

ICS

CCS

团体标准

T/CI XXX —2021

猫快速体外诊断技术指南

Technical Guidelines on Canine Fast In Vitro Diagnosis

(征求意见稿)

2021-x-XX 发布

2021-x-XX 实施

中国国际科技促进会 发布

目 录

猫快速体外诊断技术指南.....	1
目 录.....	2
前 言.....	1
猫快速体外诊断技术指南.....	2
1 适用范围.....	2
2 术语和定义.....	2
2.1 体外诊断.....	2
2.2 侧流免疫层析.....	2
2.3 快速酶联免疫吸附实验.....	2
2.4 核酸检测技术.....	2
2.5 液基细胞技术.....	2
3 猫体外诊断技术与技术标准.....	3
3.1 样本类型、采样及样本处理方法.....	3
3.1.1 血液类.....	3
3.1.2 分泌物类.....	3
3.1.3 粪便类.....	3
3.2 体外诊断技术分类与技术标准.....	4
3.2.1 侧流免疫层析法.....	4
3.2.2 快速 ELISA 法.....	7
3.3 核酸检测技术.....	13
3.3.1 实时定量荧光 PCR.....	13
3.3.2 实时荧光核酸恒温扩增检测技术.....	15
3.4 液基细胞技术.....	17
3.4.1 范围.....	17
3.4.2 原理.....	17
3.4.3 试剂和器材.....	17
3.4.4 操作步骤.....	17

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》起草。

本指南规定了猫快速体外诊断的技术及方法。

本指南由中国国际科技促进会提出并归口。

本指南为首次发布，今后将根据猫快速诊断技术实验要求及技术发展情况适时修订。

本指南由山东鑫桥联康生物工程有限公司负责管理，由山东鑫桥联康生物工程有限公司产品研发部负责具体技术内容的解释。为了提高质量，请各单位在使用过程中，总结经验和积累资料，及时将发现的问题和意见反馈给山东鑫桥联康生物工程有限公司产品研发部以供后续修订时参考。联系方式：山东省枣庄市高新区互联网小镇 15 号楼 4 楼，刘忠，邮编：277400，E-mail: lz@xqykbio.com 。

本指南起草单位：山东鑫桥联康生物工程有限公司、浙江大学山东工业技术研究院、北京鑫桥怡康生物科技有限公司、山东鑫诺生物工程有限公司、枣庄市农业农村事业发展中心

本指南主要起草人：刘忠，刘青平，岳子易，李世豪，杨阳，刘世杰，李明鑫，曹凯。

猫快速体外诊断技术指南

1 适用范围

本指南规定了猫快速体外诊断技术的实验条件要求、实验设计、实施与验证，相关仪器及检测原理等技术要求。

本指南可作为检测猫相应生理或病理指标的指导性文件，可供猫快速体外诊断技术研发单位，宠物医院，第三方检测中心等参考。

根据《中华人民共和国专利法》，对于本指南中所涉及专利技术的使用，需获得专利权所有人书面许可。

2 术语和定义

2.1 体外诊断

体外诊断即 IVD(In Vitro Diagnosis)，是指在人或动物体外，通过对人或动物样本(血液、体液、排泄物、组织等)进行检测而获取临床诊断信息，进而判断疾病或机体功能的产品和服务。体外诊断产品主要由诊断设备（仪器）和诊断试剂构成。

2.2 侧流免疫层析

侧流免疫层析（lateral flow immunoassay, LFIA）技术，是基于免疫层析原理建立起来的快速检测技术。其原理为待检样品在虹吸作用流经测试区，在侧向流动过程中，待检样品与结合垫和层析膜上的生物活性材料（抗原、抗体、核酸偶联物等）先后发生特异性结合，并在层析膜上形成可被检测（或肉眼可见）的检测线和质控线。

侧流免疫层析技术根据检测分子大小和检测原理不同主要分为两种检测方法：一种为直接法，即双抗体夹心法，主要用于检测多抗原表位的生物大分子；另一种为竞争法，主要用于检测半抗原，即不具备免疫原性的小分子化合物（如激素，药物，毒素，糖类等）。

