



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103149357 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201310033075. 5

CN 101620226 A, 2010. 01. 06,

(22) 申请日 2013. 01. 29

EP 2272860 A1, 2011. 01. 12,

(73) 专利权人 浙江迪恩生物科技股份有限公司

CN 101520458 A, 2009. 09. 02,

地址 310023 浙江省杭州市西湖区留和路

CN 101441215 A, 2009. 05. 27,

16 号 1 幢 A401-403 室

审查员 贾静

(72) 发明人 张明洲 王旻子 毛开荣 程晔

魏建良 吴海芬 丁家波 蒋卉

(74) 专利代理机构 杭州丰禾专利事务所有限公

司 33214

代理人 王从友

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101363859 A, 2009. 02. 11,

CN 101592661 A, 2009. 12. 02,

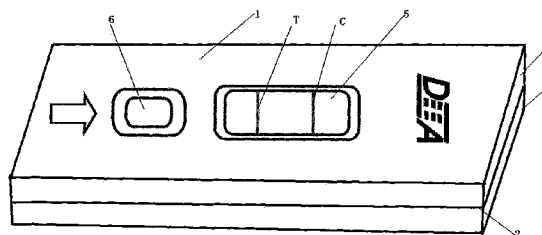
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种利用竞争法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡

(57) 摘要

本发明公开了属于免疫检测技术领域的一种利用竞争法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡。该所述检测试纸卡由外壳和其内部的试纸条构成,外壳由上板和下板构成,上板有检测窗和加样孔,试纸条由底板和在底板上依次粘贴的样品吸收垫、胶体金标记垫、检测反应区构成,样品吸收垫正对加样孔,检测反应区正对检测窗。本发明还公开了应用上述试纸条检测牛布鲁氏菌抗体的方法。本发明的牛布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡灵敏度和重复率高,特异性强,稳定性能好,假阳率和假阴率低,使用方便,容易观察区别,适合于临床快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。



1. 一种利用竞争法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,其特征在于,所述检测试纸卡由外壳(1)和其内部的试纸条(2)构成,外壳(1)由上板(3)和下板(4)构成,上板(3)有检测窗(5)和加样孔(6),试纸条(2)由底板(7)和在底板(7)上依次粘贴的样品吸收垫(8)、胶体金标记垫(9)、检测反应区(10)构成,样品吸收垫(8)正对加样孔(6),检测反应区(10)正对检测窗(5);

所述底板(7)的材质为硝酸纤维膜;

所述胶体金标记垫(9)包被有牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物;

所述牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物的制备方法为:

(1) 将牛布鲁氏菌抗原在 0.005M/L pH7.0 的 NaCl 溶液中 4℃ 透析过夜,4℃, 10000-12000rpm 条件下离心 1h;

(2) 将 OD526 的胶体金溶液的 pH 调节至 4.0-9.0;

(3) 将步骤(1)离心得到的牛布鲁氏菌抗原用 0.005M/L pH9.0 的硼酸盐缓冲溶液稀释至 5 μg/ml ~ 50 μg/ml,取 1ml 稀释后的牛布鲁氏菌抗原加入到 1ml 胶体金溶液中,振荡混匀,静置 5min,加入 0.1ml 10% 的 NaCl 溶液,混匀后静置 2h,离心纯化制得胶体金标记的牛布鲁氏菌抗原;

所述检测反应区(10)由包被牛布鲁氏菌抗体的测试区(T)和包被牛布鲁氏菌一抗的质控区(C)组成;

所述样品吸收垫含有植物凝集素或抗红细胞抗体;

所述抗红细胞抗体为使用人红细胞免疫小鼠、羊或兔,常规制备的抗红细胞单克隆抗体;

上述的检测试纸卡的检测方法,按照如下步骤进行:

(1) 血液样品处理:血液标本收集在洁净、干燥的容器内,将采集的新鲜血液加入浓度为 2.5% 抗凝剂;

