

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810069585.7

[43] 公开日 2008 年 9 月 17 日

[11] 公开号 CN 101266253 A

[22] 申请日 2008.4.25

[21] 申请号 200810069585.7

[71] 申请人 中国人民解放军第三军医大学

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号

[72] 发明人 张锡林

[74] 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司

代理人 赵荣之

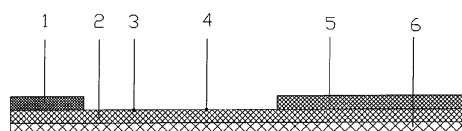
权利要求书 4 页 说明书 17 页 附图 5 页

[54] 发明名称

肺吸虫病检测试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种肺吸虫病检测试剂盒及其制备方法，该试剂盒包括检测条、样品稀释液，检测抗原为氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示的肺吸虫 ESP 蛋白；本发明试剂盒的制备方法包括肺吸虫 ESP 蛋白及其多克隆抗体的制备、标记的肺吸虫 ESP 蛋白的制备、检测层、样品垫、吸收垫、检测条及试剂盒的制备等多个步骤；采用本发明制备方法制得的试剂盒具有高度特异、敏感性，与肝吸虫病、血吸虫病的交叉反应干扰小，假阳性率低于 ELISA 法，并具有疗效考核作用，在肺吸虫病经有效药物治疗后 3-6 月，检测结果将转阴，转阴率高于 ELISA 法，可以准确、快速、简便地进行肺吸虫病的诊断与鉴别诊断、以及疗效考核，具有重要的临床应用价值。



1、一种肺吸虫病检测试剂盒，包括检测条、样品稀释液，其特征在于：检测抗原为肺吸虫 ESP 蛋白，其氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

2、根据权利要求 1 所述的肺吸虫病检测试剂盒，其特征在于：所述检测抗原为胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的肺吸虫病检测试剂盒，其特征在于：所述检测条由样品垫（1）和吸收垫（5）顺序贴附于带背衬（6）的检测层（2）上构成；检测层（2）上包被有抗人 IgG 抗体形成的检测线（3）和抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体形成的质控线（4）。

4、根据权利要求 2 所述的肺吸虫病检测试剂盒，其特征在于：所述样品稀释液为浓度为 0.01-0.05 mol/L、pH 值为 7.0-7.2 的磷酸盐缓冲液即 PBS 缓冲液，内含浓度为 5-8 $\mu\text{g/ml}$ 的胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白、质量百分浓度为 1% 的牛血清白蛋白即 BSA。

5、根据权利要求 3 所述的肺吸虫病检测试剂盒，其特征在于：所述样品稀释液为浓度为 0.01-0.05 mol/L、pH 值为 7.0-7.2 的 PBS 缓冲液，内含浓度为 5-8 $\mu\text{g/ml}$ 的胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白、质量百分浓度为 1% 的 BSA。

6、根据权利要求 1、2、4、5 之任一权利要求所述的肺吸虫病检测试剂盒，其特征在于：所述试剂盒内还有样品稀释孔。

7、根据权利要求 3 所述的肺吸虫病检测试剂盒，其特征在于：所述试剂盒内还有样品稀释孔。

8、权利要求 1 所述的肺吸虫病检测试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

a. 肺吸虫 ESP 蛋白的制备：肺吸虫 ESP 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID No.2 所示，其编码基因序列如 SEQ ID No.1 所示，根据氨基酸或核苷酸序列制备，即得肺吸虫 ESP 蛋白；

b. 抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体的制备：用肺吸虫 ESP 蛋白于哺乳动物的肌肉或皮下注射进行多次免疫，收集被免疫动物的血液，分离血清，即得抗

肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体;

c. 标记的肺吸虫 ESP 蛋白的制备: 用标记物对肺吸虫 ESP 蛋白进行标记, 即得标记的肺吸虫 ESP 蛋白;

d. 检测层的制备: 将硝酸纤维素即 NC 膜置浓度为 0.01-0.05 mol/L、pH 值为 8.0-8.2、含有质量百分浓度为 1%的 BSA、质量百分浓度为 1%的吐温-20 的 PBS 缓冲液中浸泡 30 分钟, 于温度为 37℃的条件下烘干; 用抗体稀释液即浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.0-8.2、含有质量百分浓度为 1%的 BSA 的 PBS 缓冲液, 对浓度为 1 mg/ml 的抗人 IgG 抗体溶液、浓度为 1 mg/ml 的抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体溶液分别进行 1: 500-1: 1000 稀释; 将稀释后的抗人 IgG 抗体溶液、抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体溶液, 用点膜仪以每厘米 2-3 μ l 体积分别喷到 NC 膜上, 形成检测线和质控线; 包被有检测线和质控线的 NC 膜经真空干燥后, 用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.8-9.0、含有质量百分浓度为 1%的 BSA 的 PBS 缓冲液封闭 2 小时, 再用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.8-9.0 的 PBS 缓冲液洗涤, 真空干燥, 即得检测层;

e. 样品垫的制备: 将吸水滤纸置浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 7.2 的 PBS 缓冲液中浸泡 30 分钟, 于温度为 37℃条件下烘干, 即得样品垫;

f. 吸收垫的制备: 取吸水滤纸, 即得吸收垫;

g. 检测条的制备: 将样品垫 1 和吸收垫 5 顺序贴附于带背衬 6 的检测层 2 上, 即得检测条;

h. 试剂盒的制备: 将检测条、样品稀释液、样品稀释孔装盒, 即得试剂盒; 其中, 样品稀释液为浓度为 0.01-0.05 mol/L、pH 值为 7.0-7.2、含有浓度为 5-8 μ g/ml 的标记的肺吸虫 ESP 蛋白、质量百分浓度为 1%的 BSA 的 PBS 缓冲液。

9、根据权利要求 8 所述的肺吸虫病检测试剂盒的制备方法, 其特征在于所述步骤 a 中肺吸虫 ESP 蛋白的制备采用以下方法:

以斯氏狸殖吸虫成虫总 RNA 为模板, 采用如下简并引物: 上游引物 5'-TCA (AG) GG (AGCT) CA (AG) TG (CT) GG (AGCT) TC (AGCT) TG (CT) TGG-3', 下游引物 5'-CCA (AG) CT (AG) TT (CT) TT (AGCT) AC (AG) ATCCA (AG) TA-3',

