



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109541206 A

(43)申请公布日 2019.03.29

(21)申请号 201811624580.6

G01N 33/58(2006.01)

(22)申请日 2018.12.28

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 洛阳现代生物技术研究有限公司

地址 471000 河南省洛阳市洛龙区科技园
开元大道西S8号

(72)发明人 李秀梅 范伟兴 李凯 尼博
狄栋栋 原小燕 任雪建 吴彬
刘明瑞 杨志 肖利 侯志乾
王路 卫一新

(74)专利代理机构 洛阳公信知识产权事务所
(普通合伙) 41120

代理人 时亚娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

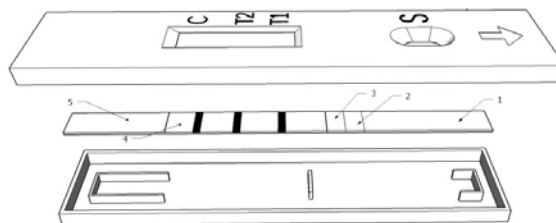
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸

(57)摘要

本发明涉及一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,属于免疫学检测领域,包括卡壳和试纸条;卡壳包括相互扣合的卡盖和卡座;试纸条包括底板以及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、荧光微球垫1、荧光微球垫2和样品垫;其特征在于:所述检测垫为设有质控线C、检测线T1和检测线T2的硝酸纤维素膜,质控线C包被抗LPS多抗,检测线T1包被LPS抗原,检测线T2包被NH抗原;所述荧光微球垫1和荧光微球垫2为分别包埋时间分辨荧光微球标记的NH抗原和LPS抗原的玻璃纤维素膜。本发明为系统化、便捷化、规范化地检测布病S2疫苗免疫抗体和布病感染抗体提供一种新方法。



1. 一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,包括卡壳和设在卡壳内的试纸条;卡壳包括相互扣合的卡盖和卡座;试纸条包括底板以及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、荧光微球垫1、荧光微球垫2和样品垫;卡盖上对应于检测垫的区域设有视窗,卡盖上对应于样品垫的区域设有加样孔,卡座内设有固定试纸条的卡槽;所述底板为不吸水的PVC板,吸水垫为吸水滤纸;其特征在于:所述检测垫为设有质控线C、检测线T1和检测线T2的硝酸纤维素膜,质控线C包被抗LPS多抗,检测线T1包被LPS抗原,检测线T2包被NH抗原;所述荧光微球垫1和荧光微球垫2为分别包埋时间分辨荧光微球标记的NH抗原和LPS抗原的玻璃纤维素膜;所述样品垫是经样品垫处理液浸泡处理后干燥的玻璃纤维素膜。

2. 如权利要求1所述的一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,其特征在于:所述NH抗原的制备方法,包括以下步骤:

步骤一、向布鲁氏菌菌液中加入终浓度为0.5%的苯酚,37℃孵育48h进行灭活,得菌液试样;取菌液试样接种胰化大豆肉汤固体培养基平板,37℃培养10日,无菌生长,检验合格;

步骤二、取经步骤一检验合格的菌液试样,离心弃上清,加入灭菌纯化水重悬洗涤,重复洗涤离心,得菌体沉淀;对菌体沉淀称重,按每20g菌体沉淀重悬于100ml灭菌纯化水中,得重悬菌液;将所得重悬菌液经120℃高压30min,8000r/min离心30min,取上清I;将所取上清I与乙醇以1:3的体积比混合,得混合溶液;将所得混合溶液-20℃孵育过夜,溶液5000r/min离心10min,取上清II;将所取上清II与乙醇1:2混合,然后-20℃孵育过夜,5000r/min离心10min,弃上清,得菌泥;

步骤三、向将步骤二所得菌泥中加入灭菌纯化水重悬,再加入使终浓度均为50μg/ml的DNaseII type V和RNase A,37℃孵育18h;加入终浓度为50μg/ml蛋白酶K,经55℃孵育1h后再于25℃孵育24h,重复处理至少3次,得处理后溶液;将所得处理后溶液经200000r/min超速离心6h,取上清并与苯酚以1:1的体积比混合,混合后经70℃孵育30min,再经8000r/min离心15min,去除水相得酚相;将酚相与乙醇以1:3的体积比混合,-20℃孵育过夜,5000r/min离心10min,取上清并与乙醇以1:4的体积比混合,-20℃孵育过夜,5000r/min离心10min,弃上清,灭菌纯化水重悬,即为粗提NH抗原;

步骤四、将步骤三所得粗提NH抗原转入截留分子量为3kD的透析袋中进行透析,得纯化NH抗原。

3. 如权利要求1所述的布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,其特征在于:LPS抗原的制备方法,包括以下步骤:

步骤一、将布鲁氏菌菌液加热至80℃,维持90min后灭活,取样接种胰化大豆肉汤固体培养基(TSA)平板,37℃培养10日,无菌生长,检验合格;

步骤二、取经步骤一检验合格的菌液,离心弃上清,得菌体沉淀;对菌体沉淀称重,按每50g菌体沉淀重悬于170ml灭菌纯化水中,加热至66℃,得重悬液;向重悬液中加入等体积的预热至66℃的体积分数为90%的苯酚水溶液,66℃持续搅拌20min,冷却至4℃,10000r/min离心15min,收集下层的酚相并用滤纸过滤,得滤液;

步骤三、向步骤二所得滤液中加入含1%饱和醋酸钠溶液的冰冷甲醇溶液500ml,4℃沉淀2h,10000r/min离心15min,收集沉淀,用80ml灭菌纯化水重悬,4℃搅拌18h,10000r/min离心10min,收获上清液I和沉淀I,置4℃保存;将沉淀I再重悬于80ml灭菌纯化水中,4℃搅拌2h,10000r/min离心10min,收集上清液II;将上清液II与上清液I混合,即得粗提LPS抗

原;

步骤四、向步骤三所得粗提LPS抗原中加入8g三氯乙酸,搅拌10min后10000r/min离心取上清,用蒸馏水透析,4000ml/次,每次透析3h,透析4次;然后加入终浓度均为15 μ g/ml的DNase I和RNase A,37 $^{\circ}$ C孵育24h;再加入终浓度为15 μ g/ml的蛋白酶K,55 $^{\circ}$ C消化3h后再室温消化24h;用去离子水充分透析,从透析袋中取出抗原即得纯化LPS抗原。

4.如权利要求1所述的一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,其特征在于:所述质控线C、检测线T1和检测线T2是将包被液划膜于检测垫制得,其中,抗LPS多抗包被液的浓度为1.5mg/ml,NH抗原包被液的浓度为0.4mg/ml,LPS抗原包被液的浓度为0.4mg/ml。

5.如权利要求1所述的一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,其特征在于:所述时间分辨荧光微球为直径200nm的含有高亮稀土染料的羧基聚苯乙烯微球。

6.如权利要求1所述的一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,其特征在于:所述荧光微球垫1和荧光微球垫2均是将荧光微球-抗原标记物溶液喷至玻璃纤维素膜上制得,所述荧光微球-抗原标记物溶液中,NH抗原的标记量是40 μ g/ml,LPS抗原的标记量是5 μ g/ml。

一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测领域,具体涉及一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸。

背景技术

[0002] 布鲁氏菌病(Brucellosis,简称布病)是一种由布氏杆菌(Brucella)引起的人畜共患性全身传染病,与常见的病毒性动物疫病不同的是,该病病原体为胞内寄生菌,可在多种家畜体内存活。1985年,世界卫生组织(WHO)将布鲁氏菌分为6个种:羊、牛、猪、狗和鼠布氏杆菌,我国流行的主要是羊型布氏杆菌、牛型布氏杆菌和猪型布氏杆菌三种,其中羊布氏杆菌的致病力最强。布病主要侵害牛羊生殖器官和关节,引起母畜流产和公畜睾丸炎以及引发人的发热、关节肿痛和流产细菌性慢性传染病。近年来,随着我国畜牧养殖量不断增加,动物及其产品流通频繁,部分地区布病疫情呈持续上升势头,不仅严重危及人身健康和公共卫生安全,也势必影响畜牧业生产。

[0003] 布鲁氏菌的细胞膜分为三层,内层为细胞质膜,中层为外周胞质膜,外层为外膜,由脂多糖(LPS)、外膜蛋白(OMPs)和磷脂层构成。LPS和OMPs是主要的表面抗原,现有的常规血清学检测方法虽然具有较高的敏感性与特异性,但无法区分布鲁氏菌感染抗体和疫苗免疫抗体,进而影响防疫工作的效果,阻碍我国扑杀布病感染动物的政策的执行。研究发现,NH(Native hapten,天然半抗原)蛋白位于光滑型布鲁氏菌表面,接种S2疫苗的动物血清中不能检出NH抗体,而野毒感染的动物血清中能够检出NH抗体,从而实现S2疫苗免疫抗体与野毒感染的鉴别。但是,如何运用现有理论开发一种能快速、准确、低成本地鉴别布鲁氏菌抗体仍是疾病防控的重大课题。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,包括活性材料制备、试纸制备及其检测方法,为系统化、便捷化、规范化地检测布病S2疫苗免疫抗体和布病感染抗体提供一种新方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,包括卡壳和设在卡壳内的试纸条;卡壳包括相互扣合的卡盖和卡座;试纸条包括底板以及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、荧光微球垫1、荧光微球垫2和样品垫;卡盖上对应于检测垫的区域设有视窗,卡盖上对应于样品垫的区域设有加样孔,卡座内设有固定试纸条的卡槽;所述底板为不吸水的PVC板,吸水垫为吸水滤纸;其特征在于:所述检测垫为设有质控线C、检测线T1和检测线T2的硝酸纤维素膜,质控线C包被抗LPS多抗,检测线T1包被LPS抗原,检测线T2包被NH抗原;所述荧光微球垫1和荧光微球垫2为分别包埋时间分辨荧光微球标记的NH抗原和LPS抗原的玻璃纤维素膜;所述样品垫是经样品垫处理液浸泡处理后干燥的玻璃纤维素膜。

[0006] 作为对上述方案的进一步优化,所述NH抗原的制备方法,包括以下步骤:

步骤一、向布鲁氏菌菌液中加入终浓度为0.5%的苯酚,37℃孵育48h进行灭活,得菌液

试样;取菌液试样接种胰化大豆肉汤固体培养基平板,37℃培养10日,无菌生长,检验合格;

步骤二、取经步骤一检验合格的菌液试样,离心弃上清,加入灭菌纯化水重悬洗涤,重复洗涤离心,得菌体沉淀;对菌体沉淀称重,按每20g菌体沉淀重悬于100ml灭菌纯化水中,得重悬菌液;将所得重悬菌液经120℃高压30min,8000r/min离心30min,取上清I;将所取上清I与乙醇以1:3的体积比混合,得混合溶液;将所得混合溶液-20℃孵育过夜,溶液5000r/min离心10min,取上清II;将所取上清II与乙醇1:2混合,然后-20℃孵育过夜,5000r/min离心10min,弃上清,得菌泥;

步骤三、向将步骤二所得菌泥中加入灭菌纯化水重悬,再加入使终浓度均为50μg/ml的DNaseII type V和RNase A,37℃孵育18h;加入终浓度为50μg/ml蛋白酶K,经55℃孵育1h后再于25℃孵育24h,重复处理至少3次,得处理后溶液;将所得处理后溶液经200000r/min超速离心6h,取上清并与苯酚以1:1的体积比混合,混合后经70℃孵育30min,再经8000r/min离心15min,去除水相得酚相;将酚相与乙醇以1:3的体积比混合,-20℃孵育过夜,5000r/min离心10min,取上清并与乙醇以1:4的体积比混合,-20℃孵育过夜,5000r/min离心10min,弃上清,灭菌纯化水重悬,即为粗提NH抗原;

步骤四、将步骤三所得粗提NH抗原转入截留分子量为3kD的透析袋中进行透析,得纯化NH抗原。

[0007] 作为对上述方案的进一步优化,LPS抗原的制备方法,包括以下步骤:

步骤一、将布鲁氏菌菌液加热至80℃,维持90min后灭活,取样接种胰化大豆肉汤固体培养基(TSA)平板,37℃培养10日,无菌生长,检验合格;

步骤二、取经步骤一检验合格的菌液,离心弃上清,得菌体沉淀;对菌体沉淀称重,按每50g菌体沉淀重悬于170ml灭菌纯化水中,加热至66℃,得重悬液;向重悬液中加入等体积的预热至66℃的体积分数为90%的苯酚水溶液,66℃持续搅拌20min,冷却至4℃,10000r/min离心15min,收集下层的酚相并用滤纸过滤,得滤液;

步骤三、向步骤二所得滤液中加入含1%饱和醋酸钠溶液的冰冷甲醇溶液500ml,4℃沉淀2h,10000r/min离心15min,收集沉淀,用80ml灭菌纯化水重悬,4℃搅拌18h,10000r/min离心10min,收获上清液I和沉淀I,置4℃保存;将沉淀I再重悬于80ml灭菌纯化水中,4℃搅拌2h,10000r/min离心10min,收集上清液II;将上清液II与上清液I混合,即得粗提LPS抗原;

步骤四、向步骤三所得粗提LPS抗原中加入8g三氯乙酸,搅拌10min后10000r/min离心取上清,用蒸馏水透析,4000ml/次,每次透析3h,透析4次;然后加入终浓度均为15μg/ml的DNase I和RNase A,37℃孵育24h;再加入终浓度为15μg/ml的蛋白酶K,55℃消化3h后再室温消化24h;用去离子水充分透析,从透析袋中取出抗原即得纯化LPS抗原。

