



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110196323 A

(43)申请公布日 2019.09.03

(21)申请号 201910427204.6

(22)申请日 2019.05.22

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 张鑫宇 刘潇羽 党红军 熊新灿
孙怀昌

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 严晓彪 董建林

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/544(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡及制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,包括PVC底板,在PVC底板上按顺序依次固定有样品垫、荧光垫、硝酸纤维素膜、吸水垫;荧光垫内有荧光标记抗ASFV p30抗原的一个表位的单克隆抗体Mab1;硝酸纤维素膜表面划有检测线和质控线,检测线为针对ASFV p30抗原另一表位的单克隆抗体Mab2,质控线为羊抗小鼠IgG抗体。适用于发病猪外周血、血清、唾液、组织(肺脏、脾脏)研磨液内ASFV p30抗原的检测,在短时间内诊断出ASFV感染,特别适合现场ASFV感染诊断、流行病学调查和生猪国际贸易检疫检验;与免疫荧光分析仪协同使用直接显示结果,操作迅速简单、准确率高,具有很强的实用性。

1. 一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,其特征在于,包括PVC底板,在PVC底板上按顺序依次固定有样品垫、荧光垫、硝酸纤维素膜、吸水垫;荧光垫内有荧光标记抗ASFV p30抗原的一个表位的单克隆抗体Mab1;硝酸纤维素膜表面划有检测线和质控线,检测线为针对ASFV p30抗原另一表位的单克隆抗体Mab2,质控线为羊抗小鼠IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,其特征在于,所述抗ASFV p30单克隆抗体Mab1和Mab2针对的抗原表位均位于p30aa145-aa154,且体Mab1和Mab2具体针对的表位不同。

3. 根据权利要求1所述的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,其特征在于,分泌单克隆抗体Mab1的杂交瘤细胞保藏于武汉大学保藏中心,地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C2018158,分类命名为:杂交瘤细胞株6G12,保藏日期为:2018.9.5;分泌单克隆抗体Mab2的杂交瘤细胞保藏于武汉大学保藏中心,地址中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C2018159,分类命名为:杂交瘤细胞株3H6,保藏日期为:2018.9.5。

4. 根据权利要求1所述的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,其特征在于,检测线的Mab2工作浓度为1.0mg/mL,质控线的羊抗鼠IgG抗体工作浓度为1.0mg/ml, Mab2抗体和羊抗鼠IgG抗体划膜时喷涂量均为1 μ L/cm,且检测线与质控线之间距离为5mm。

5. 根据权利要求1所述的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡的制备方法,其特征在于,荧光标记抗ASFV p30抗原的单克隆抗体Mab1,包括以下步骤:

S1、将未处理的荧光垫浸泡于处理液中,取出后,恒温干燥,制得预处理的荧光垫;

S2、将钬荧光微球加入EDC溶液中,振荡活化荧光微球;

S3、于纯化单克隆抗体Mab1中,加入标记液缓冲液,混合均匀后,加入活化的荧光微球,恒温振荡;

S4、平衡PD MiniTrap G-25脱盐柱后,制得标记的荧光微球溶液;

S5、将标记的荧光微球溶液喷至预处理的荧光垫上,恒温干燥。

6. 根据权利要求5所述的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡的制备方法,其特征在于,所述步骤S1中的处理液包括:0.02M PBS缓冲液,pH 7.2、3%蔗糖、0.1% PEG20000、0.5%BSA、0.5%Tween-20;浸泡时间为30min,干燥温度为37 $^{\circ}$ C;

所述步骤S2中的钬荧光微球为1mg 200nm;EDC溶液为100 μ L 40mg/ml,振荡时间为1min;

所述步骤S3中的纯化单克隆抗体Mab1为1mg,标记液缓冲液为1M MES,pH5.0,10 μ l;加入活化的荧光微球为12 μ L,恒温振荡时间为1h;

所述步骤S5中标记的荧光微球溶液的喷量为5 μ L/cm,干燥温度为37 $^{\circ}$ C。

7. 根据权利要求1-6任意一项所述的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

A1、将PVC底板粘面朝上,将硝酸纤维素膜粘在PVC板中间位置,

A2、将荧光垫粘附于硝酸纤维素膜前;

A3、在荧光垫前、硝酸纤维素膜后分别将样品垫、吸水垫粘附在PVC底板上,制得试纸条;