进行逆转录聚合酶链式反应，得到肺吸虫 ESP 蛋白的编码基因片段，再将所得编码基因片段与 pQE-80L 表达载体进行 TA 连接，转化入 BL21 大肠杆菌感受态细胞，用含氨苄青霉素的 LB 平板进行筛选培养，将阳性宿主菌接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中培养，用异丙基硫代半乳糖苷即 IPTG 诱导表达后，超声破碎，离心收集上清液，以 Ni^{2+} -NTA 树脂亲和层析法进行纯化，即得肺吸虫 ESP 蛋白。

10、根据权利要求 8 所述的肺吸虫病检测试剂盒的制备方法，其特征在于所述步骤 b 中抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体的制备采用以下方法：

将 1 mg/ml 肺吸虫 ESP 蛋白溶液与弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂等体积混合，充分乳化，制备肺吸虫 ESP 蛋白免疫抗原，免疫雄性新西兰白兔；免疫步骤如下：初次免疫，以弗氏完全佐剂免疫抗原于家兔后腿、腹部皮下多点注射，每只 1 ml；间隔 1-2 周，第二次免疫，以弗氏不完全佐剂免疫抗原于家兔后腿肌肉或背部皮下多点加强免疫，每只 1 ml；之后连续免疫 2 次，每次间隔 2 周，免疫成分、剂量、途径同第二次免疫；第四次免疫后 5-7 天，对经琼脂双扩散试验测定抗体效价达 1:32 以上的家兔，颈动脉放血，离心分离血清，血清经饱和硫酸铵溶液沉淀、透析，即得抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体。

11、根据权利要求 8 所述的肺吸虫病检测试剂盒的制备方法，其特征在于所述步骤 c 中标记的肺吸虫 ESP 蛋白的制备采用以下方法：

用三蒸水溶解氯金酸，制成 0.1 g/L 溶液，置沸水浴中煮沸，按 4:1 的比例加入质量百分浓度为 1% 的柠檬酸三钠溶液，于沸水浴中快速搅拌，直至溶液呈稳定的红色，继续于沸水浴中加热 10 分钟，冷却至室温后补足失水，检测颗粒均匀度及粒度；取均匀的粒度为 15-20 nm 的胶体金 100 ml，用碳酸钾溶液调 pH 值至 8.8-9.0，于室温、快速搅拌条件下缓慢加入浓度为 1.5-2.0 mg/ml 的肺吸虫 ESP 蛋白溶液 3-5 ml，继续搅拌 10-15 分钟，加入 BSA 至最终质量百分浓度为 1-2%，再搅拌 10-15 分钟；所得溶液于 4000 r/min 离心 20 分钟，弃沉淀，上清液以 10000 r/min 离心 60 分钟，弃去上清液，沉淀用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.0-8.2、含有质量百分浓度为 1-2% 的 BSA 的 PBS 缓冲液洗涤，

再用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.2、含有质量百分浓度为 1%的 BSA、质量百分浓度为 0.02%的叠氮化钠的 PBS 缓冲液 5-10 ml 重悬，即得胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白溶液。

肺吸虫病检测试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测试剂盒，特别涉及一种肺吸虫病检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

肺吸虫病 (Paragonimiasis) 是一种常见和重要的人兽共患寄生虫病，主要流行于亚洲、非洲和拉丁美洲，尤以亚洲地区多见，在我国流行于 22 个省、市、自治区，估计每年感染者约 200 万之多，严重危害人类健康，尤其是青少年、儿童的健康。

肺吸虫病主要是肺吸虫虫体（幼虫或成虫）在人体组织与器官内移行、寄居造成的机械性损伤，及其代谢物等引起的免疫病理反应。在我国，致病虫种主要为卫氏肺吸虫和斯氏肺吸虫，其成虫寄生于人、犬、果子狸等肉食动物的肌肉和器官如肝、肺中；尤其斯氏肺吸虫作为仅在我国流行的一种吸虫，其在人体内不能发育成熟，而以幼虫在人体内移行、窜扰，常常引起游走性皮下包块或结节，脑占位性病变和内脏损伤等肺外型寄生虫表现，造成多器官、组织的损害。肺吸虫病根据肺吸虫寄生部位不同，出现复杂的病理变化和多种多样的临床表现，临床症状不典型，易与其他疾病混淆，误诊率极高。对于感染早期、低度感染及肺外型肺吸虫病患者，以发现虫卵或虫体的病原学检测方法往往难以获得检测结果，因此，肺吸虫病的检测和鉴别检测在很大程度上需依赖于免疫学检测。

目前，用于肺吸虫病的免疫学检测方法种类较多，包括抗体检测方法如皮内试验 (IT)、补体结合试验 (CFT)、间接血凝试验 (IHA)、对照免疫电泳试验 (CIEP)、免疫荧光试验 (IFAT)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等；以及抗原检

测方法如多克隆或单克隆抗体ELISA法等。抗体检测方法敏感性高,但因治愈后抗体在体内仍可维持较长时间,致使疗效考核效果不理想,尤其在疫区反复感染人群中无法区别是现行感染还是既往感染;抗体检测中使用的抗原,如虫体抗原、排泄分泌抗原等,均为粗抗原,易出现同源吸虫间交叉反应,并严重依赖于虫体来源的成分;各实验室的检测抗原不一致,导致无法对检测结果进行比较等问题。此外,循环抗原(CAg)检测,即对虫体的代谢产物及腺体分泌液、子宫液、脱落的虫体皮层表膜等抗原性物质的检测,方法特异性高,能反映感染虫荷;因CAg出现较抗体产生为早,有早期检测价值;而且经有效治疗使虫体死亡后抗原消失快,可用于确诊和(或)疗效考核,但其不足之处在于敏感性较低,并受多种因素干扰。这一现状严重影响了临床上肺吸虫感染的早检测、早预防、早治疗,限制了人肺吸虫感染的流行病学调查研究。因此,筛选一种高度特异、敏感的用于肺吸虫病的单一检测抗原成分,并制成肺吸虫病检测试剂盒,准确、快速、简便地进行肺吸虫病的诊断与鉴别诊断、以及疗效考核具有重要意义及广阔的应用前景。

