

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610157651.7

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)

[43] 公开日 2008年6月25日

[11] 公开号 CN 101206222A

[22] 申请日 2006.12.18

[21] 申请号 200610157651.7

[71] 申请人 深圳市康百得生物科技有限公司

地址 518054 广东省深圳市南山区南油天安
工业区 8 栋 2D

[72] 发明人 杜宜峰

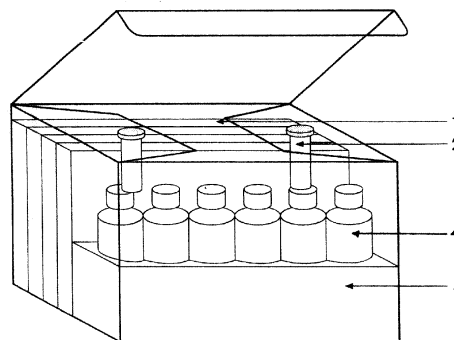
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称

食源性寄生虫病快速酶免疫检测方法及检测盒

[57] 摘要

本发明公开了一种食源性寄生虫病快速酶免疫检测方法及多孔检测盒，酶免疫检测用试剂包括抗原包被板 A、酶结合物液 B、洗涤液 C、底物 D、显色剂 E、样品稀释液 F、终止剂 G、阳性对照品 H 及阴性对照品 I，检测过程使用多孔检测盒，检测过程包括：样本稀释、加样反应、加酶反应和显色反应，抗原包被板 A 采用快速包被工艺，预先在通用聚苯乙烯微孔板上包被抗原，酶结合物 B 液添加分子量 Mr 为 20000、6000 的两种聚乙二醇，解决了现有检测方法操作时间长、操作烦琐、试剂不稳定和配套不完整等问题，具有速度快、操作方便、可靠性高和检测效果好等优点，用于猪囊虫、肺吸虫、肝吸虫和旋毛虫病的酶免疫检测。



1、一种食源性寄生虫病快速酶免疫检测方法，用于猪囊虫、肺吸虫、肝吸虫和旋毛虫病的酶免疫检测，其特征在于：酶免疫检测用试剂包括抗原包被板 A、酶结合物液 B、洗涤液 C、底物 D、显色剂 E、样品稀释液 F、终止剂 G、阳性对照品 H 及阴性对照品 I，检测过程使用多孔检测盒，具体过程包括：

(1) 样本稀释：用样品稀释液 F 将待检血清按体积比 1:50 稀释，阴阳性对照血清同比例同步稀释，然后

(2) 加样反应：每孔加已稀释血清 100 μ l，同时设阴性、阳性及空白对照各一孔，空白对照孔加入 100 μ l 样品稀释液 F，37 $^{\circ}$ C 静置 10 分钟，甩去，每孔加洗涤液 C 一滴，立即用蒸馏水洗涤多次，甩去，拍干，再

(3) 加酶反应：加酶结合物 B 二滴，37 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟，甩去，加洗涤液 C 一滴，立即用蒸馏水反复洗涤多次，甩去，拍干，最后

(4) 显色反应：加底物 D 和显色剂 E 各一滴，混匀，室温下放置 2-3 分钟，待阴性对照孔微呈蓝色时，加终止剂 G 一滴混匀，终止反应，肉眼观察浅于近于阴性对照为阴性，呈明显深于阴性对照的蓝色为阳性，用仪器判断：以空白对照调零于 630nm 读取 O.D 值，待检孔 O.D 值大于阴性对照 2.1 倍者为阳性，当阴性对照 O.D 值低于 0.07 时按 0.07 计算。

2、根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于：抗原包被板 A 采用快速包被工艺，预先在通用聚苯乙烯微孔板上包被抗原，包被液为含抗原的碳酸盐缓冲液（由碳酸氢钠与碳酸钠组成，PH9.60，0.05M），室温静止 12 小时，用 1%牛血清白蛋白封闭 2 小时，冷冻真空干燥，真空装袋封口。

3、根据权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于：酶结合物 B 液磷酸盐缓冲液（由磷酸二氢钠与磷酸氢二钠组成，PH7.0，0.05M），添加稳定剂分子量 Mr 为 20000 的聚乙二醇重量 0.5%-5%，同时添加加速剂分子量 Mr 为 6000 的聚乙二醇重量 0.5%-5%，加万分之一硫柳汞以及四种寄生虫病统一的抗人免疫球蛋白 G 辣根过氧化物酶标记结合物。

4、权利要求 1 的检测方法所使用的多孔检测盒，其特征在于：多孔检测盒是一种可以扣合的四合一化的试剂盒，盒内分为两个区，一个区放置多种寄生虫抗原预包被板，共多块紧邻液体试剂瓶，另一区设置一个开孔纸托或塑料基托立式并行放置多种通用的液体试剂瓶，试剂盒上方有开口，内侧盖上各有一个孔，分别插放阴性和阳性对照血清。

食源性寄生虫病快速酶免疫检测

方法及检测盒

技术领域 本发明涉及一种食源性寄生虫病快速酶免疫检测方法
及检测盒。

背景技术 众所周知，食源性寄生虫病（FOOD SOURCE PARASITE DISEASES）是一组可以通过食物传播的常见寄生虫病，主要包括猪囊虫、肺吸虫、肝吸虫、旋毛虫四种寄生虫病。它们可以感染人体以及家畜，严重损害人类健康并造成畜牧业的经济损失。其中，猪囊虫可以引起癫痫、瘫痪、失明；肺吸虫可以导致肺囊肿、肺脓肿；肝吸虫可以引起胆道感染、胆结石、肝硬化；旋毛虫则可以引起严重的过敏反应及心脏损害。食源性寄生虫流行广泛，仅在中国广东省肝吸虫流行区人口就达到 3000 万以上。更值得注意的是，食源性寄生虫病的起病隐匿，症状不典型，易与其它疾病混淆，加之目前临床缺乏可靠实用的检测方法，因此，常常被漏诊误诊而贻误病情。

目前，食源性寄生虫病的检测方法有两大类：一类是传统检测方法，即查找病原体，由于这四种寄生虫多寄生在深部组织内，如脑部、眼球、肝脏胆道、肺部、骨骼肌、心肌等脏器，要通过外科手段采集虫体，不仅损伤甚大而且往往虫体分布散在常难以检获。另外旋毛虫、

猪囊虫不排虫卵，肺吸虫排卵很少甚至不排卵；肝吸虫虽可以随粪便排卵，但卵体积微小且排卵不规律，难以检出，临床上常用的粪便涂片法敏感度一般低于 50%。因此，无论查虫卵或虫体都不是诊断该组寄生虫病的有效手段；另外一类就是近年来出现的常规酶免疫法等，但这类方法普遍存在以下不足：1、操作时间长：时间多在长达 2—4 小时以上，难以适应现场与临床门诊的快速诊断需要；2、试剂操作烦琐：如酶结合物和底物液要临时配制，抗原需要过夜包被，样本稀释液体以及终止液体都需要用户自行配制，在应用中给用户带来了诸多不便；3、不稳定：所提供的试剂稳定性不佳，一旦配制必须在 1 周内甚至 1 天内用完，造成经济损失，也影响了检测的可靠性；4、配套不完整：迄今，在市场上尚未见到同时提供方法统一的四种食源性寄生虫成套试剂盒，所有试剂盒都只能测定一种寄生虫病。目前，所见到的供应单位供应品种不齐全，仅供应其中一种或两种，如中国某地一家公司仅提供囊虫检测试剂，同地区另一研究所则仅提供旋毛虫检测试剂。厂家的不同，方法的区别，性能的差异，不仅影响可操作性，更影响到结果的一致性和有效性，容易造成误诊或漏诊，成为食源性寄生虫病防治中一大隐患；5 安全隐患：常规酶免疫方法常使用具有致畸性作用的 OPD 作为显色剂，并用强腐蚀性的硫酸作为终止液，对操作人员和环境构成威胁。综上所述，现有的检测技术不能有效满足食源性寄生虫病的诊断需要，不利于疾病的诊断治疗和预防控制。

发明内容 本发明的目的在于提供食源性寄生虫病快速酶免疫检测方法及与本方法配套用的成套检测盒。

为了达到上述目的,本发明提供了如下的技术方案:一种食源性寄生虫病快速酶免疫检测方法,用于猪囊虫、肺吸虫、肝吸虫和旋毛虫的酶免疫检测,该方法的酶免疫检测用试剂包括抗原包被板 A、酶结合物液 B、洗涤液 C、底物 D、显色剂 E、样品稀释液 F、终止剂 G、阳性对照品 H 及阴性对照品 I,检测过程使用多孔检测盒,具体过程包括:(1) 样本稀释:用样品稀释液 F 将待检血清按体积比 1:50 稀释,阴阳性对照血清同比例同步稀释,然后(2) 加样反应:每孔加已稀释血清 100 μ l,同时设阴性、阳性及空白对照各一孔,空白对照孔加入 100 μ l 样品稀释液 F,37 $^{\circ}$ C 静置 10 分钟,甩去,每孔加洗涤液 C 一滴,立即用蒸馏水洗涤多次,甩去,拍干,再(3) 加酶反应:加酶结合物 B 二滴,37 $^{\circ}$ C 反应 10 分钟,甩去,加洗涤液 C 一滴,立即用蒸馏水反复洗涤多次,甩去,拍干,最后(4) 显色反应:加底物 D 和显色剂 E 各一滴,混匀,室温下放置 2-3 分钟,待阴性对照孔微呈蓝色时,加终止剂 G 一滴混匀,终止反应,肉眼观察浅于近于阴性对照为阴性,呈明显深于阴性对照的蓝色为阳性,用仪器判断:以空白对照调零于 630nm 读取 O.D 值,待检孔 O.D 值大于阴性对照 2.1 倍者为阳性,当阴性对照 O.D 值低于 0.07 时按 0.07 计算。

在具体检测过程中,必须注意如下问题:1、试剂盒在 2-8 $^{\circ}$ C 下保存,每次取出时先平衡至室温后使用。滴瓶每次用后一定

要将盖拧紧，各瓶盖之间切不可混用；2、洗涤时将蒸馏水加满孔内，每次停放三十秒钟，甩去孔内液体，禁用自来水等其它水源。

本发明较好的技术方案可以是：抗原包被板 A 采用快速包被工艺，预先在通用聚苯乙烯微孔板上包被抗原，包被液为含适量抗原的碳酸盐缓冲液（由碳酸氢钠与碳酸钠组成，PH9.60，0.05M），室温静置 12 小时，用 1%牛血清白蛋白封闭 2 小时，冷冻真空干燥，真空装袋封口。采用快速包被工艺可以提高工作效率并提高检测的准确率。

本发明较好的技术方案也可以是：酶结合物 B 液磷酸盐缓冲液（由磷酸二氢钠与磷酸氢二钠组成，PH7.0，0.05M），添加稳定剂分子量 Mr 为 20000 的聚乙二醇重量 0.5%-5%，同时添加加速剂分子量 Mr 为 6000 的聚乙二醇重量 0.5%-5%，加万分之一硫柳汞以及四种寄生虫病统一的抗人免疫球蛋白 G 辣根过氧化物酶标记结合物。

在实施本发明的过程中，其它检测用的试剂的成份或配置方法如下：洗涤液 C：采用 0.5%吐温的磷酸盐缓冲液（由磷酸二氢钠与磷酸氢二钠组成，PH7.0，0.05M），加万分之一硫柳汞；底物液 D 及显色剂 E：底物液为过氧化氢溶液，显色剂为对人体无害的 TMB 溶液；样本稀释液 F：磷酸盐缓冲液（由磷酸二氢钠与磷酸氢二钠组成，PH7.0，0.1M），含吐温 0.5%；终止液 G：1%十二烷基硫酸钠（SDS）；阳性对照 H 与阴性对照 I：阳性对照系将四种阳性病人血清灭活处理，混合，加万分之一硫柳汞分装，成为可以通用的混合阳性对照；阴性对照系若干正常人血清混合后，加万分之一硫柳汞分装保存。以上组分

包括了检测所需要的全部试剂（蒸馏水除外），其中液体组分均已调整到工作浓度并装入塑料滴瓶内，无须稀释可以直接使用；阴阳对照放入带盖的塑料管内，可以直接使用；包被板拆封后也可直接使用。

本发明较好的技术方案还可以是：多孔检测盒是一种可以扣合的四合一化的试剂盒，盒内分为两个区，一个区放置多种寄生虫抗原预包被板，共多块紧邻液体试剂瓶，另一区设置一个开孔纸托或塑料基托立式并行放置多种通用的液体试剂瓶，试剂盒上方有开口，内侧盖上各有一个孔，分别插放阴性和阳性对照血清。实际使用中，用于协调四种抗原包被条件使包括酶结合物在内的其它液体组分可以成为四种寄生虫检测均可直接使用的通用试剂，因此仅一套液体试剂就可以满足四种寄生虫病的检测要求；盒内分为两个区，一个区放置四种寄生虫抗原预包被板，共四块紧邻液体试剂瓶，互相平行站立排列；另一区设置一个开孔纸托或塑料基托立式并行放置 6 种通用的液体试剂瓶。试剂盒开口设在上面，内侧盖上分别设计一个孔，分别插放阴性和阳性对照血清。

与现有技术相比，本发明具有以下明显的优点：1、提高了反应速度，整个反应时间不超过 30 分钟。比常规酶免疫方法提高了 4 倍以上；2、方便实用：试剂盒不仅配备了检测所必须的试剂组分，而且均为即开即用型，用户不必另行配制或稀释，使操作简单易行。不仅可以用仪器定量判断结果，也可以肉眼直接判断，尤适合于条件受限的现场普查和门诊检测；3、提高了四种疾病检测的可靠性：由于统一了操作方法和液体试剂，使得用户可以在同一时间和方法下进行

操作，使得结果具有高度的一致性和可比性；4、安全环保；采用了无害的 TMB 试剂，避免了常规方法所带来的危害和污染。终止液采用无腐蚀性的 SDS，消除了因使用硫酸终止液所带来的安全隐患；5、检测效果好：（1）敏感性：用本快速试剂盒检测经过确诊的肝吸虫病人血清 453 份，检测出阳性病例 417 例，敏感度达到 92.10%（417/453）；（2）特异性：用本快速试剂盒检测 356 例非流行区健康人血清，检测为阴性标本 350 例，特异性达到 98.30%（350/356）；（3）真实性（约登指数，Youder' s Index）：约登指数为 0.904，显示了检测盒高度的真实性；（4）重复性：同一操作者重复检测阳性血清 56 份和阴性血清 50 份，重复性达到 96.20%；（5）稳定性：将检测盒放置在 4℃ 下，动态观察六个月，前后结果无显著性差异。

附图说明 以下是本发明的检测盒图面说明：

图 1 是检测盒的结构示意图；

图中：1 是四种寄生虫抗原包被板，2 是对照血清，3 是放置试剂瓶的基托，4 是试剂瓶；参照图 1，多孔检测盒是一种可以扣合的四合一化的试剂盒，盒内分为两个区，一个区放置多种寄生虫抗原预包被板，共多块紧邻液体试剂瓶，另一区设置一个开孔纸托或塑料基托立式并行放置多种通用的液体试剂瓶，试剂盒上方有开口，内侧盖上各有一个孔，分别插放阴性和阳性对照血清。

具体实施方式 以下通过具体的实施方式对本发明进行更加详细的描述:

实施例 1 肝吸虫病快速酶免疫检测方法

选用肝吸虫可溶性粗制抗原,分步通过辛酸法和 DEAE52 离子层析柱层析纯化制得精制抗原,采用紫外法测定蛋白含量;进行预试验,与其它三种抗原对比实验,测定并选择肝吸虫精制抗原的包被浓度;用碳酸盐缓冲液(由碳酸氢钠与碳酸钠组成,PH9.60,0.05M)稀释抗原,包被 96 孔聚苯乙烯微孔板,100 微升/孔,室温过夜,甩去孔内液体,用同样剂量含 1%的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液(由磷酸二氢钠与磷酸氢二钠组成,PH7.0,0.05M)室温封闭 2 小时,冷冻真空干燥,真空条件下装入塑料袋,袋上贴相应标示。包被板拆封后也可直接使用。

配制通用液体试剂,包括酶结合物液 B、洗涤液 C、底物 D、显色剂 E、样品稀释液 F、终止剂 G、阳性对照品 H 及阴性对照品 I,酶结合物 B 液磷酸盐缓冲液(由磷酸二氢钠与磷酸氢二钠组成,PH7.0,0.05M),添加稳定剂分子量 Mr 为 20000 的聚乙二醇重量 0.5%-5%,同时添加加速剂分子量 Mr 为 6000 的聚乙二醇重量 0.5%-5%,加万分之一硫柳汞以及四种寄生虫病统一的抗人免疫球蛋白 G 辣根过氧化物酶标记结合物。其它检测用的试剂的成份或配置方法如下:洗涤液 C:采用 0.5%吐温的磷酸盐缓冲液(由磷酸二氢钠与磷酸氢二钠组成,PH7.0,0.05M),加万分之一硫柳汞;底物液 D 及显色剂 E:底物液为过氧化氢溶液,显色剂为对人体无害的 TMB 溶液;样本稀释液 F:

磷酸盐缓冲液（由磷酸二氢钠与磷酸氢二钠组成，PH7.0，0.1M），含吐温 0.5%； 终止液 G：1%十二烷基硫酸钠（SDS）；阳性对照 H 与阴性对照 I：阳性对照系将四种阳性病人血清灭活处理，混合，加万分之一硫柳汞分装，成为可以通用的混合阳性对照；阴性对照系若干正常人血清混合后，加万分之一硫柳汞分装保存。以上组分包括了检测所需要的全部试剂（蒸馏水需要另行准备），其中液体组分均已调整到工作浓度并装入塑料滴瓶内，无须稀释可以直接使用；阴阳对照放入带盖的塑料管内，可以直接使用；

将抗原包被板和液体试剂瓶依次装入多孔检测盒。多孔检测盒是一种可以扣合的四合一化的试剂盒，盒内分为两个区，一个区放置四种寄生虫抗原预包被板，共四块紧邻液体试剂瓶，另一区设置一个开孔基托立式并行放置多种通用的液体试剂瓶，试剂盒上方有开口，内侧盖上各有一个孔，分别插放阴性和阳性对照血清。检测盒需要在 4℃ 下保存，不得冷冻，在此条件下有效期可以达到 6 个月。

检测过程使用多孔检测盒，具体过程包括：（1）样本稀释：用样本稀释液 F 将待检血清按体积比 1:50 稀释，阴阳性对照血清同比例同步稀释，然后（2）加样反应：每孔加已稀释血清 100ul，同时设阴性、阳性及空白对照各一孔，空白对照孔加入 100ul 样品稀释液 F，37℃ 静置 10 分钟，甩去，每孔加洗涤液 C 一滴，立即用蒸馏水洗涤多次，甩去，拍干，再（3）加酶反应：加酶结合物 B 二滴，37℃ 反应 10 分钟，甩去，加洗涤液 C 一滴，立即用蒸馏水反复洗涤多次，甩去，拍干，最后（4）显色反应：加底

物 D 和显色剂 E 各一滴，混匀，室温下放置 2-3 分钟，待阴性对照孔微呈蓝色时，加终止剂 G 一滴混匀，终止反应，肉眼观察浅于近于阴性对照为阴性，呈明显深于阴性对照的蓝色为阳性，用仪器判断：以空白对照调零于 630nm 读取 O.D 值，待检孔 O.D 值大于阴性对照 2.1 倍者为阳性，当阴性对照 O.D 值低于 0.07 时按 0.07 计算。

在具体检测过程中，必须注意如下问题：1、试剂盒在 2-8℃ 下保存，每次取出时先平衡至室温后使用。滴瓶每次用后一定要将盖拧紧，各瓶盖之间切不可混用；2、洗涤时将蒸馏水加满孔内，每次停放三十秒钟，甩去孔内液体，禁用自来水等其它水源。

实施例 2 肺吸虫病快速酶免疫检测方法

选用肺吸虫可溶性粗制抗原，分步通过辛酸法和 DEAE52 离子层析柱层析纯化制得精制抗原，采用紫外法测定蛋白含量；进行预试验，与其它三种抗原对比实验，测定并选择肺吸虫精制抗原包被浓度；用碳酸盐缓冲液（成分如上述，PH9.60，0.05M）稀释抗原，包被 96 孔聚苯乙烯微孔板，100 微升/孔，室温过夜，甩去孔内液体，用同样剂量含 1%的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液（成分如上述，PH7.0，0.05M）室温封闭 2 小时，冷冻真空干燥，真空条件下装袋，板袋上贴相应标示。包被板拆封后也可直接使用。

其它试剂配制方法、组装成盒方式及检测方案同实施例 1。

实施例 3 猪囊虫病快速酶免疫检测方法

选用猪囊虫囊液可溶性粗制抗原，分步通过辛酸法和 DEAE52 离子层析柱层析纯化制得精制抗原，采用紫外法测定蛋白含量；进行预试验，与其它三种抗原对比实验，测定并选择抗原包被浓度；用碳酸盐缓冲液（成分如上述，PH9.60，0.05M）稀释抗原，包被 96 孔聚苯乙烯微孔板，100 微升/孔，室温过夜，甩去孔内液体，用同样剂量含 1%的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液（成分如上述，PH7.0，0.05M）室温封闭 2 小时，冷冻真空干燥，真空条件下装袋，板袋上贴相应标示。包被板拆封后也可直接使用。

其它试剂配制方法、组装成盒方式及检测方案同实施例 1。

实施例 4 旋毛虫病快速酶免疫检测方法

选用旋毛虫肌肉期幼虫可溶性粗制抗原，分步通过辛酸法和 DEAE52 离子层析柱层析纯化制得精制抗原，采用紫外法测定蛋白含量；进行预试验，与其它三种抗原对比实验，测定并选择抗原包被浓度；用碳酸盐缓冲液（成分如上述，PH9.60，0.05M）稀释抗原，包被 96 孔聚苯乙烯微孔板，100 微升/孔，室温过夜，甩去孔内液体，用同样剂量含 1%的牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液（成分如上述，PH7.0，0.05M）室温封闭 2 小时，冷冻真空干燥，真空条件下装袋，板袋上贴相应标示。包被板拆封后也可直接使用。

其它试剂配制方法、组装成盒方式及检测方案同实施例 1。

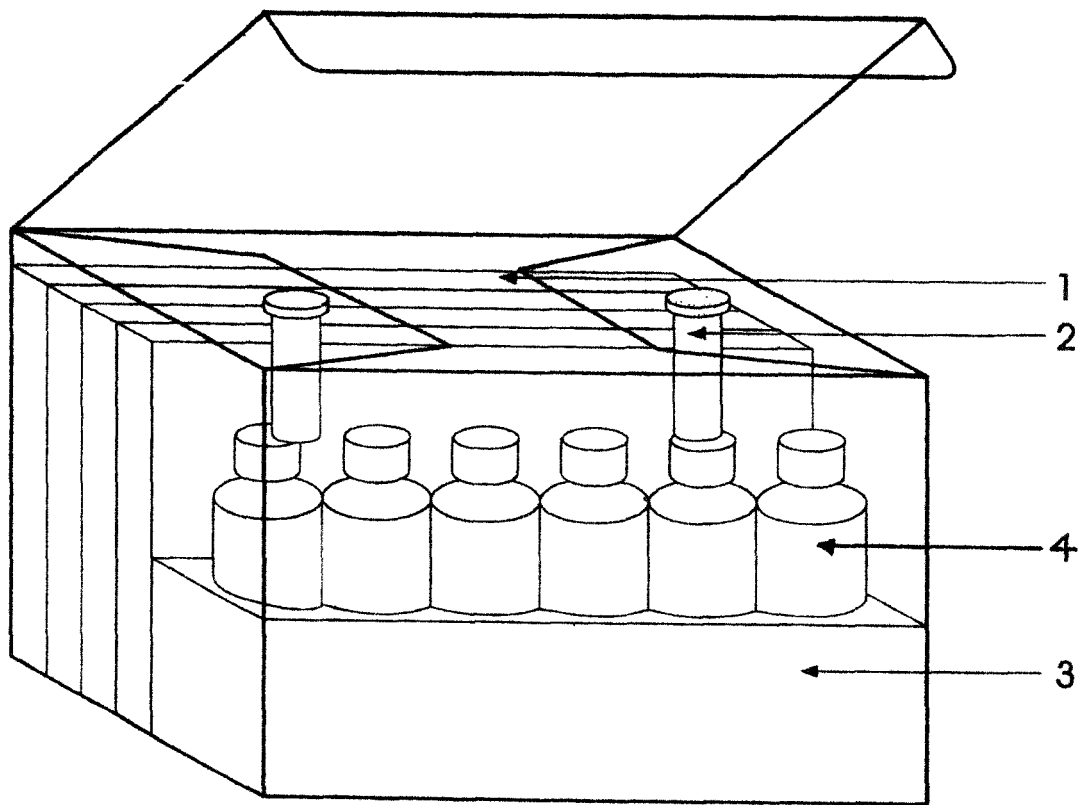


图 1

专利名称(译)	食源性寄生虫病快速酶免疫检测方法及检测盒		
公开(公告)号	CN101206222A	公开(公告)日	2008-06-25
申请号	CN200610157651.7	申请日	2006-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市康百得生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市康百得生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市康百得生物科技有限公司		
[标]发明人	杜宜峰		
发明人	杜宜峰		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N21/78		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种食源性寄生虫病快速酶免疫检测方法及多孔检测盒，酶免疫检测用试剂包括抗原包被板A、酶结合物液B、洗涤液C、底物D、显色剂E、样品稀释液F、终止剂G、阳性对照品H及阴性对照品I，检测过程使用多孔检测盒，检测过程包括：样本稀释、加样反应、加酶反应和显色反应，抗原包被板A采用快速包被工艺，预先在通用聚苯乙烯微孔板上包被抗原，酶结合物B液添加分子量Mr为20000、6000的两种聚乙二醇，解决了现有检测方法操作时间长、操作烦琐、试剂不稳定和配套不完整等问题，具有速度快、操作方便、可靠性高和检测效果好等优点，用于猪囊虫、肺吸虫、肝吸虫和旋毛虫病的酶免疫检测。