A4、将试纸条置于带加样孔的外壳内,组装成试纸卡;所述加样孔正对样品垫。

8. 根据权利要求7所述的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡的制备方法,其特征在于,所述样品垫与荧光垫、荧光垫与硝酸纤维素膜、硝酸纤维素膜与吸水垫部分叠合,且叠合宽度为2mm;试纸条的宽度为3.5mm。

9. 根据权利要求1所述的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,其特征在于,使用时,将1滴待检样品滴加于试纸卡的加样孔,加入3滴样品稀释液,室温静置后,插入便携免疫荧光分析仪,通过收集及分析免疫荧光分析仪检测到的荧光信号,转换成检测值;

若检测值 >29.49 ,则结果判定为阳性,表明样品中存在ASFV抗原;

若检测值 ≤ 29.49 ,则结果判定为阴性,表明样品中无ASFV抗原。

10. 根据权利要求9所述的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,其特征在于,所述样品稀释液包括0.8%氯化钠,0.05%BSA,0.5%Tween-20;室温静置时间为10min。

一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,具体涉及一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡及制备方法和应用,属于病毒疫病诊断技术和动物检疫技术领域。

背景技术

[0002] 非洲猪瘟 (ASF) 是猪的一种高度接触性传染病,高致病性的ASFV感染家猪后死亡率可达100%,该病一直在许多非洲国家流行,目前已传播到格鲁齐亚、亚美尼亚、阿塞拜疆和俄罗斯等邻国,2018年8月该病进入我国,给我国养猪业造成巨大损失。

[0003] 由于目前无疫苗用于ASF防疫,因此快速、准确的诊断对防止该病的传播、流行十分重要。世界动物卫生组织 (OIE) 推荐的ASF抗原诊断技术包括病原检测、核酸鉴定和病毒抗原检测。

[0004] 在病原检测常用的技术中,血吸附试验是经典的ASF诊断方法之一,敏感性较高,但需要临时制备和培养猪骨髓细胞,不仅费时、操作繁琐,而且不能用于非血吸附性毒株的诊断;检测ASFV抗原的荧光抗体试验可用于可疑病猪组织和白细胞样品的检测,不仅适用于非血吸附性毒株的鉴定,而且能与其它病毒感染进行鉴别诊断,但需要制备冰冻切片或涂片,技术难度较大,而且只能在专门的ASF诊断参考实验室进行。

[0005] ASFV核酸鉴定常用的方法为聚合酶链式反应 (PCR) 和实时定量PCR,这些方法具有快速、灵敏等优点,还适合腐败样品的病毒检测,已成为主要的ASF诊断技术,但需要较昂贵的仪器设备和防污染措施,有时检测结果需用序列测定等方法验证。

[0006] ASFV抗原检测也是常用的ASF诊断方法,常用的有免疫荧光法、免疫印迹试验、胶体金检测试纸等。免疫荧光法、免疫印迹试验需要专业人员使用专业的仪器设备进行操作,一般基层实验室、养殖场、农户等无法开展;胶体金试纸检测ASFV抗原具有方便、快捷优点,但检测灵敏度有待进一步提高。

发明内容

[0007] 为解决现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种操作迅速简单、准确率高的用于检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡。

[0008] 为了实现上述目标,本发明采用如下的技术方案:

[0009] 一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,其特征在于,包括PVC底板,在PVC底板上按顺序依次固定有样品垫、荧光垫、硝酸纤维素膜、吸水垫;

[0010] 其中,荧光垫内有荧光标记抗ASFV p30抗原的一个表位的单克隆抗体Mab1;

[0011] 硝酸纤维素膜表面划有检测线和质控线,检测线为针对ASFV p30抗原另一表位的单克隆抗体Mab2,质控线为羊抗小鼠IgG抗体。

[0012] 上述抗ASFV p30单克隆抗体Mab1和Mab2针对的抗原表位均位于p30aa145-aa154,

且体Mab1和Mab2具体针对的表位不同。

[0013] 上述的分泌单克隆抗体Mab1的杂交瘤细胞保藏于武汉大学保藏中心,地址:中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C2018158,分类命名为:杂交瘤细胞株6G12,保藏日期为:2018.9.5;

[0014] 分泌单克隆抗体Mab2的杂交瘤细胞保藏于武汉大学保藏中心,地址中国.武汉.武汉大学,保藏编号为:CCTCC NO:C2018159,分类命名为:杂交瘤细胞株3H6,保藏日期为:2018.9.5。

