

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/569 G01N 33/577

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02115746.4

[43] 公开日 2002 年 11 月 6 日

[11] 公开号 CN 1378084A

[22] 申请日 2002.4.19 [21] 申请号 02115746.4

[71] 申请人 王 滔

地址 350001 福建省福州市鼓楼区湖前路 92 号省
立医院宿舍 4-403

[72] 发明人 王 滔

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称 测定粪便样品中幽门螺杆菌的免疫微球
方法

[57] 摘要

本发明涉及一种测定粪便样品中幽门螺杆菌的免疫微球方法,它解决了现有技术中所采用的试剂和仪器成本高、操作费工费时的问题。本发明的方法是:(a)把抗幽门螺杆菌的抗体/或幽门螺杆菌抗原标记微球,形成免疫微球;(b)把怀疑含有幽门螺杆菌的粪便悬浮于样品缓冲液中;(c)将已标记抗幽门螺杆菌抗体的免疫微球与含粪便的样品缓冲液混合;或将一定抗幽门螺杆菌抗体与含粪便的样品缓冲液混合,然后加入幽门螺杆菌抗原标记微球;(d)检测粪便中可能存在的幽门螺杆菌。本发明采用免疫微球技术,检测粪便样品中的幽门螺杆菌。它具有成本低廉、操作方便快捷、结果可靠等优点。本发明的方法主要用于对粪便样品中幽门螺杆菌中的免疫微球的测定。

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

- 1、一种测定粪便样品中幽门螺杆菌的免疫微球方法，它包括：
 - (a)把抗幽门螺杆菌的抗体/或幽门螺杆菌抗原标记微球，形成免疫微球；
 - (b)把怀疑含有幽门螺杆菌的粪便悬浮于样品缓冲液中；
 - (c)将已标记抗幽门螺杆菌抗体的免疫微球与含粪便的样品缓冲液混合；或将抗幽门螺杆菌抗体与含粪便的样品缓冲液混合，然后加入幽门螺杆菌抗原标记的微球；
 - (d)检测粪便中可能存在的幽门螺杆菌
- 2、根据权利要求1的方法，用来标记的微球的颗粒有：动物或人红细胞、细菌、多种高分子聚合颗粒、树脂、皂土、明胶颗粒、活性炭、火棉胶、玻璃微粒总的一种或几种，优选方案中将采用胶乳或红细胞。
- 3、根据权利要求1的方法，将含粪便的样品缓冲液针对幽门螺杆菌进行浓集处理。
- 4 根据权利要求3所述的方法，其特征在于：该浓集处理的方法是将含有粪便样品的缓冲液进行离心浓集处理。
- 5、根据权利要求1的方法，其中的样品稀释液应含有蛋白质及洗涤剂。蛋白质成分选自胎牛血清、羊血清、豚鼠血清、马血清、酪蛋白、白蛋白、明胶、牛血清白蛋白、人血清白蛋白的一种或几种，洗涤剂含有 Tween-20 或 Triton X-100。
- 6、根据权利要求1所述的测定粪便样品中幽门螺杆菌的免疫微球方法；它包括：
 - (a)把抗幽门螺杆菌的抗体标记微球，形成免疫微球；
 - (b)把怀疑含有幽门螺杆菌的粪便悬浮于样品缓冲液中；
 - (c)将已标记抗幽门螺杆菌抗体的免疫微球与含粪便的样品缓冲液混合；
 - (d)检测与免疫微球结合的幽门螺杆菌；
- 7、根据权利要求6方法，其特征在于：检测与免疫微球结合的幽门螺杆菌的方法为：将上述混合液体连续摇动1分钟以上即可观察结果：出现凝集颗粒的为阳性反应，说明粪便样品中存在幽门螺杆菌；保持均匀乳液状为阴性反应，说明粪样品中无幽门螺杆菌或者量很少。
- 8、根据权利要求6方法，其特征在于：检测与免疫微球结合的幽门螺杆菌的方法为：将上述混合液体置室温或37℃保温5分钟以上，取一部分液体染色；在显微镜下检测免疫花环，免疫微球吸附在幽门螺杆菌的周围形成花环，如此花环存在则可间接推测样品中存在幽门螺杆菌；反之则无幽门螺杆菌或者量很少。
- 9、根据权利要求6方法，其特征在于：检测与免疫微球结合的幽门螺杆菌的方法为：检测免疫微球与缓冲液混合前后缓冲液物理或化学特性的改变，从而推测粪便样品中可能存在幽门螺杆菌。
- 10、根据权利要求6方法，其特征在于：检测与免疫微球结合的幽门螺杆菌的方法为：检测免疫微球与缓冲液混合前后微球数量以及物理特性的改变，从而推测粪便样品中可能存在幽门螺杆菌。
- 11、根据权利要求1所述的测定粪便样品中幽门螺杆菌的免疫微球方法，它包括：
 - (a)把幽门螺杆菌的抗原标记微球，形成免疫微球；
 - (b)把怀疑含有幽门螺杆菌的粪便悬浮于样品缓冲液中；
 - (c)将含有抗幽门螺杆菌抗体的液体30—60 μ l与等体积的含粪便的样品缓冲液混合，2—10分钟后加入幽门螺杆菌抗原标记的微球；
 - (d)将上述液体充分混合、连续摇动1分钟以上即可观察结果：出现凝集颗粒的为阴性反应，说明粪样品中无幽门螺杆菌或者量很少；保持均匀乳液状为阴性反应，说明粪便样品中存在幽门螺杆菌。