(2) 取经过处理的血液样品 100 μL,滴入加样孔;

(3) 待血液样品流过测试区和质控区,判定样品中是否含有牛布鲁氏菌抗体,判定规则如下:

阳性(+):仅质控区出现一条紫红色条带,在测试区内无紫红色条带出现;

阴性(-):两条紫红色条带出现,一条位于测试区内,另一条位于质控区内;

无效:当质控区不显示出紫红色条带,则无论测试区显示出紫红色条带与否,该试纸卡判为无效。

一种利用竞争法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种利用竞争法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡。

背景技术

[0002] 布鲁氏菌为革兰氏阴性短小杆菌,初次分离时多呈球状,球杆状和卵圆形,该菌传代培养后渐呈短小杆状,菌体无鞭毛,不形成芽胞。1985年WHO布鲁氏菌病专家委员会把布鲁氏菌属分为6个种19个生物型,即羊种(生物型1~3),牛种(生物型1~7.9),猪种(生物型1~5)及绵羊型副睾种,沙林鼠种,犬种(各1个生物型)。临床上以羊、牛、猪三种意义最大,羊种致病力最强。布鲁氏菌引起的人类疾病还有以下几种名称:马尔他热、地中海弛张热、波浪热或波状热。牛布鲁氏菌病在我国广泛存在,致病力也很强,尤其以畜牧生产为主的东北、华北、西北一带,经常有疫情爆发的报道,直接危害人类的健康,严重困扰畜牧业的发展和动物及其产品的进出口贸易。

[0003] 目前牛布鲁氏菌病的诊断手段主要包括病原分离鉴定、虎红平板凝集试验(RBT)、试管凝集试验(SAT)、补体结合试验(CFT)酶联免疫吸附试验(ELISA)、PCR等。病原分离鉴定耗时长,操作步骤繁琐,只适合于实验室的研究需要,不具有实用价值;补体结合试验容易引起溶血反应,应用的局限性很大,试管凝集试验为半定量试验方法,容易出现假阳性反应,且不易检测出样品中所含抗体的含量;虎红平板凝集试验也存在较高的假阳性反应,需要改进;酶联免疫吸附试验灵敏度高,定量效果好,为一种广泛应用的免疫学检测方法,但是,该方法操作比较麻烦,定性和定量需要专业人士的分析才能确定,不适合在基层、农村等单位大规模检测使用。

[0004] 免疫胶体金技术自问世以来,得到了迅速发展。广泛应用于化学检测和免疫学检测领域,尤其是胶体金免疫层析技术具有操作简单、快速灵敏、结果清楚、易于判断和保存,且无需任何仪器设备等优点。更适合于临床快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种敏感度高、特异性好、操作简单、低成本的利用竞争法检测牛布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡及其检测方法。

[0006] 一种利用竞争法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,所述检测试纸卡由外壳1和其内部的试纸条2构成,外壳1由上板3和下板4构成,上板3有检测窗5和加样孔6,试纸条2由底板7和在底板7上依次粘贴的样品吸收垫8、胶体金标记垫9、检测反应区10构成,样品吸收垫8正对加样孔6,检测反应区10正对检测窗5。

[0007] 所述底板7的材质为硝酸纤维膜。

[0008] 所述胶体金标记垫9包被有牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物。

[0009] 所述牛布鲁氏菌抗原-胶体金标记物的制备方法为:

[0010] (1) 将牛布鲁氏菌抗原在 0.005M/L pH7.0 的 NaCl 溶液中 4℃ 透析过夜, 4℃, 10000-12000rpm 条件下离心 1h;

[0011] (2) 将 OD526 的胶体金溶液的 pH 调节至 4.0-9.0;