[0008] 如权利要求1所述的布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,其特征在于:所述质控线C、检测线T1和检测线T2是将包被液划膜于检测垫制得,其中,抗LPS多抗包被液的浓度为1.5mg/ml,NH抗原包被液的浓度为0.4mg/ml,LPS抗原包被液的浓度为0.4mg/ml。

[0009] 作为对上述方案的进一步优化,所述时间分辨荧光微球为直径200nm的含有高亮稀土染料的羧基聚苯乙烯微球。

[0010] 作为对上述方案的进一步优化,所述荧光微球垫是将荧光微球-抗原标记物溶液喷至玻璃纤维素膜上制得,所述荧光微球-抗原标记物溶液中,NH抗原的标记量是40μg/ml,

LPS抗原的标记量是5 μ g/ml。

[0011] 本发明所述布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸的原理是双抗原夹心法测抗体：当待测样品为布鲁氏菌野毒感染阳性时，样品中同时含有NH抗体和LPS抗体，通过毛细作用带动荧光微球垫中的NH抗原标记物和LPS标记物向吸水垫一侧层析，途中与检测线(T1和T2)包被物均能发生特异性免疫反应；当待测样品为S2疫苗免疫阳性时，样品中仅含有LPS抗体，在层析过程中仅与检测线T2的LPS抗原包被物结合，从而实现对野毒抗体和免疫抗体的区分。反应结束后，用紫外光源对检测垫扫描，分布于检测线T1、检测线T2和质控线C的荧光微球发出高强度荧光。另外荧光微球中稀土元素的荧光衰变时间相比普通荧光团长，是其103~106倍。通过延缓测量时间，待样品基质中自然发光的短寿命荧光全部衰变后，再测量稀土元素的特异性荧光，达到完全消除本底干扰的效果，实现高信噪比。

[0012] 有益效果：

1、本发明利用试纸内的试纸条实现对布鲁氏菌感染或免疫的鉴别检测，以动物接种疫苗后同样产生针对布鲁氏菌光滑型脂多糖(LPS)的抗体为基础，而S2疫苗免疫的动物血清中几乎检测不到NH抗体，基于此将其用于鉴别野毒感染与疫苗免疫，本发明方法快捷、方便，检测结果具有良好的敏感性和特异性，可一步实现从免疫动物中筛选出布病感染动物，适合基层推广使用，便于布病防控措施的实施、及时切断布病的传染源头，为布病的防控政策的实施提供新的技术。

[0013] 2、本发明依托现有试纸条的结构和组成作为基本框架，将LPS抗原和NH抗原作为活性原材料配合使用用于检测布病血清抗体，通过改进的制备工艺分别获取纯化的LPS抗原和NH抗原，利用制备的纯化抗原制备检测垫以及相互独立的荧光微球垫1和荧光微球垫2，采用双抗原夹心法实现S2疫苗免疫抗体与野毒感染的鉴别，在此过程中，纯化抗原作为本发明的基础对本发明方案的成功实施起到决定性的作用，本发明通过各种工艺参数的改进使得纯化抗原适合于本发明所述试纸条的使用条件并具有稳定的实施效果，将发明构思成功运用到实际检测中，为企业带来巨大的经济效益。

[0014] 3、本发明采用荧光微球技术实现对布鲁氏菌抗体的检测，快速便捷，稳定性更好，相比胶体金试纸条中胶体金颗粒与蛋白质的静电引力结合作用，带有羧基端的荧光微球与抗体以共价键相连，更加稳定；灵敏度更高，相比胶体金、普通荧光免疫层析技术灵敏度高2~3个数量级；短时间内实现批量检测，检测时间不足10min，相比ELISA试剂盒时间缩短，同时通过荧光分析仪检测荧光信号，根据数字化结果判断样品性质，为布鲁氏菌抗体的检测提供更加全面的技术手段。

