ICS 65.020.30
CCS B41

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB21/TXXXX—XXXX

动物弓形虫病荧光免疫层析检测技术规程

Inspection specification for fluorescent immunochromatographic dectection of toxoplasmosis in animals

（报批稿）

XXXX-XX-XX 发布 XXXX-XX-XX 实施

辽宁省市场监督管理局 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。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：沈阳农业大学、辽宁伟嘉农牧生态食品有限公司。

本文件主要起草人：杨娜、桑晓宇、冯颖、刘攀峰、邓亮、陈冉、杨作丰、李红魁、范治斌、薛英、李德臣、李佳祺、王英。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862。

文件起草单位通讯地址:沈阳农业大学(沈阳市沈河区东陵路120号),联系电话:024-88487053。

动物弓形虫病荧光免疫层析检测技术规程

1 范围

本文件规定了动物弓形虫病荧光免疫层析检测技术规程，包括规范性引用文件、原则、仪器与试剂、样品采集与处理、检测、结果计算、判定标准。

本文件适用于动物（猪、猫等）血清中弓形虫抗体水平的快速检测。

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。

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 原则

基于双抗原夹心荧光免疫层析法，将待检血清样品加入弓形虫荧光免疫层析试纸卡样品垫上，通过虹吸作用沿层析条侧向流动，在检测区被检测，如果是阳性，则 T 线出现条带；如果是阴性，则 T 线无条带；另外 C 线作为质控线，如果 C 线出现说明试纸条是有效的，否则无效。将试纸卡放入荧光免疫分析仪中，通过测定荧光信号强度，可以对抗体滴度进行定量分析。

5 仪器与试剂

5.1 仪器

5.1.1 荧光免疫分析仪

激发波长为365 nm±5 nm，检测波长为610 nm±5 nm。

5.1.2 单道可调移液器

10 μL～100 μL，0.5 μL～10 μL。

5.1.3 分析天平

最小分度值为0.001 g。

5.1.4 离心机

离心速度3000 rpm/min。

5.1.5 冰箱

2 ℃～8 ℃，－20 ℃。

5.2 试剂

5.2.1 样品稀释液

见附录A。

5.2.2 弓形虫荧光免疫层析试纸卡

荧光微球标记的弓形虫重组抗原和鸡IgY埋置在标记物垫内；硝酸纤维素膜（NC膜）的测试线（T线）和控制线（C线）分别包被弓形虫重组抗原和羊抗鸡IgY的IgG。（见图1）

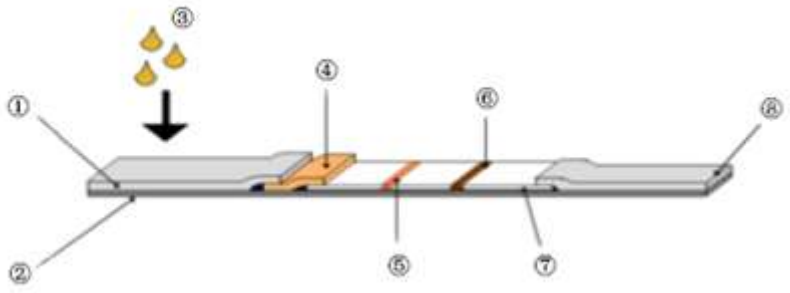

图 1 荧光免疫层析试纸卡结构

①样品垫；②PVC 底板；③待检血清样品；④标记物垫；⑤测试线（T 线）；⑥控制线（C 线）；⑦NC 膜（硝酸纤维素膜）；⑧吸水滤纸

6 样品采集与处理

6.1 样品的采集

按照NY/T 541中的规定进行，并做好安全防护。按常规方法用干燥、洁净的无抗凝剂的离心管或适当容器采集3 mL～5 mL的血液。

6.2 样品的处理

血液样本用离心机3000 rpm/ min离心3 min～5 min，分离血清，血清量不少于500 μL。

6.3 样品的贮存

血清样品在 2 ℃～8 ℃ 条件下保存应小于 24 h。如需长期保存应置于－20 ℃条件下，避免反复冻融。

7 检测

7.1 样本稀释

将弓形虫荧光免疫层析试纸和待检血清样品回温至25℃左右。将待检血清样本先用样品稀释液进行10倍稀释，即1份待检血清样品与9份样品稀释液混合（例如，100 μL待检血清样品与900 μL样品稀释液混合）。

7.2 加样

将荧光免疫层析检测卡放于干净平坦的台面上，用移液器吸取已经稀释好的100 μL待检血清样本，垂直加样于检测卡的加样孔内。

7.3 荧光检测

室温静置15 min，立即采用荧光免疫分析仪检测，测定T线和C线荧光信号，读取分析仪显示数值，该数值即为抗体效价。

7.4 有效性控制

7.4.1 空白对照

将荧光免疫层析检测卡放于干净平坦的台面上，用移液器吸取样品稀释液100 μL于检测卡的加样孔内，如果控制线（C线）检测到荧光信号，试验结果有效；否则，试验无效。

7.4.2 阴性对照

将荧光免疫层析检测卡放于干净平坦的台面上，用移液器吸取稀释液稀释好的阴性血清100 μL于检测卡的加样孔内，如果控制线（C线）检测到荧光信号，试验结果有效；否则，试验无效。

7.4.3 阳性对照

将荧光免疫层析检测卡放于干净平坦的台面上，用移液器吸取稀释液稀释好的阳性血清100μL于检测卡的加样孔内，如果控制线（C线）和检测线（T线）检测到荧光信号，试验结果有效；否则，试验无效。

8 结果计算

A_n（n=1,2,3,4,5）-荧光免疫分析仪读取标准品溶液的检测卡上的荧光信号的T/C值。

以标准品溶液的T/C值的对数为纵坐标，以弓形虫抗体阳性血清效价的对数为横坐标，绘制标准曲线图。将待测样本的荧光信号的T/C值代入标准曲线中，从标准曲线上读出所对应的样本的弓形虫抗体效价。

注：软件自带计算功能，能准确算出当前样本荧光信号的T/C值所对应的弓形虫抗体效价。

9 判定标准

被检血清抗体效价≥1:128时，判为阳性；被检血清抗体效价≤1:64时，判为阴性；被检血清抗体效价1:64～1:128时，判为可疑。

附 录 A
（资料性）
样品稀释液

A.1 样品稀释液成分

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	4.02 g
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.66 g
NaCl	9 g
Proclin300	1 mL
吐温20（Tween-20）	1 mL
双蒸水	1 L

A.2 制法

将$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$、$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$、NaCl同时放入装有800 mL双蒸水的1 L 烧杯中搅拌融化，再加入Proclin300混匀，然后加入吐温20混匀，最后用双蒸水将烧杯溶液定容至1 L。

A.3 储存

配置好的样品稀释液分装，置于2 ℃～8 ℃保存备用，储存时间不超过14天。