侧流免疫层析技术根据检测信号的呈现形式主要可分为定性（或半定量）的胶体金免疫层析技术和可定量的荧光免疫层析技术。

2.3 快速酶联免疫吸附实验

快速酶联免疫吸附试验（ELISA）不同于传统 ELISA，其用平面测试板代替了微孔反应板，并且用高效的特异性抗体将反应时间缩短至 1hr 以内，适用于临床快速体外诊断。

2.4 核酸检测技术

猫类快速体外诊断所用的核酸检测技术主要是对样本中病原微生物、病毒、寄生虫等特定核酸片段扩增和检测，进而为临床判断提供诊断依据的技术，目前常用的快速核酸检测技术包括，荧光定量 PCR 和等温扩增技术，以及基于核酸扩增和其他方法学的新型核酸检测技术。

2.5 液基细胞技术

液基细胞技术是利用细胞学原理，去除细胞样品中诸如黏液等影响因素，将样本细胞溶于固定液，染色后涂片镜检，可自动化操作，节约检测样本的时间，极大地提高了涂片质量及读片结果，减少许多人为因素的影响。TCT 技术是唯一获得 FDA 认证，可以提高癌前病变检出率的液基薄层细胞学技术。

3 猫体外诊断技术与技术标准

3.1 样本类型、采样及样本处理方法

3.1.1 血液类

猫常用采血部位有：后肢外侧小隐静脉、前肢内侧头静脉、股动脉、心脏、耳缘静脉、颈静脉。

3.1.1.1 全血

3.1.1.1.1 不添加任何添加剂的全血

用移液器取适量新鲜采集的全血加入指定的稀释液中，上下颠倒混匀后使用；部分项目如不需稀释处理，可直接使用。室温下采集的全血应尽快检测，不宜留存后使用。

3.1.1.1.2 抗凝全血

抗凝全血是指进行了抗凝处理的全血样本，一般采用添加了抗凝剂的采血管采血。常用抗凝采血管添加的抗凝剂有肝素，EDTA，枸橼酸钠，草酸盐等。

3.1.1.2 血清

用于快速检测的血清样本一般用促凝采血管采血获得。常见的促凝采血管有添加了促凝剂的采血管和添加了惰性分离凝胶和促凝剂的采血管。采集到的促凝血经离心沉淀后可分离得到血清。

3.1.1.3 血浆

用抗凝采血管采集到的全血，离心沉淀后可得到用于快速检测的血浆。

3.1.2 分泌物类

用于猫快速体外诊断的分泌物类样本主要是眼鼻口分泌物，可用棉签拭子在采样部位转 3-5 圈采集样本。将采样后的棉拭子在相应样本稀释液中搅动 8-10 次，然后将棉头在稀释液管壁按压后取出棉签。

3.1.3 粪便类

粪便样本采集可直接用棉签拭子挑取适量新鲜的粪便，或用棉签拭子在猫肛门内壁旋转 3-5 圈取样。将采样后的棉拭子在相应样本稀释液中搅动 8-10 次，然后将棉头在稀释液管壁按压后取出棉签。静置 1min 后可用于免疫层析检测。

3.2 体外诊断技术分类与技术标准

3.2.1 侧流免疫层析法

侧流免疫层析法根据检测靶标和检测原理的不同可分为直接法和竞争法。

3.2.1.1 直接法

直接法免疫层析技术可用于检测样本中的抗原（病原微生物抗原和自身抗原）分子，也可用于检测血清或血浆中的特异性抗体，用于疫病诊断和免疫效果的评价。

3.2.1.1.1 抗原检测

3.2.1.1.1.1 范围

本标准规定了直接法侧流免疫层析技术所用试剂、器材和操作步骤等。

本标准适用于猫抗原（病原微生物抗原或自身抗原）分子的快速体外检测，包括但不限于以下疫病，病原微生物、病毒或自身抗原的检测：炎症类（猫 CRP 等），传染病类（猫疱疹病毒，猫瘟热病毒，猫冠状病毒，猫杯状病毒，弓形虫等），糖尿病类（猫糖化血红蛋白等），激素类（促甲状腺激素等），心脏病类（猫 N 末端脑钠肽，）猫胰脂肪酶等。

