



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112462057 A

(43) 申请公布日 2021.03.09

(21) 申请号 202011301810.2

(22) 申请日 2020.11.23

(71) 申请人 浙江洪晟生物科技股份有限公司
地址 312366 浙江省绍兴市滨海新城沥海
镇马欢路398号科技创业中心C号楼5
楼506室

申请人 浙江理工大学绍兴生物医药研究院
有限公司
浙江海隆生物科技有限公司

(72) 发明人 查银河 周泉丽 舒建洪 陶思锐
童夏霞 陈勇锋 盛敏成

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

(54) 发明名称

猪伪狂犬病毒gB&gD抗体检测试剂盒及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明一方面公开了一种猪伪狂犬病毒gB&gD抗体检测试剂盒,所述试剂盒能同时检测猪伪狂犬病毒gB抗原抗体和gD抗原抗体,所述的试剂盒中的抗原包被板为同时包被有PRV-gB蛋白和PRV-gD蛋白的酶标板。另一方,本发明还提供了一种制备所述试剂盒的方法,所述方法包括抗原包被板的制备、样品稀释液的配制与分装、浓缩洗涤液的配制与分装、酶标抗体的配制与分装、阳性对照的制备、阴性对照的制备、质控品1的制备、质控品2的制备、质控品3的制备、显色液的分装、终止液的配制与分装。本发明的试剂盒能够实现同时检测PRV-gB蛋白抗体和PRV-gD蛋白抗体,利于对整体PRV抗体效价的评价。另外本发明的试剂盒稳定性好、灵敏度高、特异性强,能够适用于大规模临床检测。

1. 一种猪伪狂犬病毒gB&gD抗体检测试剂盒,所述试剂盒能同时检测猪伪狂犬病毒gB抗原抗体和gD抗原抗体,其特征在于,所述的试剂盒中的抗原包被板为同时包被有PRV-gB蛋白和PRV-gD蛋白的酶标板。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的抗原包被板上PRV-gB蛋白和PRV-gD蛋白的包被浓度均为100ng/孔/100 μ L。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒还包括:样品稀释液、浓缩洗涤液、酶标抗体、显色液、终止液、阳性对照、阴性对照、质控品1、质控品2和质控品3;其中,

所述的样品稀释液为含有2%BSA的1 \times PBST溶液;

所述的浓缩洗涤液为25 \times PBST溶液,在使用前稀释到1 \times PBST溶液;

所述的酶标抗体为羊抗猪IgG酶标抗体;

所述的显色液为TMB单组分溶液;

所述的终止液为2M的H₂SO₄溶液;

所述的阳性对照为PRV抗体OD450nm值在0.9~1.5之间的阳性血清;

所述的阴性对照为PRV抗体OD450nm值小于0.2的阴性血清;

所述的质控品1为S/P值在1.5~2.0之间的强阳性血清;

所述的质控品2为S/P值在0.5~1.0之间的弱阳性血清;

所述的质控品3为S/P值小于0.35的阴性血清。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述的阳性对照为PRV抗体OD450nm值在1.0~1.2之间的阳性血清。

5. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述的阴性对照为PRV抗体OD450nm小于0.1的阴性血清。

6. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于,所述的阳性对照孔每孔OD450nm读数大于0.5且各孔间最大差值应<0.3,阴性对照孔每孔OD450nm读数<0.3,空白对照OD450nm读数<0.1,质控品1的S/P值在1.5~2.0之间,质控品2的S/P值在0.5~1.0之间,质控品3的S/P值<0.35时,试验成立,结果有效。

7. 一种使用权利要求1至6任一权利要求所述的试剂盒对待检样品进行检测的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

1) 样本稀释:用样品稀释液将待检样本进行1:100倍稀释;

2) 加样本:根据待检样品数量,取可拆卸包被板,平放桌面,加入稀释好的待检血清100 μ L/孔,同时设阳性对照、阴性对照各2孔,质控品1、质控品2、质控品3、空白对照各1孔;

3) 孵育:置37 $^{\circ}$ C温箱孵育30分钟;

4) 洗涤:甩去孔内液体,加入洗涤液,300 μ L/孔,洗涤3~5次,每次静置30秒,甩去孔内液体,拍干;

5) 二抗孵育:对应孔中加入羊抗猪IgG酶标抗体,100 μ L/孔,置37 $^{\circ}$ C温箱孵育30分钟;

6) 洗涤:甩去孔内液体,加入洗涤液,300 μ L/孔,洗涤3~5次,每次静置30秒,甩去孔内液体,拍干;

7) 显色:加入显色液,100 μ L/孔,置37 $^{\circ}$ C温箱避光孵育10分钟;

8) 终止:加入终止液,50 μ L/孔,轻微震荡混合均匀;

9) 读数:加入终止液后,立即将包被板置于酶标仪中,在波长为450nm下读取OD450nm值;

