



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103076447 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201210580499. 9

(22) 申请日 2012. 12. 27

(73) 专利权人 上海市疾病预防控制中心

地址 200336 上海市长宁区中山西路 1380 号

专利权人 上海疾控生物科技有限公司

(72) 发明人 蒋守富 刘静 张小萍

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
31002

代理人 王洁 郑暄

(51) Int. Cl.

G01N 33/537(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101988924 A, 2011. 03. 23,

CN 101620226 A, 2010. 01. 06,

CN 1342902 A, 2002. 04. 03,

CN 1425918 A, 2003. 06. 25,

CN 201464476 U, 2010. 05. 12,

CN 101038289 A, 2007. 09. 19,

US 4158049 A, 1979. 06. 12,

唐秋艳 等主编. 第 6 章 免疫胶体金技术. 《免疫诊断试剂实用技术》. 2009,

陈颖奇. 治疗小鼠 EAE 模型的血吸虫卵抗原有效成分的初步探寻及其验证. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2006, (第 2006 年 12 期),

陈颖奇. 治疗小鼠 EAE 模型的血吸虫卵抗原有效成分的初步探寻及其验证. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库》. 2006, (第 2006 年 12 期),

审查员 毕秀华

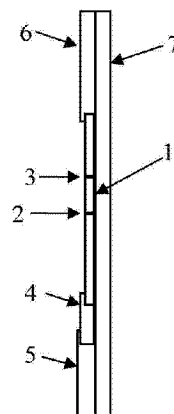
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

血吸虫虫卵粗抗原纯化方法、相关的纯化抗原和血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种血吸虫虫卵粗抗原纯化方法,采用 Sephacryl S-300HR 柱层析分离血吸虫虫卵粗抗原,去除分子量 <10kDa 组分。较佳地,最后用截留 10kDa 分子量的超滤管进一步分离纯化。收集血吸虫虫卵,加入生理盐水制成匀浆,然后超声粉碎并离心,所得上清即为血吸虫虫卵粗抗原。还提供了血吸虫虫卵纯化抗原、其应用以及血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒。本发明的血吸虫虫卵粗抗原纯化方法设计巧妙,操作简便,由此得到的纯化抗原作为血吸虫抗体检测抗原,可以减少血清用量,增加检测灵敏度,降低交叉反应率,扩大应用范围,检测效果准确可靠,操作简便易行,成本降低,更适用于血吸虫病低度流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断,适于大规模推广应用。



1. 一种血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒,其特征在于,包括血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的硝酸纤维素膜上包被有血吸虫虫卵纯化抗原作为检测物质,所述的血吸虫虫卵纯化抗原采用以下血吸虫虫卵粗抗原纯化方法制备:

采用 Sephacryl S-300HR 柱层析分离血吸虫虫卵粗抗原,去除分子量 <10kDa 组分;

最后用截留 10kDa 分子量的超滤管进一步分离纯化;

所述血吸虫虫卵粗抗原通过下述方法制备:收集血吸虫虫卵,加入生理盐水制成匀浆并超声粉碎,4℃冷浸 3 天后离心,所得上清即为所述血吸虫虫卵粗抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒,其特征在于,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的硝酸纤维素膜上包被所述的血吸虫虫卵纯化抗原免疫家兔获得的抗体作为质控物质。

3. 根据权利要求 2 所述的血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒,其特征在于,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的金标垫上具有胶体金标记的所述的血吸虫虫卵纯化抗原。

4. 根据权利要求 3 所述的血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒,其特征在于,所述的胶体金标记的所述的血吸虫虫卵纯化抗原在吸附至所述金标垫上之前保存在金标保存液中,所述金标保存液的配方为:0.01mol/L pH8.0PB,1% BSA,0.2% PEG20000,0.01%迭氮钠,其余是蒸馏水。

5. 根据权利要求 3 所述的血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒,其特征在于,所述的胶体金标记的所述的血吸虫虫卵纯化抗原在吸附至所述金标垫上之时采用金标稀释剂稀释,所述金标稀释剂的配方为:0.01mol/L pH8.0PB,1.6% NaCl,0.01% 土温-20,20% 蔗糖,1% BSA,0.01%迭氮钠,其余是蒸馏水。

