



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101846681 A

(43) 申请公布日 2010.09.29

(21) 申请号 200910071342.1

(22) 申请日 2009.01.24

(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 33/536 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 9 页

(54) 发明名称

动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体
检测试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒。动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒各组份组成如下：(1) 布鲁氏菌 FITC 标记抗原 100ml；(2) 动物布鲁氏菌病标准阴性血清 0.2ml；(3) 动物布鲁氏菌病标准阳性血清 0.2ml；(4) 标准弱阳性血清 0.2ml；(5) 10 倍样品稀释液 100ml。本发明动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒，利用平滑型布鲁氏菌的脂多糖中的多糖 OPS 作抗原标记荧光素 FITC，用灭活菌液免疫健康牛或人工感染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，样品稀释液，组装组成。用于区分哺乳动物布鲁氏菌感染抗体和免疫抗体。

1. 一种动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒,其特征在于:动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒各组份组成如下:

- | | |
|--------------------|-------|
| (1) 布鲁氏菌 FITC 标记抗原 | 100ml |
| (2) 动物布鲁氏菌病标准阴性血清 | 0.2ml |
| (3) 动物布鲁氏菌病标准阳性血清 | 0.2ml |
| (4) 标准弱阳性血清 | 0.2ml |
| (5) 10 倍样品稀释液 | 100ml |

2. 根据权利要求 1 所述的一种动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述的动物布鲁氏菌病标准阴性血清制备方法是:

(1) 制造用动物:制备阳性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;

(2) 免疫原制备:将布氏杆菌 S413 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,倾入中性玻瓶中,加甲醛溶液至终浓度为 0.2%,置 37°C 振荡灭活 48 小时,按中国兽药典进行无菌检验合格,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;

(3) 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_{450nm} 和阴性血清 OD_{450nm} 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;

(4) 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...1:128 稀释,用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验,取待检血清 OD_{650nm}/质控强阳性血清 OD_{650nm} 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。

3. 根据权利要求 1 所述的一种动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述的动物布鲁氏菌病标准阳性血清制备方法是:

(1) 制造用动物:制备阳性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;

(2) 免疫原制备:将布氏杆菌 S413 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,倾入中性玻瓶中,加甲醛溶液至终浓度为 0.2%,置 37°C 振荡灭活 48 小时,按中国兽药典进行无菌检验合格,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;

(3) 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_{450nm} 和阴性血清 OD_{450nm} 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;

(4) 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...1:128 稀释,用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验,取待检血清

OD_{650nm}/质控强阳性血清 OD_{650nm} 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;

(5) 分装将血清用 0.45 μm 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,贴上标签。

4. 根据权利要求 1 所述的一种动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法-FPA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述弱阳性血清制备方法是:将强阳性血清用样品稀释液作 1 : 1.5 稀释。

5. 根据权利要求 1 所述的一种动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法-FPA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述的 10 倍样品稀释液制备方法如下:氯化钠:8.5 克;Tris:12.1 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。

6. 根据权利要求 1 所述的一种动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法-FPA 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述的布鲁氏菌 FITC 标记抗原制备方法如下:

(一) 生产用菌种制备

(1) 一级种子制备及鉴定 将冻干 B. abortus S1119.3 株用等量灭菌生理盐水溶解,接种马铃薯浸液琼脂斜面,在 37°C 培养 48 小时;观察菌落形态,选取符合 1.1.2.1 和 1.1.2.2 项光滑型培养特性的菌落,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°C 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°C 保存,使用期不超过 2 年;

(2) 二级种子繁殖 取一级种子按 1.2.1.2 项分别接种于马铃薯浸液琼脂 37°C 培养 72 小时,收获细菌培养物;按 1.1.2 项菌种标准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°C ~ 8°C 保存,使用期不超过 1 年;

(二) 抗原制备

(1) 菌悬液制备 分别将鉴定合格的 B. abortus S1119.3 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 1.1.2.5 项变异检查,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瓶中;

(2) 菌液灭活 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;

(3) 抗原提取 将灭活菌液以 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% (V/V) 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;

(4) 裂解、标记、分装与冻干 将粗抗原称重,以 3mg/mL 的含量悬浮于 0.1M 的氢氧化钠中,然后于 37°C 水浴中孵育 1 小时后;加入 0.3ML 的 FITC,37°C 水浴中孵育 1 小时;用 0.01M 的磷酸溶液平衡的 DEAE 凝胶柱纯化,去掉大约 10--15ML 的磷酸溶液后,可收集 25-40ML 的

FITC 标记的抗原 ; 稀释成荧光密度 mp 为 250,000--300,000 后, 以 1ml/ 瓶的量分装储存 4℃, 或冻干。

动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及动物学,具体说就是动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 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”,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O: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。

(三) 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种利用平滑型布鲁氏菌的脂多糖中的多糖 OPS 作抗原标记荧光素 FITC, 用灭活菌液免疫健康牛或人工感染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的动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒。

[0009] 本发明的目的是这样实现的: 动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒各组份组成如下:

- | | | |
|--------|--------------------|-------|
| [0010] | (1) 布鲁氏菌 FITC 标记抗原 | 100ml |
| [0011] | (2) 动物布鲁氏菌病标准阴性血清 | 0.2ml |
| [0012] | (3) 动物布鲁氏菌病标准阳性血清 | 0.2ml |
| [0013] | (4) 标准弱阳性血清 | 0.2ml |
| [0014] | (5) 10 倍样品稀释液 | 100ml |

[0015] 本发明所述的动物布鲁氏菌病标准阴性血清制备方法是:

[0016] (1) 制造用动物: 制备阳性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;

[0017] (2) 免疫原制备: 将布氏杆菌 S413 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;

[0018] (3) 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_{450nm} 和阴性血清 OD_{450nm} 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;

[0019] (4) 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...1:128 稀释, 用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验, 取待检血清 OD_{650nm}/质控强阳性血清 OD_{650nm} 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。

[0020] 本发明所述的动物布鲁氏菌病标准阳性血清制备方法是:

[0021] (1) 制造用动物: 制备阳性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;

[0022] (2) 免疫原制备: 将布氏杆菌 S413 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;

[0023] (3) 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_{450nm} 和阴性血清 OD_{450nm} 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;

[0024] (4) 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 : 128 稀释,用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验,取待检血清 OD_{650nm}/质控强阳性血清 OD_{650nm} 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;

[0025] (5) 分装 将血清用 0.45 μm 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,贴上标签。

[0026] 本发明所述的弱阳性血清制备方法是:将强阳性血清用样品稀释液作 1 : 1.5 稀释。

[0027] 本发明所述的 10 倍样品稀释液制备方法如下:氯化钠:8.5 克;Tris:12.1 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。

[0028] 本发明所述的布鲁氏菌 FITC 标记抗原制备方法如下:

[0029] (一) 生产用菌种制备

[0030] (1) 一级种子制备及鉴定 将冻干 B. abortus S1119.3 株用等量灭菌生理盐水溶解,接种马铃薯浸液琼脂斜面,在 37°C 培养 48 小时。观察菌落形态,选取符合 1.1.2.1 和 1.1.2.2 项光滑型培养特性的菌落,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°C 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°C 保存,使用期不超过 2 年。

[0031] (2) 二级种子繁殖 取一级种子按 1.2.1.2 项分别接种于马铃薯浸液琼脂 37°C 培养 72 小时,收获细菌培养物。按 1.1.2 项菌种标准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°C ~ 8°C 保存,使用期不超过 1 年。

[0032] (二) 抗原制备

[0033] (1) 菌悬液制备 分别将鉴定合格的 B. abortus S1119.3 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 1.1.2.5 项变异检查,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瓶中。

[0034] (2) 菌液灭活 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。

[0035] (3) 抗原提取 将灭活菌液以 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% (V/V) 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。

[0036] (4) 裂解、标记、分装与冻干 将粗抗原称重,以 3mg/mL 的含量悬浮于 0.1M 的氢氧化钠中,然后于 37°C 水浴中孵育 1 小时后;加入 0.3ML 的 FITC,37°C 水浴中孵育 1 小时;用 0.01M 的磷酸溶液平衡的 DEAE 凝胶柱纯化,去掉大约 10--15ML 的磷酸溶液后,可收集 25-40ML 的 FITC 标记的抗原。稀释成荧光密度 mp 为 250,000--300,000 后,以 1ml/ 瓶的量分装储存 4°C,或冻干。

[0037] 本发明动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒,利用平滑型布鲁氏菌的脂多糖中的多糖 OPS 作抗原标记荧光素 FITC,用灭活菌液免疫健康牛或人工感染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,样品稀释液,组装组成。用于区分哺乳动物布鲁氏菌感染抗体和免疫抗体。

(四) 具体实施方式

[0038] 下面对本发明作进一步说明。

[0039] 实施例 1,本发明动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒,各组份组成如下:

[0040]	(1) 布鲁氏菌 FITC 标记抗原	100ml
[0041]	(2) 动物布鲁氏菌病标准阴性血清	0.2ml
[0042]	(3) 动物布鲁氏菌病标准阳性血清	0.2ml
[0043]	(4) 标准弱阳性血清	0.2ml
[0044]	(5) 10 倍样品稀释液	100ml

[0045] 所述的动物布鲁氏菌病标准阴性血清制备方法是:

[0046] (1) 制造用动物:制备阳性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;

[0047] (2) 免疫原制备:将布氏杆菌 S413 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;

[0048] (3) 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_{450nm} 和阴性血清 OD_{450nm} 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;

[0049] (4) 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...1:128 稀释,用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验,取待检血清 OD_{650nm} /质控强阳性血清 OD_{650nm} 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。

[0050] 所述的动物布鲁氏菌病标准阳性血清制备方法是:

[0051] (1) 制造用动物:制备阳性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；

[0052] (2) 免疫原制备：将布氏杆菌 S413 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；

[0053] (3) 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_{450nm} 和阴性血清 OD_{450nm} 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；

[0054] (4) 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 : 128 稀释，用质控强阳性血清作参照进行 ELISA 试验，取待检血清 OD_{650nm} / 质控强阳性血清 OD_{650nm} 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；

[0055] (5) 分装 将血清用 0.45 μm 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，贴上标签。

[0056] 所述弱阳性血清制备方法是：将强阳性血清用样品稀释液作 1 : 1.5 稀释。

[0057] 所述的 10 倍样品稀释液制备方法如下：氯化钠：8.5 克；Tris：12.1 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。

[0058] 所述的布鲁氏菌 FITC 标记抗原制备方法如下：

[0059] (一) 生产用菌种制备

[0060] (1) 一级种子制备及鉴定将冻干 B. abortus S1119.3 株用等量灭菌生理盐水溶解，接种马铃薯浸液琼脂斜面，在 37℃ 培养 48 小时。观察菌落形态，选取符合 1.1.2.1 和 1.1.2.2 项光滑型培养特性的菌落，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，使用期不超过 2 年。

[0061] (2) 二级种子繁殖取一级种子按 1.2.1.2 项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。按 1.1.2 项菌种标准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，使用期不超过 1 年。

[0062] (二) 抗原制备

[0063] (1) 菌悬液制备 分别将鉴定合格的 B. abortus S1119.3 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 1.1.2.5 项变异检查，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。

[0064] (2) 菌液灭活 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。

[0065] (3) 抗原提取 将灭活菌液以 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% (V/V) 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。

[0066] (4) 裂解、标记、分装与冻干 将粗抗原称重, 以 3mg/mL 的含量悬浮于 0.1M 的氢氧化钠中, 然后于 37℃ 水浴中孵育 1 小时后; 加入 0.3ML 的 FITC, 37℃ 水浴中孵育 1 小时; 用 0.01M 的磷酸溶液平衡的 DEAE 凝胶柱纯化, 去掉大约 10—15ML 的磷酸溶液后, 可收集 25—40ML 的 FITC 标记的抗原。稀释成荧光密度 mp 为 250, 000—300, 000 后, 以 1ml/ 瓶的量分装储存 4℃, 或冻干。

[0067] 实施例 2, 本发明动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒的使用方法如下:

[0068] (1) 将 1ML 的 1× 样品稀释液加入到 10×75 毫米的玻璃试管中, 加入 10 μ l 的标准阳性血清或阴性血清, 在震荡器上搅动三次混合均匀。FPA 仪器读取空白的荧光密度 mp 值。

[0069] (2) 加入 10ul 的 mp 值为 250, 000—300, 000 的 FITC 标记抗原, 混合均匀, 室温下孵育 2 分钟。

[0070] (3) FPA 仪器读取荧光密度 mp 值。如果 mp 值高于预先决定的阈值 78 至 90mp (根据不同动物决定 mp 的阈值, 羊及山羊阈值为 78mp, 山羊阈值为 88mp, 猪的阈值为 84mp, 鹿的阈值为 87mp, 北美野牛的阈值为 85mp, 牛的阈值为 90mp), 即为阳性样品; 否则为阴性样品。

[0071] (4) 判定

[0072] 待检血清样品 mp 值大于其阈值时, 判为阳性。

[0073] 待检血清样品 mp 值小于阈值时, 判为阴性。

[0074] 若待检血清样品 mp 值等于阈值时, 需重做。

[0075] 判为可疑的血清样品应重做一遍试验进行确证。同一血清样品的 2 次试验均为可疑, 则判为弱阳性。

[0076] 实施例 3, 本发明动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法 -FPA 抗体检测试剂盒, 是这样开发研制的: 为开发一种敏感、特异、能够准确诊断布鲁氏菌病试剂, 满足我国动物防疫的需求, 2005 起至今, 哈尔滨平河生物技术有限公司先后与加拿大 OIE 布鲁氏菌病地面参考实验室合作, 先后完成动物布鲁氏菌病抗体间接 ELISA 快速检测试剂盒, FPA 试剂盒的基础上, 开发了对 FPA 检测试剂盒的生产及检验工艺研究、敏感性研究、特异性研究及临床试验等工作, 制订了该产品的质量标准的草案。现就有关问题说明如下。

[0077] 1 关于菌种选择及标准

[0078] 菌种选择及种子代数国内外分离了很多布鲁氏菌, 有着不同的血清型。目前我所保存和使用的布鲁氏菌为牛型 S1119.3 株, 该菌株为国际制备布鲁氏菌病检测抗原的标准菌株, 该菌株易于培养, 并且不易发生粗变。该菌株由美国 USDA 鉴定, 哈尔滨平河生物技术有限公司保存。冻干保存于 -70℃, 保存期至少 10 年。

[0079] 根据该细菌的遗传稳定性研究, 细菌经连续传 10 代后, OPS 抗原位点结构更为稳

定。

[0080] 2 关于抗原制备

[0081] (1) 细菌繁殖条件控制 S1119.3 是国际制备检测布鲁氏菌病抗原的标准菌株, 生长过程中易于判定病菌增殖情况, 且不易粗变。但无论哪种血清型菌株, 对人和动物都有一定的感染力, 因此, 细菌繁殖必须在三级生物安全实验室进行。

[0082] (2) 细菌灭活 将细菌灭活可以降低生产的生物安全风险。研究表明, 布鲁氏菌 S1119.3 用 0.5% 的石炭酸生理盐水收获细菌培养物, 装于灭菌容器内。加热至 80℃ 维持 90 分钟, 杀死细菌灭活后, 对提取 OPS 没有影响。

[0083] (3) 抗原纯化、浓缩 抗原的纯度决定包被抗原实际含量和检测限度, 因此, 必须对抗原进行提纯; 纯化、浓缩的方法采用简便易行的常规法, 利用布鲁氏菌抗原 sLPS 可存在于有机相石炭酸中的特性, 再用醋酸钠甲醛溶液沉淀抗原 sLPS, 用水透析, 冷冻干燥抗原 sLPS。再经超声波裂解, 从而获得纯化的抗原。将粗抗原称重, 以 3mg/mL 的含量悬浮于 0.1M 的氢氧化钠中, 然后于 37℃ 水浴中孵育 1 小时后; 加入 0.3ML 的 FITC, 37℃ 水浴中孵育 1 小时; 用 0.01M 的磷酸溶液平衡的 DEAE 凝胶柱纯化, 去调大约 10--15ML 的磷酸溶液后, 可收集 25-40ML 的 FITC 标记的 OPS 抗原。稀释成荧光密度 mp 为 250,000--300,000 后, 以 1ml/瓶的量分装储存 4℃, 或冻干。

[0084] (4) 效价测定 提纯抗原为用于包被酶标板, 需用抗 sLPS 的单克隆抗体测定测定抗原效价, 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 sLPS 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。

[0085] 3 关于标准阴性血清和阳性血清 制备阴性血清和阳性血清的方法很多, 相对而言用本动物制备效果最好, 特异性更强。由于目前国内的动物多数被免疫不同的布鲁氏菌疫苗, 阴性血清采自临床健康动物, 除要求布鲁氏菌抗体阴性外, 要求无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, 这样更能反应中国健康动物的实际情况。用大剂量热杀死的布鲁氏菌多次免疫的方法制备阳性血清, 细菌种量和程序, 免疫时间可根据实际检验情况进行。动物感染布鲁氏菌后, 开始产生抗 OPS 抗体, 其抗体水平在 30 天左右达到高峰, 持续时间长; 另外使用经无菌过滤的确诊诊断自然感染布鲁氏菌动物的血清, 也有利于反应中国动物的实际感染情况。根据 OIE 制订的阳性血清的质量标准及中国的具体情况, 从而保证用布鲁氏菌所制备的抗体及将阳性血清作为标准对照血清的准确性。

[0086] 标准阳性血清是试剂盒中验证 FPA 试验操作是否正确, 反应是否特异的一个重要成分, 也是反应该试剂是否工作的指标。根据动物布鲁氏菌病抗体 FPA 试验的灵敏性试验研究, 标准阳性血清 mp 值均大于个自动物的阈值。标准阴性血清由于血清的影响, 在 FPA 实验中其 mp 值就略大于空白对照。

[0087] 4 关于 cut off 值的确定, 确定阴阳性限值是决定检测结果准确性非常重要的指标, 本实验中, 应用制备的 FPA 试剂盒检测了解 30 份布鲁氏菌病准阴性血清, 37 份免疫动

物布鲁氏菌血清及 16 份 OIE 阳性血清,应用国际上 OIE 已确认准确性的 FPA 试剂盒(来源于加拿大 OIE 动物布鲁氏菌病地面参考实验室)检测结果进行比对,确定了检测限为 78~90mp(根据不同动物决定 mp 的阈值,羊及山羊阈值为 78mp,山羊阈值为 88mp,猪的阈值为 84mp,鹿的阈值为 87mp,北美野牛的阈值为 85mp,牛的阈值为 90mp)。这同加拿大 OIE 动物布鲁氏菌病地面参考实验室检验 15865 份临床诊断确诊动物布鲁氏菌病的结果一致。理论上检测限应为检测大量的阴性血清样品,进行 mp 值分布研究,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,本实验中检测的 30 份确定阴性样品其 mp 值均以下。由于本公司使用的技术均从加拿大 OIE 动物布鲁氏菌病地面参考实验室学习得到,该实验室的研究结果应于本试剂盒的结果通用。

[0088] 5 关于特异性检验 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、免疫血清作样品检测动物布鲁氏菌病抗体 FPA 试验检测试剂盒的阴性检出率,结果为 100%。用乙型副伤寒杆菌、小肠结肠炎耶氏菌、大肠杆菌 0:157 阴、阳性血清进行试剂盒的阴性检出率检测,结果为 100%。试验结果表明,动物布鲁氏菌病抗体 FPA 检测试剂盒具有较高的特异性。

[0089] 6 关于敏感性检验 FPA 是目前检测抗布鲁氏菌病抗体最敏感的方法之一,由于有交叉反应,疫苗型抗体的存在,这使血清学检测方法很难区分诊断。特别是我国大规模强制免疫动物,疫苗型抗体与自然感染抗体的区分,必须借助抗体检测 FPA 和 FPA 方能区分并最后确诊鲁氏菌病,减少误诊,避免经济损失。在选用间接 ELISA 筛选诊断的基础上,采用竞争 ELISA 和 FPA 对被检样品进行确诊诊断。研究过程中 16 份 OIE 标准阳性血清和 37 份人工感染血清进行检测,阳性检出率达 96.23%。这同加拿大 OIE 动物布鲁氏菌病地面参考实验室检验 15865 份临床诊断确诊动物布鲁氏菌病的结果一致。取 5 份国际标准阳性血清,用生理盐水分别作系列倍比稀释,分别做 FPA 和竞争、间接 ELISA、虎红平板凝集试验和补体结合试验,其中 FPA 试验采用 3 个不同批次的试剂盒进行试验,结果显示 FPA 与间接 ELISA 试验相同,血清最大稀释度达 1:5120,检测灵敏性远高于虎红平板凝集实验和补体结合实验。这些实验结果能够表明制备的动物布鲁氏菌病抗体 FPA 检测试剂盒检测敏感性与国际同类产品水平一致,达到国际 OIE 水平,填补了国内空白。

[0090] 7 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,FPA 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试管中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。为保证检测试验的准确性。mp 的计算方法为国际上通用的抑制率计算方法。

[0091] 8. 关于注意事项 因为 FPA 检测试剂盒中的成分均为生物活性成分,其中的血清等又都是蛋白成分,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。

[0092] 9 关于稳定性、贮存和有效期 我们在进行保存期研究时,分别将布鲁氏菌病抗体 FPA 检测试剂盒放置于 2~8℃、室温和 37℃,每隔一定时间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 6 个月,37℃保存 9 日,其物理

性状,检测特异性及灵敏性均不受影响,因此,我们将保存期规定为 2 ~ 8℃保存,有效期 1 年。

专利名称(译)	动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法-FPA抗体检测试剂盒		
公开(公告)号	CN101846681A	公开(公告)日	2010-09-29
申请号	CN200910071342.1	申请日	2009-01-24
[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 G01N33/536 G01N33/533		
代理人(译)	崔东辉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法-FPA抗体检测试剂盒。动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法-FPA抗体检测试剂盒各组份组成如下：
 (1)布鲁氏菌FITC标记抗原100ml；(2)动物布鲁氏菌病标准阴性血清0.2ml；(3)动物布鲁氏菌病标准阳性血清0.2ml；(4)标准弱阳性血清0.2ml；(5)10倍样品稀释液100ml。本发明动物布鲁氏菌病荧光偏振检测法-FPA抗体检测试剂盒，利用平滑型布鲁氏菌的脂多糖中的多糖OPS作抗原标记荧光素FITC，用灭活菌液免疫健康牛或人工感染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，样品稀释液，组装组成。用于区分哺乳动物布鲁氏菌感染抗体和免疫抗体。