发明内容

有鉴于此,为了解决现有肺吸虫病免疫学检测方法中抗体检测法存在的疗效考核效果不理想、有交叉反应干扰、以及无法对各实验室的检测结果进行比较等技术问题,发明人采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、双向凝胶电泳(2-DE)、蛋白免疫印迹(Western Blotting)、质谱等技术对肺吸虫的成虫、幼虫及囊蚴期的虫体蛋白进行分析,识别出虫体排泄分泌物中能用于免疫检测的特异性抗原,通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)获得其编码基因片段(Genbank 登录号为AY083923),根据所得序列推导的多肽由165个氨基酸组成,命名为肺吸虫排泄分泌蛋白(Excretory-secretory protein, ESP),制备该蛋白并经动物免疫制备出特异性抗体,再进一步制得肺吸虫病检测试剂盒。

本发明的目的在于,提供一种肺吸虫病检测试剂盒,包括检测条、样品稀

释液,检测抗原为肺吸虫 ESP 蛋白,其氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示;

进一步,所述检测抗原为胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白;

进一步,所述检测条由样品垫 1 和吸收垫 5 顺序贴附于带背衬 6 的检测层 2 上构成;检测层 2 上包被由抗人 IgG 抗体形成的检测线 3 和抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体形成的质控线 4;

进一步,所述样品稀释液为浓度为 0.01-0.05 mol/L、pH 值为 7.0-7.2 的磷酸盐缓冲液即 PBS 缓冲液,内含浓度为 5-8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白、质量百分浓度为 1% 的牛血清白蛋白即 BSA;

进一步,所述试剂盒内还有样品稀释孔。

本发明的另一目的在于,提供所述肺吸虫病检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

a. 肺吸虫 ESP 蛋白的制备:肺吸虫 ESP 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID No.2 所示,其编码基因序列如 SEQ ID No.1 所示,根据氨基酸或核苷酸序列制备,即得肺吸虫 ESP 蛋白;

b. 抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体的制备:用肺吸虫 ESP 蛋白于哺乳动物的肌肉或皮下注射进行多次免疫,收集被免疫动物的血液,分离血清,即得抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体;

c. 标记的肺吸虫 ESP 蛋白的制备:用标记物对肺吸虫 ESP 蛋白进行标记,即得经标记的肺吸虫 ESP 蛋白;

d. 检测层的制备:将硝酸纤维素即 NC 膜置浓度为 0.01-0.05 mol/L、pH 值为 8.0-8.2、含有质量百分浓度为 1% 的 BSA、质量百分浓度为 1% 的吐温-20 的 PBS 缓冲液中浸泡 30 分钟,于温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下烘干;用抗体稀释液即浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.0-8.2、含有质量百分浓度为 1% 的 BSA 的 PBS 缓冲液,对浓度为 1 mg/ml 的抗人 IgG 抗体溶液、浓度为 1 mg/ml 的抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体溶液分别进行 1:500-1:1000 稀释;将稀释后的抗人 IgG 抗体溶液、抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体溶液,用点膜仪以每厘米 2-3 μl 体积分别喷到 NC 膜上,形成检测线和质控线;包被有检测线和质控线的 NC 膜

经真空干燥后,用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.8-9.0、含有质量百分浓度为 1%的 BSA 的 PBS 缓冲液封闭 2 小时,再用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.8-9.0 的 PBS 缓冲液洗涤,真空干燥,即得检测层;

e. 样品垫的制备:将吸水滤纸置浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 7.2 的 PBS 缓冲液中浸泡 30 分钟,于温度为 37℃条件下烘干,即得样品垫;

f. 吸收垫的制备:取吸水滤纸,即得吸收垫;

g. 检测条的制备:将样品垫 1 和吸收垫 5 顺序贴附于带背衬 6 的检测层 2 上,即得检测条;

h. 试剂盒的制备:将检测条、样品稀释液、样品稀释孔装盒,即得试剂盒;其中,样品稀释液为浓度为 0.01-0.05 mol/L、pH 值为 7.0-7.2、含有浓度为 5-8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标记的肺吸虫 ESP 蛋白、质量百分浓度为 1%的 BSA 的 PBS 缓冲液;

进一步,所述步骤 a 中肺吸虫 ESP 蛋白的制备采用以下方法:

以斯氏狸殖吸虫成虫总 RNA 为模板,采用如下简并引物:上游引物 5'-TCA (AG) GG (AGCT) CA (AG) TG (CT) GG (AGCT) TC (AGCT) TG (CT) TGG-3'、下游引物 5'-CCA (AG) CT (AG) TT (CT) TT (AGCT) AC (AG) ATCCA (AG) TA-3',进行逆转录聚合酶链式反应,得到肺吸虫 ESP 蛋白的编码基因片段,再将所得编码基因片段与 pQE-80L 表达载体进行 TA 连接,转化入 BL21 大肠杆菌感受态细胞,用含氨苄青霉素的 LB 平板进行筛选培养,将阳性宿主菌接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中培养,用异丙基硫代半乳糖苷即 IPTG 诱导表达后,超声破碎,离心收集上清液,以 Ni^{2+} -NTA 树脂亲和层析法进行纯化,即得肺吸虫 ESP 蛋白;

进一步,所述步骤 b 中抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体的制备采用以下方法:

将 1mg/ml 肺吸虫 ESP 蛋白溶液与弗氏完全佐剂 (Freund's complete adjuvant, FCA) 或弗氏不完全佐剂 (Freund's incomplete adjuvant, FIA) 等体积混合,充分乳化,制备肺吸虫 ESP 蛋白免疫抗原,免疫雄性新西兰白兔;免疫步骤如下:初次免疫,以弗氏完全佐剂免疫抗原于家兔后腿、腹部皮下多

点注射，每只 1 ml；间隔 1-2 周，第二次免疫，以弗氏不完全佐剂免疫抗原于家兔后腿肌肉或背部皮下多点加强免疫，每只 1 ml；之后连续免疫 2 次，每次间隔 2 周，免疫成分、剂量、途径同第二次免疫；第四次免疫后 5-7 天，对经琼脂双扩散试验测定抗体效价达 1:32 以上的家兔，颈动脉放血，离心分离血清，血清经饱和硫酸铵溶液沉淀、透析，即得抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体；