[0012] (3) 将步骤 (1) 离心得到的牛布鲁氏菌抗原用 0.005M/L pH9.0 的硼酸盐缓冲溶液稀释至 5 μg/ml ~ 50 μg/ml, 取 1ml 稀释后的牛布鲁氏菌抗原加入到 1ml 胶体金溶液中, 振荡混匀, 静置 5min, 加入 0.1ml 10% 的 NaCl 溶液, 混匀后静置 2h, 离心纯化制得胶体金标记的牛布鲁氏菌抗原。

[0013] 所述检测反应区 10 由包被牛布鲁氏菌抗体的测试区 T 和包被牛布鲁氏菌二抗的质控区 C 组成。

[0014] 所述样品吸收垫含有植物凝集素或抗红细胞抗体。

[0015] 所述抗红细胞抗体为使用人红细胞免疫小鼠、羊或兔, 常规制备的抗红细胞单克隆抗体。

[0016] 上述检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡的检测方法, 其特征在于, 按照如下步骤进行:

[0017] (1) 血液样品处理: 血液标本收集在洁净、干燥的容器内, 将采集的新鲜血液加入浓度为 2.5% 抗凝剂;

[0018] (2) 取经过处理的血液样品 100 μL, 滴入加样孔;

[0019] (3) 待血液样品流过测试区和质控区, 判定样品中是否含有牛布鲁氏菌抗体, 判定规则如下:

[0020] 阳性 (-): 仅质控区出现一条紫红色条带, 在测试区内无紫红色条带出现;

[0021] 阴性 (+): 两条紫红色条带出现, 一条位于测试区内, 另一条位于质控区内;

[0022] 无效: 当质控区不显示出紫红色条带, 则无论测试区显示出紫红色条带与否, 该试纸卡判为无效。

[0023] 本发明的检测原理: 布氏杆菌抗体快速检测试纸条表面有字母“T”和“C”作为检测线和质控线。用布氏杆菌抗原与胶体金颗粒的偶联物, 包被在醋酸纤维素膜上; 在硝酸纤维素膜上将布氏杆菌抗体和二抗分别包被在测试区 T 和质控区 C。在提供任何样品前, 检测线和质控线在结果窗中都不显示。当血清样本加到加样孔后, 样本中的布氏杆菌抗体与抗原-胶体金偶联物一起层析泳动到检测区竞争与布氏杆菌抗体结合。当样本中的布氏杆菌抗体浓度超过一定量时, 布氏杆菌抗原-胶体金偶联物就不能与检测线上的布氏杆菌抗体结合, 此时检测区不出现紫红色线条; 当样本中没有布氏杆菌抗体或者样本中布氏杆菌抗体浓度低于一定值时, 胶体金偶联物就与检测线上的布氏杆菌抗体结合, 从而在检测区显示出一条紫红色线条; 而无论样本中是否含有布氏杆菌抗体, 质控区都会出现紫红色线条, 以示检测有效。

[0024] 本发明的有益效果: 本发明的牛布鲁氏菌抗现场快速检测试纸卡灵敏度和重复率高, 特异性强, 稳定性能好, 假阳率和假阴率控制在 1% 以下, 吸收垫含有的植物凝集素或抗红细胞抗体能有效的凝集拦截红细胞, 避免红细胞透过吸收垫, 干扰后续的检测, 该试纸卡检测反应容易观察区别, 使用方便, 容易观察区别, 适合于临床快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。

附图说明

[0025] 图 1 为本发明试纸卡结构示意图；

[0026] 图 2 为本发明试纸条结构示意图；

[0027] 图中,1- 外壳、2- 试纸条、3- 上板、4- 下板、5- 检测窗、6- 加样孔、7- 底板 8- 样品吸收垫、9- 胶体金标记垫、10- 检测反应区、T- 测试区、C- 质控区。

