

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷
G01N 33/531

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01112708.2

[43]公开日 2002 年 12 月 4 日

[11]公开号 CN 1382990A

[22] 申请日 2001.4.24 [21] 申请号 01112708.2
[71] 申请人 杜凤鸣
地址 200433 上海市黑山路 181 号
[72] 发明人 杜凤鸣

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司
代理人 王 巍

权利要求书 6 页 说明书 17 页 附图 0 页

[54]发明名称 柯萨奇病毒 B 分型免疫球蛋白抗体 G 酶免盒及制备方法

[57]摘要

本发明公开了一种柯萨奇病毒 B1-6 分型抗体 IgG 试剂盒。该试剂盒用 Cox 病毒 B1-6 分型抗原包被, 免疫人 IgG 联接辣根过氧化物酶为检测抗体, 检测血清中的 Cox 病毒 B1-6 分型抗体 IgG。本发明的试剂盒灵敏度和特异性高, 临床应用价值高。本发明提供了制备方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种柯萨奇病毒 B1-6 分型抗体 IgG 试剂盒, 其特征在于该试剂盒用 CoxB 病毒 B1-6 分型抗原包被, 兔抗人 IgG 联接辣根过氧化物酶为检测抗体, 检测血清中的 CoxB 病毒 B1-6 分型抗体 IgG, 并且试剂盒由下列组成:

预包被反应条	48 孔/96 孔(盒)	酶结合物工作液:	1 瓶 (10ml)
样品稀释液	1 瓶 (6ml)	阳性对照	1 支 (200 μ l)
阴性对照	1 支 (200 μ l)	20 倍浓洗涤液	1 瓶 (13ml)
显色剂 A	1 瓶 (3ml)	显色剂 B	1 瓶 (3ml)
终止液	1 瓶 (3ml)		

2. 一种如权利要求 1 所述的一种柯萨奇病毒 B1-6 分型抗体 IgG 试剂盒的制备方法, 其特征在于该方法包括下列步骤:

一、原材料及其规格

CoxB 病毒 B1-6 分型 IgG 抗原的包被;

酶标板: 华东理工大学 ELISA 测定 CV (%) <10%

阳性对照: 诊断心肌炎患者血清, 用本试剂盒测定 A 值 >0.8, 放置 -20℃ 备用;

阴性对照: 选正常人血清, 用本试剂盒测定 A 值 <0.09, 放置 -20℃ 备用;

酶标抗体: 兔抗人 IgG-HRP, (辣根过氧化物酶, RZ>3.0 Sigma 进口)

酶标记兔抗人 IgG, 双扩散 1: 64;

小牛血清: 杭州四季清厂生产;

其它试剂:

Na ₂ CO ₃	A.R
NaHCO ₃	A.R
小牛血清	杭州四季清厂生产
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	A.R
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	A.R
NaCL	A.R
Tweel-20	化学纯
甘油	化学纯
H ₂ O ₂	A.R
柠檬酸.H ₂ O	A.R
TMB	熔点:168℃
EDTA	A.R
H ₂ SO ₄	A.R
Tris	A.R

蒸馏水必需符合《中国药典》(1990) 之规定

细胞及动物要求:

- (1) HeLa 细胞 (ATCC CCL-2)
- (2) 新西兰大白兔 2 公斤左右

二、包被抗原 (CoxB 病毒 1-6 分型抗原) 的制备;

(一) CoxB 病毒 1-6 型的制备

- (1) CoxB 病毒 1-6 型毒种来源: 昆明生物所
- (2) HeLa 细胞来源: 中科院细胞所
- (3) 细胞传代:

① 培养剂配制:

PRMI1640 基础培养过滤除菌, 200ml 基础培养剂中含: 牛血清 10%

青霉素 4 万单位

链霉素 4 万单位

6%NaHCO₃ 4ml

3%谷氨酰胺 6ml

② 胰酶 (DT) 配制:

用无 Ca、Mg 离子溶液配制 0.3%胰酶消化液, 用分散、消化细胞;

③ 细胞传代:

将成片的细胞倾去培养液, 加入 DT 进行细胞消化, 观察细胞已呈疏松网状, 既倒去 DT, 加入营养液后, 分瓶培养培养 3-5 天;

(4) CoxB1-6 型病毒的感染、培养、收毒和鉴定:

- ① 将形态完整、成片的单层细胞倾去培养液后, 用不含牛血清的洗液洗一次;
- ② 细胞感染病毒后, 在 37℃ 吸附 1 小时;
- ③ 补充培养液, 在 37℃ 培养;
- ④ 逐日观察细胞: 至所有细胞产生细胞病变后, 用无菌方法收获病毒;
- ⑤ 微量平底板进行病毒浓度的滴定和病毒鉴定;

病毒滴定:

用 10 倍的倍比稀释的方法进行病毒的稀释, 病毒加入微量板中, 每孔加 50 μ l 病毒, 每个稀释度加 4 孔, 然后加入细胞 50 μ l, 设细胞对照, 按 Reed-Muench 方法计算病毒的 TCID₅₀;

病毒的鉴定:

应用免疫电镜法和应用中和试验方法 (微量滴定法)

1-6 型病毒取 100TCID₅₀, 加入含抗血清的孔内, 25 μ l/孔, 抗血清作 1:4-1:1024 连续 4 倍稀释, 25 μ l/孔, 每个稀释度 4 孔, 将板加盖, 37℃ 中培育 2 小时; 然后每孔内加 HeLa 细胞 50 μ l, 同时设病毒阴性、阳性对照, 逐日观察细胞病变; 是同型的病毒, 能被抗

血清中和、而不出现 CPE;

(5) 抗原的制备、浓缩和纯化:

- ① 病毒灭活;
- ② 去除病毒碎片: 用冷冻离心的方法去除细胞碎片;
- ③ 初步浓缩、提纯: 用 PEG 方法进行提纯;
- ④ 1-6 型病毒的进一步纯化: 用葡聚糖过柱、洗脱的方法, 然后在 A280 的分光光度计进行 1-6 型病毒蛋白含量的测定;