10) S/P值计算:按照以下计算公式,计算S/P值:

$$S/P值 = \frac{\text{样品 } OD_{450nm} \text{ 值} - \text{阴性对照 } OD_{450nm} \text{ 均值}}{\text{阳性对照 } OD_{450nm} \text{ 均值} - \text{阴性对照 } OD_{450nm} \text{ 均值}}$$

11) 试验有效性断判:阳性对照孔每孔OD450nm读数应大于0.5且各孔间最大差值应<0.3,阴性对照孔每孔OD450nm读数应<0.3,空白对照OD450nm读数<0.1,质控品1的S/P值在1.5~2.0之间,质控品2的S/P值在0.5~1.0之间,质控品3的S/P值<0.35;

12) 结果判定:当S/P值大于0.399时判为阳性;当S/P值小于等于0.399时判为阴性。

8. 一种制备如权利要求1至6任一权利要求所述试剂盒的方法,其特征在于,所述的方法包括抗原包被板的制备、样品稀释液的配制与分装、浓缩洗涤液的配制与分装、酶标抗体的配制与分装、阳性对照的制备、阴性对照的制备、质控品1的制备、质控品2的制备、质控品3的制备、显色液的分装、终止液的配制与分装。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述的抗原包被板的制备包括以下步骤:

1) 包被:使用包被缓冲液将纯化的PRV-gB重组蛋白和PRV-gD重组蛋白分别稀释到2 μ g/mL,再将稀释好的PRV-gB重组蛋白和PRV-gD重组蛋白等体积混合,混匀后加入酶标板,100 μ L/孔,在2~8 $^{\circ}$ C下作用12~15小时;

2) 洗涤:用1 \times PBST洗涤3次,每次30秒,每孔300 μ L,最后一次拍干;

3) 封闭:加含1%BSA的PBS,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭2小时;

4) 洗涤:用1 \times PBST洗涤3次,每孔300 μ L,每次30秒,拍干,加干燥剂并抽真空保存。

10. 一种如权利要求1至6任一权利要求所述的试剂盒在猪伪狂犬病毒疫苗免疫效果评价中的应用。

猪伪狂犬病毒gB & gD抗体检测试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于病毒疫病诊断技术和动物检疫领域,具体涉及一种猪伪狂犬病毒gB&gD抗体检测试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 猪伪狂犬病是由猪伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus,PRV)引起的猪的急性传染病。该病在猪呈暴发性流行。可引起妊娠母猪流产、死胎,公猪不育,新生仔猪大量死亡,育肥猪呼吸困难、生长停滞等,是危害全球养猪业的重大传染病之一。

[0003] 伪狂犬病毒属于疱疹病毒科(Herpesviridae)、猪疱疹病毒属,病毒粒子为圆形,直径150~180nm,核衣壳直径为105~110nm。病毒粒子的最外层是病毒囊膜,它是由宿主细胞衍生而来的脂质双层结构。囊膜表面有长约8~10nm呈放射状排列的纤突。伪狂犬病毒基因组是线状双链DNA分子,大小约150kb,平均G+C含量高达74%,具有典型的疱疹病毒基因组结构特征,由独特长区段、独特短区段及位于US两侧的末端重复序列(TR)和内部重复序列(IR)组成。目前已发现11种PRV糖蛋白,其中,gB、gC、gD均为刺激机体产生中和抗体的蛋白,所产生的抗体无论是在体内、体外,还是在有无补体存在的条件下都有中和PRV的能力,因此,gB、gC、gD是研制PRV亚单位疫苗以及评价疫苗免疫效果的首选糖蛋白,其中尤以gB和gD为最好。

[0004] 但是,目前市面流行的用于评价PRV免疫效果的试剂盒都只能检测gB蛋白产生的抗体,不能评价gD蛋白产生的抗体,因此对PRV疫苗免疫后的实际情况的评价可能存在一定的假阴性的检测。

发明内容

[0005] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的之一是提供一种能同时评价PRV-gB蛋白和PRV-gD蛋白的抗体的试剂盒,以弥补现有试剂盒技术的不足。本发明的目的之二是提供了一种制备该试剂盒的方法。

[0006] 因此,本发明一方面提供了一种猪伪狂犬病毒gB&gD抗体检测试剂盒,所述试剂盒能同时检测猪伪狂犬病毒gB抗原抗体和gD抗原抗体,其特征在于,所述的试剂盒中的抗原包被板为同时包被有PRV-gB蛋白和PRV-gD蛋白的酶标板。

[0007] 优选地,本发明所述的抗原包被板上PRV-gB蛋白和PRV-gD蛋白的包被浓度均为100ng/孔/100 μ L。

[0008] 优选地,本发明所述的试剂盒还包括:样品稀释液、浓缩洗涤液、酶标抗体、显色液、终止液、阳性对照、阴性对照、质控品1、质控品2和质控品3;其中,所述的样品稀释液为含有2%BSA的1 \times PBST溶液;所述的浓缩洗涤液为25 \times PBST溶液,在使用前稀释到1 \times PBST溶液;所述的酶标抗体为羊抗猪IgG酶标抗体;所述的显色液为TMB单组分溶液;所述的终止液为2M的H₂SO₄溶液;所述的阳性对照为PRV抗体OD_{450nm}值在0.9~1.5之间的阳性血清;所述的阴性对照为PRV抗体OD_{450nm}值小于0.2的阴性血清;所述的质控品1为S/P值在1.5~

2.0之间的强阳性血清；所述的质控品2为S/P值在0.5~1.0之间的弱阳性血清；所述的质控品3为S/P值小于0.35的阴性血清。

[0009] 优选地，本发明所述的阳性对照为PRV抗体OD450nm值在1.0~1.2之间的阳性血清。

[0010] 优选地，本发明所述的阴性对照为PRV抗体OD450nm小于0.1的阴性血清。

[0011] 优选地，本发明所述的阳性对照孔每孔OD450nm读数大于0.5且各孔间最大差值应<0.3，阴性对照孔每孔OD450nm读数<0.3，空白对照OD450nm读数<0.1，质控品1的S/P值在1.5~2.0之间，质控品2的S/P值在0.5~1.0之间，质控品3的S/P值<0.35时，试验成立，结果有效。

[0012] 再一方面，本发明还提供了一种使用所述的试剂盒对待检样品进行检测的方法，所述方法包括以下步骤：(1) 样本稀释：用样品稀释液将待检样本进行1:100倍稀释；(2) 加样本：根据待检样品数量，取可拆卸包被板，平放桌面，加入稀释好的待检血清100μL/孔，同时设阳性对照、阴性对照各2孔，质控品1、质控品2、质控品3、空白对照各1孔；(3) 孵育：置37℃温箱孵育30分钟；(4) 洗涤：甩去孔内液体，加入洗涤液，300μL/孔，洗涤3~5次，每次静置30秒，甩去孔内液体，拍干；(5) 二抗孵育：对应孔中加入羊抗猪IgG酶标抗体，100μL/孔，置37℃温箱孵育30分钟；(6) 洗涤：甩去孔内液体，加入洗涤液，300μL/孔，洗涤3~5次，每次静置30秒，甩去孔内液体，拍干；(7) 显色：加入显色液，100μL/孔，置37℃温箱避光孵育10分钟；(8) 终止：加入终止液，50μL/孔，轻微震荡混合均匀；(9) 读数：加入终止液后，立即将包被板置于酶标仪中，在波长为450nm下读取OD450nm值；(10) S/P值计算：按照以下计算公式，计算S/P值：

[0013]
$$S/P值 = \frac{\text{样品 } OD_{450nm} \text{ 值} - \text{阴性对照 } OD_{450nm} \text{ 均值}}{\text{阳性对照 } OD_{450nm} \text{ 均值} - \text{阴性对照 } OD_{450nm} \text{ 均值}} \quad (11)$$
 试验有效性断判：阳性对照

孔每孔 OD450nm读数应大于0.5且各孔间最大差值应<0.3，阴性对照孔每孔OD450nm读数应<0.3，空白对照OD450nm读数<0.1，质控品1的S/P值在1.5~2.0之间，质控品2的S/P值在0.5~1.0之间，质控品3的S/P值<0.35；(12) 结果判定：当S/P值大于0.399时判为阳性；当S/P值小于等于0.399时判为阴性；

[0014] 再一方面，本发明还提供了一种制备所述试剂盒的方法，其特征在于，所述的方法包括抗原包被板的制备、样品稀释液的配制与分装、浓缩洗涤液的配制与分装、酶标抗体的配制与分装、阳性对照的制备、阴性对照的制备、质控品1的制备、质控品2的制备、质控品3的制备、显色液的分装、终止液的配制与分装。

[0015] 优选地，本发明所述的抗原包被板的制备包括以下步骤：1) 包被：使用包被缓冲液将纯化的PRV-gB重组蛋白和PRV-gD重组蛋白分别稀释到2μg/mL，再将稀释好的PRV-gB重组蛋白和PRV-gD重组蛋白等体积混合，混匀后加入酶标板，100μL/孔，在2~8℃下作用12~15小时；2) 洗涤：用1×PBST洗涤3次，每次30秒，每孔300μL，最后一次拍干；3) 封闭：加含1% BSA的PBS，200μL/孔，37℃封闭2小时；4) 洗涤：用1×PBST洗涤3次，每孔300μL，每次30秒，拍干，加干燥剂并抽真空保存。

[0016] 再一方面，本发明还提供了一种所述的试剂盒在猪伪狂犬病毒疫苗免疫效果评价中的应用。

[0017] 本发明的试剂盒能够实现同时检测PRV-gB蛋白抗体和PRV-gD蛋白抗体，且检测的

抗体滴度都在酶标仪的检测范围之内,利于对整体PRV抗体效价的评价,以免遗漏PRV-gD蛋白的抗体,从而造成可能的假阴性的存在。另外,本发明的试剂盒引入质控品(质控品1、质控品2、质控品3),对试剂盒的每次检测不仅仅有阴、阳性对照的校正外,还有3个质控品(强阳、弱阳和阴性)的校正,从而确保试剂盒的每次检测都是准确和可控的,进一步加强试剂盒的质量控制和准确性控制。此外,本发明的试剂盒稳定性好、灵敏度高、特异性强,能够适用于大规模临床检测。

