



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1866014 B

(45) 授权公告日 2010.05.12

(21) 申请号 200610050841.9

US 6756043 B2, 2004.06.29, 全文.

(22) 申请日 2006.05.19

唐雨德,等. 快速检测猪囊虫抗体的金免疫层析法的建立及应用. 中各国人兽共患病杂志 195. 2003, 19(5), 77-79.

(73) 专利权人 浙江省农业科学院

地址 310021 浙江省杭州市石桥路 198 号

(72) 发明人 卢福庄 张雪娟 程天印 项美华

付媛 方兰勇 冯尚连 程菊芬

审查员 边昕

(74) 专利代理机构 杭州丰禾专利事务所有限公

司 33214

代理人 沈仵仵

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1700008 A, 2005.11.23, 说明书 2-10 页.

权利要求书 1 页 说明书 14 页

(54) 发明名称

诊断猪囊虫病斑点金标免疫渗滤试剂盒其制备及应用方法

(57) 摘要

本发明提供了诊断猪囊虫病斑点金标免疫渗滤试剂盒其制备及应用方法,属于家畜寄生虫病的诊断技术领域。本发明以硝酸纤维素膜为固相载体,吸附猪的待检血样,以猪囊虫抗原与胶体金结合物为液相,并同时作为探针和指示剂,当抗原与相应的抗体配体结合,金颗粒在抗体配体位点大量聚集,便形成肉眼可见的红色斑点。应用时将被检猪血样干纸浸出液或血清稀释液 1 μl 点在硝酸纤维素膜上,加洗涤液 100 μl,再滴加猪囊虫抗原胶体金 100 μl,2-3 分钟内即形成或不形成红色斑点,结果判断容易,一个反应盒可做 1-4 份待检血样,检测成本低,具有敏感、特异、检出率高,省工、省时、采血样方便等优点,适用于猪囊虫病诊断与流通市场检疫等领域应用。

1. 诊断猪囊虫病斑点金标免疫渗滤试剂盒的制备方法,其中盒体、反应盒、黑色试剂瓶、白色试剂瓶及玻璃毛细管均为常规实验用品,标准阳性血纸、阴性血纸或标准阳性血清和阴性血清按常规方法制备;其特征在于所述白色试剂瓶内装有的洗涤液为 pH6.2 ~ 6.4,含有 0.7% 牛血清白蛋白的 0.01mol 磷酸盐缓冲溶液;所述黑色试剂瓶内装有的猪囊虫抗原胶体金按以下步骤制备而成:

(1) 胶体金的制备以 1% 氯金酸、1% 柠檬酸三钠、1% 鞣酸、25mMK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 及双蒸水为原料,先将 1% 氯金酸与双蒸水按体积 1 : 79 配成 A 液;将 1% 柠檬酸三钠、1% 鞣酸、25mMK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 与双蒸水按体积 4 : 0.035 ~ 0.080 : 0.035 ~ 0.080 : 15.84 ~ 15.93 配成 B 液;再将 A 液、B 液在水浴内同时加热到 59 ~ 61℃,搅拌 A 液,快速加入 B 液,继续搅拌 1 分钟,在 10 ~ 13 分钟内加热至沸腾,制成颗粒直径 10 ~ 13nm 的胶体金,该胶体金液颜色由黑→蓝→紫→红色时即成;

(2) 胶体金 pH 值的调整将步骤 (1) 胶体金液用 0.25MK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调整 pH 值为 6.8 ~ 7.1 后备用;

(3) 猪囊虫可溶性抗原的制备与透析将猪囊虫包囊经研磨后,用 0.85% NaCl 溶液按重量配成 5% 浓度溶液,置 -25℃ 反复冻融 7 次,期间用 40KHz、400W 超声波裂解处理 5 次,每次处理 20 分钟,然后在 4℃ 下,以 13000r/min 离心 60 分钟,吸取上清液即为猪囊虫可溶性抗原;将该抗原装入透析袋,用双蒸水透析去除盐分后,装瓶冷冻,备用;

(4) 猪囊虫抗原包被胶体金将步骤 (3) 猪囊虫可溶性抗原 0.27 ~ 0.30mg,缓慢加入步骤 (2) 100ml 胶体金液中进行包被,搅拌 15 分钟后,依次加入 10% 迭氮钠 500 μl、1% 牛血清白蛋白 100 μl,搅匀后在 2.5 ~ 4.0℃,1500r/min 条件下离心 30 分钟,吸取红色上清液,即成囊虫抗原胶体金,分装黑色试剂瓶内,冷藏、备用。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于所述配制胶体金 B 液的组分与含量为 1% 柠檬酸三钠 4.0ml、1% 鞣酸 0.08ml、25mMK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.08ml 与双蒸水 15.84ml;制成的胶体金颗粒直径为 10 < D ≤ 11nm;胶体金液 pH 值调整为 7.10;胶体金液与猪囊虫抗原的体积重量比为 100ml : 0.30mg。

## 诊断猪囊虫病斑点金标免疫渗滤试剂盒其制备及应用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及家畜寄生虫病的诊断技术领域,尤其涉及用于诊断猪囊虫病的斑点金标免疫渗滤试剂盒的制备方法及其应用方法。

### 背景技术

[0002] 猪囊虫病又称猪囊尾蚴病 (*cysticercosis cellulosae*),是由猪带绦虫幼虫寄生于人或猪、野猪等中间宿主引起的人兽共患寄生虫病。人不仅是猪带绦虫唯一的终宿主,同时也是其幼绦期适宜寄生的宿主。

[0003] 该病症状及危害因寄生部位不同而异。囊尾蚴寄生于脑内,可呈现脑炎症状或癫痫,眩晕、呕吐、感觉障碍、瘫痪、大小便潴留,神经衰弱等症状;寄生于眼部可诱致失明;寄生于内脏可引起心、肝囊尾蚴病、肺囊尾蚴病、胰囊尾蚴病等;寄生于肌肉或皮下,可引起无力、头昏、头痛、记忆力减退、肌肉痉挛及眼花等症状;囊尾蚴往往混合寄生于皮肤与脑内,危害的表现复杂多样,严重者可危及生命。

[0004] 猪囊虫病在世界各地均有发生,尤其在中非、南非、拉丁美洲和东南亚诸国仍是很重要的公共卫生问题。该病在我国南方诸省呈散发,在东北、华北、西北和西南地区感染率较高。例如星文梅等(2005)对青海化隆县西部地区的调查,猪的囊虫病的感染率为3.27%~4.92%;民和县满坪地区猪的囊虫病感染率为3.41%~5.43%(郭宏山,2004)。据山东省清华医院统计,1991~2002年入院的绦/囊虫病例有2824例(李登俊等,2004)。宁夏人群囊虫感染率为1.28%(王自存等,2005)。湖北襄樊市1976~2003年生猪囊虫感染率平均为0.23%(许正敏等,2004)。据赵辉元等(1998)调查研究表明,猪的猪囊尾蚴检出率在10%~20%的流行区,人体猪肉绦虫的感染率占农村人口的0.5%~1%,囊尾蚴病人占农村人口的1.5%,由此推断,我国某些地区囊虫病的危害还是相当严重的。

[0005] 猪绦虫卵被吞入猪等中间宿主的胃肠道,虫卵的胚膜为消化液中的蛋白酶所破坏,卵膜在小肠内破裂逸出六钩蚴,六钩蚴破膜而出并钻入肠壁,经血液循环及淋巴液进入到宿主体内各组织。一般猪感染虫卵后约经60~70天发育为成熟的囊尾蚴,猪囊尾蚴主要寄生于横纹肌的肌纤维之间,在膈、舌、心、脑、眼、淋巴结、胃壁、食道、肝脏、肺脏和脂肪等脏器和组织中也可见。猪囊尾蚴在猪体内可寄生3~5年。

[0006] 猪囊虫病的防治关键在于抓好“驱、检、管”综合防治措施。目前检测囊虫病的方法主要分两类:病原学检查和免疫学检测。前者主要包括囊结检查(眼观、手摸、解剖镜观察)和CT检查;后者包括皮内试验、间接血凝试验、乳胶凝集试验、卡红凝集试验、补体结合试验、间接荧光抗体试验、酶联免疫吸附试验、改良ELISA、斑点试验等。囊结检查在猪囊虫病比较严重流行的地区,该法检出率约占囊虫病猪的20%左右。CT检查是检测脑囊尾蚴病的有效手段之一,但仪器价格昂贵,目前仅用于人,且诊断结果中尚有14.17%的患者不能检出。免疫学检测方法具有较高的检出率,如果不注意纯化抗原,则会出现交叉反应,而且这些检测方法条件要求严格、操作较繁琐,有些需要特定的仪器设备,检测所需的时间较长(20分钟至数小时)。不能满足快速检疫的需要。

[0007] 因此寻找一种快速、简便,适用于猪囊虫病流行病学调查、普查、诊断、流通市场现场检疫的方法,已成为防疫部门迫切希望解决的问题。

[0008] 金标免疫渗滤法和金标免疫层析法是近几年发展起来的一种新的免疫学诊断方法,它是以微孔膜作为载体,用胶体金代替 ELISA 中的酶标记物,可省去底物反应步骤,阳性反应呈红色斑点或线条,肉眼清晰可见,操作简便快速,整个试验过程在数分钟内完成,且试剂稳定易长期保存,国内外已将该法用于多种疾病的诊断。

[0009] 国内利用金标法检测猪囊虫病的报道多见于人医学的试验。张洪花等(1994)应用金标记猪囊尾蚴囊液抗原为探针,以猪囊尾蚴抗原的 McAb 为桥联,建立了非常规斑点免疫金染色法(Dot-IGS)检测脑囊虫病患者脑脊液中循环抗原(CAg)的方法,用 4G<sub>2</sub>McAb 检测 84 例脑囊虫病脑脊液,CAg 阳性率为 88.09%,检测 63 例其它疾病患者,有 2 例假阳性。以 1F<sub>11</sub> McAb 检测 14 例脑囊虫病人,阳性率为 92.86%,检测其它疾病患者 36 例,均为阴性。

[0010] 刘玉冰等(2001)先后以 1 株猪囊尾蚴囊液抗原 McAb 滴于硝酸纤维素膜(NC)上,另 1 株猪囊尾蚴囊液抗原 McAb 与胶体金结合,建立了检测脑囊虫病患者脑脊液(CSF)中 CAg 的金标免疫渗滤法(DIGFA),对 48 例脑囊虫病患者 CSF,26 份健康人 CSF 检测,阳性检出率为 77.8%~93.75%,阴性符合率为 96.15%,对 23 例非囊虫病患者 CSF 检测,假阳性有 1 例。

[0011] 后来,刘玉冰等(2002a,2002b)又以抗猪囊尾蚴囊液抗原 4G<sub>2</sub> McAb 制备胶体金探针,将硝酸醋酸混合纤维素膜粘贴在塑料薄片上,其上部紧贴吸水滤纸,在混合纤维素上固定一条猪囊尾蚴囊液抗原线(对照线)和一条单克隆抗体(1F<sub>11</sub>McAb)线(检测线)制作成测试条,建立了金标免疫层析法检测猪囊虫循环抗原的方法。该方法原理为,将测试条插入待测液中,液体向上渗透,流经 McAb 线时,待测液中的 CAg 与其结合成抗原抗体复合物,再加入胶体金标记抗猪囊尾蚴抗原 4G<sub>2</sub>McAb,金标 4G<sub>2</sub>McAb 与检测线上的抗原抗体复合物及对照线上的抗原结合,胶体金颗粒聚集成红色的线而显色,用肉眼就可判断结果,待测液中如无 Cag,金标 McAb 只在对照线上聚集显色,检测线不显色。用该方法检测脑囊虫病人 CSF 和血清各 48 份,阳性检出率分别为 81.25%和 70.83%,检测健康人 CSF 和血清各 26 份,阴性符合率分别为 92.31%和 90.00%,检测 23 份右囊虫病患者 CSF 和血清,交叉反应率分别为 8.70%和 11.32%。检测包虫、血吸虫、华支睾虫患者血清各 10 份,交叉率分别为 20.00%、10.00%和 0。敏感性和特异性与 ELISA 相近。在另一试验中应用同样的胶体金免疫层析法检测囊虫病患者血清 78 份,阳性率为 71.79%,其中 52 例活动型脑囊虫病人血清的阳性率为 80.77%,20 份非活动型脑囊虫病人血清的阳性率为 55%,6 份单纯皮损型囊虫病血清的阳性率为 50%。检测 40 份健康人血清,阴性符合率为 87.5%。

[0012] 袁建华等(2001)在国内外率先开发成功用于囊虫病诊断的 IgG 金标层析法诊断试剂盒,该试剂盒由用囊尾蚴囊液可溶性抗原吸附的硝酸纤维素膜和胶体金标记的抗人 IgG 多克隆抗体及其它试剂组成。采用层析法检测血清中的抗囊 IgG 抗体,用于囊虫病的辅助诊断或流行病学调查。经 133 例囊虫病患者血清和 131 例正常人血清的检测,阳性率为 93.2%,阴性符合率为 99.2%,检测 20 份包虫病人血清,交叉反应率为 45%,检测 20 例其它蠕虫病人血清,未出现交叉反应。其敏感性、特异性和重复性可与酶标法媲美。操作和观察时间仅需 20 分钟左右。不足之处是价格较高。

[0013] 唐雨德等(2004)从 5 株抗囊虫 McAb 和 1 株多抗用于最佳配对的筛选,一株用于

标记胶体金,一株用于包被 NC 膜,以双抗体夹心 ELISA 为对照,试验发现以 1A<sub>5</sub> McAb 为金标抗体,以 1B<sub>6</sub> McAb 为包被抗体制备金免疫层析法(GICA)试纸条的检测效果最佳。用此 GICA 检测 7 份囊虫囊液、48 份囊虫病猪血清,25 份非疫区猪血清、21 份囊虫病人血清、8 份囊虫病人脑脊液和 36 份正常人血清的 CAg,结果显示对囊虫囊液和囊虫病猪血清的阳性率为 100%,非疫区猪的阴性符合率为 100%;囊虫病人血清和脑脊液阳性符合率达 80%,正常人血清全部为阴性。检测时间 5~15 分钟。GICA 试纸条 37℃ 保存 30 天,4℃ 和室温下保存 105 天检测结果未发生改变。

[0014] 但在上述文献报道中均存在以下问题,首先,无论是金标免疫层析法还是金标免疫渗滤法均需制备抗猪囊尾蚴囊液抗原的 McAb,抗体生产成本很高,是限制金标免疫诊断技术在家畜猪囊虫病诊断中应用的主要原因之一。所以至今还没有在家畜检疫中得到推广应用的报道;其次,目前制备胶体金标记的探针工艺,通常先以试管目测法确定抗原或者抗体的用量,为了保证充分包被,避免多余胶体金与非特异蛋白结合而干扰检测结果判断,一般在此基础上再增加 10%~20% 的被包被抗原或抗体的用量,然后又为了去除多余的游离的抗原或抗体,再采用层析或高速离心等纯化处理,这些处理或者对设备条件要求很高,或者处理过程周期长,步骤繁杂,使试剂盒成本增高,不利于产业化开发;再之,采用双夹心金标免疫渗滤法,一块反应盒仅能检测 1 个人的血样,其检测成本高,且效率较低;所以金标免疫法至今还没有在家畜检疫中得到推广应用的报道。

## 发明内容

[0015] 本发明目的是,针对上述现有金标免疫法在检测人体猪囊虫病方法中所存在的速度不快,操作繁琐,需要特定仪器或者检测成本过高等不足,提供一种敏感、特异性强、结果可靠、检测方便,效率较高的,可用于检测家畜猪囊虫病的诊断试剂盒;并提供该试剂盒中猪囊虫抗原胶体金的简便、省本、省时的制备方法;以及应用该试剂盒对猪囊虫病进行简便、快速、准确的诊断方法。

[0016] 本发明斑点金标免疫渗滤法以亲和层析原理为基础,采用硝酸纤维素膜为固相载体,以吸附在硝酸纤维素上的猪的待检血样为固相,以抗原胶体金结合物为液相,并同时作为探针和指示剂,而建立起来的一种新型的免疫检测方法。其中胶体金颗粒的表面带负电荷与囊虫抗原蛋白分子的正电荷基团因静电作用形成牢固的结合,同时金颗粒又有高电子密度的特性,当被金颗粒标记的抗原与相应的抗体配体结合,金颗粒在抗体配体位点大量聚集时,便形成肉眼可见的红色斑点。

[0017] 本发明的目的是通过下述技术方案予以实现的。

[0018] 诊断猪囊虫病斑点金标免疫渗滤试剂盒,包括盒体、内置反应盒、黑色试剂瓶、白色试剂瓶、玻璃毛细管及猪囊虫病标准阳性血纸或血清、阴性血纸或血清;所述反应盒由盒底、盒盖组成,盒盖中央有一直径 0.8cm 圆孔,盒底内装满吸水垫料、紧贴盒盖圆孔下方放一层 1.3×1.3cm 硝酸纤维素膜,紧闭盒盖与盒底即成反应盒;所述白色试剂瓶内装有洗涤液;所述黑色试剂瓶内装有猪囊虫抗原胶体金。

[0019] 一种制备所述试剂盒的方法,其中盒体、反应盒、黑色试剂瓶、白色试剂瓶及玻璃毛细管均为常规实验用品,标准阳性血纸、阴性血纸或标准阳性血清和阴性血清按常规方法制备;所述白色试剂瓶内装有的洗涤液为 pH6.2~6.4 含有 0.7% 牛血清白蛋白(BSA)的

0.01Mol 磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液, 具体由  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.263-0.376g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.109-1.000g、 $\text{NaCl}$  6g、 $\text{KCl}$  0.2g、蒸馏水 1000ml、牛血清白蛋白 7g 配制而成;

[0020] 所述黑色试剂瓶内装有的猪囊虫抗原胶体金按以下步骤制备而成:

[0021] (1) 胶体金的制备以 1% 氯金酸、1% 柠檬酸三钠、1% 鞣酸、25mM  $\text{K}_2\text{CO}_3$  及双蒸水为原料, 先将 1% 氯金酸与双蒸水按体积 1 : 79 配成 A 液; 将 1% 柠檬酸三钠、1% 鞣酸、25mM  $\text{K}_2\text{CO}_3$  与双蒸水按体积 4 : 0.035 ~ 0.080 : 0.035 ~ 0.080 : 15.84 ~ 15.93 配成 B 液; 再将 A 液、B 液在水浴内同时加热到 59 ~ 61°C, 搅拌 A 液, 快速加入 B 液, 继续搅拌 1 分钟, 在 10 ~ 13 分钟内加热至沸腾, 制成颗粒直径 8 ~ 12nm 的胶体金, 该胶体金液颜色由黑 → 蓝 → 紫 → 红色时即成;

[0022] (2) 胶体金 pH 值的调整 将步骤 (1) 胶体金液用 0.25M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  调整 pH 值为 6.8 ~ 7.1 后备用;

[0023] (3) 猪囊虫可溶性抗原的制备与透析将猪囊虫包囊 (包括囊壁、囊液和头节) 置玻璃研磨器中研磨后, 用 0.85%  $\text{NaCl}$  溶液按重量配成 5% 浓度溶液, 置 -25°C 反复冻融 7 次, 期间用 40KHz、400W 超声波裂解处理 5 次, 每次处理 20 分钟, 然后在 4°C 下 13000r/min 离心 60 分钟, 吸取上清液即为猪囊虫可溶性抗原; 将该抗原装入透析袋, 用双蒸水透析去除盐分后, 装瓶冷冻, 备用;

[0024] (4) 猪囊虫抗原包被胶体金将步骤 (3) 猪囊虫可溶性抗原 0.27 ~ 0.30mg, 缓慢加入步骤 (2) 制备的 100ml 胶体金液中进行包被, 搅拌 15 分钟后, 依次加入 10% 迭氮钠 500  $\mu\text{l}$ 、1% 牛血清白蛋白 100  $\mu\text{l}$ , 搅匀后在 2.5 ~ 4.0°C, 1500r/min 条件下离心 30 分钟, 吸取红色上清液, 即成囊虫抗原胶体金, 分装黑色试剂瓶内, 冷藏、备用;

[0025] 一种所述制备方法的优选方案是, 配制胶体金 A 液配方同上, 所述配制胶体金 B 液的组分与含量为 1% 柠檬酸三钠 4.0ml、1% 鞣酸 0.08ml、25mM  $\text{K}_2\text{CO}_3$  0.08ml 与双蒸水 15.84ml; 制成的胶体金颗粒直径为  $10 < D \leq 11\text{nm}$ ; 胶体金液 pH 值调为 7.1; 胶体金液与猪囊虫抗原的体积重量比为 100ml : 0.30mg。

[0026] 一种应用所述试剂盒诊断猪囊虫病的方法, 按以下步骤操作:

[0027] (1) 待检猪干燥血纸或猪血清的制备 采血 5 滴 / 头, 滴在滤纸面上至阴凉干燥即制成猪血纸; 或采猪血 3 ~ 5ml 于干净灭菌的试管中, 置 37°C 水浴中 30 ~ 45min, 3000r/min 离心 30min, 吸取上清液即为猪血清, 冷冻备用;

[0028] (2) 血纸浸出液或血清稀释液的制取 裁取血纸, 按每 0.24cm<sup>2</sup> 加 0.5 毫升生理盐水 (0.85% 氯化钠溶液) 比例在容器内浸泡, 每 10 分钟摇动 1 次, 浸泡 30 分钟后即成血样浸出液; 或是血清, 用生理盐水 (0.85% 氯化钠溶液) 稀释成 128 倍液;

[0029] (3) 血样浸出液或血清稀释液点样 用内径 1mm 玻璃毛细管吸取上述血样浸出液或血清稀释液 1  $\mu\text{l}$ , 点在反应盒圆孔内硝酸纤维素膜面上, 每膜可布点 1 至 4 份待检血样;

[0030] (4) 滴加洗涤液 点血样后在室温下放置 40 ~ 90 秒钟, 滴加 100  $\mu\text{l}$  洗涤液;

[0031] (5) 滴加猪囊虫抗原胶体金 待洗涤液渗入后, 再往反应盒膜面滴加 100  $\mu\text{l}$  猪囊虫抗原胶体金;

[0032] (6) 待猪囊虫抗原胶体金渗入后, 再往反应盒膜面上滴加 100  $\mu\text{l}$  蒸馏水;

[0033] (7) 观察并记录结果 观察反应盒膜面, 若点样处呈现红色斑点即为阳性, 否则为阴性。

[0034] 本发明的有益效果：

[0035] 一是本发明诊断猪囊虫病斑点金标免疫渗滤试剂盒，不需要特殊仪器，仅需按序操作，即可直观鉴别出血样猪有否患猪囊虫病，3 分钟即可检测 20 个血样，比 ELISA 方法操作简便，提高检测效率 20 倍以上。

[0036] 二是本发明是在探明了猪囊虫抗原包被胶体金的最适稳定量及胶体金标记囊虫抗原最佳 pH 值的基础上，将该抗原与胶体金直接结合成抗原胶体金，因无游离的抗原，故结合后不需要浓缩、层析纯化或高速离心纯化等处理，制作工艺简单，省工、省时、节省成本，有利于产业化开发，比目前在人医囊虫病诊断上所用的双夹心金标免疫渗滤法或双抗金标层析法试剂盒（试纸条）降低生产成本 50% 以上，工效提高 20 倍以上。

[0037] 三是该抗原胶体金能检测出人工感染猪囊虫病 21 ~ 28 天及其以上的病猪特异抗体，达到了早期诊断的目的（见试验例 2）；与解剖检虫法阳性符合率为 100%（5/5），阴性符合率为 99.21%（125/126）；与人工感染的血吸虫、肝片吸虫、锥虫、蛔虫、旋毛虫病及自然感染的兔豆状囊尾蚴病之间无交叉反应，具有可用于早期诊断、检测敏感、特异、检出率高等特点。

[0038] 四是诊断试剂在 4℃ 下保存 7 个月，在室温下保存 3 个月，对 20 份阳性及 20 份阴性血纸每月检测一次，每次结果一致，表明该诊断试剂稳定性及重现性均好（见试验例 5）。

[0039] 五是本发明检测方法可以用血纸替代常规血清样品，解决了农村基层制备血清采血量，并需离心设备进行分离加工，血清的输送与贮藏还需冷藏等诸多难题；该方法操作简单，显色快速，将待检血纸浸出液 1  $\mu$  l 点在硝酸纤维素膜上作为固相，一个反应盒最多可点 4 份血样而互不干扰，仅需 100  $\mu$  l（2 滴）猪囊虫抗原胶体金作为流动相，其抗原与特异抗体在数秒钟即能结合，在反应处发生抗原抗体金颗粒聚集，形成肉眼可见的红色斑点即为阳性，阴性则仅留淡褐黄色或粉红色背景，该结果判断容易，并可长期保存，以利于回顾性分析和研究；与现有的诊断猪囊虫病免疫学方法相比其检测工效提高 20 倍以上，显著降低了生产成本。

[0040] 六是这种以红色胶体金标记囊虫抗原来检测血样，可省去酶标法加底物显色的步骤，不用有潜在致癌性的酶的显色底物，更加安全。

## 具体实施方式

[0041] 本发明通过以下实施例和试验例作进一步具体描述。

[0042] 实施例 1：（诊断猪囊虫病斑点金标免疫渗滤试剂盒）

[0043] 盒体内设置的反应盒为长 3cm × 宽 2.5cm × 高 0.6cm 的塑料小盒，分盒底和盒盖两部分，盒盖顶面中央有一个直径为 0.8cm 的小圆孔，盒内垫满吸水材料，在小圆孔下方和吸水材料上方之间放置一张 1.3 × 1.3cm 的硝酸纤维素膜，合紧盒盖即组成反应盒；在试剂盒体内还包含装有囊虫抗原胶体金的黑色试剂瓶和装有洗涤液的白色试剂瓶、点样用的玻璃毛细管及猪囊虫病标准阳性血纸或血清、阴性血纸或血清各 4 份，用于检验试剂盒的有效性；所述黑色试剂瓶、白色试剂瓶，由有弹性的小口塑料瓶体、与之配套的细孔滴嘴和瓶盖组成，容量为 10ml 或 20ml；玻璃毛细管为常规实验用品，内径 1mm。

[0044] 猪囊虫病标准阳性血纸或血清经血清学检查为囊虫病阳性的猪，再经解剖检虫法确认为囊虫病阳性，始可采血制作标准阳性血纸和标准阳性血清，其制备方法是，采上述阳

性猪血 5 滴/头,滴在滤纸面上至阴凉干燥即制成猪血纸;或采阳性猪血 3~5ml 于干净灭菌的试管中,置 37℃ 水浴中 30~45min,3000r/min 离心 30min,吸取上清液即为猪血清,冷冻备用。

[0045] 阴性血纸或血清在囊虫非疫区,经血清学检查为阴性,并经解剖检虫法确证为阴性的猪,始可作为标准阴性血样;其制备方法同上。

[0046] 标准阳性和阴性血纸或血清主要用于检测诊断试剂盒的有效性。在每次试剂盒用于检测之前,须用标准阳性、阴性血纸的生理盐水浸出液 (0.24cm<sup>2</sup>/0.5ml),或者标准阳性和阴性血清的 (128 倍) 稀释液测试,若阳性血样出现红色斑点,阴性血样为黄色或粉红色斑点,说明试剂盒有效,否则为失效,不可再用。

[0047] 实施例 2:(胶体金的制备方法 1)

[0048] 本发明以 1% 氯金酸、1% 柠檬酸三钠、1% 鞣酸、25mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 与双蒸水为原料,采用鞣酸-柠檬酸钠还原法制备胶体金。柠檬酸钠主要为还原剂,而鞣酸具有还原和保护的双重作用,控制“晶核”的形成过程。本例 A 液,B 液各原料组分与含量的配比见表 1:

[0049] 表 1 A 液、B 液的配制 (单位 ml)

[0050]

A 液 80ml	1% 氯金酸	1.0
	双蒸水	79.0
B 液 20ml	1% 柠檬酸三钠	4.0
	1% 鞣酸	0.035
	25mM K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.035
	双蒸水	15.93

[0051] 将配制好的 A 液、B 液在水浴内同时加热到 59~61℃,在电磁搅拌器上搅拌 A 液,快速加入 B 液,继续搅拌 1 分钟,在 10~13 分钟内加热至沸腾,氯金酸在鞣酸-柠檬酸钠还原剂的作用下,使金离子还原成金原子,其胶体金液颜色由黑→蓝→紫→亮红色,此时合成的胶体金颗粒约为 12~13nm,较稳定,在 4℃ 下可保存 10 个月。

[0052] 实施例 3:(胶体金的制备方法 2)

[0053] 表 2 A 液、B 液的配制 (单位 ml)

[0054]

A 液 80ml	1%氯金酸	1.0
	双蒸水	79.0
B 液 20ml	1%柠檬酸三钠	4.0
	1%鞣酸	0.04
	25mMK <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.04
	双蒸水	15.92

[0055] A 液与 B 液的配制与合成方法同实施例 1, 制成的胶体金颗粒直径约 12nm。

[0056] 实施例 4:(胶体金的制备方法 3)

[0057] 表 3 A 液、B 液的配制(单位 ml)

A 液 80ml	1%氯金酸	1.0
	双蒸水	79.0
B 液 20ml	1%柠檬酸三钠	4.0
	1%鞣酸	0.08
	25mMK <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.08
	双蒸水	15.84

[0059] A 液与 B 液的配制与合成方法同实施例 1, 制成的胶体金颗粒直径约 10 ~ 11nm。

[0060] 实施例 5:(猪囊虫可溶性抗原的制备方法)

[0061] 将猪囊虫包囊(包括囊壁、囊液和头节)置玻璃研磨器中研磨后,用 0.85% NaCl 溶液按重量比配成 5% 溶液,置 -25℃ 反复冻融 7 次,期间用 40KHz、400W 超声波探头浸入溶液内进行超声波裂解,每次 20 分钟,先后共处理 5 次,然后在 4℃ 下以 13000r/min 离心 60min,吸取上清液即为猪囊虫可溶性抗原;将上述可溶性抗原装入透析袋,用双蒸水进行透析去除盐分,即为包被胶体金用的猪囊虫抗原。

[0062] 实施例 6:(猪囊虫抗原包被胶体金最适稳定量的测定)

[0063] 猪囊虫抗原的用量(即猪囊虫抗原包被胶体金的量)对胶体金的稳定状态起着决定作用,要求达到在囊虫抗原胶体金中既没有游离的未结合的金颗粒,也没有游离的抗原蛋白质为理想状态,这样的胶体金探针状态稳定,又可简化离心纯化等步骤。

[0064] 首选采用目测法确定胶体金与待标记囊虫抗原用量的大致比例,具体做法是分三批次进行,每批次为 6 支试管,一、二、三批次试管中分别加入实施例 2,3,4 所制的 1ml 胶体

金,再加入不同量的由实施例 5 所制抗原,按表 4、5、6 所示进行。

[0065] 表 4 胶体金与囊虫可溶性抗原用量比例的测定

[0066]

试管号	1	2	3	4	5	6
(实施例 2) 胶体金 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
囊虫可溶性抗原 ( $\mu\text{g}$ )	0.03	0.08	0.16	0.24	0.27	0.31
10% NaCl (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
结果观察	蓝紫	紫	紫红	紫红	红色	红色

[0067] 表 5 胶体金与囊虫可溶性抗原用量比例的测定

[0068]

试管号	1	2	3	4	5	6
(实施例 3) 胶体金 (ml)	1	1	1	1	1	1
囊虫可溶性抗原 ( $\mu\text{g}$ )	0.16	0.19	0.22	0.24	0.27	0.31
10% NaCl (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
结果观察	紫	紫红	紫红	紫红	红色	红色

[0069] 表 6 胶体金与囊虫可溶性抗原用量比例的测定

[0070]

试管号	1	2	3	4	5	6
(实施例 4) 胶体金 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
囊虫可溶性抗原 ( $\mu\text{g}$ )	0.03	0.08	0.16	0.24	0.27	0.31
10% NaCl (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
结果观察	蓝紫	紫	紫红	紫红	红色稍带紫	红色

[0071] 注:未加抗原的胶体金液,在加入 NaCl 溶液后胶体金液由红色变成蓝色;加入抗原量不足者,由红色变紫色或紫红色;加入抗原量达到或超过最低稳定量者,则胶体金液的红色不变,如表 4、5、6 中的第 5、第 5、第 6 管可作为稳定 1ml 胶体金液所需的囊虫可溶性抗原的用量 (0.27-0.31  $\mu\text{g}$ )。

[0072] 实施例 7:(猪囊虫抗原胶体金的制备方法 1)

[0073] 胶体金 pH 值的调整胶体金与猪囊虫抗原的结合在接近等电点的条件下最稳定,

因此,在加囊虫抗原被包胶体金之前,先用 0.25M  $K_2CO_3$  调整胶体金酸碱度至 pH 6.8~7.1,以使胶体金与猪囊虫抗原能够牢固地结合。

[0074] 取实施例 2 所制胶体金液 100ml,在电磁搅拌下用 0.25M  $K_2CO_3$  调 pH 值为 6.8,然后逐滴加入实施例 5 所制猪囊虫可溶性抗原 0.27mg,继续搅拌 15 分钟后,依次加入 10% 迭氮钠 500  $\mu$  l、1% 牛血清白蛋白 100  $\mu$  l,搅匀后,1500r/min 离心 30 分钟,吸出上清红色液体,则为猪囊虫抗原胶体金产品,按包装规格 10ml/瓶或 20ml/瓶分装于黑色塑料试剂瓶内,置 4~8 $^{\circ}C$  保存。

[0075] 实施例 8:(猪囊虫抗原胶体金的制备方法 2)

[0076] 取实施例 3 所制胶体金液 100ml,在电磁搅拌下用 0.25M  $K_2CO_3$  将胶体金 pH 值调至 6.9,然后逐滴加入实施例 5 所制猪囊虫可溶性抗原 0.28mg,其余步骤同实施例 7。

[0077] 实施例 9:(猪囊虫抗原胶体金的制备方法 3)

[0078] 取实施例 4 所制胶体金液 100ml,在电磁搅拌下用 0.25M  $K_2CO_3$  将胶体金 pH 值调至 7.1,然后逐滴加入实施例 5 所制猪囊虫可溶性抗原 0.30mg,其余步骤同实施例 7。

[0079] 实施例 10:(洗涤液的配制)

[0080] 表 7 pH6.2 洗涤液按以下配方配制 (1)

[0081]

原料	用量 (g)
$Na_2HPO_4$	0.263
$KH_2PO_4$	1.109
NaCl	6.0
KCl	0.2
蒸馏水	1000ml
牛血白蛋白	7.000

[0082] 表 8 pH6.4 洗涤液按以下配方配制 (2)

[0083]

原料	用量 (g)
$Na_2HPO_4$	0.376
$KH_2PO_4$	1.000
NaCl	6.0

原料	用量 (g)
KCl	0.2
蒸馏水	1000ml
牛血白蛋白	7.000

[0084] 上面四种原料在蒸馏水中溶解,测 pH 无误后,再加入 7.0gBSA,待完全溶解后按量分装于 10ml 或 20ml 的白色塑料试剂瓶中,保存。

[0085] 实施例 11:(猪囊虫病斑点金免疫渗滤检测方法)

[0086] 按以下具体步骤操作:

[0087] (1) 待检猪干燥血纸或猪血清的制备采猪血,滴在新华滤纸条上,于阴凉处干燥,在室温阴凉干燥的条件下可保存半年(若置封口塑料袋中冷冻或冷藏可保存 2-3 年以上)备用;采猪血 3~5ml 于干净灭菌的试管中,置 37℃ 水浴中 30~45min,3000r/min 离心 30min,吸取上清液即为猪血清。冷冻备用。

[0088] (2) 血纸浸出液或血清稀释液的制取用打孔器裁取干燥血纸圆片(0.24cm<sup>2</sup>)1 片,投入已编号的清洁、干燥试管或青霉素瓶内,加入 0.5 毫升生理盐水(0.85% NaCl)浸泡,每隔 10 分钟摇动 1 次,30 分钟后充分摇匀,则成血纸浸出液;如果是血清,则用生理盐水稀释成 128 倍稀释液;

[0089] (3) 血样浸出液或血清稀释液点样用内径 1mm 玻璃毛细管吸取血样浸出液或血清稀释液 1 $\mu$ l,具体操作是将吸取样液后的玻璃毛细管轻贴硝酸纤维素膜面 0.5 秒钟(即约 1 $\mu$ l)后,立即向上移走毛细管,若 1 个血样,将血样点在塑料反应盒硝酸纤维素膜中央;若 2~4 个血样,则沿距小孔边缘 1mm 左右按顺时针点样,并用记号笔在圆孔外四周按顺时针编上相应血样号;要求每个样品用一根毛细管,以免污染。

[0090] (4) 滴加洗涤液点血样后在室温下放置 40~90 秒钟,滴加实施例 10 制备的洗涤液 2 滴(100 $\mu$ l);

[0091] (5) 滴加猪囊虫抗原胶体金待洗涤液渗入后,再往反应盒膜面滴加 2 滴(100 $\mu$ l)实施例 7、8 或 9 制备的猪囊虫抗原胶体金;

[0092] (6) 待猪囊虫抗原胶体金渗入后,再往反应盒膜面上滴加 2 滴(100 $\mu$ l)蒸馏水或自来水;

[0093] (7) 观察并记录结果观察反应盒膜面,若点血样处呈现红色斑点即为阳性,否则为阴性。

[0094] 试验例说明:

[0095] (1) 供试血纸和血清样品:

[0096] i 人工感染囊虫病猪 21、28、35 和 42 天采血,制备血清及血纸,32 份。

[0097] ii 从河南屠宰场采集的自然感染囊虫病猪血纸及血清 5 份。

[0098] iii 从浙江非疫区采集的 126 头猪血纸。

[0099] (2) 测定试剂,装置与方法:

[0100] 试剂盒 实施例 1;

- [0101] 囊虫抗原胶体金 按实施例 7、8 或 9 制备；  
 [0102] 猪囊虫病斑点金免疫渗滤检测方法 按实施例 11 方法；  
 [0103] ELISA 检测猪囊虫病试剂盒 由浙江省农科院畜牧兽医研究所提供；  
 [0104] 试验例 1：(猪囊虫病不同检测方法符合率对比试验)  
 [0105] 表 9：斑点金标免疫渗滤法与 ELISA 法阳性、阴性符合率对比  
 [0106]

血样来源	数量	斑点金标免疫渗滤法 检测结果			ELISA 法检测结果		
		阳性 (份)	阴性 (份)	阳性率 (%)	阳性 (份)	阴性 (份)	阳性 率 (%)
人工感染猪囊虫病血纸	32	32	0	100	32	0	100
人工感染猪囊虫病血清	32	32	0	100	32	0	100
自然感染囊虫病猪血纸	5	5	0	100	5	0	100
自然感染囊虫病猪血清	5	5	0	100	5	0	100
非疫区猪血纸	126	1	125	0.79	2	124	1.58

[0107] 注：以本发明的斑点金免疫渗滤法与 ELISA 法分别检测人工感染囊虫病猪血纸、血清各 32 份及自然感染囊虫病猪血纸、血清各 5 份，两者检测阳性率均相同，阳性符合率为 100%；用斑点金免疫渗滤法和 ELISA 分别检测非疫区猪阴性血纸、血清各 126 份，其阳性率依次为 0.79% 和 1.58%，阴性率依次为 99.21% 和 98.42%。血纸与血清阳、阴性符合率为 100%。

- [0108] 试验例 2：(猪囊虫病应用不同方法早期诊断效果对比试验)  
 [0109] 表 10：斑点金标免疫渗滤法和 ELISA 法对猪囊虫病早期诊断效果对比  
 [0110]

血样来源	数量	斑点金标免疫渗滤法检测结果			ELISA 法检测结果		
		阳性 (份)	阴性 (份)	阳性 率 (%)	阳性 (份)	阴性 (份)	阳性率 (%)
猪的囊虫病血清 (21 天)	8	8	0	100	8	0	100
猪的囊虫病血清 (28 天)	8	8	0	100	8	0	100

[0111] 以斑点金标免疫渗滤法和 ELISA 法检测人工感染囊虫病 21 天、28 天的猪血清各 8 份,两者阳性检出符合率完全相同。本发明的斑点金标免疫渗滤法可用于猪囊虫病的早期诊断。

[0112] 试验例 3:(猪囊虫病斑点金标免疫渗滤法的特异性试验)

[0113] 以本发明猪囊虫病斑点金标免疫渗滤法试剂盒分别检测人工感染囊虫的猪血清、人工感染血吸虫病猪血清、人工感染肝片吸虫羊血清、人工感染锥虫的羊血清、人工感染蛔虫的猪血清,结果见下表:

[0114] 表 11:猪囊虫病斑点金标免疫渗滤法与其它疾病的交叉反应试验

[0115]

血样	数量 (份)	阳性 (份)	阴性 (份)	阳性反应率 (%)
人工感染囊虫猪血清	20	20	0	100
人工感染血吸虫病猪血清	5	0	5	0
人工感染肝片吸虫病羊血清	15	0	15	0
人工感染锥虫病羊血清	11	0	11	0
人工感染蛔虫病猪血清	7	0	7	0
兔豆状囊尾蚴病兔血清	6	0	6	0
人工感染旋毛虫病猪血清	1	0	1	0

[0116] 由上表可见,本发明斑点金标免疫渗滤法仅对猪囊虫病起反应,囊虫与血吸虫、肝片吸虫、锥虫、蛔虫兔豆状囊尾蚴及旋毛虫等病之间未见交叉反应现象。

[0117] 试验例 4:(猪囊虫病斑点金标免疫渗滤法不同人员、批次的重复性试验)

[0118] 表 12:斑点金标免疫渗滤法检测猪囊虫病的可重复性检验

[0119]

操作人员	1 <sup>1</sup>		2 <sup>1</sup>		3 <sup>1</sup>		1 <sup>2</sup>		2 <sup>3</sup>	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
猪囊虫病 血纸 32 份	32	0	32	0	32	0	32	0	32	0
猪囊虫病 血清 32 份	32	0	32	0	32	0	32	0	32	0
囊虫阴性 血纸 40 份	0	40	0	40	0	40	0	40	0	40
囊虫阴性 血清 40 份	0	40	0	40	0	40	0	40	0	40

[0120] 注:肩号 1、2、3 分别代表使用不同批次制备的囊虫抗原胶体金。

[0121] 由 3 个不同的操作者对 32 份猪囊虫病的猪血纸和血清, 40 份囊虫阴性的猪血纸和血清进行检测, 结果一致; 由相同的操作者用不同批次的猪囊虫抗原胶体金进行检测, 其结果也相同。说明该检测方法的重复性良好。

[0122] 试验例 5:(囊虫抗原胶体金保存期试验)

[0123] 表 13:囊虫抗原胶体金保存期测定

[0124]

保存时间	测定结果			
	4~8℃ 保存		室温 保存	
	阳性血纸	阴性血纸	阳性血纸	阴性血纸
1周	+	-	+	-
0.5个月	+	-	+	-
1个月	+	-	+	-
1.5个月	+	-	+	-
2个月	+	-	+	-
3个月	+	-	+	-
4个月	+	-	-	-
5个月	+	-	/	/
6个月	+	-	/	/
7个月	+	-	/	/
8个月	-	-	/	/

[0125] 注：猪囊虫抗原胶体金系按实施例6方法制备。

[0126] 用在室温（15~32℃）和冷藏保存的囊虫抗原胶体金分别对30份阳性及30份阴性血纸每星期检测一次，二个月后每个月检测一次，试验结果猪囊虫抗原胶体金在4~8℃下可保存7个月仍有效，在室温下可保存3个月之久。

专利名称(译)	诊断猪囊虫病斑点金标免疫渗滤试剂盒其制备及应用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1866014B</a>	公开(公告)日	2010-05-12
申请号	CN200610050841.9	申请日	2006-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院		
申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省农业科学院		
[标]发明人	卢福庄 张雪娟 程天印 项美华 付媛 方兰勇 冯尚连 程菊芬		
发明人	卢福庄 张雪娟 程天印 项美华 付媛 方兰勇 冯尚连 程菊芬		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532		
其他公开文献	CN1866014A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了诊断猪囊虫病斑点金标免疫渗滤试剂盒其制备及应用方法，属于家畜寄生虫病的诊断技术领域。本发明以硝酸纤维素膜为固相载体，吸附猪的待检血样，以猪囊虫抗原与胶体金结合物为液相，并同时作为探针和指示剂，当抗原与相应的抗体配体结合，金颗粒在抗体配体位点大量聚集，便形成肉眼可见的红色斑点。应用时将被检猪血样干纸浸出液或血清稀释液1μl点在硝酸纤维素膜上，加洗涤液100μl，再滴加猪囊虫抗原胶体金100μl，2-3分钟内即形成或不形成红色斑点，结果判断容易，一个反应盒可做1-4份待检血样，检测成本低，具有敏感、特异、检出率高，省工、省时、采血样方便等优点，适用于猪囊虫病诊断与流通市场检疫等领域应用。

A液 80ml	1%氯金酸	1.0
	双蒸水	79.0
B液 20ml	1%柠檬酸三钠	4.0
	1%鞣酸	0.035
	25mMK <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.035
	双蒸水	15.93