测定粪便样品中幽门螺杆菌的免疫微球方法

(一) 技术领域:

本发明涉及一种测定粪便样品中幽门螺杆菌的免疫微球方法。

(二) 背景技术:

幽门螺杆菌属螺杆菌属。它是一种在人胃肠道发现的细菌,已经发现它与人胃十二指肠疾病如:胃炎、消化性溃疡、胃癌和其它疾病有密切关系。

已经有许多不同的技术用于幽门螺杆菌的测定。依据取材有无创伤性,目前幽门螺杆菌感染的临床诊断方法可分为两大类:①无创检查:包括血清学方法、同位素标记尿素的呼气试验和胃液聚合酶链反应等。②创伤性检查:均为胃镜依赖方法,包括多种形态学、微生物学和分子生物学技术等。

上述这些方法均有缺陷,很难满足临床诊断需要。

血清学方法采用酶联免疫、免疫酶试验、胶乳凝集试验、Western blot等方法检测外周血清幽门螺杆菌全菌及其组分如细胞毒素的抗体等。由于幽门螺杆菌感染数周后血中才出现特异抗体,阴性者血中也可存在交叉反应性抗体(如空肠弯曲菌感染),且幽门螺杆菌根除后血中抗体可长时间(>6个月)维持在阳性水平,故血清学阳性不能完全肯定病人有活动性感染;阴性不能排除初期的感染。因此,血清学抗体的检测只能用于流行病学筛查而不能用于临床诊断,也不能用于疗效观察。

同位素标记尿素的呼气试验(C-13和C-14呼气试验)其原理是根据幽门螺杆菌可产生强活性的尿素酶,其分解胃液中的尿素,产生二氧化碳和氨。用C-13或C-14位素标记尿素,让病人口服后被幽门螺杆菌的尿素酶分解,产生C-13或C-14的CO₂,阳性患者可在呼出气体中检测出C-13(C-13/C-12比例)丰度和C-14(放射性)活性,从而确诊幽门螺杆菌感染,目前被认为是除细菌培养外的诊断“金标准”。但前者需要气体质谱仪,后者有一定的放射性,也需要液体闪烁仪等昂贵仪器,且检查收费标准较高,极大地限制了该方法的应用。胃肠道中的其它细菌也可分泌尿素酶,当这些细菌污染时,可产生假阳性结果。幽门螺杆菌的根除治疗后,尿素酶受到抑制,该方法易导致假阴性结果。