三、兔抗人 IgG (r) 的制备

- (1) 人 IgG (r) 链的制备
- (2) 30ml 人脐带混合血清, 50%及 33%饱和硫酸铵各盐析 1 次, PH7.2PBS 透析去盐, 体积浓缩至 30%;
- (3) 过 Sephadex G200 柱, PH8.0 0.2M Nacl-0.1Mtris 缓冲液洗脱, 分管收集, 第二峰为 IgG;
- (4) 双扩散法鉴定 IgG 纯度;
- (5) 10mM 巯基乙醇 4℃ 3h 解离轻链, 对 PB 透析 24h;
- (6) 再过 Sephadex G200 柱, 洗脱液同上, 收集第一峰 IgG (r) 链;
- (7) 双扩散鉴定 r 链特异性;
- (8) 光密度法测定 IgG (r) 浓度;
- (9) 抗 r 链特异性抗体的制备;
- (10) 1mg/ml r 链加等量福氏完全佐剂研钵中研磨乳化;
- (11) 每只兔颈背部多点注射 3mg r 链抗原, 2 周-1 个月 1 次, 共 5-8 次, 双扩散效价达 1: 64 以上时采集血清;
- (12) 辛酸法纯化抗血清 IgG 部分蛋白定量;

四、酶标记抗体制备

兔抗人 IgG (r) 用过碘酸钠法与辣根过氧化物酶偶联对 PBS 充分透析, 加等体积甘油, -20℃以下保存, 效价>1:1000 (用方阵滴定法测定);

五、酶标记兔抗人 IgG (r) 浓度测定

采用方阵滴定法选择酶标记抗体工作浓度为 1:2000

六、预包被抗原板及试剂盒原料的制备

(10 包被

Na ₂ CO ₃	0.6g
Na ₂ HCO ₃	1.58g
重蒸水	500ml

加入适量 CoxB 病毒 1-6 分型 6 型抗原, 分别调整 PH 至 9.5 加入各型板条各孔中, 置湿盒中加盖, 4℃过夜后甩干;

(2) 洗涤

Tris	2.42g
------	-------

重蒸水 1000ml

加入板条各孔中,静置 5 秒后甩干,上述操作重复 3 次,以除去剩余抗原;

(3) 封闭

蔗糖 100g

羊血清 25ml

0.1MPBS 1000ml

加入各型板条各孔中放入湿盒中(加盖)37℃2h,弃去液体,吸水纸上拍干重复一次,待干燥后,放入有干燥剂的塑料袋封口,保存于4℃;

(4) 阳性对照制备

诊断心肌炎患者的血清,60℃放置 1 小时,除菌过滤,用本试剂盒测定 A 值>0.8 备用,分装;

(5) 阴性对照的制备

正常人血清用本试剂盒测定 A 值 0-0.09 用万分之二硫柳汞防腐备用分装;

(6) 酶标记抗体配制

兔抗人 IgG (r) -HRP	30%小牛血清	
(稀释度 1: 2000)	50% 0.15MPBS	
	20%甘油	
	—————→稀释 20 倍分装	

(7) 酶标记抗体稀释液

小牛血清 30ml

0.15MPBS 50ml

甘油 20ml

20%Tween-20 2.5ml

调 PH 至 7.2

(8) 显色剂 A

Na₂HPO₄·12H₂O 1.7g

柠檬酸·H₂O 0.5g

3%H₂O₂ 200ul

重蒸水 100ml

调 PH 至 5.0

(9) 显色剂 B

EDTA 17.5mg

柠檬酸·H₂O 0.5g

重蒸水 100ml

加入 10ml DMSO 含 60mg TMB 的溶液 25ul

(10) 终止液

浓 H_2SO_4 10ml

蒸馏水 80ml

(11) 20X 洗涤液

Tris 4.84g

重蒸水 100ml

七、半成品的检定

(1) 包被板的检定: $CV(\%) < 10\%$ ($n=10$)

(2) 稳定性检定:

① 阴性对照和阳性对照 $+4^\circ C$ — $+8^\circ C$ 的稳定性检定

试剂盒内设定阴性对照及阳性对照均 $+4^\circ C$ — $+8^\circ C$ 放置 9 个月, 再用该试剂盒测定吸光度在正常范围内;

② 试剂盒 $37^\circ C$ 稳定性检定

装配前一星期将兔抗 IgG-HRP (1+100) (同一批 CoxB 病毒 1-6 型用 IgG-HRP 各检测一次) 置 $37^\circ C$, 并于第 1 天, 第 3 天, 第 5 天, 第 7 天各测定一次, 并用兔抗人 IgG-HRP 置 $-20^\circ C$ 作对照, 测得质控血清 7 天基本不变, 则可以使用;

(3) 特异性检定:

用 69 份质控参比血清来检测半成品, 阴性参比血清允许出现阳性 1 份, 阳性参比血清允许出现阴性 1 份;

阴性质控血清 45 份组成: T1-3: HAV 抗体阳性血清, T4-6: HCV 抗体阳性血清; T7-9: HEV 抗体阳性血清, T10-14: HBV 表面抗体阳性血清, T15-24: CoxB-IgM 阴性血清, T25-27: 类风湿因子阳性血清, T28-30: TB 阳性血清, T31-33: EBV 阳性血清, T34-36: CMV 阳性血清; T37-39: Hop1 阳性血清, T40-42: 抗核抗体阳性血清, T43-45: TOXO 阳性血清, 用 6 型 IgG 包被板测定; 45 份特异性血清应允许 1 份为阳性;

阳性质控血清 24 份组成: Y1-24 阳性血清 (CoxB-IgG1-6 型每型阳性血清 4 份), 24 份阳性血清, 应允许 1 份为阴性, 其余 23 份应检测为阳性;

(4) 灵敏度检定

① 组成:

将中和实验效价高之 CoxB-IgG 阳性血清选择 3 份, 分别编号为: L1#, L2# 和 L3#;

L1# 按以下稀释度稀释:

1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024

L2# 按以下稀释度稀释:

1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048

L3#按以下稀释度稀释:

1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512

②判断标准:

6型对L1#灵敏度应检测到1:32-1:64

6型对L2#灵敏度应检测到1:64-1:128

6型对L3#灵敏度应检测到1:16-1:32

(5) 精密度测定

将同一样品平行加样10孔, 其检测值的1-6型每型1份其变异系数均小于15%(CV%<15);

(6) 酶标抗体稀释液, 底物液经过 37℃细菌培养试验, 发现无菌生长;

八、试剂盒组装

(1) 上述制备步骤所用试剂用过滤器除菌过滤后超净分装;

(2) 试剂盒必需有外包装盒, 海绵垫, 塑料瓶 6 瓶, eppenkof 管 2 支, 包被板, 说明书, 内标签纸 9 张, 外标贴纸 1 张, 批号 lot/EXP, 48T/96T;

九、成品检定

(1) 物理检查

① 药盒外包装, 标签, 批号, 规格 (48T/96T) 有无遗漏;

② 药盒内试剂瓶完整无渗漏, 试剂瓶数和说明书无欠缺, 标签完整, 有效期应清楚明晰;

