



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101799470 A

(43) 申请公布日 2010.08.11

(21) 申请号 200910071636.4

(22) 申请日 2009.03.26

(71) 申请人 张晓艳

地址 150070 黑龙江省哈尔滨市哈尔滨开发  
区迎宾路集中区综合楼 205 室

(72) 发明人 张晓艳

(74) 专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务所有  
限责任公司 23101

代理人 崔东辉

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 9 页

(54) 发明名称

布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测  
试剂盒

(57) 摘要

本发明的目的在于提供一种价格适中,反应时间短,与我国实际检测普查工作需求密切结合的布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒。它是利用平滑型布氏杆菌与粗糙型布氏杆菌的纯化脂多糖混合物作抗原包被酶标板,用 S1119.3 免疫健康牛制备阳性对照血清、标准弱阳性血清,用健康非免疫牛血清作阴性对照血清,以酶标记的与哺乳动物 Fc 段结合的受体—蛋白质 AG 作酶标记结合物,配以血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、终止液,组装组成。本发明建立适合布鲁氏菌病诊断和流行病学调查的快速、敏感、特异、准确的方法;结果判定客观、操作简便,既适合大规模筛选试验,又能用于布鲁氏菌病的最后的确诊诊断。

1. 一种布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒,其特征在于:它是利用平滑型布氏杆菌与粗糙型布氏杆菌的纯化脂多糖混合物作抗原包被酶标板,用 S1119.3 免疫健康牛制备阳性对照血清、标准弱阳性血清,用健康非免疫牛血清作阴性对照血清,以酶标记的与哺乳动物 Fc 段结合的受体—蛋白质 AG 作酶标记结合物,配以血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、 $H_2O_2$ 、终止液,组装组成。

2. 根据权利要求 1 所述的一种布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒,其特征在于所述的抗原包被酶标板制备方法如下:

(1) 菌种

制作抗原用菌种分别为 B. abortus S1119.3 和 B. abortus RB51 ;B. abortus S1119.3 株在马铃薯浸液琼脂上,37℃经 48 小时孵育始能长出透明的、无色或浅黄色、边缘光滑的菌落,菌落直径 1-2mm ;B. abortus RB51 株在马铃薯浸液琼脂上,37℃经 48 小时孵育始能长出透明度低、边缘粗糙、表面干燥的菌落,在折射光下呈暗白或黄色,菌落直径 1-2mm ;

(2) 抗原

一级种子制备及鉴定:将冻干 B. abortus S1119.3 株和 B. abortusRB51 株用等量灭菌生理盐水溶解,分别接种马铃薯浸液琼脂斜面,在 37℃培养 48 小时;观察菌落形态,分别选取光滑型和粗糙型培养特性的菌落,移植于含有 5%小牛血清和 0.1%酵母浸液的马铃薯浸液琼脂扁瓶,接种面向下于 37℃温箱培养 72 小时,用 0.5%苯酚生理盐水收获细菌培养物,进行生物纯度检验,合格的作为一级种子,置 -20℃保存;

二级种子繁殖:

取两种菌株一级种子分别接种于马铃薯浸液琼脂 37℃培养 72 小时,收获细菌培养物;分别进行形态和生化特性、培养特性、血清学特性、变异检查、纯净检验等检验;符合要求的菌种,置 2℃~8℃保存;

(3) 抗原制备

菌悬液制备:

分别将鉴定合格的 B. abortus S1119.3 株和 B. abortus RB51 株二级种子接种于含有 5%小牛血清和 0.1%酵母浸液的马铃薯浸液琼脂的扁瓶中,37℃培养 72 小时;经变异检查,将有杂菌污染或生长不典型的扁瓶弃去;吸弃扁瓶中凝集水,每瓶加入含有 0.5%苯酚的生理盐水 20ml,洗下培养物,收集于高压灭菌好的玻璃瓶中;将收集好的菌悬液加热到 80℃,维持 90 分钟;存于 4℃;对灭活菌液应进行活性检验,37℃温育 10 天后不应有细菌生长;

(4) 抗原提取

分别将两种灭活菌液以 3000g 离心 75 分钟,收集沉淀;将 50g 湿重细菌加入 170ml 双蒸水,加热到 66℃,然后加入 66℃的 90%苯酚溶液;66℃持续搅拌 15 分钟,于 4℃以 10,000g 离心 15 分钟;用一长管吸弃下层棕红色的酚相,必要时,用 Whatman 1 号滤纸过滤去除大菌体碎片;然后加入 500ml 含有 1%饱和醋酸钠的冷甲醇,4℃孵育 2 小时,10000g 离心 10 分钟,弃上清,将沉淀用 80ml 双蒸水重悬,18 小时后,4℃ 10,000g 离心 10 分钟;上清液于 4℃保存;将沉淀悬浮于 80ml 灭菌蒸馏水,于 4℃再搅拌 2 小时;依上法离心获上清液,并与前述上清液混合;随后,在上清液中加入 8g 三氯乙酸,室温搅拌 15 分钟后,按 10,000g 离心 15 分钟,弃去沉淀,上清液以蒸馏水透析过夜,换液 2 次(每一次至少 4000 毫升),然后将

透析袋内容物 - 粗抗原冻干 ;

(5) 抗原包被板

抗原包被板的制备 :

包被无菌条件下,将两种纯化的冻干抗原用蒸馏水悬浮到冻干前的体积,按 1 : 5 的比例混合光滑型与粗糙型抗原,再用 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液按 1 : 1000 稀释,以 100  $\mu$  l/孔,包被聚苯乙烯 96 孔板 (NUNC620 或同等材料),加盖于 4 $^{\circ}$ C 温孵 18 小时 ;

