



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107167587 A

(43)申请公布日 2017.09.15

(21)申请号 201710402965.7

(22)申请日 2017.06.01

(71)申请人 贵州省疾病预防控制中心

地址 550004 贵州省贵阳市云岩区八鸽岩路101号

(72)发明人 吴玛莉 李安梅 黄雨婷 徐莉娜
郭志来 罗维

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

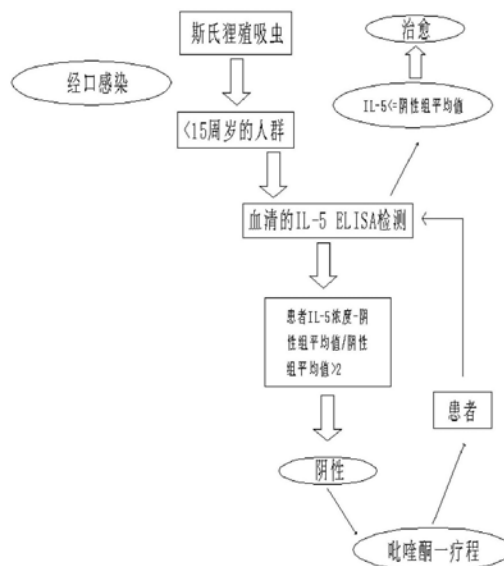
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种斯氏狸殖吸虫感染免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种新的可以用于食源性吸虫免疫诊断的分子IL-5及其在未满15周岁的未成年人斯氏狸殖吸虫感染诊断及疗效评估中的制备方法。当IL-5浓度相较于健康人增高两倍以上即为阳性,按每颗/每公斤体重的剂量服用吡喹酮3天,IL-5浓度恢复正常值。IL-5稳定、特异敏感、快速、简单且低廉,对因斯氏狸殖吸虫感染引发的并殖吸虫病的诊断及治疗具有很好的临床应用价值,由其升高幅度的倍数做出的疾病诊断结果能与患者临床症状和流行病学史的调查信息一致,有利于该病的诊治。



1. 一种斯氏狸殖吸虫感染免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法:

步骤一;患者样品收集,用生化管抽取斯氏狸殖吸虫感染患者全血2ml,同时抽取不限标准的健康非感染者(至少4例)全血作为阴性组,静止2-3h,离心机3000r/min离心5min取患者血清。每人份血清收集100 μ l,3000r/min离心5min取患者血清,血清量不少于100ml,放入1.5ml离心管中,保存于冰箱冷冻层待测,冷冻层温度低于-20℃。

步骤二;检测,采用联科生物IL-5试剂盒检测,每孔加入50 μ l样本稀释液,在加入50 μ l的标准品、患者样本和健康人阴性血清,每个样品各重复两次。然后每孔加入5 μ l检测抗体室温孵育3h。洗板后每孔加入100 μ l辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素孵育45min。洗板后加入100 μ l显色底物TMB孵育10-30min,最后加入100 μ l终止液终止反应,在酶标仪上以450nm检测OD。根据标准品绘制标准曲线并计算直线回归方程($r>99\%$)。

2. 根据权利要求1所述的一种斯氏狸殖吸虫感染免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法,其特征在于,所述抽取的患者全血和健康非感染者全血者,年龄都在15周岁以下,性别不限。

3. 根据权利要求1所述的一种斯氏狸殖吸虫感染免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法,其特征在于,所述同时抽取不限标准的健康非感染者全血,是随机抽取。

4. 根据权利要求1所述的一种斯氏狸殖吸虫感染免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法,其特征在于,所述离心管为聚丙烯材质的无菌产品。

一种斯氏狸殖吸虫感染免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及直接应用于感染斯氏狸殖吸虫且年龄小于15周岁的未成年患者血清的IL-5的ELISA诊断,特别是一种斯氏狸殖吸虫感染的免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法。

背景技术

[0002] 并殖吸虫(Paragonimus)是一种肠道蠕虫,引起并殖吸虫病,可感染猫、狗、野生动物等哺乳动物,广泛分布于亚洲、非洲及南美洲,是一种人畜共患的重要寄生虫病,据世界卫生组织(WHO)1995年的统计,全世界有2千万人感染并殖吸虫,有2.93亿人口处于感染的威胁之下,儿童的发病率最高,患者年纪多在10—14周岁之间(WHO 1995)。中国全国的流行率大约是1.7%,有1.95亿人处于感染威胁下,最近的流行病学数据显示中国某些地区的发病率正在上升中(Liu et al., 2008)。2004年我们开展的流行病学调查显示贵州省2090例寄生虫病住院病例回顾性调查分析结果显示并殖吸虫病例为67例(占3.21%),仅次于蛔虫发病率,男女比例4.151,发病率居高不下;2008年我们协助贵州省各家医院排查的门诊病人送检血清阳性率18.18%,2009年上升了4.04%,送检患者5—14岁所占比率为39.33%—68.18%。我国分布的并殖吸虫优势种主要为卫氏并殖吸虫Paragonimus westermani和斯氏狸殖吸虫Paragonimus skrjabini,而贵州省流行优势种是斯氏狸殖吸虫,以因感染其引发的并殖吸虫病人为主。并殖吸虫病常用临床诊断技术方法主要有病原学检查、ELISA检测患者血清或者胸腔积液抗体、粗抗原真皮内测试ID及嗜酸性粒细胞EOS检测等诊断方法(郑晓燕等,2008)。ELISA是最为大量采用的检测方式,通常使用并殖吸虫粗抗原或部分提纯的抗原进行反应,虽然有大量研究报道了不同的ELISA方法,但是只有少量文献标准引起人们的注意,各研究组常使用自己自创的检测方法(Blair et al., 2008)。Th2控制的免疫反应是蠕虫感染的一个独有特征。它具有如下特征:(1)不同虫种的具体调控情况不完全相同。(2)不同年龄段的同一寄主,Th2细胞免疫反应存在差异。寄主感染发生后通常无症状,大部分寄主能忍受其作为一个正常的病原存在而无病变,病理学变化更多地同增高的细胞免疫学变化有关,例如感染中经常发现EOS显著增高。典型的如嗜酸性粒细胞通常在健康人中只占到2%~4%,而在感染患者中会上升到40%。嗜酸性粒细胞现在被假定为引发Th2反应的主要细胞之一,它分泌多种细胞因子和趋化因子,IL-5来源于它。IL-5促进嗜酸性粒细胞上升,介导其从骨髓中释放,趋化因子CCL11、CCL5、IL-5是其在肺部募集涉及的最主要分子,蠕虫感染诱导的嗜酸性粒细胞需要IL-5。因此,以蠕虫感染引起的Th2细胞免疫反应为基础,很可能筛选到某些特异变化的免疫分子,这显然对斯氏狸殖吸虫的临床诊治具有很大的现实意义。而IL-5即是其特征分子,还介导EOS形态改变或通过蛋白激酶C诱导此变化,在过敏性疾病的发生过程中起着更为重要的作用。

[0003] 很多寄生虫病诊断中常用的形态学检查不适用于斯氏狸殖吸虫,因为其以童虫寄生人体,偶有发育为成虫,故基本上无法查到虫卵。而当前临床常用检测试剂盒基于寄生虫的抗体,以虫体粗抗原包被制备成的ELISA试剂盒为主,不同批次之间的试剂盒质量难免

会有差异,而全国临检领域对于该病也无一套统一的行业诊断的金标准,因此检测结果只能局限于某种试剂盒的方法体系,无法与其他实验室的结果进行比较,所获数据只可作为临床诊断的参考,不能凭此一项制定治疗方案,必需借助于影像学等其他医学检验方法排查;除此以外,不同吸虫品种的免疫交叉反应也是影响检测的重要原因(王光西,2000),以上因素增加了检测结果的不准确性,导致无法准确诊断及针对性治疗。再者,通过EOS 进行的检测会受检查者技术及仪器辨别能力影响,无法保证结果稳定可靠。最后,EOS和寄主抗体都存在一个很大的缺陷,即它们能在患者体内存在十几年,长时间在血清中处于高水平,所以无法判断现症或既往感染,同时也无法对疗效做出判断。

[0004] 立足于蠕虫感染的Th2细胞免疫学变化特征,寻找斯氏狸殖吸虫特异、敏感的免疫分子诊断标志物,开发更为特异、标准的免疫学诊断方法,解决因寄生虫粗抗原ELISA试剂盒的质控差异、吸虫交叉反应及EOS形态学检查缺陷导致的检验结果不稳定或不确定,避免出现假阳性和假阴性结果,同时提出一种能统一行业的检验标准,有利于所有的从业人员快速轻松地掌握并稳定地重复。进一步地,克服抗体和EOS 的时效性,通过其动态变化能监测患者病程,评判药物疗效,做出病情是否转归的判断以指导临床治疗方案的制定。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决上述问题,设计了一种斯氏狸殖吸虫感染的免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法。

[0006] 实现上述目的本发明的技术方案为,一种斯氏狸殖吸虫感染免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法:步骤一;患者样品收集,用生化管抽取斯氏狸殖吸虫感染患者全血2ml,同时抽取不限标准的健康非感染者(至少4例)全血作为阴性组,静置2-3h,离心机3000r/min离心5min 取患者血清。每人份血清收集100 μ l,3000r/min离心5min取患者血清,血清量不少于100ml,放入1.5ml离心管中,保存于冰箱冷冻层待测,冷冻层温度低于-20 $^{\circ}$ C。步骤二;检测,采用联科生物IL-5试剂盒检测,每孔加入50 μ l样本稀释液,在加入50 μ l的标准品、患者样本和健康人阴性血清,每个样品各重复两次。然后每孔加入5 μ l检测抗体室温孵育3h。洗板后每孔加入100 μ l辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素孵育45min。洗板后加入100 μ l显色底物TMB孵育10-30min,最后加入100 μ l终止液终止反应,在酶标仪上以450nm检测OD。根据标准品绘制标准曲线并计算直线回归方程($r>99\%$)。

[0007] 所述抽取的患者全血和健康非感染者全血者,年龄都在15周岁以下,性别不限。

[0008] 所述同时抽取不限标准的健康非感染者全血,是随机抽取。

[0009] 所述离心管为聚丙烯材质的无菌产品。

[0010] 利用本发明的技术方案制作的斯氏狸殖吸虫感染的免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法,以IL-5的浓度变化倍数作为诊断15周岁以下未成年人的斯氏狸殖吸虫感染指标,具有简单易行、结果可靠稳定及成本低廉的特点。首先,作为各医疗机构的检验科,都可以提供本检测进行的所有仪器设备;其次,IL-5即是蠕虫感染Th2免疫反应的特征分子,亦是斯氏狸殖吸虫感染15周岁以下未成年人的特异性且敏感性的免疫分子。最后,人的IL-5试剂盒已实现国产商品化生产,稳定性良好,成本也比较低廉。可检测96个病人的市售试剂盒单价从1550-2000 元,平均每个孔的成本为16-20.8元人民币。

附图说明

[0011] 图1是本发明所述一种斯氏狸殖吸虫感染的免疫诊断生物标志物 IL-5的制备方法的结构示意图;

具体实施方式

[0012] 下面结合附图对本发明进行具体描述,如图1所示,一种斯氏狸殖吸虫感染免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法:步骤一;患者样品收集,用生化管抽取斯氏狸殖吸虫感染患者全血2ml,同时抽取不限标准的健康非感染者(至少4例)全血作为阴性组,静置2-3h,离心机3000 r/min离心5min取患者血清。每人份血清收集100 μ l,3000r/min 离心5min取患者血清,血清量不少于100 μ l,放入1.5ml离心管中,保存于冰箱冷冻层待测,冷冻层温度低于-20℃。步骤二;检测,采用联科生物IL-5试剂盒检测,每孔加入50 μ l样本稀释液,在加入50 μ l的标准品、患者样本和健康人阴性血清,每个样品各重复两次。然后每孔加入5 μ l检测抗体室温孵育3h。洗板后每孔加入100 μ l辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素孵育45min。洗板后加入100 μ l显色底物 TMB孵育10-30min,最后加入100 μ l终止液终止反应,在酶标仪上以450nm检测OD。根据标准品绘制标准曲线并计算直线回归方程 ($r>99\%$);所述抽取的患者全血和健康非感染者全血者,年龄都在15 周岁以下,性别不限;所述同时抽取不限标准的健康非感染者全血,是随机抽取;所述离心管为聚丙烯材质的无菌产品。

[0013] 本实施方案的特点为,从蠕虫感染诱导的嗜酸性粒细胞需要IL-5 而IL-5又能促进其上升的机理出发,结合具体虫种及寄主不同发育时期的免疫反应存在差异的特点,本发明首次创造性地在15周岁以下的斯氏狸殖吸虫感染患者中提出IL-5可以用于诊断和疗效评估。检验科只需要简单、常用的设备和商品化、价格比较低廉的试剂盒就可快速灵敏的检测,患者服药后IL-5也会迅速下降,十分有利于临床治疗方案的调整及优化。IL-5确诊的结果也能与患者临床症状和流行病学调查一致,这使得因感染斯氏狸殖吸虫导致的并殖吸虫病的诊断比较简单、易行、可靠,减少了假阳性和假阴性情况的发生,克服了常用诊断方法的缺陷以及无法对病程做出判断的不足。总之,IL-5是一个在诊治效果、人力和物力成本投入方面都非常适合大面积推广的免疫诊断生物标志物。

[0014] 在本实施方案中,具体操作步骤如下:

[0015] 步骤一、患者样品收集

[0016] 15周岁以下、性别不限人群,用2ml普通生化管抽取斯氏狸殖吸虫感染患者全血。同时随机抽取不限标准的健康非感染者(至少4例)全血作为阴性组。将其放置2-3小时,选择普通国产离心机3000r/min 离心5min取患者血清。每人份血清收集100 μ l。

[0017] 步骤二、联科生物IL-5试剂盒的检测

[0018] (1)标准品制备

[0019] 用蒸馏水或去离子水重溶人的IL-5标准品,重溶体积标注在人IL-5 标准品的标签上。轻柔地涡旋震荡,确保充分混匀,重溶后标准品的浓度为2000pg/ml。重溶后静置10-30分钟。稀释前充分混匀。取150 μ l浓缩的人IL-5标准品,加入150 μ l标准品稀释液,作为标准曲线的最高浓度(1000pg/ml)。在每一个试管中加入150 μ l标准品稀释液。使用高浓度标准品做1:1系列稀释。每次移液时,请确保充分混匀。后续步骤同样品检测。

[0020] (2) 样品检测

[0021] 首先将不需要的板条拆卸下来,放回装有干燥剂的铝箔袋,重新封好封口保存于4度冰箱。加入300 μ l 1 $\times$ 洗液静置浸泡30秒。弃掉洗液之后,在吸水纸上将微孔板拍干。洗板完成之后每孔加入50 μ l 1 $\times$ 检测缓冲液。加入50 μ l样本于孔中,重复2次,保证连续加样,不要间断。加样过程在15分钟内完成。每孔加入50 μ l稀释的检测抗体。使用封板膜封板。3000转/分钟振荡,室温孵育2小时。弃掉液体,每孔加入300 μ l洗液洗板,洗涤6次。每次洗板,在吸水纸上拍干。为获得理想的实验性能,必须彻底移除残留液体。每孔加入100 μ l稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。使用新的封板膜封板。300转/分钟振荡,室温孵育45分钟。重复步骤8。每孔加入100 μ l显色底物 TMB,避光,室温孵育5-30分钟。每孔加入100 μ l终止液。颜色由蓝色变为黄色。如果颜色呈现绿色或者颜色的变化明显不均匀,请轻轻叩击板框,充分混匀。在30分钟之内,使用热电multiscan MK3进行双波长检测,测定450nm最大吸收波长和570nm或630nm参考波长下的OD值。校准后的OD值为450nm的测定值减去570nm或630nm的测定值。仅使用450nm测定会导致OD值偏高,并且准确度降低。

[0022] 步骤三、结果计算及判断

[0023] 以标准品稀释液作为标准曲线的零浓度。计算标准品或样品平均OD值,然后减去零浓度标准品的OD值。对浓度值和OD值取10为底的对数,以标准品浓度为横坐标,OD值为纵坐标,用计算机软件进行回归拟合生成标准曲线。回归分析确定最佳拟合曲线。用样品所测OD结合方程计算倍比稀释后的细胞因子浓度,原始样品浓度=稀释后的细胞因子浓度 $\times$ 2。按照公式计算倍数:患者IL-5浓度-阴性组平均值/阴性组平均值 >2 即确诊。吡喹酮一疗程剂量按每颗/每公斤体重,连续服用3天后IL-5下降到阴性组平均值或以下即治愈。

[0024] 在贵州省斯氏狸殖吸虫流行地区收集患者12例,对于送检样品病人或家属,详细询问其流行病学史、记录临床症状和体征、影像学检查结果、感染时间、途径、地点信息,用普通生化管抽取感染患者2ml左右全血,3000r/min离心5min取上清经珠海海泰肺吸虫抗体试剂盒诊断阳性。然后同时采用联科生物人的IL-5试剂盒检测。阴性组IL-5平均值为4.45pg/ml,患者IL-5的值为10.36-48.66pg/ml,变化倍数是2.32-10.93,确诊率100%,同时临床症状及流行病学调查也能与之相互佐证。12名患者服药后IL-5均下降至阴性组平均值或以下的水平。具体信息如下。

[0025] 表1患者IL-5浓度检测

[0026]

患者	OD	空白	校正 (Y 值)	X 值 (稀释)	原始浓度 (pg/ml)
1	0.049	0.038	0.011	10.68	21.35
2	0.047	0.038	0.009	8.88	17.76
3	0.044	0.038	0.006	6.12	12.24
4	0.058	0.038	0.020	18.47	36.95
5	0.055	0.038	0.017	15.92	31.83
6	0.054	0.038	0.016	15.05	30.11
7	0.043	0.038	0.005	5.18	10.36
8	0.048	0.038	0.010	9.78	19.56
9	0.065	0.038	0.027	24.33	48.66
10	0.043	0.038	0.005	5.18	10.36
11	0.047	0.038	0.009	8.88	17.76
12	0.048	0.038	0.010	9.78	19.56

[0027] 表2患者临床症状及流行病学史

[0028]

患者	性别	年龄	临床症状	食蟹史
1	男	10	腹部包块	有
2	男	9	腹部包块	无
3	男	7	胸水	无
4	男	7	胸水	有
5	男	4	多器官官能障碍, 浮肿	不祥
6	男	10	头痛, 嗜酸性粒细胞高	不祥
7	男	10	腹水	有

[0029]

8	男	9	胸水, 腹部两包块	不祥
9	男	14	胸水	无
10	女	9	右胸包块2个月	有
11	男	5	胸水,	无
12	男	13	胸水	

[0030] 表3患者临床及流行病学史的分析

	特征	未成年组(n=12[%])
[0031]	性别	
	男	11 (91.76%)
	女	1 (8.33%)
	年龄	4-14
	临床症状	
	胸水、腹水	10 (83.33%)
	嗜酸性粒细胞增高	1 (8.33%)
	包块	10 (83.33%)
	浮肿	1 (8.33%)
	是否吃螃蟹	
	是	4(33.33%)
	不是	4(33.33%)
	不清楚	4(33.33%)

[0032] 上述技术方案仅体现了本发明技术方案的优选技术方案,本技术领域的技术人员对其中某些部分所可能做出的一些变动均体现了本发明的原理,属于本发明的保护范围之内。

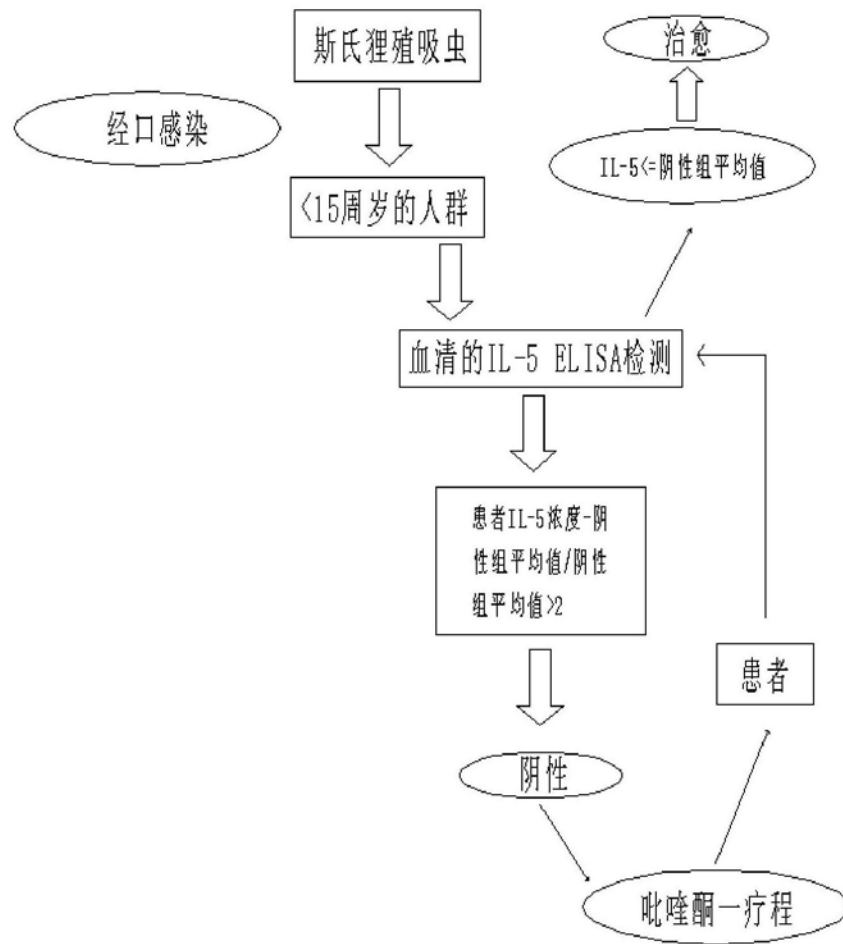


图1

专利名称(译)	一种斯氏狸殖吸虫感染免疫诊断生物标志物IL-5的制备方法		
公开(公告)号	CN107167587A	公开(公告)日	2017-09-15
申请号	CN2017110402965.7	申请日	2017-06-01
[标]发明人	吴玛莉 李安梅 黄雨婷 徐莉娜 郭志来 罗维		
发明人	吴玛莉 李安梅 黄雨婷 徐莉娜 郭志来 罗维		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种新的可以用于食源性吸虫免疫诊断的分子IL - 5及其在未满15周岁的未成年人斯氏狸殖吸虫感染确诊及疗效评估中的制备方法。当IL - 5浓度相较于健康人增高两倍以上即为阳性，按每颗/每公斤体重的剂量服用吡喹酮3天，IL - 5浓度恢复正常值。IL - 5稳定、特异敏感、快速、简单且低廉，对因斯氏狸殖吸虫感染引发的并殖吸虫病的诊断及治疗具有很好的临床应用价值，由其升高幅度的倍数做出的疾病诊断结果能与患者临床症状和流行病学史的调查信息一致，有利于该病的诊治。