③ 药盒试剂 (酶标抗体稀释液, 显色剂 A, 显色剂 B, 洗涤液) 核对 PH 值及溶液是否澄清;

(2) 稳定性检定: 完全同半成品检定

(3) 特异性检定: 完全同半成品检定;

(4) 灵敏度: 完全同半成品检定;

(5) 精密性: 完全同半成品检定;

(6) 抽样合格后, 留下 5 个试剂盒剩余入库;

3 个试剂盒

4℃ 2 个 隔一个月测定 1 次

37℃ 1 个 第一次隔三天测定 1 次, 以后每星期测定 1 次, 记录数据, 绘制图表;

2 个试剂盒留库备查

十、保存与有效期

保存于 2-8℃, 自检定后合格之日起有效期为 8 个月。

柯萨奇病毒 B 分型免疫球蛋白抗体 G 酶免盒及制备方法

本发明涉及生物技术产品，具体涉及一种柯萨奇病毒 (Cox) B1-6 分型抗体 IgG 试剂盒及制备方法。

柯萨奇病毒 B1-6 对易感人群具有高度的传染性，儿童是最敏感的人群，病毒流行期儿童的感染率通常为 10-20% 家庭中所有敏感成员通常都被感染，因此，柯萨奇病毒 B 感染所致的相关疾病发病率较高，尤其柯萨奇病毒性心肌炎对儿童具有很大威胁的危害。临床的病原学较早诊断对有效治疗有很重要意义。以往柯萨奇病毒 B 感染和致病的病原学确诊法是病毒分离和心肌荧光染色，但这两种方法的标本采集和处理较复杂，病毒分离和取心肌荧光染色程序烦琐，实验时间很长，因此病毒分离技术和取心肌荧光法的早期诊断优势不大。而从血清中检测柯萨奇病毒 B1-6 型分型抗体 IgG 是病毒较早期感染的主要标志，确定 Cox B1-6 型型别感染是最后的病原学诊断。

本发明的目的在于克服以往方法的不足之处，研制一种灵敏度和特异性高的诊断试剂盒。

本发明提供了一种 Cox B1-6 分型抗体 IgG ELISA 试剂盒，该试剂盒用 Cox B 病毒 B1-6 分型抗原包被，兔抗人 IgG 联接辣根过氧化物酶为检测抗体，检测血清中的 Cox B 病毒 B1-6 分型抗体 IgG，并且试剂盒由下列组成：

预包被反应条	96 孔	酶结合物工作液	1 瓶 (10ml)
样品稀释液	1 瓶 (6ml)	阳性对照	1 支 (200 μ l)
阴性对照	1 支 (200 μ l)	20 倍浓洗涤液	1 瓶 (13ml)
显色剂 A	1 瓶 (3ml)	显色剂 B	1 瓶 (3ml)
终止液	1 瓶 (3ml)		

本发明的另一目的是提供了上述柯萨奇病毒 B1-6 分型抗体 IgG ELISA 试剂盒的制备方法，该方法包括下列步骤：

一、原材料及其规格

Cox B 病毒 B1-6 分型 IgG 抗原的包被。

酶标板：华东理工大学 ELISA 测定 CV (%) <10%

阳性对照：诊断心肌炎患者血清，用本试剂盒测定 A 值 >0.8，放置 -20℃ 备用。

阴性对照：选正常人血清，用本试剂盒测定 A 值 <0.09，放置 -20℃ 备用。

酶标抗体：兔抗人 IgG-HRP，(辣根过氧化物酶，RZ>3.0 Sigma 进口)

酶标记兔抗人 IgG，双扩散 1: 64。

小牛血清：杭州四季清厂生产。

其它试剂：

Na ₂ CO ₃	A.R
NaHCO ₃	A.R
小牛血清	杭州四季清厂生产
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	A.R
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	A.R
NaCL	A.R
Tweel-20	化学纯
甘油	化学纯
H ₂ O ₂	A.R
柠檬酸.H ₂ O	A.R
TMB	熔点:168℃
EDTA	A.R
H ₂ SO ₄	A.R
Tris	A.R

蒸馏水必需符合《中国药典》(1990)之规定

细胞及动物要求：

- (1) Hela 细胞 (ATCC CCL-2)
- (2) 新西兰大白兔 2 公斤左右

二、包被抗体 (CoxB 病毒 1-6 分型抗原) 的制备。

(一) CoxB 病毒 1-6 型的制备

- (1) CoxB 病毒 1-6 型毒种来源：昆明生物所
- (2) Hela 细胞来源：中科院细胞所
- (3) 细胞传代：

① 培养剂配制：

PRMI1640 基础培养过滤除菌，200ml 基础培养剂中含：牛血清 10%

青霉素 4 万单位

链霉素 4 万单位

6%NaHCO₃ 4ml

3%谷氨酰胺 6ml

② 胰酶 (DT) 配制：

用无 Ca、Mg 离子溶液配制 0.3%胰酶消化液，用分散、消化细胞。

③ 细胞传代：

将成片的细胞倾去培养液，加入 DT 进行细胞消化，观察细胞已呈疏松网状，既倒去 DT，加入营养液后，分瓶培养培养 3-5 天。

(4) CoxB1-6 型病毒的感染、培养、收毒和鉴定：

① 将形态完整、成片的单层细胞倾去培养液后，用不含牛血清的洗

液洗一次。

- ② 细胞感染病毒后，在 37℃ 吸附 1 小时。
- ③ 补充培养液，在 37℃ 培养。
- ④ 逐日观察细胞：至所有细胞产生细胞病变后，用无菌方法收获病毒。
- ⑤ 微量平底板进行病毒浓度的滴定和病毒鉴定。

病毒滴定：

用 10 倍的倍比稀释的方法进行病毒的稀释，病毒加入微量板中，每孔加 50 μ l 病毒，每个稀释度加 4 孔，然后加入细胞 50 μ l，设细胞对照，按 Reed-Muench 方法计算病毒的 TCID₅₀；

病毒的鉴定：

应用免疫电镜法和应用中和试验方法（微量滴定法）

1-6 型病毒取 100TCID₅₀，加入含抗血清的孔内，25 μ l/孔，抗血清作 1:4-1:1024 连续 4 倍稀释，25 μ l/孔，每个稀释度 4 孔，将板加盖，37℃ 中培育 2 小时。然后每孔内加 Hela 细胞 50 μ l，同时设病毒阴性、阳性对照，逐日观察细胞病变。是同型的病毒，能被抗血清中和、而不出现 CPE；

