



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111474346 A

(43)申请公布日 2020.07.31

(21)申请号 202010292606.2

(22)申请日 2020.04.15

(71)申请人 浙江理工大学绍兴生物医药研究院
有限公司

地址 312366 浙江省绍兴市滨海新区马欢
路398号科创中心C楼

申请人 浙江理工大学
杭州洪桥中科基因技术有限公司

(72)发明人 查银河 舒建洪 杨芳 黄磊
赵海波 刘影 舒金琪

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

C07K 16/10(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

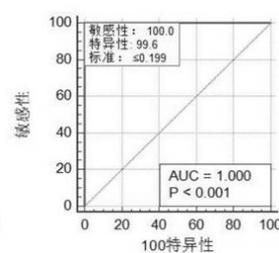
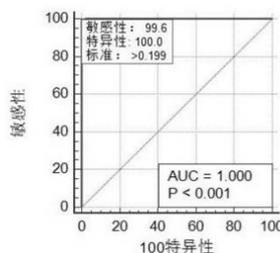
权利要求书3页 说明书22页 附图1页

(54)发明名称

猪流行性腹泻病毒IgA和IgG抗体检测试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明一方面提供了一种猪流行性腹泻病毒IgA和IgG抗体检测试剂盒,所述试剂盒能同时检测猪流行性腹泻病毒IgG抗体和IgA抗体,所述的试剂盒包括:抗原包被板、样品稀释液、浓缩洗涤液、酶标抗体、显色液、终止液、阳性对照和阴性对照。另一方,本发明还提供了一种制备所述试剂盒的方法,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、显色液的分装、终止液的配制与分装。本试剂盒能够在仅仅增加一个试剂的情况下实现同时检测PEDV的IgG抗体和IgA抗体;且检测的抗体滴度都在酶标仪的检测范围之内,利于对整体抗体效价的评价。



1. 一种猪流行性腹泻病毒抗体检测试剂盒,所述试剂盒能同时检测猪流行性腹泻病毒IgG抗体和IgA抗体,其特征在于,所述的试剂盒包括:抗原包被板、样品稀释液、浓缩洗涤液、酶标抗体、显色液、终止液、阳性对照和阴性对照;其中,

所述的抗原包被板为包被有PEDV-S1蛋白的酶标板;

所述的样品稀释液为含有2%BSA的1×PBST溶液;

所述的浓缩洗涤液为25×PBST溶液,在使用前稀释到1×PBST溶液;

所述的酶标抗体有两份,分别为羊抗猪IgA酶标抗体和羊抗猪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0.05%的叠氮钠溶液;

所述的阳性对照为PEDV-IgA抗体OD650nm值在0.9~1.5之间,且PEDV-IgG抗体OD650nm值在1.2~1.8之间的阳性血清;

所述的阴性对照为PEDV-IgA抗体和PEDV-IgG抗体OD650nm值均小于0.2的阴性血清。

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PEDV-S1蛋白的包被浓度为100ng/孔/100 μ l。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的阳性对照为PEDV-IgA抗体OD650nm值在1.1~1.2之间,且PEDV-IgG抗体OD650nm值在1.5~1.6之间的阳性血清。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的阴性对照为PEDV-IgA抗体和PEDV-IgG抗体OD650nm值均小于0.1的阴性血清。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的阳性对照孔每孔OD650nm读数大于0.5且各孔间最大差值应 <0.3 ,阴性对照孔每孔OD650nm读数 <0.3 时,试验成立,结果有效。

6. 一种使用权利要求1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,同时设阳性对照和阴性对照各2孔;同样的样品、阳性对照和阴性对照在包被板的不同位置再加一遍,其中第一遍用于检测PEDV-IgG抗体,第二遍用于检测PEDV-IgA抗体;

3) 孵育:置37 $^{\circ}$ C温箱孵育60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3分钟,甩去孔内液体,拍干;

5) 二抗孵育:对应孔中分别加入羊抗猪IgG酶标抗体和羊抗猪IgA酶标抗体,100 μ L/孔,置37 $^{\circ}$ C温箱孵育45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3分钟,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15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650nm下读取OD650nm值;

10) S/P值计算:按照以下计算公式,计算S/P值:

$$S/P \text{ 值} = \frac{\text{样品 OD}_{650\text{nm}} \text{ 值} - \text{阴性对照 OD}_{650\text{nm}} \text{ 均值}}{\text{阳性对照 OD}_{650\text{nm}} \text{ 均值} - \text{阴性对照 OD}_{650\text{nm}} \text{ 均值}}$$

11) 试验有效性断判: 阳性对照孔每孔OD650nm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OD650nm读数应<0.3;

12) 结果判定:

PEDV-IgG抗体检测结果判定: 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;

PEDV-IgA抗体检测结果判定: 当S/P值大于0.199时判为阳性; 当S/P值小于等于0.199时判为阴性。

7. 一种制备如权利要求1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、显色液的分装、终止液的配制与分装。

8. 根据权利要求7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PEDV-S1重组蛋白稀释到1 μ g/mL, 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3分钟, 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3分钟, 拍干;

5) 加保护剂: 加入10%的海藻糖, 37 $^{\circ}$ C孵育2小时, 拍干, 加干燥剂并抽真空保存。

9. 根据权利要求7所述的方法, 其特征在于, 所述的阳性对照的制备方法包括以下步骤:

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;

2) 免疫原的制备: 取制备的重组PEDV-S1蛋白, 调整蛋白含量为500 μ g/mL;

3) 免疫程序: 对3头猪进行颈部肌肉多点注射重组PEDV-S1蛋白各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PEDV抗体检测;

4) 效价测定: 采用中和法测定血清效价, 选择PEDV中和抗体不低于1:100的猪用于阳性血清制备;

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;

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1:50、1:100、1:200、1:400共4个稀释度, 各稀释度均用制造的试剂盒进行检测, 选择PEDV-IgA抗体OD650nm值 \geq 1.1且PEDV-IgG抗体OD650nm值 \geq 1.5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。

10. 根据权利要求7所述的方法, 其特征在于, 所述的阴性对照的制备方法包括以下步骤:

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;

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;

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。

猪流行性腹泻病毒IgA和IgG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,具体涉及一种检测猪流行性腹泻病毒IgA和IgG抗体检测试剂盒及制备方法和应用。

背景技术

[0002] 猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的,以腹泻、呕吐、脱水和对哺乳仔猪高致死率为主要特征的一种高度接触性肠道传染病。截止到2017年, PED已蔓延到全世界大多数养猪国家,成为世界范围内养猪业共同关注并亟需解决的问题。当前,对PEDV的临床诊断方法主要是酶联免疫吸附试验(ELISA),检测抗原或特异性抗体,以评估猪场的PEDV的感染情况。

[0003] PEDV属于冠状病毒科(Coronaviridae),冠状病毒属(Coronavirus)。病毒粒子为多型性,倾向球状,平均直径约为130nm。病毒结构蛋白包括:核衣壳蛋白(N),纤突糖蛋白(S)、膜蛋白(M)、小膜蛋白(E),其中S蛋白最大。S蛋白为伸出PEDV包膜的20nm球杆形糖蛋白,分子量为180~220kDa,预测有1,383个氨基酸残基组成,富含半胱氨酸,并含有29个潜在N-糖基化位点,pH4.0条件下,溶解度最大。S蛋白中N-糖基化位点在病毒粒子成熟后不能被细胞蛋白酶切割,直接导致病毒的细胞融合力和感染力降低,是PEDV人工细胞培养增殖困难的原因。根据与其它冠状病毒S蛋白保守序列的相似性, PEDV S蛋白被划分为S1(aa 1~789)和S2(aa790~1383)两个结构域。其中S1区位于病毒表面,主要识别受体并与宿主细胞受体结合,介导中和抗体产生。S2区负责病毒囊膜与宿主细胞膜的融合,将病毒遗传物质RNA导入宿主细胞内,从而引起细胞感染。因此,选择S1蛋白作为试剂盒开发的抗原蛋白最为合适。