附图说明

[0015] 图1为本发明试纸条及卡壳结构示意图；其中：1、样品垫；2、荧光微球垫1；3、荧光微球垫2；4、检测垫；5、吸水垫。

具体实施方式

[0016] 下面通过具体的实施例对本发明做进一步的解释说明。

[0017] 实施例1、试纸的制备

1、制备本试纸的主要活性原材料包括LPS抗原和NH抗原，其制备方法如下：

LPS抗原具体制备方法:将布鲁氏菌菌液加热至80℃,维持90min后灭活,取样接种胰化大豆肉汤固体培养基(TSA)平板各3个,每个平板接种0.1ml,37℃培养10日,均应无菌生长。取检验合格的菌液,6000r/min离心30min,弃上清,对菌体沉淀称重。按每50g菌体沉淀重悬于170ml灭菌纯化水,加热至66℃,再加入预热至66℃等体积的90%(V/V)的苯酚溶液(水饱和酚溶液),66℃持续搅拌20min。冷却至4℃,10000r/min离心15min,收集下层的酚相并用滤纸过滤,向滤液中加入含1%饱和醋酸钠溶液的冰冷甲醇溶液500ml,4℃沉淀2h,10000r/min离心15min。收集沉淀,用80ml灭菌纯化水重悬,4℃搅拌18h。10000r/min离心10min,收获上清液置4℃保存。将沉淀再重悬于80ml灭菌纯化水中,4℃搅拌2h,10000r/min离心10min,收集上清,并与前述上清混合,即为粗提LPS。在加入8g三氯乙酸至上清,搅拌10min后10000r/min离心取上清,用蒸馏水透析,4000ml/次,每次透析3h,透析4次。加入终浓度15μg/ml的DNase I、RNase A 37℃孵育24h。再加入终浓度为15μg/ml蛋白酶K,55℃消化3h后,室温消化24h。用去离子水充分透析,从透析袋中取出抗原即为纯化的LPS抗原。

[0018] NH抗原具体制备方法:向布鲁氏菌菌液中加入终浓度为0.5%的苯酚,37℃孵育48h进行灭活,取样接种胰化大豆肉汤固体培养基(TSA)平板各3个,每个平板接种0.1ml,37℃培养10日,均应无菌生长。取检验合格的菌液,6000r/min离心30min,弃上清。菌体沉淀用灭菌纯化水重悬洗涤,6000r/min离心30min,弃上清,重复洗涤步骤1次。对菌体沉淀称重,按每20g菌泥重悬于100ml灭菌纯化水。重悬菌液经120℃高压30min,8000r/min离心30min,取上清。上清与乙醇1:3混合,混合溶液-20℃孵育过夜,溶液5000r/min离心10min,取上清。上清与乙醇1:2混合,混合溶液-20℃孵育过夜,溶液5000r/min离心10min,弃上清。灭菌纯化水重悬沉淀,加入浓度为50μg/ml的DNaseII type V、RNase A 37℃孵育18h。向溶液中加入终浓度为50μg/ml蛋白酶K,溶液经55℃孵育1h,25℃孵育24h,蛋白酶K对溶液重复处理3次。处理后的溶液经200000r/min超速离心6h。取上清与苯酚1:1混合,混合溶液经70℃孵育30min。处理后的溶液经8000r/min离心15min,去除水相,酚相与乙醇1:3混合,混合液-20℃孵育过夜,5000r/min离心10min,取上清。上清与乙醇1:4混合,混合液-20℃孵育过夜,5000r/min离心10min,弃上清,灭菌纯化水重悬沉淀,即为粗提的NH。将重悬的抗原转入截留分子量为3kD的透析袋中,扎口后将透析袋置于50倍溶液体积的灭菌纯化水中透析,24h更换1次灭菌纯化水,更换3次。从透析袋中取出抗原即为纯化的NH抗原。

[0019] 2、荧光微球垫1和荧光微球垫2的制备

(1)清洗:取适量固体含量为1%的荧光微球溶液至1.5ml离心管中,加入20倍体积的0.01M MES溶液,混匀,12000r/min离心15min,弃上清,重复清洗2次,将洗涤后的荧光微球重悬于20倍体积的0.01M MES溶液;

(2)活化:向微球分散液中,加入等体积的0.4mol/L EDC溶液,振荡混匀,避光反应30min,12000r/min离心15min,弃上清,按步骤(1)重复清洗2次,沉淀即为活化的荧光微球,40倍体积0.05mol/L BBS溶液重悬;

(3)标记:将LPS抗原加入到已活化的荧光微球中,使其终浓度为5μg/ml,混匀;将NH抗原加入到已活化的荧光微球中,使其终浓度为40μg/ml,混匀。将混匀后含LPS抗原的荧光微球溶液和含NH抗原的荧光微球溶液,分别于室温条件下,避光反应1h;

(4)封闭:分别按溶液总体积的10%加入封闭液(9%的酪蛋白)。于室温条件下,分别避光反应30min。

[0020] (5)复溶:12000r/min离心15min,弃上清,加入1ml稀释液,超声打散微球,得荧光微球-抗体复合物溶液;

(6)染色:向荧光微球-抗体复合物溶液中分别加入1%胭脂红溶液,充分混匀,制得混合液;

(7)喷涂:将混合液按照3 μ l/cm喷至玻璃纤维素膜上;

(8)干燥:将喷有混合液的玻璃纤维素膜放入37℃鼓风干燥箱中,干燥3~4h,分别制得荧光微球垫1和荧光微球垫2;将干燥后的荧光微球垫1和荧光微球垫2放入干燥器中,备用。

[0021] 以上步骤中所述荧光微球为直径200nm的含有高亮稀土染料的羧基聚苯乙烯微球;吸收波长为365nm,检测波长是610nm。

[0022] 所述EDC是一种可溶于水的碳二亚胺。

[0023] 所述胭脂红溶液可替换为柠檬黄、果绿、日落黄、亮蓝或其他色素溶液。

[0024] 3、样品垫制备

(1)配制pH 7.4的PBS:称取8g NaCl,5.8g Na₂HPO₄,0.2g KCl,0.2g KH₂PO₄溶于1L纯化水中,即为pH 7.4的PBS;

(2)配制样品垫处理液:分别称取5g蔗糖,5g PVP-K30,5g PEG-20000,量取20ml Tween-20,至1L pH 7.4的PBS中,磁力搅拌器上混匀待用;

(3)样品垫的处理:将玻璃纤维素膜装于自封袋中,20ml/张,加入样品垫处理液,浸泡30min;

(4)样品垫的干燥:将充分浸泡过的玻璃纤维素膜放入37℃鼓风干燥箱中,干燥8~10h;放入干燥器中待用。

[0025] 4、检测垫的制备

检测垫是指包被了一条横向质控线(C线)和两条横向检测线(T1和T2线)的硝酸纤维素膜,C线与T2线间距是5~6mm,T1线与T2线间距是3~4mm。从样品垫到吸水垫方向依次为T1线、T2线和C线。C线包被的是抗LPS多抗,具体实施步骤是将抗LPS多抗用PB(pH值8.0)稀释成1.5mg/ml,倒吸至划膜机管线中,按照0.8 μ l/cm划出,放入37℃鼓风干燥箱中,干燥3~4h;T1线包被LPS抗原,T2线包被NH抗原;具体实施步骤是将LPS抗原或NH抗原用PB(pH值8.0)稀释至0.4mg/ml,倒吸至划膜机管线中,按照0.8 μ l/cm划出,放入37℃鼓风干燥箱中,干燥3~4h;放入干燥器中待用。所述检测垫是样品中有效成份与固定在膜上的活性物质发生特异性结合的区域。

[0026] 5、试纸卡的组装

以不吸水的PVC胶粘板为底板,将样品垫、荧光微球垫1、荧光微球垫2、检测垫和吸水垫由上至下依次搭接粘贴在底板上,各组分在相邻处有1~2mm重叠,用切条机将贴好的PVC板切成3mm宽的试纸条,通过卡座内的卡槽与卡壳组合。其中,所述检测垫上的T1线靠近样品垫一侧、对应的卡盖上“T1”标志;质控线C线靠近吸水垫一侧,对应的卡盖上有“C”标志,如图1所示。所述吸水垫为吸水滤纸,吸水滤纸裁切成长30cm,宽1.9~2.1cm。所述吸水垫具有虹吸效果。

[0027] 所述卡盖的规格为70mm*20mm*5mm,卡盖中心有一16mm*3mm大小的视窗,卡盖与样品垫对应区域有标识为“S”的加样孔,加样孔下方有指示检测方向的箭头。

[0028] 实施例2、布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸的检测方法

撕开检测卡铝箔包装袋,取出检测卡,放于平整、洁净的台面上;

用配套滴管吸取已准备好的血清样本,垂直而缓慢的滴加2~3滴(约60 μ l)到加样孔内;

室温静置5~10min读取结果,按卡盖上所示箭头方向将试纸卡插入荧光免疫分析仪的卡槽中,读取T1/C值和T2/C值;

判定标准:当T2/C值 ≥ 0.1 且T1/C值 ≥ 0.1 时,判定为布鲁氏菌感染;当T1/C值 < 0.1 且T2/C值 ≥ 0.1 时,判定为免疫阳性;当T1/C值 < 0.1 且T2/C值 < 0.1 ,判定为阴性。

[0029] 实施例3、特异性试验

采用布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸,对小肠耶尔森氏菌、粗糙型布鲁氏菌、都柏林沙门氏菌和大肠杆菌0157阳性血清进行检测,4种特异性血清的T1/C值和T2/C值均在0.1以内;布鲁氏菌野毒感染阳性血清T1/C和T2/C为0.964和0.145;布鲁氏菌S2疫苗免疫阳性血清T1/C和T2/C为0.052和1.346;布鲁氏菌阴性血清T1/C和T2/C为0.030和0.062;表明本研究建立的检测方法特异性强,与相似病原阳性血清均无交叉反应。

[0030] 实施例4、临界值的确定

本研究共采集378份临床血清样本,通过用布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸对大量羊血清样品检测,运用ROC(受试者工作特性曲线)方法进行统计学分析,通过T1/C值、T2/C值与敏感性和特异性的数量关系,确定本制品的临界值及判定标准:当T2/C值 ≥ 0.1 且T1/C值 ≥ 0.1 时,判定为布鲁氏菌感染;当T1/C值 < 0.1 且T2/C值 ≥ 0.1 时,判定为免疫阳性;当T1/C值 < 0.1 且T2/C值 < 0.1 ,判定为阴性。

[0031] 实施例5、比对试验

基于布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸优化后的生产工艺,制备了3批成品试纸,每批抽取2盒试纸,分别对30份羊血清样品进行2次重复检测,按照试纸说明书操作进行试验,检测结果显示3批试纸检测结果均一致,说明本试纸具有良好的重复性,具体结果如下表所示。

血清 编号	批次 1						批次 2						批次 3					
	重复 1			重复 2			重复 1			重复 2			重复 1			重复 2		
	T1 C	T2 C	判定	T1 C	T2 C	判定	T1 C	T2 C	判定	T1 C	T2 C	判定	T1 C	T2 C	判定	T1 C	T2 C	判定
01	1.351	1.059	++	1.345	1.079	++	1.337	1.065	++	1.336	1.061	++	1.343	1.077	++	1.336	1.056	++
02	1.338	0.949	++	1.335	0.950	++	1.347	0.935	++	1.346	0.963	++	1.343	0.935	++	1.346	0.929	++
03	1.705	0.162	++	1.703	0.164	++	1.715	0.167	++	1.726	0.171	++	1.709	0.177	++	1.716	0.171	++
04	2.031	0.898	++	2.059	0.891	++	2.047	0.935	++	2.076	0.927	++	2.033	0.899	++	2.056	0.910	++
05	1.821	1.129	++	1.863	1.201	++	1.843	1.185	++	1.853	1.141	++	1.842	1.177	++	1.836	1.146	++
06	1.431	1.289	++	1.435	1.279	++	1.437	1.285	++	1.436	1.281	++	1.433	1.287	++	1.436	1.286	++
07	1.259	1.089	++	1.268	1.079	++	1.252	1.075	++	1.267	1.081	++	1.261	1.087	++	1.275	1.086	++
08	1.201	1.389	++	1.204	1.389	++	1.207	1.385	++	1.206	1.381	++	1.203	1.387	++	1.206	1.686	++
09	1.239	1.004	++	1.235	1.003	++	1.237	1.007	++	1.236	0.989	++	1.233	0.997	++	1.236	0.983	++
10	1.901	1.049	++	1.905	1.050	++	1.907	1.031	++	1.906	1.039	++	1.903	1.037	++	1.906	1.036	++
11	2.731	0.041	~	2.775	0.045	~	2.767	0.047	~	2.766	0.041	~	2.751	0.039	~	2.749	0.045	~
12	1.291	0.041	~	1.295	0.044	~	1.297	0.045	~	1.296	0.045	~	1.293	0.048	~	1.296	0.045	~
13	1.931	0.012	~	1.935	0.010	~	1.937	0.015	~	1.936	0.015	~	1.933	0.018	~	1.936	0.019	~
14	0.851	0.015	~	0.855	0.016	~	0.857	0.015	~	0.856	0.018	~	0.853	0.014	~	0.856	0.015	~
15	1.131	0.035	~	1.135	0.034	~	1.137	0.033	~	1.136	0.035	~	1.133	0.035	~	1.136	0.035	~
16	1.739	0.022	~	1.775	0.025	~	1.757	0.023	~	1.776	0.025	~	1.743	0.023	~	1.776	0.025	~
17	1.019	0.058	~	1.040	0.059	~	1.033	0.057	~	1.044	0.055	~	1.023	0.058	~	1.016	0.055	~
18	0.913	0.015	~	0.927	0.015	~	0.916	0.016	~	0.921	0.018	~	0.926	0.015	~	0.921	0.015	~
19	2.221	0.005	~	2.235	0.005	~	2.237	0.003	~	2.346	0.001	~	2.313	0.006	~	2.256	0.005	~