进一步，所述步骤 c 中标记的肺吸虫 ESP 蛋白的制备采用以下方法：

用三蒸水溶解氯金酸，制成 0.1 g/L 溶液，置沸水浴中煮沸，按 4:1 的比例加入质量百分浓度为 1% 的柠檬酸三钠溶液，于沸水浴中快速搅拌，直至溶液呈稳定的红色，继续于沸水浴中加热 10 分钟，冷却至室温后补足失水，检测颗粒均匀度及粒度；取均匀的粒度为 15-20 nm 的胶体金 100 ml，用碳酸钾溶液调 pH 值至 8.8-9.0，于室温、快速搅拌条件下缓慢加入浓度为 1.5-2.0 mg/ml 的肺吸虫 ESP 蛋白溶液 3-5 ml，继续搅拌 10-15 分钟，加入 BSA 至最终质量百分浓度为 1-2%，再搅拌 10-15 分钟；所得溶液于 4000 r/min 离心 20 分钟，弃沉淀，上清液以 10000 r/min 离心 60 分钟，弃去上清液，沉淀用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.0-8.2、含有质量百分浓度为 1-2% 的 BSA 的 PBS 缓冲液洗涤，再用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.2、含有质量百分浓度为 1% 的 BSA、质量百分浓度为 0.02% 的叠氮化钠的 PBS 缓冲液 5-10 ml 重悬，即得胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白溶液。

本发明所述肺吸虫病检测试剂盒，与肺吸虫病免疫检测常用的 ELISA 法比较，主要具有以下优点：（1）具有高度特异、敏感性，肝吸虫病、血吸虫病的交叉反应干扰小，假阳性率低于 ELISA 法，可用于肺吸虫病的诊断与鉴别诊断；（2）具有疗效考核的作用，在肺吸虫病患者经有效药物治疗后 3-6 月，检测结果将转阴，转阴率高于 ELISA 法，可用于肺吸虫病的疗效考核；（3）使用经过纯化的单一抗原蛋白，不依赖于虫体来源的成分，可对各实验室的检测结果进行比较；（4）无需任何特殊仪器，可用于现场操作；（5）方法简便，不需由专业人员操作；（6）检测快速，10 分钟以内可获结果；（7）检测成本低；（8）检测过程对人体无危害，对环境无污染；（9）贮存方便，对温度要求不高，

置 4℃ 下有效保存期可达 6 个月，在室温下可保存 3 个月。

本发明的其他优点、目标，和特征在某种程度上将在随后的说明书中进行阐述，并且在某种程度上，基于对下文的考察研究对本领域技术人员而言将是显而易见的，或者可以从本发明的实践中得到教导。本发明的目标和其他优点可以通过下面的说明书和权利要求书来实现和获得。

附图说明

为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合附图和优选实施例对本发明作进一步的详细描述，其中：

图 1 为肺吸虫 ESP 蛋白编码基因 RT-PCR 扩增产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图；

图 2 为双酶切阳性克隆质粒的 1% 琼脂糖凝胶电泳图；

图 3 为重组表达载体 pQE-80L/ESP 的定向构建流程图；

图 4 为大肠杆菌诱导表达产物的 SDS-PAGE 图；

图 5 为肺吸虫病检测条的剖面图；

图 6 为肺吸虫病检测试剂盒检测原理图；

图 7 为检测线阳性结果原理图；

图 8 为质控线原理图；

图 9 为肺吸虫病检测试剂盒检测结果图。

具体实施方式

下面参照优选实施例对本发明进行详细的描述。应当理解，下面的优选实施例仅为了说明本发明，而不是为了限制本发明的保护范围。

一、肺吸虫病检测试剂盒的制备

1、肺吸虫 ESP 蛋白的制备

a. 引物的设计与合成

根据吸虫半胱氨酸蛋白酶氨基酸保守序列，设计并合成如下简并引物：

上游引物：5' -TCA (AG) GG (AGCT) CA (AG) TG (CT) GG (AGCT) TC (AGCT)

TG (CT) TGG-3';

下游引物: 5' -CCA (AG) CT (AG) TT (CT) TT (AGCT) AC (AG) ATCCA (AG) TA-3';

b. 肺吸虫 ESP 蛋白编码基因的 RT-PCR 扩增

取 2 条斯氏狸殖吸虫成虫 (共 60 mg), 用 Tripure 试剂 (美国 Roche 公司) 于冰浴下匀浆, 按照 Tripure 试剂说明提取虫体总 RNA;

以提取的虫体总 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 试剂盒 (北京博大泰克生物基因技术有限公司) 进行逆转录及 cDNA 扩增: 以 Oligo (dT)₁₆ 为引物进行逆转录为 cDNA 时, 37℃ 水浴 2 小时, 95℃ 热变性 5 分钟; 以步骤 a 所述简并引物进行 PCR 扩增双链 cDNA 时, 94℃ 预变性 5 分钟, 然后 94℃ 1 分钟、43℃ 2 分钟、72℃ 2 分钟, 共 45 个循环, 最后 72℃ 5 分钟; PCR 结束后, 采用质量百分浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 结果如图 1 所示, 其中 1 泳道为 PCR 分子量标准, 2 泳道为 PCR 产物, 从图可知, 在约 500 bp 的位置出现一条特异性 DNA 条带, 与理论预测值相符;

利用 Silver Beads DNA 胶纯化回收试剂盒 (上海生物工程技术服务有限公司) 对 PCR 产物进行纯化, 按照试剂盒说明操作, 选择约 500 bp 的目的片段进行切胶回收纯化;

c. 肺吸虫 ESP 蛋白编码基因的克隆

将步骤 b 所得纯化的目的片段与 pMD18T 载体 (宝生物工程 (大连) 有限公司) 进行 TA 连接, 转化入 CaCl₂ 法制备的 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 并涂布在蓝白斑筛选培养基平板上, 挑取白色菌落, 接种到含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 于温度为 37℃、150 r/min 振摇过夜, 碱裂解法小量提取质粒, 用 PCR 方法 (以质粒为模板, 采用步骤 b 所述 PCR 反应条件进行 PCR 扩增) 和 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切鉴定阳性克隆质粒;

d. 阳性克隆质粒序列测定

取步骤 c 所得阳性克隆质粒, 委托上海生物工程技术服务有限公司测定插入片段的序列, 获得 495bp 的 cDNA 序列 (如 SEQ ID No. 1 所示), 在 Genbank