6. 根据权利要求 1 所述的血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒,其特征在于,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒还包括样品缓冲液,所述样品缓冲液的配方为:0.02mol/L pH8.0PB,1% BSA,0.05% PEG20000,0.02%迭氮钠,其余是蒸馏水。

血吸虫虫卵粗抗原纯化方法、相关的纯化抗原和血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白纯化和检测技术领域，特别涉及抗原纯化和抗体检测技术领域，具体是指一种血吸虫虫卵粗抗原纯化方法、相关的纯化抗原和血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒。

背景技术

[0002] 血吸虫病免疫学诊断方法是较可靠的辅助诊断方法，也是流行病学调查最常用的工具。在血吸虫病免疫学诊断方法中，目前常用的有酶联免疫法、间接血凝法、胶体染料试纸条法、胶体金斑点免疫渗滤法。虽然这些方法各有利弊，但在血吸虫病检测的敏感性和特异性方面没有明显区别，都纳入了中华人民共和国卫生行业标准—血吸虫病诊断标准（WS261-2006）。胶体金免疫层析试纸条是备受世界卫生组织推崇的“高技术制备，低技术应用”的免疫学诊断方法，其优势在于操作简便、反应快速，不需任何专门设备，不需工作人员特殊培训，既可用于血清流行病学调查，又能作为单份检测个别病例的免疫学诊断工具。

[0003] 但是，目前我国应用效果较好的几种血吸虫病免疫诊断试剂盒，不仅胶体金免疫层析试纸条，而且包括酶联免疫法、间接血凝法、渗滤法等，均将血吸虫虫卵粗抗原（SEA）作为检测用抗原，以检测血清中特异性抗体。这就不可避免的与其他寄生虫病如并殖吸虫病和华支睾吸虫病等存在着不同程度的交叉反应。原因在于 SEA 组分复杂，且与其它虫种存在一定的交叉抗原，其诊断效能受到较大限制。其次，在血吸虫病免疫学诊断方法中，与 ELISA 比较，胶体金免疫层析试纸条敏感性较低，受检的血清量较大（50 ~ 100 μ l）等缺陷依然存在，受检者需静脉抽血，增加疼痛和心理压力，依从度降低，不便于现场工作人员采样，使其现场大规模应用受到限制。再次，这些试剂盒适用对象单一，只针对人或者动物，增加现场流行病学调查成本和工作强度。

[0004] 因此，需要提供一种具有血清用量少，交叉反应低，应用范围广等特点，更适用于血吸虫病低度流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断的快速检测方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服了上述现有技术中的缺点，提供一种血吸虫虫卵粗抗原纯化方法、相关的纯化抗原和血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒，该血吸虫虫卵粗抗原纯化方法设计巧妙，操作简便，由此得到的纯化抗原作为血吸虫抗体检测抗原，可以减少血清用量，增加检测灵敏度，降低交叉反应率，扩大应用范围，检测效果准确可靠，操作简便易行，成本降低，更适用于血吸虫病低度流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断，适于大规模推广应用。

[0006] 为了实现上述目的，在本发明的第一方面，提供了一种血吸虫虫卵粗抗原纯化方法，其特点是，采用 Sephacryl S-300HR 柱层析分离血吸虫虫卵粗抗原，去除分子量 <10kDa 组分。

[0007] 较佳地,最后用截留 10kDa 分子量的超滤管进一步分离纯化。

[0008] 所述血吸虫虫卵粗抗原实际上是指破碎的血吸虫虫卵浸出物。较佳地,所述血吸虫虫卵粗抗原通过下述方法制备:从病兔肝收集分离血吸虫虫卵,加入生理盐水制成匀浆并超声粉碎,4℃冷浸 3 天后离心,所得上清即为所述血吸虫虫卵粗抗原。

