



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108152509 A

(43)申请公布日 2018.06.12

(21)申请号 201711297715.8

(22)申请日 2017.12.08

(71)申请人 广州源起健康科技有限公司

地址 510530 广东省广州市广州高新技术
产业开发区瑞泰路2号

(72)发明人 李根平

(74)专利代理机构 广州市深研专利事务所
44229

代理人 姜若天

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

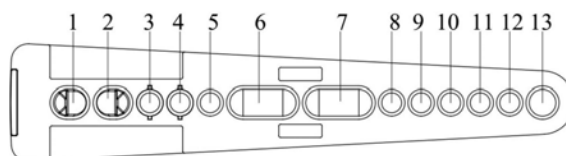
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光
免疫试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒,由猪瘟E2抗原免疫磁珠、荧光物质标记羊抗猪抗体、洗涤液、增强液、阴性对照血清和阳性对照血清组成。本发明所述的定量检测猪瘟病毒抗体磁微粒荧光免疫试剂盒与RT-PCR方法、ELISA方法相比,具有操作简便、适合不同数量样本检测且检测速度快(20min左右即可有结果);与胶体金免疫层析试纸条相比,本发明具有灵敏度更高、线性范围更宽,且可实现精确定量等优点。本试剂盒的检测结果能够准确反映接种疫苗过程中机体抗CSFV血清IgG抗体变化规律,为养猪户CSF防控提供科学合理的技术支持。



1. 一种定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒,其特征在于由猪瘟E2抗原免疫磁珠、荧光物质标记羊抗猪抗体、洗涤液、增强液、阴性对照血清和阳性对照血清组成。

2. 如权利要求1所述的磁微粒荧光免疫试剂盒,其特征在于,所述免疫磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 μ m的超顺磁珠与蛋白的共价偶联物,其中所使用的磁珠为羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠中的一种或几种;所述的E2抗原为PK-15猪肾细胞表达的。

3. 如权利要求1所述的磁微粒荧光免疫试剂盒,其特征在于,所述的荧光物质为镧系螯合物,为铈、钐、铽或镱的螯合物或其组合。

4. 如权利要求1所述的磁微粒荧光免疫试剂盒,其特征在于,所述猪瘟E2抗原的制备方法为:按照GenBank上公布的CSFV 弱毒株基因序列设计一对引物,用于扩增E2 基因;将扩增好的猪瘟病毒E2基因通过clonExpress技术连入真核表达载体pEGFP-C1载体,转化DH5 α 感受态细胞,在LB平板上挑取单克隆提取质粒,进行测序鉴定;将上述重组质粒pEGFP-E2通过DEAE-葡聚糖法转染猪肾上皮细胞PK-15;培养后,高压破碎细胞,将细胞上清进行亲和层析纯化并鉴定,获得猪瘟病毒E2蛋白。

5. 如权利要求1所述的磁微粒荧光免疫试剂盒,其特征在于,所述免疫磁珠的制备方法为:吸取羧基磁珠到离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠3~5次;向上述洗涤好的磁珠中加入0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和50mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺,室温震荡反应;将活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠;加入猪瘟E2蛋白,室温持续旋转孵育30~240分钟,反应时间取决于磁珠的配位基与浓度;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠;加入含有5%BSA 0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联猪瘟E2蛋白的活化羧基位点,反应30~60min;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入免疫磁珠保存液。

6. 如权利要求5所述的磁微粒荧光免疫试剂盒,其特征在于,所述的保存液为含5%BSA, 5%蔗糖,0.1%Tween-20,0.1%PEG20000,0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

7. 如权利要求3所述的磁微粒荧光免疫试剂盒,其特征在于,铈标抗体的制备方法为:将DTTA-Eu作为标记物,在0.05M pH8.0的碳酸盐缓冲液下,加入DTTA-Eu与羊抗猪二抗,混合后溶于0.05M pH8.0的碳酸盐缓冲液,室温震荡过夜;用葡聚糖凝胶柱过滤后收集峰管;将上述制备好的铈标二抗稀释,使羊抗猪抗体的终浓度为0.0060~0.0075g/L。

