



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111024946 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911133737.X

(22)申请日 2019.11.19

(71)申请人 江苏美克医学技术有限公司

地址 210032 江苏省南京市浦口区高新技术开发区江北新区新锦湖路3-1号二期D栋3层

(72)发明人 卢铖

(74)专利代理机构 上海盈盛知识产权代理事务所(普通合伙) 31294

代理人 孙佳胤

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页 附图2页

(54)发明名称

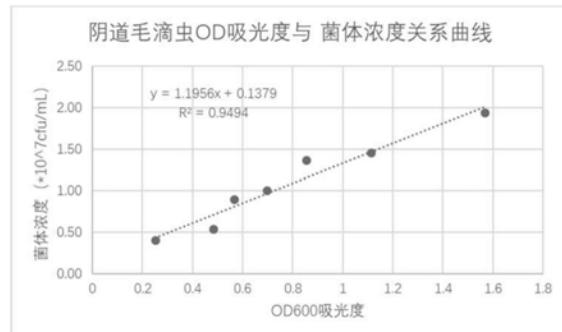
阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒及其制备方法，包括检测卡、SD卡和样品稀释液；所述检测卡由一壳体和免疫层析试纸条组成，所述免疫层析试纸条位于壳体内部，包括底板，所述底板上沿其长度方向顺次设置有一样品垫、一结合垫、硝酸纤维素膜和一吸样垫，所述结合垫上固定有荧光微球标记的抗阴道毛滴虫单克隆抗体，所述硝酸纤维素膜上设置有检测T线和质控C线，所述T线上包被有与所述荧光微球标记的单克隆抗体配对的单克隆抗体，所述C线上包被有与所述荧光微球标记的单克隆抗体配对的二抗。本发公开的试剂盒检测灵敏度、准确度、精密度均更高，对于动态监测患者病情、预后评估及检测复发、指导临床医生及时作出重要的医学决策均有重要意义。

A

CN



1. 一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒，其特征在于，包括检测卡、SD卡和样品稀释液；

所述检测卡，由一壳体和免疫层析试纸条组成，所述免疫层析试纸条位于壳体内部，包括底板，所述底板上沿其长度方向顺次设置有一样品垫、一结合垫、硝酸纤维素膜和一吸样垫，所述结合垫上固定有荧光微球标记的抗阴道毛滴虫单克隆抗体，所述硝酸纤维素膜上设置有检测T线和质控C线，所述T线上包被有与所述荧光微球标记的单克隆抗体配对的单克隆抗体，所述C线上包被有与所述荧光微球标记的单克隆抗体配对的二抗；

所述SD卡内存储有标准曲线，采用平板计数法与光密度法关系曲线建立定标方式，使用定标浓度与仪器信号值关系曲线建立标准曲线，实现定量检测；

所述样品稀释液包括磷酸盐缓冲液和亲水性表面活性剂。

2. 根据权利要求1所述的一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒，其特征在于，所述结合垫制备时阴道毛滴虫单克隆抗体与荧光微球质量比为1:50~1:10。

3. 根据权利要求1所述的一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒，其特征在于，所述结合垫设置封闭1和封闭2，所述封闭1为加入甘氨酸和乙醇胺封闭；所述封闭2为加入BSA和兔IgG封闭，所述BSA与荧光微球质量比为4~2:1，所述兔IgG与荧光微球质量比为0.25~2:1。

4. 根据权利要求1所述的一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒，其特征在于，所述亲水性表面活性剂优选为吐温20或曲拉通100。

5. 根据权利要求4所述的一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒，其特征在于，所述样品稀释液以1000重量份计，包括吐温20或曲拉通100 1~5份和余量的磷酸盐缓冲液。

6. 权利要求1所述一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒的制备方法，其特征在于，所述试剂盒包括检测卡、SD卡和样品稀释液，

所述检测卡的制备方法为，将吸样垫、结合垫、样品垫依次固定在包被抗阴道毛滴虫单克隆抗体的硝酸纤维素膜底板上，切割成试纸条，加干燥剂于常温下密封保存；

所述结合垫通过以下方法制备：

(1) 缓冲液置换：取微粒加入MES缓冲液离心，去除上清，加入少量MES超声重悬，待用；

(2) 活化：向微球中加入NHS和EDC，混匀；

(3) 清洗：活化结束后，加入MES缓冲液离心，去除上清，加入少量MES超声重悬；加入HEPES缓冲液超声重悬，补满HEPES离心，加HEPES重悬后待用；

(4) 抗体反应：加入相应量HEPES预先透析的抗体，阴道毛滴虫单克隆抗体与荧光微球质量比为1:50~1:10，混匀后反应；

(5) 封闭1：加入甘氨酸和乙醇胺封闭；

(6) 封闭2：加入BSA和兔IgG，BSA与荧光微球质量比为4~2:1，兔IgG与荧光微球质量比为0.25~2:1，混匀后封闭；

(7) 清洗：加入PBST清洗两次，加微球保存液清洗一次后，加入适宜量的微球保存液，置于2~8℃保存备用；

(8) 铺结合垫：将标记好的微球偶联物稀释至合适的浓度，铺在玻璃纤维上，置于鼓风干燥箱中干燥；

所述包被抗阴道毛滴虫单克隆抗体的硝酸纤维素膜通过以下方法制备：

(1) T线划线液配制:用缓冲液将阴道毛滴虫单克隆抗体稀释至1.0~2.5mg/mL;