中进行注册，登录号为 AY083923；根据所得序列，用 DNASIS 程序推导出其编码的氨基酸序列（如 SEQ ID No. 2 所示）；

e. 肺吸虫 ESP 蛋白编码基因的 PCR 扩增

依据肺吸虫 ESP 蛋白的基因序列，结合 pQE-80L 表达载体上的内切酶位点，设计表达引物，并在上游引物引入 *Bam*H I 酶切位点（下划线部分），在下游引物引入 *Hind* III 酶切位点（下划线部分），同时在 5' 末端添加相应的酶切保护碱基：

上游引物，5'-CGGGATCCCAAGGTCAATGTGGCTC-3'；

下游引物，5'-CCAAGCTTGATTGTTAAAAATAGTTGG-3'；

利用上述表达引物，以步骤 c 所得阳性克隆质粒为模板，采用步骤 b 所述 PCR 反应条件进行 PCR 扩增，切胶回收，纯化 PCR 产物，按照步骤 c 所述再次进行 TA 克隆，并经测序鉴定；

f. 肺吸虫 ESP 蛋白重组表达载体的构建及阳性克隆的筛选

将步骤 e 测序鉴定后的阳性克隆质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切，双酶切产物用琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，结果如图 2 所示，其中 1 泳道为双酶切产物，2 泳道为 DNA 分子量标准，从图可知，酶切后得到两条带，其中一条约 500 bp，与目的片段大小一致；切胶回收纯化该片段，并在 T4 DNA 连接酶的作用下，与经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切消化后的 pQE-80L 载体（德国 Qiagen 公司）相连接，将连接产物转化入 CaCl_2 法制备的 BL21 大肠杆菌感受态细胞，用含氨苄青霉素的 LB 平板进行筛选培养，从 LB 平板上随机挑取 3 个白色菌落，接种于液体 LB 培养基中，于温度为 37℃、150 r/min 振荡过夜，碱裂解法小量提取质粒，以质粒为模板，采用步骤 b 所述 PCR 反应条件进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳鉴定有无插入片段后，再通过序列测定确保插入方向正确；测序结果表明实验获得的质粒为含有肺吸虫 ESP 蛋白编码基因的重组质粒；重组表达载体 pQE-80L/ESP 的定向构建流程如图 3 所示；

g. 肺吸虫 ESP 蛋白的诱导表达

挑取步骤 f 经测序鉴定的阳性克隆菌落，同时设 pQE-80L 空载体转化菌落和 BL21 空菌株菌落为对照，接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，于温度

为 37℃、150 r/min 振摇过夜，取 3 ml 过夜培养菌液接种于 300 ml 含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，于温度为 37℃、200 r/min 振摇培养 1 小时，加入浓度为 200 mmol/L 的 IPTG 诱导剂 300 μ l，继续培养 5 小时，收集全部菌液，9 000 g 离心 5 分钟，去除上清液，沉淀用等体积的浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 7.2 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次后，用 5 倍体积的细菌裂解液重悬，冰浴超声，条件为超声 5 秒间隔 5 秒，重复 50 次，功率 200 W；取超声后的匀浆物，离心，分别收集沉淀和上清液，用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测目的蛋白的表达情况，结果如图 4 所示，其中 1 泳道为诱导表达菌株，2 泳道为未诱导菌株，3 泳道为空载体菌株，4 泳道为蛋白质分子量标准，从图可知，肺吸虫 ESP 蛋白被 BL21 大肠杆菌在 IPTG 诱导下高效表达，表达产物分子量大小为 22 kDa，与预计大小相一致；

h. 肺吸虫 ESP 蛋白大肠杆菌表达产物的纯化

将超声匀浆后的离心上清液，利用载体 C 末端引入的 6 个 His tag 标签，以 Ni^{2+} -NTA 树脂（德国 Qiagen 公司）亲和层析法纯化目的蛋白，按照说明书中所述步骤进行纯化，即制得肺吸虫 ESP 蛋白，置 4℃ 保存；

2、抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体的制备

将 1mg/ml 肺吸虫 ESP 蛋白溶液与弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂等体积混合，充分乳化，制备肺吸虫 ESP 蛋白免疫抗原，免疫雄性新西兰白兔；免疫步骤如下：初次免疫，以弗氏完全佐剂免疫抗原于家兔后腿、腹部皮下多点注射，每只 1 ml；间隔 2 周，第二次免疫，以弗氏不完全佐剂免疫抗原于家兔后腿肌肉或背部皮下多点加强免疫，每只 1 ml；之后连续免疫 2 次，每次间隔 2 周，免疫成分、剂量、途径同第二次免疫；第四次免疫后 7 天，对经琼脂双扩散试验测定抗体效价达 1：32 以上的家兔，颈动脉放血，离心分离血清，血清经饱和硫酸铵溶液沉淀、透析，即制得抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体，置 -20℃ 冷冻保存；

3、胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白的制备

用三蒸水溶解氯金酸，制成 0.1 g/L 溶液，置沸水浴中煮沸，按 4：1 的比

例加入质量百分浓度为 1% 的柠檬酸三钠溶液, 于沸水浴中快速搅拌, 直至溶液呈稳定的红色, 继续于沸水浴中加热 10 分钟, 冷却至室温后补足失水, 检测颗粒均匀度及粒度; 取均匀的粒度为 20 nm 的胶体金 100 ml, 用浓度为 0.2 mol/L 的碳酸钾溶液调 pH 值至 9.0, 于室温、快速搅拌条件下缓慢加入浓度为 2.0 mg/ml 的肺吸虫 ESP 蛋白溶液 5 ml, 继续搅拌 10 分钟, 加入 BSA 至最终质量百分浓度为 1%, 再搅拌 10 分钟; 所得溶液于 4000 r/min 离心 20 分钟, 弃沉淀, 上清液以 10000 r/min 离心 60 分钟, 弃去上清液, 沉淀用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.2、含有质量百分浓度为 1% 的 BSA 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 再用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.2、含有质量百分浓度为 1% 的 BSA、质量百分浓度为 0.02% 的叠氮化钠的 PBS 缓冲液 10 ml 重悬, 制得浓度为 5 μ g/ml 的胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白溶液, 置 4 $^{\circ}$ C 保存备用;