具体实施方式

[0018] 下面对本发明的较佳实施例进行详细阐述,以使本发明的优点和特征能更易于被本领域技术人员理解,从而对本发明的保护范围做出更为清楚明确的界定。实施例中未进行详细实验方法的,通常按照本技术领域常规操作或按照厂商建议的条件进行。实施例中涉及的试剂及药品,若无特殊说明,均为普通市售产品。

[0019] 实施例1 PRV-gD和PRV-gB蛋白的制备

[0020] 本发明所用的PRV-gD蛋白来源于专利号为201710551363.8的发明专利,具体制备方法参考该专利的相关实施例。

[0021] 本发明所用的PRV-gB蛋白来源于专利号为201910577700.X的发明专利,具体制备方法参考该专利的相关实施例。

[0022] 实施例2猪伪狂犬病毒gB&gD抗体检测试剂盒的制备与使用

[0023] 1抗原包被板的制备

[0024] 1.1酶联反应板的来源及标准购自美国Corning公司的COSTAR酶标板,规格为8孔×12列。

[0025] 1.2包被将PRV-gB蛋白和PRV-gD蛋白分别用包被缓冲液(称取0.15g碳酸钠、0.293g碳酸氢钠,溶解后调节pH值到9.6,然后加双蒸水至100mL,混合均匀,0.22μm滤膜过滤除菌,定量分装)稀释到2μg/mL,再将稀释好的PRV-gB蛋白和PRV-gD蛋白等体积混合,混匀后加入酶标板,100μL/孔,37℃湿盒内(工厂化生产,空气湿度保持65%~70%)孵育1小时后4℃过夜(12~14小时)。取出,弃去孔内液体,用洗涤液洗涤3次,300μL/孔,每次静置30秒,拍干。

[0026] 1.3封闭向酶标板内加入封闭液(称取0.27g磷酸二氢钾、0.2g氯化钾、3.58g十二水磷酸氢二钠、8.0g氯化钠,溶于800mL双蒸水中,添加0.5mL吐温-20、终浓度为0.01%(m/V)的ProClin 300和终浓度为1%(m/V)BSA,溶解后调节pH值到7.2,然后加双蒸水至1L,混合均匀,0.22μm滤膜过滤除菌,定量分装)300μL/孔,37℃湿盒中(工厂化生产,空气湿度保持65%~70%)孵育120分钟。取出弃去封闭液,用洗涤液洗涤3次,300μL/孔,每次静置30秒。

[0027] 1.4干燥酶标板装架,37℃条件下烘干30分钟。

[0028] 1.5装袋将酶标板、干燥剂装入铝箔袋,真空后密封。

[0029] 2阳性对照的制备

[0030] 2.1制备用动物:3日龄的仔猪3头,对应母猪产前7天采血进行PEDV、CSFV、FMDV、PRV、PCV2、PRRSV、TGEV抗体筛查,挑选全部阴性母猪所产的健康仔猪;

[0031] 2.2免疫原的制备:取商品化的猪伪狂犬弱毒疫苗,按时说明书进行稀释;

[0032] 2.3免疫程序:对3头猪进行颈部肌肉多点注射重组疫苗1mL,14日后进行二免,方法及剂量与首次相同,二免后每隔7天采血,采用中和法进行血清PRV抗体检测;

[0033] 2.4效价测定:采用中和法测定血清效价,选择PRV中和抗体不低于1:100的猪用于阳性血清制备;

[0034] 2.5阳性血清制备:对满足条件的实验猪进行颈动脉放血,每头猪的血液保存在一个灭菌的三角烧瓶中,将析出的血清转移到离心瓶中,3000r/min离心5分钟,取上清,将上清混匀后0.22 μ m滤膜过滤除菌,定量分装,1mL/管;

[0035] 2.6阳性对照制备:用样品稀释液将检验合格的阳性血清稀释成1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200,各稀释度均用制造的试剂盒进行检测,选择OD450nm值 \geq 1.1的最高稀释倍数,用样品稀释液按该稀释倍数将阳性血清进行稀释,混合均匀,用0.22 μ m滤膜过滤除菌,定量分装,1mL/管或3mL/管。

[0036] 2.7阳性对照的检验将2.6制备的阳性血清使用本发明制备的试剂盒进行检测,其中 OD450nm值应在0.9~1.5之间。但是根据2.6的要求,结合试剂盒的实际检测要求,优先地,阳性对照的OD450nm值在1.1~1.2之间。

[0037] 3阴性对照的制备

[0038] 3.1制备用动物:3日龄的仔猪3头,对应母猪产前7天采血进行PEDV、CSFV、FMDV、PRV、PCV2、PRRSV、TGEV抗体筛查,挑选全部阴性母猪所产的健康仔猪。

[0039] 3.2血清制备与分装:对猪进行颈动脉放血致死,血液置于灭菌洁净的三角烧瓶中,将析出的血清转移到离心瓶中,3000r/min离心5分钟,取上清,将上清混匀后0.22 μ m滤膜过滤除菌,定量分装,1mL/管。

[0040] 3.3阴性对照制备:将阴性血清用样品稀释液稀释100倍,混合均匀,用0.22 μ m滤膜过滤除菌,定量分装,1mL/管或3mL/管。。

[0041] 3.4阴性对照的检验:将3.3制备的阴性血清使用本发明制备的试剂盒进行检测,OD450nm值均小于0.2。但是结合试剂盒的实际检测要求,优先地,阴性对照的OD450nm 值均小于0.1。

[0042] 4样品稀释液的制备称取0.27g磷酸二氢钾、0.2g氯化钾、3.58g十二水合磷酸氢二钠、8.0g氯化钠,溶于800mL双蒸水中,添加0.05%的吐温-20(V/V)、终浓度为0.1%的防腐剂ProClin 300sigma(V/V)和终浓度为2%BSA(m/V),加双蒸水至1L,混合均匀,0.22 μ m 滤膜过滤除菌,定量分装。

[0043] 5浓缩洗涤液(25 \times)的制备称取6.8g磷酸二氢钾、5g氯化钾、89.5g十二水合磷酸氢二钠、198.7g氯化钠,溶于800mL双蒸水中,添加1.25%的吐温-20(V/V)和终浓度为0.1%的防腐剂ProClin 300(V/V),加双蒸水至1L,混合均匀,0.22 μ m滤膜过滤除菌,定量分装。

[0044] 6羊抗猪IgG酶标抗体的制备

[0045] 6.1来源购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

[0046] 6.2羊抗猪IgG酶标抗体的制备用样品稀释液将辣根过氧化物酶标记的羊抗猪IgG进行1:20,000(V/V)稀释,再加入终浓度为0.01g/L的酚红,0.22 μ m滤膜过滤除菌,定量分装。

[0047] 7显色液的制备与检验

- [0048] 7.1来源购自北京索莱宝生物科技有限公司。
- [0049] 7.2显色液的制备单组份TMB显色液或其他通用显色液,定量分装。
- [0050] 8终止液的制备与检验
- [0051] 8.1来源国药集团。
- [0052] 8.2终止液的制备取21.74mL浓硫酸缓缓加到含有178.26mL双蒸水的烧杯中,搅拌均匀后,定量分装。
- [0053] 9质控品的制备与检验
- [0054] 9.1质控品1的制备来源于阳性血清,用样品稀释液将检验合格的阳性血清稀释成1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400等,各稀释度均用制造的试剂盒(含阳性对照、阴性对照)进行检测,选择S/P值在1.5~2.0之间的最高稀释倍数,用样品稀释液按该稀释倍数将阳性血清进行稀释,混合均匀,用0.22 μ m滤膜过滤除菌,定量分装,1mL/管或3mL/管。
- [0055] 9.2质控品2的制备来源于阳性血清,用样品稀释液将检验合格的阳性血清稀释成1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800等,各稀释度均用制造的试剂盒(含阳性对照、阴性对照)进行检测,选择S/P值在0.5~1.0之间的最高稀释倍数,用样品稀释液按该稀释倍数将阳性血清进行稀释,混合均匀,用0.22 μ m滤膜过滤除菌,定量分装,1mL/管或3mL/管。
- [0056] 9.3质控品3的制备来源于阴性血清,将检验合格的阴性血清用样品稀释液稀释1:5、1:10、1:20、1:40、1:80等,各稀释度均用制造的试剂盒(含阳性对照、阴性对照)进行检测,选择S/P值小于0.35的最高稀释倍数,用样品稀释液按该稀释倍数将阳性血清进行稀释,混合均匀,用0.22 μ m滤膜过滤除菌,定量分装,1mL/管或3mL/管。
- [0057] 10试剂盒组装
- [0058] 10.1将检验合格的各试剂盒组份按下表进行组装

编号	名称	数量	数量
1	抗原包被板	2 块板 (192 孔/盒)	5 块板 (480 孔/盒)
2	阳性对照	1 mL/管	3 mL/管
3	阴性对照	1 mL/管	3 mL/管
4	样品稀释液	80 mL/瓶	200 mL/瓶
5	浓缩洗涤液	30 mL/瓶	60 mL/瓶
[0059] 6	羊抗猪 IgG 酶标抗体	25 mL/瓶	60 mL/瓶
7	显色液	25 mL/瓶	60 mL/瓶
8	终止液	12 mL/瓶	30 mL/瓶
9	说明书	1 份	1 份
10	质控品 1	1 mL/管	3 mL/管
11	质控品 2	1 mL/管	3 mL/管
12	质控品 3	1 mL/管	3 mL/管

- [0060] 10.2试剂盒的包装用合适的外包装盒包装,贴加标签,标签上应包含标识名称、批号、生产日期、有效期和生产单位等信息。
- [0061] 11用法与判定
- [0062] 11.1用法

[0063] 11.1.1材料的准备

[0064] 11.1.1.1待检试剂盒包括抗原包被板、阳性对照、阴性对照、样品稀释液、浓缩洗涤液、羊抗猪IgG酶标抗体、显色液、终止液、质控品1、质控品2、质控品3。

[0065] 11.1.1.2其他材料酶标仪、移液器、定时钟、待检血清等。

[0066] 11.1.2试剂的准备

[0067] 11.1.2.1试剂的准备用前将所有的试剂和样品恢复至室温(15~25℃),试剂应轻轻地旋转或震荡予以混合。

[0068] 11.1.2.2洗涤液的配制将1份浓缩洗涤液加入到24份双蒸水中,混匀。配制好的洗涤液,应在3日内用完。

[0069] 11.1.2.3待检血清的稀释用样品稀释液将待检血清按1:100(V/V)进行稀释。

[0070] 11.1.3检验

[0071] 11.1.3.1加样

[0072] 根据待检样品数量,取可拆卸包被板,平放桌面,加入稀释好的待检血清100μL/孔,同时设阳性对照、阴性对照各2孔,质控品1、质控品2、质控品3、空白对照各1孔;包被板上对照样品和待检样品添加位置如下表所示。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N											
B	N											
C	P											
[0073] D	P											
E	质控品1											
F	质控品2											
G	质控品3											
H	空白对照											

[0074] (注:“P”为阳性对照,“N”为阴性对照,根据检测样品的数量可以调整加样位置)

[0075] 11.1.3.2孵育:置37℃温箱孵育30分钟;

[0076] 11.1.3.3洗涤:甩去孔内液体,加入洗涤液,300μL/孔,洗涤3~5次,每次静置30秒,甩去孔内液体,拍干;

[0077] 11.1.3.4二抗孵育:对应孔中分别加入羊抗猪IgG酶标抗体,100μL/孔,置37℃温箱孵育30分钟;

[0078] 11.1.3.5洗涤:甩去孔内液体,加入洗涤液,300μL/孔,洗涤3~5次,每次静置30秒,甩去孔内液体,拍干;

[0079] 11.1.3.6显色:加入显色液,100μL/孔,置37℃温箱避光孵育10分钟;

[0080] 11.1.3.7终止:加入终止液,50μL/孔,轻微震荡混合均匀;

[0081] 11.1.3.8读数:加入终止液后,立即将包被板置于酶标仪中,在波长为450nm下读取 OD_{450nm}值;

[0082] 11.1.3.9 S/P值计算:按照以下计算公式,计算S/P值:

$$[0083] \quad S/P \text{ 值} = \frac{\text{样品 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值} - \text{阴性对照 OD}_{450\text{nm}} \text{ 均值}}{\text{阳性对照 OD}_{450\text{nm}} \text{ 均值} - \text{阴性对照 OD}_{450\text{nm}} \text{ 均值}}$$

[0084] 11.1.3.10试验有效性断判:阳性对照孔每孔OD_{450nm}读数应大于0.5且各孔间最

大差值应 <0.3 ,阴性对照孔每孔OD450nm读数应 <0.3 ,空白对照OD450nm读数 <0.1 ,质控品1的S/P值在1.5~2.0之间,质控品2的S/P值在0.5~1.0之间,质控品3的S/P值 <0.35 ;

[0085] 11.1.3.11结果判定:当S/P值大于0.399时判为阳性;当S/P值小于等于0.399时判为阴性。

[0086] 12注意事项

[0087] 12.1试剂盒应2~8℃运输及保存。

[0088] 12.2贮存时,所有的板条一定要用封口膜密封,防止潮气对包被板的损伤。

[0089] 12.3仔细阅读说明书。

[0090] 12.4不要使底物溶液接触强光和氧化物。所有试剂取出后,均不得再加回瓶中。

[0091] 12.5不要使用过期的组分或者不同批次试剂混合使用。

[0092] 12.6稀释浓缩洗涤液时,如发现结晶,置37℃使其溶解后再使用。

[0093] 12.7注意加样和洗涤过程,以确保试验的准确度。不能用嘴吸液。

[0094] 12.8待检血清发生腐败时勿用于检测。

[0095] 12.9检验用器皿必须清洁,操作过程避免与金属类器物接触。

[0096] 12.10应严格按照试剂盒说明书进行操作,严格遵守各操作步骤规定的时间和温度。

[0097] 13贮藏和有效期2~8℃保存,有效期为12个月。

[0098] 14规格(1)2块板(192孔/盒)(2)5块板(480孔/盒)。

[0099] 实施例4猪伪狂犬病毒gB&gD抗体检测试剂盒的性能评价

[0100] 按照实施例3制备了5批试剂盒,使用这5批试剂盒进行性能评价。

[0101] 1特异性检验随机挑选3批试剂盒,用7种特异性质控血清样品对试剂盒进行特异性检验,具体结果见下表:

批号	检测 S/P 值			
	200901	200902	200903	
[0102]				
	阳性对照 OD450	1.221	1.175	1.209
	阴性对照 OD450	0.072	0.073	0.069
	猪口蹄疫病毒阳性血清	-0.070	-0.063	-0.063
	猪流行性腹泻病毒阳性血清	-0.057	-0.061	-0.055
[0103]				
	猪瘟病毒阳性血清	0.022	0.019	0.037
	猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清	-0.001	-0.030	-0.009
	猪圆环病毒阳性血清	0.000	-0.021	-0.016

[0104] 2重复性检验

[0105] 2.1批内重复性检验采用5批试剂盒对挑选出来的临床样品进行了批内和批间的重复性检测。其中,批内重复性是按照说明书用5批试剂盒分别对3份质控样品进行检测,每份样品重复检测4次,分别计算每份血清的S/P值平均值,标准差和变异系数,测得结果后计算批内变异系数,结果显示,5批试剂盒检测结果批内变异系数均 $<10\%$,符合要求,具体数据见下表。

		抗体检测 S/P 值							
序列号	试剂盒批次	各重复孔的 S/P 值				平均值	标准差	变异系数	
		1st	2nd	3rd	4th				
[0106]	1	200901	1.762	1.830	1.824	1.886	1.825	0.051	2.78%
		200902	1.909	1.867	1.864	1.866	1.876	0.021	1.14%
		200903	1.730	1.742	1.782	1.842	1.774	0.050	2.84%
		200904	1.820	1.879	1.777	1.819	1.824	0.042	2.30%
		200905	1.979	1.918	1.879	1.862	1.909	0.052	2.71%
[0106]	2	200901	0.671	0.637	0.647	0.634	0.647	0.017	2.59%
		200902	0.701	0.691	0.671	0.672	0.684	0.015	2.15%
		200903	0.669	0.65	0.649	0.657	0.656	0.009	1.40%
		200904	0.664	0.658	0.636	0.656	0.654	0.012	1.86%
		200905	0.654	0.687	0.646	0.654	0.660	0.018	2.76%
[0106]	3	200901	0.149	0.166	0.165	0.159	0.160	0.008	4.89%
		200902	0.149	0.166	0.165	0.159	0.160	0.008	4.89%
		200903	0.151	0.147	0.158	0.171	0.157	0.011	6.72%
		200904	0.147	0.149	0.144	0.143	0.146	0.003	1.89%
		200905	0.146	0.147	0.145	0.14	0.145	0.003	2.15%

[0107] 2.2批间重复性检验从每一批试剂盒中分别随机抽取1盒,按照说明书分别对3份质控样品进行检测,每份样品重复检测4次,分别计算每份血清的S/P值平均值,标准差和变异系数,测得结果后计算批间变异系数。结果显示,各样品的变异系数均<10%,符合要求,具体数据见下表。

		抗体检测 S/P 值							
序列号	试剂盒批次	各重复孔的 S/P 值				平均值	标准差	变异系数	
		1st	2nd	3rd	4th				
[0108]	1	200901	1.762	1.830	1.824	1.886	1.842	0.062	3.39%
		200902	1.909	1.867	1.864	1.866			
		200903	1.730	1.742	1.782	1.842			
		200904	1.820	1.879	1.777	1.819			
		200905	1.979	1.918	1.879	1.862			
[0108]	2	200901	0.671	0.637	0.647	0.634	0.660	0.018	2.76%
		200902	0.701	0.691	0.671	0.672			
		200903	0.669	0.65	0.649	0.657			
		200904	0.664	0.658	0.636	0.656			
		200905	0.654	0.687	0.646	0.654			
[0109]	3	200901	0.149	0.166	0.165	0.159	0.154	0.010	6.56%
		200902	0.151	0.147	0.158	0.171			
		200903	0.147	0.149	0.144	0.143			
		200904	0.146	0.147	0.145	0.14			
		200905	0.16	0.152	0.155	0.177			

[0110] 3敏感性检验用1:100、1:200、1:400、1:800和1:1600共5份不同稀释度的敏感性质控血清(即实施例3中的阳性血清)分别进行检测。结果见下表:

不同稀释 倍数 S/P 值	抗体检测 S/P 值										质量标 准 (S/P 值)	
	200901		200902		200903		200904		200905			
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
[0111] 质 控 血 清	1:100	1.596	1.599	1.525	1.560	1.778	1.726	1.624	1.614	1.649	1.539	1.4~1.8
	1:200	1.107	1.074	1.051	1.129	1.188	1.167	1.193	1.113	1.105	1.107	0.9~1.3
	1:400	0.690	0.635	0.680	0.749	0.639	0.637	0.769	0.623	0.650	0.682	0.5~0.8
	1:800	0.354	0.357	0.360	0.317	0.366	0.379	0.352	0.360	0.369	0.393	0.2~0.5
	1:1600	0.174	0.228	0.184	0.168	0.196	0.192	0.260	0.194	0.178	0.211	0.1~0.3

[0112] 4 无菌检验将试剂盒中阳、阴性对照、样品稀释液、浓缩洗涤液、羊抗猪 IgG 酶标抗体、质控品 1、质控品 2、质控品 3 各组份按现行《中国兽药典》附录进行无菌检验。结果见下表。

批号	200901	200902	200903	200904	200905
阳性对照	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长
阴性对照	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长
样品稀释液	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长
[0113] 浓缩洗涤液	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长
羊抗猪 IgG 酶标抗体	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长
质控品 1	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长
质控品 2	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长
质控品 3	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长

[0114] 5 临床样品检测挑选一批本试剂盒对临床采集的血清样本进行 PRV-gB&PRV-gD 抗体的检测,其结果显示,本试剂盒与某进口试剂盒综合符合率为 96.6%,具体结果见下表。

厂家 样本	某进口试剂盒			本试剂盒		
	测值	S/P	判定	测值	S/P	判定
[0115] 1	0.277	0.194	-	0.077	0.018	-
2	0.264	0.178	-	0.119	0.055	-
3	0.294	0.215	-	0.081	0.022	-
4	0.363	0.301	-	0.080	0.021	-
5	0.28	0.198	-	0.096	0.035	-

[0116]

6	0.366	0.305	-	0.073	0.015	-
7	0.273	0.189	-	0.075	0.017	-
8	0.357	0.294	-	0.075	0.016	-
9	0.274	0.190	-	0.091	0.030	-
10	0.363	0.301	-	0.076	0.017	-
11	0.432	0.388	-	0.087	0.027	-
12	0.254	0.165	-	0.085	0.026	-
13	0.228	0.133	-	0.076	0.017	-
14	0.277	0.194	-	0.065	0.008	-
15	0.338	0.270	-	0.084	0.024	-
16	0.222	0.125	-	0.076	0.017	-
17	0.23	0.135	-	0.075	0.016	-
18	0.706	0.520	+	0.801	0.650	+
19	1.204	0.991	+	0.745	0.601	+
20	1.512	1.283	+	1.621	1.365	+
21	1.645	1.409	+	1.361	1.139	+
22	0.803	0.612	+	0.924	0.757	+
23	2.247	1.980	+	1.942	1.646	+
24	0.569	0.390	-	0.125	0.060	-
25	0.473	0.299	-	0.490	0.379	-
26	3.5	3.167	+	2.584	2.206	+
27	3.5	3.167	+	3.036	2.601	+
28	3.062	2.752	+	2.296	1.954	+
29	0.935	0.758	+	0.928	0.761	+
30	0.946	0.768	+	0.889	0.727	+
31	0.923	0.747	+	0.862	0.703	+
32	0.496	0.347	-	0.862	0.703	+
33	1.021	0.838	+	0.944	0.775	+
34	1.255	1.057	+	1.468	1.232	+
35	1.411	1.203	+	1.097	0.909	+
36	1.404	1.196	+	1.398	1.171	+
37	1.364	1.159	+	1.421	1.191	+
38	1.476	1.264	+	1.552	1.305	+
39	1.971	1.727	+	1.505	1.264	+
40	1.913	1.672	+	1.487	1.248	+
41	1.165	0.973	+	1.406	1.178	+
42	2.018	1.770	+	1.501	1.261	+
43	1.975	1.730	+	1.528	1.285	+
44	1.929	1.687	+	1.621	1.366	+
45	1.947	1.704	+	1.696	1.431	+
46	1.753	1.523	+	1.547	1.301	+
47	2.028	1.780	+	1.592	1.341	+
48	1.378	1.172	+	1.168	0.971	+
49	0.845	0.791	+	0.460	0.333	+
50	0.51	0.385	-	0.142	0.069	-

[0117]

51	0.288	0.116	-	0.103	0.037	-
52	0.365	0.210	-	0.063	0.003	-
53	1.603	1.709	+	1.217	0.962	+
54	1.388	1.449	+	0.824	0.636	+
55	0.461	0.448	-	0.227	0.108	-
56	0.489	0.486	-	0.547	0.384	-
57	0.438	0.417	-	0.239	0.119	-
58	0.809	0.915	+	0.553	0.389	-
59	1.61	1.989	+	1.870	1.523	+
60	0.802	0.905	+	0.414	0.269	-
61	1.144	1.364	+	1.635	1.322	+
62	0.793	0.893	+	0.984	0.760	+
63	1.148	1.370	+	1.991	1.628	+
64	1.237	1.489	+	1.844	1.501	+
65	0.809	0.915	+	0.719	0.533	+
66	0.778	0.873	+	0.641	0.465	+
样本个数	66			66		
阳性符合率	38/40=95%					
阴性符合率	25/26=96%					
总符合率	63/66=95.5%					

[0118] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。