具体实施方式

[0028] 下面结合附图和具体实施例对本发明做进一步说明。

[0029] 实施例 1 利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡结构

[0030] 利用夹心法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡,如图 1 和图 2 所示,所述检测试纸卡由外壳 1 和其内部的试纸条 2 构成,外壳 1 由上板 3 和下板 4 构成,上板 3 有检测窗 5 和加样孔 6,试纸条 2 由底板 7 和在底板 7 上依次粘贴的样品吸收垫 8、胶体金标记垫 9、检测反应区 10 构成,样品吸收垫 8 正对加样孔 6,检测反应区 10 正对检测窗 5。胶体金标记垫 9 包被有布鲁氏菌抗原和胶体金标记物。检测反应区 10 由包被布鲁氏菌抗体的测试区 T 和包被布鲁氏菌二抗的质控区 C 组成。

[0031] 样品吸收垫含有植物凝集素或抗红细胞抗体。

[0032] 抗红细胞抗体为使用人红细胞免疫小鼠、羊或兔,常规制备的抗红细胞单克隆抗体。

[0033] 实施例 2 检测牛布鲁氏菌抗体的方法

[0034] 1、牛布鲁氏菌抗原 - 胶体金标记物的制备

[0035] (1) 将牛布鲁氏菌抗原在 0.005M/L pH7.0 的 NaCl 溶液中 4℃ 透析过夜,4℃,10000-12000rpm 条件下离心 1h；

[0036] (2) 将 OD526 的胶体金溶液的 pH 调节至 4.0-9.0；

[0037] (3) 将步骤 (1) 离心得到的牛布鲁氏菌抗原用 0.005M/L pH9.0 的硼酸盐缓冲溶液稀释至 5 μg/ml ~ 50 μg/ml,取 1ml 稀释后的牛布鲁氏菌抗原加入到 1ml 胶体金溶液中,振荡混匀,静置 5min,加入 0.1ml10% 的 NaCl 溶液,混匀后静置 2h,离心纯化制得胶体金标记的牛布鲁氏菌抗原。

[0038] 2、血液样品的处理

[0039] 取 100 份经过牛布鲁氏菌抗原免疫的牛血液样品,血液标本收集在洁净、干燥的容器内,将采集的新鲜血液加入浓度为 2.5% 抗凝剂;血液标本在 2℃ ~ 8℃ 冷藏可保存 48 小时。

[0040] 3、检测步骤

[0041] (1) 将 100 份经过处理的血液样品各 100 μL,标准牛布鲁氏菌抗体 100 μL (浓度为 10 μg/ml),去离子水 100 μL,滴入加样孔；