[0009] 在本发明的第二方面,提供了一种血吸虫虫卵纯化抗原,其特点是,采用上述的血吸虫虫卵粗抗原纯化方法制备而成。

[0010] 在本发明的第三方面,提供了上述的血吸虫虫卵纯化抗原在制备检测血吸虫抗体的检测产品中的应用。

[0011] 在本发明的第四方面,提供了一种血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒,其特点是,包括血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的硝酸纤维素膜上包被有上述的血吸虫虫卵纯化抗原作为检测物质。

[0012] 较佳地,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的硝酸纤维素膜上包被有上述的血吸虫虫卵纯化抗原免疫家兔获得的抗体作为质控物质。

[0013] 较佳地,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的金标垫上具有胶体金标记的上述的血吸虫虫卵纯化抗原。

[0014] 更佳地,所述金标垫采用聚酯膜作为吸附材料,所述聚酯膜预先采用 0.1%Triton-100 溶液浸泡 10min 作亲水处理。

[0015] 更佳地,所述的胶体金标记的上述的血吸虫虫卵纯化抗原在吸附至所述金标垫上之前保存在金标保存液中,所述金标保存液的配方为:0.01mol/L pH8.0PB,1%BSA,0.2%PEG20000,0.01%迭氮钠,其余是蒸馏水。

[0016] 更佳地,所述的胶体金标记的上述的血吸虫虫卵纯化抗原在吸附至所述金标垫上之时采用金标稀释剂稀释,所述金标稀释剂的配方为:0.01mol/L pH8.0PB,1.6%NaCl,0.01%土温-20,20%蔗糖,1%BSA,0.01%迭氮钠,其余是蒸馏水。

[0017] 较佳地,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒还包括样品缓冲液,所述样品缓冲液的配方为:0.02mol/L pH8.0PB,1%BSA,0.05%PEG20000,0.02%迭氮钠,其余是蒸馏水。

[0018] 本发明的有益效果具体在于:

[0019] 1、本发明的血吸虫虫卵粗抗原纯化方法采用 Sephacryl S-300HR 柱层析分离血吸虫虫卵粗抗原,去除分子量 <10kDa 组分,以之为血吸虫抗体检测抗原,可以减少血清用量,增加检测灵敏度,降低交叉反应率,扩大应用范围,检测效果准确可靠,操作简便易行,成本降低,更适用于血吸虫病低度流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断,适于大规模推广应用。

[0020] 2、本发明的血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒包括血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡,所述血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的硝酸纤维素膜上包被有上述的血吸虫虫卵纯化抗原作为检测物质,可以减少血清用量,增加检测灵敏度,降低交叉反应率,扩大应用范围,检测效果准确可靠,操作简便易行,成本降低,更适用于血吸虫病低度流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断,适于大规模推广应用。

附图说明

[0021] 图 1 是本发明的血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的一具体实施例的侧视示意

图,其中 1 为硝酸纤维素膜;2 为 T 线;3 为 C 线;4 为金标垫;5 为样品垫;6 为吸水纸;7 为底板。

[0022] 图 2 是图 1 所示的具体实施例的俯视示意图,其中 1 为硝酸纤维素膜;2 为 T 线;3 为 C 线;4 为金标垫;5 为样品垫;6 为吸水纸。

[0023] 图 3 是采用图 1 所示的具体实施例对最低阳性检出参考品(P16)测试结果,其中左起依次为 P16 原液、P16 原液的 1:4 的稀释液、P16 原液的 1:8 的稀释液、P16 原液的 1:16 的稀释液、P16 原液的 1:32 的稀释液、阴性参照。

具体实施方式

[0024] 为了能够更清楚地理解本发明的技术内容,特举以下实施例详细说明。

[0025] 请参见图 1~图 2 所示,本发明的血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的硝酸纤维素膜(NC 膜)上包被有血吸虫虫卵纯化抗原作为检测线即 T 线。

[0026] 首先制备血吸虫虫卵粗抗原(可溶性 SEA):取经皮接种 1500 条日本血吸虫尾蚴 45d 的家兔肝脏,按文献(毛守白. 血吸虫生物学与血吸虫病的防治 [M]. 北京:人民卫生出版社,1990:465.)方法收集分离虫卵,依次经 200 孔/25.4mm 和 300 孔/25.4mm 尼龙绢过滤,收集滤渣,即为较纯净的血吸虫虫卵。然后加入 10 倍量的生理盐水,置玻璃匀浆器内制成匀浆,用超声粉碎机超声处理(1min,10 次),液氮冻融 3 次,4℃冷浸 3 天后,以 10000r/min 离心 30min,上清液即为 SEA,用分光光度计测定蛋白含量,分装后-20℃冻存备用。