4、检测层的制备

将 NC 膜置浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.2、含有质量百分浓度为 1% 的 BSA、质量百分浓度为 1% 的吐温-20 的 PBS 缓冲液中浸泡 30 分钟, 于温度为 37 $^{\circ}$ C 的条件下烘干; 用抗体稀释液即浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 8.2、含有质量百分浓度为 1% 的 BSA 的 PBS 缓冲液, 对浓度为 1 mg/ml 的兔抗人 IgG 抗体溶液、浓度为 1 mg/ml 的兔抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体溶液分别进行 1: 1000 稀释; 将稀释后的兔抗人 IgG 抗体溶液、兔抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体溶液, 用 Bio-dot ZX1000 点膜仪 (BioDot 公司) 的气动喷头 (AIR-JET) 以每厘米 3 μ l 体积分别喷到 NC 膜上, 形成检测线和质控线, 检测线距样品垫 13 mm, 质控线距吸收垫 13 mm, 两线距离 8 mm; 包被有检测线和质控线的 NC 膜经真空干燥后, 用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 9.0、含有质量百分浓度为 1% 的 BSA 的 PBS 缓冲液封闭 2 小时, 再用浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 9.0 的 PBS 缓冲液洗涤, 真空干燥, 置 4 $^{\circ}$ C 保存备用;

5、样品垫的制备

将吸水滤纸置浓度为 0.01 mol/L、pH 值为 7.2 的 PBS 缓冲液中浸泡 30 分钟, 于温度为 37 $^{\circ}$ C 条件下烘干, 置 4 $^{\circ}$ C 保存备用;

6、吸收垫的制备

取吸水滤纸，备用；

7、检测条的制备

如图 5 所示，将宽为 5 mm，长分别为 25 mm、30 mm 的样品垫 1 及吸收垫 5 顺序贴附于长 80 mm 的带背衬 6 的检测层 2 上，即制得检测条；

8、试剂盒的制备

将检测条每 10 条一包，加入干燥剂，真空封装；样品稀释液一瓶（5 ml）；样品稀释孔一条（10 孔）装入聚氯乙烯袋内，即制得肺吸虫病检测试剂盒；其中，样品稀释液为浓度为 0.01 mol/L，pH 值为 7.2，含有浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 的胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白、质量百分浓度为 1% 的 BSA 的 PBS 缓冲液；样品稀释孔大小为 0.6 $\times$ 1.0 cm。

二、肺吸虫病检测试剂盒的检测方法

1、检测原理

检测原理如图 6 所示，以胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白作为检测抗原，以抗人 IgG 抗体为检测线，抗肺吸虫 ESP 蛋白的多克隆抗体为质控线，利用免疫渗滤技术来检测样品中是否含有抗肺吸虫 IgG 抗体。检测时，若样品中含有抗肺吸虫 IgG 抗体，其先和胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白结合，形成抗原-抗体复合物；由于毛细管作用，反应复合物沿 NC 膜向前泳动，到达检测线时，遇到包被在 NC 膜上的抗人 IgG 抗体，就会形成如图 7 所示的，胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白-抗肺吸虫 IgG 抗体-抗人 IgG 抗体复合物，从而富集在检测线上，形成紫红色沉淀线；未结合抗肺吸虫 IgG 抗体的胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白则通过检测线，形成如图 8 所示的，抗原-抗体复合物，富集在质控线上，形成紫红色沉淀线，判为阳性结果；若样品中不含有抗肺吸虫 IgG 抗体，不能与胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白结合，到达检测线时，就不会形成如图 7 所示的复合物，而未结合抗肺吸虫 IgG 抗体的胶体金标记的肺吸虫 ESP 蛋白通过检测线，富集在质控线上，形成紫红色沉淀线，判为阴性结果。

2、检测方法

取待测血清 15-20 μl 置样品稀释孔内，用样品稀释液稀释至 50 μl ；取出检测条，将检测条的样品垫端浸入制备好的样品中，放置约 5-10 分钟，观察结果。

3、结果判定

结果判定见图 9，A 为阳性结果；B 为阴性结果。当检测条出现肉眼可见的紫红色质控线，同时出现肉眼可见的紫红色检测线，结果判为阳性，记为“+”；检测线颜色越深，说明被检测样品的抗体水平越高；当检测条出现肉眼可见的紫红色质控线，没有出现肉眼可见的紫红色检测线，结果判为阴性，记为“-”；当检测条没有出现肉眼可见的紫红色质控线，不管是否出现肉眼可见的紫红色检测线，结果都判为检测条失效，应废弃。

三、肺吸虫病检测试剂盒的鉴定

1、特异性

方法：采用本发明所述试剂盒对肺吸虫病患者、肝吸虫病患者、血吸虫病患者和健康者血清进行检测，并与 ELISA 法进行比较；ELISA 法为常规方法，即将抗原包被于 PVC 条板，取待测血清 10 μl ，加 PBS 缓冲液 90 μl ，于温度为 37℃ 条件下孵育 30 分钟，洗涤 3 次，加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的第二抗体，于温度为 37℃ 条件下作用 30 分钟，洗涤 3-5 次，3, 3, 5, 5-四甲基联苯胺（TMB）显色，用酶标仪测 OD 值，待检孔 OD 值大于阴性对照 2.1 倍者为阳性。

结果：见表 1。本发明所述试剂盒和 ELISA 法检测肺吸虫病患者血清抗体的阳性率分别为 96.5%（55/57）和 100.0%（57/57），两法间差异无显著性（ $P > 0.05$ ）；采用本发明所述试剂盒检测肝吸虫病患者血清、血吸虫病患者血清和健康者血清，除血吸虫病患者血清的交叉反应率为 5.0%外，其余两者均为阴性，假阳性率低于 ELISA 法。

结论：本发明所述试剂盒具有高度特异性，可以用于肺吸虫病的诊断，以及肺吸虫病与其它吸虫病的鉴别诊断。

表 1、本发明所述试剂盒与 ELISA 法检测不同血清的结果

血清来源	检测 例数	本发明所述试剂盒		ELISA 法	
		阳性例数	阳性率 (%)	阳性例数	阳性率 (%)
肺吸虫病患者	57	55	96.5	57	100.0
肝吸虫病患者	20	0	0	3	15.0
血吸虫病患者	20	1	5.0	15	75.0
健康者	50	0	0	1	2.0

2、敏感性

方法：采用本发明所述试剂盒对 28 例疑似肺吸虫病患者血清进行检测，并与 ELISA 法进行比较；ELISA 法为常规方法。

结果：见表 2。两种方法检测结果的总符合率为 100% (21/28)。经 χ^2 检验，两法间差异无显著性 ($P > 0.05$)。检测结果呈阳性的 21 例病人最终确诊为肺吸虫病患者，因此，两种方法的敏感性均为 100%。

