

团 体 标 准

T/CVMA 217—2025

棘球蚴（包虫）时间分辨荧光免疫层析抗体 检测方法

TRFIA for detection of antibodies against hydatidosis antibody

2025 - 2 - 14 发布

2025 - 2 - 14 实施

中国兽医协会 发布

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件由中国动物疫病预防控制中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心、青海省动物疫病预防控制中心、河南科技大学、新疆维吾尔自治区动物疾病预防控制中心、洛阳现代生物技术研究有限公司、西藏自治区动物疫病预防控制中心、甘肃省动物疫病预防控制中心、洛阳莱普生信息科技有限公司。

本文件主要起草人：孙雨、阚威、李玉婉、李静、宋晓晖、宁立宏、林元清、李长印、马晓艳、游潇倩、都占林、吴兵、马艳萍、马占军、齐海涛、陈帆、原小燕、巨金铃、刘蓉菁、谢得军、杨俊鹏、曾战豪、曹丽萍、刘慧芳、央珍、卓玛央吉。

中国兽医协会
CVMA

棘球蚴（包虫）时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法

1 范围

本文件规定了棘球蚴（包虫）时间分辨荧光免疫层析抗体检测方法的试剂与耗材、技术原理、实验前准备、操作步骤、结果计算、试验成立条件及结果判定等内容。

本文件适用于检测牛、羊血清中的棘球蚴（包虫）抗体。

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

时间分辨荧光免疫层析技术 Time resolved fluorescence immunochromatographic assay; TRFIA

以时间分辨荧光微球作为示踪物，将抗原抗体固定在硝酸纤维素膜上，通过层析来呈现免疫反应结果的一种新型免疫分析技术。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BCA: 双缩脲试剂法蛋白含量测定 (Bicinchoninic Acid Assay)

IPTG: 异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl Thiogalactoside)

SDS-PAGE: 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

5 技术原理

采用时间分辨荧光免疫层析技术和双抗原夹心法相结合的技术与原理。通过样品与荧光微球标记物沿层析膜移动，样品棘球蚴Eg95抗体与荧光微球标记物、检测线（T线）上的抗原结合而产生荧光信号值（T值），荧光微球标记物继续移动与质控线（C线）上的抗体结合产生荧光信号值（C值），计算出T/C值即为棘球蚴抗体检测值。

6 试剂与耗材

- 6.1 棘球蚴（包虫）抗体荧光微球检测试纸，见附录 A。
- 6.2 相关试剂配制，按照附录 B 配制。
- 6.3 微量毛细采样管（10 μL ）。
- 6.4 微量移液器（量程：10 μL 、20 μL 、200 μL ）。
- 6.5 便携式免疫荧光分析仪及配套 ID 卡，能在荧光检测波段 365/610 nm 条件下检测，按照附录 C 操作。
- 6.6 注射器（5 mL、10 mL）。

7 样品的采集及处理

7.1 样品采集

按照 NY/T 541 中规定进行样品的采集与处理，期间做好个人防护。按常规方法抽取 2 mL ~ 3 mL 血液置洁净干燥的试管中，静置约 60 min，待血液凝固后 4000 r/min 离心 10 min（也可将血液样品静置约 120 min，待血液凝固自然析出血清），分离血清。血清清亮，无溶血、无污染。

7.2 血清样品的保存与运输

按照 NY/T 541 中规定进行血清样品的存放与运输。血清样本若在一周内检测，置 2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。若长时间保存，应置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻保存，且应避免反复冻融。