8. 如权利要求1所述的磁微粒荧光免疫试剂盒,其特征在于,所述洗涤液的配方为, 0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液。

9. 如权利要求1所述的磁微粒荧光免疫试剂盒,其特征在于,所述增强液的配方为0.1~0.2M醋酸,0.1~0.2M邻苯二甲酸氢钾,5~15 μ M β -NTA,30~50 μ M TOP0,0.5~2ml Triton X-100。

一种定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于动物疫病检测领域,具体的说是一种定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒。适用于检测猪血清或血浆中猪瘟病毒抗体的水平。

背景技术

[0002] 猪瘟(Classical swine fever,CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus,CSFV)引起猪的一种急性、发热性、接触性传染病,该病被我国定为一类动物疫病,被世界动物卫生组织列为A类传染病。该病传播速度快、流行广、发病率高和致死率高,对我国的养猪业产生的危害极大。目前我国猪瘟的防治措施以猪瘟兔化弱毒疫苗免疫为主,对疫苗免疫效果的评价主要通过猪瘟病毒抗体水平的检测实现。因此国内市场急需性能稳定、准确的CSFV血清抗体诊断试剂盒,监测群体免疫抗体水平和抗体消长规律。

[0003] 目前检测猪瘟病毒抗体的方法主要有:

[0004] (1)正向间接血凝实验被农业部推荐为猪瘟疫苗抗体检测的主要方法,但其灵敏度低,检测血清需灭活处理,增加了检测时间和难度,肉眼判读误差大,不适合基层兽医部门广泛使用。

[0005] (2)竞争ELISA法:虽然特异性强、准确度高,但操作过程繁琐、需要配备专业的技术人员。

[0006] (3)胶体金/荧光免疫层析法:虽然操作简单,检测时间短,但往往准确度不高,不能准确定量,检测范围窄。

[0007] (4)化学发光法:虽然灵敏度高、检测范围宽等优点,但需要专业的仪器设备和技术人员,不能实现样本的现场检测。

[0008] (5)RT-PCR:有检出率高、特异性高的优点,但是需要昂贵的仪器设备,检测时间较长(4~6h),操作不当容易出现假阳性和假阴性的结果。

[0009] 因此,开发出一种灵敏度高、操作简便、快速的诊断试剂尤为重要。

发明内容

[0010] 本发明的目的是为解决上述技术问题的不足,提供一种灵敏度高、操作简便、检测时间短、准确定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒。

[0011] 为实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0012] 一种定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒,由猪瘟E2抗原免疫磁珠、荧光物质标记羊抗猪抗体、洗涤液、增强液、阴性对照血清和阳性对照血清组成。

[0013] 在上述的磁微粒荧光免疫试剂盒中,所述免疫磁珠为带有官能团修饰的直径1~3 μm 的超顺磁珠与蛋白的共价偶联物,其中所使用的磁珠为羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白A磁珠、蛋白G磁珠、抗小鼠IgG磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠中的一种或几种;所述的E2抗原为PK-15猪肾细胞表达的。

[0014] 在上述的磁微粒荧光免疫试剂盒中,所述的荧光物质为镧系螯合物,为铕(Eu^{3+})、

钐(Sm^{3+})、铽(Tb^{3+})、镝(Dy^{3+})等稀土元素组成的螯合物或其组合。激发波长为290~350nm,发射波长为500~650nm。

[0015] 在上述的磁微粒荧光免疫试剂盒中,所述猪瘟E2抗原的制备方法为:按照GenBank上公布的CSFV弱毒株基因序列设计一对引物,用于扩增E2基因;将扩增好的猪瘟病毒E2基因通过clonExpress技术连入真核表达载体pEGFP-C1载体,转化DH5 α 感受态细胞,在LB平板上挑取单克隆提取质粒,进行测序鉴定;将上述重组质粒pEGFP-E2通过DEAE-葡聚糖法转染猪肾上皮细胞PK-15;培养后,高压破碎细胞,将细胞上清进行亲和层析纯化并鉴定,获得猪瘟病毒E2蛋白。