[0015] 上述的检测线的Mab2工作浓度为1.0mg/mL,质控线的羊抗鼠IgG抗体工作浓度为1.0mg/ml,Mab2抗体和羊抗鼠IgG抗体划膜时喷涂量均为1 μ L/cm,且检测线与质控线之间距离为5mm。

[0016] 上述的荧光标记抗ASFV p30抗原的单克隆抗体Mab1,包括以下步骤:

[0017] S1、将未处理的荧光垫浸泡于处理液中,取出后,恒温干燥,制得预处理的荧光垫;

[0018] S2、将钨荧光微球加入EDC溶液中,振荡活化荧光微球;

[0019] S3、于纯化单克隆抗体Mab1中,加入标记液缓冲液,混合均匀后,加入活化的荧光微球,恒温振荡;

[0020] S4、平衡PD MiniTrap G-25脱盐柱后,制得标记的荧光微球溶液;

[0021] S5、将标记的荧光微球溶液喷至预处理的荧光垫上,恒温干燥。

[0022] 上述步骤S1中的处理液包括:0.02M PBS缓冲液,pH 7.2、3%蔗糖、0.1% PEG20000、0.5%BSA、0.5%Tween-20;浸泡时间为30min,干燥温度为37 $^{\circ}$ C;

[0023] 所述步骤S2中的钨荧光微球为1mg 200nm;EDC溶液为100 μ L 40mg/ml,振荡时间为1min;

[0024] 所述步骤S3中的纯化单克隆抗体Mab1为1mg,标记液缓冲液为1M MES,pH5.0,10 μ l;加入活化的荧光微球为12 μ L,恒温振荡时间为1h;

[0025] 所述步骤S5中标记的荧光微球溶液的喷量为5 μ L/cm,干燥温度为37 $^{\circ}$ C。

[0026] 上述的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡的制备方法,包括以下步骤:

[0027] A1、将PVC底板粘面朝上,将硝酸纤维素膜粘在PVC板中间位置,

[0028] A2、将荧光垫粘附于硝酸纤维素膜前;

[0029] A3、在荧光垫前、硝酸纤维素膜后分别将样品垫、吸水垫粘附在PVC底板上,制得试纸条;

[0030] A4、将试纸条置于带加样孔的外壳内,组装成试纸卡;所述加样孔正对样品垫。

[0031] 进一步的,上述样品垫与荧光垫、荧光垫与硝酸纤维素膜、硝酸纤维素膜与吸水垫部分叠合,且叠合宽度为2mm;试纸条的宽度为3.5mm。

[0032] 使用时,将1滴待检样品滴加于试纸卡的加样孔,加入3滴样品稀释液,室温静置后,插入便携免疫荧光分析仪,通过收集及分析免疫荧光分析仪检测到的荧光信号,转换成检测值;

[0033] 若检测值 $>$ 29.49,则结果判定为阳性,表明样品中存在ASFV抗原;

[0034] 若检测值 \leq 29.49,则结果判定为阴性,表明样品中无ASFV抗原。

[0035] 进一步的,上述样品稀释液包括0.8%氯化钠,0.05%BSA,0.5%Tween-20;室温静

置时间为10min。

[0036] 本发明的有益之处在于：

[0037] 本发明的一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡，适用于发病猪全血、血清、唾液、组织（肺脏、脾脏）研磨液内ASFV p30抗原的检测，可在短时间内诊断出ASFV感染，特别适合现场ASFV感染诊断、流行病学调查和生猪国际贸易检疫检验。其与便携免疫荧光分析仪协同使用，可直接显示检测结果，使用方便、操作迅速简单、准确率高，避免人为因素干扰，具有很强的实用性；

[0038] 且，本发明不限于用本检测方法检测的ASFV p30抗原，亦包括其它的可用于检测的ASFV抗原；抗体亦可相应换成针对非洲猪瘟病毒其他蛋白的单克隆抗体或多克隆抗体，具有广泛的适用性。

附图说明

[0039] 图1为本发明的荧光微球免疫试纸卡的组装结构示意图。

[0040] 附图中标记的含义如下：1、上壳体，2、下壳体，3、加样孔，4、可视窗，5、样品垫，6、荧光垫，7、硝酸纤维素膜，8、吸水垫，9、检测线，10、质控线。