8 操作步骤

8.1 样品稀释

将微量毛细采样管取 10 μL 全血或血清样本加入到样本稀释液中混匀，稀释后的样品应在 1 h 内完成检测。可按照以下两种方式稀释：

- a) 离心管稀释：将检测样本在 1.5 mL 离心管中做 10 倍稀释并混匀。
- b) 稀释板稀释：将检测样本在稀释板上做 10 倍稀释并混匀。

8.2 取检测卡

将恢复至室温的试纸卡从铝箔包装中取出，将检测卡放于平整、洁净的台面上。

8.3 加样及孵育

用配套吸管吸取已稀释好的样品，垂直而缓慢的滴加 2 滴 ~ 3 滴（约 80 μL ）到加样孔内，室温下放置 10 min ~ 15 min。

8.4 仪器检测并读值

读数前先将产品配套 ID 卡插入便携式荧光免疫分析仪，之后将完成反应的检测试纸加样孔朝里插入便携式荧光免疫分析仪，点击“快速检测”进行读数。超过 25 min 的检测结果无效。

9 结果计算

便携式荧光免疫分析仪通过 365/610 nm 光波激发和收集检测线（T 线）和质控线（C 线）上的荧光信号，仪器将荧光信号值转换成数值（T 值和 C 值），T/C 值即为样品中棘球蚴抗体检测值（软件自带计算功能，能准确计算出 T/C 值）。

10 试验成立条件

当仪器完成读值后，如果“检测值”项显示“无效”，则实验不成立，需重新检测。
如果“检测值”项显示数值，说明质控线和检测线荧光信号值正常，则实验成立。

11 结果判定

当 T/C 值 < 0.1 时，判为棘球蚴（包虫）抗体阴性。
当 T/C 值 ≥ 0.1 时，判为棘球蚴（包虫）抗体阳性。

附 录 A
(规范性)

棘球蚴（包虫）抗体荧光微球检测试纸的制备

A. 1 棘球蚴Eg95 抗原的氨基酸序列

抗原	氨基酸序列（N - C）	大小
Eg95	N-QEYKGMGVETRTTETPLRKHFNLTPVGSQGIRLSWEVQHLSDLKGTDISLKAVNPSPDLVYKRQTAKFSDGQLTIG ELKPSTLYKMTVEAVKAKKTI LGFTVDIETPRAGKKESTVMTSGSALTSAIAGFVFSCIVVVLTC	140 AA

A. 2 Eg95 抗原的制备

A. 2. 1 菌液繁殖

将-80℃保藏的重组 E. coli 菌种划线于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体平板，于 37℃（±2℃）恒温培养箱中倒置培养至菌落清晰。挑取单菌落，接种于 5 mL LB 液体培养基（含 50 μg/mL 卡那霉素），并于 37℃（±2℃）、200 r/min 条件下振荡培养 8 h~12 h。

A. 2. 2 Eg95 抗原的发酵表达

将 A.2.1 中制备的菌液按 1%的接种比，接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基（500 mL 三角瓶，载料 200 mL），于 37℃（±2℃）、200 r/min 条件下振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6 左右。调节培养温度至 16℃，并向培养体系中添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG，继续诱导培养 12 h 后收集发酵液。

A. 2. 3 Eg95 抗原的分离提取

将 A.2.2 中收集的发酵液，于 4℃、5000 r/min 条件下离心 10 min，收集菌体沉淀，并用结合缓冲液（20 mmol/L Tris-HCl，5 mmol/L 咪唑，0.5 mol/L 氯化钠，pH 7.0）重悬混匀。重悬后的菌液于冰浴中进行超声裂解（设置超声功率为 300 W，工作时间 3 s，间歇时间 4 s，总时间 20 min）。裂解完成后，于 4℃，12000 r/min 条件下离心 30 min，收集分离上清。

A. 2. 4 Eg95 抗原的纯化

将 A.2.3 中收集的分离上清，使用 Ni Sepharose 6 Fast Flow 进行亲和层析纯化，A.2.3 中所述结合缓冲液用于层析柱的平衡，结合缓冲液添加终浓度 50 mmol/L 的咪唑用于洗脱杂蛋白，添加终浓度 0.5 mol/L 的咪唑用于洗脱目的蛋白。洗脱所得 Eg95 蛋白透析至 PBS 缓冲液，分别通过 SDS-PAGE 和 Image Lab 软件对蛋白纯化结果及蛋白纯度进行分析，利用 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行定量分析后，作为包虫病抗原-70℃以下保存备用。