3.2.1.1.1.2 原理

侧流免疫层析抗原检测技术是利用了双抗体夹心法检测原理，具体是样本中的抗原滴加到试纸条样品垫上后在虹吸作用下向反应端流动，流经结合垫时，与结合垫上标记的检测抗体结合，形成抗原-检测抗体-标记物复合物，该复合物流经 NC 膜时与检测线处的捕获抗体捕获，形成可被检测到的检测线，未结合抗原的检测抗体-标记物和未被捕获的抗原-检测抗体-标记物复合物流经质控线时被质控抗体捕获，形成质控线。

3.2.1.1.1.3 主要试剂和器材

3.2.1.1.1.3.1 试剂

3.2.1.1.1.3.1.1 样本稀释液 (如需要)

常用稀释液为 PBST（10mM PBS+0.5% Tween-20）。

3.2.1.1.1.3.2 器材

3.2.1.1.1.3.2.1 免疫层析试剂卡

免疫层析试剂卡多在常温下保存，如需冷藏者，须提前平衡至室温后方可拆封使用。如试剂卡包装破损则不可使用。

3.2.1.1.1.3.2.2 免疫层析读数仪

免疫层析读数仪包括安装了电荷耦合件（CCD）照相机检测胶体金和检测荧光信号的手持、便携或多通道读数仪，用于检测免疫层析试剂卡结果和出示检测报告。

3.2.1.1.1.3.3 微量移液器

微量移液器（2~10 μL ，10~100 μL ）用于吸取血液类需稀释样本和滴加待检样本。

3.2.1.1.1.4 操作步骤

3.2.1.1.1.4.1 加样

从铝箔袋（需冷藏者提前平衡至室温）中取出试剂卡，按要求在加样孔滴加 指定体积 3.1 中取得的样本（稀释或不稀释）。室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.1.1.1.4.2 检测

持免疫层析试剂卡手柄端将反应后的试剂卡插入读数仪，按要求读取检测结果，出示检测报告。

3.2.1.1.2 抗体检测

3.2.1.1.2.1.1 范围

本标准规定了直接法侧流免疫层析技术所用试剂、器材和操作步骤等。

本标准适用于猫特异性抗体（抗病原微生物或病毒）分子的快速体外检测，包括但不限于以下病原微生物、病毒抗体的检测：猫疱疹病毒，猫瘟热病毒，猫冠状病毒，猫杯状病毒，弓形虫等。

3.2.1.1.2.1.2 原理

免疫层析抗体检测技术利用抗原-抗体特异性结合的原理检测待检样本中抗特异性抗原的抗体。待检样本加到试剂卡加样孔中，样本沿样品垫流至结合垫时，样本中的抗体（IgG）与标记的抗-猫 IgG 抗体结合形成复合物，该复合物被检测线上的抗原捕获，形成可被检测到的检测线，未被捕获的复合物和未结合特异性抗体的标记抗体在流经质控线时被质控抗体捕获，形成质控线。

3.2.1.1.2.1.3 主要试剂和器材

3.2.1.1.2.1.3.1 试剂

3.2.1.1.2.1.3.1.1 样本稀释液

抗体检测的样本稀释液一般为生理盐水+0.1% Tween 20。

3.2.1.1.2.1.3.2 器材

3.2.1.1.2.1.3.2.1 抗体检测免疫层析试剂卡

免疫层析试剂卡多在常温下保存，如需冷藏者，须提前平衡至室温后方可拆封使用。如试剂卡包装破损则不可使用。

3.2.1.1.2.1.3.2.2 免疫层析读数仪

免疫层析读数仪包括安装了电荷耦合件（CCD）照相机检测胶体金和检测荧光信号的手持、便携或多通道读数仪，用于检测免疫层析试剂卡结果和出示检测报告。

3.2.1.1.2.1.3.2.3 微量移液器

微量移液器（2~10 μL ，10~100 μL ）用于吸取血液类需稀释样本和滴加待检样本。

3.2.1.1.2.1.3.3 操作步骤

3.2.1.1.2.1.3.3.1 加样

从铝箔袋（需冷藏者提前平衡至室温）中取出试剂卡，按要求在加样孔滴加 指定体积 3.1 中取得的样本（稀释或不稀释）。室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.1.1.2.1.3.3.2 检测