(5) 抗原的制备、浓缩和纯化：

- ① 病毒灭活；
- ② 去除病毒碎片：用冷冻离心的方法去除细胞碎片；
- ③ 初步浓缩、提纯：用 PEG 方法进行提纯；
- ④ 1-6 型病毒的进一步纯化：用葡聚糖过柱、洗脱的方法，然后在 A280 的分光光度计进行 1-6 型病毒蛋白含量的测定。

三、兔抗人 IgG (r) 的制备

- (1) 人 IgG (r) 链的制备
- (2) 30ml 人脐带混合血清，50%及 33%饱和硫酸铵各盐析 1 次，PH7.2PBS 透析去盐，体积浓缩至 30%。
- (3) 过 Sephadex G200 柱，PH8.0 0.2M NaCl-0.1Mtris 缓冲液洗脱，分管收集，第二峰为 IgG。
- (4) 双扩散法鉴定 IgG 纯度。
- (5) 10mM 巯基乙醇 4℃ 3h 解离轻链，对 PB 透析 24h。
- (6) 再过 Sephadex G200 柱，洗脱液同上，收集第一峰 IgG (r) 链。
- (7) 双扩散鉴定 r 链特异性。
- (8) 光密度法测定 IgG (r) 浓度。
- (9) 抗 r 链特异性抗体的制备。
- (10) 1mg/ml r 链加等量福氏完全佐剂研钵中研磨乳化。
- (11) 每只兔颈背部多点注射 3mg r 链抗原，2 周-1 个月 1 次，共 5-8 次，双扩散效价达 1: 64 以上时采集血清。

(12) 辛酸法纯化抗血清 IgG 部分蛋白定量。

四、酶标记抗体制备

兔抗人 IgG (r) 用过碘酸钠法与辣根过氧化物酶偶联对 PBS 充分透析, 加等体积甘油, -20°C 以下保存, 效价 $>1:1000$ (用方阵滴定法测定)。

五、酶标记兔抗人 IgG (r) 浓度测定

采用方阵滴定法选择酶标记抗体工作浓度为 $1:2000$

六、预包被抗原板及试剂盒原料的制备

(10) 包被

Na_2CO_3	0.6g
Na_2HCO_3	1.58g
重蒸水	500ml

加入适量 CoxB 病毒 1-6 分型 6 型抗原, 分别调整 PH 至 9.5 加入各型板条各孔中, 置湿盒中加盖, 4°C 过夜后甩干。

(2) 洗涤

Tris	2.42g
重蒸水	1000ml

加入板条各孔中, 静置 5 秒后甩干, 上述操作重复 3 次, 以除去剩余抗原。

(3) 封闭

蔗糖	100g
羊血清	25ml
0.1MPBS	1000ml

加入各型板条各孔中放入湿盒中(加盖) 37°C 2h, 弃去液体, 吸水纸上拍干重复一次, 待干燥后, 放入有干燥剂的塑料袋封口, 保存于 4°C 。

(4) 阳性对照制备

诊断心肌炎患者的血清, 60°C 放置 1 小时, 除菌过滤, 用本试剂盒测定 A 值 >0.8 备用, 分装。

(5) 阴性对照的制备

正常人血清用本试剂盒测定 A 值 $0-0.09$ 用万分之二硫柳汞防腐备用分装。

(6) 酶标记抗体配制

	30%小牛血清
兔抗人 IgG (r) -HRP	50% 0.15MPBS
(稀释度 $1:2000$)	20%甘油

→ 稀释 20 倍分装

(7) 酶标记抗体稀释液

小牛血清	30ml
0.15MPBS	50ml
甘油	20ml
20%Tween-20	2.5ml
调 PH 至 7.2	

(8) 显色剂 A

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.7g
柠檬酸. H_2O	0.5g
3% H_2O_2	200ul
重蒸水	100ml
调 PH 至 5.0	

(9) 显色剂 B

EDTA	17.5mg
柠檬酸. H_2O	0.5g
重蒸水	100ml
加入 10ml DMSO 含 60mg TMB 的溶液 25 μl	

(10) 终止液

浓 H_2SO_4	10ml
蒸馏水	80ml

(11) 20X 洗涤液

Tris	4.84g
重蒸水	100ml

七、半成品的检定

(1) 包被板的检定: $\text{CV}(\%) < 10\%$ ($n=10$)

(2) 稳定性检定:

① 阴性对照和阳性对照+4℃--+8℃的稳定性检定

试剂盒内设定阴性对照及阳性对照均+4℃--+8℃放置 9 个月, 再用该试剂盒测定吸光度在正常范围内。

② 试剂盒 37℃稳定性检定

装配前一星期将兔抗 IgG-HRP (1+100) (同一批 CoxB 病毒 1-6 型用 IgG-HRP 各检测一次) 置 37℃, 并于第 1 天, 第 3 天, 第 5 天, 第 7 天各测定一次, 并用兔抗人 IgG-HRP 置-20℃作对照, 测得质控血清 7 天基本不变, 则可以使用。

(3) 特异性检定:

用 69 份质控参比血清来检测半成品, 阴性参比血清允许出现阳性 1 份, 阳性参比血清允许出现阴性 1 份。

阴性质控血清 45 份组成: T1-3: HAV 抗体阳性血清, T4-6: HCV

抗体阳性血清: T7-9:HEV 抗体阳性血清, T10-14:HBV 表面抗体阳性血清, T15-24:CoxB-IgM 阴性血清, T25-27: 类风湿因子阳性血清, T28-30:TB 阳性血清, T31-33EBV 阳性血清, T34-36CMV 阳性血清, T37-39Hopl 阳性血清, T40-42 抗核抗体阳性血清, T43-45TOXO 阳性血清, 用 6 型 IgG 包被板测定。45 份特异性血清应允许 1 份为阳性。

阳性质控血清24份组成:Y1-24阳性血清 (CoxB-IgG1-6型每型阳性血清4份), 24份阳性血清, 应允许1份为阴性, 其余23份应检测为阳性。

(4) 灵敏度检定

① 组成:

将中和实验效价高之CoxB-IgG阳性血清选择3份, 分别编号为: L1#、L2#和L3#。

L1#按以下稀释度稀释:

1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024

L2#按以下稀释度稀释:

1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048

L3#按以下稀释度稀释:

1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512

②判断标准:

6型对L1#灵敏度应检测到1:32-1:64

6型对L2#灵敏度应检测到1:64-1:128

6型对L3#灵敏度应检测到1:16-1:32

(5) 精密度测定

将同一样品平行加样10孔, 其检测值的1-6型每型1份其变异系数均小于15%(CV%<15)。

(6) 酶标抗体稀释液, 底物液经过 37℃细菌培养试验, 发现无菌生长。

八、试剂盒组装

(1) 上述制备步骤所用试剂用过滤器除菌过滤后超净分装。

(2) 试剂盒必需有外包装盒, 海绵垫, 塑料瓶 6 瓶, eppenkof 管 2 支, 包被板, 说明书, 内标签纸 9 张, 外标贴纸 1 张, 批号 lot/EXP, 48T/96T。

九、成品检定

(1) 物理检查

① 药盒外包装, 标签, 批号, 规格 (48T/96T) 有无遗漏。

② 药盒内试剂瓶完整无渗漏, 试剂瓶数和说明书无欠缺, 标签完整, 有效期应清楚明晰。

③ 药盒试剂（酶标抗体稀释液，显色剂 A，显色剂 B，洗涤液）核对 PH 值及溶液是否澄清。

(2) 稳定性检定：完全同半成品检定

(3) 特异性检定：完全同半成品检定。

(4) 灵敏度：完全同半成品检定。

(5) 精密性：完全同半成品检定。

(6) 抽样合格后，留下 5 个试剂盒剩余入库。

3 个试剂盒

4℃ 2 个 隔一个月测定 1 次

37℃ 1 个 第一次隔三天测定 1 次，以后每星期测定 1 次，记录数据，绘制图表。

2 个试剂盒留库备查

十、保存与有效期

保存于 2-8℃，自检定后合格之日起有效期为 8 个月。

本发明的柯萨奇病毒 B1-6 分型 IgG 抗体试剂盒经上海长海医院临床应用结果如下：

标本：

对本院临床和门诊病人 CoxB1-6 混合型 IgG 抗体阳性的部分血清进一步作 CoxB-IgG 的分型检测。

试剂盒：

上海新新医学生物工程公司 CoxB1-6 分型抗体 IgG 酶联试剂盒。检测模式为间接分步法。

酶标仪：Labsystems Dragon Wellscan MK3

检测结果见下表：

CoxB 分型 IgG 抗体阳性检出率结果								
临床拟诊	例数	1	2	3	4	5	6 型	阳性份数
心肌炎	25	5	5	20	9	7	1	47
上感	5	0	2	2	4	3	0	9
发热待查	4	2	2	2	1	1	1	9

讨论：

1. CoxB1-6 IgG 混合型抗体在多种疾病血清中可呈阳性结果，而本项目中不少病种的检测例数太少，故未再列入 IgG 抗体的分型研究中，无诊断栏中的检测例数虽达 59 例，但分型检测的临床意义不大，所以也未对此类血清作分型实验。本研究共对心肌炎、上感和发热待查三个病种计 34 例阳性血清作了分型检测。

2. 从上表数据可看出，多数病例的同一份血清往往呈现 CoxB 二个型以上的 IgG 抗体阳性结果，在 25 例心肌炎中，一个型别抗体阳性的有 7 例，2 个型别抗体阳性的有 11 例，3 个型别抗体阳性的有 5

例，4个型别抗体阳性的有2例。上感和发热待查的9份病例全部是2个型别以上同时阳性，这反映柯萨奇病毒B组病毒的感染可能以混合型感染为主。

3. 从分型检测中初步显示，CoxB病毒性心肌炎中以CoxB3型的感染为主，6型的感染极少，1、2、4、5型也有，但较少。上感与CoxB2、3、4、5型的感染均有关系，但与CoxB1、6两型关系不大。CoxB引起的不明发热，因病例太少，似难以断定主要与CoxB的哪一型别有关。

经上海第二医科大学附属新华医院临床应用结果如下：

应用上海新新医学生物工程公司提供的《柯萨奇病毒B1-6分型抗体IgG酶联免疫(ELISA)诊断试剂盒》对部分CoxB1-6混合型IgG抗体阳性血清作分型检测，实验按试剂盒说明书操作，酶标仪为Drganon Teknika Reader 530，试剂盒系采用间接ELISA法，分型检测的总结果见下表。

分型抗体检测结果

诊 断	例数	1	2	3	4	5	6	主型
心肌炎	20	2	5	16	8	4	0	3
上感	10	0	1	2	6	6	1	4、5
肺炎	11	1	7	3	3	5	0	2、5
肝炎	5	1	1	3	0	5	0	3、5

结果分析：

1. 凡CoxB1-6混合型IgG抗体阳性的血清作分型IgG抗体检测时，全部有至少一型IgG抗体阳性、也即混合型IgG抗体阳性，分型IgG抗体也阳性。

2. CoxB感染的心肌炎，主型是3型，其中单独2型抗体阳性1例，单独4型抗体阳性2例，而凡3型抗体阳性的血清均同时伴有其它型抗体的阳性，从表中可见，CoxB6型似与心肌炎感染无关。10例上感中，单独4型阳性抗体的有3例，单独5型抗体阳性的也有3例，3、4、5型同时阳性的2例，2、5型阳性1例，4、6型阳性1例，可见上感主要与CoxB4、5型感染有关，与1、2、6型关系较少。肺炎与CoxB之间的关系和上感大致相似，也是与2、5两型关系较密切。肝炎患者血清中也常有CoxB IgM和IgG抗体的阳性，进一步的分型检测说明主要与CoxB3、5两型有关，尤其是5型，在5例混合型IgG阳性的血清中，5例均出现CoxB5型抗体阳性，而在所分型的5例中未查到4型和6型抗体阳性。

3. 本项分型检测中，大多数病例的血清出现了二型以上抗体同时阳性的结果，这说明是几型病毒的混合感染呢？还是由于包被病毒抗原的交叉反应所致？对病例进一步分析，我们认为以多型病毒的

混合感染为主。

经上海中医药大学附属曙光医院临床应用结果如下：

一、材料

1. “柯萨奇病毒 B1-6 分型抗体 IgG 酶联免疫诊断试剂盒” 由上海新新医学生物工程公司提供。
2. 检测样品为本院应用该公司的 “CoxB1-6 混合型 IgG 抗体试剂盒” 检测为阳性结果的血样共 28 份。

二、方法

根据试剂盒规定应用 ELISA 间接法测定病人血清中的 CoxB1-6 分型 IgG 抗体，操作步骤按说明书进行。酶标仪为 Labsystems Dragon Wellscan MK3。