洗涤 以 0.01mol/l pH 值为 7.2 的 PBST (见 5 洗涤液) 作洗涤液,加入足量室温作用 3 分钟后甩去,如上重复 3 次,或用洗板机重复洗 3 次,拍干至无水印为止 ;

封闭 用含 0.1% 牛血清白蛋白的 0.01mol/l pH 值为 6.3 的 PBST (见 4 血清稀释液) 按 100u1/孔,加入至酶标板中,37 $^{\circ}$ C 作用 1 小时,甩去,加入足量洗涤液,室温作用 3 分钟后甩去,如上重复 3 次,或用洗板机重复洗 3 次,拍干至无水印为止,自然干燥。

3. 根据权利要求 1 所述的一种布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒,其特征在于所述的阳性对照血清、弱阳性血清制备方法如下 :

(1) 阳性对照血清的制备 :

制造用动物 制备阳性对照血清的牛需要经过实验室检测,必须是 18 月龄性成熟、健康牛,无小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌、大肠杆菌 0 :157 感染、以及无繁殖系统感染等抗体阴性的健康牛,观察一周 ;

免疫原制备将布氏杆菌 S1119.3 接种马铃薯浸液琼脂扁瓶,置 37 $^{\circ}$ C 培养 48 小时,待形成一层菌落时,选取纯净扁瓶,吸弃凝集水,用含 0.5% 苯酚的灭菌生理盐水将菌苔洗下,倾入中性玻璃瓶中,加甲醛溶液至终浓度为 0.2%,置 37 $^{\circ}$ C 振荡灭活 48 小时,经无菌检验按中国兽药典进行合格,于 4 $^{\circ}$ C 以 20000 转 / 分钟离心 10 分钟,取沉淀,用生理盐水做 10 倍稀释,用作免疫原,于 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用 ;

免疫程序 用免疫原按 5ml/ 点分 4 点肌肉注射,免疫动物,14 日后,同法免疫一次,再 14 日后采血,分离血清,用 ELISA 检测 ;血清 OD<sub>450nm</sub> 和阴性血清 OD<sub>450nm</sub> 的比值 (P/N) > 1 方可大量采血 ;如检验不合格,应再加强免疫一次 ;

血清制造

强阳性血清制造 :以常规方法采血,分离其血清,将其作为待检血清,用血清稀释液作 1 : 2,1 : 4.....1 : 126 稀释,用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验,取待检血清 OD<sub>450nm</sub> / 质控强阳性血清 OD<sub>450nm</sub> 值 = 1 时的待检血清稀释度作为血清稀释倍数,用血清稀释液对血清进行稀释 ;

弱阳性血清制造 :将强阳性血清用血清稀释液作 1 : 1.5 稀释 ;除菌与分装将血清用 0.45  $\mu$  m 的滤器进行抽滤除菌,无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐,然后无菌条件下定量分装、冻干 ;

所述的阴性对照血清的制备方法如下 :

制造用动物 :同阳性对照血清制造用动物,观察一周 ;

血清制造 :以常规方法采血,分离其血清 ;

血清处理与分装 :将血清用 0.45  $\mu$  m 的滤器进行抽滤除菌,无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐,然后无菌条件下定量分装,贴上标签。

4. 根据权利要求 1 所述的一种布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒,其

特征在于所述的酶标记的与哺乳类动物 Fc 段结合的受体 -- 蛋白质 AG 的制备方法如下：

用 pH7.2, PBS 溶液作为酶结合物稀释液, 按 0.5mg/ml 稀释酶标记结合物, 过滤除菌 ; 将酶标结合物用 0.45  $\mu$ m 的滤器进行抽滤除菌, 无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐 ; 分装冻干, 无菌条件下按 0.2ml/ 瓶分装酶标结合物。

## 布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒

### (一) 技术领域

[0001] 本发明涉及医学生物制品技术,具体说就是布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒。

### (二) 背景技术

[0002] 免疫学检测方法是应用免疫学理论设计的一系列测定抗原、抗体、免疫细胞及其分泌的细胞因子的实验方法。随着学科间的相互渗透,免疫学涉及的范围不断扩大,新的免疫学检测方法层出不穷。免疫学方法的应用范围亦在日益扩大,不仅成为多种临床疾病诊断的重要方法,也为众多学科的研究提供了方便。

[0003] 抗原与相应抗体相遇可发生特异性结合,并在外界条件的影响下呈现某种反应现象,如凝集或沉淀,藉此可用已知抗原(或抗体)检测未知抗体(或抗原)。试验所采用的抗体常存在于血清中,因此又称之为血清学反应(serological reaction)。

[0004] 抗原种类繁多,按其物理性状可分颗粒性和可溶性两类。前者指细胞性抗原(包括细菌抗原),其制备较为简便,一般用新鲜细胞以无菌生理盐水或磷酸缓冲液洗涤后配成一定浓度。若系细菌抗原,则取新鲜培养物,经集菌作如下处理,H抗原因不耐热用0.3%~0.5%甲醛处理,0抗原耐热可加热100℃ 2h去除H抗原后应用。可溶性抗原可以是细胞膜、细胞浆、细胞核及核膜等细胞组成部分,也可能是经细胞分泌至体液中的一些可溶性因子。细胞组成部分常需经过机械或酶解法等破碎、离心获得粗制抗原,并通过选择性沉淀或层析等方法进一步纯化。而体液中(如血清等)的可溶性抗原则可直接用生化手段获得所需成分。有些可溶性抗原仅具有免疫反应性,而无免疫原性,此类抗原尚需与载体偶联方可成为完全抗原。

[0005] 布鲁氏菌病(Brucellosis)又称地中海弛张热,马尔他热,波浪热或波状热,是由布鲁氏菌引起的人畜共患性全身传染病,其临床特点为长期发热、多汗、关节痛及肝脾肿大等。1886年英国军医Bruce在马尔他岛从死于“马尔他热”的士兵脾脏中分离出“布鲁氏菌”,首次明确了该病的病原体。1897年Wright与其同事发现病人血清与布鲁氏菌的培养物可发生凝集反应,称为Wright凝集反应,从而建立了迄今仍用的血清学诊断方法。我国古代医籍中对本病虽有描述,但直到1905年Boone于重庆对本病作正式报道。目前该病在世界分布,只有几个国家消灭此病,而在中国的东北,华北,西北一带有流行和分布,其它地区有散发,且日益广泛和危害严重。对畜牧业和人类来严重经济损失。

[0006] 布鲁氏菌是一类革兰阴性的短小杆菌,内毒素是重要的致病物质。布鲁氏菌有强侵袭力,细菌可通过完整皮肤和粘膜进入宿主。布鲁氏菌有6个生物型,我国流行的是羊布鲁氏菌,牛布鲁氏菌和猪布鲁氏菌三种,其中以羊布鲁氏菌最常见。自然情况下,有60多种动物可感染布鲁氏菌,其主要是山羊,绵羊,牛和猪,以流产为主,孕期动物最为宜感。人类对布鲁氏菌易感,细菌进入人体后,迁延不愈,反复发作,发热呈波浪式,如不治疗,后果严重。

[0007] 根据临床症状、流行病学特点和特征性病变,不难做出布鲁氏菌病的初步诊断,但

由于在临床上小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌、大肠杆菌 0:157 感染存在相似的症状,必须借助实验室诊断技术才能对布鲁氏菌病进行最后确诊。为了建立适合本病诊断和流行病学调查的快速、敏感、特异、准确的方法,国内外许多学者进行了大量研究,并取得了显著的成绩。先后建立了病原鉴定、荧光抗体中和检等检测方法。我国目前应用虎红和试管凝集的方法,它们的敏感性及特异性差,是国际贸易淘汰的技术,且反应时间较长,与我国实际检测普查工作需求存在一定的矛盾。

### (三) 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种价格适中,反应时间短,与我国实际检测普查工作需求密切结合的布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒。

[0009] 本发明的目的是这样实现的:它是利用平滑型布氏杆菌与粗糙型布氏杆菌的纯化脂多糖混合物作抗原包被酶标板,用 S1119.3 免疫健康牛制备阳性对照血清、标准弱阳性血清,用健康非免疫牛血清作阴性对照血清,以酶标记的与哺乳动物 Fc 段结合的受体—蛋白质 AG 作酶标记结合物,配以血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、 $H_2O_2$ 、终止液,组装组成。

[0010] 本发明还有以下技术特征:

[0011] 所述的抗原包被酶标板制备方法如下:

[0012] (1) 菌种

[0013] 制作抗原用菌种分别为 *B. abortus* S1119.3 和 *B. abortus* RB51 ;*B. abortus* S1119.3 株在马铃薯浸液琼脂上,37℃ 经 48 小时孵育始能长出透明的、无色或浅黄色、边缘光滑的菌落,菌落直径 1-2mm ;*B. abortus* RB51 株在马铃薯浸液琼脂上,37℃ 经 48 小时孵育始能长出透明度低、边缘粗糙、表面干燥的菌落,在折射光下呈暗白或黄色,菌落直径 1-2mm ;

[0014] (2) 抗原

[0015] 一级种子制备及鉴定:将冻干 *B. abortus* S1119.3 株和 *B. abortus* RB51 株用等量灭菌生理盐水溶解,分别接种马铃薯浸液琼脂斜面,在 37℃ 培养 48 小时;观察菌落形态,分别选取光滑型和粗糙型培养特性的菌落,移植于含有 5% 小牛血清和 0.1% 酵母浸液的马铃薯浸液琼脂扁瓶,接种面向下于 37℃ 温箱培养 72 小时,用 0.5% 苯酚生理盐水收获细菌培养物,进行生物纯度检验,合格的作为一级种子,置 -20℃ 保存;

[0016] 二级种子繁殖:

[0017] 取两种菌株一级种子分别接种于马铃薯浸液琼脂 37℃ 培养 72 小时,收获细菌培养物;分别进行形态和生化特性、培养特性、血清学特性、变异检查、纯净检验等检验;符合要求的菌种,置 2℃~8℃ 保存;

[0018] (3) 抗原制备

[0019] 菌悬液制备:

[0020] 分别将鉴定合格的 *B. abortus* S1119.3 株和 *B. abortus* RB51 株二级种子接种于含有 5% 小牛血清和 0.1% 酵母浸液的马铃薯浸液琼脂的扁瓶中,37℃ 培养 72 小时;经变异检查,将有杂菌污染或生长不典型的扁瓶弃去;吸弃扁瓶中凝集水,每瓶加入含有 0.5% 苯酚的生理盐水 20ml,洗下培养物,收集于高压灭菌好的玻璃瓶中;将收集好的菌悬液加热到

80℃,维持 90 分钟;存于 4℃;对灭活菌液应进行活性检验,37℃温育 10 天后不应有细菌生长;

[0021] (4) 抗原提取

[0022] 分别将两种灭活菌液以 3000g 离心 75 分钟,收集沉淀;将 50g 湿重细菌加入 170ml 双蒸水,加热到 66℃,然后加入 66℃ 的 90% 苯酚溶液;66℃ 持续搅拌 15 分钟,于 4℃ 以 10,000g 离心 15 分钟;用一长管吸弃下层棕红色的酚相,必要时,用 Whatman 1 号滤纸过滤去除大菌体碎片;然后加入 500ml 含有 1% 饱和醋酸钠的冷甲醇,4℃ 孵育 2 小时,10000g 离心 10 分钟,弃上清,将沉淀用 80ml 双蒸水重悬,18 小时后,4℃ 10,000g 离心 10 分钟;上清液于 4℃ 保存;将沉淀悬浮于 80ml 灭菌蒸馏水,于 4℃ 再搅拌 2 小时;依上法离心获上清液,并与前述上清液混合;随后,在上清液中加入 8g 三氯乙酸,室温搅拌 15 分钟后,按 10,000g 离心 15 分钟,弃去沉淀,上清液以蒸馏水透析过夜,换液 2 次(每一次至少 4000 毫升),然后将透析袋内容物-粗抗原冻干;

[0023] (5) 抗原包被板

[0024] 抗原包被板的制备:

[0025] 包被无菌条件下,将两种纯化的冻干抗原用蒸馏水悬浮到冻干前的体积,按 1:5 的比例混合光滑型与粗糙型抗原,再用 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液按 1:1000 稀释,以 100  $\mu$ l/孔,包被聚苯乙烯 96 孔板(NUNC620 或同等材料),加盖于 4℃ 温孵 18 小时;

[0026] 洗涤以 0.01mol/l pH 值为 7.2 的 PBST(见 5 洗涤液)作洗涤液,加入足量室温作用 3 分钟后甩去,如上重复 3 次,或用洗板机重复洗 3 次,拍干至无水印为止;

[0027] 封闭用含 0.1% 牛血清白蛋白的 0.01mol/l pH 值为 6.3 的 PBST(见 4 血清稀释液)按 100 $\mu$ l/孔,加入至酶标板中,37℃ 作用 1 小时,甩去,加入足量洗涤液,室温作用 3 分钟后甩去,如上重复 3 次,或用洗板机重复洗 3 次,拍干至无水印为止,自然干燥。

[0028] 所述的阳性对照血清、弱阳性血清制备方法如下:

[0029] (1) 阳性对照血清的制备:

[0030] 制造用动物制备阳性对照血清的牛需要经过实验室检测,必须是 18 月龄性成熟、健康牛,无小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌、大肠杆菌 0:157 感染、以及无繁殖系统感染等抗体阴性的健康牛。观察一周;

[0031] 免疫原制备将布氏杆菌 S1119.3 接种马铃薯浸液琼脂扁瓶,置 37℃ 培养 48 小时,待形成一层菌落时,选取纯净扁瓶,吸弃凝集水,用含 0.5% 苯酚的灭菌生理盐水将菌苔洗下,倾入中性玻璃瓶中,加甲醛溶液至终浓度为 0.2%,置 37℃ 振荡灭活 48 小时,经无菌检验按中国兽药典进行合格,于 4℃ 以 20000 转/分钟离心 10 分钟,取沉淀,用生理盐水做 10 倍稀释,用作免疫原。于 2℃~8℃ 冰箱保存备用;

[0032] 免疫程序用免疫原按 5ml/点分 4 点肌肉注射,免疫动物,14 日后,同法免疫一次,再 14 日后采血,分离血清,用 ELISA 检测。血清 OD<sub>450nm</sub> 和阴性血清 OD<sub>450nm</sub> 的比值 (P/N) > 1 方可大量采血。如检验不合格,应再加强免疫一次;

[0033] 血清制造

[0034] 强阳性血清制造:以常规方法采血,分离其血清,将其作为待检血清,用血清稀释液作 1:2,1:4,.....1:126 稀释,用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验,取待检血清 OD<sub>450nm</sub>/质控强阳性血清 OD<sub>450nm</sub> 值 = 1 时的待检血清稀释度作为血清稀释倍数,用血清

稀释液对血清进行稀释；

[0035] 弱阳性血清制造：将强阳性血清用血清稀释液作 1 : 1.5 稀释；除菌与分装将血清用 0.45  $\mu$ m 的滤器进行抽滤除菌，无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐，然后无菌条件下定量分装、冻干。

[0036] 所述的阴性对照血清的制备方法如下：

[0037] 制造用动物：同阳性对照血清制造用动物，观察一周；

[0038] 血清制造：以常规方法采血，分离其血清；

[0039] 血清处理与分装：将血清用 0.45  $\mu$ m 的滤器进行抽滤除菌，无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐，然后无菌条件下定量分装，贴上标签。

[0040] 所述的酶标记的与哺乳类动物 Fc 结合的受体——蛋白质 AG 的制备方法如下：用 pH7.2, PBS 溶液作为酶结合物稀释液，按 0.5mg/ml 稀释酶标记结合物。过滤除菌。将酶标记结合物用 0.45  $\mu$ m 的滤器进行抽滤除菌，无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐。分装冻干无菌条件下按 0.2ml/ 瓶分装酶标结合物。

[0041] 本发明布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒，建立适合布鲁氏菌病诊断和流行病学调查的快速、敏感、特异、准确的方法，结果判定客观、操作简便，既适合大规模筛选试验，又能用于布鲁氏菌病的最后确诊诊断。

#### (四) 具体实施方式

[0042] 下面对本发明作进一步说明。

[0043] 实施例 1, 本发明布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒，它是利用平滑型布氏杆菌与粗糙型布氏杆菌的纯化脂多糖混合物作抗原包被酶标板，用 S1119.3 免疫健康牛制备阳性对照血清、标准弱阳性血清，用健康非免疫牛血清作阴性对照血清，以酶标记的与哺乳动物 Fc 段结合的受体——蛋白质 AG 作酶标记结合物，配以血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、终止液，组装组成。

[0044] 所述的抗原包被酶标板制备方法如下：

[0045] (1) 菌种制作抗原用菌种分别为 *B. abortus* S1119.3 和 *B. abortus* RB51；*B. abortus* S1119.3 株在马铃薯浸液琼脂上，37℃ 经 48 小时孵育始能长出透明的、无色或浅黄色、边缘光滑的菌落，菌落直径 1-2mm；*B. abortus* RB51 株在马铃薯浸液琼脂上，37℃ 经 48 小时孵育始能长出透明度低、边缘粗糙、表面干燥的菌落，在折射光下呈暗白或黄色，菌落直径 1-2mm；

