



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104155449 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201410363969. 5

(22) 申请日 2014. 07. 28

(71) 申请人 广州市丰华生物工程有限公司
地址 510730 广东省广州市开发区银谊街 6 号

(72) 发明人 谭玉华 范主桥 李奕辉 卢德祥

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202

代理人 郝传鑫 付静

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

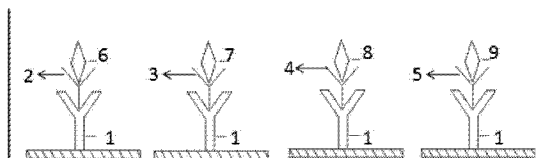
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测 TORCH IgM 抗体的方法及试剂盒和该试剂盒的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒,所述试剂盒包括:包被有与 TORCH IgM 抗体结合的抗体的固相载体,镧系元素标记的 TORCH 抗原, TORCH IgM 抗体校准品,样本稀释液,实验缓冲液,浓缩洗液以及增强液。本发明所述试剂盒能够在相对同一检测条件下同时检测 TORCH 病原体中多种病原体 IgM 抗体,灵敏度高,特异性强,精密度好,准确度高,用血量少,快速方便,有利于 TORCH 病原体感染的早期诊断;本方法又具有检测线性范围宽的特点,可以减少高值样本的稀释次数或稀释倍数,可以提高检测结果的准确性。



1. 一种检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:包被有与 TORCH IgM 抗体结合的抗体的固相载体,镧系元素标记的 TORCH 抗原, TORCH IgM 抗体校准品,样本稀释液,实验缓冲液,浓缩洗液以及增强液。

2. 根据权利要求 1 所述的检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒,其特征在于,所述包被有与 TORCH IgM 抗体结合的抗体的固相载体为包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体。

3. 根据权利要求 2 所述的检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒,其特征在于,所述包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体是采用以下步骤制备而得的:

将鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体用包被缓冲液稀释至 0.01 ~ 10 μ g/mL,在固相载体上进行包被,将固相载体洗涤 1 次,然后再用含 1% BSA 的 50mmol/L、pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液进行封闭,将固相载体甩干,晾干,真空包装,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 保存备用。

4. 根据权利要求 1 所述的检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒,其特征在于,所述镧系元素标记的 TORCH 抗原为镧系元素 1 标记的弓形虫抗原、镧系元素 2 标记的风疹病毒抗原、镧系元素 3 标记的巨细胞病毒抗原和镧系元素 4 标记的单纯疱疹病毒抗原的组合,所述镧系元素 1、镧系元素 2、镧系元素 3、镧系元素 4 分别选自铈、钐、铽和铕中的一种,且所述镧系元素 1、镧系元素 2、镧系元素 3、镧系元素 4 互不相同;所述镧系元素标记的 TORCH 抗原中 TORCH 抗原为 TORCH 天然抗原和 TORCH 重组抗原中的至少一种。

5. 根据权利要求 4 所述的检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒,其特征在于,所述镧系元素 4 标记的单纯疱疹病毒抗原中单纯疱疹病毒抗原为单纯疱疹病毒 I 型抗原和单纯疱疹病毒 II 型抗原中的至少一种。

6. 根据权利要求 5 所述的检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒,其特征在于,所述镧系元素 4 标记的单纯疱疹病毒抗原中单纯疱疹病毒抗原为单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原。

7. 根据权利要求 4 所述的检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒,其特征在于,所述镧系元素标记的 TORCH 抗原是参照相应的镧系元素标记试剂盒说明书制备而成的。

8. 一种采用如权利要求 1 所述试剂盒检测 TORCH IgM 抗体的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1) 用实验缓冲液配制镧系元素标记的 TORCH 抗原,用纯化水将浓缩洗液稀释成工作洗涤液;

(2) 将待检样本用样本稀释液稀释,然后在包被有与 TORCH IgM 抗体结合的抗体的固相载体上预设的校准品孔、样本孔相应位置分别加入 TORCH IgM 抗体校准品、预先稀释好的待检样本;

(3) 将步骤 (2) 中得到的固相载体在室温条件下缓慢振荡孵育;

(4) 用步骤 (1) 中工作洗涤液洗涤步骤 (3) 中孵育后的固相载体;

(5) 分别向步骤 (4) 中获得的固相载体上校准品孔和样本孔中加入步骤 (1) 中配制好的镧系元素标记的 TORCH 抗原,在室温下孵育;

(7) 用步骤 (1) 中工作洗涤液洗涤步骤 (5) 中孵育后的抗原固相载体;

(8) 分别向步骤 (7) 中获得的固相载体上校准品孔和样本孔中加入增强液的共解离剂部分,继续孵育,再加入增强液的共增强剂;

(9) 孵育结束后,采用相应的镧系元素窗口程序进行检测并分析。

9. 根据权利要求 8 所述的采用试剂盒检测 TORCH IgM 抗体的方法,其特征在于,所述

步骤(2)中包被有与TORCH IgM抗体结合的抗体的固相载体为包被有鼠抗人IgM μ 链单克隆抗体的固相载体;所述步骤(1)中镧系元素标记的TORCH抗原为镧系元素1标记的弓形虫抗原、镧系元素2标记的风疹病毒抗原、镧系元素3标记的巨细胞病毒抗原和镧系元素4标记的单纯疱疹病毒抗原的组合,所述镧系元素1、镧系元素2、镧系元素3、镧系元素4分别选自铈、钐、铥和铽中的一种,且所述镧系元素1、镧系元素2、镧系元素3、镧系元素4互不相同;所述步骤(1)中镧系元素标记的TORCH抗原中TORCH抗原为TORCH天然抗原和TORCH重组抗原中的至少一种。

10. 一种如权利要求1所述检测TORCH IgM抗体的试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

(1) 制备包被有与TORCH IgM抗体结合的抗体的固相载体,镧系元素标记的TORCH抗原, TORCH IgM抗体校准品,样本稀释液,实验缓冲液,浓缩洗液以及增强液;

(2) 贴标签;

(3) 组装为试剂盒。

一种检测 TORCH IgM 抗体的方法及试剂盒和该试剂盒的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 TORCH IgM 抗体的方法及试剂盒,具体涉及一种基于多元标记时间分辨荧光免疫法检测 TORCH IgM 抗体的方法及试剂盒和该试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] TORCH 一词是美国学者 Nahmias 等于 1971 年将数种孕妇患病后将引起子宫内胚胎(胎儿)感染引发流产、甚至造成先天缺陷或发育异常的病原体英文名词的第一个字母组合而成。是指一组病原体:T 即刚地弓形虫(*Toxoplasma*);O 即 others,比如乙型肝炎病毒、HIV 病毒、梅毒螺旋体等;R 即风疹病毒(*Rubellavirus*);C 即巨细胞病毒(*Cytomegalovirus*);H 即单纯疱疹病毒(*herpes simplex virus*)。

[0003] 上述四种病原体具有以下几个共同点:1. 可以通过胎盘垂直传播,引起胎儿宫内感染。2. 宫内感染后可能导致流产、早产、死胎和畸形。3. 病原体感染对胎儿造成的危害,与孕妇感染的孕龄相关。