三、CoxB1-6 分型 IgG 抗体检测一览表。

病 名	序号	1	2	3	4	5	6 型
心肌炎	1			+	+	+	
	2			+		+	
	3		+	+	+		
	4			+	+		
	5			+			
	6		+	+		+	
	7			+			
	8			+	+		
	9	+		+		+	+
	10			+			
	11		+				
	12						+
	13	+	+	+	+		
	14			+	+		
	15			+	+		
	16		+				
	17			+	+		+
	18	+		+			
上感	1		+		+		
	2			+		+	
	3		+			+	+
	4			+	+	+	
	5			+	+		
	6	+				+	
心律失常	1	+		+			

四、讨论

1. 本项研究中选择了心肌炎的部份 CoxB1-6 IgG 阳性病例以及所有上感和心律失常 CoxB1-6 混合型 IgG 阳性病例作进一步分型抗体检测, 结果凡混合型 IgG 抗体阳性的血清, 作分型 IgG 抗体检测也至少有一型以上阳性, 这说明该公司的混合型试剂盒和分型试剂盒能互相印证, 检测结果正确。

2. 本研究中分型检测血清共 28 份, 单独一个型别病毒抗体阳性的血清只有 6 份, 其余 22 份血清为二个以上型别的病毒抗体同时阳性, 说明柯萨奇 B 组病毒感染可能系以多型病毒混合感染为主。

3. 从 18 份心肌炎分型检测的结果中可以看出, 18 份心肌炎分型检测血清中 CoxB3 型占 15 份, 4 型占 8 份, 所以初步提示柯萨奇病毒引起的心肌炎主要与 CoxB3 型感染为主, CoxB4 型次之。

4. 上感的主型 CoxB 病毒为 3、4、5 型, 另三型病毒也有合并感染的情况, 但阳性率较低。心律失常似乎与 COXB3 型关系更密切些, 但检测病例数较少, 尚须进一步观察。

本申请的柯萨奇病毒 B1-6 抗体 IgG 分型 ELISA 试剂盒。其检测方法简便快速, 收费低廉, 灵敏度和特异性均较高, 它是柯萨奇病毒 B 感染疾病较早期诊断的鉴别诊断的可靠病原学指标, 能最后确定 CoxB1-6 型感染的型别, 临床应用价值较高, 有较明显的社会和经济效益。

实施例

检测 CoxB1-6 分型抗体 IgG 试剂盒的制备。

一、主要原材料

1. HeLa细胞	中科院细胞所
2. Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	上海新华化工厂
3. NaCl	上海试剂一厂
4. KCl	江苏常熟化工厂
5. CaCl ₂	江苏常熟化工厂
6. 葡萄糖	成都化学试剂厂
7. EDTA	上海试剂一厂
8. 水解乳蛋白	上海试剂二厂
9. 谷氨酸	上海试剂二厂
10. 谷氨酰胺	上海化学试剂分装厂
11. L赖氨酸	上海生化所

12. L精氨酸 L组氨酸 L蛋氨酸	上海试剂二厂
13. 小牛血清	杭州四季青生物材料工程公司
14. 胰蛋白酶	美国Sigma公司
15. 氯化铯	美国Sigma公司
16. 辣根过氧化物酶	美国Sigma公司
17. TMB	上海东风试剂厂
18. 高碘酸钠	上海化学试剂分装厂
19. 硼氢化钾	上海试剂一厂
20. 酶标板	华东理工大学新分离技术研究室

二、CoxB1-6包被病毒抗原的制备

1. CoxB病毒1-6型毒种来源：昆明生物所

2. Hela 细胞来源：中科院细胞所

3. 细胞传代：

① 培养剂配制：PRMI1640基础培养剂过滤除菌，200ml基础培养剂中含：

牛血清	10%
青霉素	4万单位
链霉素	4万单位
6%NaHCO ₃	4ml
3%谷氨酰胺	6ml

② 胰酶(DT)配制：

用无Ca、Mg离子溶液配制0.3%胰酶消化液，用分散、消化细胞。

③ 细胞传代：

将成片的细胞倾去培养液，加入DT进行细胞消化，观察细胞已呈疏松网状，即倒去DT，加入营养液后，分瓶培养3-5天。

4. 病毒的感染、培养、收毒和鉴定：

① 将形态完整、成片的单层细胞倾去培养液后，用不含牛血清的洗液洗一次。

② 细胞感染病毒后，在37℃吸附1小时。

③ 补充培养液，在37℃培养。

④ 逐日观察细胞，至所有细胞产生细胞病变后，用无菌方法收获病毒。

⑤ 微量平底板进行病毒浓度的滴定和病毒鉴定：

病毒滴定：用10倍的倍比稀释方法进行病毒的稀释，病毒加入微量板中，每孔加50 μl病毒，每个稀释度加4孔，然后加入细胞50 μl，设细胞对照，按Reed-Muench方法计算病毒的TCID₅₀，本法培养病毒效价为TCID₅₀>10⁻⁵。

病毒的鉴定：

A. 应用免疫电泳法;

B. 应用中和试验方法(微量滴定法)

病毒取 100TCID₅₀, 加入含抗血清的孔内, 25 μ l/孔, 抗血清作 1:4-1:1024 连续 4 倍稀释, 25 μ l/孔, 每个稀释度 4 孔, 将板加盖, 37℃中培育 2 小时。然后每孔内加 Hela 细胞 50 μ l, 同时设病毒阴性、阳性对照, 逐日观察细胞病变。是同型的病毒, 能被抗血清中和、而不出现 CPE;

三、抗原的制备、浓缩和纯化:

1. 病毒灭活;

2. 去除病毒碎片: 用冷冻离心的方法去除细胞碎片;

3. 初步浓缩、提纯: 用 PEG 方法进行提纯;

4. 病毒的进一步纯化: 用葡聚糖过柱、洗脱的方法, 然后在 A280 的分光光度计进行蛋白含量的测定;

5. 包被聚苯乙烯微孔板测定包被浓度和活性, 1mg/ml 病毒的包被浓度为 1:1000;

四、兔抗人 IgG (r) 抗体的制备

1. 人 IgM (r) 链的制备

① 30ml 人脐带混合血清, 50%及 33%硫酸铵饱和度各盐析 1 次, PH7.2PBS 透析去盐, 体积浓缩至 30%;