[0042] (2) 待血液样品、标准牛布鲁氏菌抗体、去离子水流过各自试纸条的测试区和质控区,判定样品中是否含有牛布鲁氏菌抗体,判定规则如下：

[0043] 阳性 (-):仅质控区出现一条紫红色条带,在测试区内无紫红色条带出现；

[0044] 阴性 (+):两条紫红色条带出现,一条位于测试区内,另一条位于质控区内；

[0045] 无效:当质控区不显示出紫红色条带,则无论测试区显示出紫红色条带与否,该试

纸卡判为无效。

[0046] 判定结果为：牛血液样品 98 份呈阳性，1 份呈阴性，1 份无效，灵敏度为 99%。

[0047] 实施例 3 检测牛布鲁氏菌抗体的试纸卡假阳性率和假阴性测试实验

[0048] 1、假阳性测试

[0049] (1) 取 100 份普通牛血液样品，采用血液前处理装置对血液样品进行处理；

[0050] (2) 将经过处理的 100 份普通牛血液样品各 100 μ L，去离子水 100 μ L，滴入加样孔；

[0051] (2) 待血液样品、去离子水流过各自试纸条的测试区和质控区，判定样品中是否含有牛布鲁氏菌抗体，判定规则如下：

[0052] 阳性 (-)：仅质控区出现一条紫红色条带，在测试区内无紫红色条带出现；

[0053] 阴性 (+)：两条紫红色条带出现，一条位于测试区内，另一条位于质控区内；

[0054] 无效：当质控区不显示出紫红色条带，则无论测试区显示出紫红色条带与否，该试纸卡判为无效。

[0055] 判定结果为：牛血液样品 1 份呈阳性，99 份呈阴性，全部有效，假阳性率为 1%。

[0056] 2、假阴性测试

[0057] (1) 取 100 份标准牛布鲁氏菌抗体（浓度为 10 μ g/ml）各 100 μ L，去离子水 100 μ L，滴入加样孔；

[0058] (2) 待标准牛布鲁氏菌抗体、去离子水流过各自试纸条的测试区和质控区，判定样品中是否含有牛布鲁氏菌抗体，判定规则如下：

[0059] 阳性 (-)：仅质控区出现一条紫红色条带，在测试区内无紫红色条带出现；

[0060] 阴性 (+)：两条紫红色条带出现，一条位于测试区内，另一条位于质控区内；

[0061] 无效：当质控区不显示出紫红色条带，则无论测试区显示出紫红色条带与否，该试纸卡判为无效。

[0062] 判定结果为：牛血液样品 99 份呈阳性，1 份呈阴性，全部有效，假阴性率为 1%。

[0063] 实施例 4 检测牛布鲁氏菌抗体的试纸条其他性能的测定

[0064] (1) 布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡的特异性测定

[0065] 应用制备的布鲁氏菌抗体试纸卡检测与布鲁氏菌种系较近的 3 种细菌全血，其结果均为阴性，表明其特异性好，无交叉。

[0066] (2) 布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡的敏感性

[0067] 取外购牛布鲁氏菌阳性血清，用 ELISA 检测其平均效价约为 1：8000，虎红平板凝集抗原在血液稀释度低于 50 倍时检测为阳性；布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡测到的阳性结果的血液效价为 1：6000，血液稀释度 \geq 6000 倍时，试纸卡检测线显色不清晰或无显色。故布鲁氏菌抗体现场快速检测实在卡的灵敏度明显高于虎红平板凝集试验，但其灵敏度仍低于 ELISA。

[0068] (3) 布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡的重复性

[0069] 进行平行检测 5 个试纸卡，其检测结果一致，说明该检测方法具有可重复性。

[0070] (4) 布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡的稳定性

[0071] 4 $^{\circ}$ C 放置布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡，定期检测标准阳性血清，结果显示其稳定性可保存 1 年，1 年后金释放速度减慢，层析速度减慢等现象。产品的稳定性为 4 $^{\circ}$ C 环