(2) C线划线液配制:用缓冲液将羊抗兔IgG抗体稀释至1.0~2.5mg/mL;

(3) 采用喷金划膜仪,将C线抗体、T线抗体分别包被在固定于底板上的硝酸纤维素膜上;

(4) 将划好的大板置于鼓风干燥箱中干燥;

所述SD卡通过以下方法制备:

(1) 阴道毛滴虫平板计数法与光密度法关系曲线建立:配制不同浓度梯度的阴道毛滴虫菌悬液并在600nm波长下分别测定OD值,将不同梯度的菌悬液样品同时做稀释涂平板培养计数,将OD<sub>600</sub>和对应菌体浓度做直线回归,得出回归方程;

(2) 参考品制备:将阴道毛滴虫接种于液体培养基中,摇床震荡培养,离心去上清,加入生理盐水洗涤,加入少量细胞冻存液重悬菌体,在600nm波长下测量OD值,根据阴道毛滴虫平板计数法与光密度法关系回归方程,计数出制得的参考品浓度,分装冻存备用;

(3) 校准品制备:用样品稀释液将参考品稀释至覆盖线性范围的几个浓度点,分装冻存备用;

(4) 校准品测试:取不同浓度的校准品滴加到免疫层析试纸条的加样孔,通过荧光免疫分析仪读取检测信号值;

(5) 校准曲线生成:根据校准品的制备浓度和荧光值采用合适的拟合方式生成该批试剂的校准曲线,并用仪器软件将曲线导入SD卡中。

## 阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物免疫检测技术领域,更具体地说,涉及一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)是寄生在人体阴道和泌尿道的鞭毛虫,主要引起滴虫性阴道炎和尿道炎,是以性传播为主的一种传染病。

[0003] 阴道毛滴虫是一种寄生虫,但是肉眼看不见,这种毛滴虫呈广梨形或椭圆形,长为10~30 $\mu\text{m}$ ,宽10~20 $\mu\text{m}$ ,头部有4根与虫体等长的鞭毛,在显微镜下可以清楚地看到这种毛滴虫。毛滴虫对不同的环境适应力很强,能在25°C~42°C条件下生长繁殖,3°C~5°C的低温可生存21天,在46°C时仍能生存20~60分钟,脱离人体后在半干燥的条件下也可生存数小时。毛滴虫不但寄生于缺氧的阴道内,并可侵入尿道和尿道旁腺,甚至于上行至输尿管及肾盂。最适宜于毛滴虫生长的pH值是5.5~6,如pH为5以下或7.5以上则毛滴虫的生长会受到抑制。毛滴虫可引起阴道滴虫病和男性滴虫性非淋菌性尿道炎。阴道毛滴虫的致病力随着虫株及宿主生理状况、免疫功能、内分泌以及阴道内细菌或真菌感染等而改变,尤其是妇女在妊娠及泌尿生殖系统生理失调时更易出现炎症。感染数天后,阴道粘膜出现充血、水肿、上皮细胞变性脱落,白细胞炎症反应。健康妇女阴道因乳酸杆菌作用,pH值维持在3.8~4.4之间,可抑制其他细菌生长,不利于滴虫生长,称为阴道的自净作用。然而滴虫在阴道中消耗糖原,妨碍乳酸杆菌的酵解作用,影响乳酸浓度,从而使阴道pH转为中性或碱性。妊娠及月经后的阴道生理周期使pH接近中性,这些都有利于滴虫繁殖,因而感染和复发率较高。目前多采用的是微生物染色方法鉴别阴道分泌物中的阴道毛滴虫,染色过程简单,阅片较为复杂,且灵敏度低,阅片速度和实验员的经验有很大关系。最大问题是只能定性,不能作为定量检测。这是本领域人员亟待解决的问题。

[0004] 中国专利CN107132353A公开了一种B族链球菌的检测试剂盒及其制备方法,虽然也能给出定量检测结果,但是其采用ABS系统,制备工艺复杂,且需要两株抗体分别标记,有两个结合垫,两个样本处理液,使用时需要按比例混合,系统误差大,不利于CV的控制。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于,提供一种检测误差小,准确度高的阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒。

[0006] 本发明的第二个目的在于,提供一种检测误差小,准确度高的阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒的制备方法。

[0007] 为了实现上述目的,本发明提供了一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于,包括检测卡、SD卡和样品稀释液;

[0008] 所述检测卡,由一壳体和免疫层析试纸条组成,所述免疫层析试纸条位于壳体内部,包括底板,所述底板上沿其长度方向顺次设置有一样品垫、一结合垫、硝酸纤维素膜和

一吸样垫,所述结合垫上固定有荧光微球标记的抗阴道毛滴虫单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上设置有检测T线和质控C线,所述T线上包被有与所述荧光微球标记的单克隆抗体配对的单克隆抗体,所述C线上包被有与所述荧光微球标记的单克隆抗体配对的二抗;

[0009] 所述SD卡内存储有标准曲线,采用平板计数法与光密度法关系曲线建立定标方式,使用定标浓度与仪器信号值关系曲线建立标准曲线,实现定量检测;

[0010] 所述样品稀释液包括磷酸盐缓冲液和亲水性表面活性剂。

[0011] 作为一个优选方案,所述结合垫制备时阴道毛滴虫单克隆抗体与荧光微球质量比为1:50~1:10。

[0012] 作为一个优选方案,所述结合垫设置封闭1和封闭2,所述封闭1为加入甘氨酸和乙醇胺封闭;所述封闭2为加入BSA和兔IgG封闭,所述BSA与荧光微球质量比为4~2:1,所述兔IgG与荧光微球质量比为0.25~2:1。