持免疫层析试剂卡手柄端将反应后的试剂卡插入读数仪，按要求读取检测结果，出示检测报告。

3.2.1.2 竞争法

竞争法侧流免疫层析技术主要用于检测半抗原，即不具备免疫原性的小分子化合物（如激素，药物，毒素，糖类等）。

3.2.1.2.1 范围

本标准规定了竞争法侧流免疫层析技术所用试剂、器材和操作步骤等。

本标准适用于猫半抗原分子（如激素，药物，毒素，糖类等）的快速体外检测，包括但不限于以下项目的检测：T4，血清游离 T4，T3，血清游离 T3，孕酮 皮质醇，LH 等。

3.2.1.2.2 原理

竞争法侧流免疫层析法主要是利用了半抗原分子只有单一抗原决定簇的特点，将偶联了载体分子的半抗原包被固定在 NC 膜上作为检测线。当样本加到加样孔中后，样本流至结合垫时，样本中待测抗原分子与结合垫上标记的抗半抗原抗体-偶联物（标记探针）结合形成半抗原-抗半抗原抗体-偶联物复合物，后者在虹吸作用下流至检测线时，待检半抗原与检测线处半抗原竞争结合标记探针，检测线所结合标记探针的量与样本中半抗原含量呈负相关。未结合的标记探针被质控线处的抗探针抗体结合形成质控线。

3.2.1.2.3 主要试剂和器材

3.2.1.2.3.1 试剂

3.2.1.2.3.1.1 样本稀释液

抗体检测的样本稀释液一般为生理盐水+0.1% Tween 20。

3.2.1.2.3.2 器材

3.2.1.2.3.2.1.1.1 抗体检测免疫层析试剂卡

免疫层析试剂卡多在常温下保存，如需冷藏者，须提前平衡至室温后方可拆封使用。如试剂卡包装破损则不可使用。

3.2.1.2.3.2.1.1.2 免疫层析读数仪

免疫层析读数仪包括安装了电荷耦合件（CCD）照相机检测胶体金和检测荧光信号的手持、便携或多通道读数仪，用于检测免疫层析试剂卡结果和出示检测报告。

3.2.1.2.3.2.1.1.3 微量移液器

微量移液器（2~10 μL ，10~100 μL ）用于吸取血液类需稀释样本和滴加待检样本。

3.2.1.2.4 操作步骤

3.2.1.2.4.1.1.1.1 加样

从铝箔袋（需冷藏者提前平衡至室温）中取出试剂卡，按要求在加样孔滴加 指定体积 3.1 中取得的样本（稀释或不稀释）。室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.1.2.4.1.1.1.2 检测

持免疫层析试剂卡手柄端将反应后的试剂卡插入读数仪，按要求读取检测结果，出示检测报告。

3.2.2 快速 ELISA 法

快速 ELISA 法根据检测靶标和检测原理的不同可分为直接法和竞争法。

3.2.2.1 直接法

直接法快速 ELISA 技术可用于检测样本中的抗原（病原微生物抗原和自身抗原）分子，也可用于检测血清或血浆中的特异性抗体，用于疫病诊断和免疫效果的评价。

3.2.2.1.1 抗原检测

3.2.2.1.1.1 范围

本标准规定了直接法快速 ELISA 技术所用试剂、器材和操作步骤等。

本标准适用于猫抗原（病原微生物抗原或自身抗原）分子的快速体外检测，包括但不限于以下疫病，病原微生物、病毒或自身抗原的检测：炎症类（猫 CRP 等），传染病类（猫疱疹病毒，猫瘟热病毒，猫冠状病毒，猫杯状病毒，弓形虫等），糖尿病类（猫糖化血红蛋白等），激素类（促甲状腺激素等），心脏病类（猫 N 末端脑钠肽，）猫胰脂肪酶等。