结论：本发明所述试剂盒具有高度敏感性。

表 2、本发明所述试剂盒与 ELISA 法检测敏感性比较

本发明所述试剂盒	ELISA 法		合计
	+	-	
+	21	0	21
-	0	7	7
合计	21	7	28

3、疗效考核作用

方法：在肺吸虫病患者经有效药物治疗后 3 个月与 6 个月，采用本发明所述试剂盒对 7 例肺吸虫病患者血清进行检测，并与 ELISA 法进行比较；ELISA 法为常规方法。

结果：采用本发明所述试剂盒检测，7例肺吸虫病患者经有效药物治疗后3个月，有4例转阴，转阴率57.1%；治疗后6个月，7例全部转阴，转阴率100.0%；而采用ELISA法分别于治疗后3个月、6个月检测，无1例转阴。

结论：采用本发明所述试剂盒检测，转阴率明显高于ELISA法，可用于肺吸虫病的疗效考核。

4、稳定性

将本发明所述试剂盒分别置4℃和室温保存，每隔一个月检测一次。结果表明，4℃保存的试剂盒6个月内，室温保存的试剂盒3个月内，都能够对肺吸虫病患者进行快速（10分钟以内）、灵敏的诊断与鉴别诊断。

5、重复性

取肺吸虫病患者血清和健康者血清各20例，采用本发明所述试剂盒分别连续进行5次测定，结果阳性和阴性结果不变，显示本发明所述试剂盒的检测重复性良好。

尽管通过参照本发明的某些优选实施例，已经对本发明进行了描述，但本领域的普通技术人员应当理解，可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变，而不偏离所附权利要求书所限定的本发明的精神和范围。

序 列 表

- <110> 中国人民解放军第三军医大学
 <120> 肺吸虫病检测试剂盒及其制备方法
 <160> 2
 <210> 1
 <211> 495
 <212> RNA
 <213> 斯氏狸殖吸虫 (Pagumogonimus skrjabini)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (495)
 <400> 1

```

caa ggt caa tgt ggc tcc tgc tgg gcg ttt tcg gta gta gga aat 45
Gln Gly Gln Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Val Val Gly Asn
1           5           10           15
att gaa ggt caa tgg ttt ctc aag acc ggt cag ctt atc agt ctg 90
Ile Glu Gly Gln Trp Phe Leu Lys Thr Gly Gln Leu Ile Ser Leu
           20           25           30
agc aaa cag caa ttg gtc gat tgt gac aag gtg gac cac gga tgc 135
Ser Lys Gln Gln Leu Val Asp Cys Asp Lys Val Asp His Gly Cys
           35           40           45
aat ggt gga tgg cca cca tac aca tac ggc gag atc aaa cgg ttg 180
Asn Gly Gly Trp Pro Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Ile Lys Arg Leu
           50           55           60
ggg ggc tta gag acg caa caa gac tat ccc tat att gga aga cag 225
Gly Gly Leu Glu Thr Gln Gln Asp Tyr Pro Tyr Ile Gly Arg Gln

```

65	70	75	
caa acg tgt aga atg gat aag tcg aag ttg ttg acg aaa atc gac			270
Gln Thr Cys Arg Met Asp Lys Ser Lys Leu Leu Thr Lys Ile Asp			
80	85	90	
ggg tca att gtt ctg gag aga gat gag tat aaa cag gca gct tgg			315
Gly Ser Ile Val Leu Glu Arg Asp Glu Tyr Lys Gln Ala Ala Trp			
95	100	105	
ctc gca gaa cac gga cca atg gct tca act ctc aat gcc aat tat			360
Leu Ala Glu His Gly Pro Met Ala Ser Thr Leu Asn Ala Asn Tyr			
110	115	120	
ctt cag tac tac cga tcc gga atc agt cat ccg tcc agg tat gag			405
Leu Gln Tyr Tyr Arg Ser Gly Ile Ser His Pro Ser Arg Tyr Glu			
125	130	135	
tgt aat cct gct aga ctg aac cac ggc gta ctg act gtg ggc tat			450
Cys Asn Pro Ala Arg Leu Asn His Gly Val Leu Thr Val Gly Tyr			
140	145	150	
ggc acg gaa aat ggt att ccc tac tgg att gtt aaa aat agt tgg			495
Gly Thr Glu Asn Gly Ile Pro Tyr Trp Ile Val Lys Asn Ser Trp			
155	160	165	

<210> 2

<211> 165

<212> PRT

<213> 斯氏狸殖吸虫 (Pagumogonimus skrjabini)

<400> 2

Gln Gly Gln Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Val Val Gly Asn

1

5

10

15

Ile	Glu	Gly	Gln	Trp	Phe	Leu	Lys	Thr	Gly	Gln	Leu	Ile	Ser	Leu
				20					25					30
Ser	Lys	Gln	Gln	Leu	Val	Asp	Cys	Asp	Lys	Val	Asp	His	Gly	Cys
				35					40					45
Asn	Gly	Gly	Trp	Pro	Pro	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu
				50					55					60
Gly	Gly	Leu	Glu	Thr	Gln	Gln	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Gly	Arg	Gln
				65					70					75
Gln	Thr	Cys	Arg	Met	Asp	Lys	Ser	Lys	Leu	Leu	Thr	Lys	Ile	Asp
				80					85					90
Gly	Ser	Ile	Val	Leu	Glu	Arg	Asp	Glu	Tyr	Lys	Gln	Ala	Ala	Trp
				95					100					105
Leu	Ala	Glu	His	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Thr	Leu	Asn	Ala	Asn	Tyr
				110					115					120
Leu	Gln	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Gly	Ile	Ser	His	Pro	Ser	Arg	Tyr	Glu
				125					130					135
Cys	Asn	Pro	Ala	Arg	Leu	Asn	His	Gly	Val	Leu	Thr	Val	Gly	Tyr
				140					145					150
Gly	Thr	Glu	Asn	Gly	Ile	Pro	Tyr	Trp	Ile	Val	Lys	Asn	Ser	Trp
				155					160					165

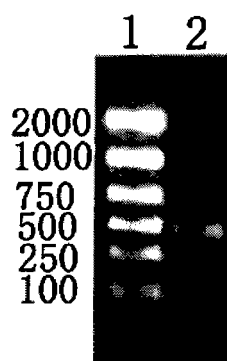


图 1

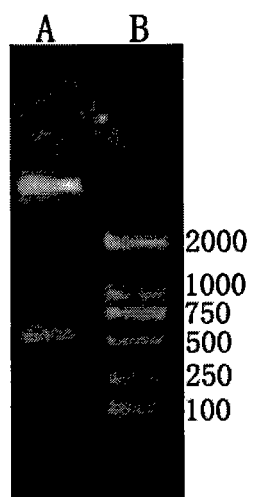


图 2

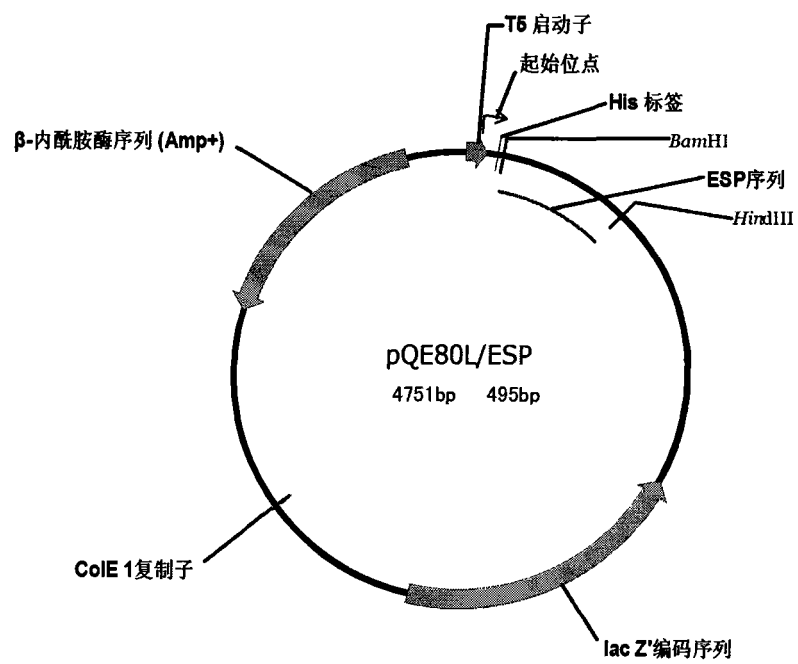


图 3

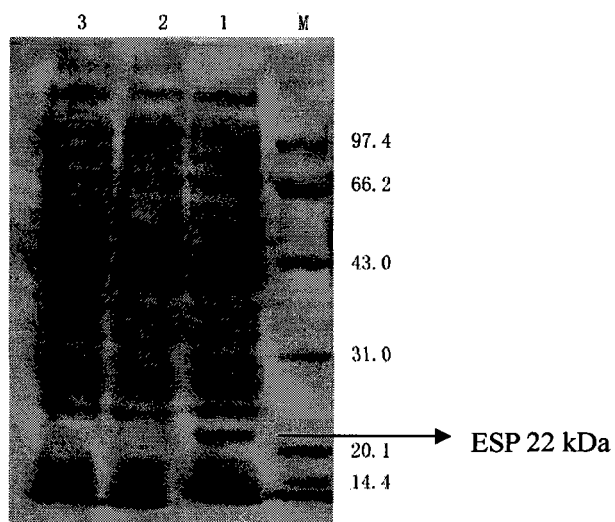


图 4

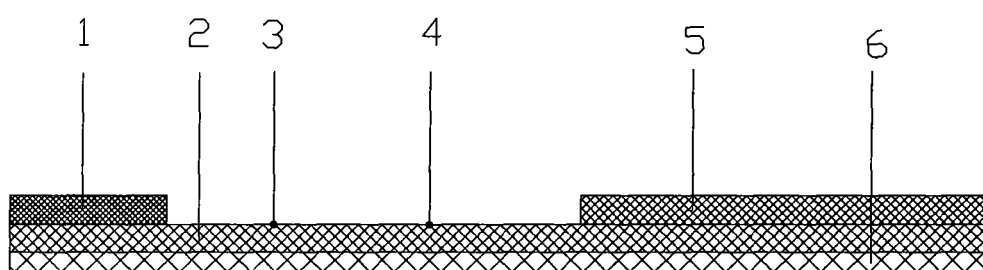


图5

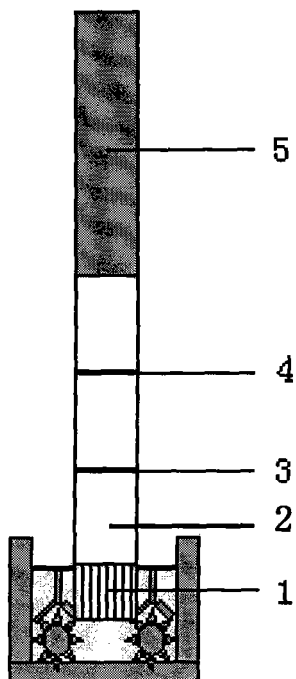


图 6

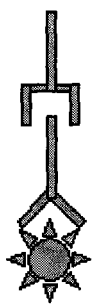


图 7



图 8

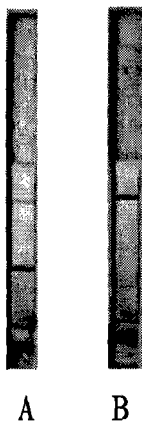


图 9

专利名称(译)	肺吸虫病检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN101266253A	公开(公告)日	2008-09-17
申请号	CN200810069585.7	申请日	2008-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
[标]发明人	张锡林		
发明人	张锡林		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/558 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种肺吸虫病检测试剂盒及其制备方法，该试剂盒包括检测条、样品稀释液，检测抗原为氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的肺吸虫ESP蛋白；本发明试剂盒的制备方法包括肺吸虫ESP蛋白及其多克隆抗体的制备、标记的肺吸虫ESP蛋白的制备、检测层、样品垫、吸收垫、检测条及试剂盒的制备等多个步骤；采用本发明制备方法制得的试剂盒具有高度特异、敏感性，与肝吸虫病、血吸虫病的交叉反应干扰小，假阳性率低于ELISA法，并具有疗效考核作用，在肺吸虫病经有效药物治疗后3 - 6月，检测结果将转阴，转阴率高于ELISA法，可以准确、快速、简便地进行肺吸虫病的诊断与鉴别诊断、以及疗效考核，具有重要的临床应用价值。