[0004] 现有技术认为,针对PEDV的ELISA检测应针对IgA抗体,因为其为粘膜免疫系统产生的抗体,也是对阻断病毒感染起到重要作用的抗体。但是,仅仅检测IgA抗体对整体的免疫进行评价,不够全面,因为,我们的临床检测表明, IgA抗体和IgG抗体并没有明显的相关性,因此,为了便于更好的评价PEDV临床免疫或感染状况,可能需要同时检测PEDV IgG抗体和PEDV IgA抗体。另外,本发明人在进行试剂盒开发过程中发现,免疫后的血清中抗体滴度很高,使用OD450检测时很容易超出仪器检测上限(如专利号为201710704142.X的发明专利提出的ELISA检测试剂盒,为了达到降低OD450值,使用很低的抗原包被浓度来建立试剂盒,但本发明人使用同样的抗原蛋白重复试验时,发现不同时间、不同人、不同批次重复性很差,不利于试剂盒的保存和推广),不利于整个抗体效价的评价。基于此,特提出了本发明。

发明内容

[0005] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的之一,提供一种猪流行性腹泻病毒抗体检测试剂盒;优选地的猪流行性腹泻病毒抗体检测试剂盒能够同时检测PEDV-IgG抗体和

PEDV-IgA抗体。本发明的目的之二，还提供了一种制备该试剂盒的方法。本发明的目的之三，在不影响整体的试剂盒性能的前提下，降低试剂盒的信号，利于对整体实际抗体效价的评价。

[0006] 因此，本发明一方面提供了一种猪流行性腹泻病毒抗体检测试剂盒，所述试剂盒能同时检测猪流行性腹泻病毒IgG抗体和IgA抗体，所述的试剂盒包括：抗原包被板、样品稀释液、浓缩洗涤液、酶标抗体、显色液、终止液、阳性对照和阴性对照；其中，所述的抗原包被板为包被有PEDV-S1蛋白的酶标板；所述的样品稀释液为含有2%BSA的1×PBST溶液；所述的浓缩洗涤液为25×PBST溶液，在使用前稀释到1×PBST溶液；所述的酶标抗体有两份，分别为羊抗猪IgA酶标抗体和羊抗猪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0.05%的叠氮钠溶液；所述的阳性对照为PEDV-IgA抗体OD650nm值在0.9~1.5之间，且PEDV-IgG抗体OD650nm值在1.2~1.8之间的阳性血清；所述的阴性对照为PEDV-IgA抗体和PEDV-IgG抗体OD650nm值均小于0.2的阴性血清。

[0007] 优先地，本发明所述的抗原包被板上PEDV-S1蛋白的包被浓度为100ng/孔/100μl。

[0008] 优先地，本发明所述的阳性对照为PEDV-IgA抗体OD650nm值在1.1~1.2之间，且PEDV-IgG抗体OD650nm值在1.5~1.6之间的阳性血清。

[0009] 优先地，本发明所述的阴性对照为PEDV-IgA抗体和PEDV-IgG抗体OD650nm值均小于0.1的阴性血清。

[0010] 优先地，本发明所述的阳性对照孔每孔OD650nm读数大于0.5且各孔间最大差值应<0.3，阴性对照孔每孔OD650nm读数<0.3时，试验成立，结果有效。

[0011] 另一方面，本发明还提供了一种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，同时设阳性对照和阴性对照各2孔；同样的样品、阳性对照和阴性对照在包被板的不同的位置再加一遍，其中第一遍用于检测PEDV-IgG抗体，第二遍用于检测PEDV-IgA抗体；3) 孵育：置37℃温箱孵育60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3分钟，甩去孔内液体，拍干；5) 二抗孵育：对应孔中分别加入羊抗猪IgG酶标抗体和羊抗猪IgA酶标抗体，100μL/孔，置37℃温箱孵育45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3分钟，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15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650nm下读取OD650nm值；10) S/P值计算：按照以下计算公式，计算S/P值：

$$S/P值 = \frac{\text{样品 } OD_{650nm} \text{ 值} - \text{阴性对照 } OD_{650nm} \text{ 均值}}{\text{阳性对照 } OD_{650nm} \text{ 均值} - \text{阴性对照 } OD_{650nm} \text{ 均值}}; \quad 11)$$

试验有效性断判：阳性对照孔每孔OD650nm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OD650nm读数应<0.3；12) 结果判定：PEDV-IgG抗体检测结果判定：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；PEDV-IgA抗体检测结果判定：当S/P值大于0.199时判为阳性；当S/P值小于等于0.199时判为阴性。

[0012] 再一方面，本发明还提供了一种制备所述试剂盒的方法，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、显色液的分装、终止液的配制与分装。

[0013] 优先地,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PEDV-S1 重组蛋白稀释到 $1\mu\text{g}/\text{mL}$,混匀后加入酶标板, $100\mu\text{l}/\text{孔}$,在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下作用 $12\sim 15$ 小时;2)洗涤:用 $1\times\text{PBST}$ 洗涤3次,每次3分钟,每孔 $300\mu\text{l}$,最后一次拍干;3)封闭:加含 1% BSA的PBS, $200\mu\text{l}/\text{孔}$, 37°C 封闭2小时;4)洗涤:用 $1\times\text{PBST}$ 洗涤3次,每孔 $300\mu\text{l}$,每次3分钟,拍干;5)加保护剂:加入 10% 的海藻糖, 37°C 孵育2小时,拍干,加干燥剂并抽真空保存。

[0014] 优先地,本发明所述的阳性对照的制备方法包括以下步骤: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;2)免疫原的制备:取制备的重组PEDV-S1蛋白,调整蛋白含量为 $500\mu\text{g}/\text{mL}$;3)免疫程序:对3头猪进行颈部肌肉多点注射重组PEDV-S1蛋白各 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PEDV抗体检测;4)效价测定:采用中和法测定血清效价,选择PEDV中和抗体不低于 $1:100$ 的猪用于阳性血清制备;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, $3000\text{ r}/\text{min}$ 离心5分钟,取上清,将上清混匀后 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,定量分装, $1\text{mL}/\text{管}$;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 $1:50$ 、 $1:100$ 、 $1:200$ 、 $1:400$ 共4个稀释度,各稀释度均用制造的试剂盒进行检测,选择PEDV-IgA抗体OD 650nm 值 ≥ 1.1 且PEDV-IgG抗体OD 650nm 值 ≥ 1.5 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 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,定量分装。

[0015] 优先地,本发明所述的阴性对照的制备方法包括以下步骤: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;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, $3000\text{r}/\text{min}$ 离心5分钟,取上清,将上清混匀后 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,定量分装, $1\text{mL}/\text{管}$;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 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,定量分装。

[0016] 本发明的试剂盒能够在仅仅增加一个试剂(酶标抗体)的情况下实现同时检测PEDV的IgG抗体和IgA 抗体;且检测的抗体滴度都在酶标仪的检测范围之内,利于对整体抗体效价的评价。另外,本发明的试剂盒不仅适用于血清检测,也适用于奶样检测,通用性较强。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。

附图说明

[0017] 图1PEDV-IgA试剂盒cut-off值图(S/P值)。

具体实施方式

[0018] 下面结合附图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说明了实验方法,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 PEDV-S1蛋白的制备

[0020] 本发明所用的PEDV-S1蛋白来源于专利号为201710704142.X的发明专利申请单位,具体制备方法参考该专利的相关实施例。

[0021] 实施例2 PEDV-IgA抗体检测试剂盒的建立

[0022] 1材料与方法

[0023] 1.1试验材料

[0024] 1.1.1纯化的猪流行性腹泻病毒S1蛋白由浙江大学动物科学学院人类与动物病毒实验室(专利号为 201710704142.X的发明专利的第一申请单位)制备。

[0025] 1.1.2酶标板购自美国Corning公司。

[0026] 1.1.3血清阳性血清、阴性血清、特异性质控血清由浙江大学动物科学学院人类与动物病毒实验室制备或购买、保存,待检血清由丽水市枫景养殖场提供。

[0027] 1.1.4主要试剂样品稀释液、浓缩洗涤液、羊抗猪IgA酶标抗体、显色液、终止液。

[0028] 1.2试验方法

[0029] 1.2.1试剂盒制备工艺的建立

[0030] 1.2.1.1重组S1蛋白包被浓度与血清稀释倍数的确定采用方阵滴定法确定重组蛋白的最佳工作浓度和待检血清的最佳稀释倍数。纯化后的重组S1蛋白用包被液稀释到浓度为16 μ g/mL、8 μ g/mL、4 μ g/mL、2 μ g/mL、1 μ g/mL、0.5 μ g/mL、0.25 μ g/mL,按100 μ L/孔包被酶标板。PEDV阴性、阳性血清分别按1:100、1:200、1:400和1:800进行倍比稀释,每个血清稀释度对应8个抗原包被浓度。将辣根过氧化物酶标记羊抗猪IgA酶标抗体稀释10,000倍。按照间接ELISA方法的操作程序进行检测,用酶标仪测定每孔OD650nm 读数,计算相同稀释度的阳性血清和阴性血清孔之间的OD650nm值的比值(P/N)值,选择P/N值最大孔的稀释度作为抗原和血清的最佳稀释度。