[0013] 作为一个优选方案,所述亲水性表面活性剂优选为吐温20或曲拉通100。

[0014] 作为一个优选方案,所述样品稀释液以1000重量份计,包括吐温20或曲拉通100 1~5份和余量的磷酸盐缓冲液。

[0015] 为了实现上述第二个目的,本发明提供了一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒的制备方法,所述试剂盒包括检测卡、SD卡和样品稀释液,

[0016] 所述检测卡的制备方法为,将吸样垫、结合垫、样品垫依次固定在包被抗阴道毛滴虫单克隆抗体的硝酸纤维素膜底板上,切割成试纸条,加干燥剂于常温下密封保存;

[0017] 所述结合垫通过以下方法制备:

[0018] (1) 缓冲液置换:取微粒加入MES(吗啉乙磺酸)缓冲液离心,去除上清,加入少量MES超声重悬,待用;

[0019] (2) 活化:向微球中加入NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)缓冲液和EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺)缓冲液,混匀;

[0020] (3) 清洗:活化结束后,加入MES缓冲液离心,去除上清,加入少量MES超声重悬;加入HEPES缓冲液超声重悬,补满HEPES离心,加HEPES重悬后待用;

[0021] (4) 抗体反应:加入相应量HEPES(4-羟乙基哌嗪乙磺酸)缓冲液预先透析的抗体,阴道毛滴虫单克隆抗体与荧光微球质量比为0.3~0.7:10,混匀后反应;

[0022] (5) 封闭1:加入甘氨酸和乙醇胺封闭;

[0023] (6) 封闭2:加入BSA和兔IgG,BSA与荧光微球质量比为4~2:1,兔IgG与荧光微球质量比为0.25~2:1,混匀后封闭;

[0024] (7) 清洗:加入PBST清洗两次,加微球保存液清洗一次后,加入适宜量的微球保存液,置于2~8°C保存备用;

[0025] (8) 铺结合垫:将标记好的微球偶联物稀释至合适的浓度,铺在玻璃纤维上,置于鼓风干燥箱中干燥;

[0026] 所述包被抗阴道毛滴虫单克隆抗体的硝酸纤维素膜通过以下方法制备:

[0027] (1) T线划线液配制:用缓冲液将阴道毛滴虫单克隆抗体稀释至1.0~2.5mg/mL;

[0028] (2) C线划线液配制:用缓冲液将羊抗兔IgG抗体稀释至1.0~2.5mg/mL;

[0029] (3) 采用喷金划膜仪,将C线抗体、T线抗体分别包被在固定于底板上的硝酸纤维素膜上;

- [0030] (4) 将划好的大板置于鼓风干燥箱中干燥；
- [0031] 所述SD卡通过以下方法制备：
- [0032] (1) 阴道毛滴虫平板计数法与光密度法关系曲线建立：配制不同浓度梯度的阴道毛滴虫菌悬液并在600nm波长下分别测定OD值，将不同梯度的菌悬液样品同时做稀释涂平板培养计数，将OD<sub>600</sub>和对应菌体浓度做直线回归，得出回归方程；
- [0033] (2) 参考品制备：将阴道毛滴虫接种于液体培养基中，摇床震荡培养，离心去上清，加入生理盐水洗涤，加入少量细胞冻存液重悬菌体，在600nm波长下测量OD值，根据阴道毛滴虫平板计数法与光密度法关系回归方程，计数出制得的参考品浓度，分装冻存备用；
- [0034] (3) 校准品制备：用样品稀释液将参考品稀释至覆盖线性范围的几个浓度点，分装冻存备用；
- [0035] (4) 校准品测试：取不同浓度的校准品滴加到免疫层析试纸条的加样孔，通过荧光免疫分析仪读取检测信号值；
- [0036] (5) 校准曲线生成：根据校准品的制备浓度和荧光值采用合适的拟合方式生成该批试剂的校准曲线，并用仪器软件将曲线导入SD卡中。
- [0037] 制备包被抗阴道毛滴虫单克隆抗体的硝酸纤维素膜的缓冲液优先选择含糖的0.01mol/LPBS(磷酸盐缓冲液，含10g/L蔗糖)，pH7.0~7.4。
- [0038] 所述磷酸盐缓冲液为0.01~0.05mol/L PBS，pH为7.0~7.4。
- [0039] 定量检测的原理是将测定活菌的平板计数法与表征活菌、死菌终浓度的光密度法联系起来，解决了试纸条免疫学测定无法区分死菌、活菌的难题。
- [0040] 所述试剂盒的测定方法包括以下步骤：
- [0041] (1) 打开荧光免疫分析仪，将SD卡插入仪器对应的插口中。
- [0042] (2) 将取样拭子置于稀释液中，混匀，取100~150μL滴加到免疫层析试纸条的加样孔。
- [0043] (3) 室温孵育15~30min，将检测卡放入荧光免疫分析仪中读取检测结果。
- [0044] 本发明的优点在于，(1) 本发明采用荧光免疫层析技术，既保留了传统胶体金试纸条的现场快速检测优点，又增加了灵敏度高、稳定性好、受自然荧光干扰低等优点，具有较高的检测灵敏度，测定线性范围是10<sup>4</sup>cfu/mL~10<sup>7</sup>cfu/mL，线性相关系数>0.99，同时其配套使用的设备精巧，无需大型仪器设备，适用于基层医院及大医院检验科。(2) 本发明所包含的样品稀释液能够使易聚集的阴道毛滴虫分散成单一菌体，使样品更加均一，同时能够使样本中的抗原更好的与试纸条抗体进行反应结合，提高样本检测的准确度和精密度。该试剂盒的平均回收率90%~110%，平均精密度<15%，临床样本符合率>99%。

## 附图说明

- [0045] 图1为阴道毛滴虫荧光免疫层析试纸条的结构示意图；
- [0046] 图2为阴道毛滴虫平板计数法与光密度法关系曲线图；
- [0047] 图3为校准品浓度与信号值四参数拟合曲线图。
- [0048] 图标：1-底板；2-样品垫；3-结合垫；4-硝酸纤维素膜；5-吸样垫；41-检测线；42-质控线。

## 具体实施方式

[0049] 为了进一步了解本发明的技术特征,下面将结合具体实施例及附图对本发明的技术方案进行详细地描述。显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。实施例只对本发明具有示例性的作用,而不具有任何限制性的作用。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。所用试剂或仪器,未特别注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

### [0050] 实施例1:结合垫制备

[0051] 1.缓冲液更换:取1mg 200nm荧光微球,加1mL100mM MES, pH5.5~6.0(以下MES皆为100mM),离心(14000g 30min)。加入500μL MES超声重悬,待用。

[0052] 2.活化:加入0.06mg NHS,混匀后再加0.1mgEDC,加入500μL MES,37℃旋转反应30min~60min(混匀旋转仪的转速设置为30~50)。

[0053] 3.清洗:活化结束后,加1mL MES,离心(14000g 30min),去上清,加入500μL MES超声重悬,重复一次,加入50mM HEPES, pH8.0(以下HEPES皆为50mM, pH8.0) 500μL,超声重悬,加入1mL HEPES离心,加500μL HEPES超声重悬后待用。

[0054] 4.抗体反应:加入0.03mg抗体(抗体HEPES预先透析),混匀后37℃反应1~4hr。

[0055] 5.封闭1:加入2M Gly7μL和1M EA(乙醇胺)14μL,37℃旋转反应0.5~1.5hr。

[0056] 6.封闭2:分别按如下方式封闭:加入2mgBSA和0.5mg兔IgG,2~8℃,旋转反应12~18h。

[0057] 7.清洗:加入1mL PBST离心(14000g 30min),去上清,加500μL微球保存液超声重悬,离心(14000g 30min),去上清,加500μL微球保存液,离心(14000g 30min),去上清,加入100微升微球固定液超声重悬,按1/50的使用浓度,固定在结合垫上,置于鼓风干燥箱中,37℃,干燥2~6hr。

### [0058] 实施例2:结合垫制备

[0059] 所述抗体的加入量为0.05mg,所述兔IgG的加入量为1mg,其余步骤同实施例1。

### [0060] 实施例3:结合垫制备

[0061] 所述兔IgG的加入量为0.05mg,所述兔IgG的加入量为2mg其余步骤同实施例1。

### [0062] 实施例4:结合垫制备

[0063] 所述抗体的加入量为0.07mg,所述兔IgG的加入量为2mg,其余步骤同实施例1。

### [0064] 实施例5:硝酸纤维素膜包被抗阴道毛滴虫抗体的制备

[0065] 1.T线划线液的配制:采用划膜稀释液将抗阴道毛滴虫单克隆抗体稀释至1.0mg/mL,混匀,所述划膜稀释液为0.01mol/L PBS(含10g/L蔗糖),pH7.0~7.4。

[0066] 2.C线划线液的配制:采用划膜稀释液将羊抗兔IgG抗体稀释至1.5mg/mL,混匀,所述划膜稀释液为0.01mol/L PBS(含10g/L蔗糖),pH7.0~7.4。

[0067] 3.采用喷金划膜仪,将C线抗体、T线抗体分别包被在固定于底板上的硝酸纤维素膜上,划液量:0.5~2μL/cm;划膜速度:50mm/s。

[0068] 4.将划好的大板置于鼓风干燥箱中,37℃,干燥2~6h。

### [0069] 实施例6:硝酸纤维素膜包被抗阴道毛滴虫抗体的制备

[0070] 所述T线划线液中抗阴道毛滴虫单克隆抗体浓度为1.5mg/mL,其余步骤同实施例

5。

- [0071] 实施例7:硝酸纤维素膜包被抗阴道毛滴虫抗体的制备
- [0072] 所述T线划线液中抗阴道毛滴虫单克隆抗体浓度为2.0mg/mL,其余步骤同实施例5。
- [0073] 实施例8:硝酸纤维素膜包被抗阴道毛滴虫抗体的制备
- [0074] 所述C线划线液中羊抗兔IgG抗体浓度为2.0mg/mL,其余步骤同实施例5。
- [0075] 实施例9:硝酸纤维素膜包被抗阴道毛滴虫抗体的制备
- [0076] 所述T线划线液中抗阴道毛滴虫单克隆抗体浓度为2.0mg/mL,所述C线划线液中羊抗兔IgG抗体浓度为1.5mg/mL,其余步骤同实施例5。
- [0077] 实施例10:荧光免疫层析试纸条的制备
- [0078] 一种荧光免疫层析试纸条(图1),包括底板1,底板1上沿其长度方向顺次设置有样品垫2、结合垫3、硝酸纤维素膜4和吸样垫5;样品垫2与结合垫3部分重叠,结合垫3与硝酸纤维素膜4部分重叠,且结合垫3的一侧边位于样品垫2的下方,结合垫3的相对的另一侧边位于硝酸纤维素膜4的一侧边的上方;硝酸纤维素膜4与吸样垫5部分重叠,且硝酸纤维素膜4的相对的另一侧边位于吸样垫5的下方;硝酸纤维素膜4上设置有检测线41和质控线42,且检测线41靠近结合垫3,质控线42靠近吸样垫5。
- [0079] 将吸样垫、结合垫、样品垫依次固定在包被抗体的硝酸纤维素膜底板上;切割成试纸条,加干燥剂于常温下密封保存。
- [0080] 实施例11:样品稀释液的制备
- [0081]
- |      |            |
|------|------------|
| 稀释液1 | PBS        |
| 稀释液2 | PBS+吐温20   |
| 稀释液3 | PBS+曲拉通100 |
- [0082] 所述样品稀释液为0.01mol/L PBS,pH7.4,其中含有0.1%吐温20。
- [0083] 实施例12:样品稀释液的制备
- [0084] 所述样品稀释液为0.01mol/L PBS,pH7.4,其中含有0.5%的吐温。
- [0085] 实施例13:样品稀释液的制备
- [0086] 所述样品稀释液为0.01mol/L PBS,pH7.4,其中含有1%的吐温20。
- [0087] 实施例14:样品稀释液的制备
- [0088] 所述样品稀释液为0.01mol/L PBS,pH7.4,其中含有0.1%的Triton-100。
- [0089] 实施例15:样品稀释液的制备
- [0090] 所述样品稀释液为0.01mol/L PBS,pH7.4,其中含有0.5%的Triton-100。
- [0091] 实施例16:样品稀释液的制备
- [0092] 所述样品稀释液为0.01mol/L PBS,pH7.4,其中含有1%的Triton-100。
- [0093] 为验证阴道毛滴虫使用优化后的样品稀释液在试纸条上的检测效果,分别用0.01mol/L PBS以及不同含量的吐温20、曲拉通100稀释阴道毛滴虫至 $10^6$ cfu/mL。实验结果表明,添加了吐温20和曲拉通100的稀释液均能够使抗体抗原间反应更加充分,其中0.5%的吐温的重复性测试最好。
- [0094] 数据结构如下:

组分	PBS	向样本稀释液中添加吐温 20 和 Triton-100 的含量					
		0.1%吐温 20	0.5%吐温 20	1%吐温 20	0.1%Triton-100	0.5%Triton-100	1%Triton-100
[0095]	1.855	1.597	2.198	1.986	1.589	1.967	1.886
	2.228	1.678	2.356	2.357	1.496	2.262	2.463
	1.734	1.993	2.038	2.536	2.158	2.159	2.589
	1.651	2.246	2.359	2.256	2.245	2.278	2.436
	1.267	2.247	2.069	2.498	2.168	2.24	1.854
	1.99	2.127	2.246	1.899	2.147	1.988	1.898
	1.653	2.056	1.988	2.599	1.892	1.67	2.176
	1.656	1.746	2.114	2.56	1.792	1.734	1.634
	1.953	2.158	2.263	2.456	1.852	2.011	2.384
	2.128	2.029	1.968	1.892	1.954	1.706	1.846
AVE	1.812	1.988	2.160	2.350	1.927	2.002	2.117
SD	0.280	0.235	0.145	0.255	0.271	0.235	0.333

[0096]	CV	15.45%	11.81%	6.71%	10.84%	14.05%	11.73%	15.72%
--------	----	--------	--------	-------	--------	--------	--------	--------

[0097] 实施例17:定标曲线建立

[0098] 1. 不同光密度值的菌悬液制备:用移液器吸取在液体培养基上活化好的阴道毛滴虫于无菌生理盐水中混匀,制成菌悬液。并在600nm波长下测定OD值。制备OD值在0.8左右的菌悬液作为原菌液样品,并将原菌液样品做稀释梯度,制备OD值在0.2-0.8之间的5-7个菌悬液样品。

[0099] 2. 稀释涂平板:将制备好的不同梯度的菌悬液样品做稀释涂平板,在PDA培养基上,37℃培养24h计数。

[0100] 3. 定标曲线生成:依据稀释倍数和涂布量,算出菌体浓度,结果见表1。将OD<sub>600</sub>和对应菌体浓度做直线回归,得出回归方程y=ax+b(如图2)。

[0101] 表1阴道毛滴虫平板计数结果

OD <sub>600</sub>	菌落数/平皿				稀释倍数	涂布量 (mL/平皿)	浓度 (*10 <sup>7</sup> cfu/mL)
	1	2	3	M			
1.568	98	102	90	96.67	10000	0.05	1.93
1.112	69	73	76	72.67			1.45
0.856	57	62	85	68.00			1.36
0.698	48	54	49	50.33			1.01
0.568	44	42	48	44.67		5000	0.89
0.485	26	24	30	26.67			0.53
0.251	17	20	24	20.33			0.41

[0103] 实施例18:参考品制备

[0104] 1.接种:将在液体培养基上活化好的阴道毛滴虫接种于液体培养基中,37℃摇床震荡培养24h。

[0105] 2.清洗:将培养好的阴道毛滴虫离心去上清,并加入生理盐水,离心洗涤2~3次,加入少量细胞冻存液重悬菌体。

[0106] 3.参考品定标:用0.01mol/LPBS稀释至一定比例,在600nm波长下测量OD值(OD值需在0.2~0.8之间),根据阴道毛滴虫平板计数法与光密度法关系回归方程y=ax+b,计数出制得的参考品浓度,结果见表2。分装冻存备用。

[0107] 表2参考品定标结果

稀释倍数	OD <sub>600</sub>	计算浓度		原浓度 *10 <sup>10</sup> cfu/mL	a	b
		cfu/mL	*10 <sup>10</sup> cfu/mL			
1	10 <sup>10</sup>	0.562	0.81	0.11	1.1956	0.1379
2	10 <sup>10</sup>	0.702	0.98	0.13	1.1956	0.1379
3	10 <sup>10</sup>	0.633	0.89	0.12	1.1956	0.1379
平均	—	—	—	0.11	—	—

[0109] 细胞冻存液配方如下:

物料名称	单位	不完全 1640 液
		基准量 1000mL
阴道毛滴虫培养基	g	1.76
小牛血清	mL	1
青霉素	µL	100
链霉素	µL	100
水	mL	7
[0110] 过滤除菌后分装, -20℃保存。		
物料名称	单位	细胞冻存液
		基准量 100mL
不完全 1640 液	mL	50
小牛血清	mL	40
DMSO	mL	10
无菌条件下配制, 4℃保存。		

[0111] 实施例19:SD卡制备

[0112] 1. 校准品制备:用样品稀释液将参考品稀释至覆盖线性范围的几个浓度点,分别是 $1\times10^4\text{cfu/mL}$ 、 $1\times10^5\text{cfu/mL}$ 、 $5\times10^5\text{cfu/mL}$ 、 $1\times10^6\text{cfu/mL}$ 、 $5\times10^6\text{cfu/mL}$ 、 $1\times10^7\text{cfu/mL}$ 分装冻存备用。所述样品稀释液如实施例12。

[0113] 2. 校准品测试:将不同浓度的校准品取120µL滴加到免疫层析试纸条的加样孔,20min后,通过荧光免疫分析仪读取检测信号值。检测结果见表3。所用免疫层析试纸条制备如实施例3、实施例5、实施例10。

[0114] 表3校准品信号值测试结果

[0115]	浓度 ( $\times 10^4\text{cfu/mL}$ )	1	2	3	4	5	平均
[0116]	1	0.102	0.087	0.086	0.077	0.061	0.083
	10	0.381	0.395	0.363	0.402	0.385	0.385
	50	1.025	1.093	1.057	1.082	1.058	1.063
	100	1.865	1.905	2.043	2.025	2.001	1.833
	500	4.789	4.566	4.885	4.658	4.661	4.712
	1000	7.065	6.956	6.865	7.125	6.993	7.035

[0117] 3. 校准曲线生成:根据根据校准品的制备浓度和荧光值采用四参数拟合方式生成该批试剂的校准曲线,并用仪器软件将曲线导入SD卡中,校准曲线方程见表4,曲线形状见图3。

[0118] 表4校准曲线方程

$$y = -5E-06x^2 + 0.0114x + 0.3679 R^2 = 0.9926$$

[0120] 实施例20:试剂盒的空白限测试

[0121] 将样品稀释液作为空白样本,取120µL滴加到免疫层析试纸条的加样孔,20min后,通过荧光免疫分析仪读取检测信号值。重复测试20次,计算平均信号值M和标准差SD,将M+

2SD带入标准曲线中,计算出对应的浓度值,即为试剂盒的空白限。结果如表5所示。所述免疫层析试纸条的制备如实施例3、实施例5、实施例10,所述样品稀释液见实施例12,所述SD卡见实施例19。

[0122] 表5试剂盒的空白限

测试次数	测量值
1	0.019
2	0.018
3	0.021
4	0.025
5	0.024
6	0.024
7	0.019
8	0.019
9	0.019
10	0.024

[0123]

[0124]	11	0.025
	12	0.023
	13	0.019
	14	0.022
	15	0.017
	16	0.019
	17	0.02
	18	0.016
	19	0.016
	20	0.017
	M	0.020
	SD	0.003
	M+2*SD	14.74%
	空 白 限 (*10 <sup>4</sup> cfu/mL)	0.3681

[0125] 实施例21:试剂盒的批内精密性测试

[0126] 用样品稀释液将参考品稀释至高、中、低三个浓度,取120μL滴加到免疫层析试纸条的加样孔,20min后,通过荧光免疫分析仪读取检测浓度。每个浓度重复测试10次,计算平均值M和标准差SD,分别计算CV (CV=SD/M×100%)。结果如表6所示。所述免疫层析试纸条的制备如实施例3、实施例5、实施例10,所述样品稀释液见实施例12,所述SD卡见实施例19。

[0127] 表6试剂盒的批内精密性

	R-L(*10 <sup>4</sup> cfu/mL)	R-M(50*10 <sup>4</sup> cfu/mL)	R-H(1000*10 <sup>4</sup> cfu/mL)
[0128]	1	0.08	1.125
	2	0.096	1.057
	3	0.079	1.149
	4	0.082	1.089
	5	0.078	1.099

[0129]	6	0.091	1.055	7.246
	7	0.094	1.129	7.322
	8	0.089	1.055	6.955
	9	0.088	1.278	6.784
	10	0.075	1.079	6.494
	M	0.085	1.112	7.039
	SD	0.007	0.067	0.316
	CV	8.59%	6.05%	4.48%

[0130] 实施例22:试剂盒的批间精密性测试

[0131] 用样品稀释液将参考品稀释至高、中、低三个浓度,分别用三个不同批次的试剂盒重复测试3次,计算相对极差。结果如表7所示。所述试剂盒的制备如实施例3、实施例5、实施例10,实施例12、实施例19。

[0132] 表7试剂盒的批间精密性

次数	R-L(*10 <sup>4</sup> cfu/mL)			R-L(*10 <sup>4</sup> cfu/mL)			R-L(*10 <sup>4</sup> cfu/mL)		
	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3
1	0.081	0.081	0.072	1.062	1.012	0.996	7.425	6.895	6.86
2	0.079	0.08	0.085	1.137	1.241	1.088	6.856	6.994	7.052
3	0.085	0.086	0.08	1.125	0.998	1.012	7.035	7.019	6.653
平均值 X	0.082	0.082	0.079	1.108	1.084	1.032	7.105	6.969	6.855
平均值 X <sub>T</sub>	0.081			1.074555556			6.976555556		
相对极差	3.38%			7.36%			3.65%		

[0134] 实施例23:试剂盒的准确度测试

[0135] 将一定浓度的参考品加入到低值临床样本中,使其终浓度在10<sup>5</sup>cfu/mL(医学决定水平)左右,参考品的加入体积不得高于终体积的1/20,用试剂盒测试低值样本浓度和加参考品后样本浓度,做3个平行测试。分别根据以下公式计算回收率R,结果如表8所示。

$$[0136] R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\%$$

[0137] R——回收率;

[0138] V——加入参考品液体积;

[0139] V<sub>0</sub>——人源阴道分泌物样本的体积;

[0140] C——人源阴道分泌物样本加入参考品液后的测定浓度;

[0141] C<sub>0</sub>——人源阴道分泌物样本的测定浓度;

[0142] C<sub>s</sub>——参考品溶液的浓度。

[0143] 表8回收率测试结果

参考品		人源样本		纯品+人源样本		回收率
体积 V ( $\mu\text{L}$ )	浓度 CS (cfu/mL)	体积 V0 ( $\mu\text{L}$ )	检测浓度 C0 (cfu/mL)	体积 V+V0 ( $\mu\text{L}$ )	检测浓度 C (cfu/mL)	R
10	1000	990	$4.21 \times 10^4$	1000	$1.56 \times 10^5$	114%
			$4.36 \times 10^4$		$1.78 \times 10^5$	136%
			$4.01 \times 10^4$		$1.33 \times 10^5$	91%

[0145] 实施例24: 检测临床样本

[0146] 收集经金标准确定的病例组与对照组样本,用考核试剂(本试剂盒)与参比试剂(北京泰格科信试剂盒)同步测定,计算考核试剂测定结果与参比试剂测定结果符合或差异程度的统计学指标,评价方法如下:

试剂	考核		参比试剂	合计
	阳性	阴性		
阳性	A	B	A+B	
阴性	C	D	C+D	
合计	A+C	B+D	$\frac{A+B}{C+D} \times 100\%$	

[0148] 阳性符合率:考核试剂检出阳性的样本占参比试剂检出阳性样本总数的比例,即阳性符合率。

[0149] 阴性符合率:考核试剂检出阴性的样本占参比试剂检出阴性样本总数的比例,即阴性符合率。

[0150] 总符合率:考核试剂与参比试剂检出结果一致的样本占总样本的比例,即总符合率。

[0151] 一致率:计算Kappa系数,若Kappa系数 $\geq 0.75$ ,表明一致率良好。

[0152] 用下列公式表示:

[0153] 阳性符合率= $A / (A+C) \times 100\%$  阴性符合率= $D / (B+D) \times 100\%$

[0154] 总符合率= $(A+D) / (A+B+C+D) \times 100\%$

[0155] Kappa系数= $2 \times (A \times D - B \times C) / [(A+B) \times (B+D) + (A+C) \times (C+D)]$

[0156] 结果如表9所示。

[0157] 表9比对测试结果

试剂	考 核	参比试剂		合 计
	阳性	阴性		
[0158]	阳性	98	2	100
	阴性	2	98	100
	合计	100	100	200

[0159] 阳性符合率 =  $98 / (2+98) \times 100\% = 98\%$ ;

[0160] 阴性符合率 =  $98 / (2+98) \times 100\% = 98\%$ ;

[0161] 总符合率 =  $(98+98) / (100+100) = 98\%$ ;

[0162] Kappa系数 =  $2 \times (98 \times 99 - 2 \times 2) / [(98+2) \times (2+98) + (98+2) \times (2+98)] = 0.96$ 。