3.2.2.1.1.2 原理

快速 ELISA 法抗原检测技术是利用了双抗体夹心法检测原理，具体是在测试板上分别包被抗特异抗原的捕获抗体和抗检测抗体的质控抗体。当测试板插入含有抗原的样本溶液中时，样本中抗原与捕获抗体结合被捕获固定在测试板上，经过洗涤后，测试板插入含有检测抗体-酶偶联物的溶液中，该偶联物与测试板上的捕获抗体-抗原复合物结合，同时测试板上的质控抗体也会结合检测抗体-酶偶联物。将测试板洗涤后插入到含酶底物中，底物沉淀集结在测试板上，底物的沉积量与测试板上酶含量呈正相关。

3.2.2.1.1.3 主要试剂和器材

3.2.2.1.1.3.1 试剂

3.2.2.1.1.3.1.1 样本稀释液 (如需要)

常用稀释液为 PBST（10mM PBS+0.5% Tween-20）。

3.2.2.1.1.3.2 器材

3.2.2.1.1.3.2.1 快速 ELISA 检测板

快速 ELISA 法检测板常在 2-8℃ 下保存，使用前须提前平衡至室温后方可拆封使用。如反应槽包装破损则不可使用。根据测试样本数量剪取对应数目的反应板。

3.2.2.1.1.3.2.2 快速 ELISA 试剂盒反应槽

快速 ELISA 法反应槽常在 2-8℃下保存，使用前须提前平衡至室温后方可拆封使用。如反应槽包装破损则不可使用。

3.2.2.1.1.3.2.3 快速 ELISA 法读数仪

快速 ELISA 法读数仪通常安装了电荷耦合件（CCD）用于检测快速 ELISA 检测板结果和出示检测报告。

3.2.2.1.1.3.3 微量移液器

微量移液器（2~10 μL ，10~100 μL ）用于吸取血液类需稀释样本和滴加待检样本。

3.2.2.1.1.4 操作步骤

3.2.2.1.1.4.1 加样

从铝箔袋（需冷藏者提前平衡至室温）中取出快速 ELISA 反应槽，按要求在加样反应孔加入指定体积 3.1 中取得的样本，用移液器反复吹打 10 次以混匀。将快速 ELISA 检测板插入上述加样反应孔中。室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.2.1.1.4.2 洗涤

将测试板插入洗涤孔中，浸泡洗涤 1~2min。

3.2.2.1.1.4.3 加检测抗体-酶偶联物

将检测板插入到含检测抗体-酶偶联物的反应孔中。室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.2.1.1.4.4 洗涤

将检测板插入新的洗涤孔中，浸泡洗涤 1~2min，根据需要重复 1~2 次本步骤。

3.2.2.1.1.4.5 加底物

将检测板插入到含底物的孔中，室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.2.1.1.4.6 检测（或比色）

持快速 ELISA 检测卡手柄端将反应后的检测卡插入读数仪，按要求读取检测结果，出示检测报告。

如为比色类检测项目，将检测卡结果与标准比色卡比较，得出检测结果。

3.2.2.1.2 抗体检测

3.2.2.1.2.1 范围

本标准规定了直接法快速 ELISA 技术所用试剂、器材和操作步骤等。

本标准适用于猫特异性抗体（抗病原微生物或病毒）分子的快速体外检测，包括但不限于以下病原微生物、病毒抗体的检测：猫疱疹病毒，猫瘟热病毒，猫冠状病毒，猫杯状病毒，弓形虫等。

3.2.2.1.2.2 原理

快速 ELISA 法抗体检测技术是利用了抗原-抗体特异性结合的原理，具体是在测试板上分别包被特异抗原和抗检测抗体（抗猫 IgG 抗体）的质控抗体。当测试板插入含有待检抗体的样本中时，样本中特异性与包被抗原结合被捕获固定在测试板上，经过洗涤后，测试板插入含有抗猫 IgG 抗体（检测抗体）-酶偶联物的溶液中，该偶联物与测试板上的特异性抗体-抗原复合物结合，同时测试板上的质控抗体也会结合检测抗体-酶偶联物。将测试板洗涤后插入到含酶底物中，底物沉淀集结在测试板上，底物的沉积量与测试板上酶含量呈正相关。