A. 3 荧光微球垫的制备

A. 3. 1 微球标记包虫病抗原的制备

A. 3. 1. 1 洗涤

按需量取固体含量为 1%的荧光微球分散液，加入 5 倍体积的硼酸盐缓冲液（0.05 mol/L，pH 值为 8.5），以 12000 r/min 离心 15 min，弃去上清液，重复清洗 2 次，将洗涤后的荧光微球重悬于 5 倍体积硼酸盐缓冲液中。

A.3.1.2 荧光微球活化

取 50 μL 荧光微球加入 1 mL MES (2-吗啉乙磺酸) 缓冲液中, 混匀, 12000 r/min 离心 15min; 弃去上清液, 加入 1 mL MES 缓冲液, 混匀离心; 重复上述步骤 3 次, 并用 1 mL MES 缓冲液复溶; 向上述溶液中加入 250 μL EDC 缓冲液, 混匀, 室温反应 30 min; 弃去上清液, 加入 4 mL 标记缓冲液, 混匀。

A.3.1.3 荧光微球标记

将制备的包虫病抗原加入到已活化的荧光微球中, 使其终浓度为 15 $\mu\text{g/mL}$, 充分混匀。将混匀后含包虫病抗原的荧光微球溶液, 于室温 (15 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$) 条件下, 避光反应 1.5 h; 按溶液总体积的 3% 加入封闭液 (9% 的酪蛋白)。于室温条件下, 避光反应 30 min。离心弃去上清, 按 A.3.1.1 用硼酸盐缓冲液清洗 2 次, 并重悬已标记的荧光微球。以 1% 的量加入 1% 胭脂红色素, 混匀, 置 2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.3.2 荧光微球垫的制备

从冰箱中取出标记包虫病抗原的荧光微球, 恢复至室温 (15 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$), 取出玻璃纤维素膜并用辅料切条机裁切成 10 cm $\times$ 30 cm 规格。设置喷涂量为 3 $\mu\text{L/cm}$, 每张玻璃纤维素膜 (10 cm $\times$ 30 cm) 以 1.0 cm 间隔喷涂 8 条。将完成喷涂的玻璃纤维素膜放置在干净纱窗网上, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ (± 2 $^{\circ}\text{C}$) 干燥 2 h ~ 3 h, 逐一垂直放入切条机中切成 0.7 cm $\times$ 30 cm 的荧光微球垫, 置于装有干燥剂的密封袋中并于室温 (15 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$) 保存备用。

A.4 印膜的制备

A.4.1 印膜溶液的制备

A.4.1.1 质控线 (C 线) 印膜溶液

用磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值为 8.0) 将棘球蚴抗体稀释至 0.4 mg/mL 作为质控线 (C 线) 印膜溶液, 置于棕色玻璃瓶中, 2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.4.1.2 检测线印膜溶液

用磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值为 8.0) 将棘球蚴抗原稀释至 0.45 mg/mL 作为检测线包被溶液, 置于棕色玻璃瓶中, 2 $^{\circ}\text{C}$ ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

A.4.2 印膜

将印膜溶液分别吸至高效连续点膜机的质控线管线和检测线管线中, 按 0.8 $\mu\text{L/cm}$ 在硝酸纤维素膜上均匀划出质控线 (C 线) 和检测线 (T 线), 其中质控线 (C 线) 距硝酸纤维素膜顶端 0.8 cm $\pm$ 0.1 cm 处, 检测线距膜顶端 1.3 cm $\pm$ 0.1 cm 处, 质控线与检测线相距 0.5 cm $\pm$ 0.1 cm, 并在膜的开始端、末端及不均匀处作标记。

A.4.3 印膜干燥

将已划线的 NC 膜逐一放置在干净纱窗网上, 忌重叠, 置于干燥间进行干燥, 37 $^{\circ}\text{C}$ (± 2 $^{\circ}\text{C}$) 干燥 2 h 后。放入装有干燥剂的铝箔袋内, 封口, 贴上标签, 室温 (15 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$) 保存备用。

