



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109813576 B

(45) 授权公告日 2021.04.02

(21) 申请号 201910225723.4

(22) 申请日 2019.03.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109813576 A

(43) 申请公布日 2019.05.28

(73) 专利权人 中国动物卫生与流行病学中心
地址 266032 山东省青岛市南京路369号

(72) 发明人 张喜悦 魏荣 商营利 孙明军
孙翔翔 周晓翠 李阳

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 1/14 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 201968687 U, 2011.09.14

WO 2015119512 A1, 2015.08.13

CN 2652328 Y, 2004.11.03

CN 1810838 A, 2006.08.02

CN 102183649 A, 2011.09.14

CN 202553949 U, 2012.11.28

CN 104548081 A, 2015.04.29

María Laura Mon等. Evaluation of cocktails with recombinant proteins of Mycobacterium bovis for a specific diagnosis of bovine Tuberculosis.《BioMed Research International》.2014,

张喜悦等. 牛结核病刺激上清液在布病检疫中的应用.《兽医科学》.2018,

审查员 王晓彤

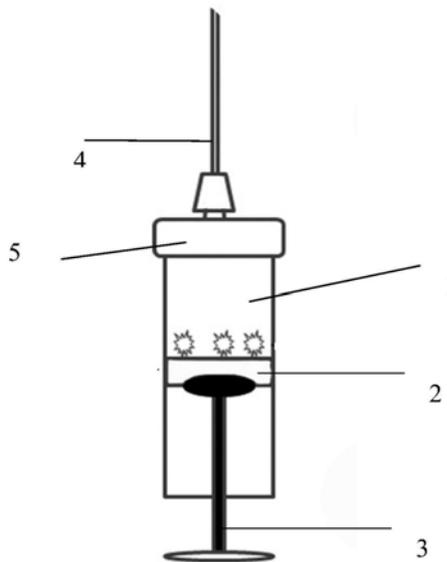
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种牛结核病刺激上清制备用采血器

(57) 摘要

本发明首先提供一种牛结核病刺激上清制备用采血器,包含有内筒以及采血器常用的其它组件,且在采血器的内筒内放入有肝素和鸡尾酒抗原的混合物,所述的鸡尾酒抗原包括ESAT6、CFP10、FixB和Rv3615c蛋白。本发明通过对传统方法的简化,仅需采血、孵育后即可直接进行检测。整个试验流程在普通实验室即可进行,每人进行50头牛的刺激上清检测即可节约4小时。使得原本纷繁复杂的牛结核病的 γ -干扰素试验,变得极易普及。同时,本采血器内使用的鸡尾酒抗原可以排除疫苗免疫造成的假阳性反应。



1. 一种牛结核病刺激上清制备用采血器,其特征在于,所述的采血器包含有内筒还包含有以过渡配合方式安装在内筒内的活塞,和控制活塞运动的拉杆,以及针头,所述的针头通过采血器帽安装在内筒上;所述的采血器帽通过螺旋方式安装在内筒的前端;所述的采血器帽内安装有滤膜;且在采血器的内筒内放入有肝素和鸡尾酒抗原的混合物,所述的鸡尾酒抗原包括ESAT6、CFP10、FixB和Rv3615c蛋白,其中ESAT6、CFP10、FixB和Rv3615c抗原蛋白的质量比为2:2:1:1;