3.2.2.1.2.3 主要试剂和器材

3.2.2.1.2.3.1 试剂

3.2.2.1.2.3.1.1 样本稀释液（如需要）

常用稀释液为 PBST（10mM PBS+0.5% Tween-20）。

3.2.2.1.2.3.2 器材

3.2.2.1.2.3.2.1 快速 ELISA 检测板

快速 ELISA 法检测板常在 2-8℃ 下保存，使用前须提前平衡至室温后方可拆封使用。如反应槽包装破损则不可使用。根据测试样本数量剪取对应数目的反应板。

3.2.2.1.2.3.2.2 快速 ELISA 试剂盒反应槽

快速 ELISA 法反应槽常在 2-8℃ 下保存，使用前须提前平衡至室温后方可拆封使用。如反应槽包装破损则不可使用。

3.2.2.1.2.3.2.3 快速 ELISA 法读数仪

快速 ELISA 法读数仪通常安装了电荷耦合件（CCD）用于检测快速 ELISA 检测板结果和出示检测报告。

3.2.2.1.2.3.2.4 微量移液器

微量移液器（2~10 μL ，10~100 μL ）用于吸取血液类需稀释样本和滴加待检样本。

3.2.2.1.2.4 操作步骤

3.2.2.1.2.4.1 加样

从铝箔袋（需冷藏者提前平衡至室温）中取出快速 ELISA 反应槽，按要求在加样反应孔加入指定体积 3.1 中取得的样本，用移液器反复吹打 10 次以混匀。将快速 ELISA 检测板插入上述加样反应孔中。室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.2.1.2.4.2 洗涤

将测试板插入洗涤孔中，浸泡洗涤 1~2min。

3.2.2.1.2.4.3 加检测抗体-酶偶联物

将检测板插入到含检测抗体-酶偶联物的反应孔中。室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.2.1.2.4.4 洗涤

将检测板插入新的洗涤孔中，浸泡洗涤 1~2min，根据需要重复 1~2 次本步骤。

3.2.2.1.2.4.5 加底物

将检测板插入到含底物的孔中，室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.2.1.2.4.6 检测（或比色）

持快速 ELISA 检测卡手柄端将反应后的检测卡插入读数仪，按要求读取检测结果，出示检测报告。

如为比色类检测项目，将检测卡结果与标准比色卡比较，得出检测结果。

3.2.2.2 竞争法

竞争法快速 ELISA 技术主要用于检测半抗原，即不具备免疫原性的小分子化合物（如激素，药物，毒素，糖类等）。

3.2.2.2.1 范围

本标准规定了竞争法快速 ELISA 技术所用试剂、器材和操作步骤等。

本标准适用于猫半抗原分子（如激素，药物，毒素，糖类等）的快速体外检测，包括但不限于以下项目的检测：T4，血清游离 T4，T3,血清游离 T3,孕酮 皮质醇，LH 等。

3.2.2.2.2 原理

竞争法快速 ELISA 技术主要是利用了半抗原分子只有单一抗原决定簇的特点，抗半抗原抗体包被固定在检测卡上，当检测卡插入到样本溶液中后，检测卡上包被的抗半抗原与样本中半抗原结合，当检测卡插入到含酶-半抗原的溶液中时，样本中半抗原与酶-半抗原偶联物竞争结合检测卡上的抗体，检测卡结合酶标抗原的量与样本中半抗原含量呈负相关。