境为 1 年。

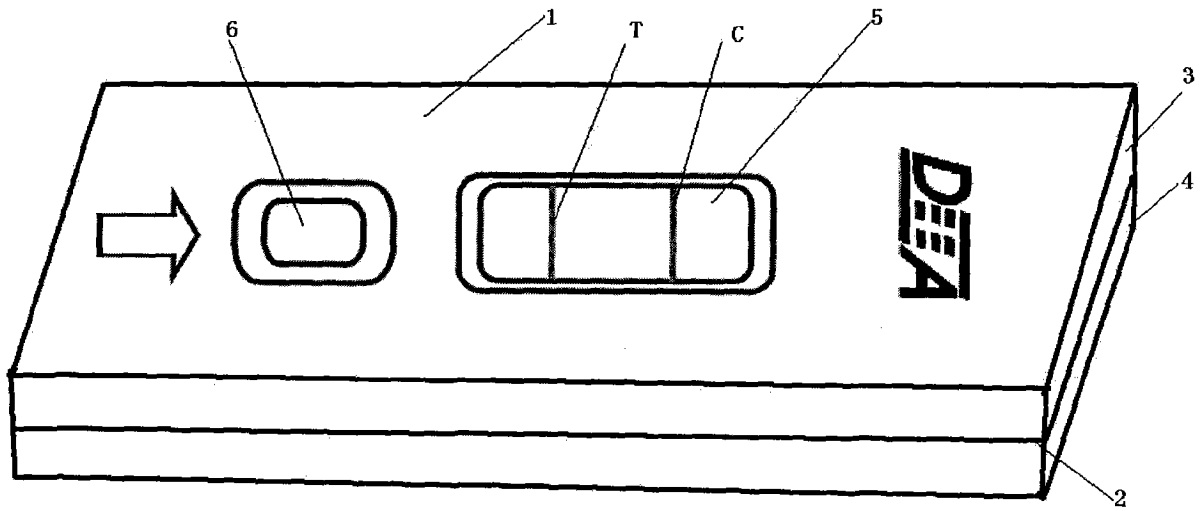


图 1

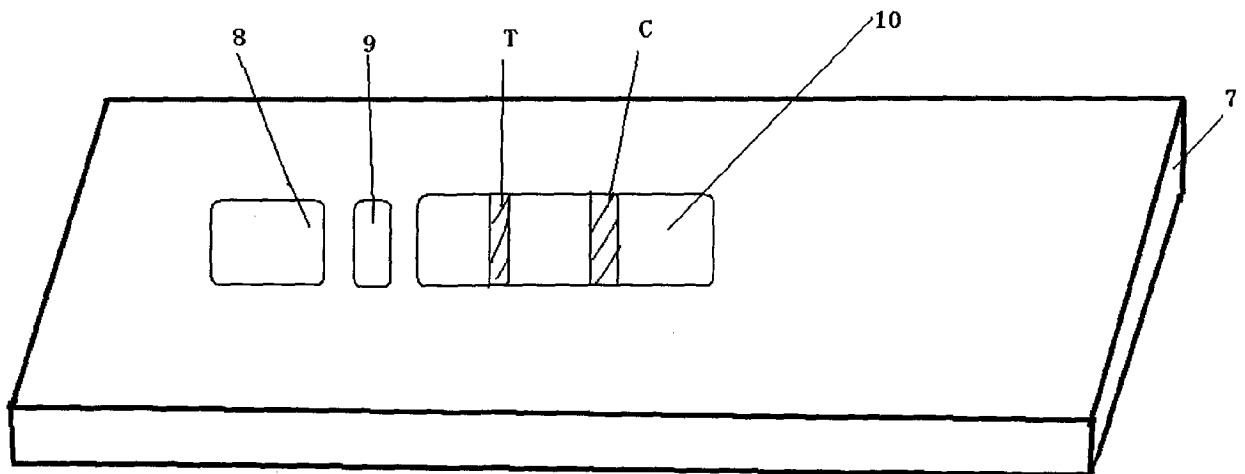


图 2

专利名称(译)	一种利用竞争法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡		
公开(公告)号	CN103149357B	公开(公告)日	2016-04-20
申请号	CN201310033075.5	申请日	2013-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	杭州迪恩科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州迪恩科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江迪恩生物科技股份有限公司		
[标]发明人	张明洲 王旻子 毛开荣 程晔 魏建良 吴海芬 丁家波 蒋卉		
发明人	张明洲 王旻子 毛开荣 程晔 魏建良 吴海芬 丁家波 蒋卉		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/532		
代理人(译)	王从友		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN103149357A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了属于免疫检测技术领域的一种利用竞争法检测牛布鲁氏菌抗体的检测试纸卡。该所述检测试纸卡由外壳和其内部的试纸条构成，外壳由上板和下板构成，上板有检测窗和加样孔，试纸条由底板和在底板上依次粘贴的样品吸收垫、胶体金标记垫、检测反应区构成，样品吸收垫正对加样孔，检测反应区正对检测窗。本发明还公开了应用上述试纸条检测牛布鲁氏菌抗体的方法。本发明的牛布鲁氏菌抗体现场快速检测试纸卡灵敏度和重复率高，特异性强，稳定性能好，假阳率和假阴率低，使用方便，容易观察区别，适合于临床快速诊断和基层、农村等流行病学调查大规模应用。