[0016] 在上述的磁微粒荧光免疫试剂盒中,所述免疫磁珠的制备方法为:吸取羧基磁珠到离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸洗涤磁珠3~5次;向上述洗涤好的磁珠中加入0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸,加入10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液和50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺,室温震荡反应;将活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠;加入猪瘟E2蛋白,室温持续旋转孵育30~240分钟,反应时间取决于磁珠的配位基与浓度;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠;加入含有5%BSA 0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联猪瘟E2蛋白的活化羧基位点,反应30~60min;上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入免疫磁珠保存液。所述的保存液为含5%BSA, 5%蔗糖,0.1%Tween-20,0.1%PEG20000,0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0017] 在上述的磁微粒荧光免疫试剂盒中,铕标抗体的制备方法为:将DTTA-Eu作为标记物,在0.05M pH8.0的碳酸盐缓冲液下,加入DTTA-Eu与羊抗猪二抗,混合后溶于0.05M pH8.0的碳酸盐缓冲液,室温震荡过夜;用葡聚糖凝胶柱过滤后收集峰管;将上述制备好的铕标二抗稀释,使羊抗猪抗体的终浓度为0.0060~0.0075g/L。

[0018] 所述的猪瘟抗原E2蛋白为哺乳动物系统表达出来的,该系统所表达的外源蛋白的空间构象和功能更接近天然蛋白,特异性和敏感性更好。

[0019] 本发明的定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒的检测原理为间接法,试剂条的反应孔中预装有猪瘟E2抗原免疫磁珠,测试时,先将待测样本(血清或血浆)加到试剂的反应孔中,经过室温孵育洗涤后再加入荧光物质标记的羊抗猪抗体。形成抗原-抗体-二抗复合物,加入增强液,在激发光的作用下,荧光物质发射一定波长的光信号,被免疫荧光检测仪识别,由于荧光信号强度与样本中猪瘟病毒抗体浓度成正比关系,当检测样本为阳性时,荧光值高于判定值;当检测样本为阴性时,荧光值低于判定值。

[0020] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0021] (1)已经建立的检测猪瘟抗体的试剂盒所采用的包被抗原,大多是原核系统表达,而E2是糖基化蛋白,原核表达产物无法进行糖基化等蛋白后修饰,与天然的E2蛋白无论构象和反应原性方面都区别较大。酵母和昆虫细胞表达系统存在不正确糖基化,产物复杂不易纯化等复杂问题。本试剂盒利用猪源性的PK-15猪肾细胞作为表达E2糖蛋白的外源蛋白表达系统,该系统对E2蛋白的后期加工可以使得该蛋白的反应原性和免疫原性得到极大的提高,比原核、酵母和昆虫表达系统更接近天然蛋白,特异性更好。

[0022] 研究表明,猪肾细胞表达的E2蛋白与完整CSFV抗原具有相似的结合猪瘟血清抗体功能,经试验证实与牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、绵羊边界病毒(BDV)、猪伪狂犬(PRV)、猪蓝

耳 (PRRSV)、猪细小病毒 (PPV) 阳性血清无交叉反应, 为 CSFV 血清抗体特异性抗原。

[0023] (2) 免疫磁珠是免疫学和磁载体技术相结合而发展起来的一类新型材料。磁珠表面包被特异性配基, 可与抗体/抗原特异性的结合, 形成磁珠-抗体/抗原复合物。免疫磁珠分离技术是将免疫学反应的高度特异性与磁珠特有的磁响应性相结合的一种新免疫学技术。免疫磁珠具有以下优点: ① 细小而均一的免疫磁珠与抗原/抗体的反应提供了较大的接触面积, 反应更充分, 更快速, 缩短了反应时间; ② 磁珠的磁性使其可以用磁力收集器方便快速地获得分离, 且对被分离物无损伤; ③ 检测复杂的生物样本时受颗粒性杂质等的影响较小; ④ 作为一种流动性的固相支持物, 其洗涤和反应都进行的更充分; ⑤ 由于磁珠与抗原/抗体为共价偶联, 克服了物理吸附的不稳定性, 因此免疫磁珠保存时间久且更稳定。