[0027] 其次,血吸虫虫卵粗抗原纯化:本发明采用 Sephacryl S-300HR 柱层析分离 SEA 抗原,去除分子量<10kDa 组分,并将蛋白液置截留 10kDa 分子量的超滤管内进一步分离纯化,保留具有特异性反应活性的抗原蛋白组分,去除引起交叉反应的蛋白组分。

[0028] 具体操作:将烯丙基葡聚糖凝胶 S-300HR 预装柱装载于 BioLogic LP 纯化仪,用 0.05mol/LPBS 充分平衡,取 SEA2ml,加 2ml PBS,经 0.45 μm 滤膜过滤后上样。流速定为 1ml/min,由纯化仪自动控制,并按分子量大小依次收集>10kDa 蛋白组分蛋白液。收集完毕后,将蛋白液置截留 10kDa 分子量的超滤管内脱盐浓缩,用分光光度法测试蛋白浓度后分装保存于-20℃备用。

[0029] 检测线(T 线)的组成:本发明以 SEA 纯化抗原作为检测线主要成分,包被液为 0.01mol/LpH7.2 磷酸盐(PB)缓冲液,最佳包被浓度为 0.8mg/ml。主要作用是提高检测的特异性。其原理为:当胶体金标记的 SEA 抗原与受检血清中相应抗体结合成复合物,经层析方式通过 T 线时,与包被的 SEA 结合,形成胶体金 SEA 抗原-特异性抗体-SEA 结合物,胶体金滞留在 T 线上,产生红色条带。而由于 T 线上包被的是纯化抗原,若受检血清中只有其他抗体或交叉反应性抗体等,即使沾染上胶体金 SEA 抗原,在通过 T 线时,都不会与纯化抗原结合而滞留,不会形成红色反应带。

[0030] 划线(T 线):本发明采用 XYZ3050 三维喷点系统以非接触方式作喷点式划线,避免在操作时对膜造成的物理损伤,与通常试纸条接触式划线比较,可避免非特异性抗体在 T 线滞留而产生假阳性反应,提高检测的特异性。具体操作:将 2.25cm 宽硝酸纤维素膜(NC 膜,型号 M135)粘在 PVC 底板上,以 0.8mg/ml 纯化 SEA 作为检测线(T 线)溶液,用三维喷点系统以 1 μl/cm 的速率在硝酸纤维素膜上面进行划线,线距为距硝酸纤维素膜下端 1cm,37℃烘干 10min。本发明线距较通常试纸条延长 2~3mm,有助于抗体与金标垫释放的

SEA 抗原充分结合,以提高检测的灵敏度。

[0031] 请参见图 1 ~ 图 2 所示,本发明的血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的硝酸纤维素膜上包被有上述的血吸虫虫卵纯化抗原免疫家兔获得的抗体作为质控线即 C 线。

[0032] 抗 SEA 抗体制备:按常规方法用纯化 SEA 免疫 2 只新西兰白兔,加强免疫 4 次剖杀采血,收集分离血清,用辛酸-硫酸铵盐析法纯化抗体,然后用截留 100kDa 分子量的超滤管脱盐浓缩 3 次,测定蛋白浓度后分装保存于 -20℃ 备用。本发明采用超滤管脱盐,效率高,耗时短,只需 1 小时就可完成,并且还可使抗体得到浓缩。而常规方法需时 2 天,对抗体活性保持构成负面影响。

[0033] 具体操作:将盐析法纯化的抗体溶液分置截留 100kDa 分子量的超滤管内,每管容积 15ml,5000g 离心 15min,然后倒掉滤过液,在截留管内加 0.01mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液,再同法离心,如此重复 3 次后,截留管内未滤出液即为已脱盐并浓缩的纯化抗体,用分光光度法测试蛋白浓度后分装保存于 -20℃ 备用。

