

(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103063841 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201210572128. 6

(22) 申请日 2012. 12. 24

(71) 申请人 潍坊市康华生物技术有限公司

地址 261023 山东省潍坊市经济开发区月河
路 699 号

(72) 发明人 杨致亭 杨爱香 王春光 沈孝功
刘发新 刘海波 邱香廷 宋玉翠

(74) 专利代理机构 潍坊正信专利事务所 37216
代理人 王伟霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

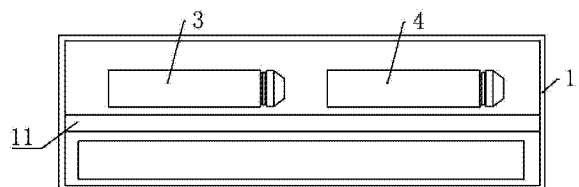
权利要求书3页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测
测试剂盒及其制备和使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测测试剂盒及其制备和使用方法, 包括盒体, 所述盒体内设有 EHF 酶标板、封板膜、EHF 酶结合物溶液瓶、底物 A 溶液瓶、底物 B 溶液瓶、EHF 阴性对照溶液瓶、EHF 阳性对照溶液瓶和终止液溶液瓶。本发明采用 IgM 捕获 ELISA 法检测 EHF IgM 抗体, 以减少假阳性或假阴性现象对临床诊断带来的干扰, 并且使该试剂盒能够对流行性出血热进行快速、准确的检测, 同时误差小、检测灵敏度高、对检测设备要求低。



1. 一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒, 包括盒体, 其特征在于: 所述盒体内设有 EHF 酶标板、封板膜、EHF 酶结合物溶液瓶、底物 A 溶液瓶、底物 B 溶液瓶、EHF 阴性对照溶液瓶、EHF 阳性对照溶液瓶和终止液溶液瓶;

所述 EHF 酶标板上设有五个以上的包被有固相抗人 IgM 单克隆抗体的透明反应孔;

每 1000ml 所述底物 A 溶液内含有柠檬酸三钠 4.16g ~ 6.24g、柠檬酸 7.76g ~ 11.64g、乙酸钠 7.13g ~ 10.70g、冰乙酸 1.52ml ~ 2.28ml、双氧水 0.8ml ~ 1.2ml;

每 1000ml 所述底物 B 溶液内含有无水乙醇 520ml ~ 780ml、乙二醇 272ml ~ 408ml、二甲基甲酰胺 8ml ~ 12ml、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 0.8g ~ 1.2g;

每 1000ml 所述 EHF 阴性对照溶液内含有氯化钠 6g ~ 8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.2g ~ 3.4g、 KH_2PO_4 0.16g ~ 0.24g、氯化钾 0.16g ~ 0.24g、蔗糖 40g ~ 60g、叠氮化钠 0.08g ~ 0.12g;

所述 EHF 阳性对照溶液是在每 1ml 所述 EHF 阴性对照溶液中加入 $24 \mu\text{g} \sim 36 \mu\text{g}$ 的羊抗兔抗体配制而成的;

所述终止液是在 900ml 纯水中加入硫酸 80ml ~ 120ml 配制而成的。

2. 如权利要求 1 所述的一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述 EHF 酶标板上设有 5~95 个反应孔。

3. 如权利要求 1 所述的一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述 EHF 酶标板包括板架和多个可拆卸安装在所述板架上的反应板条, 所述反应孔设置在所述反应板条上。

4. 如权利要求 1 所述的一种流行性出血热 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述盒体内部设有隔断, 使所述盒体内部具有多个空腔。

5. 如权利要求 4 所述的一种流行性出血热 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒, 其特征在于: 所述盒体内部设有一个横向隔断, 使所述盒体分成一个上部用于容纳所述 EHF 酶结合物溶液瓶、底物 A 溶液瓶、底物 B 溶液瓶、EHF 阴性对照溶液瓶、EHF 阳性对照溶液瓶和终止液溶液瓶的空腔和一个底部用于容纳所述 EHF 酶标板的空腔。

6. 权利要求 1 所述流行性出血热 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒的制备方法, 其特征在于:

(1) EHF 酶标板的制备:

1.1 配制 EHF 包被液: 用碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液将抗人 IgM 单克隆抗体溶液稀释成浓度为 $0.8 \mu\text{g/ml}$ 、 $\text{PH}=9.5 \sim 9.7$ 的溶液;

1.2 包被: 用步骤 1.1 制得的 EHF 包被液按 $100 \mu\text{l/孔}$ 对所述透明反应孔进行包被, 并在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 温度下静置 40 ~ 50 小时;

1.3 洗涤液制备: 将含有 0.05% 吐温-20、 $\text{pH}=7.5$ 的 PBS 溶液与蒸馏水按体积比 1:40 混合均匀, 制得洗涤液;

1.4 洗涤: 用洗涤液连续洗涤包被后的酶标板 2 次, 拍干;

1.5 封闭: 向洗涤后的透明反应孔内按 $130 \mu\text{l/孔}$ 加入封闭液, 所述封闭液为每 1000ml 纯水溶液中含 NaHCO_3 2.93g、 Na_2CO_3 1.59g、牛血清白蛋白 10g, 并在 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 条件下, 封闭 2.8 ~ 3.2 小时;

1.6 甩出孔中的封闭液, 加入保护液将反应孔密封, 所述保护液组成为: 9wt% ~ 11wt% 小牛血清和 89wt% ~ 91wt% 甘油, 制得 EHF 酶标板;

(2) EHF 酶结合物溶液的配制：

2.1 将 5mg 辣根过氧化物酶溶解在 1ml 双蒸水中,再加入 21.4mg/ml 的高碘酸钠溶液 200 μ l,在室温 18 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C 条件下混合均匀制备得到辣根过氧化物酶溶液；

2.2 再将辣根过氧化物酶溶液加入 PH4.4 的醋酸 - 冰乙酸缓冲液,在 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 条件下透析 16 ~ 20 小时；

2.3 取 EHF 抗原加入 pH=9.6、碳酸钠含量为 0.05mol/L 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲溶液,在 4 $^{\circ}$ C 条件下透析 16 ~ 20 小时；

2.4 将透析后的辣根过氧化物酶溶液和 EHF 抗原溶液混匀,放入 pH=9.6、碳酸钠含量为 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液中搅拌透析 3 ~ 3.5 小时,再加入 4mg/ml 的硼氢化钠溶液,加入量为 50 μ l/0.5mg EHF 抗原,并充分混匀；