[0024] (3) 采用时间分辨荧光免疫分析技术, 采用镧系螯合物铕、铽、钐、镱作为标记物, 其具有较宽的激发光谱、较窄发射光谱, 有利于降低本底, 提高灵敏度; 紫外光激发具有较高量子产率、较大 Stokes 位移, 避免激发光谱和荧光发射光谱以及生物基质发射的光谱重合, 不受样本自然光的干扰; 荧光衰变时间长等优点, 比传统荧光物质检测范围更宽、特异性更好。

[0025] (4) 配套全自动检测仪器, 实现现场自动化操作, 可同时检测一份或多份样本, 操作简便快速 (20 分钟即可出结果)、价格低廉。

[0026] (5) 本发明所述的定量检测猪瘟病毒抗体磁微粒荧光免疫试剂盒与 RT-PCR 方法、ELISA 方法相比, 具有操作简便、适合不同数量样本检测且检测速度快 (20min 左右即可有结果); 与胶体金免疫层析试纸条相比, 本发明具有灵敏度更高、线性范围更宽, 且可实现精确定量等优点。本试剂盒的检测结果能够准确反映接种疫苗过程中机体抗 CSFV 血清 IgG 抗体变化规律, 为养猪户 CSF 防控提供科学合理的技术支持。

附图说明

[0027] 图1是本发明所述定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒所采用的试剂条的俯视结构示意图。

[0028] 图2是本发明所述定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒所采用的试剂条的结构示意图。

[0029] 1、测试孔1, 2、测试孔2, 3、标记物1, 4、标记物2, 6、洗液, 7、洗液, 8、样本稀释液1, 9、样本稀释液2, 12、增强液, 5、10、11、13均为预备孔。

具体实施方式

[0030] 本发明所述的免疫磁珠为带有官能团修饰的直径 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ 的超顺磁珠与蛋白的共价偶联物, 其中所使用的磁珠有羧基磁珠、氨基磁珠、羟基磁珠、甲苯磺酰基磁珠、NHS 磁珠、链酶亲和素磁珠、蛋白 A 磁珠、蛋白 G 磁珠、抗小鼠 IgG 磁珠、亲水磁珠、疏水磁珠等其中的一种或几种。

[0031] 本发明所述的 E2 蛋白为 PK-15 猪肾细胞表达的。

[0032] 本发明所述的荧光物质为镧系螯合物, 主要有铕 (Eu^{3+})、钐 (Sm^{3+})、铽 (Tb^{3+})、镱 (Dy^{3+}) 等稀土元素组成的螯合物及其组合。

[0033] 以下结合附图和具体实施例来详细说明本发明。

[0034] 实施例1制备方法:

[0035] 一种猪瘟病毒抗体检测试剂盒,包含:试剂条、阴性对照血清和阳性对照血清。

[0036] 所述的试剂条主要包被有猪瘟病毒抗原E2蛋白的免疫磁珠、钨标羊抗猪抗体、样本稀释液、洗液、增强液;

[0037] (1)猪瘟病毒抗原E2蛋白制备方法:

[0038] ①猪瘟病毒E2蛋白的扩增

[0039] 按照GenBank上公布的CSFV弱毒株基因序列(GenBank登录号为AF531433)设计一对引物,用于扩增E2基因。

[0040] 引物P1:5'-CGCGGATCCCGGCTAGCCTGC-3';P2:5'-CCGCTCGAG TTATAGTACCTGTTCT-3'。

[0041] ②重组质粒pEGFP-E2的构建

[0042] 将扩增好的猪瘟病毒E2基因通过clonExpress技术连入真核表达载体pEGFP-C1载体,转化DH5 α 感受态细胞,在LB平板上挑取单克隆提取质粒,进行测序鉴定。