[0004] TORCH 综合征患者造成孕妇流产、死胎,出生后有严重的智力障碍,生活不能自理,造成极大的精神及经济负担。我国每年约有 26000 个 TORCH 患儿出生,平均每小时就有 3 人,对优生优育与人口素质构成极大的威胁,因此它的感染诊治工作引起普遍关注。

[0005] TORCH 感染是严重危害新生儿健康的重要因素之一。可导致多器官损害及一系列严重后遗症。因此,为减少病残儿的出生率及提高出生人口素质,临床工作者应进一步加强对孕妇的宣传教育,积极做好 TORCH 感染的血清学筛查以便及早发现不良妊娠并及时处理。对新生儿也应常规开展 TORCH 检测,了解新生儿 TORCH 感染情况,以便早干预、早治疗。TORCH 感染的血清学筛查对优生优育具有重要现实意义。

[0006] TORCH 抗体检测试剂是指一类利用免疫学方法,如酶免疫技术、化学发光免疫分析技术等,对育龄妇女、孕妇血清或血浆样本中,TORCH 特异性抗体进行体外定性和/或半定量和/或定量检测的试剂。结合临床表现和其他实验室指标,可作为 TORCH 感染辅助诊断的指标之一,用于治疗方案的制定及免疫状态的评估。

[0007] TORCH 抗体检测试剂,主要检测的 Ig 为病原体特异性 IgG 和 IgM。在病原体感染的初次体液免疫应答中(原发性感染),特异性 IgM 抗体首先出现,但其普遍反应短暂,一般几周后即不易再测到。病原体特异性 IgM 抗体阳性常提示早期感染,可用于感染急性期的辅助判断。特异性 IgG 抗体,在免疫接种后、原发性感染及再次感染时都可检出,且长时间存在。

[0008] 实时荧光定量 PCR 能早期、灵敏地检测到 TORCH 病原体 DNA/RNA,并可对抗 TORCH 病原体治疗的效果监测,但是 TORCH 病原体 DNA/RNA 阳性只能反映 TORCH 病原体某一片段的存在,不能准确反映 TORCH 病原体活动状态,对亚临床型或潜伏型感染,实时荧光定量 PCR 结果可为阳性。

[0009] 目前用于检测 TORCH IgM 抗体常分别采用单一试剂盒,即一个试剂盒仅能检测

TORCH 病原体中的一种病原体的 IgM 抗体,此种方式存在以下缺点:1. 检测步骤繁多,特别是手工法容易导致实验出现错误;2. 加样时间长,检测时间长,费时费力;3. 样本需要量大,导致采血量增加。

[0010] 目前常用免疫方法有放射免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA)、酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、化学发光免疫分析法 (chemiluminescent immunoassay, CLIA)、电化学发光免疫分析法 (electro-chemiluminescence immunoassay, ECLI) 等。RIA 由于放射性污染,对环境和操作者影响较大,批内批间变异较大,难于自动化;ELISA 采用大分子酶标记,且酶容易失活,这种依靠比色法或偏振光法的检测技术所受的干扰因素太多(即使是优秀的“管式 ELISA”,其试管形状的变化也会影响试验的结果),其灵敏度、线性和稳定性未能高于 RIA;CLIA 的化学发光通常是瞬间完成,发光峰值很快衰减,温度和 pH 值对发光有很大影响,该类因素影响了该类方法的应用;ECLI 仍为非开放系统,试剂依赖进口,试剂昂贵,维修及检测成本高,这也限制了其推广应用。由于时间分辨荧光免疫法 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 独特的技术原理,有区别于传统的免疫标记技术的特点和优势,已被人们广泛接受,与现在广泛使用的 RIA、ELISA、CLIA 和 ECLI 相比,TRFIA 克服了 RIA 放射性污染的不足、酶标记物的不稳定性和定量范围窄的缺陷、化学发光仅能一次发光、一般荧光标记受环境干扰的难点和 ECLI 的非直接标记等缺点, Eu 标记 TRFIA 的灵敏度可达 10^{-19} mol/L,应用范围广,致使其试剂盒的生产和检测仪器的更新换代进展甚速,目前已实现了分析技术的自动化,TRFIA 已成为生物医学研究和临床超微量生化检验中一项最有发展前景的分析手段。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于克服现有技术存在的不足之处而提供了一种基于多元标记时间分辨荧光免疫法检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒,以及所述试剂盒的制备方法,本发明还提供了采用所述试剂盒检测 TORCH IgM 抗体的方法。本发明建立了定量测定 TORCH 病原体中多种病原体 IgM 抗体的时间分辨荧光免疫多元标记捕获法,同时提供了一种能够在相对同一检测条件下同时检测 TORCH 病原体中多种病原体 IgM 抗体的定量测定试剂盒,所述 TORCH 病原体包括弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒,其中所述单纯疱疹病毒为单纯疱疹病毒 I 型和单纯疱疹病毒 II 型中的至少一种。

[0012] 为实现上述目的,所采取的技术方案:一种检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒,所述试剂盒包括:包被有与 TORCH IgM 抗体结合的抗体的固相载体,镧系元素标记的 TORCH 抗原, TORCH IgM 抗体校准品,样本稀释液,实验缓冲液,浓缩洗液以及增强液。

[0013] 优选地,所述包被有与 TORCH IgM 抗体结合的抗体的固相载体为包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体。

[0014] 优选地,所述包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体是采用以下步骤制备而得的:

[0015] 将鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体用包被缓冲液稀释至 $0.01 \sim 10 \mu\text{g/mL}$,在固相载体上进行包被,将固相载体洗涤 1 次,然后再用含 1% BSA 的 50mmol/L 、pH7.8 的 Tris-HCl 缓冲液进行封闭,将固相载体甩干,晾干,真空包装, $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 保存备用。

[0016] 优选地,所述镧系元素标记的 TORCH 抗原为镧系元素 1 标记的弓形虫抗原、镧系元素 2 标记的风疹病毒抗原、镧系元素 3 标记的巨细胞病毒抗原和镧系元素 4 标记的单纯疱疹病毒抗原的组合,所述镧系元素 1、镧系元素 2、镧系元素 3、镧系元素 4 分别选自铈、钐、铽和铕中的一种,且所述镧系元素 1、镧系元素 2、镧系元素 3、镧系元素 4 互不相同;所述镧系元素标记的 TORCH 抗原中 TORCH 抗原为 TORCH 天然抗原和 TORCH 重组抗原中的至少一种。

[0017] 优选地,所述镧系元素 4 标记的单纯疱疹病毒抗原中单纯疱疹病毒抗原为单纯疱疹病毒 I 型抗原和单纯疱疹病毒 II 型抗原中的至少一种。

[0018] 优选地,所述镧系元素 4 标记的单纯疱疹病毒抗原中单纯疱疹病毒抗原为单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原。所述单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原上同时含有单纯疱疹病毒 I 型抗原和单纯疱疹病毒 II 型抗原。

[0019] 优选地,所述镧系元素标记的 TORCH 抗原是参照相应的镧系元素标记试剂盒说明书制备而成的。

[0020] 本发明还提供了一种采用上述所述试剂盒检测 TORCH IgM 抗体的方法,所述方法包括以下步骤:

[0021] (1) 用实验缓冲液配制镧系元素标记的 TORCH 抗原,用纯化水将浓缩洗液稀释成工作洗涤液;