[0163] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

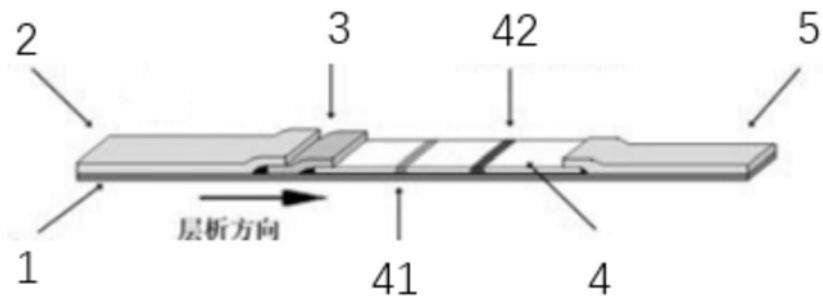


图1

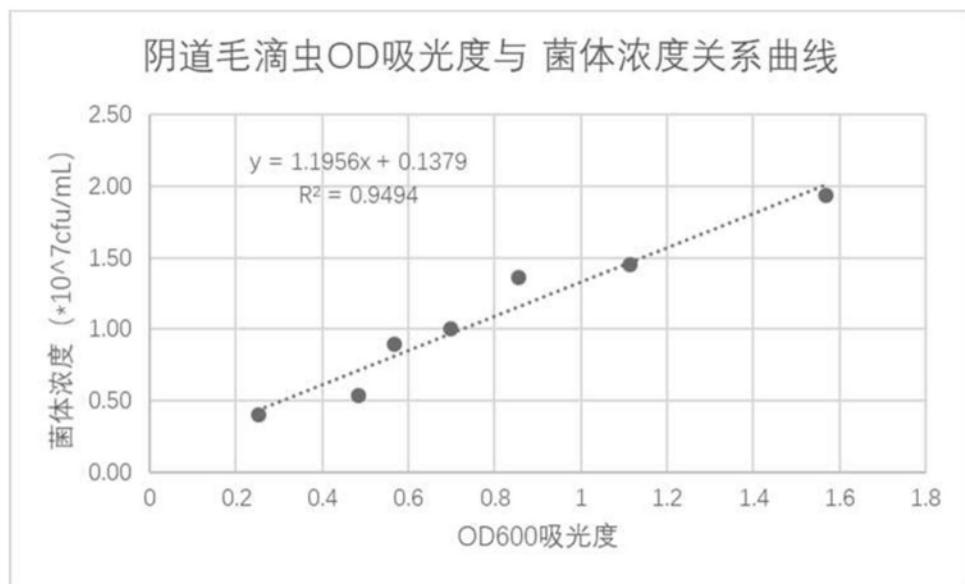


图2

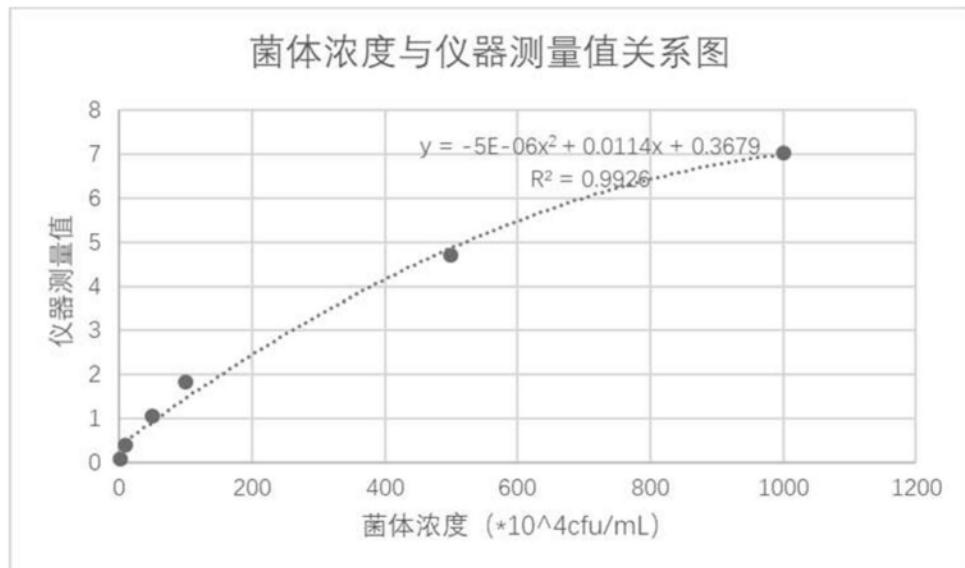


图3

专利名称(译)	阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN111024946A</a>	公开(公告)日	2020-04-17
申请号	CN201911133737.X	申请日	2019-11-19
[标]发明人	卢铖		
发明人	卢铖		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/56905 G01N33/577		
代理人(译)	孙佳胤		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

#### 摘要(译)

本发明提供一种阴道毛滴虫荧光免疫层析测定试剂盒及其制备方法，包括检测卡、SD卡和样品稀释液；所述检测卡由一壳体和免疫层析试纸条组成，所述免疫层析试纸条位于壳体内部，包括底板，所述底板上沿其长度方向顺次设置有一样品垫、一结合垫、硝酸纤维素膜和一吸样垫，所述结合垫上固定有荧光微球标记的抗阴道毛滴虫单克隆抗体，所述硝酸纤维素膜上设置有检测T线和质控C线，所述T线上包被有与所述荧光微球标记的单克隆抗体配对的单克隆抗体，所述C线上包被有与所述荧光微球标记的单克隆抗体配对的二抗。本发公开的试剂盒检测灵敏度、准确度、精密度均更高，对于动态监测患者病情、预后评估及检测复发、指导临床医生及时作出重要的医学决策均有重要意义。

阴道毛滴虫OD吸光度与 菌体浓度关系曲线