具体实施方式

[0041] 以下结合附图和具体实施例对本发明作具体的介绍。

[0042] 生物材料来源：

[0043] 扬州大学制备的分泌单克隆抗体Mab1的杂交瘤细胞保藏于武汉大学保藏中心，地址：中国·武汉·武汉大学，保藏编号为：CCTCC NO:C2018158，分类命名为：杂交瘤细胞株6G12，保藏日期为：2018.9.5；

[0044] 分泌单克隆抗体Mab2的杂交瘤细胞保藏于武汉大学保藏中心，地址中国·武汉·武汉大学，保藏编号为：CCTCC NO:C2018159，分类命名为：杂交瘤细胞株3H6，保藏日期为：2018.9.5。

[0045] 大肠杆菌中表达、纯化的非洲猪瘟病毒p30重组蛋白：由扬州大学制备；

[0046] 直径200nm钨荧光微球：购于美国Bangs Laboratories.Inc；

[0047] 牛血清白蛋白(BSA)、羊抗小鼠IgG抗体：购于美国Sigma公司。

[0048] 如图1所示，

[0049] 实施例：

[0050] 1. 抗ASFV p30单克隆抗体的制备

[0051] (1) Mab1、Mab2腹水制备

[0052] 8周龄的BALB/c小鼠（扬州大学比较医学中心提供）腹腔注射无菌液体石蜡，0.5mL/只；1周后，小鼠腹腔分别注射分泌Mab1、Mab2的杂交瘤细胞， 10^6 个细胞/只，6天后收集腹水，12000rpm离心去除细胞及脂肪。

[0053] (2) 在腹水中分别加入3倍体积0.06M的 CH_3COONa 缓冲液（ $\text{pH}=5.0$ ），然后再加入1M的盐酸，调节 pH 至4.5；逐滴滴加1/3体积的辛酸，边滴边搅拌，滴完后继续搅拌30min， 4°C 静置1.5h； 4°C 10000rpm离心30min，吸出上清；上清中加入1M NaOH溶液调节 pH 至7.4，逐滴滴加等体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液，边滴边搅拌，滴完后 4°C 静置过夜；第二天10000rpm离心

30min,弃去上清,10mM PB(pH=7.4)溶解沉淀,装入透析袋,PB缓冲液中透析,去除高浓度的盐离子,最终用PB缓冲液稀释至浓度1.0mg/mL,用于荧光微球的标记和硝酸纤维素膜的包被。

[0054] 2. 荧光微球免疫试纸卡制备

[0055] (1) 标记p30单克隆抗体Mab1的荧光垫制备

[0056] S1、将未处理的荧光垫(上海金标生物科技有限公司)浸泡于处理液中(0.02M PBS缓冲液,pH 7.2;3%蔗糖;0.1%PEG20000;0.5%BSA;0.5%Tween-20),浸泡30分钟后取出,置于37℃恒温干燥箱中干燥;

[0057] S2、1mg 200nm的钬荧光微球加入100μL 40mg/ml EDC溶液,涡旋仪振荡1min活化荧光微球;

[0058] S3、1mg纯化单克隆抗体Mab1中,加入标记液缓冲液(1M MES pH5.0) 10μl,混合均匀,加入12μL活化的荧光微球,恒温振荡箱室温振荡1h,标记荧光微球;

[0059] S4、标记的荧光微球溶液经PD MiniTrap G-25脱盐柱(美国GE公司)除盐后;

[0060] S5、喷金划膜仪(上海金标生物科技有限公司)将标记的荧光微球溶液5μL/cm的喷至预处理的荧光垫上,37℃恒温干燥箱中干燥。

[0061] (2) 硝酸纤维素膜检测线和质控线喷涂

[0062] 在硝酸纤维素膜(上海金标生物科技有限公司)表面用喷金划膜一体机喷涂检测线(T)和质控线(C),检测线为针对ASFV p30抗原的单克隆抗体Mab2,质控线为羊抗小鼠IgG抗体;Mab2工作浓度为1.0mg/mL,羊抗鼠IgG抗体(美国Sigma公司)工作浓度为1.0mg/ml,两者划膜时喷涂量均为1μL/cm,且检测线与质控线之间距离5mm。

