月有效。

B.2 样品稀释液[含 0.05% (体积分数)吐温-20 的 0.01 mol/L PBS, pH 7.2~7.4]

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.30 g
KH_2PO_4	0.02 g
NaCl	0.80 g
KCl	0.02 g
吐温-20	0.05 mL
加蒸馏水至 100 mL。	

B.3 定型 ELISA、液相阻断 ELISA、固相竞争 ELISA 洗涤缓冲液(0.002 mol/L PBS, pH 7.4±0.2)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.60 g
KH_2PO_4	0.04 g
NaCl	1.60 g
KCl	0.04 g
加蒸馏水至 1 000 mL。	

B.4 底物溶液

B.4.1 OPD 底物溶液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.84 g
柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 分析纯)	0.52 g
邻苯二胺(OPD)	0.05 g
加去离子水 100 mL。	

分装成 3 mL/瓶, -20 ℃ 避光保存。使用前避光融化,每 3 mL 上述溶液加 15 μL 3% 双氧水(H_2O_2)。

B.4.2 TMD 底物溶液

A 液: TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)	200 mg
无水乙醇	100 mL
蒸馏水加至 1 000 mL。	
B 液: 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 , 分析纯)	71.7 g
柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 分析纯)	9.33 g
0.75% 过氧化氢尿素	6.4 mL

加蒸馏水至 1 000 mL,调整 pH 至 5.0~5.4。

将底物溶液 A 和底物溶液 B 按 1:1 混合,现配现用。

B.5 终止液

B.5.1 1.25 mol/L 硫酸

取 68 mL 分析纯浓硫酸缓慢加入到 932 mL 去离子水中,分装室温保存。

B.5.2 2 mol/L 硫酸

116 mL 分析纯浓硫酸缓慢加入 884 mL 去离子水中,分装室温保存。

B.5.3 0.3 mol/L 硫酸

16.6 mL 分析纯浓硫酸缓慢加入 983.4 mL 去离子水中,分装室温保存。

B.6 NSP 3ABC 抗体间接/阻断 ELISA 用洗涤缓冲液

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9 g
吐温-20	0.5 mL

加蒸馏水至 1 000 mL,调整 pH 7.4。

B.7 25 倍浓缩磷酸盐缓冲液(25×PBS)

NaCl	200.0 g
KCl	5.0 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	72.5 g
KH ₂ PO ₄	5.0 g

加蒸馏水至 1 000 mL。103 kPa 高压蒸汽灭菌 30 min,室温保存备用。

B.8 NSP 3ABC 抗体间接/阻断 ELISA 用血清稀释液

马血清	100 mL
酪蛋白	2.5 g
硫柳汞	0.1 g
25 倍浓缩磷酸盐缓冲液	40.0 mL

补充无菌双蒸水或超纯水至 1 000 mL。

附 录 C
(规范性附录)
核酸检测用液体配制

C.1 50×TAE 贮存液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242.0 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH 8.0)	100.0 mL
加双蒸水至 1 000 mL。	

C.2 1×TAE 缓冲液

使用前将 50×TAE 作 50 倍稀释即可。

C.3 电泳加样缓冲液

溴酚蓝	0.25 g
甘油	30.0 mL
双蒸水	70.0 mL