3.2.2.2.3 主要试剂和器材

3.2.2.2.3.1 试剂

3.2.2.2.3.1.1 样本稀释液（如需要）

常用稀释液为 PBST（10mM PBS+0.5% Tween-20）。

3.2.2.2.3.2 器材

3.2.2.2.3.2.1 快速 ELISA 检测板

快速 ELISA 法检测板常在 2-8℃下保存，使用前须提前平衡至室温后方可拆封使用。如反应槽包装破损则不可使用。根据测试样本数量剪取对应数目的反应板。

3.2.2.2.3.2.2 快速 ELISA 试剂盒反应槽

快速 ELISA 法反应槽常在 2-8℃下保存，使用前须提前平衡至室温后方可拆封使用。如反应槽包装破损则不可使用。

3.2.2.2.3.2.3 快速 ELISA 法读数仪

快速 ELISA 法读数仪通常安装了电荷耦合件（CCD）用于检测快速 ELISA 检测板结果和出示检测报告。

3.2.2.2.3.2.4 微量移液器

微量移液器（2~10μL，10~100μL）用于吸取血液类需稀释样本和滴加待检样本。

3.2.2.2.4 操作步骤

3.2.2.2.4.1 加样

从铝箔袋（需冷藏者提前平衡至室温）中取出快速 ELISA 反应槽，按要求在加样反应孔加入指定体积 3.1 中取得的样本，用移液器反复吹打 10 次以混匀。将快速 ELISA 检测板插入上述加样反应孔中。室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.2.2.4.2 洗涤

将测试板插入洗涤孔中，浸泡洗涤 1~2min。

3.2.2.2.4.3 加检测半抗原-酶偶联物

将检测板插入到含检测半抗原-酶偶联物的反应孔中。室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.2.2.4.4 洗涤

将检测板插入新的洗涤孔中，浸泡洗涤 1~2min，根据需要重复 1~2 次本步骤。

3.2.2.2.4.5 加底物

将检测板插入到含底物的孔中，室温下反应指定时间（一般为 5~10 min）。

3.2.2.2.4.6 检测（或比色）

持快速 ELISA 检测卡手柄端将反应后的检测卡插入读数仪，按要求读取检测结果，出示检测报告。

如为比色类检测项目，将检测卡结果与标准比色卡比较，得出检测结果。

3.3 核酸检测技术

常用于猫的快速核酸检测技术包括实时定量荧光 PCR 技术和实时荧光核酸恒温扩增检测技术等，二者的区别在于对核酸片段的扩增原理不同。

3.3.1 实时定量荧光 PCR

实时荧光定量 PCR 技术是指在 PCR 反应体系中加入荧光染料或基团、利用荧光信号来实时监测整个 PCR 过程，最后通过标准曲线对未知模板浓度进行定量分析。

3.3.1.1 范围

本标准规定了实时荧光定量 PCR 技术所用试剂、器材和操作步骤等。

本标准适用于猫病原微生物、寄生虫或病毒等核酸分子的快速体外检测，包括但不限于以下病原微生物、病毒及寄生虫的快速检测：猫支原体，猫衣原体，猫疱疹病毒，猫瘟热病毒，猫副流感病毒，猫疱疹病毒，猫冠状病毒，猫杯状病毒，弓形虫等。

3.3.1.2 原理

PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针，该探针为一寡核苷酸，两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；刚开始时，探针结合在 DNA 任意一条单链上；PCR 扩增时，Taq 酶的 5' 端—3' 端外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

3.3.1.3 试剂和器材

3.3.1.3.1 试剂

3.3.1.3.1.1 核酸提取液

用于样本核酸提取。

3.3.1.3.1.2 反应液

核酸扩增，检测反应体系，含引物，酶，荧光染料等。

3.3.1.3.2 器材

3.3.1.3.2.1 荧光定量 PCR 仪

快速荧光定量 PCR 仪用于核酸扩增和检测。

3.3.1.3.2.2 金属浴

用于核酸提取。

3.3.1.3.2.3 离心机

用于样本处理，核酸提取等。

3.3.1.3.2.4 微量移液器

用于加样，转移核酸提取物等。

3.3.1.4 操作步骤

3.3.1.4.1 核酸提取

将指定体积的样本加入核酸提取液，混匀后静置备用。

3.3.1.4.2 加样

取一定体积的核酸提取物加入反应液管，混匀备用。

3.3.1.4.3 上机检测

将加样后的反应液管放入荧光定量 PCR 仪，选定程序，系统自动完成扩增并出具报告。

3.3.2 实时荧光核酸恒温扩增检测技术

实时荧光核酸恒温扩增检测技术（Simultaneous Amplification and Testing，简称 SAT）是将新一代的核酸恒温扩增技术和实时荧光检测技术相结合的一种新型核酸检测技术。该技术具有高灵敏度、高特异性、低污染、反应稳定等优点。

3.3.2.1 范围

本标准规定了实时荧光定量 PCR 技术所用试剂、器材和操作步骤等。

本标准适用于猫病原微生物、寄生虫或病毒等核酸分子的快速体外检测，包括但不限于以下病原微生物、病毒及寄生虫的快速检测：猫支原体，猫衣原体，猫疱疹病毒，猫瘟热病毒，猫副流感病毒，猫疱疹病毒，猫冠状病毒，猫杯状病毒，弓形虫等。

3.3.2.2 原理

恒温扩增技术（Isothermal Amplification Technology）是继 PCR 技术后发展起来的一门新型的体外核酸扩增技术，其反应过程始终维持在恒定的温度下，通过添加不同活性的酶和各自特异性引物来达到快速核酸扩增的目的。目前主要的恒温扩增技术有：滚环核酸扩增、环介导等温扩增、链替代扩增、依赖核酸序列扩增和解链酶扩增。它们都具有共同的特点：恒温、高效、特异、不需要特殊的仪器设备。

3.3.2.3 试剂和器材

3.3.2.3.1 试剂

3.3.2.3.1.1 核酸提取液

用于样本核酸提取。

3.3.2.3.1.2 反应液

核酸扩增，检测反应体系，含引物，酶，荧光染料等。

3.3.2.3.2 器材

3.3.2.3.2.1 荧光定量 PCR 仪

快速荧光定量 PCR 仪用于核酸扩增和检测。

3.3.2.3.2.2 金属浴

用于核酸提取。

3.3.2.3.2.3 离心机

用于样本处理，核酸提取等。

3.3.2.3.2.4 微量移液器

用于加样，转移核酸提取物等。

3.3.2.4 操作步骤

3.3.2.4.1 核酸提取

将指定体积的样本加入核酸提取液，混匀后静置备用。

3.3.2.4.2 加样

取一定体积的核酸提取物加入反应液管，混匀备用。

3.3.2.4.3 上机检测

将加样后的反应液管放入荧光定量 PCR 仪，选定程序，系统自动完成扩增并出具报告。

3.4 液基细胞技术

液基细胞技术由美国 Cytoc 公司在 1987 年研 发成功，1991 年获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA)批准，我国在 2000 年以后开始广泛应用于各医疗服务机构，用于取代传统的巴氏试验 (Papanicolaou test)。近年来已有部分基于液基细胞计数的产品应用于猫的快速体外诊断。

3.4.1 范围

本标准规定了液基细胞技术所用试剂、器材和操作步骤等。

本标准适用于猫粪便或尿液脱落细胞，寄生虫或虫卵的快速检测，包括但不限于以下寄生虫的检测：猫蛔虫，弓形虫等。

3.4.2 原理

液基细胞技术所用样本处理液（细胞保存液）可祛除样本中粘液等影响因素，将样本细胞溶于固定液，染色后涂片镜检，可自动化操作。

3.4.3 试剂和器材

3.4.3.1 试剂

3.4.3.1.1 液基细胞保存液

用于存放处理样本。

3.4.3.2 器材

3.4.3.2.1 载玻片

用于滴加细胞样本用于镜检。

3.4.3.2.2 显微镜或自动染色检测仪

用于检查载玻片样本结果。

3.4.4 操作步骤

3.4.4.1 加样

将取得的样本（粪便或尿液）加入到液基细胞保存液中。

3.4.4.2 制片

将细胞保存液滴加到载玻片上，盖上盖玻片以备镜检。

3.4.4.3 镜检并报告结果

显微镜下检查并汇报结果。

征文意见稿