



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106980017 B

(45)授权公告日 2019.06.28

(21)申请号 201611250386.7

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2016.12.30

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106980017 A

审查员 刘迎鸣

(43)申请公布日 2017.07.25

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:M 2016607 2016.11.01

(73)专利权人 青岛易邦生物工程有限公司

地址 266009 山东省青岛市红岛经济开发
区岙东南路21号

(72)发明人 张恒 郭莉莉 张会 范根成

杜元钊

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务

所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种兔支气管败血波氏杆菌的检测方法

(57)摘要

本发明提供一种用于兔支气管败血波氏杆菌的悬浮荧光免疫检测方法,包括有用于检测兔支气管败血波氏杆菌的悬浮荧光免疫检测试剂盒及其间接悬浮免疫荧光检测方法。其中,试剂盒成份包括用于检测兔支气管败血波氏杆菌的单因子血清抗体、FITC标记羊抗小鼠IgG、阳性对照样品、固定液和PBS洗液;所述的检测兔支气管败血波氏杆菌的单因子血清抗体,是用兔支气管败血波氏杆菌QDBb01株外膜蛋白抗原免疫小鼠制备的。以此试剂盒为基础构建的兔支气管败血波氏杆菌悬浮荧光免疫检测方法,可检测临床上兔支气管败血波氏杆菌感染兔病料组织中的抗原,判定是否感染兔支气管败血波氏杆菌,其特异性强、灵敏度高、可重复性好且检测速度快。

1. 一种用于检测兔支气管败血波氏杆菌的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包含如下的组分:

- 1) 一抗:用于检测兔支气管败血波氏杆菌的单因子血清抗体;
- 2) 二抗:FITC标记的山羊抗小鼠IgG;
- 3) PBS洗液;其配比为NaCl 8.0g/L;KCl 0.2g/L;Na₂HPO₄ 3.58g/L;KH₂PO₄ 0.24g/L;

所述的单因子血清抗体,其制备方法如下:将兔支气管败血波氏杆菌进行培养,并4000r/min收集菌体,再用pH7.2的Tris-HCl溶液重悬菌体,将重悬菌体超声波破碎,破碎工作1s,间隔时间3s,全程时间12min,总共180次;再4000r/min低速离心去除未破碎掉的细菌菌体和较重的细菌细胞内细胞器,取上清液于100000r/min,超速离心20min,去上清;将含外膜蛋白的沉淀用含2%Triton X-100的Tris-HCl缓冲液溶解,室温下孵育1h去除内膜蛋白,再进行100000r/min超速离心30min,沉淀用缓冲液再重悬,采用能够截留蛋白分子量在40kDa以上的半透膜透析掉小分子外膜蛋白;将纯化后的兔支气管败血波氏杆菌外膜蛋白浓度稀释至50μg/ml,再与弗氏完全佐剂按照体积比1:1乳化制备亚单位疫苗,将此疫苗三次强化免疫BALB/c小鼠,每次间隔14d后,用兔支气管败血波氏杆菌进行攻毒,选择攻毒后无发病临床症状的健康小鼠采集血清制备成单因子血清抗体;

用于制备单因子血清抗体的所述的兔支气管败血波氏杆菌为兔支气管败血波氏杆菌QDBb01株,保藏编号为CCTCC M 2016607;

所述的试剂盒中还包含有作为阳性对照样品的兔支气管败血波氏杆菌。

一种兔支气管败血波氏杆菌的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于家畜病毒检测技术领域,具体涉及一种兔支气管败血波氏杆菌的检测方法。

背景技术

[0002] 兔支气管败血波氏杆菌病在秋冬季节和早春多发;该菌主要通过空气传播,经呼吸道而感染。幼兔发病率高,并且有死亡病例。成年兔发病较少。此菌在群养兔污染为64.4%,散养兔为20%。在自然条件下,多种哺乳动物上呼吸道中都有本菌寄生,常引起慢性呼吸道病的相互感染。尤其在天气突变,兔的抵抗力下降,兔舍卫生不好,空气污浊等情况下,均可引起本病发生。本病的潜伏期7~10d。成年兔表现鼻炎和支气管炎。有多量的浆液性、黏液性鼻液流出。鼻炎长期不愈,鼻腔流出黏液性或脓性分泌物,打喷嚏,呼吸困难,不食,消瘦等。仔兔多呈急性经过,初期刚见鼻炎病状后,即表现呼吸困难,迅速死亡,病程2~3d。本病的主要病变为鼻炎、化脓性鼻气管炎、化脓性支气管肺炎,个别的出现败血病变化。鼻腔、气管黏膜充血、水肿。鼻腔内有浆液性、黏液性或黏液脓性分泌物。在肺门支气管周围到肺的边缘见有支气管肺炎病灶。病变多见于心叶、尖叶,严重的病例,波及全肺叶。病变部隆起、坚硬,呈暗红色,褐色,进而为灰黄色。有些病例肺上有大小不等的脓疮。严重的占肺部的90%以上。有的肝脏表面有黄豆至蚕豆大的脓疮。脓疮破后可见黏稠的奶油状乳白色的脓汁。还见有心包炎、胸膜炎、胸腔积脓及肌肉脓肿等。

[0003] 根据临床病状及剖检变化可初步确诊。但必须进行细菌学检查,找出病原才能最后确诊。采取呼吸道分泌物或病变组织涂片,革兰氏染色,镜检,能看到革兰氏阴性、小球杆菌;如用美蓝染色,镜检,可见多形态、两极染色的小杆菌。血清学检查可用平板凝集试验,在洁净的玻璃片上,滴加1滴菌液(2500亿菌1ml),再加1滴被检血清,充分混合,在20~25℃条件下作用2~5min,出现颗粒絮状物,液体清亮为阳性。以上检测方法均不能进行对分离到的病原菌直接定性,往往存在同种类分离菌的影响,不能精确确诊,易出现误诊。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种兔支气管败血波氏杆菌的检测方法,可以更灵敏、更特异的检测到兔体是否感染了兔支气管败血波氏杆菌,从而弥补现有技术的不足。

[0005] 本发明首先提供一种用于检测兔支气管败血波氏杆菌的试剂盒,包含如下的组分:

[0006] 1) 一抗:用于检测兔支气管败血波氏杆菌的单因子血清抗体;

[0007] 2) 二抗:FITC标记的山羊抗小鼠IgG;

[0008] 3) 阳性对照样品:兔支气管败血波氏杆菌;

[0009] 4) PBS洗液:NaCl 8.0g/L;KCl 0.2g/L;Na₂HPO₄ 3.58g/L;KH₂PO₄ 0.24g/L定容至1L。

[0010] 其中单因子血清抗体,其制备方法如下:将兔支气管败血波氏杆菌QDBb01株

(Rabbit *Bordetella bronchiseptica* QDBb01), 保藏编号为CCTCC NO:M 2016607; 进行培养, 并4000r/min收集菌体, 再用PH7.2的Tris-Hcl溶液重悬菌体, 将重悬菌体超声波破碎, 破碎工作1s, 间隔时间3s, 全程时间12min, 总共180次; 再4000r/min低速离心去除未破碎掉的细菌菌体和较重的细菌细胞内细胞器, 取上清液于100000r/min, 超速离心20min, 去上清; 将含外膜蛋白的沉淀用含2% Triton X-100的Tris-Hcl缓冲液溶解, 室温下孵育1h去除内膜蛋白, 再进行100000r/min超速离心30min, 沉淀用缓冲液再重悬, 采用能够截留蛋白分子量在40kDa以上的半透膜透析掉小分子外膜蛋白; 将纯化后的兔支气管败血波氏杆菌外膜蛋白浓度稀释至50 μ g/ml, 再与弗氏完全佐剂按照体积比1:1乳化制备亚单位疫苗, 将此疫苗三次强化免疫Balb/C小鼠, 每次间隔14d后, 用兔支气管败血波氏杆菌进行攻毒, 选择攻毒后无发病临床症状的健康小鼠采集血清制备成单因子血清抗体。

[0011] 上述的试剂盒用于检测兔支气管败血波氏杆菌; 操作步骤包括如下:

[0012] 通过将待检测的样品菌进行3% TSB培养基培养后, 先收集细胞于离心管中, 1500r/min离心收集细菌, 并用PBS重悬洗涤收集菌, 然后加入10%多聚甲醛对重悬菌体固定、1%BSA封闭, 再依次加入试剂盒中制备的一抗(兔支气管败血波氏杆菌单因子血清)、二抗(FITC标记的山羊抗小鼠IgG) 赋育, 以上操作步骤均采用1500r/min离心10min的方法进行洗涤多聚甲醛以及未结合的BSA、一抗和二抗, 最后将染色后的细菌液滴至载玻片上, 并用盖玻片封片, 于荧光显微镜下观察。

[0013] 为了弥补现今国内外兔支气管败血波氏杆菌悬浮培养后检测方法的不足, 本发明通过构建兔支气管败血波氏杆菌悬浮荧光免疫检测试剂盒, 将待检兔支气管败血波氏杆菌悬浮培养后, 采用间接免疫荧光检测技术(IFA) 进行该菌悬浮状态下的一抗、二抗荧光抗体染色。该检测方法能够具体检测到兔支气管败血波氏杆菌的单个菌体(出现特异性绿色荧光), 具有灵敏度高、特异性强和重复性好的特点。

具体实施方式

[0014] 实施例1: 用于检测兔支气管败血波氏杆菌的悬浮荧光免疫试剂盒的构建

[0015] 1.1针对兔支气管败血波氏杆菌单因子血清抗体的制备方法

[0016] 用于检测兔支气管败血波氏杆菌的荧光免疫试剂盒主要成分为鼠抗兔支气管败血波氏杆菌外膜蛋白的单因子血清抗体, 是将青岛易邦生物工程有限公司技术中心分离鉴定保存的兔支气管败血波氏杆菌QDBb01株(于2016年11月1日保藏在中国武汉的中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为CCTCC M 2016607) 进行3% TSB培养, 并4000r/min收集菌体, 再用PH7.2Tris-Hcl重悬菌体, 将重悬菌体超声波破碎, 工作1s, 间隔时间3s, 全程时间12min, 总共180次。4000r/min低速离心去除未破碎掉的细菌菌体和较重的细菌细胞内细胞器, 取上清液于100000r/min, 超速离心20min, 去上清。将含外膜蛋白的沉淀用含2% Triton X-100的Tris-Hcl缓冲液溶解, 室温下孵育1h去除内膜蛋白, 再进行100000r/min超速离心30min, 沉淀用缓冲液再重悬, 采用能够截留蛋白分子量在40kDa以上的半透膜透析掉小分子外膜蛋白, 分装, 置-20 $^{\circ}$ C保存。采用Bradford蛋白含量测定法测出样品中纯化的兔支气管败血波氏杆菌外膜蛋白浓度。将纯化后的兔支气管败血波氏杆菌外膜蛋白浓度稀释至50 μ g/ml, 再与弗氏完全佐剂按照体积比1:1乳化制备亚单位疫苗, 将此疫苗三次强化免疫10只Balb/C小鼠, 每只1ml (25 μ g/只); 14d后用进行第二次免疫, 1ml/只; 再经14d后第三次

免疫(方法同第二次),其中5只未免疫Balb/C小鼠作为阴性对照组。第三次免疫后10d,,用兔支气管败血波氏杆菌P13株(进行攻毒的兔支气管败血波氏杆菌还可以选用其它兔支气管败血波氏杆菌)进行攻毒,选择攻毒后发病临床症状的健康小鼠采集血清制备,析出的血清-20℃保存。其制备出的抗体能够与兔支气管败血波氏杆菌外膜蛋白发生特异性反应。以此单因子血清构建的兔支气管败血波氏杆菌的荧光免疫检测试剂盒,可以检测兔支气管败血波氏杆菌的外膜抗原蛋白,可以检测临床上兔支气管败血波氏杆菌感染兔病料组织中的抗原,判定是否感染兔支气管败血波氏杆菌,其特异性强、灵敏度高、可重复性好且检测速度快,与以往的PCR、革兰氏染色、平板凝集试验及动物回归试验检测方法相比,利用该试剂盒通过IFA检测更方便、更准确。

[0017] 实施例2间接悬浮免疫荧光抗体检测方法操作步骤

[0018] 2.1收集悬浮培养的兔支气管败血波氏杆菌(QDBb01株)菌体1ml(细菌总数为 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml)于1.5ml EP管中,1500r/min离心10min,弃上清。

[0019] 2.2加入1mlPBS,温和上下颠倒,1500r/min,弃上清。

[0020] 2.3重复1.2.2步骤,去除培养基中血清的影响;

[0021] 2.4加入10%多聚甲醛1ml,重悬细菌菌体,室温放置10min;期间每隔2min轻弹EP管管底数次,使细菌单个菌体充分接触固定液;1500r/min离心10min,弃上清。

[0022] 2.5加入1ml含1%BSA 37℃封闭1小时,以封闭细菌表面的非特异性抗原;期间每隔2min轻弹EP管管底数次,使细菌单个菌体充分接触封闭液1500r/min离心10min,弃上清。

[0023] 2.6将析出的小鼠血清分别用PBS按1:50、1:100、1:200、1:500作4个稀释度稀释至1ml重悬菌体,37℃孵育1小时。

[0024] 2.7使用1mlPBS轻轻冲洗细胞3次,每次10min(切忌将细胞冲起)。

[0025] 2.8加入FITC标记的山羊抗小鼠IgG荧光二抗(Sigma),500 μ l/孔,37℃避光孵育1小时。

[0026] 2.9使用1mlPBS轻轻冲洗细胞3次,每次10min。

[0027] 2.10将1.2.9处理的EP管中的菌悬液滴在载玻片上,盖上盖玻片压成单侧,在倒置显微镜下用蓝色激发光(波长490nm)放大100 $\times \sim$ 200 \times 观察。

[0028] 2.11结果判定当待检EP管中细菌菌体出现特异性绿色荧光,阴性对照管中细菌菌体未出现特异性绿色荧光时,试验成立。待检孔被判为阳性。

[0029] 2.12结果单因子血清可与兔支气管败血波氏杆菌发生特异性反应,并且因子血清在1:100倍稀释效果较好。

[0030] 实施例3:兔支气管败血波氏杆菌悬浮荧光检测方法的敏感性和特异性鉴定

[0031] 3.1以此单因子血清为基础构建的兔支气管败血波氏杆菌悬浮荧光免疫检测方法所用试剂盒成份包括:

[0032] 1)一抗:用于检测兔支气管败血波氏杆菌的单因子血清抗体(鼠源),工作浓度100倍稀释;

[0033] 2)二抗:FITC标记的山羊抗小鼠IgG;

[0034] 3)阳性对照样品:兔支气管败血波氏杆菌(P13株);

[0035] 4)PBS洗液:NaCl 8.0g/L;KCl 0.2g/L;Na₂HPO₄ 3.58g/L;KH₂PO₄ 0.24g/L定容至1L。

[0036] 3.2用于检测兔支气管败血波氏杆菌悬浮荧光检测方法的灵敏性、特异性和重复性试验

[0037] 1) IFA和PCR对比检测

[0038] 为了分析本发明检测兔支气管败血波氏杆菌抗原的悬浮荧光检测方法的敏感性和特异性,分别用IFA和PCR方法对江苏、河南、天津和山东等地兔场送检的89份临床诊断疑似兔支气管败血波氏杆菌感染的组织样品进行了对比检测。IFA和PCR检测不同地区来源组织样品结果见下表。

[0039]

样品来源	样品数	IFA 阳性数	阳性率 (%)	PCR 阳性数	阳性率 (%)
江苏	20	4	20	5	25
河南	21	6	28.6	6	28.6
天津	23	5	12.2	6	12.5
山东	25	5	12.5	5	12.5
总计	89	20	22.5	22	24.7

[0040] 2) 重复性试验

[0041] 利用此用于检测兔支气管败血波氏杆菌的悬浮荧光免疫检测方法对89份临床样品进行检测,同时,提取样品细菌DNA用PCR方法进行扩增验证该方法检测结果,除了江苏和天津组织样品检测阳性数:PCR方法比IFA方法均多一例外,其余检测结果基本一致。同时,对上述江苏及天津样品进行两次重复检测,IFA检测结果与第一次相同,第二、三次PCR检测结果与IFA结果一致,说明PCR检测结果易出现假阳性结果,从而证明此方法检测结果的灵敏性、特异性及可重复性。重复检测结果见下表。

[0042]

样品来源	样品数	IFA 阳性数 (2)	PCR 阳性数 (2)	IFA 阳性数 (3)	PCR 阳性数 (3)
江苏	4	4	4	4	4
天津	5	5	5	5	5
总计	9	9	9	9	9

[0043] 3) 交叉试验

[0044] 随机抽取一批利用检测兔支气管败血波氏杆菌悬浮荧光免疫检测方法,对实验室保存的一些病原毒株进行检测,结果表明兔巴氏杆菌、兔魏氏梭菌、兔大肠杆菌和兔沙门氏菌进行检测,结果在荧光显微镜下观察均未出现荧光,为阴性结果,进一步说明本发明检测兔支气管败血波氏杆菌的悬浮荧光免疫检测方法不会出现假阴性,具有良好的特异性。

[0045] 对本发明方法的应用效果描述如下:

[0046] A应用此方法不会出现假阳性和假阴性结果。

[0047] B敏感性和特异性较高:制备的该单因子血清工作浓度1:100倍稀释效果较好,且能准确灵敏的对实验室已知的兔支气管败血波氏杆菌进行检测诊断。

[0048] C临床应用效果较好:利用此方法对临床89份疑似兔支气管败血波氏杆菌引发的兔组织等样品进行检测,同时,用灵敏度较高的PCR方法进行验证,结果检测出20份含有兔支气管败血波氏杆菌的感染,此方法检测结果与第二、三次PCR方法检测结果一致,证明了此方法检测结果的灵敏性、特异性及可重复性较高,临床应用效果较好。

专利名称(译)	一种免支气管败血波氏杆菌的检测方法		
公开(公告)号	CN106980017B	公开(公告)日	2019-06-28
申请号	CN201611250386.7	申请日	2016-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	青岛易邦生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	青岛易邦生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	青岛易邦生物工程有限公司		
[标]发明人	张恒 郭莉莉 张会 范根成 杜元钊		
发明人	张恒 郭莉莉 张会 范根成 杜元钊		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/56911		
其他公开文献	CN106980017A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种用于免支气管败血波氏杆菌的悬浮荧光免疫检测方法，包括有用于检测免支气管败血波氏杆菌的悬浮荧光免疫检测试剂盒及其间接悬浮免疫荧光检测方法。其中，试剂盒成份包括用于检测免支气管败血波氏杆菌的单因子血清抗体、FITC标记羊抗小鼠IgG、阳性对照样品、固定液和PBS洗液；所述的检测免支气管败血波氏杆菌的单因子血清抗体，是用免支气管败血波氏杆菌QDBb01株外膜蛋白抗原免疫小鼠制备的。以此试剂盒为基础构建的免支气管败血波氏杆菌悬浮荧光免疫检测方法，可检测临床上免支气管败血波氏杆菌感染免病料组织中的抗原，判定是否感染免支气管败血波氏杆菌，其特异性强、灵敏度高、可重复性好且检测速度快。

样品来源	样品数	IFA 阳性数	阳性率 (%)	PCR 阳性数	阳性率 (%)
江苏	20	4	20	5	25
河南	21	6	28.6	6	28.6
天津	23	5	12.2	6	12.5
山东	25	5	12.5	5	12.5
总计	89	20	22.5	22	24.7