

## 犬细粒棘球绦虫抗原检测试剂盒使用说明书

### 【用途】

本试剂盒用于检测犬粪便中细粒棘球绦虫抗原。

### 【原理】

本试剂盒使用抗细粒棘球绦虫（*Echinococcus granulosus*, Eg）多抗包被微量反应板，利用夹心 ELISA 原理进行检测。如果待测样品中含有 Eg 抗原，则与包被抗体结合，加入辣根过氧化物酶标记的抗 Eg 单抗后，形成抗体-抗原-酶标单抗复合物，再加入 TMB 底物液作用显色，在酶标仪 450nm 波长测定各孔吸光度值，判定结果。

### 【试剂盒组成】

名 称	数 量	使用状态
1. Eg 多抗包被板	1 块（8×12 孔）	直接使用
2. 10 倍浓缩洗涤液	1 瓶（30mL）	稀释后使用
3. Eg 阴性对照	1 支（320μL）	直接使用
4. Eg 阳性对照	1 支（120μL）	直接使用
5. 10 倍样品稀释液	1 瓶（30mL）	稀释后使用
6. Eg 酶稀释液	1 瓶（12mL）	直接使用
7. Eg 酶标单抗	1 支（30μL）	稀释后使用
8. 底物液 A	1 瓶（8mL）	直接使用
9. 底物液 B	1 瓶（8mL）	直接使用
10. 终止液	1 瓶（8mL）	直接使用
11. 一次性封板膜	2 张	
12. 自封袋(干燥剂)	1 个	
13. 说明书	1 份	

### 【其它需自备的物品】

1. 50uL 和 100uL 的精确微量移液器，200uL 八或十二通道微量移液器；
2. 一次性移液器吸头；
3. 稀释用 96 孔板；
4. 37℃ 避光孵育箱；
5. 1000mL 量筒（配制洗涤液用）；
6. 酶标仪（含 450nm 波长滤光片）；
7. 蒸馏水或去离子水；
8. 自动或手动洗板系统；
9. 吸水纸。

### 【注意事项】

1. 试剂盒从冷藏环境中取出后，应置室温下平衡至少 30 分钟后再使用；未用完的包被板加干燥剂放于自封袋中，置 2~8℃ 保存；
2. 吸取每个样品后都要更换吸头；
3. 加液时均应使用加液器并经常校对其准确性，以减少试验误差；
4. 待检血清样品数量较多时，应使用八或十二通道微量移液器，从稀释板转移到反应板中，缩短加样时间；
5. 洗涤时各孔均需加满洗涤液，防止因洗涤不充分造成非特异性显色；
6. 封板膜只限一次使用，以避免交叉污染；

7. 结果判定必须以酶标仪读数为准，且终止反应后应立即读数，在 10 分钟内完成；
8. 所有样品、洗涤液和各种废弃物都应灭活处理；
9. 不同批次试剂不能混用；
10. 底物 B 液中含有 TMB 成份，对强光和氧化剂敏感，应尽量避光；
11. 终止液为 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，应避免与眼、皮肤接触；
12. 请严格按照实验操作步骤操作。

#### 【样品制备】

新鲜采集犬粪便样品-70℃冷冻一周，室温解冻后取 1g 样品，用 1ml 1×稀释液溶解混匀，4000r/min 离心 15 分钟，取上清备用。

#### 【样品稀释液配制】

使用前，10 倍稀释液应恢复至室温（25℃左右），并摇动使沉淀的盐溶解，然后用蒸馏水或去离子水作 10 倍稀释（例如：每板用 30 ml 浓缩液加上 270ml 水），即 1×稀释液。

#### 【样品稀释】

在稀释板中按 1:1 的体积比稀释待检样品（100μl 样品 1×稀释液中加入 100μl 待检样品）。

**注意：阴性和阳性对照不需要稀释。**

#### 【洗涤液配制】

使用前，浓缩的洗涤液应恢复至室温（25℃左右），并摇动使沉淀的盐溶解，然后用蒸馏水或去离子水作 10 倍稀释（例如：每板用 30 ml 浓缩液加上 270ml 水），即 1×洗液。

#### 【酶结合物溶液配制】

使用酶稀释液将酶标单抗 1:500 稀释（10ml 酶稀释液中加入 20μl 酶标单抗）。

#### 【操作步骤】

使用前所有试剂应恢复至室温（25℃），试剂应轻轻旋转或振荡混匀。阴性对照、阳性对照和酶标单抗液量较少，使用前可稍离心。

1. 取出反应板（根据样品多少，可拆开分次使用），在记录表上记录阳性对照、阴性对照和样品的位置；
2. 分别在相应孔中加入阳性对照（1 孔）和阴性对照（3 孔）（**直接使用**）、稀释好的待检犬粪样品各 100μl。充分混匀后，贴上封板膜，置 37℃孵育 30 分钟；
3. 小心揭掉封板膜，弃去各孔中液体、拍净。每孔加满洗涤液，静置约 30 秒，重复洗涤 5 次，最后在吸水纸上拍净；
4. 每孔加入配制好的酶结合物溶液 100μl，贴上封板膜，置 37℃孵育 30 分钟；
5. 重复步骤 3；
6. 每孔加入底物液 A 50μl，再加入底物液 B 50μl，轻轻振荡混匀，置 37℃避光显色 15 分钟；
7. 每孔加入终止液 50μl，轻轻振荡混匀，置酶标仪 450nm 波长处测定各孔 OD<sub>450</sub> 值。

#### 【结果判定】

1. 试验结果同时符合下列条件，方为有效：  
阳性对照 OD<sub>450</sub> 平均值应 ≥ 阴性对照 OD<sub>450</sub> 平均值 × 2.1；
2. 按以下计算方法的判定结果：
  - ① 阳性：**样品 OD<sub>450</sub> 值** > 阴性对照 OD<sub>450</sub> 平均值 × 2.1，即 Eg 抗原阳性。
  - ② 阴性：**样品 OD<sub>450</sub> 值** ≤ 阴性对照 OD<sub>450</sub> 平均值 × 2.1，即 Eg 抗原阴性。

【贮藏条件】2-8℃避光保存

【保存期】该产品有效期 12 个月