[0034] 划线(C线):本发明将抗 SEA 抗体作为质控线(C线),包被液为 0.01mol/L pH7.2 PB 缓冲液添加终浓度为 3% 甲醇组成,最佳包被浓度为 5mg / ml。添加少量甲醇的目的是增强抗体在硝酸纤维素膜上面的吸附力。也采用非接触方式作喷点式划线,线距为 T 线上方 5mm 处。具体操作同 3.。

[0035] 请参见图 1 ~ 图 2 所示,本发明的血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡的金标垫上具有胶体金标记的上述的血吸虫虫卵纯化抗原。

[0036] 胶体金标记 SEA 抗原:本发明采用胶体金直接标记 SEA 抗原,可以提高层析卡检测灵敏度。因为受检血清只要存在抗血吸虫特异性抗体,无论是 IgG 或 IgM 甚至 IgA 抗体,都可与 SEA 抗原结合,相比一般试纸条标记的是第二抗体,如抗人 IgG,只能与人的 IgG 抗体结合;或者也有标记 A 蛋白的,可以与人或动物的 IgG 结合,但不能结合其它抗体,本发明的灵敏度大为提高。再者,由于直接检测抗 SEA 抗体,无论是人还是动物,只要体内存在相应抗体,就可直接在层析卡 T 线显示红色条,扩大了应用范围,减少现场流行病学调查成本和工作强度。

[0037] 具体操作:采用柠檬酸三钠还原法制备直径为 35nm 的胶体金颗粒。即:取 1% 氯金酸 5ml 溶于 495ml dH₂O,加热至 100℃,快速加入 1% 柠檬酸三钠 5ml,加热煮沸 10min,溶液颜色由黑逐渐变为紫红色。冷却后用 0.1mol/L 碳酸钾调溶液 pH 至 8.0。按最适蛋白稳定量为 20 μg / ml 计算,在 500ml 胶体金溶液内加入 10mg SEA,磁力搅拌 30min,加入 5%BSA100ml,继续搅拌 5min,10000r/min 离心 30min,沉淀物加入适量金标保存液调节浓度为 250D 值(529nm 波长),4℃ 保存备用。

[0038] 聚酯膜处理:聚酯膜是金标垫的吸附材料,本发明所用聚酯膜型号为 6613,属疏水性,因此,须作亲水处理。处理所用表面活性剂的种类、浓度和作用时间等对于金标结合物的吸附、释放至关重要,吸附过强、释放过快均不利于金标结合物与抗体的结合,导致检测灵敏度降低。经摸索比较,本发明选择 Triton-100 为处理剂,浓度为 0.1%。

[0039] 具体操作:将聚酯膜裁减成 0.8×30cm 大小,浸于 0.1%Triton-100 溶液中 10min,取出后将剩余液体吸掉,置 42℃ 烘干 2h,室温保存备用。

[0040] 本发明的胶体金标记的上述的血吸虫虫卵纯化抗原在吸附至所述金标垫上之前保存在金标保存液中,所述金标保存液的配方为:0.01mol/L pH8.0PB,1%BSA,

0.2%PEG20000,0.01%迭氮钠(N_3Na),其余是蒸馏水。白蛋白(BSA)和聚乙二醇(PEG)20000均为保护剂,稳定胶体金状态。本发明提高BSA的浓度,除了稳定作用外,还具有封闭非特异性位点作用,降低非特异性反应。

[0041] 本发明的胶体金标记的上述的血吸虫虫卵纯化抗原在吸附至所述金标垫上之时采用金标稀释剂稀释,所述金标稀释剂的配方为:0.01mol/L pH8.0PB,1.6%NaCl,0.01%土温-20,20%蔗糖,1%BSA,0.01%迭氮钠,其余是蒸馏水。金标稀释剂配方中是否用表面活性剂以及所用种类和浓度等对于金标结合物的释放至关重要,释放过快不利于金标结合物与抗体的结合,浓度过高还会引发胶体金变性导致出现死金现象,导致检测灵敏度降低。经摸索比较,本发明选择土温-20,终浓度为0.01%。在配方中还有一个重要化合物,即蔗糖,对胶体金结合物起到稳定作用,可以延长使用期限,而且,如果不加蔗糖,甚至连反应带无法显色。本发明经多次反复探索比较,选择20%蔗糖溶液为最适浓度。