[0046] (2) 抗原一级种子制备及鉴定：将冻干 *B. abortus* S1119.3 株和 *B. abortus* RB51 株用等量灭菌生理盐水溶解，分别接种马铃薯浸液琼脂斜面，在 37℃ 培养 48 小时；观察菌落形态，分别选取光滑型和粗糙型培养特性的菌落，移植于含有 5% 小牛血清和 0.1% 酵母浸液的马铃薯浸液琼脂扁瓶，接种面向下于 37℃ 温箱培养 72 小时，用 0.5% 苯酚生理盐水收获细菌培养物，进行生物纯度检验，合格的作为一级种子，置 -20℃ 保存；

[0047] 二级种子繁殖：

[0048] 取两种菌株一级种子分别接种于马铃薯浸液琼脂 37℃ 培养 72 小时，收获细菌培养物；分别进行形态和生化特性、培养特性、血清学特性、变异检查、纯净检验等检验；符合要求的菌种，置 2℃~8℃ 保存；

**[0049] (3) 抗原制备**

**[0050]** 菌悬液制备:分别将鉴定合格的 *B. abortus* S1119.3 株和 *B. abortus* RB51 株二级种子接种于含有 5% 小牛血清和 0.1% 酵母浸液的马铃薯浸液琼脂的扁瓶中, 37°C 培养 72 小时; 经变异检查, 将有杂菌污染或生长不典型的扁瓶弃去; 吸弃扁瓶中凝集水, 每瓶加入含有 0.5% 苯酚的生理盐水 20ml, 洗下培养物, 收集于高压灭菌好的玻璃瓶中; 将收集好的菌悬液加热到 80°C, 维持 90 分钟; 存于 4°C; 对灭活菌液应进行活性检验, 37°C 温育 10 天后不应有细菌生长;

**[0051]** (4) 抗原提取分别将两种灭活菌液以 3000g 离心 75 分钟, 收集沉淀; 将 50g 湿重细菌加入 170ml 双蒸水, 加热到 66°C, 然后加入 66°C 的 90% 苯酚溶液; 66°C 持续搅拌 15 分钟, 于 4°C 以 10,000g 离心 15 分钟; 用一长管吸弃下层棕红色的酚相, 必要时, 用 Whatman 1 号滤纸过滤去除大菌体碎片; 然后加入 500ml 含有 1% 饱和醋酸钠的冷甲醇, 4°C 孵育 2 小时, 10000g 离心 10 分钟, 弃上清, 将沉淀用 80ml 双蒸水重悬, 18 小时后, 4°C 10,000g 离心 10 分钟; 上清液于 4°C 保存; 将沉淀悬浮于 80ml 灭菌蒸馏水, 于 4°C 再搅拌 2 小时; 依上法离心获上清液, 并与前述上清液混合; 随后, 在上清液中加入 8g 三氯乙酸, 室温搅拌 15 分钟后, 按 10,000g 离心 15 分钟, 弃去沉淀, 上清液以蒸馏水透析过夜, 换液 2 次 (每一次至少 4000 毫升), 然后将透析袋内容物 - 粗抗原冻干;

**[0052] (5) 抗原包被板**

**[0053]** 抗原包被板的制备: 包被无菌条件下, 将两种纯化的冻干抗原用蒸馏水悬浮到冻干前的体积, 按 1 : 5 的比例混合光滑型与粗糙型抗原, 再用 0.05M pH9.6 的碳酸缓冲液按 1 : 1000 稀释, 以 100  $\mu$  l / 孔, 包被聚苯乙烯 96 孔板 (NUNC620 或同等材料), 加盖于 4°C 温孵 18 小时;

**[0054]** 洗涤以 0.01mol/l pH 值为 7.2 的 PBST (见 5 洗涤液) 作洗涤液, 加入足量室温作用 3 分钟后甩去, 如上重复 3 次, 或用洗板机重复洗 3 次, 拍干至无水印为止;

**[0055]** 封闭用含 0.1% 牛血清白蛋白的 0.01mol/l pH 值为 6.3 的 PBST (见 4 血清稀释液) 按 100  $\mu$  l / 孔, 加入至酶标板中, 37°C 作用 1 小时, 甩去, 加入足量洗涤液, 室温作用 3 分钟后甩去, 如上重复 3 次, 或用洗板机重复洗 3 次, 拍干至无水印为止, 自然干燥。

**[0056]** 所述的阳性对照血清、弱阳性血清制备方法如下:

**[0057] (1) 阳性对照血清的制备:**

**[0058]** 制造用动物制备阳性对照血清的牛需要经过实验室检测, 必须是 18 月龄性成熟、健康牛, 无小肠结肠炎耶氏菌、乙型副伤寒杆菌、大肠杆菌 0:157 感染、以及无繁殖系统感染等抗体阴性的健康牛。观察一周;

**[0059]** 免疫原制备将布氏杆菌 S1119.3 接种马铃薯浸液琼脂扁瓶, 置 37°C 培养 48 小时, 待形成一层菌落时, 选取纯净扁瓶, 吸弃凝集水, 用含 0.5% 苯酚的灭菌生理盐水将菌苔洗下, 倾入中性玻璃瓶中, 加甲醛溶液至终浓度为 0.2%, 置 37°C 振荡灭活 48 小时, 经无菌检验按中国兽药典进行合格, 于 4°C 以 20000 转 / 分钟离心 10 分钟, 取沉淀, 用生理盐水做 10 倍稀释, 用作免疫原。于 2°C ~ 8°C 冰箱保存备用;

**[0060]** 免疫程序用免疫原按 5ml / 点分 4 点肌肉注射, 免疫动物, 14 日后, 同法免疫一次, 再 14 日后采血, 分离血清, 用 ELISA 检测。血清 OD<sub>450nm</sub> 和阴性血清 OD<sub>450nm</sub> 的比值 (P/N) > 1 方可大量采血。

- [0061] 如检验不合格,应再加强免疫一次;
- [0062] 血清制造
- [0063] 强阳性血清制造:以常规方法采血,分离其血清,将其作为待检血清,用血清稀释液作 1 : 2, 1 : 4..... 1 : 126 稀释,用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验,取待检血清  $OD_{450nm}$  / 质控强阳性血清  $OD_{450nm}$  值 = 1 时的待检血清稀释度作为血清稀释倍数,用血清稀释液对血清进行稀释;
- [0064] 弱阳性血清制造:将强阳性血清用血清稀释液作 1 : 1.5 稀释;除菌与分装将血清用 0.45  $\mu$ m 的滤器进行抽滤除菌,无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐,然后无菌条件下定量分装、冻干。
- [0065] 所述的阴性对照血清的制备方法如下:
- [0066] 制造用动物:同阳性对照血清制造用动物,观察一周;
- [0067] 血清制造:以常规方法采血,分离其血清;
- [0068] 血清处理与分装:将血清用 0.45  $\mu$ m 的滤器进行抽滤除菌,无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐,然后无菌条件下定量分装,贴上标签。
- [0069] 所述的酶标记的与哺乳类动物 Fc 段结合的受体—蛋白质 AG 的制备方法如下:用 pH7.2, PBS 溶液作为酶结合物稀释液,按 0.5mg/ml 稀释酶标记结合物。过滤除菌。将酶标记结合物用 0.45  $\mu$ m 的滤器进行抽滤除菌,无菌条件下加入硫柳汞和庆大霉素使其终浓度均为 0.02% 以防腐。分装冻干无菌条件下按 0.2ml/ 瓶分装酶标结合物。
- [0070] 所述的血清稀释液、洗涤液、底物溶液 A、底物溶液 B、 $H_2O_2$ 、终止液的制备方法如下:
- [0071] (1) 血清稀释液为 0.05M 碳酸溶液:
- [0072] 碳酸钠 1.93 克;碳酸氢钠 3.80 克;加蒸馏水至 1000 毫升, pH9.6, 10 磅高压 15 分钟;
- [0073] 1% 的 BSA 溶液
- [0074] 取 PBST 溶液 1000 毫升,加 BSA 10 克。调 pH 值 7.0, 过滤除菌;
- [0075] (2) 洗涤液为 10 倍洗液
- [0076] 氯化钠, 8 克;磷酸二氢钾, 0.2 克;磷酸氢二钠 ( $12H_2O$ ), 6.29 克;加蒸馏水至 100 毫升,加 0.5 毫升吐温 20。调 pH 值 7.2, 10 磅高压 15 分钟;
- [0077] 10 倍样品稀释液
- [0078] 氯化钠, 8.5 克;磷酸二氢钾, 0.2 克;磷酸氢二钠 ( $12H_2O$ ), 6.29 克;0.5 毫升吐温 20, EDTA, 5.7 克,加蒸馏水至 100 毫升, pH6.3, 10 磅高压 15 分钟;
- [0079] (3) 底物溶液为 10 倍底物溶液 A
- [0080] 取柠檬酸 4.2g, 醋酸钠 13.5g, 过氧化尿 0.5g, 加去离子水 100ml, 调 pH 值 4.0, 过滤除菌;
- [0081] (4) 底物溶液 B 取 TMB 0.2192g, 二甲基亚砷 20ml, 室温下溶解;
- [0082] (5)  $H_2O_2$  液
- [0083] 由美国 VWR 公司生产, 0.2ml/ 瓶分装于黑瓶, 密封瓶口, 粘贴标签;
- [0084] (6) 10 倍终止液
- [0085] 取 55.6 毫升 98% 的浓硫酸加入 80 毫升水中, 调至总体积 100 毫升。

[0086] 实施例 2,就本发明布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒的有关问题说明如下。

#### [0087] 1 菌种选择

[0088] 布鲁氏菌牛型 S1119.3 是传统的提取抗原的菌株。它来源于美国 USDA,因 S1119.3 不易转变为粗糙型,是国际动物卫生组织 (OIE) 认可的提取平滑型细菌脂多糖的菌株。RB51 是牛布鲁氏菌粗糙型的变异菌株,作为一种牛布鲁氏菌疫苗株,也是国际通用提取粗糙型细菌脂多糖的菌株。用两种细菌脂多糖的混和物作抗原检测布鲁氏菌病抗体,目的是为了能够检测所有血清型布鲁氏菌抗体,提高检测试剂盒的检出率,避免漏检。

#### [0089] 2 抗原制备

[0090] 2.1 细菌繁殖尽管布鲁氏菌在我国划为二类病原,但由于是人畜共患病原,所有活菌的繁殖与检定工作均在 P3 实验室内进行。

[0091] 2.2 细菌灭活方式出于生物安全性考虑,除活菌操作外,其他工作可在 P2 级实验室进行。灭活检验效果表明,布鲁氏菌 RB51 和 S1119.3 的 0.5% 苯酚生理盐水洗液 80℃ 维持 90 分钟,能够有效杀死细菌,并对脂多糖提取没有影响。

[0092] 2.3 纯化、浓缩抗原的纯度是保证试剂盒特异性的关键指标。为提高脂多糖的纯度,利用布鲁氏菌脂多糖能特异性地存在于有机相苯酚的特性,采用将醋酸钠甲醛溶液沉淀脂多糖抗原,再用水透析,从而获得纯化、浓缩的抗原。

[0093] 2.4 效价测定提纯抗原为用于包被酶标板,需用抗脂多糖的单克隆抗体测定抗原效价,根据试验研究,因为单克隆抗体识别单一抗原位点的专一性,按生产规程制备的抗原纯度基本符合试剂盒要求,但每批抗原的制造过程中 LPS 的量不是确定不变的,所以每批抗原均需进行效价测定。使用经过标定的单克隆抗体,在抗原量足够时,其 OD 应为 1.5 ~ 2.0,这个显色区间是 ELISA 最敏感,抗原量稍有变化,其 OD 即迅速变化,抗原量小于标准时,OD 值可能偏低,试验不灵敏,OD 值偏高 (大于 3.0),可能会出现超出酶标仪的检测范围。

#### [0094] 3 酶标结合物

[0095] 为克服传统间接 ELISA 方法酶标二抗宿主的单一性问题,采用酶标记物蛋白质 AG 作为均一的酶标二抗且与所有哺乳类动物抗体的 Fc 段结合。

#### [0096] 4 阴性对照血清和阳性对照血清

[0097] 阳性对照血清是试剂盒中验证 ELISA 试验操作是否正确,反应是否特异的一个重要成分,也是反应该试剂盒是否工作的指标。为降低对照血清的非特异性,制备阴性对照血清和阳性对照血清的动物均需进行布鲁氏菌抗体、小肠结肠炎耶氏菌抗体、乙型副伤寒杆菌抗体,大肠杆菌 0:157 抗体检验,并且检测阴性。

[0098] 用大剂量灭活布鲁氏菌多次免疫的方法制备阳性血清。动物首次免疫 10 天后开始产生抗体,随着多次免疫刺激,其抗体水平在第二次免疫后 20 天左右达到高峰,持续时间达半年左右;

[0099] 确诊为自然感染布鲁氏菌动物的血清经无菌过滤后也可用作阳性对照血清,但必须经质控血清进行标定。

[0100] 根据动物布鲁氏菌病抗体间接 ELISA 试验的灵敏性试验研究,阳性对照血清对单抗的阳性率接近 100% P,基本上完全显色。阴性对照血清对单抗没有竞争抑制,由于血清的影响,在间接 ELISA 实验中其 OD 值就略大于空白对照。

[0101] 5 关于临界值 (cut off) 确定阴阳性限值是决定检测结果准确性非常重要的指标。理论上检测限应为检测大量的阴性血清样品,进行阳性百分率分布研究,以排除非特异性反应影响特异性,但在实际工作上,难以得到大量的确定阴性样品,只能通过和其他的检测试剂进行比对来确定。

[0102] 本研究实验中,应用研制的间接 ELISA 试剂盒检测 30 份布鲁氏菌病阴性血清,53 份免疫动物布鲁氏菌感染血清及免疫血清,应用国际上 OIE 已确认准确性的间接 ELISA 试剂盒检测结果进行比对,30 份确定阴性样品其阳性百分率均在 20% 以下,因此,确定检测限即临界值为 20% P(阳性百分率)。

[0103] 6 试剂盒的特异性是确定诊断结果准确与否的重要指标之一。为验证其特异性,用 OIE 标准阳性血清、标准阴性血清、阴性参考血清、人工感染血清、免疫血清检测,阴性检出率为 100%。用乙型副伤寒杆菌、小肠结肠炎耶氏菌、大肠杆菌 0:157 阴、阳性血清进行检测,克服交叉反应的特异性达 96.5%。试验结果表明,动物布鲁氏菌病间接 ELISA 抗体检测试剂盒具有较高的特异性。

[0104] 在实际应用时和对每批产品进行检测时不可能也没有必要对所有病进行检测,所以在制订特异性标准时只对与小肠结肠炎耶氏菌阳性血清、乙型副伤寒杆菌阳性血清,大肠杆菌 0:157 阳性血清,疫苗型抗体, OIE 标准阳性和标准阴性血清进行检验验证。

[0105] 7 试剂盒的敏感性

[0106] 由于我国大规模强制免疫动物,畜群中存在免疫抗体,从而使得一般血清学检测方法很难区分诊断。ELISA 是目前检测抗布鲁氏菌病抗体最敏感的方法之一,但在实际检测普查等工作中我们急需一种可以应用于田间、敏感、交叉反应小又尽量避免免疫抗体干扰的筛选检测方法。

[0107] 研究过程中选用人工布鲁氏菌攻毒血清 37 份, OIE 标准阳性血清 16 份, OIE 标准阴性血清 8 份,免疫疫苗阳性血清 5 份分别用动物布鲁氏菌间接 ELISA 试剂盒进行了检测,结果 51 份布鲁氏菌病阳性血清为阳性,敏感性为 96.23% (51/53)。

[0108] 8 关于用法与判定试验方法与试验结果密切相关,正确的操作和恰当的判定才能得出正确的结果,ELISA 是非常敏感的检测方法,往往因为实验操作不当造成检测结果差异很大,因此对用法与结果判定方法也做出具体规定:试剂盒在使用前应恢复至室温,因冰冷的诊断试剂加入到酶标板上需要时间才能使反应条件达到 18 ~ 28℃,这样就造成实际反应时间不足,影响抗原抗体结合。在洗板机操作条件下,4 次洗板就足够。结果计算中,设计了两个阴阳性及空白对照以计算平均值,检测试验的准确性。阳性百分率的计算方法为国际上通用的计算方法。

[0109] 9 关于注意事项因为 ELISA 检测试剂盒中的成分均为生物活性成分,其中的抗体等又都是蛋白成分,在室温下及频繁升降温能够造成蛋白变性从而影响试剂盒的检测效果,所以必须按要求存放使用;另外,试剂盒中的显色剂及终止液均含有对人有害的化学物质,实验中应避免皮肤接触。

[0110] 10 关于稳定性、贮存和有效期在进行保存期研究时,布鲁氏菌病抗体 I-ELISA 检测试剂盒后分别放置在 2 ~ 8℃ 和室温,每隔 1 个月取几条包被好的酶标板条进行检验,结果表明检测试剂盒在 2 ~ 8℃ 保存 12 个月,室温保存至少 4 个月,其物理性状,检测特异性及灵敏性均不受影响。因此将保存期暂定为:2 ~ 8℃ 保存,有效期 1 年。

[0111] 实施例 3, 诊断布鲁氏菌病的初级结合试验, 包括荧光偏振检测和酶联免疫吸附试验。荧光偏振法是一种均相法, 不需要除去未结合试剂, 操作速度快, 两分钟便得到结果, 可以消除一些疫苗反应。它既可以用于实验室检测, 也可以运用于牧场和野外, 适合野生动物布鲁氏菌病的检测。FPA 的敏感性高, 是优秀的筛选试验。价格相对低廉, 准确度与其它的初级结合试验一样。这种类型的测定, 也适合自动化。它的原理是测量分子反应率变化, 这种改变是由于在试验样品中抗体与可溶性抗原反应引起。如果抗体结合抗原, 抗原的旋转率将下降, 则可测量这种反应。FPA 的基本原理是分子在溶液中旋转随机利率与其大小成反比 (小分子旋转快速, 较大的分子更慢)。如果一个小分子通过依附在一个更大的分子上使其变大, 就可以测量小分子的旋转速度变化。FPA 使用的是通过水解特异多糖再标记荧光制备的抗原。这种分子的平均相对分子质量为 22kD, 使其远小于分子量为 160kD 的抗体分子 (如 IgG 抗体)。FPA 的操作方法中, 可在玻璃管或 96 孔板内稀释血清、血液或牛奶后, 使用 FPA 分析仪去掉本底的荧光读数。这个读数被存储并且在以后的读值中减去它。FPA 分析仪通过偏振光通过特定的角度测量分子的转动速度。然后加入荧光标记的特异多糖抗原, 混合后, 孵育 2 分钟 (血清或牛奶; 全血孵育 15 秒), 最后用分析仪读取最终数值。如果在被验样品有抗体, 抗原分子的旋转时间增加, 导致较高的毫偏振单位 (mP) 读数。毫偏振单位 (mP) 读数的大小与抗体存在的数量成比例。

[0112] 两种类型的酶联免疫吸附试验用于对抗体的检测。它们是间接酶联免疫吸附试验和竞争酶联免疫吸附试验。间接酶联免疫吸附试验, 以抗体结合在固相上, 用一种能与所选择的或所有同种型的抗体结合的酶标记试剂的反应。因为疫苗抗体也可能用这个法检测到, 所以它主要是用来作为筛选试验。它有几个优点, 包括自动化、商业供货、准确性、相对短的检验时间、相对便宜等适应性。间接酶联免疫吸附试验 (IELISA) 用于检测平滑或粗糙型布鲁氏菌产生的抗体, 可用于大部分哺乳动物。此检验法可在 90 分钟内完成也可作为优秀的筛选试验, 用于实验室检测。它的敏感性最高, 主要有于布鲁氏菌病的消除计划。

[0113] 快速间接酶联免疫吸附试验 (RIELISA), 用于检测平滑或粗糙型布鲁氏菌产生的抗体, 可用于大部分哺乳动物。此检验法可在 15 分钟内完成可作为优秀的筛选试验, 最大优点是可以在牧场、田间操作、快捷。

[0114] 奶液间接酶联免疫吸附试验 (MIELISA), 用于检测反刍动物奶水内的布鲁氏菌抗体, 此常规检测法可测出平滑型布鲁氏菌在牛羊奶内的抗体。耗时 90 分钟, 为作为混合奶样品的筛选试验。因为检测动物的奶液可以用于布鲁氏菌病的监测, 同时也减少了对产奶动物的刺激。

[0115] 竞争酶联免疫吸附试验使用单克隆抗体与检验样品中的抗体竞争。它不仅具有间接酶联免疫吸附试验属性, 且有选择合适的亲和力竞争抗体用以消除由于疫苗和交叉反应的抗体引起的血清学反应。竞争酶联免疫吸附试验 (CELISA), 用于检测平滑型布鲁氏菌产生的抗体, 适用于人和几乎全部动物。此检测法以高敏感度的单克隆抗体为基础, 是很好的最后布鲁氏菌病的确诊试验, 也是用于区分疫苗免疫和野毒感染的唯一方法。

专利名称(译)	布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101799470A</a>	公开(公告)日	2010-08-11
申请号	CN200910071636.4	申请日	2009-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	张晓艳		
申请(专利权)人(译)	张晓艳		
当前申请(专利权)人(译)	张晓艳		
[标]发明人	张晓艳		
发明人	张晓艳		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535 G01N33/543		
代理人(译)	崔东辉		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明的目的在于提供一种价格适中，反应时间短，与我国实际检测普查工作要求密切结合的布鲁氏菌病间接酶联免疫吸附试验抗体检测试剂盒。它是利用平滑型布氏杆菌与粗糙型布氏杆菌的纯化脂多糖混合物作抗原包被酶标板，用S1119.3免疫健康牛制备阳性对照血清、标准弱阳性血清，用健康非免疫牛血清作阴性对照血清，以酶标记的与哺乳动物Fc段结合的受体-蛋白质AG作酶标记结合物，配以血清稀释液、洗涤液、底物溶液A、底物溶液B、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、终止液，组装组成。本发明建立适合布鲁氏菌病诊断和流行病学调查的快速、敏感、特异、准确的方法；结果判定客观、操作简便，既适合大规模筛选试验，又能用于布鲁氏菌病的最后的确诊诊断。