[0022] (2) 将待检样本用样本稀释液稀释,然后在包被有与 TORCH IgM 抗体结合的抗体的固相载体上预设的校准品孔、样本孔相应位置分别加入 TORCH IgM 抗体校准品、预先稀释好的待检样本;

[0023] (3) 将步骤 (2) 中得到的固相载体在室温条件下缓慢振荡孵育;

[0024] (4) 用步骤 (1) 中工作洗涤液洗涤步骤 (3) 中孵育后的固相载体;

[0025] (5) 分别向步骤 (4) 中获得的固相载体上校准品孔和样本孔中加入步骤 (1) 中配制好的镧系元素标记的 TORCH 抗原,在室温下孵育;

[0026] (7) 用步骤 (1) 中工作洗涤液洗涤步骤 (5) 中孵育后的抗原固相载体;

[0027] (8) 分别向步骤 (7) 中获得的固相载体上校准品孔和样本孔中加入增强液的共解离剂部分,继续孵育,再加入增强液的共增强剂;

[0028] (9) 孵育结束后,采用相应的镧系元素窗口程序进行检测并分析。

[0029] 优选地,所述步骤 (2) 中包被有与 TORCH IgM 抗体结合的抗体的固相载体为包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体;所述步骤 (1) 中镧系元素标记的 TORCH 抗原为镧系元素 1 标记的弓形虫抗原、镧系元素 2 标记的风疹病毒抗原、镧系元素 3 标记的巨细胞病毒抗原和镧系元素 4 标记的单纯疱疹病毒抗原的组合,所述镧系元素 1、镧系元素 2、镧系元素 3、镧系元素 4 分别选自铈、钐、铽和铕中的一种,且所述镧系元素 1、镧系元素 2、镧系元素 3、镧系元素 4 互不相同;所述步骤 (1) 中镧系元素标记的 TORCH 抗原中 TORCH 抗原为 TORCH 天然抗原和 TORCH 重组抗原中的至少一种。

[0030] 本发明还提供了一种上述所述试剂盒的制备方法,所述制备方法包括以下步骤:

[0031] (1) 制备包被有与 TORCH IgM 抗体结合的抗体的固相载体,镧系元素标记的 TORCH 抗原, TORCH IgM 抗体校准品,样本稀释液,实验缓冲液,浓缩洗液以及增强液;

[0032] (2) 贴标签;

[0033] (3) 组装为试剂盒。

[0034] 本发明的有益效果在于：在 TORCH 病原体感染的初次体液免疫应答中（原发性感染），特异性 IgM 抗体首先出现，但其普遍反应短暂，一般几周后即不易再测到。病原体特异性 IgM 抗体阳性常提示早期感染，检测 TORCH 病原体特异性 IgM 抗体可用于 TORCH 病原体感染急性期的辅助判断。

[0035] 本发明采用鼠抗人 IgM μ 链单克隆包被固相载体，避免了以往的 IgM 抗体试剂采用间接法检测 IgM 抗体时因同型抗体间对抗原位点的竞争而导致敏感性差的问题，也避免如类风湿因子（rheumatoid factor, RF）等引起的非特异性反应。

[0036] 本发明采用时间分辨荧光免疫法多元标记技术，研制了一种能够在相对同一检测条件下同时检测 TORCH 病原体中多种病原体 IgM 抗体的定量测定试剂盒，降低了由于人为原因造成的检测误差，减少了操作人员的工作量，也减少了样本用量。妊娠期发生初次感染或复发感染，体内产生 IgG 或 IgM 是一个急剧变化的过程，只有通过定量分析浓度变化才能检测到。定量分析有助于发现假阳性或假阴性结果。对于那些孕前未做过基础免疫状况评估的孕妇，选择两个时间点（T1, T2）检测 IgG 或 IgM 浓度（C1, C2），计算单位时间内浓度变化梯度，能有效的发现机体受到病毒攻击而发生的特异性免疫反应，但目前还没有参考值，较为常用的是 $C2/C1 > 4$ 倍。所有这些必须以定量检测为前提。

[0037] 本发明所述试剂盒能够在相对同一检测条件下同时检测 TORCH 病原体中多种病原体 IgM 抗体，灵敏度高，特异性强，精密度好，准确度高，用血量少，快速方便，有利于 TORCH 病原体感染的早期诊断；本方法又具有检测线性范围宽的特点，可以减少高值样本的稀释次数或稀释倍数，可以提高检测结果的准确性。

附图说明

[0038] 图 1 为采用本发明所述试剂盒检测 TORCH 病原体 IgM 抗体时同一检测微孔内反应体系的一种实施例的原理示意图；

[0039] 图中 1 为鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体，2 为弓形虫病毒 IgM 抗体，3 为风疹病毒 IgM 抗体，4 为巨细胞病毒 IgM 抗体，5 为单纯疱疹病毒 IgM 抗体，6 为铕（ Eu^{3+} ）标记的弓形虫重组抗原，7 为钐（ Sm^{3+} ）标记的风疹病毒重组抗原，8 为镝（ Dy^{3+} ）标记的巨细胞病毒重组抗原，9 为铽（ Te^{3+} ）标记的单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原。

具体实施方式

[0040] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点，下面将结合具体实施例对本发明作进一步说明。实施例中的鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体、弓形虫重组抗原、弓形虫天然抗原、风疹病毒重组抗原、风疹病毒天然抗原、巨细胞病毒天然抗原、巨细胞病毒重组抗原、单纯疱疹病毒 I 型天然抗原、单纯疱疹病毒 I 型重组抗原、单纯疱疹病毒 II 型天然抗原、单纯疱疹病毒 II 型重组抗原、单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原购于深圳市菲鹏生物股份有限公司；固相载体为 96 孔微孔空白板（ 8×12 孔）购于深圳市金灿华实业有限公司；铕（ Eu^{3+} ）标记试剂盒、钐（ Sm^{3+} ）标记试剂盒、镝（ Dy^{3+} ）标记试剂盒和铽（ Te^{3+} ）标记试剂盒购于芬兰 Wallac 公司；琼脂糖凝胶 Sepharose CL-6B 购于瑞典 Pharmacia 公司；人类优生优育病毒（TORCH）系列检测试剂盒（酶联免疫法）由德国维润赛润研发有限公司提供；共荧光增强

液、浓缩洗液、实验缓冲液、FWZ- I 型微量振荡仪、DEM- III型全自动酶标洗板均由广州市丰华生物工程有限公司提供。VictorTM2D1420 型 TRFIA 仪购于美国 Perkin Elmer 公司。其他试剂为国产分析纯。所述单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原上同时含有单纯疱疹病毒 I 型抗原和单纯疱疹病毒 II 型抗原。

[0041] 实施例 1

[0042] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的一种实施例,所述试剂盒包括:包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体,铕 (Eu^{3+}) 标记的弓形虫重组抗原,钐 (Sm^{3+}) 标记的风疹病毒重组抗原,镝 (Dy^{3+}) 标记的巨细胞病毒重组抗原,铽 (Te^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I 型重组抗原, TORCH IgM 抗体校准品,样本稀释液,实验缓冲液,浓缩洗液以及增强液;所述增强液为共荧光增强液。

[0043] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0044] (1) 包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体:将鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体用包被缓冲液稀释至 0.01 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$,在固相载体上进行包被,将固相载体洗涤 1 次,然后再用含 1% BSA 的 50mmol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液进行封闭,将固相甩干,晾干,真空包装,2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。所述包被缓冲液为 50mmol/L pH 9.6 的碳酸缓冲液,20mmol/L pH 4.5 的磷酸盐缓冲液,50mmol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液和 50mmol/L pH 4.5 的柠檬酸盐缓冲液中的一种。

[0045] TORCH IgM 抗体校准品为 TORCH 病原体 IgM 抗体混合校准品,采用厂商选定测量程序校准,将 TORCH 病原体 IgM 抗体原料用含有 10g/L BSA 的 50mmol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液稀释成 A、B、C、D、E 和 F 6 个校准品。由于目前尚无弓形虫 IgM 抗体正式的国际标准品和定量的国家标准品,弓形虫 IgM 抗体校准品采用德国维润赛润研发有限公司的弓形虫 IgM 抗体定量检测试剂盒(酶联免疫法)及酶标仪组成的测量程序标化,所述弓形虫 IgM 抗体在 A、B、C、D、E 和 F 6 个校准品中的浓度分别为 0, 2, 8, 32, 128, 256U/mL。由于目前尚无风疹病毒 IgM 抗体正式的国际标准品和定量的国家标准品,风疹病毒 IgM 抗体校准品采用德国维润赛润研发有限公司的风疹病毒 IgM 抗体定量检测试剂盒(酶联免疫法)及酶标仪组成的测量程序标化,所述风疹病毒 IgM 抗体在 A、B、C、D、E 和 F 6 个校准品中的浓度分别为 0, 2, 8, 32, 128, 256U/mL。由于目前尚无巨细胞病毒 (CMV) IgM 抗体国际标准品和定量的国家标准品,巨细胞病毒 IgM 抗体校准品采用德国维润赛润研发有限公司的巨细胞病毒 IgM 抗体定量检测试剂盒(酶联免疫法)及酶标仪组成的测量程序标化,所述巨细胞病毒 IgM 抗体在 A、B、C、D、E 和 F 6 个校准品中的浓度分别为 0, 2, 8, 32, 128, 256 U/mL。由于目前尚无单纯疱疹病毒 (HSV) IgM 国际标准品和定量的国家标准品,单纯疱疹病毒 I 型 IgM 抗体校准品以德国维润赛润研发有限公司的单纯疱疹病毒 I 型 IgM 抗体定量检测试剂盒(酶联免疫法)及酶标仪组成的测量程序标化,所述单纯疱疹病毒 I 型 IgM 抗体在 A、B、C、D、E 和 F6 个校准品中的浓度分别为 0, 2, 8, 32, 128, 256U/mL。

[0046] 铕 (Eu^{3+}) 标记的弓形虫重组抗原:按照铕 (Eu^{3+}) 标记试剂盒说明书操作。将 1.0mg 的弓形虫抗原加入 Millipore 公司的截留分子量为 10000 的超滤离心管中,8000r/min 离心 5 ~ 6min,再用标记缓冲液重复离心洗涤 3 ~ 5 次,将处理得到的 200 μL 弓形虫抗原加入到 1.0mg 的预先用标记缓冲液溶解的铕 (Eu^{3+}) 标记试剂 DTTA-EuNa 充分混匀,2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 24 ~ 72h。反应液经分别用 50mmol/L pH 7.80Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sepharose

CL-6B 柱 (1cm×40cm) 层析, 在 A280 下监测收集第一洗脱峰。然后采用棋盘方阵滴配法确定最适工作浓度, 然后用含有 0.2% BSA、30ppm Procline-300 的 pH7.8 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释成最适工作浓度的 1/20 倍即为所述铈 (Eu^{3+}) 标记的弓形虫重组抗原。

[0047] 钐 (Sm^{3+}) 标记的风疹病毒重组抗原: 按照钐 (Sm^{3+}) 标记试剂盒说明书操作。将 1.0mg 的风疹病毒重组抗原加入 Millipore 公司的截留分子量为 10000 的超滤离心管中, 8000r/min 离心 5~6min, 再用标记缓冲液重复离心洗涤 3~5 次, 将处理得到的 200 μL 风疹病毒重组抗原加入到 1.0mg 的预先用标记缓冲液溶解的钐 (Sm^{3+}) 标记试剂 DTTA-SmNa 充分混匀, 2~8℃ 振荡孵育 24~72h。反应液经分别用 50mmol/L pH 7.80 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1cm×40cm) 层析, 在 A280 下监测收集第一洗脱峰。然后采用棋盘方阵滴配法确定最适工作浓度, 然后用含有 0.2% BSA、30ppm Procline-300 的 pH7.8 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释成最适工作浓度的 1/20 倍即为所述钐 (Sm^{3+}) 标记的风疹病毒重组抗原。

[0048] 镝 (Dy^{3+}) 标记的巨细胞病毒重组抗原: 按照镝 (Dy^{3+}) 标记试剂盒说明书操作。将 1.0mg 的巨细胞病毒重组抗原加入 Millipore 公司的截留分子量为 10000 的超滤离心管中, 8000r/min 离心 5~6min, 再用标记缓冲液重复离心洗涤 3~5 次, 将处理得到的 200 μL 巨细胞病毒抗原加入到 1.0mg 的预先用标记缓冲液溶解的镝 (Dy^{3+}) 标记试剂 DTTA-DyNa 充分混匀, 2~8℃ 振荡孵育 24~72h。反应液经分别用 50mmol/L pH 7.80 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1cm×40cm) 层析, 在 A280 下监测收集第一洗脱峰。然后采用棋盘方阵滴配法确定最适工作浓度, 然后用含有 0.2% BSA、30ppm Procline-300 的 pH7.8 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释成最适工作浓度的 1/20 倍即为所述镝 (Dy^{3+}) 标记的巨细胞病毒重组抗原。

[0049] 铽 (Te^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I 型重组抗原: 按照铽 (Te^{3+}) 标记试剂盒说明书操作。将 1.0mg 的单纯疱疹病毒重组抗原加入 Millipore 公司的截留分子量为 10000 的超滤离心管中, 8000r/min 离心 5~6min, 再用标记缓冲液重复离心洗涤 3~5 次, 将处理得到的 200 μL 单纯疱疹病毒抗原加入到 1.0mg 的预先用标记缓冲液溶解的 Te^{3+} 标记试剂 DTTA-TeNa 充分混匀, 2~8℃ 振荡孵育 (24~72)h。反应液经分别用 50mmol/L pH 7.80 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1cm×40cm) 层析, 在 A280 下监测收集第一洗脱峰。然后采用棋盘方阵滴配法确定最适工作浓度, 然后用含有 0.2% BSA、30ppm Procline-300 的 pH7.8 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释成最适工作浓度的 1/20 倍即为所述铽 (Te^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I 型重组抗原。

[0050] 样本稀释液: 在洁净容器中准确加入 6.06g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 8.50g 氯化钠, 加入适量的纯化水搅拌溶解后, 加入 3mL 浓盐酸混匀, 再向其中加入 20mg 硫柳汞, 1mL Procline-300, 50g 牛血清白蛋白 (BSA), 搅拌溶解后, 加纯化水至 1000mL。