[0042] 金标垫制备方法:本发明将胶体金标记物用金标稀释液按1:1稀释,浸于 $0.8 \times 30\text{cm}$ 大小已处理的聚酯膜10min,置 42°C 烘干6h,放入铝箔袋中,室温保存备用。

[0043] 本发明的血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒还包括样品缓冲液,所述样品缓冲液的配方为:0.02mol/L pH8.0PB,1%BSA,0.05%PEG20000,0.02%迭氮钠,其余是蒸馏水。样品缓冲液组成成分及pH高低对反应条带的显色程度以及灵敏度均有影响。本发明较高浓度的BSA和较高pH值的Tris碱缓冲液(TBS),一方面对已包被的硝酸纤维素膜进行封闭,另一方面增强了反应带显色程度,提高了检测灵敏度。

[0044] 本发明层析卡制备过程:本发明在对层析卡组成关键要素进行发明和改进的基础上,将各要素按序装配成可作即时检测的层析卡。具体步骤为:将2.25cm宽硝酸纤维素膜条粘在PVC底板上,以0.01mol/L pH7.2PB缓冲液将SEA纯化抗原稀释成0.8mg/ml浓度,作为检测线(T线),以0.01mol/L pH7.2PB缓冲液添加3%甲醇,稀释抗SEA抗体至5mg/ml浓度作为质控线(C线),用三维喷点系统以非接触方式按 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 的速率在硝酸纤维素膜上面作喷点式划线, 37°C 烘干10min。然后,按图1和图2示,在包被好的硝酸纤维素膜上方粘上吸水纸垫,下方依次粘上金标结合垫和样品垫,用自动切条机分切成3mm宽度试纸条,装入塑料卡盒中,与干燥剂一起装入铝箔袋内密封,置室温保存备用。

[0045] 本发明层析卡使用方法:非常简便,即在加样孔内加 $5\mu\text{l}$ 受检血清,然后加1滴样品缓冲液,20min时即可判断结果。T线和C线均出现为阳性,无T线为阴性结果。

[0046] 血清加样量减少:在上述最佳反应体系的基础上,本发明将血清用量减至 $5\mu\text{l}$,为目前血吸虫病检测试纸条最少用量。此举便于现场工作人员采样,只需用三菱针在耳垂或指末采集 $10 \sim 15\mu\text{l}$ 血液至采血管,静置15min吸取血清即可进行检测。受检者无需静脉抽血,减少了疼痛和心理压力,更容易接受和配合操作。

[0047] 一、SEA纯化前后的检测效果比较

[0048] 本发明SEA经Sephacryl S-300HR柱层析纯化后检测灵敏度没有降低,与纯化前SEA一样均达到1:32,超过国家参考品对试纸条最低检出值1:4的8倍;并且纯化SEA的交叉反应率较纯化前明显降低,两者对其它寄生虫病的交叉反应率分别为2.1%和16.7%,其中对并殖吸虫病分别为5.6%和33.3%,均具有统计学意义($P < 0.05$);此外,纯化抗原的特异性也较粗抗原明显提高(表1)。

[0049] 表1SEA粗抗原与纯化抗原血吸虫抗体检测结果比较

[0050] Table1Comparison of results of antibody to schistosomiasis with SEA purified or not in GICA

[0051]

组别 Group	SEA 粗抗原 No purified SEA			SEA 纯化抗原 Purified SEA		
	例数 Cases	阳性数 No. positive	阳性率 (%) Positive rate(%)	例数 Cases	阳性数 No. positive	阳性率 (%) Positive rate(%)
最低检出值 (1:32) Lowest positive reference sera	10	9	90.0	10	10	100.0
血吸虫病人 Patients with Schistosomiasis	50	49	98.0	50	49	98.0
并殖吸虫病人 Patients with Paragonimiasis	18	6	33.3	18	1	5.6
华支睾吸虫病人 Patients with Clonorchiasis sinensis	20	2	10.0	20	0	0
囊虫病人 Patients with cysticercosis	10	0	0	10	0	0
健康人群 Control population	50	5	10.0	50	1	2.0

[0052] 二、最适试验条件验证

[0053] 本发明根据最适条件组成的层析卡经血吸虫病抗体诊断试剂国家参考品(批准号:(2005)国生参字 014 号)的测试结果验证,30 份阴阳性参考品的检测符合率均为 100%,精密度测试 10 次均为阳性,灵敏度为 1:32,超过国家参考品对试纸条最低检出值 8 倍(图 3、表 2)。

[0054] 表 2 层析卡(GICA)对国家参考品的测试结果

[0055] Table2Results ofdetecting the national reference sera to schistosome antibody by GICA

[0056]

参考品 Reference sera	例数 Cases	阴性数 No. negative	阳性数 No. positive	符合率(%) Coincident rate
阴性参考品 Negative reference sera	15	15	0	100
阳性参考品 Positive reference sera	15	0	15	100
灵敏度参考品 Detectable minimum reference sera	6(1-1:64)	1(1:64)	5(1-1:32)	
精密度参考品 Precision reference sera	10	0	10	100

[0057] 三、稳定性

[0058] 本发明层析卡置于 37℃ 恒温箱内 60 日, 每 15 日测试 15 份血吸虫抗体阳性血清和 10 份正常人血清, 敏感性和特异性均达到 100%, 除 C 线色度在 60 日时略有变淡, T 线阳性反应的强度未见减弱。层析卡置于室温 6 个月, 测试同样血清, 效果未改变。按照 37℃ 恒温箱内 1 日相当于 4 ~ 10℃ 1.5 个月计算, 层析卡置于室温保存 1 年有效性不会改变, 若置 4 ~ 10℃ 保存则有效期将更久。

[0059] 四、实验室检测

[0060] 本发明对粪检确诊的血吸虫病人血清的阳性检出率(敏感性)为 93.7%(163/174), 尤其对 EPG<25 的低感染度血清检出率超过 90%; 对健康人群的检测特异性为 97.1%(165/170), Youden 指数为 0.91。交叉反应结果显示, 除与并殖吸虫病人血清有 5.6% 的交叉反应率, 其他受检的寄生虫病人血清均无交叉反应(表 3)。

[0061] 表 3 层析卡(GICA)对寄生虫病患者和健康对照者血吸虫抗体检测结果

[0062] Table 3 Results of antibody to schistosomiasis in patients with parasitic diseases and control population by GICA

组别 Group	例数 Cases	阳性例数 No. positive	阳性率 Positive rate (%)
血吸虫病人 (EPG >25)	71	69	97.2
Patients with Schistosomiasis			
血吸虫病人 (EPG <25) Patients with Schistosomiasis	103	94	91.3
健康人群 Control population	170	5	2.9
并殖吸虫病人 Patients with Paragonimiasis	18	1	5.6
华支睾吸虫病人 Patients with Clonorchiasis sinensis	20	0	0
囊虫病人 Patients with cysticercosis	10	0	0

[0065] 五、现场检测

[0066] 本发明层析卡(GICA)与 ELISA (采用深圳康百得生物有限公司试剂盒,该产品曾获得全国血吸虫抗体检测试剂盒第一名)平行检测外来流动人口血吸虫抗体,两者均阳性为 35 例,均阴性为 457 例,总符合率为 96.1% (487 / 507), Kappa 值为 0.81,显示两者具有良好的 consistency (表 4)。

[0067] 表 4 层析卡(GICA)与 ELISA 对流动人口血吸虫抗体平行检测结果

[0068] Table 4 Results of antibody to schistosomiasis in floating population by GICA and ELISA

GICA	ELISA		合计 Total
	+	-	
+	35	5	40
-	10	457	467
合计 Total	45	462	507

[0070] 总之,本发明的血吸虫抗体检测胶体金免疫层析卡具有血清用量少,交叉反应低,应用范围广,保存时间久等特点,更适用于血吸虫病低度流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断。