A.5 样品垫的制备

将玻璃纤维素膜用辅料斩切机裁切成 2.0 cm×30 cm 的规格，室温（15 °C ~ 25 °C）密封保存备用。

A. 6 检测卡的制备

A. 6.1 制备环境

在室温（15 °C ~ 25 °C）及湿度≤30 %RH 的洁净环境下，按照以下步骤组装半成品试纸。

A. 6.2 贴条

依次按印膜、吸水垫、荧光微球垫、样品垫的顺序将各中间制品粘贴于 PVC 底板上，保证各中间品在相邻处均有 1 mm ~ 2 mm 层叠，并使印膜上的检测线靠近样品垫一侧、质控线靠近吸水垫一侧。

A. 6.3 切条

将已组装好的荧光微球大板修剪整齐后，用切条机裁切为 $4.0\text{ mm}\pm0.1\text{ mm}$ 的试纸。

A. 6.4 装卡

挑取印膜无划痕、无污染，边缘整齐的试纸，将试纸放入底卡中，盖上卡盖。

附 录 B
(规范性)
相关试剂的配制

B.1 样品稀释液 (0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 值为 8.5)

称取 6.7 g 硼酸, 13.4 g 硼砂 (含 12 个结晶水), 溶解于 800 mL 纯化水, 定容至 1 L, 调节 pH 至 8.5。

B.2 EDC 溶液 (2 mg/mL)

称取 0.2 g 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, 100 mL 纯化水溶解, 2 °C ~ 8 °C 保存。

B.3 MES (2-吗啉乙磺酸) 缓冲液

称取 2.0 g 吗啉乙磺酸 (MES), 溶解于 800 mL 纯化水, 定容至 1L, 调节 pH 值至 6.0, 置 2 °C ~ 8 °C 保存备用。

B.4 封闭液

称取 90 g 酪蛋白, 加入 1 L 纯化水溶解, 2 °C ~ 8 °C 保存。

B.5 1% 胭脂红色素

称取 1.0 g 胭脂红色素, 100 mL 纯化水溶解。

B.6 磷酸缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 8.0)

甲液 (0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液): 称取 2.84 g 磷酸氢二钠加纯化水定容至 100 mL; 乙液 (0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液): 称取 3.12 g 十二水合磷酸二氢钠加纯化水定容至 100 mL; 分别量取甲液 94.7 mL 和乙液 5.3 mL, 混匀后量取 25 mL 加入 75 mL 纯化水, 混匀。

B.7 样品稀释液 (0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 值 7.2)

称取 3.0 g 十二水合磷酸氢二钠、0.5 g 磷酸二氢钾、8.0 g 氯化钠、0.5 g 氯化钾, 溶于 800 mL 纯化水, 再加入 400 μ L Proclin-300, 纯化水定容至 1L。

B.8 样品垫处理液

称取 17 g 无水磷酸氢二钠, 0.414 g 磷酸二氢钠 (含 12 个结晶水), 5.0 g 蔗糖, 3.0 g 酪蛋白, 5.0 g 聚乙二醇 20000, 5.0 g 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-K30), 20 mL 吐温-20, 加入 1 L 纯化水溶解。

附 录 C
(资料性)
便携式免疫荧光分析仪及配套 ID 卡

C.1 ID 卡准备

将检验项目信息（项目名称、编号、临界值等）录入 ID 卡。

C.2 检测前准备

检查便携式免疫荧光分析仪电源显示正常。点击分析仪开关，将其打开，进入检测界面后，将产品配套 ID 卡插入相应插孔。

C.3 检测

C.3.1 检测读值

待检样品加入检测卡计时 15 min 后，将检测卡加样孔端插入仪器检测插孔中，点击仪器界面中的“快速测试”，确认待检项目信息无误后，再次点击“快速测试”，仪器开始读值。

完成读值后，仪器界面显示检测结果：“检测项目”、“检测值”、“结论”。

C.3.2 结果处理

结果如需上传或打印，点击仪器界面下端上传或打印。