[0043] ③重组质粒pEGFP-E2对PK-15细胞的转染

[0044] 将上述重组质粒pEGFP-E2通过DEAE-葡聚糖法转染猪肾上皮细胞PK-15。培养一段时间后,高压破碎细胞,将细胞上清进行亲和层析纯化并鉴定,获得猪瘟病毒E2蛋白。

[0045] (2)免疫磁珠的制备:

[0046] ①洗涤磁珠

[0047] 吸取1mg直径1 μ m羧基磁珠到1.5ml离心管中,将离心管放置在磁力架中,利用磁力架进行磁珠和缓冲液的分离,用1ml 0.1M pH5.0的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)洗涤磁珠3~5次。

[0048] ②磁珠活化

[0049] 向上述洗涤好的磁珠中加入1ml 0.1M pH5.0的MES,加入50 μ L 10mg/mL的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸溶液(EDC)和50 μ L 50mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温震荡反应0.5~1小时。

[0050] ③猪瘟E2蛋白与磁珠的偶联

[0051] 上述活化好的磁珠置于磁力架上,弃上清,收集活化好的磁珠。加入1~2mg猪瘟E2蛋白,室温持续旋转孵育30~240分钟,反应时间取决于磁珠的配位基与浓度。

[0052] ④封闭

[0053] 上述磁珠置于磁力架上,弃上清,收集免疫磁珠。加入含有5%BSA0.05M pH8.0的Tris-HCl缓冲液,重悬磁珠,封闭未偶联猪瘟E2蛋白的活化羧基位点,反应30~60min。

[0054] ⑤储存

[0055] 上述磁珠置于磁力架上,弃上清,加入100 μ L免疫磁珠保存液。

[0056] 所述的保存液为含5% (w/v) BSA,5% (w/v) 蔗糖,0.1% (v/v) Tween-20,0.1% (w/v) PEG20000,0.05M pH 8.0的Tris-HCl缓冲液。

[0057] 将上述制备好的免疫磁珠稀释,使猪瘟E2蛋白的终浓度为0.0025~0.0080g/L,100 μ L/孔分装至试剂条第1孔(测试孔1)中。

[0058] (3)钨标抗体的制备:将DTTA-Eu作为标记物,在0.05M pH8的碳酸盐缓冲液下,加入DTTA-Eu与羊抗猪二抗,混合后溶于300 μ L0.05M pH8的碳酸盐缓冲液,室温震荡过夜。用

葡聚糖凝胶柱过滤后收集峰管。将上述制备好的铕标二抗按一定比例稀释,使羊抗猪抗体的终浓度为0.0060~0.0075g/L,100 μ L/孔分装至试剂条第3孔(标记物1)中。

[0059] (4)所述的样本稀释液为0.01M pH7.4PBS,620 μ L/孔分装至试剂条第8孔(样本稀释液孔)中。

[0060] (5)所述洗涤液,为含有0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液。800 μ L/孔分装至试剂条第6孔(洗液孔)中。

[0061] (6)所述增强液为含有用5~15ml醋酸用0.1~0.2M邻苯二甲酸氢钾调节PH3.0~4.0,5~15 μ M β -NTA,30~50 μ M TOP0,0.5~2ml Triton X-100用超纯水定容至1L。200 μ L/孔分装至试剂条第12孔(增强液孔)中。

[0062] (7)阴性对照血清和阳性对照血清制备方法:

[0063] 制备CSFV抗体阴性血清:取未经疫苗免疫的健康仔猪血清,CSFV正向间接血凝抗体检测试剂盒(购自中国农业科学院兰州兽医研究所)测试血清抗体为阴性。

[0064] 制备CSFV抗体阳性血清:对1月龄仔猪肌肉免疫1毫升乳兔苗,1个月后加强免疫1次,加强免疫后2周静脉采血,分离血清,用CSFV正向间接血凝抗体检测试剂盒将血清抗体效价标定为1:512。

[0065] 实施例2本试剂盒使用方法:

[0066] ①加样

[0067] 将待测样本放入全自动荧光分析仪的装载系统,将试剂条插入试剂条卡槽,仪器自动识别封板膜的产品信息。20 μ L样本加入第8孔,稀释32倍,再取50 μ L稀释后的样本加入试剂条第1孔,然后加入荧光标记物100 μ L。

[0068] ②孵育

[0069] 加样完成后37 $^{\circ}$ C震荡孵育15min。

[0070] ③洗涤

[0071] 孵育完成后,仪器自动洗孔5次,每次洗液100 μ L/孔。

[0072] ④加入增强液

[0073] 洗涤完成后,加入增强液150 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C孵育3min。

[0074] ⑤检测

[0075] 试剂条被推入暗室,仪器自动检测并出结果。

[0076] 用来测试试剂条的全自动磁微粒荧光免疫分析仪包含样本装载系统、条码读取系统、加样系统、温育系统、荧光光源检测系统及自动软件分析控制系统。

[0077] 本发明所述的猪瘟病毒抗体磁微粒荧光免疫试剂盒,检测样本时只需将试剂条插入全自动仪器中,仪器自动完成加样、孵育、磁分离、检测过程,全程只需要20min即可以读取检测报告。

[0078] 本发明试剂盒的阴阳性判定标准为:血清不稀释,检测猪瘟阴性血清100例,统计荧光值均值和标准差,根据统计学原理,阴性血清荧光值均值+3 $\times$ 标准差时,可以在99.9%的水准判定为阳性,因而设定阴阳性临界值等于阴性血清荧光值均值+3 $\times$ 标准差,求得阴阳性临界值为20022,在规定实验条件下,待检血清样本>20022,判为阳性;反之为阴性。

[0079] 实施例3本试剂盒的特异性实验

[0080] 特异性实验用定量检测猪瘟病毒抗体磁微粒荧光免疫试剂盒检测猪瘟病毒

(CSFV)、牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)、绵羊边界病毒 (BDV)、猪伪狂犬 (PRV)、猪蓝耳 (PRRSV)、猪细小病毒 (PPV) 等标准阳性血清和猪瘟阴性血清,除猪瘟病毒标准血清为95840,其余血清的荧光值均小于20022,符合阴性血清判定标准,表明这种方法特异性良好,而且与BVDV、BDV阳性血清不存在交叉反应,检测结果见表1。

[0081] 表1特异性实验

[0082]

病毒种类	CSFV	BVDV	BDV	PRV	PRRSV	SIV	阴性血清
荧光值	95840	9004	10528	3056	5841	3267	10205

[0083] 实施例4与美国IDEXX猪瘟抗体检测试剂盒检测结果符合率比较

[0084] 本方法对80例临床血清的检测结果与IDEXX猪瘟抗体检测试剂盒进行比较,阳性符合率95%,阴性符合率93%,二者的总符合率为95%。检测结果见下表2。

[0085] 表2本试剂盒与IDEXX试剂盒比对结果

IDEXX 本试剂盒	阳性	阴性	合计	符合率
	阳性	阴性	合计	符合率
阳性	63	1	64	95%
阴性	3	13	16	93%
合计	66	14	80	95%

[0087] 实施例5本试剂盒的灵敏度实验

[0088] 本试剂盒与IDEXX公司的抗体检测试剂盒同时检测不同稀释倍数的猪瘟抗体阳性血清。在血清稀释512倍时本试剂盒与IDEXX试剂盒均为阳性,血清稀释1024倍时均为阴性,说明本试剂盒与IDEXX公司的试剂盒灵敏度相当。结果见表3。