[0071] 综上,本发明的血吸虫虫卵粗抗原纯化方法设计巧妙,操作简便,由此得到的纯化抗原作为血吸虫抗体检测抗原,可以减少血清用量,增加检测灵敏度,降低交叉反应率,扩大应用范围,检测结果准确可靠,操作简便易行,成本降低,更适用于血吸虫病低度流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断,适于大规模推广应用。

[0072] 在此说明书中,本发明已参照其特定的实施例作了描述。但是,很显然仍可以作出各种修改和变换而不背离本发明的精神和范围。因此,说明书和附图应被认为是说明性的而非限制性的。

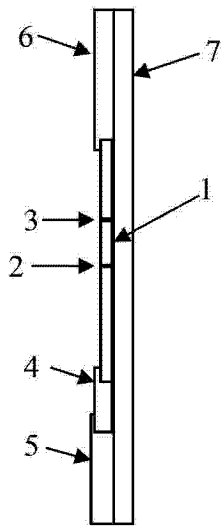


图 1

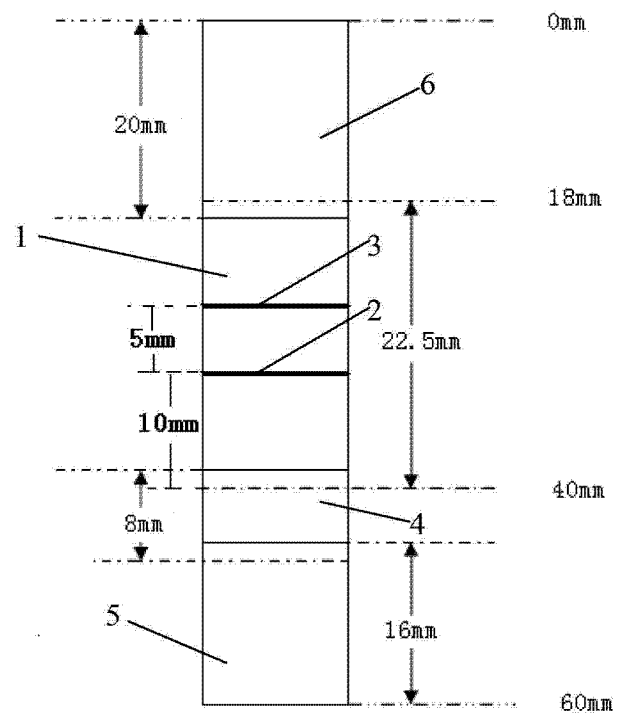


图 2



图 3

专利名称(译)	血吸虫虫卵粗抗原纯化方法、相关的纯化抗原和血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN103076447B	公开(公告)日	2015-04-08
申请号	CN201210580499.9	申请日	2012-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	上海市疾病预防控制中心 上海疾控生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海市疾病预防控制中心 上海疾控生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海市疾病预防控制中心 上海疾控生物科技有限公司		
[标]发明人	蒋守富 刘静 张小萍		
发明人	蒋守富 刘静 张小萍		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	王洁 郑暄		
其他公开文献	CN103076447A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种血吸虫虫卵粗抗原纯化方法，采用Sephacryl S-300HR柱层析分离血吸虫虫卵粗抗原，去除分子量<10kDa组分。较佳地，最后用截留10kDa分子量的超滤管进一步分离纯化。收集血吸虫虫卵，加入生理盐水制成匀浆，然后超声粉碎并离心，所得上清即为血吸虫虫卵粗抗原。还提供了血吸虫虫卵纯化抗原、其应用以及血吸虫抗体检测胶体金免疫试剂盒。本发明的血吸虫虫卵粗抗原纯化方法设计巧妙，操作简便，由此得到的纯化抗原作为血吸虫抗体检测抗原，可以减少血清用量，增加检测灵敏度，降低交叉反应率，扩大应用范围，检测效果准确可靠，操作简便易行，成本降低，更适用于血吸虫病低度流行区现场流行病学调查、疾病筛查以及免疫学诊断，适于大规模推广应用。