② 过 sephadex G200 柱 PH8.0 0.2M NaCl-0.1M Tris 缓冲液洗脱, 分管收集, 第二峰为 IgG。

③ 双扩散法鉴定 IgG 纯度。

④ 10mM 巯基乙醇 4℃ 3h 解离轻链, 对 PBB 透析 24h。

⑤ 再过 sephadex G200 柱, 洗脱液同上, 收集第一峰 IgG (r) 链。

⑥ 双扩散鉴定 r 链特异性。

⑦ 光密度法测定 IgG (r) 浓度。

2. 抗 r 链特异性抗体的制备

① 1mg/ml r 链加等量福氏完全佐剂研钵中研磨乳化。

② 每只兔颈背部多点注射 3mg r 链抗原, 2 周—1 个月 1 次, 共 5-8 次, 双扩效价达 1:64 以上时采集血清。

③ 辛酸法纯化抗血清 IgG 部份, 蛋白定量。

五、兔抗人 IgG (r) 酶标记物的制备。

1. 称 5mg 辣根过氧化物酶加 0.5ml 蒸馏水, 再加 0.5ml 60mM 过碘酸钠液氧化 15' 4℃中。

2. 加 0.16M 乙二醇 0.5ml 中止氧化, 4℃30'。

3. 加 10mg/ml 兔抗人 IgG (r) 0.5ml, 装袋对碳酸钠缓冲液透析过夜。

4. 加 5mg/ml 硼氢化钾 0.2ml, 4℃3h 再装透析袋对 PH7.2 0.01M PBS 透析 24h, 换液 4-5 次。

5. 取出兔抗人IgG(r)-HRP作工作浓度测定, 配成1mg/ml浓度时的工作效价为1:2000。

六、阴、阳性对照血清配制

从病毒攻击的细胞保护试验筛选阴性和阳性对照血清, 并将阳性血清定值。

七、CoxB1-6 IgG分型试剂盒操作方法建立

1. 预包被CoxB-IgG1-6型板的制备 (10 μ g/ml抗原量)。CoxB IgG分型试剂盒操作流程。
2. 在试管中将待检血清, 用PBS作1: 50稀释 (10倍PBS1ml+9ml蒸馏水即为工作浓度)。
3. 各孔中滴加100 μ l滴样品稀释液, 然后分别加待检血清5 μ l, 同时做阳性对照1孔, 阴性对照1孔 (各加50 μ l), 空白对照1孔 (孔含样品稀释液2滴)。
4. 置37℃温箱中反应60分钟, 甩去孔内液体先在草纸上拍2-3下, 然后用洗涤液洗5次, 每次条孔加满洗涤液后停留30秒钟, 每次甩去洗涤液后都要在草纸上拍干, 以便洗涤彻底。(10倍浓洗涤液1ml+9ml蒸馏水即为工作洗涤液)。
5. 各孔加酶标记液1滴 (50 μ l), 置37℃中反应60分钟。
6. 同上彻底洗涤拍干。
7. 各孔滴加显色剂A、B各1滴, 置37℃中反应10-15分钟再每孔滴加终止液1滴, 置酶标仪中450nm波长读数。
8. 结果判定:

阴性对照A值 $\times$ 2.5=临界值, 凡待检标本孔A值大于临界值即为阳性。阴性对照小于0.09按0.09计算。

八、灵敏度测定

选中和实验CoxB-IgG阳性血清3份, 编号为L1#、L2#和L3#。

用CoxB1-6 IgG分型试剂盒分别对

L1#按以下稀释度稀释:

1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024检测

L2#按以下稀释度稀释:

1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048检测

L3#按以下稀释度稀释:

1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512检测

判断标准:

CoxB1-6型试剂盒对L1#灵敏度应检测到1:32-1:64

CoxB1-6型试剂盒对L2#灵敏度应检测到1:64-1:128

CoxB1-6型试剂盒对L3#灵敏度应检测到1:16-1:32

九、特异性检定:

用 69 份内控参比血清来检测半成品，阴性参比血清允许出现阳性 1 份，阳性参比血清允许出现阴性 1 份。

阴性质控血清 45 份组成：T1-3：HAV 抗体阳性血清，T4-6：HCV 抗体阳性血清，T7-9：HEV 抗体阳性血清，T10-14：HBV 表面抗体阳性血清，T15-24：CoxB-IgM 阴性血清，T25-27：类风湿因子阳性血清，T28-30：TB 阳性血清，T31-33EBV 阳性血清，T34-36CMV 阳性血清，T37-39Hopl 阳性血清，T40-42 抗核抗体阳性血清，T43-45TOXO 阳性血清，用 6 型 IgG 包被板测定。45 份特异性血清应允许 1 份为阳性。

阳性质控血清 20 份组成：Y1-24 阳性血清（CoxB-IgG1-6 型每型阳性血清 4 份），24 份阳性血清，应允许 1 份为阴性，其余 23 份应检测为阳性。

十、精密度试验

取实验吸光度分别为高中低 A 值的 3 份阳性血清做精密度试验，批内试验为每份血清同时做 10 个复孔，批间试验为每份血清间隔 2-3 天，实验 1 次，共测定 6 次，结果如下：

B1 型试剂盒批内试验：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	S	CV(%)
1	1.11	1.20	1.18	1.24	1.09	1.06	1.22	1.14	1.13	1.07	1.144	0.063	5.5
2	0.76	0.74	0.68	0.67	0.75	0.66	0.70	0.71	0.69	0.80	0.716	0.045	6.3
3	0.41	0.38	0.40	0.36	0.44	0.37	0.38	0.39	0.34	0.43	0.390	0.031	7.9

平均批间 CV=6.5%

B1 型试剂盒批间试验

	1	2	3	4	5	6	X	S	CV(%)
1	1.06	1.11	1.10	0.99	0.95	1.03	1.04	0.063	6.02
2	0.76	0.68	0.74	0.69	0.81	0.75	0.738	0.047	6.5
3	0.41	0.37	0.36	0.43	0.38	0.35	0.383	0.031	8.03

平均批间 CV=6.85%

B2 型试剂盒批内试验：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	S	CV(%)
1	1.09	1.11	0.99	0.98	1.04	1.12	1.02	1.11	1.01	1.06	1.053	0.053	5.0
2	0.67	0.73	0.64	0.65	0.72	0.74	0.60	0.69	0.70	0.63	0.677	0.047	6.9
3	0.51	0.48	0.49	0.45	0.54	0.55	0.47	0.44	0.50	0.43	0.486	0.040	8.3

平均批间 CV=6.73%

B2 型试剂盒批间试验

	1	2	3	4	5	6	X	S	CV(%)
1	1.11	1.05	0.97	1.01	0.95	1.09	1.030	0.064	6.26
2	0.71	0.74	0.66	0.68	0.73	0.64	0.69	0.040	5.74
3	0.53	0.50	0.47	0.48	0.42	0.54	0.49	0.044	8.94

平均批间 CV=6.98%

B3 型试剂盒批内试验:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	S	CV(%)
1	1.34	1.31	1.40	1.33	1.30	1.38	1.42	1.41	1.33	1.37	1.359	0.043	3.1
2	0.86	0.94	0.78	0.87	0.85	0.76	0.80	0.81	0.79	0.90	0.836	0.057	6.9
3	0.61	0.58	0.60	0.55	0.63	0.56	0.59	0.58	0.55	0.62	0.587	0.028	4.8