2.5 使步骤 2.4 得到的混合溶液通过葡聚糖凝胶 G-200 柱,同时用 PH=7.1 的 PBS 溶液洗脱；

2.6 用小试管依次分段接收流出物,用事先包被好的羊抗鼠板条进行检测,收集试管内的羊抗鼠板条显兰色的试管内产物,制得酶结合物初溶液；

2.7 将 6g ~ 8g 氯化钠、140ml ~ 160ml 小牛血清和 0.8g ~ 1.2g 叠氮钠溶解在 1000ml 纯水中,混匀制得酶结合物稀释液；

2.8 将酶结合物初溶液用酶结合物稀释液按 1:700 稀释,并在 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C 静置 24 小时,再按兔抗羊 IgG - HRP 溶液与稀释后的酶结合物初溶液体积比为 1:5000 加入兔抗羊 IgG - HRP 溶液,制得 EHF 酶结合物溶液；

(3) 底物 A 溶液的配制

先将柠檬酸三钠 4.16g ~ 6.24g、柠檬酸 7.76g ~ 11.64g 和乙酸钠 7.13g ~ 10.70g 用纯水完全溶解,再加入 1.52ml ~ 2.28ml 的冰乙酸和 0.8ml ~ 1.2ml 的双氧水,最后用纯水定容至 1000ml,制得底物 A 溶液；

(4) 底物 B 溶液的配制

将 0.95g ~ 1.05g 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺溶解在 10ml 二甲基甲酰胺中,再加入 650ml 无水乙醇和 340ml 乙二醇,混匀,制得底物 B 溶液；

(5) 终止液的配制

向 900ml 纯水中加入 100ml 硫酸,混匀,制得终止液；

(6) EHF 阴性对照溶液的配制

将氯化钠 6g ~ 8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.2g ~ 3.4g、 KH_2PO_4 0.16g ~ 0.24g、氯化钾 0.16g ~ 0.24g 和蔗糖 40g ~ 60g 完全溶解在纯水中,再加入 0.8g ~ 1.2g 叠氮化钠,用纯水定容至 1000ml,制得 EHF 阴性对照溶液；

(7) EHF 阳性对照溶液的配制

向步骤(6)制得的 EHF 阴性对照溶液中加入羊抗兔抗体,加入量为每 1ml 阴性对照溶液中加入羊抗兔抗体 24 μ g ~ 36 μ g,制得 EHF 阳性对照溶液。

7. 如权利要求 1 所述的流行性出血热 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包括以下步骤：

(1) 样品收集

静置待测血清 30min,对所述待测血清进行离心处理 10 ~ 20 分钟,即可进行检测；

(2) 加样检测

a. 将在冷藏环境中贮藏的所述 EHF 酶结合物溶液瓶、底物 A 溶液瓶、底物 B 溶液瓶、EHF 阴性对照溶液瓶、EHF 阳性对照溶液瓶和终止液溶液瓶平衡至室温 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$;

b. 将所述 EHF 酶标板用生理盐水洗 3 次 ;

c. 采用生理盐水作为稀释液,按照 1:100 的比例稀释待检血清 ;

d. 将所述酶标板上的至少一个反应孔作为空白孔 ;取稀释后的待检血清按 $100 \mu\text{l}$ / 孔加入到所述酶标板上的至少一个反应孔内,作为样品孔 ;取 EHF 阳性对照溶液按 $100 \mu\text{l}$ / 孔加入到所述酶标板上的至少一个反应孔内,作为阳性对照孔 ;取 EHF 阴性对照液按 $100 \mu\text{l}$ / 孔加入到所述酶标板上的至少两个反应孔内,作为阴性对照孔 ;

e. 将所述 EHF 酶标板贴上封板膜,震荡混匀,置于 $36^{\circ}\text{C} \sim 38^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中反应 $29\text{min} \sim 31\text{min}$;

f. 取出所述 EHF 酶标板,揭下封板膜,向样品孔、阳性对照孔和阴性对照孔内各加入 $50 \mu\text{l}$ 酶结合物溶液,混匀,贴上封板膜,置于 $36^{\circ}\text{C} \sim 38^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中反应 $58\text{min} \sim 62\text{min}$;

g. 取出所述 EHF 酶标板,并揭下封板膜,用生理盐水洗涤各反应孔 5 次,每次间隔 15 秒 \sim 25 秒,拍干 ;

h. 依次向样品孔、阳性对照孔和阴性对照孔内各加入 $50 \mu\text{l}$ 底物溶液 A 和 $30 \mu\text{l}$ 底物溶液 B,混匀,贴上封板膜,室温 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 避光放置 $10 \sim 30$ 分钟,揭下封板膜,观察结果 : 若只判断检测样的阴阳性,采用目测方法,分别对比样品孔与阳性对照孔、阴性对照孔的颜色,即可得出检测结果 ;若需读出准确的检测数值,在步骤 g 后,向所述空白孔、样品孔、阳性对照孔和阴性对照孔内再分别加入 $50 \mu\text{l}$ 终止液,混匀后,使用酶标仪读取结果。

8. 如权利要求 7 所述的流行性出血热 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒的使用方法,其特征在于,如待测血清不能及时检测,应将待测血清在 $-20^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 条件冻存。

一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物学检测技术领域,具体涉及一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法。

背景技术

[0002] 流行性出血热(EHF) 又称肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS),是由布尼亚病毒科(Bunyaviridae) 汉坦病毒属(Hantavirus) 中某些病毒引起,并以鼠类为主要传染源的自然疫源性疾。临床上以发热、休克、充血性出血和急性肾功能衰竭为主要表现,并常伴有腔道出血、中枢神经系统并发症、肺水肿等多种并发症。肾综合征出血热分布于全世界 30 多个国家,疫源地分布于五大洲 70 多个国家,已成为世界公共卫生问题。我国是受肾综合征出血热危害最为严重的国家,年报告发病人数约为 4 ~ 6 万,占世界报告病例总数的 90% 以上,高发疫区发病率在 50/10 万左右,偶有暴发流行,病死率高达 30%。该病在我国分布范围广、疫区类型复杂,是我国最严重的虫媒传染病之一。