所述的肝素和鸡尾酒抗原的质量比为1:1,

所述的肝素和鸡尾酒抗原的混合物以粉末形式放在内筒中。

2. 权利要求1所述的采血器在制备牛结核病 γ -干扰素检测试剂盒中的应用。

一种牛结核病刺激上清制备用采血器

技术领域

[0001] 本发明属于动物疫病检测设备领域,具体涉及一种牛结核病刺激上清制备用采血器。

背景技术

[0002] 牛结核病是一种慢性消耗性的人兽共患传染病,是国际动物卫生组织(OIE)规定必须通报的动物疫病,在我国属二类动物传染病,对养牛业、食品安全与人类健康构成重大威胁。据统计,人结核中约有5%是由牛分枝杆菌引起。因此掌握我国牛结核现状、检疫淘汰感染牛具有重要的公共卫生意义。牛结核病的检疫目前可归为三类,细菌学检测、分子生物学检测和免疫学检测。细菌学检测和分子生物学检测方法的样品采集需要屠宰牛,不适于活畜检疫。免疫学检测方法包括血清学检测和细胞免疫检测,由于分枝杆菌引起的机体免疫应答以细胞免疫为主,因此目前应用最广泛是结核菌素皮内变态反应和牛结核病 γ -干扰素ELISA检测技术,其中牛结核病 γ -干扰素ELISA检测技术已被OIE批准为皮内变态反应的试验的替代试验。

[0003] 常用的牛结核病 γ -干扰素ELISA检测技术的第一步是制备刺激上清。其过程如下:

[0004] 1) 采血:用动物用采血器,采集好后将血液打入肝素抗凝管中,轻轻颠倒几次混合血液,使肝素溶解。室温($22\pm 5^{\circ}\text{C}$,避免温度过高或过低)下运送到实验室并在采血后8个小时内进行培养;

[0005] 2) 加样:将抗凝血加入24孔组织培养板;

[0006] 3) 加入刺激抗原,在每孔抗凝血中分别无菌加入牛PPD、禽PPD和PBS(阴性抗原对照);

[0007] 4) 孵育:将含有血液和抗原的组织培养板在 37°C 湿温培养箱中孵育16-24小时。

[0008] 5) 收样:用移液器小心吸取上层血浆,进行ELISA检测。

[0009] 牛结核病 γ -干扰素ELISA检测技术的第二步是使用ELISA试剂盒检测已收获的刺激上清。

[0010] 可见,目前牛结核病 γ 干扰素ELISA试验用的刺激上清制备过程繁琐,试剂耗材用量多,工作量很大,再加上收获上清的时间,每人制备50头牛的刺激上清即约耗时5个或更多的小时。同时,ELISA结果判定等均较为复杂,难以在条件不是很完善的实验室推广,且不能够排除疫苗免疫造成的假阳性反应。

发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种牛结核病刺激上清制备用采血器,从而弥补现有技术的不足。

[0012] 本发明首先提供一种牛结核病刺激上清制备用采血器,包含有内筒以及采血器常用的其它组件,且在采血器的内筒内放入有肝素和鸡尾酒抗原的混合物,所述的鸡尾酒抗

原包括ESAT6、CFP10、FixB和Rv3615c蛋白,其中ESAT6、CFP10、FixB和Rv3615c抗原蛋白的质量比为2:2:1:1;

[0013] 所述的肝素和鸡尾酒抗原的质量比为1:1。

[0014] 其中肝素和鸡尾酒抗原的混合物是处于干燥状态,例如粉末状态。

[0015] 所述的采血器,还包含有以过渡配合方式安装在内筒1内的活塞2和控制活塞2运动的拉杆3,以及针头4,所述的针头4优选通过采血器帽5安装在内筒1上;

[0016] 所述的采血器帽5是通过螺旋方式安装在内筒1的前端;

[0017] 所述的采血器帽5内还有滤膜6。

[0018] 本发明所提供的采血器可用于制备用于牛结核病 γ -干扰素检测试剂盒。

[0019] 传统制备方法繁琐复杂,需要将采血、加样、加入刺激抗原、孵育和收样等步骤,需要在条件较好、且配备生物安全柜的高级实验室进行操作,需要耗费细胞培养板等试剂耗材,同时需要耗费大量的时间。而本发明通过对传统方法的简化,仅需采血、孵育后即可直接进行检测。整个试验流程在普通实验室即可进行,每人进行50头牛的刺激上清检测即可节约4小时。使得原本纷繁复杂的牛结核病的 γ -干扰素试验,变得极易普及。同时,本采血器内使用的鸡尾酒抗原可以排除疫苗免疫造成的假阳性反应。

附图说明

[0020] 图1:本发明的采血器结构示意图

[0021] 图2:本发明的采血器帽的结构示意图;

[0022] 其中1、内筒 2、活塞 3、拉杆 4、针头 5、采血器帽 6、滤膜;

[0023] 图3:抗原组分筛选图;

[0024] 图4:两种方法制备50头牛花费时间的比较图;

[0025] 图5:两种方法疫苗免疫干扰率的比较图。

具体实施方式

[0026] 本发明在采血器内放入肝素和筛选获得的鸡尾酒抗原的混合物,可以简化繁琐复杂的刺激上清制备过程,将采血、加样、加入刺激抗原、孵育和收样等简化为采血、孵育后直接进行检测的试验过程。同时节约了细胞培养板等试剂耗材。让必须在条件较好、且配备生物安全柜的高级实验室进行的操作,在普通实验室即可进行,让原本在县级兽医实验室难以进行的牛结核病的 γ -干扰素试验,变得极易普及。同时采血器内使用的鸡尾酒抗原还可以排除疫苗免疫造成的假阳性反应。

[0027] 下面结合实施例和附图对本发明进行详细的描述。

[0028] 实施例1:采血器的结构

[0029] 本发明中,肝素和筛选获得的鸡尾酒抗原的混合物进行干燥后,可以放入常规使用的采血器中;下面对本发明所使用的一种采血器进行描述。

[0030] 如图1所示,所述的采血器,还包含有以过渡配合方式安装在内筒1内的活塞2和控制活塞2运动的拉杆3,以及针头4,所述的针头4优选通过采血器帽5安装在内筒1上;所述的采血器帽5是通过螺旋方式安装在内筒1的前端;所述的采血器帽5内还有滤膜6。

[0031] 本实施例的采血器内筒(采血器器体)使用的原料为聚苯乙烯,拉杆、活塞使用的

原料为聚丙烯;滤膜6为0.12微米孔径,复合PP+PET材料。

[0032] 所述注射器的一种尺寸如下:

[0033] 器体:长6cm、直径1.7cm

[0034] 拉杆:长8cm

[0035] 活塞:直径1.5

[0036] 采血器帽:直径1.8

[0037] 针头:可使用6号和7号针头。

[0038] 2、肝素锂

[0039] 将肝素锂用灭菌的0.9%生理盐水配制成3mg/mL浓度的溶液,置4℃备用。

[0040] 3、鸡尾酒抗原

[0041] ①抗原组分筛选

[0042] 将ESAT6、CFP10作为必备组分,与将其他各组分进行组合,形成ESAT6/CFP10(简写为EC)、ESAT6/CFP10/MPB83(简写为ECM)、ESAT6/CFP10/FixB(简写为ECF)、ESAT6/CFP10/Rv3615c(简写为ECR)等4种组合,同时以PPDB/PPDA(简写为BA)作用传统方法对照。结果表明ESAT6/CFP10/Rv3615c组合优于其他组合。将ECR与其他分子进行组合,形成ECR、ESAT6/CFP10/Rv3615c/MPB83(ECRM)、ESAT6/CFP10/Rv3615c/FixB(ECRF)、ESAT6/CFP10/Rv3615c/MPB83/FixB(ECRMF)等4种组合,检测结果表明ECRM、ECRF、ECRMF均优于ECR,但ECRM、ECRF、ECRMF之间无明显区别(图3)。但这三种组合中,以ECRF的生产流程最为简单,因此确定以ESAT6/CFP10/Rv3615c/FixB组合作为鸡尾酒抗原组分。

[0043] ②抗原浓度筛选

[0044] 将ESAT6、CFP10、Rv3615c、FixB 4种抗原蛋白分别做梯度稀释为10μg/mL、20μg/mL、40μg/mL、80μg/mL、160μg/mL,烘干后加入3mL抗凝血,进行牛结核病γ-干扰素试验。结果ESAT6、CFP10的最佳使用浓度为80μg/mL,Rv3615c和FixB的最佳使用浓度为40μg/mL。

[0045] ③抗原制备

[0046] 将上述的ESAT6、CFP10、FixB和Rv3615c蛋白,调整为240μg/mL浓度,按照2:2:1:1的比例混合。取100uL鸡尾酒抗原,与50uL稀释好的肝素锂混合。

[0047] ④抗原加样

[0048] 将采血器置于试管架上,针头端朝上,拧开采取器帽,将上述鸡尾酒抗原和肝素锂混合物加入内筒。置湿度25%以下房间的电热恒温干燥箱中,40℃烘干3小时,此时液体消失,偶见白斑遗留在内筒的活塞上面。拧上采血器帽。

[0049] 4.采血器的包装

[0050] 在湿度25%以下房间,取出处理后的采血器,装入包装袋,充入氮气、加入干燥剂后封口,置室温保存。

[0051] 实施例2:采血器的应用

[0052] 本发明与常规的采血器外观基本一致,由内筒、活塞、拉杆、针头、2种采血器盖和外包装组成。其中采血器的活塞上面含有干燥后的肝素及鸡尾酒抗原,部分采血器肉眼观察不到;部分采血器可见白斑,但采血后会溶解、消失。

[0053] 本发明的使用方法与常规的采血器基本一致。具体过程如下。

[0054] ①采血。打开外包装,使用专用采血器采集2-3mL牛的全血,将采血器轻轻颠倒几

次混合血液,使内含的肝素及鸡尾酒抗原溶解。拧下采血用采血器帽,盖上孵育用采血器帽;拧下拉杆,室温($22\pm 5^{\circ}\text{C}$,避免温度过高或过低)下运送到实验室。

[0055] ②孵育。将装有全血的采血器放入试管架中,试管架约呈45度倾斜放入 37°C 湿温培养箱中孵育16-24小时。

[0056] ③检测。直接使用采血管中的上清进行ELISA试验;或者用移液器吸取上清,转入独立的1.5mL离心管中, -20°C 保存备用。

[0057] 使用ELISA试剂盒检测刺激上清。结果判定:上清OD值 ≥ 0.2 为阳性;上清OD值 < 0.2 为阴性。阳性结果表明牛只为牛结核病自然感染阳性,阴性结果表明牛只为牛结核病阴性。

[0058] 新型采血器和传统方法相比,将传统方法的采血、加样、加入刺激抗原、孵育和收样等步骤,简化为采血后直接即可检测,每人制备50头牛的刺激上清,即可节约4小时(图4)。

[0059] 传统方法中,用作刺激抗原的牛型PPD成分复杂,含有多种蛋白,其中大部分的蛋白同时存在于BCG疫苗菌株中,使用疫苗免疫后,会导致部分免疫牛的刺激上清在牛结核病 γ -干扰素ELISA试验中为阳性,这种阳性反应与牛结核分枝杆菌自然感染产生的阳性无法区分,因此无法排出这种由疫苗免疫造成的假阳性。我们对5头疫苗免疫牛进行牛结核病检测,使用传统方法,同时用牛型PPD、禽型PPD和PBS制备刺激上清,经牛结核病 γ -干扰素ELISA试剂盒检测,有2头的牛PPD的OD值-PBS的OD值 ≥ 0.1 且牛PPD的OD值-禽PPD的OD值 ≥ 0.1 ,判为阳性,其余3头牛PPD的OD值-PBS的OD值 < 0.1 ,判为阴性。)疫苗免疫造成的阳性牛为2头,疫苗免疫造成的干扰率为40%。

[0060] 使用新型采血器,由于采血器中的刺激抗原为新型鸡尾酒抗原,其蛋白组分仅仅存在于野毒株中,而不存在于疫苗株中,其制备的疫苗免疫牛刺激上清在牛结核病 γ -干扰素检测中即为阴性结果,从而排除疫苗免疫造成的假阳性反应,增强试验的特异性。同样对这5头疫苗免疫牛,采用本发明采血器制备刺激上清,经牛结核病 γ -干扰素ELISA试剂盒检测,所有5头牛的牛PPDOD值-PBSOD值 < 0.1 ,判为阴性,疫苗免疫造成的阳性牛为0头,疫苗免疫造成的干扰率为0%,见图5。

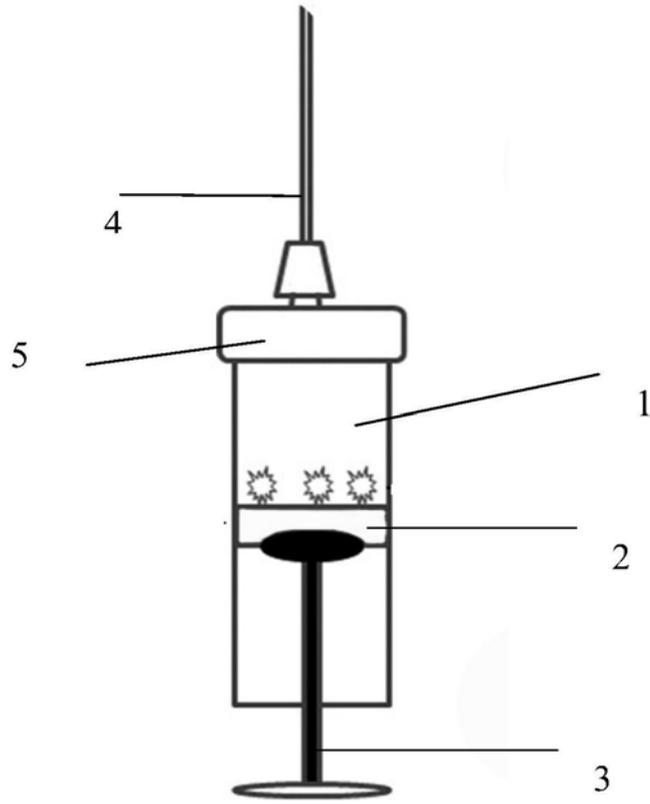


图1

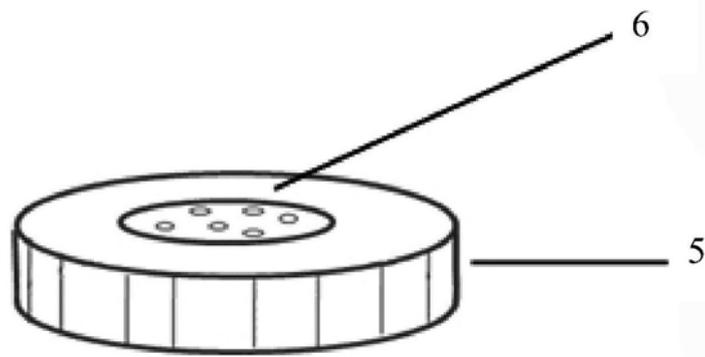


图2

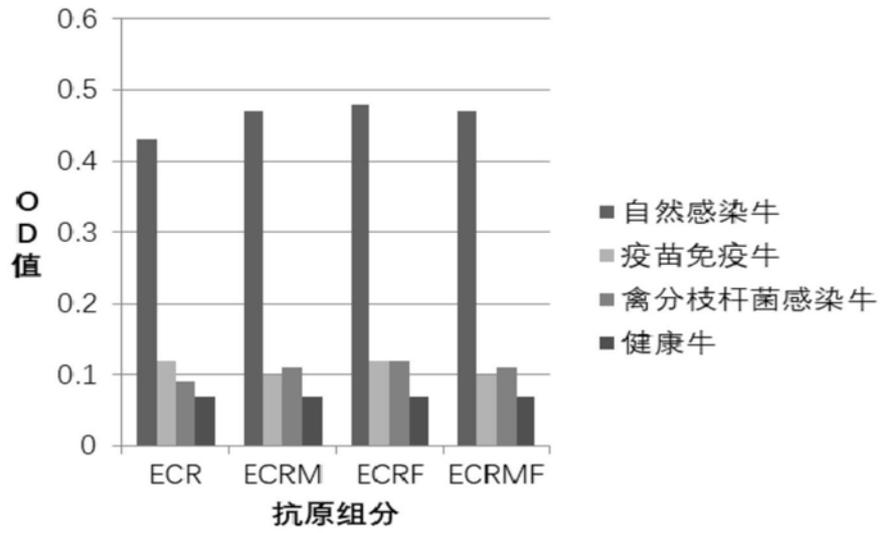


图3

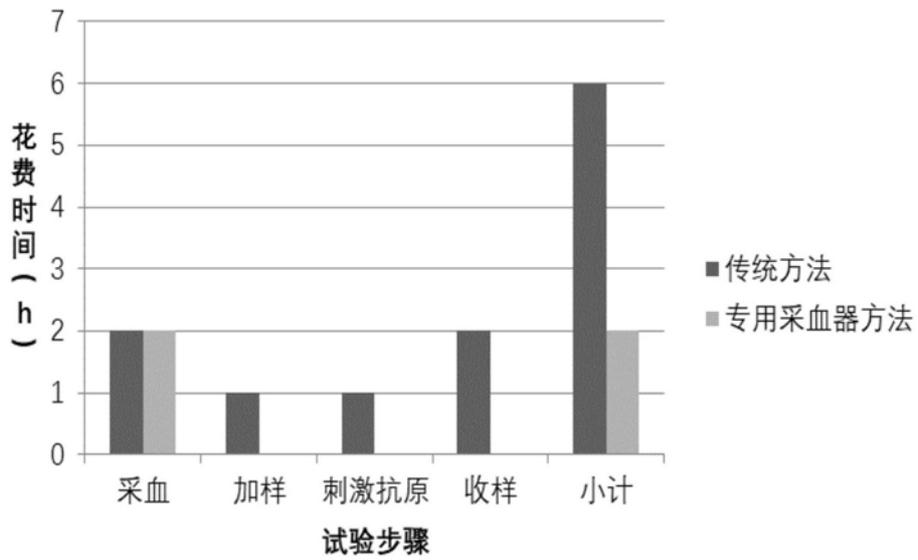


图4

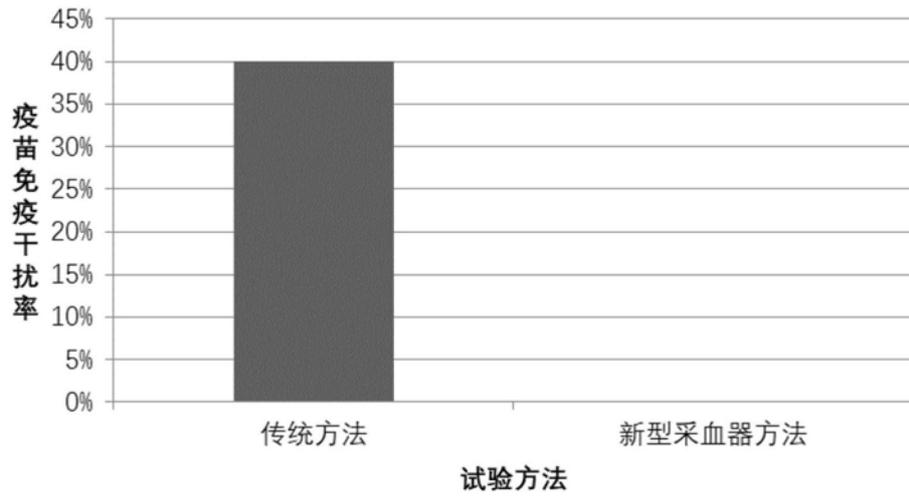


图5