平均批间 CV=4.9%

B3 型试剂盒批间试验

	1	2	3	4	5	6	X	S	CV(%)
1	1.34	1.39	1.30	1.29	1.36	1.25	1.32	0.051	3.87
2	0.86	0.94	0.80	0.79	0.91	0.81	0.852	0.062	7.33
3	0.61	0.57	0.55	0.62	0.57	0.55	0.578	0.030	5.18

平均批间 CV=5.46%

B4 型试剂盒批内试验:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	S	CV(%)
1	0.95	0.91	0.89	0.86	0.98	0.85	0.83	0.87	0.97	0.88	0.899	0.052	5.78
2	0.78	0.72	0.69	0.73	0.68	0.79	0.64	0.62	0.81	0.83	0.729	0.072	9.9
3	0.39	0.43	0.36	0.34	0.44	0.38	0.38	0.40	0.36	0.37	0.385	0.031	8.14

平均批间 CV=7.94%

B4 型试剂盒批间试验

	1	2	3	4	5	6	X	S	CV(%)
1	0.91	0.97	0.84	0.88	0.96	0.86	0.903	0.053	5.8
2	0.78	0.73	0.65	0.63	0.71	0.61	0.685	0.066	9.58
3	0.39	0.43	0.34	0.41	0.37	0.36	0.383	0.033	8.68

平均批间 CV=8.05%

B5 型试剂盒批内试验:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	S	CV(%)
1	0.87	0.90	0.84	0.83	0.89	0.92	0.93	0.86	0.84	0.82	0.87	0.038	4.4
2	0.69	0.67	0.72	0.73	0.66	0.64	0.68	0.75	0.63	0.65	0.682	0.040	5.9
3	0.32	0.36	0.35	0.30	0.31	0.29	0.34	0.36	0.38	0.29	0.33	0.032	9.79

平均批间 CV=6.7%

B5 型试剂盒批间试验

	1	2	3	4	5	6	X	S	CV(%)
1	0.87	0.94	0.85	0.95	0.83	0.84	0.88	0.052	5.9
2	0.69	0.75	0.62	0.67	0.74	0.64	0.685	0.052	7.66
3	0.32	0.38	0.40	0.33	0.34	0.35	0.353	0.031	8.7

平均批间 CV=7.42%

B6 型试剂盒批内试验:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	S	CV(%)
1	1.23	1.25	1.29	1.26	1.19	1.17	1.15	1.24	1.25	1.26	1.229	0.044	3.6
2	0.65	0.71	0.57	0.66	0.64	0.58	0.59	0.64	0.58	0.69	0.631	0.049	7.7
3	0.30	0.27	0.29	0.31	0.34	0.26	0.28	0.27	0.28	0.31	0.291	0.024	8.3

平均批间 CV=6.53%

B6 型试剂盒批间试验

	1	2	3	4	5	6	X	S	CV(%)
1	1.23	1.28	1.19	1.18	1.25	1.14	1.211	0.051	4.2
2	0.65	0.73	0.59	0.70	0.60	0.64	0.651	0.055	8.4
3	0.30	0.26	0.25	0.31	0.27	0.26	0.275	0.024	8.8

平均批间 CV=7.13%

十、CoxB1-6 分型抗体 IgG 稳定性试验

试剂盒置 37℃温箱中保存, 在 0-7 天中分别测 O.D 值。

CoxB1-6分型: B1型试剂盒

A450	0天	一天	二天	三天	四天	五天	六天	七天
药盒阴性对照	0.073	0.071	0.073	0.070	0.068	0.069	0.065	0.063
药盒阳性对照	0.698	0.701	0.697	0.693	0.695	0.689	0.687	0.681

CoxB1-6分型: B2型试剂盒

A450	0天	一天	二天	三天	四天	五天	六天	七天
药盒阴性对照	0.063	0.060	0.061	0.059	0.053	0.049	0.048	0.048
药盒阳性对照	0.782	0.738	0.777	0.781	0.749	0.745	0.743	0.739

CoxB1-6分型: B3型试剂盒

A450	0天	一天	二天	三天	四天	五天	六天	七天
药盒阴性对照	0.087	0.084	0.083	0.085	0.081	0.082	0.079	0.077
药盒阳性对照	0.937	0.939	0.935	0.931	0.933	0.929	0.925	0.921

CoxB1-6分型：B4型试剂盒

A450	0天	一天	二天	三天	四天	五天	六天	七天
药盒阴性对照	0.074	0.075	0.072	0.068	0.085	0.084	0.072	0.077
药盒阳性对照	0.727	0.730	0.729	0.717	0.715	0.716	0.698	0.695

CoxB1-6分型：B5型试剂盒

A450	0天	一天	二天	三天	四天	五天	六天	七天
药盒阴性对照	0.068	0.063	0.064	0.063	0.065	0.062	0.059	0.060
药盒阳性对照	0.808	0.811	0.814	0.815	0.801	0.797	0.795	0.796

CoxB1-6分型：B6型试剂盒

A450	0天	一天	二天	三天	四天	五天	六天	七天
药盒阴性对照	0.077	0.072	0.073	0.068	0.072	0.070	0.067	0.065
药盒阳性对照	0.611	0.610	0.589	0.593	0.606	0.583	0.578	0.573

CoxB1-6 型各型试剂盒的灵敏度高、特异性好、精密度高和稳定性好。

专利名称(译)	柯萨奇病毒B分型免疫球蛋白抗体G酶免盒及制备方法		
公开(公告)号	CN1382990A	公开(公告)日	2002-12-04
申请号	CN01112708.2	申请日	2001-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
当前申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
[标]发明人	杜凤鸣		
发明人	杜凤鸣		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	王巍		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种柯萨奇病毒B1 - 6分型抗体IgG试剂盒。该试剂盒用Cox病毒B1 - 6分型抗原包被,免抗人IgG联接辣根过氧化物酶为检测抗体,检测血清中的Cox病毒B1 - 6分型抗体IgG。本发明的试剂盒灵敏度和特异性高,临床应用价值高。本发明提供了制备方法。

柯萨奇病毒B1 - 6分型抗体IgG试剂盒

临床拟诊	例数	1	2	3	4	5	6型	阳性份数
心肌炎	25	5	5	20	9	7	1	47
上感	5	0	2	2	4	3	0	9
发热待查	4	2	2	2	1	1	1	9

讨论: