



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 204203232 U

(45) 授权公告日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201420633906. 2

(22) 申请日 2014. 10. 29

(73) 专利权人 武汉生命科技股份有限公司

地址 430079 湖北省武汉市洪山区卓刀泉路
26 号

(72) 发明人 张薇 吴边 龚华岳 王方杰
倪龙泉 金玉翠

(74) 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限公司 42102

代理人 唐万荣

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/536(2006. 01)

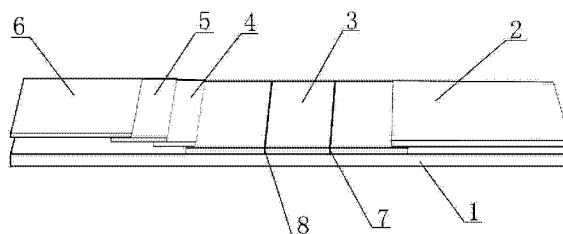
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 实用新型名称

麻疹疫苗接种效果快速评价试剂盒

(57) 摘要

本实用新型属于生物检测领域,具体涉及一种麻疹疫苗接种效果快速评价试剂盒。所述试剂盒包括箱体、装有样品稀释液的容器和检测试纸,所述检测试纸是由底板(1)和相互紧密搭接粘贴在底板上的样品垫(6)、抗原垫(5)、标记物结合垫(4)、包被膜(3)和吸收垫(2)组成,根据 WHO 推荐的麻疹抗体最低保护滴度水平,将试剂盒的最低检测线设定为 200mIU/ml,用于检测血清/血浆/全血中的抗麻疹病毒 IgG 抗体。本实用新型所述的试剂盒成本低廉,制备工艺简单,检测血清抗体的结果与 ELISA 试剂盒的结果无显著差异,可以用于麻疹疫苗接种后免疫效果的快速评价。



1. 麻疹疫苗接种效果快速评价试剂盒,包括箱体、装有样品稀释液的容器和检测试纸,所述装有样品稀释液的容器和检测试纸位于盒体内,其特征在于,所述检测试纸是由底板和相互紧密搭接粘贴在底板上的样品垫、抗原垫、标记物结合垫、包被膜和吸收垫组成,所述抗原垫上包被有麻疹病毒抗原,所述标记物结合垫上包被有胶体金标记的鼠抗麻疹单克隆抗体,所述包被膜上固定有检测T线和质控C线,所述检测T线上包被有鼠抗人IgG抗体,所述质控C线上包被有羊抗鼠IgG抗体;所述检测试纸的最低检测线为200mIU/ml。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗原垫为玻璃纤维、无纺布或聚酯膜。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述底板为PVC底板,所述PVC底板的一面为双面胶。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述包被膜为硝酸纤维素膜。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述标记物结合垫和样品垫为玻璃纤维,所述吸收垫为吸水纸。

麻疹疫苗接种效果快速评价试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型属于生物检测领域,具体涉及一种麻疹疫苗接种效果快速评价试剂盒。

背景技术

[0002] 麻疹由麻疹病毒引起的急性传染病,传染性极强,多见于儿童。其临床特征为发热、流鼻涕、咳嗽、眼结合膜炎,出现特殊的科氏斑(又称麻疹黏膜斑)和广泛的皮肤斑丘疹。麻疹是传染性最强的疾病之一,主要通过呼吸道飞沫或直接接触感染者的鼻或咽喉分泌物而传播,偶尔也通过空气传播的微小的气溶胶颗粒或者间接接触新鲜污染的物品。麻疹具有高度传染性,在易感人群中的二代发病率超过 90%。很多因素可以增加发展中国家的麻疹严重性,例如,过度拥挤会增加病毒在人与人之间的传播,还会增加暴露于高病毒载量的可能性。

[0003] 麻疹病毒属副粘病毒科(family Paramyxoviridae)麻疹病毒属(genus Morbillivirus)。它是一种有包膜的单链 RNA 病毒,数十年来在全球范围内均保持为单一抗原型。基因组编码包括血凝素蛋白(haemagglutinin protein, H)和融合蛋白(fusion protein, F)在内的 8 种蛋白质。患者在感染麻疹病毒后可获得终生免疫力,这得益于机体产生的抗 H 蛋白中和抗体。

[0004] 预防麻疹流行的有效措施主要是接种麻疹疫苗。我国的扩大国家免疫规划已将麻疹病毒活疫苗列入常规免疫程序,目前上市供应的麻疹减毒活疫苗的种类很多,有的是单价疫苗,有的则为含麻疹疫苗成分的联合疫苗(MCV),可含风疹、流行性腮腺炎、水痘疫苗,或含部分上述疫苗。每年大约有数千万儿童接受免疫接种。这提示我们,有必要对麻疹疫苗的群体免疫效果进行评价。

[0005] 评价疫苗免疫效果最可靠的方法就是检测接种者体内血清中的特异抗体的含量。当前市场上检测麻疹抗体的商品化试剂盒多采用酶联免疫法和化学发光法,这些方法虽然灵敏度高、结果准确、化学发光试剂还可以对抗体进行定量,但在实际操作上存在诸多不便,如步骤复杂、耗时较长,还需使用特定的仪器设备;试剂盒需 4℃ 保存;对样品要求静脉采血等,不易在基层普及运用。

[0006] 免疫胶体金快速诊断技术是建立在酶联免疫吸附试验、乳胶凝集试验、单克隆抗体技术和免疫胶体金标记技术基础上,以胶体金为标记物,利用特异的抗原抗体反应放大反应信号,通过直接观察就可以判定结果的新技术。该技术具有简单、快速、准确和无污染等优点,在临床医学检测、动物医学检测、激素检测、食品安全检测、药物残留和毒品快速检测等诸多诊断领域迅速发展。目前,胶体金标记的快速检测抗体的检测试纸都是由样品垫、标记物结合垫、包被膜(其上划有检测线、质控线)和吸收垫组成,根据检测原理的不同大体分为两种:一种是将抗原标金,在标记物结合垫上包被胶体金标记的抗原,在包被膜上用待测抗体的抗体划膜得到检测 T 线;另一种是将抗原划膜,在标记物结合垫上包被胶体金标记的待测抗体的抗体,在包被膜上用抗原划膜得到检测 T 线。现有研究表明:因为抗体

蛋白性质较为稳定,所以对抗体蛋白的胶体金标记较为稳定,因此上述第一种方法所述的抗原的胶体金标记则存在颇多问题,因为抗原多为病毒类,性质多样,有的大小甚至比胶体金颗粒还大,且稳定性较差,因此很难直接将抗原标记在胶体金颗粒上;即使勉强能将抗原标记上,也需要抗原达到极高的纯度,而对抗原病毒的纯化是一项难度较大、成本较高的工程;也有人寻找抗原的重组抗原来代替这些天然抗原,但是很多抗原很难寻到能替代的重组抗原,而且即使有,成本也是极高的,由此说明,上述第一种方法的局限性比较高。上述的第二种方法使用待测抗体的抗体进行金标记,可以避免抗原金标记的问题,但在包被膜上使用抗原划膜得到检测 T 线,需要抗原具有较高的浓度和纯度,这也增加了产品生产的成本和难度;另外将抗原划到膜上,由于抗原稳定性较差,抗原划膜后很难长时间保存,因此试纸条的有效期极短。这些都是限制抗体快速检测类试剂盒快速发展的原因。

发明内容

[0007] 本实用新型针对现有技术的不足,目的在于提供一种麻疹疫苗接种效果快速评价试剂盒,用该试剂盒对接种者体内血清中的麻疹病毒 IgG 抗体进行胶体金法快速检测,可以实现对麻疹疫苗接种效果的快速评价。

[0008] 本使用新型所采用的技术方案为:

[0009] 麻疹疫苗接种效果快速评价试剂盒,包括盒体、装有样品稀释液的容器和检测试纸,所述装有样品稀释液的容器和检测试纸位于盒体内,其特征在于,所述检测试纸是由底板和相互紧密搭接粘贴在底板上的样品垫、抗原垫、标记物结合垫、包被膜和吸收垫组成,所述抗原垫上包被有麻疹病毒抗原,所述标记物结合垫上包被有胶体金标记的鼠抗麻疹单克隆抗体,所述包被膜上固定有检测 T 线和质控 C 线,所述检测 T 线上包被有鼠抗人 IgG 抗体,所述质控 C 线上包被有羊抗鼠 IgG 抗体;所述检测试纸的最低检测线为 200mIU/ml。

[0010] 按上述方案,所述样品稀释液为含磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠和叠氮钠的混合水溶液。

[0011] 按上述方案,所述抗原垫为玻璃纤维、无纺布或聚酯膜。

[0012] 按上述方案,所述底板为 PVC 底板,所述 PVC 底板的一面为双面胶。

[0013] 按上述方案,所述包被膜为硝酸纤维素膜。

[0014] 按上述方案,所述标记物结合垫和样品垫为玻璃纤维,所述吸收垫为吸水纸。

[0015] 按上述方案,所述抗原垫的制备方法为:使用抗原保护液将麻疹病毒抗原进行稀释后均匀铺在玻璃纤维、无纺布或聚酯膜上,置于 37℃,相对湿度低于 40% 的环境中,干燥 4 小时,制成抗原垫;所述抗原保护液的配方为:Na₂HPO₄ 5.72g, NaH₂PO₄ 0.624g, 柠檬酸三钠 8.5g, 蔗糖 10g, 叠氮钠 1g, 水定容至 1L;所述麻疹病毒抗原为粗抗原,其中抗原的含量为 40wt%~50wt%。

[0016] 本实用新型中,所述试剂盒中检测试纸的检测原理为:在样品垫加入血清或血浆或全血样品,再加入 2~3 滴样品稀释液,若样品中含有麻疹病毒 IgG 抗体,其将和抗原垫中的麻疹病毒抗原形成麻疹病毒抗原-麻疹病毒 IgG 抗体复合物,该复合物向前移动,复合物中的麻疹病毒抗原再与标记物结合垫中的胶体金标记的鼠抗麻疹单克隆抗体结合,形成麻疹病毒 IgG 抗体-麻疹病毒抗原-胶体金标记的鼠抗麻疹单克隆抗体免疫复合物,该复合物由于层析作用沿纸条向前移动,至检测 T 线,复合物中的麻疹病毒 IgG 抗体与检测 T 线

上包被的鼠抗人 IgG 抗体反应形成鼠抗人 IgG 抗体-麻疹病毒 IgG 抗体-麻疹病毒抗原-胶体金标记的鼠抗麻疹单克隆抗体免疫复合物,该复合物可聚集在检测区,当聚集的复合物达到一定的数量时,则形成一条肉眼可见的条带(T 线),判断结果为阳性;若样品中不含有或含很少量的麻疹病毒 IgG 抗体,则不能形成免疫复合物,即不能形成肉眼可见的条带,判断结果为阴性;C 线作为试剂的质控标准,阳性和阴性检测样品均会产生条带。

[0017] 同时,依据世界卫生组织(WHO)推荐的血清中麻疹病毒的最低保护抗体滴度水平为 200mIU/ml,即当接种者体内麻疹病毒 IgG 抗体的浓度 \geq 200mIU/ml,说明麻疹疫苗接种成功,当接种者体内麻疹病毒 IgG 抗体的浓度 $<$ 200mIU/ml,说明麻疹疫苗接种不成功。本实用新型中,将试剂盒的灵敏度设置为 200mIU/ml,麻疹病毒 IgG 抗体的检测结果为阳性即表明麻疹疫苗接种成功,麻疹病毒 IgG 抗体的检测结果为阴性即表明麻疹疫苗接种不成功。因此,本实用新型所述的试剂盒可以实现快速评价麻疹疫苗的接种效果。

[0018] 本实用新型试剂盒的使用方法:将检测试纸平放,在样品垫加入 5 μ l 血样,再加入 2~3 滴样品稀释液,用肉眼直接观察在 20 分钟内检测 T 线和质控 C 线的显色情况:质控 C 线不显色,说明本试验失败;质控 C 线显色,检测 T 线不显色说明麻疹疫苗接种不成功;质控 C 线和检测 T 线均显色说明麻疹疫苗接种成功。

[0019] 本实用新型的有益效果:

[0020] (1) 与现有技术相比,本实用新型所述的检测试纸增加了抗原垫的结构,通过在抗原垫上加入抗原保护液并包被麻疹病毒抗原,在标记物结合垫上包被鼠抗麻疹单克隆抗体,解决了麻疹病毒抗原由于稳定性差而不容易被金标记的问题;另一方面,本实用新型采用鼠抗人 IgG 抗体划膜得到检测 T 线,因为抗体相比较为稳定,因此试纸条的有效期较长。

[0021] (2) 本实用新型所述麻疹病毒抗原为粗抗原,不需对粗抗原进一步纯化就能达到反应效果,这是因为在试纸条反应层析过程中,已经通过双抗体夹心法对粗抗原进行了筛选和纯化,保证了试剂反应的特异性,因此检测试纸的制备成本低,利于推广应用;实验结果表明,利用本实用新型所述的检测试纸检测产品,检测的结果与 ELISA 检测结果一致。

[0022] (3) 与现有技术相比,本实用新型所述的试剂盒具有快速、简便、灵敏、特异的特点,摆脱了试剂对设备、仪器、人员及储存盒运输环境的特殊要求,将试剂盒的灵敏度设置为 200mIU/ml,可以实现对麻疹疫苗接种效果的快速评估。

附图说明

[0023] 图 1 为本实用新型的试剂盒整体结构示意图,其中 A- 盒体,B- 装有样品稀释液的容器,C- 检测试纸,D- 说明书。

[0024] 图 2 为本实用新型的试剂盒中检测试纸的结构示意图,其中,1- 底板,2- 吸收垫,3- 包被膜,4- 标记物结合垫,5- 抗原垫,6- 样品垫,7- 质控 C 线,8- 检测 T 线。

具体实施方式

[0025] 为了更好地理解本实用新型,下面结合实施例进一步阐明本实用新型的内容,但本实用新型的内容不仅仅局限于下面的实例。

[0026] 如图 1 所示,麻疹疫苗接种效果快速评价试剂盒,其特征在于,包括盒体 A、装有样品稀释液的容器 B 和检测试纸 C,所述装有样品稀释液的容器和检测试纸位于盒体内,所述

检测试纸是由底板 1 和相互紧密搭接粘贴在底板上的样品垫 6、抗原垫 5、标记物结合垫 4、包被膜 3 和吸收垫 2 组成,所述抗原垫上包被有麻疹病毒抗原,所述标记物结合垫上包被有胶体金标记的鼠抗麻疹单克隆抗体,所述包被膜上固定有检测 T 线 8 和质控 C 线 7,所述检测 T 线上包被有鼠抗人 IgG 抗体,所述质控 C 线上包被有羊抗鼠 IgG 抗体;所述检测试纸的最低检测线为 200mIU/ml。

[0027] 盒体 A 内放置有说明书 D。

[0028] 所述样品稀释液为含磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠和叠氮钠的混合水溶液。以下实施例中,样品稀释液的组分为:磷酸氢二钠 5.72g,磷酸二氢钠 0.624g,氯化钠 8g,叠氮钠 0.5g,超纯水定容至 1L。

[0029] 所述底板为 PVC 底板,所述 PVC 底板的一面为双面胶。

[0030] 所述包被膜为硝酸纤维素膜;所述抗原垫为玻璃纤维、无纺布或聚酯膜。

[0031] 所述标记物结合垫和样品垫为玻璃纤维,所述吸收垫为吸水纸。

[0032] 所述抗原垫通过使用抗原保护液将麻疹病毒抗原进行稀释后均匀铺在玻璃纤维、无纺布或聚酯膜上获得,所述抗原为粗抗原,其中抗原的含量为 40wt%~50wt%。

[0033] 实施例 1 麻疹病毒 IgG 抗体检测试纸条

[0034] 1、主要材料

[0035] 抗原:麻疹抗原购自 microbix 公司,培养的天然病毒,为粗纯,但已灭活,不具有生物危害,用于制备抗原垫。

[0036] 鼠抗人 IgG 抗体,购自厦门波生生物技术有限公司,用于硝酸纤维素膜 T 线的包被。

[0037] 鼠抗麻疹单克隆抗体,购自武汉赛欣生物技术有限公司,用于标记胶体金。

[0038] 羊抗鼠 IgG 抗体,购自杭州隆基生物技术有限公司,用于硝酸纤维素膜质控 C 线的包被。

[0039] 氯金酸:sigma 公司产品。

[0040] 硝酸纤维素膜:millipore 公司产品。

[0041] 牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白:sigma 公司产品。

[0042] 其余化学试剂均为分析纯试剂。

[0043] 临床血清由公司在武汉市血液中心获得,其中麻疹病毒 IgG 抗体阳性样本 248 份,阴性样本 52 份。

[0044] 麻疹病毒 IgG 抗体检测试剂盒(ELISA 法):购自江苏华冠生物技术有限公司,国内已注册的商用产品。

[0045] 2、标记物结合垫的制备

[0046] 氯金酸-柠檬酸三钠还原法制备直径为 40nm 的胶体金溶液,制备完成后,取 100ml 胶体金溶液置于磁力搅拌器上缓慢搅拌,调节 pH 至 8.0,然后按每 100ml 胶体金溶液 0.5mg 抗体加入鼠抗麻疹病毒单克隆抗体 0.5mg,继续搅拌 30min,再加入终浓度为 1%的 BSA 进行封闭,继续搅拌 30min。标记结束后,以 10000r/min 对标记液进行离心,弃上清,然后将沉淀用复溶溶液进行复溶至原体积,所述复溶溶液的配方为:Tris1.965g, Casein-Na2.5g,柠檬酸三钠 2.5g,吐温-200.50ml,蔗糖 10.0g,叠氮钠 1.0g,用超纯水定容至 1L。将复溶好的金标记溶液按每 ml 溶液铺 18cm² 的比例均匀铺在玻璃纤维上,置于 37℃,相对湿度低于 20%

的环境中,干燥 12-18 小时,制成标记物结合垫。

[0047] 3、抗原垫的制备

[0048] 将麻疹病毒抗原使用抗原保护液进行稀释到 2 倍得到抗原液,将稀释好的抗原液按每 ml 溶液铺 18cm² 的比例均匀铺在玻璃纤维上,置于 37℃,相对湿度低于 40% 的环境中,干燥 4 小时,制成抗原垫。所述抗原保护液的配方为:Na₂HPO₄ 5.72g,NaH₂PO₄ 0.624g,柠檬酸三钠 8.5g,蔗糖 10g,叠氮钠 1g,水定容至 1L;所述麻疹病毒抗原为粗抗原,其中抗原的含量为 40wt%~50wt%。

[0049] 4、包被膜的制备

[0050] 使用 0.02M, pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液将鼠抗人 IgG 抗体分别稀释成 2.0mg/ml (T 线溶液),羊抗鼠 IgG 抗体稀释至 1.0mg/ml (C 线溶液)。然后使用划膜仪将 T 线与 C 线溶液按 1.5ul/cm 的出液量均匀地包被于 NC 膜上,NC 膜已事先黏贴于塑料底板上,包被完成后,将 NC 膜置于 37℃,相对湿度低于 40% 的环境中,干燥 3~4 小时,制成包被膜。

[0051] 5、麻疹病毒 IgG 抗体检测试纸条的组装

[0052] 在干燥环境下(温度 20~25℃,相对湿度低于 30%),将包被膜置于洁净环境中,在 NC 膜的 T 线端,标记物结合垫(结合垫已事先切裁成 6mm 宽)紧密压接 NC 膜 2mm,抗原垫(抗原垫已事先切裁成 10mm 宽)紧密压接结合垫另一侧 2mm,样品垫紧密压接抗原垫另一侧 4~5mm,最后用切条机将贴好的底板切成 4mm 宽的试纸条。

[0053] 6、麻疹病毒 IgG 抗体检测试纸条的使用方法

[0054] 将待检血清或血浆或全血(待检样品)平衡至室温,制备好的试纸条平放于试验台上,在样品垫处加入 5ul 待检样品,再加入 2~3 滴样品稀释液,若样品中含有麻疹病毒 IgG 抗体,样品加入后,人麻疹 IgG 抗体先与抗原垫中麻疹抗原形成麻疹抗原-麻疹病毒 IgG 抗体复合物,复合物向前移动,与标记物结合垫中的金标记的鼠抗麻疹单克隆抗体形成麻疹 IgG 抗体-麻疹抗原-金标记的鼠抗麻疹单克隆抗体免疫复合物,该复合物由于层析作用沿纸条向前移动,至检测 T 线与鼠抗人 IgG 抗体反应形成鼠抗人 IgG 抗体-麻疹 IgG 抗体-麻疹抗原-金标记的鼠抗麻疹单克隆抗体免疫复合物,该复合物可聚集在检测区,当聚集的复合物达到一定的数量时,则形成一条肉眼可见的条带(T 线),判断结果为阳性;若样品中不含有或含很少量的麻疹 IgG 抗体,则不能形成免疫复合物,则不能形成肉眼可见的条带,判断结果为阴性。C 线作为试剂的质控标准,阳性和阴性检测样品均会产生条带。用肉眼直接观察试纸条在 20 分钟内的出线情况,并判定检测结果。

[0055] 7、根据世界卫生组织规定的麻疹病毒 IgG 抗体的最低保护滴度为 200mIU/ml,当麻疹病毒 IgG 抗体浓度 \geq 200mIU/ml 说明人体对麻疹病毒具有抵抗性,当麻疹病毒 IgG 抗体浓度 $<$ 200mIU/ml 说明人体对麻疹病毒还没有产生抵抗性,因此本试纸条将检测麻疹病毒 IgG 抗体的检测临界值设置为 200mIU/ml, T 线显线表明麻疹病毒 IgG 抗体的浓度 \geq 200mIU/ml,麻疹疫苗接种成功, T 线不显线表明麻疹病毒 IgG 抗体的浓度 $<$ 200mIU/ml,麻疹疫苗接种不成功。

[0056] 8、临床样品检测结果对照

[0057] 对公司收集的临床血清样本使用本申请检测试纸及商用检测 ELISA 试剂盒同时进行检测,再对检测结果进行对照。

[0058] 以 ELISA 试剂盒为对照,对麻疹病毒 IgG 抗体进行检测,检测出 248 份麻疹病毒

IgG 阳性样本,52 份麻疹病毒 IgG 阴性样本,而本试纸条检测出 246 份麻疹病毒 IgG 阳性样本,54 份麻疹病毒 IgG 阴性样本,总体符合率为 98.67%。临床检测结果表明,本试剂盒的性能与 ELISA 试剂盒相比无显著差异,说明本实用新型适合用于临床检验,具有实用价值。

[0059] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的实例,而并非对实施方式的限制。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而因此所引申的显而易见的变化或变动仍处于本实用新型创造的保护范围之内。

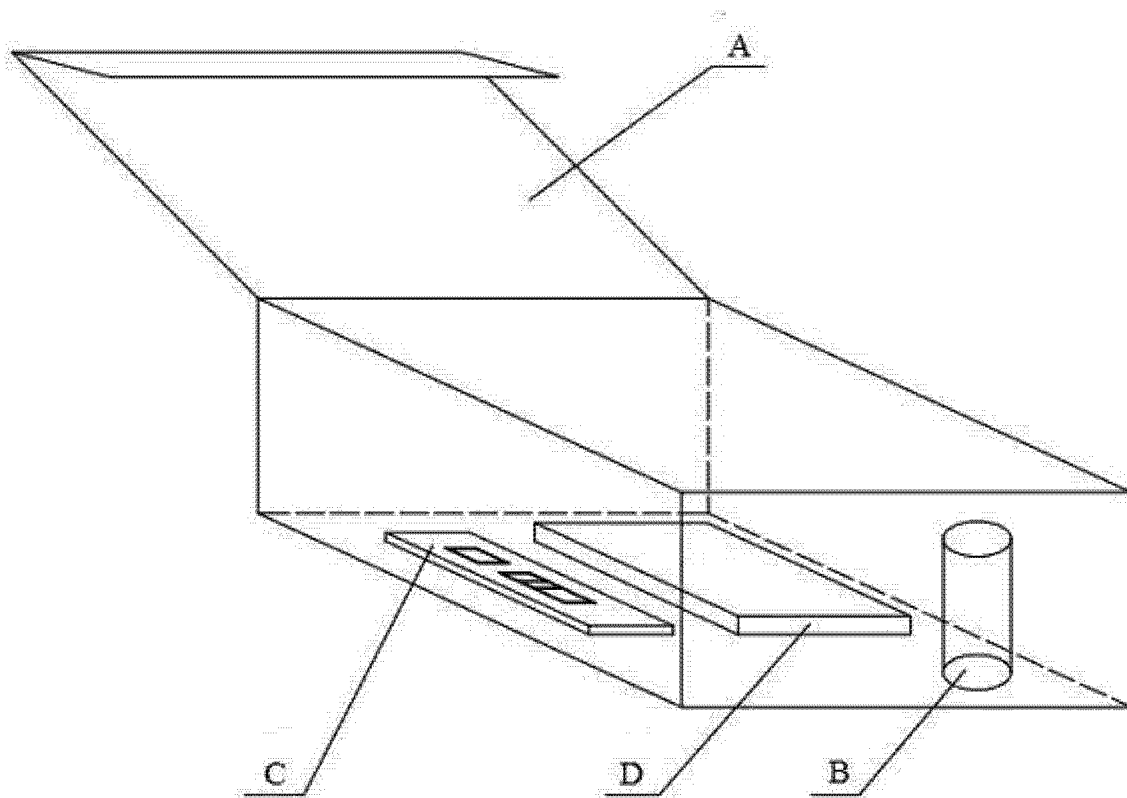


图 1

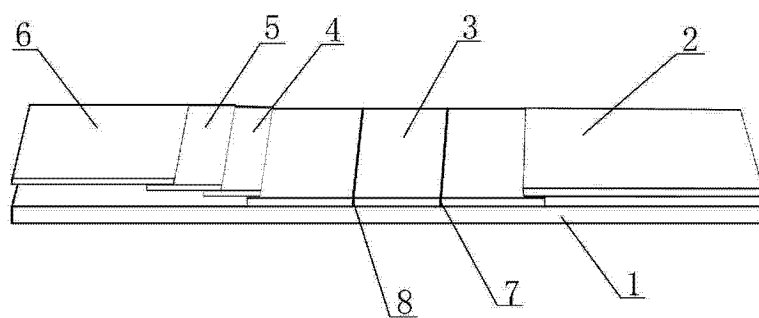


图 2

专利名称(译)	麻疹疫苗接种效果快速评价试剂盒		
公开(公告)号	CN204203232U	公开(公告)日	2015-03-11
申请号	CN201420633906.2	申请日	2014-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	武汉生命科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉生命科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉生命科技股份有限公司		
[标]发明人	张薇 吴边 龚华岳 王方杰 倪龙泉 金玉翠		
发明人	张薇 吴边 龚华岳 王方杰 倪龙泉 金玉翠		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/536		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型属于生物检测领域，具体涉及一种麻疹疫苗接种效果快速评价试剂盒。所述试剂盒包括盒体、装有样品稀释液的容器和检测试纸，所述检测试纸是由底板（1）和相互紧密搭接粘贴在底板上的样品垫（6）、抗原垫（5）、标记物结合垫（4）、包被膜（3）和吸收垫（2）组成，根据WHO推荐的麻疹抗体最低保护滴度水平，将试剂盒的最低检测线设定为200mIU/ml，用于检测血清/血浆/全血中的抗麻疹病毒IgG抗体。本实用新型所述的试剂盒成本低廉，制备工艺简单，检测血清抗体的结果与ELISA试剂盒的结果无显著差异适，可以用于麻疹疫苗接种后免疫效果的快速评价。