[0051] 实验缓冲液: 在洁净容器中准确加入 6.06g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 8.50g 氯化钠, 加入适量的纯化水搅拌溶解后, 加入 3mL 浓盐酸混匀, 再向其中加入 0.05g 曙红、5g 聚乙二醇 2000、0.01mg EDTA、20mg 硫柳汞、1mL Procline-300、100mL 小牛血清、6mL Tween20, 搅拌溶解后, 加纯化水至 1000mL; 分装成 30mL/瓶。

[0052] 浓缩洗液: 在洁净容器中准确加入 6.06g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 8.50g 氯化钠, 加入适量的纯化水搅拌溶解后, 加入 3mL 浓盐酸混匀, 再向其中加入 20mg 亮蓝、4mL

Tween20、1mL Procline-300, 搅拌溶解后, 加纯化水至 1000mL; 分装成 40mL/ 瓶。

[0053] 共荧光增强液: 共荧光增强液含有共解离剂和共增强剂, 共解离剂为在洁净容器中准确加入 120 μ mol 精对苯二甲酸 (PTA)、10 μ mol 氧化钪用 300mL 的乙醇溶解, 加入适量的纯化水混匀, 然后加入 0.5mL 曲拉通-100、0.8mL 冰乙酸、0.5g 乙酸钠后充分溶解, 用纯化水定容至 1000mL。共增强剂为在洁净容器中准确加入 0.5mmol 邻菲罗啉、0.2mol 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 加入适量的纯化水搅拌溶解后, 再用纯化水定容至 1000mL; 分装成 40mL/ 瓶。

[0054] (2) 贴标签。

[0055] (3) 成品组装。

[0056] 实施例 2

[0057] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的一种实施例, 所述试剂盒包括: 包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体, 铽 (Te^{3+}) 标记的弓形虫重组抗原, 镝 (Dy^{3+}) 标记的风疹病毒重组抗原, 钐 (Sm^{3+}) 标记的巨细胞病毒重组抗原, 铕 (Eu^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 II 型重组抗原, TORCH IgM 抗体校准品, 样本稀释液, 实验缓冲液, 浓缩洗液以及增强液; 所述增强液为共荧光增强液。

[0058] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的制备方法中除了铽 (Te^{3+}) 标记的弓形虫重组抗原、镝 (Dy^{3+}) 标记的风疹病毒重组抗原、钐 (Sm^{3+}) 标记的巨细胞病毒重组抗原和铕 (Eu^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 II 型重组抗原分别参照相应的镧系元素标记试剂盒说明书而制备, TORCH IgM 抗体校准品中由于目前尚无单纯疱疹病毒 (HSV) IgM 国际标准品和定量的国家标准品, 单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体校准品以德国维润赛润研发有限公司的单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体定量检测试剂盒 (酶联免疫法) 及酶标仪组成的测量程序标化, 所述单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体在 A、B、C、D、E 和 F 6 个校准品中的浓度分别为 0, 2, 8, 32, 128, 256U/mL 外, 其他同实施例 1 的制备方法。

[0059] 实施例 3

[0060] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的一种实施例, 所述试剂盒包括: 包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体, 镝 (Dy^{3+}) 标记的弓形虫重组抗原, 铽 (Te^{3+}) 标记的风疹病毒重组抗原, 铕 (Eu^{3+}) 标记的巨细胞病毒重组抗原, 钐 (Sm^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原, TORCH IgM 抗体校准品, 样本稀释液, 实验缓冲液, 浓缩洗液以及增强液; 所述增强液为共荧光增强液。

[0061] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的制备方法中除了镝 (Dy^{3+}) 标记的弓形虫重组抗原、铽 (Te^{3+}) 标记的风疹病毒重组抗原、铕 (Eu^{3+}) 标记的巨细胞病毒重组抗原和钐 (Sm^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原分别参照相应的镧系元素标记试剂盒说明书而制备, TORCH IgM 抗体校准品中由于目前尚无单纯疱疹病毒 (HSV) IgM 国际标准品和定量的国家标准品, 单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体校准品以德国维润赛润研发有限公司的单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体定量检测试剂盒 (酶联免疫法) 及酶标仪组成的测量程序标化, 所述单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体在 A、B、C、D、E 和 F 6 个校准品中的浓度分别为 0, 2, 8, 32, 128, 256U/mL 外, 其他同实施例 1 的制备方法。

[0062] 实施例 4

[0063] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的一种实施例, 所述试剂盒包括: 包被

有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体, 钐 (Sm^{3+}) 标记的弓形虫天然抗原, 铽 (Te^{3+}) 标记的风疹病毒天然抗原, 铕 (Eu^{3+}) 标记的巨细胞病毒天然抗原, 镝 (Dy^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原, TORCH IgM 抗体校准品, 样本稀释液, 实验缓冲液, 浓缩洗液以及增强液; 所述增强液为共荧光增强液。

[0064] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的制备方法中除了钐 (Sm^{3+}) 标记的弓形虫天然抗原, 铽 (Te^{3+}) 标记的风疹病毒天然抗原, 铕 (Eu^{3+}) 标记的巨细胞病毒天然抗原, 镝 (Dy^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原分别参照相应的镧系元素标记试剂盒说明书而制备, TORCH IgM 抗体校准品中由于目前尚无单纯疱疹病毒 (HSV) IgM 国际标准品和定量的国家标准品, 单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体校准品以德国维润赛润研发有限公司的单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体定量检测试剂盒 (酶联免疫法) 及酶标仪组成的测量程序标化, 所述单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体在 A、B、C、D、E 和 F 6 个校准品中的浓度分别为 0, 2, 8, 32, 128, 256U/mL 外, 其他同实施例 1 的制备方法。

[0065] 实施例 5

[0066] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的一种实施例, 所述试剂盒包括: 包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体, 铕 (Eu^{3+}) 标记的弓形虫天然抗原, 钐 (Sm^{3+}) 标记的风疹病毒天然抗原, 镝 (Dy^{3+}) 标记的巨细胞病毒天然抗原, 铽 (Te^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I 型天然抗原, TORCH IgM 抗体校准品, 样本稀释液, 实验缓冲液, 浓缩洗液以及增强液; 所述增强液为共荧光增强液。

[0067] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的制备方法中除了铕 (Eu^{3+}) 标记的弓形虫天然抗原、钐 (Sm^{3+}) 标记的风疹病毒天然抗原、镝 (Dy^{3+}) 标记的巨细胞病毒天然抗原和铽 (Te^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I 型天然抗原分别参照相应的镧系元素标记试剂盒说明书而制备外, 其他同实施例 1 的制备方法。

[0068] 实施例 6

[0069] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的一种实施例, 所述试剂盒包括: 包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体, 铕 (Eu^{3+}) 标记的弓形虫天然抗原, 钐 (Sm^{3+}) 标记的风疹病毒天然抗原, 镝 (Dy^{3+}) 标记的巨细胞病毒天然抗原, 铽 (Te^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 II 型天然抗原, TORCH IgM 抗体校准品, 样本稀释液, 实验缓冲液, 浓缩洗液以及增强液; 所述增强液为共荧光增强液。

[0070] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的制备方法中除了铕 (Eu^{3+}) 标记的弓形虫天然抗原、钐 (Sm^{3+}) 标记的风疹病毒天然抗原、镝 (Dy^{3+}) 标记的巨细胞病毒天然抗原和铽 (Te^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 II 型天然抗原分别参照相应的镧系元素标记试剂盒说明书而制备, TORCH IgM 抗体校准品中由于目前尚无单纯疱疹病毒 (HSV) IgM 国际标准品和定量的国家标准品, 单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体校准品以德国维润赛润研发有限公司的单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体定量检测试剂盒 (酶联免疫法) 及酶标仪组成的测量程序标化, 所述单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体在 A、B、C、D、E 和 F 6 个校准品中的浓度分别为 0, 2, 8, 32, 128, 256U/mL 外, 其他同实施例 1 的制备方法。

[0071] 实施例 7

[0072] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的一种实施例, 所述试剂盒包括: 包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体, 铕 (Eu^{3+}) 标记的弓形虫天然抗原, 钐 (Sm^{3+}) 标记

的风疹病毒天然抗原,镝 (Dy^{3+}) 标记的巨细胞病毒天然抗原,铽 (Te^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I 型重组抗原, TORCH IgM 抗体校准品,样本稀释液,实验缓冲液,浓缩洗液以及增强液;所述增强液为共荧光增强液。

[0073] 本发明所述检测 TORCH IgM 抗体的试剂盒的制备方法中除了铕 (Eu^{3+}) 标记的弓形虫天然抗原、钐 (Sm^{3+}) 标记的风疹病毒天然抗原、镝 (Dy^{3+}) 标记的巨细胞病毒天然抗原和铽 (Te^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I 型重组抗原分别参照相应的镧系元素标记试剂盒说明书而制备外,其他同实施例 1 的制备方法。

[0074] 实施例 8

[0075] 本发明所述检测戊型肝炎病毒抗体的试剂盒的使用方法,具体操作如下:

[0076] 1) 试剂准备

[0077] 固相载体:将试剂及所需数量的鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体固相载体平衡至室温 ($20 \sim 25^{\circ}C$)。余下的固相载体及时置入自封袋密闭并于 $2 \sim 8^{\circ}C$ 保存。

[0078] 洗涤工作液:将 40mL 浓缩洗液和 960mL 纯化水在干净的容器中混合,作为工作洗涤液备用。纯化水敬请用户自备。

[0079] 镧系元素标记物混合工作液:使用前 30min 内配制,铕标记物、钐标记物、镝标记物和铽标记物四种镧系元素标记物与实验缓冲液按体积比 1:1:1:1:20 加进洁净的同一个一次性容器中并混匀;当次实验用完。在实施例 3 所述试剂盒的使用方法中,镝标记物为镝 (Dy^{3+}) 标记的弓形虫重组抗原,铽标记物为铽 (Te^{3+}) 标记的风疹病毒重组抗原,铕标记物为铕 (Eu^{3+}) 标记的巨细胞病毒重组抗原,钐标记物为钐 (Sm^{3+}) 标记的单纯疱疹病毒 I+II 型重组抗原,其他实施例所述试剂盒的使用方法中铕标记物、钐标记物、镝标记物和铽标记物分别为相应镧系元素标记的病原体抗原。

[0080] 2) 试验操作

[0081] ①将待检样本用样本稀释液按 1:100 稀释,然后在包被有鼠抗人 IgM μ 链单克隆抗体的固相载体上预设的校准品孔、样本孔相应位置分别加入 $100 \mu L$ TORCH IgM 抗体校准品和 $100 \mu L$ 预先稀释好的待检样本;

[0082] ②将步骤①中得到的固相载体在室温条件下缓慢振荡孵育 45min;

[0083] ③第一步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤 4 次,拍干;

[0084] ④分别向步骤③中获得的固相载体上校准品孔和样本孔中加入 $100 \mu L$ 配制好的镧系元素标记物混合工作液,在室温下缓慢振荡孵育 45min;

[0085] ⑤第二步孵育结束后,小心将封片揭下并弃掉,用洗板机洗涤 6 次,拍干;

[0086] ⑥分别向步骤⑤中获得的固相载体上校准品孔和样本孔中加入 $100 \mu L$ 加入增强液的共解离剂部分,继续孵育 5min,再加入 $100 \mu L$ 增强液的共增强剂;

[0087] ⑦步骤⑥中获得的固相载体于室温下缓慢振荡 5min 后,在相应的镧系元素检测窗口检测,铕标记物、钐标记物、镝标记物、铽标记物分别在铕窗口、钐窗口、镝窗口、铽窗口检测,在 30min 内完成检测并进行分析。

[0088] 实施例 9

[0089] 本发明所述试剂盒的性能分析

[0090] (1) 弓形虫 IgM 抗体定量测定的分析性能:

[0091] ①最低检出量(稀释度):用 6 份企业灵敏度参考品进行检定, S1 ~ S3 检测结果

S/CO 或 COI ≥ 1.0 , S4、S5 检测结果 S/CO 或 COI < 1.0 或 ≥ 1.0 , S6 检测结果 S/CO 或 COI < 1.0 ;

[0092] ②重复性:用 1 份企业精密度参考品检定,试剂盒批内变异系数 CV $\leq 15.0\%$ (n = 10);

[0093] ③阴性参考品符合率:用 10 份企业阴性参考品检定,结果均为阴性;

[0094] ④阳性参考品符合率:用 10 份企业阳性参考品检定,结果均为阳性;

[0095] ⑤稳定性试验:取有效期内试剂盒于 37℃放置至少 6 天(有效期为 1 年)检测,其性能无明显改变。

[0096] ⑥交叉反应:检测以下样本均无交叉反应,弓形虫 IgG 抗体高浓度样本 10 例,风疹病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例,巨细胞病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例,单纯疱疹病毒 I 型 IgM 抗体阳性样本 5 例,单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体阳性样本 5 例,抗核抗体阳性样本 5 例,类风湿因子阳性样本 5 例,异嗜细胞抗体阳性样本 5 份,胆红素样本 5 份,甘油三酯样本 5 份,溶血样本 15 份,EB 病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例,乙型肝炎病毒表面抗体阳性 ($\geq 100\text{mIU/mL}$) 样本 20 例;乙型肝炎病毒 e 抗体阳性 ($\geq 4\text{NCU/mL}$) 20 例;乙型肝炎病毒核心抗体 IgM 阳性 ($\geq 200\text{PEI U/L}$) 20 例;甲型肝炎病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例,水痘带状疱疹病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例,肺炎支原体 IgM 抗体阳性样本 10 例,大肠杆菌 BL21 抗体 (2.50mg/mL) 1 份(仅代表本实验室研究结果)。

[0097] ⑦干扰物质:胆红素浓度 818 $\mu\text{mol/L}$, 血红蛋白浓度 180g/L, 甘油三酯浓度 21.54mmol/L, EDTA-K₂-2H₂O 浓度 2.2mg/mL, 草酸钾浓度 2mg/mL, 肝素浓度 15U/mL, 枸橼酸钠浓度 21.8mmol/L, 氟化钠浓度 1mg/mL 对检测结果无干扰性。

[0098] ⑧ IgM 破坏性试验:10 份含有特异性弓形虫 (TOX) IgM 抗体的样本,采用 0.2 mol/L 的 2-巯基乙醇 37℃灭活 IgM 抗体 2h 后对比检测处理前和处理后的样本,处理样本后, IgM 抗体检测结果均为阴性。

[0099] 2) 风疹病毒 IgM 抗体定量测定的分析性能:

[0100] ①最低检测限:用国家参考品或标化的企业参考品检定,3 份最低检测限参考品 (L1 ~ L3), L1 和 L2 检测结果均为阳性, L3 检测结果为阴性或阳性;

[0101] ②重复性:用国家参考品或标化的企业参考品检定,试剂盒批内变异系数 (CV) 不大于 15.0% (n = 10);

[0102] ③阴性参考品符合率:用 10 份国家参考品或标化的企业参考品检定,结果均为阴性;

[0103] ④阳性参考品符合率:用 5 份国家参考品或标化的企业参考品检定,结果均为阳性;

[0104] ⑤稳定性试验:试剂盒自成品生产之日起于 37℃放置 6 天(有效期为 12 个月);成品剩余效期内,则按 37℃放置 6 天有效期为 12 个月推算 37℃放置的时间进行检测,其性能无明显改变。

[0105] ⑥交叉反应:检测以下样本均无交叉反应,风疹病毒 IgG 抗体高浓度样本 10 例,弓形虫 IgM 抗体阳性样本 5 例,巨细胞病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例,单纯疱疹病毒 I 型 IgM 抗体阳性样本 5 例,单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体阳性样本 5 例,抗核抗体阳性样本 5 例,类风湿因子阳性样本 5 例,异嗜细胞抗体阳性样本 5 份,胆红素样本 5 份,甘油三酯样本 5 份,

溶血样本 15 份, EB 病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 乙型肝炎病毒表面抗体阳性 ($\geq 100\text{mIU/mL}$) 样本 20 例; 乙型肝炎病毒 e 抗体阳性 ($\geq 4\text{NCU/mL}$) 20 例; 乙型肝炎病毒核心抗体 IgM 阳性 ($\geq 200\text{PEI U/L}$) 20 例; 甲型肝炎病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 水痘带状疱疹病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 肺炎支原体 IgM 抗体阳性样本 10 例, 大肠杆菌 BL21 抗体 (2.50mg/mL) 1 份 (仅代表本实验室研究结果)。

[0106] ⑦干扰物质: 胆红素浓度 $818\ \mu\text{mol/L}$, 血红蛋白浓度 180g/L , 甘油三酯浓度 21.54mmol/L , EDTA- $\text{K}_2\text{-}2\text{H}_2\text{O}$ 浓度 2.2mg/mL , 草酸钾浓度 2mg/mL , 肝素浓度 15U/mL , 枸橼酸钠浓度 21.8mmol/L , 氟化钠浓度 1mg/mL 对检测结果无干扰性。

[0107] ⑧ IgM 破坏性试验: 10 份含有特异性风疹病毒 (RV) IgM 抗体的样本, 采用 0.2mol/L 的 2-巯基乙醇 37°C 灭活 IgM 抗体 2h 后对比检测处理前和处理后的样本, 处理样本后, IgM 抗体检测结果均为阴性。

[0108] (3) 巨细胞病毒 IgM 抗体定量测定的分析性能:

[0109] ①最低检测限: 用国家参考品或标化的企业参考品检定, S1 ~ S3 检测为阳性, S4、S5 检测为阴性或阳性, S6 检测为阴性;

[0110] ②重复性: 用国家参考品或标化的企业参考品检定, 试剂盒批内变异系数 $\text{CV} \leq 15.0\%$ ($n = 10$);

[0111] ③阴性参考品符合率: 用 9 份国家参考品或标化的企业阴性参考品检定, 结果均为阴性;

[0112] ④阳性参考品符合率: 用 5 份国家参考品或标化的企业阳性参考品检定, 结果均为阳性;

[0113] ⑤稳定性试验: 试剂盒自成品生产之日起于 37°C 放置 6 天 (有效期为 12 个月); 成品剩余效期内, 则按 37°C 放置 6 天有效期为 12 个月推算 37°C 放置的时间进行检测, 其性能无明显改变。

[0114] ⑥交叉反应: 检测以下样本均无交叉反应, 巨细胞病毒 IgG 抗体高浓度样本 10 例, 风疹病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 弓形虫 IgM 抗体阳性样本 5 例, 单纯疱疹病毒 I 型 IgM 抗体阳性样本 5 例, 单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体阳性样本 5 例, 抗核抗体阳性样本 5 例, 类风湿因子阳性样本 5 例, 异嗜细胞抗体阳性样本 5 份, 胆红素样本 5 份, 甘油三酯样本 5 份, 溶血样本 15 份, EB 病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 乙型肝炎病毒表面抗体阳性 ($\geq 100\text{mIU/mL}$) 样本 20 例; 乙型肝炎病毒 e 抗体阳性 ($\geq 4\text{NCU/mL}$) 20 例; 乙型肝炎病毒核心抗体 IgM 阳性 ($\geq 200\text{PEI U/L}$) 20 例; 甲型肝炎病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 水痘带状疱疹病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 肺炎支原体 IgM 抗体阳性样本 10 例, 大肠杆菌 BL21 抗体 (2.50mg/mL) 1 份 (仅代表本实验室研究结果)。

[0115] ⑦干扰物质: 胆红素浓度 $818\ \mu\text{mol/L}$, 血红蛋白浓度 180g/L , 甘油三酯浓度 21.54mmol/L , EDTA- $\text{K}_2\text{-}2\text{H}_2\text{O}$ 浓度 2.2mg/mL , 草酸钾浓度 2mg/mL , 肝素浓度 15U/mL , 枸橼酸钠浓度 21.8mmol/L , 氟化钠浓度 1mg/mL 对检测结果无干扰性。

[0116] ⑧ IgM 破坏性试验: 10 份含有特异性巨细胞病毒 (CMV) IgM 抗体的样本, 采用 0.2mol/L 的 2-巯基乙醇 37°C 灭活 IgM 抗体 2h 后对比检测处理前和处理后的样本, 处理样本后, IgM 抗体检测结果均为阴性。

[0117] (4) 单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体定量测定的分析性能:

[0118] ①最低检测限 :用企业参考品检测, S1 ~ S3 均为阳性, S4、S5 为阴性或阳性, S6 为阴性 ;

[0119] ②重复性 :用企业参考品检测, 试剂盒批内变异系数 $CV \leq 15\%$ ($n = 10$) ;

[0120] ③阴性参考品符合率 :用 20 份企业阴性参考品检测, 检测结果应为阴性 ;

[0121] ④阳性参考品符合率 :用 10 份企业阳性参考品进行检测, 检测结果为阳性 ;

[0122] ⑤稳定性试验 : 试剂盒自成品生产之日起于 37℃ 放置 6 天 (有效期为 12 个月) ; 成品剩余效期内, 则按 37℃ 放置 6 天有效期为 12 个月推算 37℃ 放置的时间进行检测, 其性能无明显改变。

[0123] ⑥交叉反应 :检测以下样本均无交叉反应, 单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体高浓度样本 10 例, 单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体高浓度样本 10 例, 风疹病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 弓形虫 IgM 抗体阳性样本 5 例, 巨细胞病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 抗核抗体阳性样本 5 例, 类风湿因子阳性样本 5 例, 异嗜细胞抗体阳性样本 5 份, 胆红素样本 5 份, 甘油三酯样本 5 份, 溶血样本 15 份, EB 病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 乙型肝炎病毒表面抗体阳性 ($\geq 100\text{mIU/mL}$) 样本 20 例 ;乙型肝炎病毒 e 抗体阳性 ($\geq 4\text{NCU/mL}$) 20 例 ;乙型肝炎病毒核心抗体 IgM 阳性 ($\geq 200\text{PEI U/L}$) 20 例 ;甲型肝炎病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 水痘带状疱疹病毒 IgM 抗体阳性样本 5 例, 肺炎支原体 IgM 抗体阳性样本 10 例,

[0124] 大肠杆菌 BL21 抗体 (2.50mg/mL) 1 份。

[0125] ⑦干扰物质 :胆红素浓度 $818 \mu\text{mol/L}$, 血红蛋白浓度 180g/L , 甘油三酯浓度 21.54mmol/L , EDTA- $\text{K}_2\text{-}2\text{H}_2\text{O}$ 浓度 2.2mg/mL , 草酸钾浓度 2mg/mL , 肝素浓度 15U/mL , 枸橼酸钠浓度 21.8mmol/L , 氟化钠浓度 1mg/mL 对检测结果无干扰性。

[0126] ⑧ IgM 破坏性试验 :10 份含有特异性单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体的样本, 采用 0.2mol/L 的 2- 巯基乙醇 37°C 灭活 IgM 抗体 2h 后对比检测处理前和处理后的样本, 处理样本后, IgM 抗体检测结果均为阴性。

[0127] 实施例 10

[0128] 本发明所述试剂盒与德国维润赛润研发有限公司的产品比较, 比较结果如下 :

[0129] 表 1 弓形虫 IgM 抗体检测结果

[0130]

本发明试剂盒	维润赛润试剂		合计
	+	-	
+	40	2	42
-	3	975	978
合计	43	977	1020

[0131] 表 1 中不符合样本均在 2 周后重新采血与第一次的采血同时进行弓形虫 IgG 抗体检测, 在维润赛润试剂检测弓形虫 IgM 抗体中为阳性而本发明试剂盒检测为阴性的 3 例样本中有 1 例弓形虫 IgG 抗体出现 4 倍增高 ;在维润赛润试剂检测弓形虫 IgM 抗体中为阴性而本发明试剂检测为阳性的 2 例样本中也有 1 例弓形虫 IgG 抗体出现 4 倍增高。

[0132] 表 2 风疹病毒 IgM 抗体检测结果

[0133]

本发明试剂盒	维润赛润试剂		合计
	+	-	
+	36	4	40
-	3	977	980
合计	39	981	1020

[0134]

[0135] 表 2 中不符合样本均在 2 周后重新采血与第一次的采血同时进行风疹病毒 IgG 抗体检测,在维润赛润试剂检测风疹病毒 IgM 抗体中为阳性而本发明试剂盒检测为阴性的 3 例样本中有 0 例风疹病毒 IgG 抗体出现 4 倍增高;在维润赛润试剂检测风疹病毒 IgM 抗体中为阴性而本发明试剂检测为阳性的 4 例样本中有 2 例风疹病毒 IgG 抗体出现 4 倍增高。

[0136] 表 3 巨细胞病毒 IgM 抗体检测结果

[0137]

本发明试剂盒	维润赛润试剂		合计
	+	-	
+	53	4	57
-	4	959	959
合计	57	963	1020

[0138] 表 3 中不符合样本均在 2 周后重新采血与第一次的采血同时进行巨细胞病毒 IgG 抗体检测,在维润赛润试剂检测巨细胞病毒 IgM 抗体中为阳性而本发明试剂检测为阴性的 4 例样本中有 2 例巨细胞病毒 IgG 抗体出现 4 倍增高;在维润赛润试剂检测巨细胞病毒 IgM 抗体中为阴性而本发明试剂检测为阳性的 4 例样本中有 1 例巨细胞病毒 IgG 抗体出现 4 倍增高。

[0139] 表 4 单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体检测结果

[0140]

本发明试剂盒	维润赛润试剂		合计
	+	-	
+	32	2	34
-	3	983	986
合计	35	985	1020

[0141] 这里的单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体为单纯疱疹病毒 I 型 IgM 抗体,单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体或单纯疱疹病毒 I 型 IgM 抗体和单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的混合,表 4 中不符合样本均在 2 周后重新采血与第一次的采血同时进行单纯疱疹病毒 I+II 型 IgG 抗体检测,在维润赛润试剂检测单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体中为阳性而本发明试剂检测为阴性的 3 例样本中有 1 例单纯疱疹病毒 I+II 型 IgG 抗体出现 4 倍增高;在维润赛润试剂检测单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体中为阴性而本发明试剂检测为阳性的 4 例样本中有 0 例

单纯疱疹病毒 I+II 型 IgG 抗体出现 4 倍增高。

[0142] 从比较结果来看,本发明所述试剂盒与德国维润赛润研发有限公司的产品相比,在检测弓形虫 IgM 抗体、风疹病毒 IgM 抗体、巨细胞病毒 IgM 抗体、单纯疱疹病毒 I+II 型 IgM 抗体时,其检测准确性相当。

[0143] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

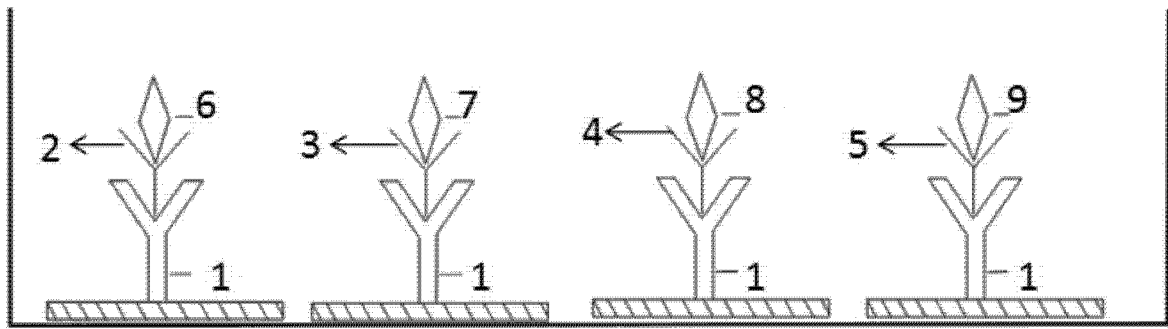


图 1

专利名称(译)	一种检测TORCH IgM抗体的方法及试剂盒和该试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN104155449A	公开(公告)日	2014-11-19
申请号	CN201410363969.5	申请日	2014-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
[标]发明人	谭玉华 范主桥 李奕辉 卢德祥		
发明人	谭玉华 范主桥 李奕辉 卢德祥		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/56983 G01N33/56994 G01N33/582 G01N2333/45		
代理人(译)	付静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测TORCH IgM抗体的试剂盒，所述试剂盒包括：包被有与TORCH IgM抗体结合的抗体的固相载体，镧系元素标记的TORCH抗原，TORCH IgM抗体校准品，样本稀释液，实验缓冲液，浓缩洗液以及增强液。本发明所述试剂盒能够在相对同一检测条件下同时检测TORCH病原体中多种病原体IgM抗体，灵敏度高，特异性强，精密度高，准确度高，用血量少，快速方便，有利于TORCH病原体感染的早期诊断；本方法又具有检测线性范围宽的特点，可以减少高值样本的稀释次数或稀释倍数，可以提高检测结果的准确性。