[0031] 1.2.1.2羊抗猪IgA酶标抗体工作浓度的优化以重组蛋白的最佳工作浓度包被ELISA板,封闭,加入最适稀释倍数的阴性、阳性血清,将羊抗猪IgA酶标抗体按1:10,000、1:20,000、1:40,000的比例倍比稀释,按照间接ELISA方法的操作程序,检测已知的PEDV阴性血清,酶标仪测定每孔OD650nm值,比较 P/N值,以确定羊抗猪IgA酶标抗体最佳稀释度。

[0032] 1.2.1.3封闭条件的选择封闭液分别选择含0.5%BSA、1%BSA、5%BSA、5%脱脂乳的PBST,封闭的时间分别用37 $^{\circ}$ C湿盒孵育1小时、37 $^{\circ}$ C湿盒孵育2小时、37 $^{\circ}$ C湿盒孵育2.5小时、37 $^{\circ}$ C湿盒孵育3小时,进行ELISA检测,比较P/N值,确定最佳封闭条件。

[0033] 1.2.2诊断方法的建立

[0034] 1.2.2.1血清稀释比浓度取PEDV阴性、阳性血清分别按1:100、1:200、1:400和1:800的比例倍比稀释,分别用实验室试制的3批产品(批号为170501、170502、170503)进行检测,用酶标仪测定每孔OD650nm 值,计算P/N(阳性/阴性)值。选择P/N值最大孔的稀释倍数作为血清的最佳稀释度。

[0035] 1.2.2.2抗原抗体反应条件及时间采用方阵滴定法确定抗原抗体的反应条件及时间。取PEDV阴性、阳性血清分别按最佳稀释倍数稀释,分别用实验室试制的3批产品进行检测,抗原抗体反应温度为25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C,时间为1小时、1.5小时、2小时。用酶标仪测定每孔OD650nm值,计算P/N(阳性/阴性)值。选择P/N值最大的条件为抗原抗体的反应条件及时间。

[0036] 1.2.2.3羊抗猪IgA酶标抗体作用条件及时间采用方阵滴定法确定羊抗猪IgA酶标抗体工作条件及时间。取PEDV阴性、阳性血清分别按最佳稀释倍数稀释,分别用实验室试制

的3批产品进行检测;作用温度:4℃、37℃,作用时间:4℃作用14小时,37℃作用45分钟、60分钟、90分钟,酶标仪测定每孔OD650nm 值,计算P/N(阳性/阴性)值。选择P/N值最大孔的稀释倍数作为羊抗猪IgA酶标抗体最佳作用温度与时间。

[0037] 1.2.2.4底物浓度及反应时间取底物(北京索莱宝公司生产)分别用实验室试制的3批产品进行检测,反应时间分别为10分钟、15分钟、20分钟,用酶标仪测定每孔OD650nm值,计算P/N(阳性/阴性)值。选择P/N值最大孔的稀释倍数作为最佳底物浓度及反应时间。

[0038] 1.2.2.5试剂盒成立条件取阴性、阳性对照对实验室试制的3批PEDV试剂盒按确定的诊断方法进行操作,并进行50次重复性试验,计算 \bar{x} ,阳性对照 $\bar{x} - 5SD$,确定试剂盒中阴性对照、阳性对照成立的成立条件。

[0039] 1.2.1.6阴阳性临界值的确定用219份已知阴性血清、247份已知阳性血清按上述确定的诊断方法进行检测,用MedCalc软件对所有检测结果进行统计学分析(ROC分析),根据95%CI条件下的敏感性(Sn95),特异性(Sp95)以及95%CI下的曲线面积(AUCs)来确定最优临界点。

[0040] 2结果

[0041] 2.1试剂盒制备工艺的建立

[0042] 2.1.1抗原最佳包被量与血清最佳稀释倍数的确定

[0043] 方阵滴定法结果显示:当包被抗原量为100ng/孔/100 μ L,待检血清的最佳稀释倍数为1:100时,检测得到的P/N平均值高达13.05(表1),为最佳检测效果。因此,抗原的最佳包被量为100ng/孔/100 μ L,待检血清的最佳稀释倍数定为1:100。

[0044] 表1 PEDV-S1蛋白抗原最佳包被浓度和阳性血清的最佳稀释度

包被 浓度 (ng/ 孔)	血清稀释度															
	1:100				1:200				1:400				1:800			
	(+)	(-)	P/N 值	平均 值	(+)	(-)	P/N 值	平均 值	(+)	(-)	P/N 值	平均 值	(+)	(-)	P/N 值	平均 值
25	0.95	0.11	8.77	8.82	0.48	0.16	3.05	3.04	0.37	0.15	2.4	2.41	0.26	0.13	2.1	2.1
	0.95	0.11	8.87		0.48	0.16	3.03		0.36	0.15	2.43		0.26	0.13	2.1	
50	1.14	0.11	10.44	10.45	0.5	0.16	3.02	3.03	0.43	0.13	3.25	3.25	0.24	0.1	2.4	2.31
	1.14	0.11	10.46		0.5	0.16	3.04		0.43	0.13	3.26		0.24	0.11	2.22	
100	1.41	0.1	13.69	13.05	0.51	0.13	3.98	4.02	0.59	0.14	4.3	4.32	0.28	0.12	2.25	2.25
	1.39	0.11	12.41		0.52	0.13	4.06		0.59	0.14	4.35		0.28	0.12	2.25	
200	1.75	0.25	7.13	7.11	0.95	0.17	5.5	5.54	0.65	0.14	4.6	4.59	0.36	0.12	2.91	2.94
	1.74	0.25	7.09		0.95	0.17	5.57		0.65	0.14	4.57		0.36	0.12	2.97	
400	2.18	0.27	8.15	8.14	1.48	0.21	7.2	7.16	0.94	0.15	6.22	6.2	0.51	0.12	4.11	4.12
	2.19	0.27	8.13		1.48	0.21	7.11		0.94	0.15	6.19		0.51	0.12	4.12	
800	2.77	0.3	9.18	9.22	2.41	0.27	8.99	9.04	1.77	0.17	10.54	10.48	1.01	0.12	8.55	8.41
	2.78	0.3	9.27		2.41	0.27	9.1		1.77	0.17	10.42		1.02	0.12	8.26	
1600	2.85	0.55	5.16	5.14	2.7	0.34	7.86	7.88	2.55	0.21	12.39	12.48	1.53	0.15	10.57	10.6
	2.85	0.56	5.12		2.7	0.34	7.9		2.55	0.2	12.56		1.54	0.14	10.78	

[0046] 注:(+)表示阳性血清,(-)表示阴性血清

[0047] 2.1.2羊抗猪IgA酶标抗体最佳工作浓度的确定

[0048] 结果表明:当羊抗猪IgA酶标抗体稀释度为1:10,000时,检测得到的P/N值达到最高(表2);因此,确定羊抗猪IgA酶标抗体最佳工作浓度为1:10,000。

[0049] 表2羊抗猪IgA酶标抗体最佳稀释倍数的确定

羊抗猪 IgA 酶标抗体不同稀释度时的 OD650nm						
稀释度	1:10,000		1:20,000		1:40,000	
[0050] 阳性血清	1.61	1.60	1.00	0.96	0.54	0.54
阴性血清	0.09	0.08	0.06	0.06	0.04	0.04
P/N 值	18.74	19.55	16.97	17.21	13.12	13.48
P/N 均值	19.15		17.09		13.30	

[0051] 2.1.3 封闭条件的确定

[0052] 试验结果显示:当封闭液为含1%BSA的PBST,封闭条件为37℃2小时时,检测结果P/N值平均值为14.69达到最高(表3);因此,最佳封闭条件确定为:封闭液为含1%BSA的PBST,封闭条件为37℃ 2小时。

[0053] 表3最佳封闭条件的确定

封闭液	阳性样品 P/N 值											
	37℃ 1 小时			37℃ 2 小时			37℃ 2.5 小时			37℃ 3 小时		
	1	2	平均值	1	2	平均值	1	2	平均值	1	2	平均值
[0054] 0.5% BSA	9.14	10.21	9.68	10.21	12.22	11.22	10.77	12.68	11.73	9.66	11.08	10.37
[0055] 1% BSA	13.91	11.68	12.8	15.08	14.3	14.69	14.23	14.25	14.24	14.29	13.74	14.02
5% BSA	12.37	11.28	11.83	14.29	12.94	13.62	13.08	14.03	13.56	13.1	13.7	13.4
5%脱脂乳	10.47	11.04	10.76	12.23	13.06	12.65	12.29	10.06	11.18	10.75	11.98	11.37

[0056] 2.2 诊断方法的建立

[0057] 2.2.1 血清稀释比浓度

[0058] 3批实验室对血清不同稀释度实验结果显示,血清按1:100的比例稀释,检测得到的P/N值平均值高达16.27(表4),为最佳检测效果。因此,血清按1:100的比例稀释为最佳选择。

[0059] 表4阳性血清的最佳稀释度

批号	血清稀释度															
	1:100				1:200				1:400				1:800			
	(+)	(-)	P/N 值	平均值	(+)	(-)	P/N 值	平均值	(+)	(-)	PN/ 值	平均值	(+)	(-)	P/N 值	平均值
[0060] 170501	2.39	0.203	11.77	11.23	0.876	0.156	5.62	5.54	0.465	0.122	3.81	3.53	0.263	0.125	2.1	2.25
170502	2.338	0.219	10.68	16.27	0.896	0.164	5.46	7.13	0.432	0.133	3.25	4.45	0.242	0.101	2.4	2.58
170503	2.42	0.148	16.35	10.44	0.914	0.129	7.09	10.74	0.589	0.137	4.3	6.38	0.277	0.123	2.25	3.97
	2.346	0.145	16.18		0.946	0.132	7.17		0.653	0.142	4.6		0.355	0.122	2.91	
	2.184	0.208	10.5		1.677	0.155	10.82		0.839	0.151	5.56		0.506	0.123	4.11	
	2.208	0.213	10.37		1.673	0.157	10.66		0.886	0.123	7.2		0.517	0.135	3.83	

[0061] 2.2.2 抗原抗体反应条件及时间

[0062] 对实验室生产的3批试剂盒,采用方阵滴定法对抗原抗体反应条件进行实验,结果显示:抗原抗体反应在37℃条件下1小时P/N值最高为13.52(表5),25℃条件下2小时P/N值最高为13.98,二者差异不大。考虑到一般兽医实验室都配备生化培养箱,为了缩短操作时间,提高工作效率,我们确定抗原抗体最佳反应条件为:37℃条件下作用1小时。

[0063] 表5抗原抗体反应条件及时间

时 间	170501						170502						170503					
	37℃			25℃			37℃			25℃			37℃			25℃		
	(+)	(-)	P/N 值	(+)	(-)	P/N 值	(+)	(-)	P/N 值	(+)	(-)	P/N 值	(+)	(-)	P/N 值	(+)	(-)	P/N 值
[0064] 1	1.39	0.10	13.5	1.36	0.1	13.3	1.39	0.11	13.25	1.36	0.1	13.33	1.39	0.1	13.52	1.36	0.1	13.33
h	1.38	0.11	12.7	1.37	0.1	13.3	1.38	0.11	12.63	1.37	0.1	13.3	1.38	0.11	12.79	1.37	0.1	13.3
1.5	1.42	0.15	9.59	1.41	0.15	9.59	1.43	0.15	9.6	1.41	0.15	9.59	1.42	0.15	9.74	1.41	0.15	9.59
h	1.45	0.15	9.98	1.74	0.24	7.14	1.46	0.15	10.07	1.74	0.24	7.14	1.45	0.25	5.9	1.75	0.23	7.49
2	2.18	0.17	13	2.17	0.17	13.0	2.18	0.17	13	2.17	0.17	13.02	2.18	0.18	12.27	2.18	0.16	13.87
h	2.18	0.16	13.4	2.16	0.15	14.1	2.18	0.16	13.36	2.16	0.16	13.48	2.18	0.17	12.59	2.15	0.15	13.98

[0065] 2.2.3羊抗猪IgA酶标抗体作用条件

[0066] 对实验室生产的3批试剂盒,在羊抗猪IgA酶标抗体的工作浓度1:10,000条件下,对羊抗猪IgA酶标抗体作用温度及反应时间进行实验,结果显示:37℃条件下作用45分钟时,P/N值达到最高(表6)。因此确认羊抗猪IgA酶标抗体最佳作用条件为:37℃条件下作用45分钟。

[0067] 表6羊抗猪IgA酶标抗体作用条件及时间P/N结果

羊抗猪 IgA 酶标抗体 作用条件	170501				170502				170503				
	(+)	(-)	P/N 值	平均 值	(+)	(-)	P/N 值	平均 值	(+)	(-)	P/N 值	平均 值	
[0068] 4℃	16	2.33	0.17	13.69	2.23	0.16	13.92	15.69	2.28	0.17	13.26	14.29	
小时	2.35	0.13	17.68	15.69	2.24	0.15	14.65	14.29	2.34	0.18	13.01	13.14	
45	1.67	0.09	19.24	20.12	1.66	0.08	20.54	20.13	1.61	0.08	20.32	20.14	
分钟	1.66	0.08	20.99	20.12	1.64	0.08	19.71	20.13	1.64	0.08	19.96	20.14	
37	60	1.26	0.09	14.12	1.25	0.09	14.67	14.77	1.25	0.09	14.34	13.97	
℃	分钟	1.25	0.08	15.23	14.68	1.25	0.08	14.87	14.77	1.25	0.09	13.6	13.97
90	1	0.06	16.92	16.93	0.98	0.07	13.58	13.54	0.99	0.07	14.75	14.17	
分钟	0.95	0.06	16.93	16.93	0.96	0.07	13.49	13.54	0.98	0.07	13.58	14.17	

[0069] 2.2.4底物最佳反应时间的确定

[0070] 用实验室试制的3批产品(批号为170501、170502、170503)进行检测,加入底物之后分别在37℃作用10分钟、15分钟、20分钟进行ELISA检测,选择底物最佳作用时间。用酶标仪测定每孔OD_{650nm}值,计算各个作用时间P/N值,结果表明加入底物15分钟时其P/N值最高。因此,选择37℃条件时底物反应时间为15分钟作为最佳底物浓度及反应时间。具体结果见表7。

[0071] 表7底物反应时间P/N结果

项目	10 分钟	15 分钟	20 分钟
[0072] 阳性	0.95	0.92	1.59
阴性	0.07	0.09	0.13
P/N 值	13.57	10.22	12.23

[0073] 2.2.5成立条件

[0074] 取阴性、阳性对照血清对实验室试制的3批PEDV试剂盒按确定的诊断方法进行的操作,并进行50次重复性试验,结果如下:

[0075] 表8阴、阳性对照重复性试验检测结果

	阴性对照 ELISA 检测结果 (OD 值)			阳性对照 ELISA 检测结果 (OD 值)				
	重复试验	170501	170502	170503	重复试验	170501	170502	170503
[0076]	1	0.058	0.04	0.045	1	1.112	1.157	1.106
	2	0.137	0.134	0.164	2	1.203	1.149	1.104
	3	0.127	0.098	0.132	3	0.911	1.234	1.201
	4	0.113	0.091	0.116	4	1.128	1.242	1.218
	5	0.056	0.073	0.084	5	1.086	1.150	1.135
	6	0.087	0.075	0.094	6	1.273	1.277	1.206
	7	0.078	0.048	0.052	7	1.198	1.177	1.087
	8	0.125	0.139	0.149	8	0.995	1.261	1.185
	9	0.068	0.065	0.071	9	1.202	0.958	0.974
	10	0.082	0.068	0.084	10	1.025	1.045	1.009
	11	0.112	0.104	0.102	11	0.927	1.064	1.030
	12	0.079	0.078	0.093	12	0.996	1.265	1.196
	13	0.096	0.048	0.084	13	1.210	0.938	0.902
	14	0.088	0.079	0.083	14	0.998	1.054	1.170

	15	0.151	0.137	0.142	15	0.897	1.219	1.180
	16	0.14	0.13	0.135	16	0.904	1.077	0.991
	17	0.075	0.048	0.092	17	1.287	1.024	1.006
	18	0.098	0.081	0.092	18	1.173	1.084	1.023
	19	0.114	0.108	0.112	19	0.984	0.934	0.914
	20	0.058	0.057	0.064	20	1.227	1.267	1.177
	21	0.058	0.056	0.063	21	0.910	0.964	0.896
	22	0.068	0.058	0.064	22	0.984	0.929	0.903
	23	0.069	0.06	0.063	23	0.924	0.925	0.924
	24	0.139	0.133	0.136	24	1.117	0.956	0.901
	25	0.108	0.105	0.109	25	1.021	0.950	0.912
	26	0.112	0.085	0.108	26	1.188	1.165	1.174
	27	0.127	0.118	0.124	27	1.207	1.218	1.203
	28	0.132	0.14	0.152	28	1.118	1.149	1.108
	29	0.139	0.148	0.158	29	1.024	1.211	1.298
	30	0.052	0.045	0.048	30	1.128	1.126	1.108
	31	0.097	0.131	0.15	31	1.165	1.137	1.115
	32	0.102	0.101	0.109	32	1.215	1.049	1.003
	33	0.148	0.158	0.145	33	1.010	1.256	1.201
[0077]	34	0.095	0.12	0.123	34	1.181	1.224	1.194
	35	0.051	0.05	0.058	35	0.900	1.145	1.103
	36	0.085	0.046	0.049	36	1.202	0.954	0.952
	37	0.068	0.049	0.063	37	0.914	1.062	0.986
	38	0.158	0.16	0.155	38	1.202	1.276	1.141
	39	0.048	0.045	0.05	39	0.984	1.234	1.165
	40	0.136	0.135	0.139	40	1.185	0.984	1.023
	41	0.106	0.106	0.111	41	0.919	1.239	1.206
	42	0.162	0.142	0.146	42	1.197	0.917	0.919
	43	0.041	0.045	0.079	43	0.905	1.135	1.125
	44	0.087	0.08	0.082	44	1.262	1.223	1.293
	45	0.051	0.044	0.046	45	1.181	0.983	1.037
	46	0.067	0.055	0.064	46	1.172	1.256	1.157
	47	0.086	0.051	0.064	47	1.231	1.030	0.992
	48	0.123	0.11	0.128	48	1.213	1.227	1.197
	49	0.078	0.042	0.071	49	1.200	1.187	1.237
	50	0.05	0.043	0.046	50	1.141	1.275	1.184
	\bar{x}		0.094		\bar{x}		1.101	
	SD		0.041		SD		0.120	
	$\bar{x} +5SD$		0.299		$\bar{x} -5SD$		0.501	

[0078] 考虑到后期使用环节存在较大地区、设备人员操作差异,因此确定试剂盒成立条件为:阳性对照孔每孔OD_{650nm}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

OD_{650nm}读数应<0.3。

[0079] 2.2.6 阴阳性临界值的确定

[0080] 用219份已知阴性血清 (IPMA效价<1:25)、247份已知阳性血清 (IPMA效价≥1:50)按上述确定的 诊断方法进行检测,用MedCalc软件对所有检测结果进行统计学分析 (ROC分析),根据95% CIs条件下的敏感性 (Sn95),特异性 (Sp95)以及95% CIs下的曲线面积 (AUCs)来确定。分析结果显示 (图1),阳性的cut-off值 (S/P值)为0.199,阴性的cut-off值 (S/P值)为0.199为系统分析的最优临界点。因此,当样品S/P值大于0.199时判为阳性。当样品S/P值小于等于0.199时判为阴性。

[0081] 表9 219份已知阴性样品 (S/P值)

[0082]

0.006	0.139	-0.024	-0.004	0.065	-0.008	0.199
-0.019	0.068	-0.042	-0.035	0.04	0.124	0.007
0.001	0.026	-0.054	-0.039	-0.013	0.113	0.094
-0.014	-0.028	-0.034	0.05	-0.035	0.015	-0.007
0.027	0.076	0.011	0.004	-0.062	0.138	-0.009
0.016	0.125	-0.041	0.013	0.064	0.1	0.012
0.021	0.109	-0.03	-0.003	0.053	0.046	0.063
-0.003	0.105	-0.041	-0.009	0.069	0.026	0.014
-0.006	0.132	-0.024	-0.012	0.062	0.06	-0.004
-0.018	0.198	-0.028	-0.01	0.06	0.087	-0.003
0.199	0.079	0.069	-0.032	-0.06	0.072	0.054
-0.014	0.106	0.093	-0.001	-0.058	0.018	0.007
0.006	0.052	-0.032	-0.014	-0.059	0.02	0.115
0.006	0.015	-0.039	-0.031	-0.006	0.039	0.053
-0.006	0.111	-0.044	-0.04	-0.007	0.048	0.046
-0.001	0.046	-0.014	-0.046	-0.011	0.14	0.071
0.096	0.011	-0.004	-0.046	-0.001	0.073	0.043
-0.016	0.136	-0.003	-0.037	0	0.068	0.033
0.089	0.057	0.017	-0.04	0.007	0.121	-0.006
0.036	0.015	0.001	0.014	0.072	0.109	0.144
-0.015	0.144	-0.001	0.021	0.03	0.117	0.025
0.139	-0.009	0.06	0.024	0.076	0.134	-0.014
0.121	0.142	-0.013	-0.011	0.101	0.048	-0.001
0.061	0.071	0.076	-0.007	0.041	0.036	-0.006
0.023	0.021	0.076	-0.014	0.051	0.019	-0.011
0.112	-0.002	0.088	-0.041	0.12	0.05	-0.012
0.056	-0.011	0.065	-0.035	0.005	-0.006	-0.004
0.021	-0.015	0.046	-0.045	0.14	-0.01	-0.012
0.058	-0.024	-0.035	0.042	0.106	0.124	0.127
0.025	-0.017	-0.032	0.049	0.109	-0.007	0.046

0.005	-0.008	-0.039	0.037	0.125	-0.012	0.199
0.139	0.07	/	/	/	/	/

[0083] 表10 247已知阳性样品(S/P值)

1.155	1.165	1.485	1.049	0.527	0.201	0.236
0.252	0.952	0.236	0.436	0.572	1.265	0.338

0.226	0.203	0.212	0.446	0.784	0.493	0.416
0.445	0.201	0.23	1.987	1.708	1.763	1.529
0.49	0.282	0.232	1.313	0.292	0.843	1.791
0.278	0.75	0.247	0.381	1.467	0.385	0.812
0.852	0.855	0.274	0.723	0.308	1.629	0.312
0.474	1.981	0.317	0.214	1.703	0.711	1.095
0.498	0.206	0.408	1.764	0.319	1.886	0.869
0.268	1.23	0.432	0.81	0.31	0.271	0.245
0.853	0.622	0.464	0.377	1.985	2.017	0.245
1.323	0.334	0.535	1.491	0.267	1.192	1.723
1.968	1.927	0.572	1.496	0.22	0.193	0.281
0.851	0.3	0.598	0.505	1.838	0.423	1.42
0.858	1.895	0.636	0.323	0.809	1.325	0.297
0.86	1.556	0.764	0.26	0.647	0.501	0.593
1.339	1.917	0.801	1.917	1.726	1.949	1.618
1.359	1.158	0.957	0.63	0.316	1.567	0.61
1.762	0.68	0.968	1.784	0.301	0.659	0.708
1.291	1.903	0.998	0.22	0.252	1.043	0.227
0.408	1.213	1.003	1.827	0.508	0.302	0.408
0.573	0.209	1.032	1.535	0.326	0.451	0.654
0.205	0.912	1.217	1.897	0.336	1.837	1.114
1.734	1.74	1.283	0.985	0.369	0.386	1.362
0.206	0.73	1.558	1.313	0.284	1.596	0.204
1.01	0.282	1.565	0.526	0.848	0.319	0.254
1.714	0.656	1.574	0.64	1.148	0.673	0.777
0.258	0.321	1.61	0.85	0.641	0.716	1.546
0.244	1.995	1.739	0.288	0.434	1.727	0.41
0.232	1.577	1.746	1.979	0.801	0.251	0.641
0.281	0.203	1.781	1.828	0.986	1.88	1.951
0.439	0.564	1.851	0.432	1.497	1.586	0.266
0.344	1.532	1.853	1.613	0.341	1.472	0.289
0.292	0.32	1.902	0.502	0.684	1.345	0.482
0.575	0.746	1.923	0.216	1.127	0.76	0.842
0.235	1.054	/	/	/	/	/

[0086] 3结论

[0087] 通过对S1蛋白抗原包被浓度、封闭液及封闭条件、羊抗猪IgA酶标抗体最适工作浓度的筛选进行试剂盒生产工艺优化,确定抗原包被量为100ng/孔/100 μ L(1 μ g/mL)、封闭液

为1%BSA的PBST和封闭条件为37℃下孵育120分钟、羊抗猪IgA酶标抗体工作浓度为1:10,000。

[0088] 利用实验室生产(批号为170501、170502、170503)的3批产品,确定血清稀释比浓度为1:100、抗原抗体反应条件为37℃条件下作用1小时、羊抗猪IgA酶标抗体作用条件为37℃条件下作用45分钟,底物反应条件为37℃条件作用15分钟。

[0089] 确定试剂盒成立条件为阳性对照孔每孔OD_{650nm}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OD_{650nm}读数应<0.3。

[0090] 通过用MedCalc软件的统计学分析(ROC分析),根据95%CI_s条件下的敏感性(Sn₉₅),特异性(Sp₉₅)以及95%CI_s下的曲线面积(AUC_s)来确定,判定标准为:当S/P值大于0.199时判为阳性。当S/P值小于等于0.199时判为阴性。

[0091] 实施例3 PEDV-IgG抗体检测试剂盒的建立

[0092] 为了能够同时检测PEDV IgA抗体和PEDV IgG抗体,本发明人在仅更换羊抗猪IgA酶标抗体(更换为羊抗猪IgG酶标抗体)的基础上,实现PEDV IgA抗体和PEDV IgG抗体同步检测。因此,本发明人在建立PEDV-IgG抗体检测试剂盒时,只对羊抗猪IgG酶标抗体的稀释度以及阴阳性临界值进行优化,具体的试验方法同实施例2,在此不再赘述。优化结果如下:

[0093] 羊抗猪酶标抗体(购自Thermo公司),稀释2万倍后直接使用;

[0094] 阴阳性临界值(判定标准):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。

[0095] 实施例4 PEDV-IgA和PEDV-IgG检测试剂盒的制备与使用

[0096] 1抗原包被板的制备

[0097] 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。

[0098] 1.2包被将抗原用包被缓冲液(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1mg/mL,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3分钟,拍干。

[0099] 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3分钟。

[0100] 1.4干燥酶标板装架,37℃条件下烘干30分钟。

[0101] 1.5装袋将酶标板、干燥剂装入铝箔袋,真空后密封。

[0102] 2阳性对照的制备

[0103] 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;

[0104] 2.2免疫原的制备:取制备的重组PEDV-S1蛋白,调整蛋白含量为500μg/mL;

[0105] 2.3免疫程序:对3头猪进行颈部肌肉多点注射重组PEDV-S1蛋白各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PEDV抗体检测;

[0106] 2.4效价测定:采用中和法测定血清效价,选择PEDV中和抗体不低于1:100的猪用于阳性血清制备;

[0107] 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;

[0108] 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1:50、1:100、1:200、1:400共4个稀释度,各稀释度均用制造的试剂盒进行检测,选择PEDV-IgA抗体OD650nm值 \geq 1.1且PEDV-IgG抗体 OD650nm值 \geq 1.5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。

[0109] 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PEDV-IgA抗体 OD650nm值应在0.9~1.5之间,且PEDV-IgG抗体OD650nm值在1.2~1.8之间。

[0110] 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PEDV-IgA抗体OD650nm值在1.1~1.2之间,且PEDV-IgG抗体OD650nm值在1.5~1.6之间。

[0111] 3阴性对照的制备

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 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,PEDV-IgA抗体和 PEDV-IgG抗体OD650nm值均小于0.2。

[0116] 但是结合试剂盒的实际检测要求,优先地,阴性对照的PEDV-IgA抗体和PEDV-IgG抗体OD650nm 值均小于0.1。

[0117] 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。

[0118] 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、198.7 g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。

[0119] 6羊抗猪IgA酶标抗体的制备

[0120] 6.1来源购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

[0121] 6.2羊抗猪IgA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IgA

进行1:10,000 (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。

[0122] 7羊抗猪IgG酶标抗体的制备

[0123] 7.1来源购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

[0124] 7.2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。

[0125] 8显色液的制备与检验

[0126] 8.1来源购自北京索莱宝生物科技有限公司。

[0127] 8.2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。

[0128] 9终止液的制备与检验

[0129] 9.1来源生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0130] 9.2终止液的制备取0.05g叠氮钠加到含有100mL双蒸水的烧杯中,搅拌混匀后,0.22 μ m滤膜过滤除菌,定量分装。

[0131] 10试剂盒组装

[0132] 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	2 mL/管	5 mL/管
3	阴性对照	2 mL/管	5 mL/管
4	样品稀释液	80 mL/瓶	200 mL/瓶
[0133]	5 浓缩洗涤液	30 mL/瓶	60 mL/瓶
6	羊抗猪 IgA 酶标抗体	25 mL/瓶	60 mL/瓶
7	羊抗猪 IgG 酶标抗体	25 mL/瓶	60 mL/瓶
8	显色液	25 mL/瓶	60 mL/瓶
9	终止液	12 mL/瓶	30 mL/瓶
10	说明书	1 份	1 份

[0134] 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。

[0135] 11用法与判定

[0136] 11.1用法

[0137] 11.1.1材料的准备

[0138] 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IgA 酶标抗体、羊抗猪IgG酶标抗体、显色液、终止液。

[0139] 11.1.1.2其他材料酶标仪、移液器、定时钟、待检血清等。

[0140] 11.1.2试剂的准备

[0141] 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 $^{\circ}$ C),试剂应轻轻地旋转或震荡予以混合。

[0142] 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。

[0143] 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。

[0144] 11.1.3检验

[0145] 11.1.3.1加样

[0146] 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,同时设阳性对照和阴性对照各2孔;同样的样品、阳性对照和阴性对照在包被板的不同的位置再加一遍,其中第一遍用于检测PEDV-IgG抗体,第二遍用于检测PEDV-IgA抗体。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						N					
B	N						N					
C	P						P					
[0147] D	P						P					
E												
F												
G												
H												

[0148] (注:“P”为阳性对照;“N”为阴性对照;其余孔为待检样品;第1列为PEDV IgG抗体阴阳性对照;第7列为PEDV IgA抗体阴阳性对照,根据检测样品的数量可以调整加样位置)

[0149] 11.1.3.2孵育:置37℃温箱孵育60分钟;

[0150] 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3分钟,甩去孔内液体,拍干;

[0151] 11.1.3.4二抗孵育:对应孔中分别加入羊抗猪IgG酶标抗体和羊抗猪IgA酶标抗体,100μL/孔,置37℃温箱孵育45分钟;

[0152] 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3分钟,甩去孔内液体,拍干;

[0153] 11.1.3.6显色:加入显色液,100μL/孔,置37℃温箱避光孵育15分钟;

[0154] 11.1.3.7终止:加入终止液,50μL/孔,轻微震荡混合均匀;

[0155] 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650nm下读取OD650nm值;

[0156] 11.1.3.9S/P值计算:按照以下计算公式,计算S/P值:

$$[0157] \quad S/P值 = \frac{\text{样品 } OD_{650nm} \text{ 值} - \text{阴性对照 } OD_{650nm} \text{ 均值}}{\text{阳性对照 } OD_{650nm} \text{ 均值} - \text{阴性对照 } OD_{650nm} \text{ 均值}}$$

[0158] 11.1.3.10试验有效性断判:阳性对照孔每孔OD650nm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OD650nm读数应<0.3;

[0159] 11.1.3.11结果判定:

[0160] PEDV-IgG抗体检测结果判定: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;