[0063] (3) 荧光微球免疫试纸卡的组装

[0064] PVC底板(上海金标生物科技有限公司)粘面朝上,按照非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡的结构示意图(图1)将硝酸纤维素膜粘在PVC板中间位置,然后将荧光垫粘附于硝酸纤维素膜前,两者重叠2mm;再在荧光垫前、硝酸纤维素膜后分别将样品垫(上海金标生物科技有限公司)、吸水垫(上海金标生物科技有限公司)粘附在PVC底板上,样品垫、吸水垫分别和荧光垫、硝酸纤维素膜重叠2mm。最终切成宽度为3.5mm试纸条,外面压上塑料外壳,组装成试纸卡。

[0065] 塑料外壳由下壳体和上壳体组成;下壳体内侧设有若干试纸条的定位柱,上壳体设有正对样品垫的加样孔,及正对硝酸纤维素膜的可视窗。

[0066] 3. 荧光微球免疫试纸卡的使用方法

[0067] 将1滴(约30μL)待检样品滴加于试纸卡的加样孔,加入3滴样品稀释液(0.8%氯化钠,0.05%BSA,0.5%Tween-20),室温静置10min后,插入便携免疫荧光分析仪(FA1000,深圳市中科同辉科技有限公司)插口,通过收集及分析免疫荧光分析仪检测到的荧光信号,转换成检测值A:

[0068] 若检测值A>临界值B,则结果判定为阳性,表明样品中存在ASFV抗原;

[0069] 若检测值A≤临界值B,则结果判定为阴性,表明样品中无ASFV抗原。

[0070] 4. 荧光微球免疫试纸卡的检测临界值确定

[0071] 用制备的非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,按照上述方法,检测已确认非洲猪瘟病毒为阴性的血清样品150份,免疫荧光分析仪读取每个样品检测值(表1),计算非

洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡检测临界值,临界值=平均检测值+2SD(标准差)= $9.99+2\times 9.75=29.49$ 。

[0072] 表1阴性样品检测结果

样品编号	检测值	样品编号	检测值	样品编号	检测值
1	28.05	51	15.23	101	0
2	9.4	52	10.25	102	23.36
3	36.5	53	11.25	103	45.25
4	27.26	54	5	104	9.23
5	11.745	55	2.63	105	2.31
6	15.11	56	4.5	106	9.23
7	4.5	57	5.23	107	5.69
8	18.27	58	24.5	108	8.55
9	3.91	59	10.56	109	15.62
10	0.39	60	0	110	25.31
11	0	61	9.5	111	8.56
12	25	62	4.56	112	10.25
13	1.54	63	22.23	113	11.02
14	0	64	4.56	114	0.23
15	14.94	65	8.97	115	12.25
16	9.3	66	1.25	116	8.31
17	10.12	67	2.36	117	4.63
18	9	68	4.65	118	9.98
19	0	69	6.93	119	27.96
20	1.87	70	3.25	120	15.23
21	0	71	0.15	121	0
22	8.125	72	0	122	14.69
23	13.44	73	5.36	123	4.56
24	25.63	74	11.89	124	8.97
25	25.31	75	0.25	125	1.25
26	4.83	76	6.36	126	2.36
27	28.65	77	3.25	127	4.65
28	24.32	78	1.89	128	6.93
29	15.49	79	11.25	129	3.25
30	10.92	80	5.64	130	0.15
31	2.65	81	3.26	131	0
32	11.32	82	5.01	132	5.36

[0073]

[0074]	33	0	83	0	133	11.89
	34	0	84	2.31	134	0.25
	35	8.56	85	6.98	135	6.36
	36	36.25	86	8.79	136	3.25
	37	35.25	87	11.23	137	1.89
	38	9.26	88	13.25	138	11.25
	39	5.89	89	38.26	139	5.64
	40	6.25	90	12.25	140	3.26
	41	9.85	91	13.56	141	5.01
	42	11.63	92	0.125	142	0
	43	25.31	93	1.35	143	2.31
	44	16.92	94	11.52	144	6.98
	45	22.11	95	43.25	145	8.79
	46	15.23	96	11.25	146	11.23
	47	45.26	97	10.01	147	13.25
	48	7.85	98	9.89	148	5.63
	49	1.23	99	12.5	149	8.63
	50	3.62	100	11.02	150	1.25

[0075] 5. 荧光微球免疫试纸卡的灵敏度测定

[0076] 将大肠杆菌中表达、纯化的非洲猪瘟病毒p30重组蛋白用无菌PBS梯度稀释成4ng/mL、2ng/mL、1ng/mL、0.5ng/mL,用非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡进行检测,每个样品重复检验10次,以10次检测结果均为阳性的重组p30蛋白最大稀释度作为该检测卡的最低检出限,根据检测结果(表2)可知,该非洲猪瘟病毒荧光微球免疫试纸卡最低检测限为1ng/mL。

[0077] 表2非洲猪瘟病毒荧光微球免疫试纸卡灵敏度检测结果

[0078]

重组 p30 (4ng/ml)		重组 p30 (2ng/ml)		重组 p30 (1ng/ml)		重组 p30 (0.5ng/ml)	
测试次数	检测结果	测试次数	检测结果	测试次数	检测结果	测试次数	检测结果
1	+	1	+	1	+	1	-
2	+	2	+	2	+	2	-
3	+	3	+	3	+	3	+
4	+	4	+	4	+	4	-
5	+	5	+	5	+	5	-
6	+	6	+	6	+	6	-
7	+	7	+	7	+	7	+
8	+	8	+	8	+	8	-
9	+	9	+	9	+	9	+
10	+	10	+	10	+	10	-

[0079]

阳性检出率	10/10	阳性检出率	10/10	阳性检出率	10/10	阳性检出率	3/10
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------

[0080] 注：“+”表示检测结果为阳性，“-”表示检测结果为阴性。

[0081] 6. 荧光微球免疫试纸卡敏感性、特异性测定

[0082] 对收集的50份临床样品分别用非洲猪瘟病毒荧光PCR检测试剂盒进行检测、非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡进行检测,以非洲猪瘟病毒荧光PCR检测试剂盒检测结果作为标准,确定非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡对临床样品的检测敏感性、特异性以及总符合率。其中,对于液体样本,直接滴1滴待检液体于试纸卡的加样孔,再加入3滴样品稀释液,室温静置后,插入便携免疫荧光分析仪检测;对于组织样本,取0.1g组织脏器(肺脏、脾脏),加入1mL无菌0.01M PBS (pH7.6),磁珠充分研磨、匀浆后,10000rpm离心1min,取液体上清,参照液体样本进行检测。

[0083] 结果(表3)显示,该非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡,

[0084] 敏感性 = (阳性检出数/阳性数) × 100% = (22/25) × 100% = 88%,

[0085] 特异性 = (阴性检出数/阴性数) × 100% = (25/25) × 100% = 100%,

[0086] 总符合率 = (正确检出数/样品总数) × 100% = (47/50) × 100% = 94%。

[0087] 表3临床样品检测结果

[0088]

样品编号	样品类型	Real-time PCR 结果	免疫试纸卡结果	检测结果是否一致
1	血清	+	+	是
2	血清	+	+	是
3	血清	+	+	是
4	肺脏	+	+	是
5	血清	-	-	是
6	肺脏	+	+	是
7	脾脏	+	+	是
8	血清	+	+	是
9	血清	+	+	是
10	血清	-	-	是
11	血清	-	-	是
12	血清	+	+	是

[0089]

13	血清	+	+	是
14	血清	+	+	是
15	血清	+	+	是
16	血清	-	-	是
17	血清	+	+	是
18	血清	+	+	是
19	血清	+	+	是
20	血清	-	-	是
21	血清	-	-	是
22	脾脏	-	-	是
23	血清	-	-	是
24	血清	-	-	是
25	血清	+	-	否
26	血清	+	+	是
27	血清	-	-	是
28	血清	-	-	是
29	血清	+	-	否
30	血清	-	-	是
31	血清	-	-	是
32	血清	-	-	是
33	血清	-	-	是
34	全血	+	+	是
35	全血	-	-	是
36	全血	+	+	是
37	全血	-	-	是
38	全血	-	-	是
39	全血	+	-	否
40	全血	-	-	是
41	全血	-	-	是
42	全血	-	-	是
43	全血	-	-	是
44	全血	-	-	是
45	唾液	+	+	是
46	唾液	+	+	是
47	唾液	+	+	是
48	唾液	+	+	是
49	唾液	-	-	是
50	唾液	-	-	是

[0090] 注：“+”表示检测结果为阳性，“-”表示检测结果为阴性。

[0091] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和优点。本行业的技术人员应该

了解,上述实施例不以任何形式限制本发明,凡采用等同替换或等效变换的方式所获得的技术方案,均落在本发明的保护范围内。

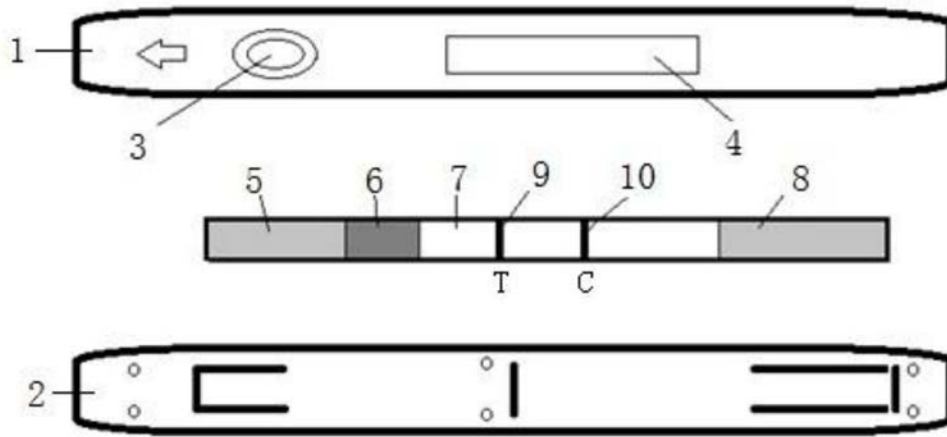


图1

专利名称(译)	一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡及制备方法和应用		
公开(公告)号	CN110196323A	公开(公告)日	2019-09-03
申请号	CN201910427204.6	申请日	2019-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	张鑫宇 党红军 熊新灿 孙怀昌		
发明人	张鑫宇 刘潇羽 党红军 熊新灿 孙怀昌		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/58 G01N33/533 G01N33/544		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/544 G01N33/56983 G01N33/582 G01N33/585 G01N2333/183		
代理人(译)	董建林		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测非洲猪瘟病毒抗原荧光微球免疫试纸卡，包括PVC底板，在PVC底板上按顺序依次固定有样品垫、荧光垫、硝酸纤维素膜、吸水垫；荧光垫内有荧光标记抗ASFV p30抗原的一个表位的单克隆抗体Mab1；硝酸纤维素膜表面划有检测线和质控线，检测线为针对ASFV p30抗原另一表位的单克隆抗体Mab2，质控线为羊抗小鼠IgG抗体。适用于发病猪外周血、血清、唾液、组织(肺脏、脾脏)研磨液内ASFV p30抗原的检测，在短时间内诊断出ASFV感染，特别适合现场ASFV感染诊断、流行病学调查和生猪国际贸易检验检疫；与免疫荧光分析仪协同使用直接显示结果，操作迅速简单、准确率高，具有很强的实用性。

样品编号	检测值	样品编号	检测值	样品编号	检测值
1	28.05	51	15.23	101	0
2	9.4	52	10.25	102	23.36
3	36.5	53	11.25	103	45.23
4	27.26	54	5	104	9.23
5	11.745	55	2.63	105	2.31
6	15.11	56	4.5	106	9.23
7	4.5	57	5.23	107	5.69
8	18.27	58	24.5	108	8.55
9	3.91	59	10.56	109	15.62
10	0.39	60	0	110	25.31
11	0	61	9.5	111	8.56
12	25	62	4.56	112	10.25
13	1.54	63	22.23	113	11.02
14	0	64	4.56	114	0.23
15	14.94	65	8.97	115	12.25
16	9.3	66	1.25	116	8.31
17	10.12	67	2.36	117	4.63
18	9	68	4.65	118	9.98
19	0	69	6.93	119	27.96
20	1.87	70	3.25	120	15.23
21	0	71	0.15	121	0
22	8.125	72	0	122	14.69
23	13.44	73	5.36	123	4.56
24	25.63	74	11.89	124	8.97
25	25.31	75	0.25	125	1.25
26	4.83	76	6.36	126	2.36
27	28.65	77	3.25	127	4.65
28	24.32	78	1.89	128	6.93
29	15.49	79	11.25	129	3.25
30	10.92	80	5.64	130	0.15
31	2.65	81	3.26	131	0
32	11.32	82	5.01	132	5.36