20	1.311	0.066	—	1.309	0.068	—	1.319	0.055	—	1.315	0.065	—	1.323	0.063	—	1.321	0.065	—
21	0.001	0.009	—	0.005	0.008	—	0.007	0.005	—	0.006	0.001	—	0.003	0.007	—	0.006	0.006	—
22	0.081	0.070	—	0.084	0.070	—	0.083	0.075	—	0.082	0.071	—	0.081	0.077	—	0.083	0.078	—
23	0.031	0.039	—	0.005	0.038	—	0.036	0.035	—	0.036	0.031	—	0.033	0.033	—	0.033	0.036	—
24	0.051	0.059	—	0.055	0.053	—	0.057	0.055	—	0.056	0.051	—	0.053	0.057	—	0.056	0.056	—
25	0.009	0.003	—	0.008	0.002	—	0.007	0.005	—	0.008	0.001	—	0.008	0.007	—	0.009	0.006	—
26	0.041	0.009	—	0.045	0.008	—	0.047	0.005	—	0.046	0.001	—	0.043	0.007	—	0.046	0.006	—
27	0.002	0.009	—	0.005	0.008	—	0.005	0.008	—	0.004	0.007	—	0.003	0.007	—	0.003	0.006	—
28	0.018	0.006	—	0.016	0.005	—	0.014	0.003	—	0.014	0.002	—	0.018	0.004	—	0.017	0.003	—
29	0.053	0.012	—	0.055	0.015	—	0.059	0.015	—	0.057	0.014	—	0.054	0.011	—	0.052	0.019	—
30	0.001	0.003	—	0.002	0.003	—	0.004	0.001	—	0.003	0.004	—	0.003	0.005	—	0.005	0.003	—
1、羊布鲁氏菌荧光微球抗体检测试纸判定标准为：当 T2/C 值大于等于 0.1 且 T1/C 值大于等于 0.1 时，判定为布鲁氏菌感染；当 T1/C 值大于等于 0.1 且 T2/C 值小于 0.1 时，判定为疫苗免疫阳性；当 T1/C 值小于 0.1 时，判定为阴性； 2、“—”表示检测结果为布鲁氏菌感染，“—”表示检测结果为疫苗免疫阳性，“—”表示检测结果为阴性；																		

[0032] 因此，本发明所述试纸条使用快捷、方便，检测结果具有良好的敏感性、特异性以及重复性，能够有效鉴别自然感染布鲁氏菌的羊，便于布病防控措施的实施、及时切断布病的传染源头，为布病的防控政策的实施提供新的技术，为系统化、便捷化、规范化地检测布病S2疫苗免疫抗体和布病感染抗体提供一种新方法。

[0033] 需要说明的是，以上所述的实施方案应理解为说明性的，而非限制本发明的保护范围，本发明的保护范围以权利要求书为准。对于本领域技术人员而言，在不背离本发明实质和范围的前提下，对本发明作出的一些非本质的改进和调整仍属于本发明的保护范围。

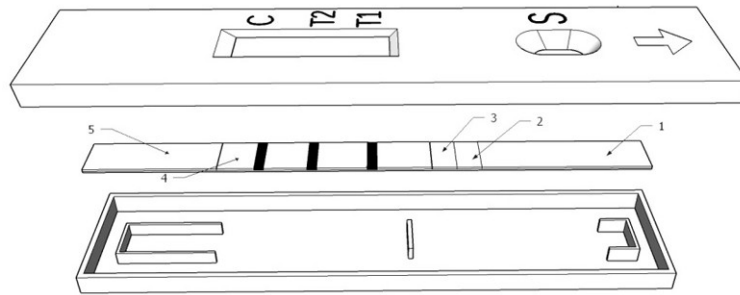


图1

专利名称(译)	一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸		
公开(公告)号	CN109541206A	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201811624580.6	申请日	2018-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛阳现代生物技术研究有限公司		
[标]发明人	李秀梅 范伟兴 李凯 狄栋栋 原小燕 任雪建 吴彬 刘明瑞 杨志 肖利 侯志乾 王路 卫一新		
发明人	李秀梅 范伟兴 李凯 尼博 狄栋栋 原小燕 任雪建 吴彬 刘明瑞 杨志 肖利 侯志乾 王路 卫一新		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56911 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/582 G01N2333/23		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种布鲁氏菌抗体血清学鉴别诊断试纸，属于免疫学检测领域，包括卡壳和试纸条；卡壳包括相互扣合的卡盖和卡座；试纸条包括底板以及依次搭接粘贴在底板上的吸水垫、检测垫、荧光微球垫1、荧光微球垫2和样品垫；其特征在于：所述检测垫为设有质控线C、检测线T1和检测线T2的硝酸纤维素膜，质控线C包被抗LPS多抗，检测线T1包被LPS抗原，检测线T2包被NH抗原；所述荧光微球垫1和荧光微球垫2为分别包埋时间分辨荧光微球标记的NH抗原和LPS抗原的玻璃纤维素膜。本发明为系统化、便捷化、规范化地检测布病S2疫苗免疫抗体和布病感染抗体提供一种新方法。