[0161] PEDV-IgA抗体检测结果判定:当S/P值大于0.199时判为阳性;当S/P值小于等于0.199时判为阴性。

[0162] 12注意事项

- [0163] 12.1试剂盒应2~8℃运输及保存。
- [0164] 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。
- [0165] 12.3仔细阅读说明书。
- [0166] 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。
- [0167] 12.5不要使用过期的组分或者不同批次试剂混合使用。
- [0168] 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。
- [0169] 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。
- [0170] 12.8待检血清发生腐败时勿用于检测。
- [0171] 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。
- [0172] 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。
- [0173] 13贮藏和有效期2~8℃保存,有效期为12个月。
- [0174] 14规格(1)2块板(192孔/盒)(2)5块板(480孔/盒)。
- [0175] 实施例4 PEDV-IgA和PEDV-IgG检测试剂盒的性能评价
- [0176] 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。
- [0177] 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	PEDV-IgG 抗体检测 S/P 值			PEDV-IgA 抗体检测 S/P 值		
	190501	190503	190505	190501	190503	190505
[0178] 阳性对照 OD650	1.552	1.568	1.501	1.121	1.145	1.109
阴性对照 OD650	0.075	0.078	0.077	0.082	0.071	0.079
猪口蹄疫病毒阳性血清	0.019	-0.002	0.016	-0.007	-0.009	-0.005
猪伪狂犬病病毒阳性血清	0.009	0.011	0.013	-0.014	-0.011	-0.006
猪瘟病毒阳性血清	0.006	-0.002	0.003	-0.015	-0.016	-0.010
猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清	0.006	0.002	0.000	-0.013	-0.009	-0.005
猪圆环病毒阳性血清	0.021	0.016	0.013	0.006	0.004	0.006
[0179] 猪传染性胃肠炎病毒阳性血清	0.001	0.001	0.002	0.003	0.002	0.000
PEDV 阴性质控血清	-0.015	-0.016	-0.016	-0.011	-0.014	-0.020

[0180] 2重复性检验

[0181] 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6份临床样品进行检测,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。

PEDV-IgG 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			
1	190501	0.198	0.202	0.190	0.198	0.197	0.005	2.56%
	190502	0.187	0.180	0.197	0.179	0.185	0.008	4.43%
	190503	0.178	0.184	0.188	0.183	0.183	0.004	2.27%
	190504	0.170	0.181	0.177	0.178	0.177	0.005	2.68%
	190505	0.176	0.174	0.177	0.183	0.178	0.004	2.22%
2	190501	0.116	0.127	0.129	0.122	0.124	0.006	4.68%
	190502	0.116	0.125	0.124	0.122	0.122	0.004	3.23%
	190503	0.110	0.116	0.124	0.123	0.118	0.006	5.39%
	190504	0.110	0.120	0.115	0.117	0.116	0.004	3.42%
	190505	0.105	0.110	0.110	0.114	0.110	0.004	3.36%
3	190501	0.389	0.387	0.366	0.358	0.375	0.015	4.11%
	190502	0.387	0.382	0.381	0.382	0.383	0.003	0.70%
	190503	0.359	0.359	0.348	0.351	0.354	0.005	1.55%
	190504	0.368	0.366	0.348	0.355	0.359	0.010	2.66%
	190505	0.362	0.352	0.344	0.353	0.353	0.007	2.11%
4	190501	0.253	0.257	0.265	0.276	0.262	0.010	3.87%
	190502	0.280	0.275	0.281	0.282	0.279	0.003	1.10%
	190503	0.243	0.247	0.254	0.265	0.252	0.010	3.79%
	190504	0.228	0.236	0.229	0.242	0.234	0.007	2.89%
	190505	0.238	0.246	0.255	0.252	0.248	0.007	2.93%
5	190501	1.106	1.117	1.044	1.013	1.070	0.049	4.62%
	190502	1.177	1.148	1.163	1.121	1.152	0.024	2.10%
	190503	1.153	1.155	1.118	1.129	1.139	0.018	1.60%
	190504	1.088	1.062	1.064	1.075	1.072	0.012	1.12%
	190505	1.122	1.087	1.092	1.098	1.100	0.015	1.39%
6	190501	2.060	2.060	2.088	2.106	2.078	0.023	1.09%
	190502	2.226	2.160	2.165	2.217	2.192	0.034	1.56%
	190503	2.194	2.125	2.137	2.148	2.151	0.030	1.41%
	190504	2.075	2.097	2.109	2.093	2.094	0.014	0.68%
	190505	2.139	2.108	2.065	2.152	2.116	0.038	1.81%

[0182]

[0183]

PEDV-IgA 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			
1	190501	0.112	0.117	0.125	0.129	0.121	0.008	6.39%
	190502	0.108	0.126	0.134	0.106	0.119	0.014	11.42%
	190503	0.116	0.114	0.107	0.109	0.111	0.004	3.45%
	190504	0.117	0.119	0.115	0.110	0.115	0.004	3.22%
	190505	0.114	0.117	0.126	0.117	0.119	0.005	4.56%
2	190501	0.321	0.287	0.297	0.284	0.297	0.017	5.61%
	190502	0.341	0.341	0.321	0.322	0.332	0.011	3.37%
	190503	0.319	0.300	0.299	0.307	0.306	0.009	3.03%
	190504	0.314	0.308	0.286	0.306	0.303	0.012	4.03%
	190505	0.304	0.296	0.296	0.304	0.300	0.004	1.39%
3	190501	2.248	2.263	2.236	2.336	2.271	0.045	1.98%
	190502	2.422	2.422	2.381	2.423	2.412	0.021	0.85%
	190503	2.399	2.382	2.385	2.363	2.382	0.015	0.62%
	190504	2.292	2.300	2.280	2.252	2.281	0.021	0.92%
	190505	2.345	2.316	2.321	2.352	2.333	0.018	0.76%
4	190501	0.638	0.621	0.628	0.557	0.611	0.037	6.00%
	190502	0.698	0.680	0.706	0.695	0.695	0.011	1.55%
	190503	0.660	0.674	0.661	0.680	0.669	0.010	1.47%
	190504	0.644	0.643	0.647	0.664	0.649	0.010	1.51%
	190505	0.639	0.639	0.648	0.649	0.644	0.005	0.82%
5	190501	1.305	1.270	1.230	1.215	1.255	0.040	3.22%
	190502	1.301	1.244	1.258	1.231	1.259	0.030	2.41%
	190503	1.305	1.289	1.231	1.200	1.256	0.049	3.90%
	190504	1.323	1.211	1.205	1.216	1.239	0.056	4.56%
	190505	1.275	1.246	1.236	1.211	1.242	0.027	2.14%
6	190501	1.149	1.166	1.165	1.129	1.152	0.017	1.51%
	190502	1.171	1.147	1.158	1.171	1.162	0.012	1.01%
	190503	1.170	1.119	1.114	1.143	1.137	0.026	2.28%
	190504	1.141	1.147	1.134	1.140	1.141	0.005	0.45%
	190505	1.160	1.172	1.175	1.177	1.171	0.007	0.64%

[0185] 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6份临床样品进行检测,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,弱阳性样品、阳性样品、强阳性样品、阴性样品的变异系数均<10%,符合要求,具体数据见下表。

PEDV-IgG 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				
[0186]	1	190501	0.198	0.202	0.19	0.198	0.18	0.01	4.87%
		190502	0.187	0.18	0.197	0.179			
		190503	0.178	0.184	0.188	0.183			
		190504	0.17	0.181	0.177	0.178			
		190505	0.176	0.174	0.177	0.183			
	2	190501	0.116	0.127	0.129	0.122	0.12	0.01	5.67%
		190502	0.116	0.125	0.124	0.122			
		190503	0.11	0.116	0.124	0.123			
		190504	0.11	0.12	0.115	0.117			
	3	190505	0.105	0.11	0.11	0.114	0.36	0.01	4.05%
		190501	0.389	0.387	0.366	0.358			
		190502	0.387	0.382	0.381	0.382			
190503		0.359	0.359	0.348	0.351				
190504		0.368	0.366	0.348	0.355				
[0187]	4	190505	0.362	0.352	0.344	0.353	0.26	0.02	6.73%
		190501	0.253	0.257	0.265	0.276			
		190502	0.28	0.275	0.281	0.282			
	5	190503	0.243	0.247	0.254	0.265	1.11	0.04	3.82%
		190504	0.228	0.236	0.229	0.242			
		190505	0.238	0.246	0.255	0.252			
		190501	1.106	1.117	1.044	1.013			
		190502	1.177	1.148	1.163	1.121			
	6	190503	1.153	1.155	1.118	1.129	2.13	0.05	2.33%
		190504	1.088	1.062	1.064	1.075			
		190505	1.122	1.087	1.092	1.098			
		190501	2.06	2.06	2.088	2.106			
190502		2.226	2.16	2.165	2.217				
6	190503	2.194	2.125	2.137	2.148	2.13	0.05	2.33%	
	190504	2.075	2.097	2.109	2.093				
	190505	2.139	2.108	2.065	2.152				

		PEDV-IgA 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				
[0188]	1	190501	0.112	0.117	0.125	0.129	0.12	0.01	6.58%
		190502	0.108	0.126	0.134	0.106			
		190503	0.116	0.114	0.107	0.109			
		190504	0.117	0.119	0.115	0.11			
		190505	0.114	0.117	0.126	0.117			
	2	190501	0.321	0.287	0.297	0.284	0.31	0.02	5.25%
		190502	0.341	0.341	0.321	0.322			
		190503	0.319	0.3	0.299	0.307			
		190504	0.314	0.308	0.286	0.306			
		190505	0.304	0.296	0.296	0.304			
3	190501	2.248	2.263	2.236	2.336	2.34	0.06	2.62%	
	190502	2.422	2.422	2.381	2.423				
	190503	2.399	2.382	2.385	2.363				
	190504	2.292	2.3	2.28	2.252				
	190505	2.345	2.316	2.321	2.352				
4	190501	0.638	0.621	0.628	0.557	0.65	0.03	5.02%	
	190502	0.698	0.68	0.706	0.695				
	190503	0.66	0.674	0.661	0.68				
	190504	0.644	0.643	0.647	0.664				
	190505	0.639	0.639	0.648	0.649				
[0189]	5	190501	1.305	1.27	1.23	1.215	1.25	0.04	3.07%
		190502	1.301	1.244	1.258	1.231			
		190503	1.305	1.289	1.231	1.2			
		190504	1.323	1.211	1.205	1.216			
		190505	1.275	1.246	1.236	1.211			
	6	190501	1.149	1.166	1.165	1.129	1.15	0.02	1.65%
		190502	1.171	1.147	1.158	1.171			
		190503	1.17	1.119	1.114	1.143			
		190504	1.141	1.147	1.134	1.14			
		190505	1.16	1.172	1.175	1.177			

[0190] 3敏感性检验用1:50、1:100、1:200、1:400和1:800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	PEDV-IgA 抗体检测 S/P 值										质量标 准 (S/P 值)	
	190501		190502		190503		190504		190505			
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
[0191] 质 控 血 清	阳性对照 OD650	1.142	1.166	1.138	1.136	1.112	1.115	1.099	1.141	1.101	1.109	/
	阴性对照 OD650	0.093	0.098	0.093	0.093	0.057	0.071	0.062	0.093	0.070	0.092	/
	1:50	1.807	1.910	1.841	1.920	1.836	1.863	1.793	1.836	1.832	1.911	1.3~2.2
	1:100	1.386	1.417	1.364	1.456	1.351	1.511	1.352	1.427	1.436	1.495	1.0~1.7
	1:200	0.875	0.878	0.853	0.890	0.889	0.910	0.852	0.862	0.886	0.918	0.5~1.3
	1:400	0.476	0.517	0.488	0.521	0.487	0.496	0.479	0.498	0.476	0.511	0.3~0.8
	1:800	0.371	0.398	0.347	0.372	0.327	0.363	0.351	0.358	0.366	0.378	0.2~0.5

不同稀释 倍数 S/P 值	PEDV-IgG 抗体检测 S/P 值										质量标 准 (S/P 值)	
	190501		190502		190503		190504		190505			
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
[0192] 质 控 血 清	阳性对照 OD650	1.542	1.566	1.538	1.536	1.512	1.515	1.599	1.541	1.501	1.509	/
	阴性对照 OD650	0.093	0.098	0.093	0.093	0.057	0.071	0.062	0.093	0.070	0.092	/
	1:50	2.007	2.110	2.141	2.020	1.986	1.973	2.093	1.996	2.092	1.987	1.3~2.2
	1:100	1.526	1.487	1.504	1.576	1.571	1.671	1.582	1.597	1.636	1.595	1.0~1.7
	1:200	0.985	0.998	0.973	1.090	0.989	1.092	0.952	0.962	0.986	0.988	0.5~1.3
	1:400	0.576	0.597	0.568	0.591	0.587	0.556	0.549	0.568	0.586	0.591	0.3~0.8
	1:800	0.391	0.408	0.417	0.367	0.387	0.353	0.381	0.378	0.396	0.388	0.2~0.5

[0193] 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 IgA 酶标抗体、羊抗猪 IgG 酶标抗体各组份按现行《中国兽药典》附录进行无菌检验。结果见下表。

批号	190501	190502	190503	190504	190505
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
[0194] 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
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
羊抗猪 IgA 酶标抗体	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长

[0195] 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和奶样样本进行 PEDV-IgG 抗体和 PEDV-IgA 抗体的检测,其结果显示,本试剂盒对这两种样品都能很好的检测,具体结果见下表。

检测次数	PEDV-IgG 抗体检测 S/P 值			PEDV-IgA 抗体检测 S/P 值		
	1	2	3	1	2	3
阳性对照 OD650	1.502	1.508	1.521	1.181	1.125	1.169
阴性对照 OD650	0.085	0.077	0.069	0.062	0.067	0.059
经产母猪奶样 1	2.315	2.345	2.335	1.987	2.017	2.065
经产母猪奶样 2	2.123	2.167	2.212	1.787	1.796	1.826
[0196] 经产母猪奶样 3	2.678	2.665	2.687	1.987	2.965	2.067
7 日龄仔猪血清 1	1.567	1.612	1.598	1.194	1.153	1.214
7 日龄仔猪血清 2	1.657	1.687	1.701	1.298	1.171	1.208
7 日龄仔猪血清 3	1.678	1.724	1.698	1.118	1.078	1.187
28 日龄仔猪血清 1	1.078	1.109	1.096	0.829	0.824	0.907
28 日龄仔猪血清 2	1.106	1.125	1.134	0.617	0.645	0.651
28 日龄仔猪血清 3	1.098	1.103	1.146	0.6	0.626	0.65

[0197] 注:经产母猪都免疫了猪流行性腹泻疫苗,且仔猪为对应母猪所产。

[0198] 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及附图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。

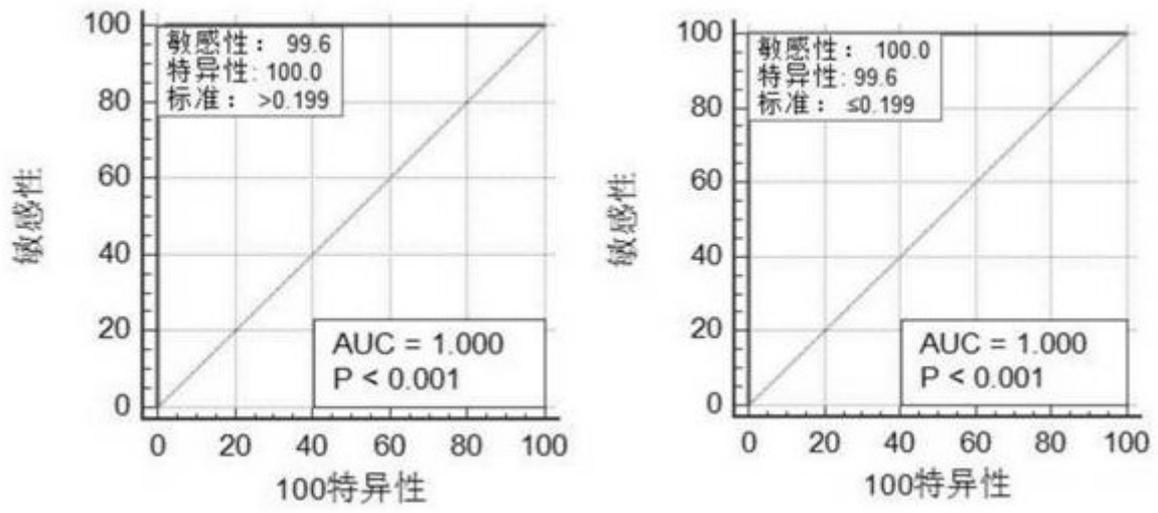


图1