[0089] 表3本试剂盒与IDEXX试剂盒灵敏度比对结果

血清编号 稀释倍数	1	1	2	2
	(本试剂盒)	(IDEXX)	(本试剂盒)	(IDEXX)
1:32	200568	82%	211589	82%
1:64	111427	80%	111363	75%
1:128	61904	72%	58612	69%
1:256	34391	69%	30848	60%
1:512	23106	48%	26503	45%
1: 1024	10614	31%	8545	28%
1:2048	5897	8%	4498	10%

[0091] 注:IDEXX试剂盒阻断率 $\geq 40\%$ 为CSFV抗体阳性,阻断率 $\leq 30\%$ 为阴性,阻断率在30%-40%之间为可疑。

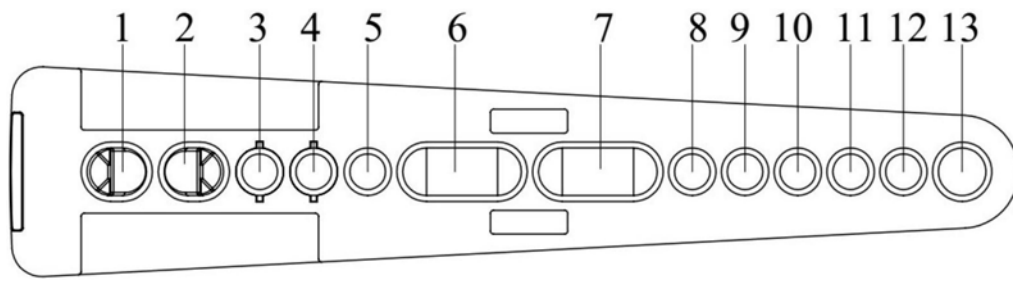


图1

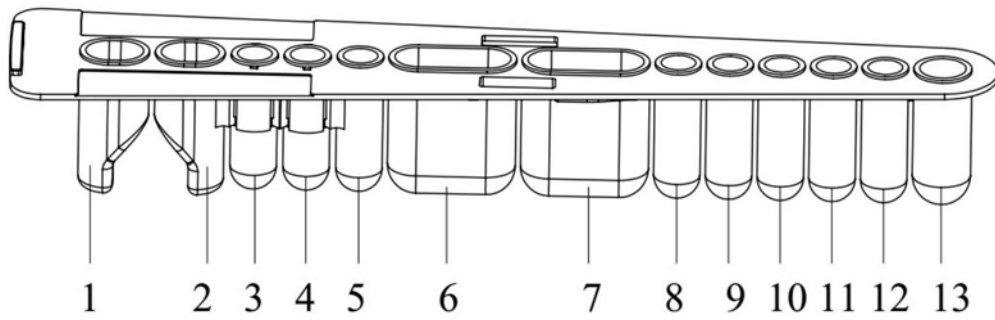


图2

专利名称(译)	一种定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN108152509A	公开(公告)日	2018-06-12
申请号	CN2017111297715.8	申请日	2017-12-08
[标]发明人	李根平		
发明人	李根平		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6857 G01N33/531 G01N33/5432		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测猪瘟病毒抗体的磁微粒荧光免疫试剂盒，由猪瘟E2抗原免疫磁珠、荧光物质标记羊抗猪抗体、洗涤液、增强液、阴性对照血清和阳性对照血清组成。本发明所述的定量检测猪瘟病毒抗体磁微粒荧光免疫试剂盒与RT-PCR方法、ELISA方法相比，具有操作简便、适合不同数量样本检测且检测速度快(20min左右即可有结果)；与胶体金免疫层析试纸条相比，本发明具有灵敏度更高、线性范围更宽，且可实现精确定量等优点。本试剂盒的检测结果能够准确反映接种疫苗过程中机体抗CSFV血清IgG抗体变化规律，为养猪户CSF防控提供科学合理的技术支持。