[0003] 汉坦病毒为分节段的负链 RNA 病毒,其基因组由大(L)、中(M)和小(S)三个 RNA 片段组成,分别编码依赖 RNA 的 RNA 多聚酶、包膜糖蛋白(G1 和 G2)和核壳体蛋白。汉坦病毒基因组 RNA 的 5' 端和 3' 端的 15 ~ 30 个碱基互补,这些互补序列可以保持 RNA 的稳定性,并可能在转录或复制的过程中被 RNA 聚合酶识别,启动合成新的 RNA。11 个碱基的最末端序列“TAGTAGTAGAC”为所有汉坦病毒所共有,是汉坦病毒的重要基因特征之一,是区分汉坦病毒和布尼亚病毒科其它病毒的重要依据。汉坦属病毒和布尼亚病毒科其它病毒在血清学上没有交叉反应。

[0004] 目前流行性出血热病毒抗体传统的检测方法是采用血清学诊断方法,包括间接酶免吸附试验检测 EHF IgG 抗体、胶体金法、免疫荧光试验检测双份血清 IgG 抗体等,这些方法均在一定程度上易出现假阳性或假阴性现象,给流行性出血热的临床诊断带来一定干扰。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是:提供一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法,使之具有以下优点:一、应用 IgM 捕获 ELISA 法检测 EHF IgM 抗体,以减少假阳性或假阴性现象对临床诊断带来的干扰,并且使该试剂盒能够对流行性出血热进行快速、准确的检测,同时误差小、检测灵敏度高、对检测设备要求低;二、提高试剂盒的使用安全性;三、提高反应板条的使用期限。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案是:

[0007] 一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒,包括盒体,其特征在于:所述盒体内设有 EHF 酶标板、封板膜、EHF 酶结合物溶液瓶、底物 A 溶液瓶、底物 B 溶液瓶、EHF

阴性对照溶液瓶、EHF 阳性对照溶液瓶和终止液溶液瓶；

[0008] 所述 EHF 酶标板上设有五个以上包被有固相抗人 IgM 单克隆抗体的透明反应孔；

[0009] 每 1000ml 所述底物 A 溶液内含有柠檬酸三钠 4.16g ~ 6.24g、柠檬酸 7.76g ~ 11.64g、乙酸钠 7.13g ~ 10.70g、冰乙酸 1.52ml ~ 2.28ml、双氧水 0.8ml ~ 1.2ml；

[0010] 每 1000ml 所述底物 B 溶液内含有无水乙醇 520ml ~ 780ml、乙二醇 272ml ~ 408ml、二甲基甲酰胺 8ml ~ 12ml、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 0.8g ~ 1.2g；

[0011] 每 1000ml 所述 EHF 阴性对照溶液内含有氯化钠 6g ~ 8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.2g ~ 3.4g、 KH_2PO_4 0.16g ~ 0.24g、氯化钾 0.16g ~ 0.24g、蔗糖 40g ~ 60g、叠氮化钠 0.08g ~ 0.12g；

[0012] 所述 EHF 阳性对照溶液是在每 1ml 所述 EHF 阴性对照溶液中加入 $24 \mu\text{g}$ ~ $36 \mu\text{g}$ 羊抗兔抗体配置而成；

[0013] 所述终止液是在 900ml 纯水中加入 80ml ~ 120ml 硫酸配置而成的。

[0014] 优选的,所述 EHF 酶标板上设有 5~95 个反应孔。

[0015] 优选的,所述 EHF 酶标板包括板架和多个可拆卸安装在所述板架上的反应板条,所述反应孔设置在所述反应板条上。

[0016] 优选的,所述盒体内部设有隔断,使所述盒体内部具有多个空腔。

[0017] 优选的,所述盒体内部设有一个横向隔断,使所述盒体分成一个上部用于容纳所述 EHF 酶结合物溶液瓶、底物 A 溶液瓶、底物 B 溶液瓶、EHF 阴性对照溶液瓶、EHF 阳性对照溶液瓶和终止液溶液瓶的空腔和一个底部用于容纳所述 EHF 酶标板的空腔。

[0018] 所述流行性出血热 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒的制备方法：

[0019] (1) EHF 酶标板的制备：

[0020] 1.1 配制 EHF 包被液：用碳酸钠—碳酸氢钠缓冲溶液将抗人 IgM 单克隆抗体溶液稀释成浓度为 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $\text{pH}=9.6$ 的溶液；

[0021] 1.2 包被：用步骤 1.1 制得的 EHF 包被液按 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 进行包被,并在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 温度下静置 40 ~ 50 小时；

[0022] 1.3 洗涤液制备：将含有 0.05% 吐温—20、 $\text{pH}=7.5$ 的 PBS 溶液与蒸馏水按体积比 1:40 混合均匀,制得洗涤液；

[0023] 1.4 洗涤：用洗涤液连续洗涤包被后的酶标板 2 次,拍干；

[0024] 1.5 封闭：向洗涤后的透明反应孔内按 $130 \mu\text{l}/\text{孔}$ 加入封闭液,所述封闭液为每 1000ml 纯水溶液中含 NaHCO_3 2.93g、 Na_2CO_3 1.59g、牛血清白蛋白 10g,并在 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 条件下,封闭 2.8 ~ 3.2 小时；

[0025] 1.6 甩出孔中的封闭液,加入保护液将反应孔密封,所述保护液组成为：9.5wt% ~ 10.5wt% 小牛血清和 89wt% ~ 91wt% 甘油,制得 EHF 酶标板；

[0026] (2) EHF 酶结合物溶液的配制：

[0027] 2.1 将 5mg 辣根过氧化物酶溶解在 1ml 双蒸水中,再加入 21.4mg/ml 的高碘酸钠溶液 $200 \mu\text{l}$,在室温 $18^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 条件下混合均匀制备得到辣根过氧化物酶溶液；

[0028] 2.2 再将辣根过氧化物酶溶液加入 $\text{pH}4.4$ 的醋酸—冰乙酸缓冲液,在 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 条件下透析 16 ~ 20 小时；

[0029] 2.3 取 EHF 抗原加入 $\text{pH}=9.6$ 、碳酸钠含量为 $0.05\text{mol}/\text{L}$ 的碳酸钠—碳酸氢钠缓冲

溶液,在 4℃条件下透析 16 ~ 20 小时;

[0030] 2.4 将透析后的辣根过氧化物酶溶液和 EHF 抗原溶液混匀,放入 pH=9.6、碳酸钠含量为 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液中搅拌透析 3 ~ 3.5 小时,再加入 4mg/ml 的硼氢化钠溶液,加入量为 50 μ l/0.5mg EHF 抗原,并充分混匀;

[0031] 2.5 使步骤 2.4 得到的混合溶液通过葡聚糖凝胶 G-200 柱,同时用 PH=7.1 的 PBS 溶液洗脱;

[0032] 2.6 用小试管依次分段接收流出物,用事先包被好的羊抗鼠板条进行检测,收集试管内的羊抗鼠板条显兰色的试管内产物,制得酶结合物初溶液;

[0033] 2.7 将 6g ~ 8g 氯化钠、140ml ~ 160ml 小牛血清和 0.8g ~ 1.2g 叠氮钠溶解在 1000ml 纯水中,混匀制得酶结合物稀释液;

[0034] 2.8 将酶结合物初溶液用酶结合物稀释液按 1:700 稀释,并在 2℃ ~ 8℃ 静置 24 小时,再按免抗羊 IgG - HRP 溶液与稀释后的酶结合物初溶液体积比为 1:5000 加入免抗羊 IgG - HRP 溶液,制得 EHF 酶结合物溶液;

[0035] (3) 底物 A 溶液的配制

[0036] 先将柠檬酸三钠 4.16g ~ 6.24g、柠檬酸 7.76g ~ 11.64g 和乙酸钠 7.13g ~ 10.70g 用纯水完全溶解,再加入 1.52ml ~ 2.28ml 的冰乙酸和 0.8ml ~ 1.2ml 的双氧水,最后用纯水定容至 1000ml,制得底物 A 溶液;

[0037] (4) 底物 B 溶液的配制

[0038] 将 0.95g ~ 1.05g 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶解在 10ml 二甲基甲酰胺中,再加入 650ml 无水乙醇和 340ml 乙二醇,混匀,制得底物 B 溶液;

[0039] (5) 终止液的配制

[0040] 向 900ml 纯水中加入 100ml 硫酸,混匀,制得终止液;

[0041] (6) EHF 阴性对照溶液的配制

[0042] 将氯化钠 6g ~ 8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.2g ~ 3.4g、 KH_2PO_4 0.16g ~ 0.24g、氯化钾 0.16g ~ 0.24g 和蔗糖 40g ~ 60g 完全溶解在纯水中,再加入 0.8g ~ 1.2g 叠氮化钠,用纯水定容至 1000ml,制得 EHF 阴性对照溶液;

[0043] (7) EHF 阳性对照溶液的配制

[0044] 向步骤(6)制得的 EHF 阴性对照溶液中加入羊抗兔抗体,加入量为每 1ml 阴性对照溶液中加入羊抗兔抗体 24 μ g ~ 36 μ g,制得 EHF 阳性对照溶液。

[0045] 所述流行性出血热 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0046] (1) 样品收集

[0047] 静置待测血清 30min,对所述待测血清进行离心处理 10 ~ 20 分钟,即可进行检测。

[0048] (2) 加样检测

[0049] a. 将在冷藏环境中贮藏的所述 EHF 酶结合物溶液瓶、底物 A 溶液瓶、底物 B 溶液瓶、EHF 阴性对照溶液瓶、EHF 阳性对照溶液瓶和终止液溶液瓶平衡至室温 20℃ ~ 25℃;

[0050] b. 将所述 EHF 酶标板用生理盐水洗 3 次;

[0051] c. 采用生理盐水作为稀释液,按照 1:100 的比例稀释待检血清;

[0052] d. 将所述酶标板上的至少一个反应孔作为空白孔;取稀释后的待检血清按 100 μ l/孔加入到所述酶标板上的至少一个反应孔内,作为样品孔;取 EHF 阳性对照溶液按

100 μ l/ 孔加入到所述酶标板上的至少一个反应孔内,作为阳性对照孔;取 EHF 阴性对照液按 100 μ l/ 孔加入到所述酶标板上的至少两个反应孔内,作为阴性对照孔;

[0053] e. 将所述 EHF 酶标板贴上封板膜,震荡混匀,置于 36 $^{\circ}$ C ~ 38 $^{\circ}$ C 恒温水浴中反应 29min ~ 31min;

[0054] f. 取出所述 EHF 酶标板,揭下封板膜,向样品孔、阳性对照孔和阴性对照孔内各加入 50 μ l 酶结合物溶液,混匀,贴上封板膜,置于 36 $^{\circ}$ C ~ 38 $^{\circ}$ C 恒温水浴中反应 58min ~ 62min;

[0055] g. 取出所述 EHF 酶标板,并揭下封板膜,用生理盐水洗涤各反应孔 5 次,每次间隔 15 秒 ~ 25 秒,拍干;

[0056] h. 依次向样品孔、阳性对照孔和阴性对照孔内各加入 50 μ l 底物溶液 A 和 30 μ l 底物溶液 B,混匀,贴上封板膜,室温 20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C 避光放置 10~30 分钟,揭下封板膜,观察结果:若只判断检测样的阴阳性,采用目测方法,分别对比样品孔与阳性对照孔、阴性对照孔的颜色,即可得出检测结果;若需读出准确的检测数值,在步骤 g 后,向所述空白孔、样品孔、阳性对照孔和阴性对照孔内再分别加入 50 μ l 终止液,混匀后,使用酶标仪读取结果。

[0057] 优选的,如待测血清不能及时检测,应将待测血清在 -20 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C 条件冻存。

[0058] 采用上述技术方案后,本发明的有益效果是:由于本发明采用 ELISA 法 IgM 捕获法检测 EHF IgM 抗体,若待测血清中含有流行性出血热病毒,则流行性出血热病毒 IgM 抗体即与 EHF 酶结合物、抗人 -IgM 单抗结合,并结合在微孔壁表面,通过底物作用显色,用以特异性的检测待测血清中的流行性出血热 IgM 抗体,检测出流行性出血热病毒,与 ELISA 法间接法等其他方法相比,本发明灵敏度高、特异性强,实验操作仅需一步即可出结果,因此,本发明不但减少了假阳性或假阴性现象对临床诊断带来的干扰,使该试剂盒能够对流行性出血热进行快速、准确的检测,而且误差小、检测灵敏度高、对检测设备要求低;还由于本发明采用了所述酶标板和各种溶液的配方,使得本发明试剂盒的检测结果的准确程度是目前市场上其它出血热检测试剂所达不到的;本发明试剂盒阳性对照溶液为非传染性 EHF 阳性血清,对实验操作者安全;另外,本发明酶标板反应板条内含有甘油,因而无需干燥储存,也不会因其储存过程中受潮而失效,大大提高了反应板条储存的有效期。

附图说明

[0059] 图 1 为本发明实施例打开后俯视图;

[0060] 图 2 为本发明实施例内部正视示意图;

[0061] 图 3 为本发明实施例酶标板的示意图;

[0062] 其中,1、盒体;2、EHF 酶结合物溶液瓶;3、底物 A 溶液瓶;4、底物 B 溶液瓶;5、EHF 阴性对照溶液瓶;6、EHF 阳性对照溶液瓶;7、终止液溶液瓶;8、透明反应孔;9、板架;10、反应板条;11、横向隔断;12、纵向隔断。

具体实施例

[0063] 实施例 1

[0064] 一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒

[0065] 如图 1、图 2 和图 3 所示,本实施例试剂盒包括盒体 1,盒体 1 内设有 EHF 酶标板(如

图 3 所示)、封板膜、EHF 酶结合物溶液瓶 2、底物 A 溶液瓶 3、底物 B 溶液瓶 4、EHF 阴性对照溶液瓶 5、EHF 阳性对照溶液瓶 6 和终止液溶液瓶 7；

[0066] EHF 酶标板上设有多个包被有固相抗人 IgM 单克隆抗体的透明反应孔 8；

[0067] 每 1000ml 底物 A 溶液内含有柠檬酸三钠 5.2g、柠檬酸 9.7g、乙酸钠 8.92g、冰乙酸 1.9ml、双氧水 1ml；

[0068] 每 1000ml 底物 B 溶液内含有无水乙醇 650ml、乙二醇 340ml、二甲基甲酰胺 10ml、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(简称 TMB) 1g；

[0069] 每 1000ml EHF 阴性对照溶液内含有氯化钠 7g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.8g、 KH_2PO_4 0.2g、 KCl 0.2g、蔗糖 50g、叠氮化钠 0.1g；

[0070] EHF 阳性对照溶液是在每 1ml 所述 EHF 阴性对照溶液中加入 30 μg 的羊抗兔抗体配制而成的；

[0071] 终止液是在 900ml 纯水中加入硫酸 100ml 配制而成的,所用硫酸为质量百分比为 98% 的浓硫酸。

[0072] EHF 酶标板上设有 48 个反应孔。

[0073] EHF 酶标板包括板架 9 和多个可拆卸安装在板架 9 上的反应板条 10,透明反应孔 8 设置在反应板条 10 上。盒体 1 内部设有一个横向隔断 11,使盒体分成一个上部用于容纳 EHF 酶结合物溶液瓶 2、底物 A 溶液瓶 3、底物 B 溶液瓶 4、EHF 阴性对照溶液瓶 5、EHF 阳性对照溶液瓶 6 和终止液溶液瓶 7 的空腔和一个底部用于容纳板架 9 的空腔,横向隔断 11 为硬质材料,盒体 1 上部空腔设有还有一个纵向隔断 12,底物 A 溶液瓶 3 和底物 B 溶液瓶 4 放入其中的一个空腔,其他溶液瓶放置于另一个空腔。

[0074] 实施例 2

[0075] 一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒

[0076] 本实施例中：

[0077] 每 1000ml 底物 A 溶液内含有柠檬酸三钠 4.16g、柠檬酸 7.76g、乙酸钠 7.13g、冰乙酸 1.52ml、双氧水 0.8ml；

[0078] 每 1000ml 底物 B 溶液内含有无水乙醇 520ml、乙二醇 272ml、二甲基甲酰胺 8ml、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 0.8g；

[0079] 每 1000ml EHF 阴性对照溶液内含有氯化钠 6g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 KH_2PO_4 0.16g、氯化钾 0.16g、蔗糖 40g、叠氮化钠 0.08g；

[0080] EHF 阳性对照溶液是在每 1ml 所述 EHF 阴性对照溶液中加入 24 μg 的羊抗兔抗体配制而成的；

[0081] 终止液是在 900ml 纯水中加入硫酸 80ml 配制而成的,所用硫酸为质量百分比为 98% 的浓硫酸；

[0082] EHF 酶标板上设有 5 个反应孔。

[0083] 其余同实施例 1。

[0084] 实施例 3

[0085] 一种流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒

[0086] 本实施例中：

[0087] 每 1000ml 底物 A 溶液内含有柠檬酸三钠 6.24g、柠檬酸 11.64g、乙酸钠 10.70g、冰

乙酸 2.28ml、双氧水 1.2ml；

[0088] 每 1000ml 底物 B 溶液内含有无水乙醇 780ml、乙二醇 408ml、二甲基甲酰胺 12ml、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 1.2g；

[0089] 每 1000ml EHF 阴性对照溶液内含有氯化钠 8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.4g、 KH_2PO_4 0.24g、氯化钾 0.24g、蔗糖 60g、叠氮化钠 0.12g；

[0090] EHF 阳性对照溶液是在每 1ml 所述 EHF 阴性对照溶液中加入 36 μg 的羊抗兔抗体配制而成的；

[0091] 终止液是在 900ml 纯水中加入硫酸 120ml 配制而成的，所用硫酸为质量百分比为 98% 的浓硫酸。

[0092] EHF 酶标板上设有 95 个反应孔。

[0093] 其余同实施例 1。

[0094] 实施例 4

[0095] 流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒制备方法

[0096] 本实施例中微孔板中所包被的兔抗人 -IgM 单抗在碱性环境下可以很好的结合在微孔板塑料表面上，采用的包被抗原浓度为 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，本实施例中 EHF 酶标板由板架和多个可拆卸安装在板架上的反应板条组成。

[0097] 制备如实施例 1 所述的流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒，具体制备步骤如下：

[0098] (1) EHF 反应板条的制备：

[0099] 1.1 EHF 包被液的配制：用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液（配方：0.159g Na_2CO_3 +0.293g Na_2HCO_3 定容至 100ml）将 3.42mg/ml 的兔抗人 -IgM 单抗溶液稀释成 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，PH=9.6；

[0100] 1.2 包被量：EHF 反应板条均按 100 μl /孔包被，待全部包被完毕，置 2~8℃ 静置、吸附 48 小时；

[0101] 1.3 洗涤液制备：将含有 0.05%（体积含量）吐温-20、pH=7.5 的 PBS 溶液与蒸馏水按体积比 1:40 混合均匀，制得洗涤液。

[0102] 1.4 洗涤：用洗涤液连续洗涤包被后的反应板条 2 次，拍干。

[0103] 1.5 封闭：分别将上述洗涤后的反应板条加封闭液 130 μl /孔，室温 20~25℃ 封闭 3 小时；封闭液组成配方为： NaHCO_3 2.93g+ Na_2CO_3 1.59g+BSA 10g，纯水定容 1000ml；

[0104] 1.6 甩出孔中的封闭液，加入保护液将反应孔密封，所述保护液组成为：10wt% 小牛血清和 90wt% 甘油，制得 EHF 反应板条；

[0105] 分别将上述处理后的板条装入铝箔袋，封口，2~8℃ 保存备用。

[0106] (2) EHF 酶结合物的制备包括以下步骤：

[0107] 2.1 称取辣根过氧化物酶倒入一棕色小玻璃瓶内，取 1ml 双蒸水溶解，用加样器取 200 μl 高碘酸钠溶液，滴入盛辣根过氧化物酶的小瓶内，将 5mg 辣根过氧化物酶溶解在 1ml 双蒸水中，再加入 21.4mg/ml 的高碘酸钠溶液 200 μl ，在室温 18℃~25℃ 振荡 20min 制备得到辣根过氧化物酶溶液；

[0108] 2.2 振荡好的辣根过氧化物酶溶液取入透析袋，放入配制好的 PH4.4 醋酸缓冲液中，4℃ 冰箱透析 18 小时；

[0109] 2.3 取 EHF 抗原放入另一透析袋中，加入 pH=9.6、碳酸钠含量为 0.05mol/L 的碳酸

钠—碳酸氢钠缓冲溶液,在 4℃条件下透析 18 小时;

[0110] 2.4 将透析后的辣根过氧化物酶溶液和 EHF 抗原溶液混匀,放入 pH=9.6、碳酸钠含量为 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液中搅拌透析 3 小时,再加入 4mg/ml 的硼氢化钠溶液,加入量为 50 μ l/0.5mg EHF 抗原,并充分混匀;

[0111] 2.5 使步骤 2.4 得到的混合溶液通过葡聚糖凝胶 G-200 柱,同时用 PH=7.1 的 PBS 溶液洗脱;

[0112] 2.6 用小试管依次分段接收流出物,用事先包被好的羊抗鼠板条进行检测,收集试管内的羊抗鼠板条显兰色的试管内产物,制得酶结合物初溶液。

[0113] 也可将收集的酶结合物加入等量甘油混匀(甘油能更好的稳定酶结合物活性),放置于 -20℃冰箱保存。

[0114] 2.7 将 7g 氯化钠、150ml 小牛血清和 1.0g 叠氮钠溶解在 1000ml 纯水中,混匀制得酶结合物稀释液;

[0115] 2.8 将酶结合物初溶液用酶结合物稀释液按 1:700 稀释,并在 6℃静置 24 小时,再按兔抗羊 IgG — HRP 溶液与稀释后的酶结合物初溶液体积比为 1:5000 加入兔抗羊 IgG — HRP 溶液,制得 EHF 酶结合物溶液,装入试剂瓶冷藏备用。

[0116] (3) 底物 A 的配制

[0117] 用电子天平准确称量柠檬酸三钠 5.2g、柠檬酸 9.7g、乙酸钠 8.92g 加入容量瓶中;先加适量纯水,轻摇使之完全溶解;再用移液器准确量取冰乙酸 1.9ml、双氧水 1ml 加入容量瓶中,轻摇混匀;以纯水定容至 1000ml。

[0118] (4) 底物 B 的配制

[0119] 用电子天平准确称取 TMB1g,倒入有色广口瓶中;用移液器准确量取二甲基甲酰胺 10ml,加入有色广口瓶中,轻摇使 TMB 混匀;用量筒准确量取无水乙醇 650ml、乙二醇 340ml,倒入广口瓶中,摇匀,定容至 1000ml。

[0120] (5) 终止液的配制

[0121] 用量筒准确量取所需的纯水 900ml,倒入广口瓶中;再用量筒准确量取浓硫酸(质量百分比为 98% 以上) 100ml,边搅拌边慢慢倒入广口瓶中;扣上瓶盖,轻摇广口瓶,使液体混匀。

[0122] (6) EHF 阴性对照的配制

[0123] 用电子天平准确称量 NaCl7g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.8g、 KH_2PO_4 0.2g、KCl 0.2g、蔗糖 50g,加入容量瓶;先加适量纯水,轻摇使之溶解完全;再用电子天平准确称量叠氮化钠 0.1g,加入容量瓶,搅拌使之完全溶解,轻摇混匀;以纯水定容,混匀备用。

[0124] (7) EHF 阳性对照的配制

[0125] 向步骤(6)制得的 EHF 阴性对照溶液中加入羊抗兔抗体,加入量为每 1ml EHF 阴性对照溶液中加入羊抗兔抗体 30 μ g,制得阳性对照溶液。

[0126] 实施例 5

[0127] 流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒制备方法

[0128] 本实施例同实施例 4,不同之处在于:

[0129] (1) EHF 反应板条的制备:

[0130] 1.2 包被量:EHF 反应板条均按 100 μ l/孔包被,待全部包被完毕,置 2~8℃静置、

吸附 40 小时；

[0131] 1.5 封闭：分别将上述洗涤后的反应板条加封闭液 130 μ l/孔，室温 20 ~ 25 $^{\circ}$ C 封闭 2.8 小时；封闭液组成配方为：NaHCO₃2.93g+Na₂CO₃1.59g+BSA10g，纯水定容 1000ml；

[0132] 1.6 甩出孔中的封闭液，加入保护液将反应孔密封，所述保护液组成为：9.5wt% 小牛血清和 91wt% 甘油，制得 EHF 反应板条；

[0133] (2) EHF 酶结合物的制备包括以下步骤：

[0134] 2.2 振荡好的辣根过氧化物酶溶液取入透析袋，放入配制好的 PH4.4 醋酸缓冲液中，4 $^{\circ}$ C 冰箱透析 16 小时；

[0135] 2.3 取 EHF 抗原放入另一透析袋中，加入 pH=9.6、碳酸钠含量为 0.05mol/L 的碳酸钠—碳酸氢钠缓冲溶液，在 4 $^{\circ}$ C 条件下透析 18 小时；

[0136] 2.7 将 6g 氯化钠、140ml 小牛血清和 0.8g 叠氮钠溶解在 1000ml 纯水中，混匀制得酶结合物稀释液；

[0137] 2.8 将酶结合物初溶液用酶结合物稀释液按 1:700 稀释，并在 2 $^{\circ}$ C 静置 24 小时，再按兔抗羊 IgG—HRP 溶液与稀释后的酶结合物初溶液体积比为 1:5000 加入兔抗羊 IgG—HRP 溶液，制得 EHF 酶结合物溶液，装入试剂瓶冷藏备用。

[0138] (3) 底物 A 的配制

[0139] 用电子天平准确称量柠檬酸三钠 4.16g、柠檬酸 7.76g、乙酸钠 7.13g 加入容量瓶中；先加适量纯水，轻摇使之完全溶解；再用移液器准确量取冰乙酸 1.52ml、双氧水 0.8ml 加入容量瓶中，轻摇混匀；以纯水定容至 1000ml。

[0140] (6) 阴性对照的配制

[0141] 用电子天平准确称量 NaCl6g、Na₂HPO₄·12H₂O2.2g、KH₂PO₄0.16g、KCl0.16g、蔗糖 40g，加入容量瓶；先加适量纯水，轻摇使之溶解完全；再用电子天平准确称量叠氮化钠 0.8g，加入容量瓶，搅拌使之完全溶解，轻摇混匀；以纯水定容，混匀备用。

[0142] (7) 阳性对照的配制

[0143] 向步骤(6)制得的阴性对照溶液中加入羊抗兔抗体，加入量为每 1ml 阴性对照溶液中加入羊抗兔抗体 24 μ g，制得阳性对照溶液。

[0144] 实施例 6

[0145] 流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒制备方法

[0146] 本实施例同实施例 4，不同之处在于：

[0147] (1) EHF 反应板条的制备：

[0148] 1.2 包被量：EHF 反应板条均按 100 μ l/孔包被，待全部包被完毕，置 8 $^{\circ}$ C 静置、吸附 50 小时；

[0149] 1.5 封闭：分别将上述洗涤后的反应板条加封闭液 130 μ l/孔，室温 20 ~ 25 $^{\circ}$ C 封闭 3.2 小时；封闭液组成配方为：NaHCO₃2.93g+Na₂CO₃1.59g+BSA10g，纯水定容 1000ml；

[0150] 1.6 甩出孔中的封闭液，加入保护液将反应孔密封，所述保护液组成为：10.5wt% 小牛血清和 89.5wt% 甘油，制得 EHF 反应板条；

[0151] (2) EHF 酶结合物的制备包括以下步骤：

[0152] 2.2 振荡好的辣根过氧化物酶溶液取入透析袋，放入配制好的 PH4.4 醋酸缓冲液中，4 $^{\circ}$ C 冰箱透析 20 小时；

[0153] 2.3 取 EHF 抗原放入另一透析袋中,加入 pH=9.6、碳酸钠含量为 0.05mol/L 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液,在 4℃ 条件下透析 20 小时;

[0154] 2.7 将 8g 氯化钠、160ml 小牛血清和 1.2g 叠氮钠溶解在 1000ml 纯水中,混匀制得酶结合物稀释液;

[0155] 2.8 将酶结合物初溶液用酶结合物稀释液按 1:700 稀释,并在 8℃ 静置 24 小时,再按兔抗羊 IgG - HRP 溶液与稀释后的酶结合物初溶液体积比为 1:5000 加入兔抗羊 IgG - HRP 溶液,制得 EHF 酶结合物溶液,装入试剂瓶冷藏备用。

[0156] (3) 底物 A 的配制

[0157] 用电子天平准确称量柠檬酸三钠 6.24g、柠檬酸 11.64g、乙酸钠 10.7g 加入容量瓶中;先加适量纯水,轻摇使之完全溶解;再用移液器准确量取冰乙酸 2.28ml、双氧水 1.2ml 加入容量瓶中,轻摇混匀;以纯水定容至 1000ml。

[0158] (6) 阴性对照的配制

[0159] 用电子天平准确称量氯化钠 8g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.4g、KH₂PO₄ 0.24g、氯化钾 0.24g、蔗糖 60g,加入容量瓶;先加适量纯水,轻摇使之溶解完全;再用电子天平准确称量叠氮化钠 1.2g,加入容量瓶,搅拌使之完全溶解,轻摇混匀;以纯水定容,混匀备用。

[0160] (7) 阳性对照的配制

[0161] 向步骤(6)制得的阴性对照溶液中加入羊抗兔抗体,加入量为每 1ml 阴性对照溶液中加入羊抗兔抗体 36 μg,制得阳性对照溶液。

[0162] 实施例 8

[0163] 流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒使用方法

[0164] 实施例 1 所述的流行性出血热病毒 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒的使用方法:

[0165] (1) 样品收集

[0166] 静置待测血清 30min,对所述待测血清进行离心处理 10 ~ 20 分钟,进行检测。

[0167] (2) 加样检测

[0168] a. 将在冷藏环境中贮藏的 EHF 酶结合物溶液瓶、底物 A 溶液瓶、底物 B 溶液瓶、EHF 阴性对照溶液瓶、EHF 阳性对照溶液瓶和终止液溶液瓶等试剂平衡至室温 20℃ ~ 25℃;

[0169] b. 将所述 EHF 酶标板用生理盐水洗 3 次;

[0170] c. 采用生理盐水作为稀释液,按照 1:100 的比例分别稀释待检血清、阴性对照溶液和阳性对照溶液;

[0171] d. 将所述酶标板上的一个反应孔作为空白孔;取稀释后的待检血清按 100 μl/孔加入到所述酶标板上的一个反应孔内,作为样品孔;取稀释后的阳性对照溶液按 100 μl/孔加入到所述酶标板上的一个反应孔内,作为阳性对照孔;取稀释后的待检血清按 100 μl/孔加入到所述酶标板上的两个反应孔内,作为阴性对照孔;

[0172] e. 将所述 EHF 酶标板贴上封板膜,震荡混匀,置于 36℃ ~ 38℃ 恒温水浴中反应 30min;

[0173] f. 取出所述 EHF 酶标板,揭下封板膜,向样品孔、阳性对照孔和阴性对照孔内各加入 50 μl 酶结合物溶液,混匀,贴上封板膜,置于 36℃ ~ 38℃ 恒温水浴中反应 60min;

[0174] g. 取出所述 EHF 酶标板,并揭下封板膜,用生理盐水洗涤各反应孔 5 次,每次间隔 20 秒,拍干;

[0175] h. 依次向样品孔、阳性对照孔和阴性对照孔内各加入 50 μ l 底物溶液 A, 30 μ l 底物溶液 B, 混匀, 贴上封板膜, 室温 20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C 避光放置 20 分钟, 揭下封板膜, 观察结果: 若只判断检测样的阴阳性, 采用目测方法, 分别对比样品孔与阳性对照孔、阴性对照孔的颜色, 即可得出检测结果; 若需读出准确的检测数值, 在步骤 f 后, 向样品孔内再加入 50 μ l 终止液, 混匀后, 使用酶标仪读取结果;

[0176] (3) 检测结果分析

[0177] 在 450nm 波长下用空白孔调零读取各孔的吸光度值, 并按如下计算方法, 得出检测结果:

[0178] 当阴性对照孔的平均吸光度值小于 0.10 时, 临界值为 0.10; 当阴性对照孔平均吸光度值大于 0.10 时, 临界值 = 3 \times 阴性对照计算平均吸光度值;

[0179] a. 比色法:

[0180] 若样品孔吸光度值 \geq 临界值, 检测结果为阳性;

[0181] 若样品孔吸光度值 $<$ 临界值, 检测结果为阴性;

[0182] b. 比值法

[0183] 若样品孔吸光度值 / 临界值 \geq 1, 检测结果为阳性;

[0184] 若样品孔吸光度值 / 临界值 $<$ 1, 检测结果为阴性;

[0185] 当阴性对照孔平均吸光度值 / 临界吸光度值 $<$ 0.33, 并且阳性对照孔平均吸光度值 / 临界吸光度值 \geq 6.0 时, 则检测结果有效, 否则应当重复试验。

[0186] 本发明流行性出血热酶联免疫检测试剂盒的性能指标测试:

[0187] (1) 阴性参考品符合率: 用 10 份该试剂阴性参考品检测, 检测结果全部成阴性。

[0188] (2) 阳性参考品符合率: 用 10 份该试剂阳性参考品检测 (包括强、中、弱) 检测, 检测结果全部成阳性。

[0189] (3) 精密性: 用 1 份精密性参考品做 10 个测试, CV 值不高于 10%。

[0190] (4) 临床实验结果: 用本试剂盒检测已确诊的临床样本 1000 例 (其中 EHF 阳性 50 例), 检测结果显示, 阴性符合率 100%, 阳性符合率 100%, 总符合率 100%。

[0191] 检测实例: 共检测临床血清样本 1000 例 (其中 EHF 阳性 50 例), 使用本发明方法进行检测, 其特异性和敏感性均为 100%。

[0192] 表 1 本发明 EHF 试剂盒检测结果与临床诊断结果比较

EHF 试剂盒 检测结果	临床诊断		合计
	阳性	阴性	
阳性	50	0	50
阴性	0	950	950
合计	50	950	1000

[0194] 本发明不局限于上述具体的实施方式, 本领域的普通技术人员从上述构思出发, 不经过创造性的劳动, 所作出的种种变换, 均落在本发明的保护范围之内。

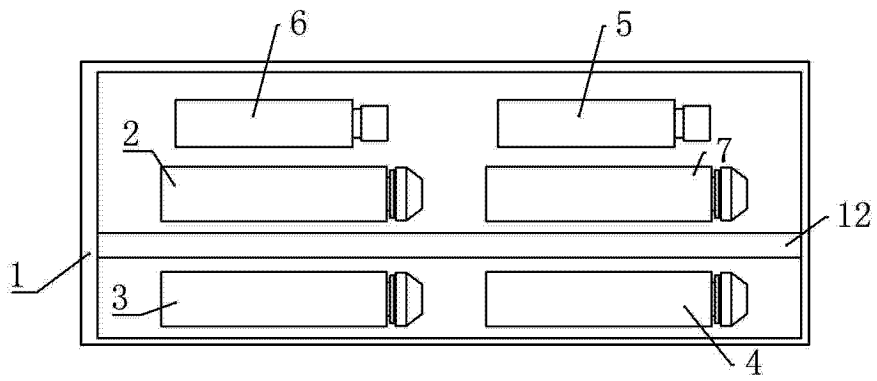


图 1

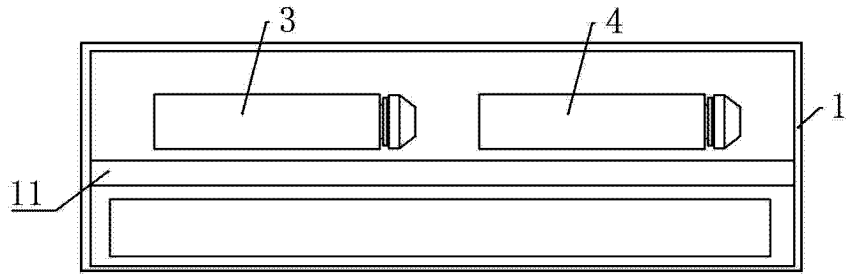


图 2

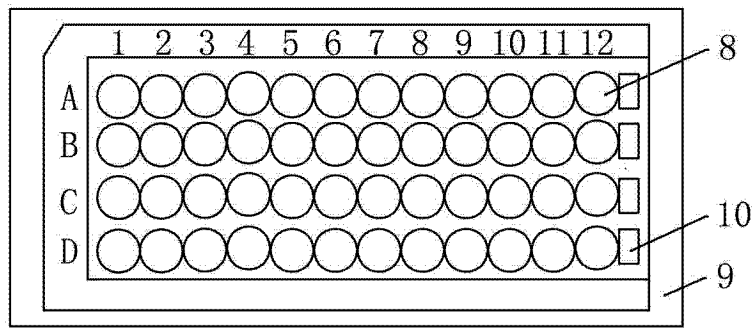


图 3

专利名称(译)	一种流行性出血热病毒IgM抗体酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法		
公开(公告)号	CN103063841A	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN201210572128.6	申请日	2012-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	潍坊市康华生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	潍坊市康华生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	潍坊市康华生物技术有限公司		
[标]发明人	杨致亭 杨爱香 王春光 沈孝功 刘发新 刘海波 邱香廷 宋玉翠		
发明人	杨致亭 杨爱香 王春光 沈孝功 刘发新 刘海波 邱香廷 宋玉翠		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	王伟霞		
其他公开文献	CN103063841B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种流行性出血热病毒IgM抗体酶联免疫检测试剂盒及其制备和使用方法，包括盒体，所述盒体内设有EHF酶标板、封板膜、EHF酶结合物溶液瓶、底物A溶液瓶、底物B溶液瓶、EHF阴性对照溶液瓶、EHF阳性对照溶液瓶和终止液溶液瓶。本发明采用IgM捕获ELISA法检测EHF IgM抗体，以减少假阳性或假阴性现象对临床诊断带来的干扰，并且使该试剂盒能够对流行性出血热进行快速、准确的检测，同时误差小、检测灵敏度高、对检测设备要求低。