基因诊断方法,如插胃管吸取胃液或胃镜抽取胃液或活检组织,提取DNA做聚合酶链反应和探针杂交诊断幽门螺杆菌感染,具有准确性好、检测灵敏度高的优点。还可特异地检测细菌的致病基因如空泡毒素基因等,但操作复杂、易污染,且大大增加了病人的经济开支,对已拥有多种检查手段以诊断幽门螺杆菌感染的今天,不宜提倡作为常规方法。

微生物学方法主要为细菌分离培养技术,是诊断幽门螺杆菌感染的“金标准”,同时可以获得诸如抗原制备、药敏试验、分型和致病性研究等所需的细菌。但要求具有一定的厌氧培养条件和技术,作为常规诊断手段不易推广。

快速尿素酶试验是胃镜检查时最常用的Hp感染诊断方法,包括PH指示剂法及分析化学法。多用活检标本,也可用胃液标本检测。另外还有活检组织病理染色、涂片染色等直接看到细菌等方法,这几种方法均是创伤性检查,需要胃镜取材和判断经验。因此,限制了这些方法的应用。

综上所述,幽门螺杆菌的感染最好能直接检查细菌抗原,尤其是粪便样品中的幽门螺杆菌抗原。为此,美国默里迪恩诊断公司提出一种“粪便样品中幽门螺杆菌的免疫测定法”(中国专利申请号 97103112.6)。该方法采用酶联免疫检测技术检测粪便样品中幽门螺杆菌抗原,具有灵敏度高、特异性好等优点,但是该方法所采用的试剂成本高,操作费时,需要昂贵的酶标仪等,限制了该方法的使用。

(三) 发明内容:

本发明的目的在于解决现有技术中所采用的试剂和仪器成本高、操作费时的问题。

概述

本发明提供一种测定粪便样品中幽门螺杆菌的免疫微球方法;它包括:

- (a)把抗幽门螺杆菌的抗体/或幽门螺杆菌抗原标记微球,形成免疫微球;
- (b)把怀疑含有幽门螺杆菌的粪便悬浮于样品缓冲液中;
- (c)将已标记抗幽门螺杆菌抗体的免疫微球与含粪便的样品缓冲液混合;或将一定抗幽门螺杆菌抗体与含粪便的样品缓冲液混合,然后加入幽门螺杆菌抗原标记微球;
- (d)检测粪便中可能存在的幽门螺杆菌。

在本发明的实施方案中,可用来标记的微球(或微粒)的颗粒种类很多,常用的有:动物或人红细胞、细菌、多种高分子材料聚合成的微颗粒(如聚苯乙烯胶乳等)、树脂、皂土、明胶颗粒、活性炭、火棉胶、玻璃微球等。优选方案中将采用胶乳和红细胞。

在本发明的实施方案中,用来标记微球的抗体可以是多克隆抗体,也可以是各种单克隆抗体或其混合。优选方案将采用多克隆抗体。

抗体或抗原标记微球的方法有数种:物理吸附、化学交联和间接法等。在实施时应根据微球的具体特点和抗体的特性进行选择。

粪便样品制备:将一定量粪便按适当比例稀释于样品缓冲液中,充分搅拌均匀,低速离心数分钟,取上清液,待测。其中的样品稀释液应含有蛋白质及洗涤剂,可减少非特异性反应。为提高检测敏感度可含粪便的样品缓冲液针对幽门螺杆菌进行浓集处理。

检测粪便中可能存在的幽门螺杆菌的方法有直接法和间接法。直接法是指,将抗幽门螺杆菌抗体标记微球,形成免疫微球;直接将免疫微球与含粪便的样品缓冲液混合,检测与免疫微球结合的幽门螺杆菌,如:凝集反应、免疫花环、检测免疫微球与缓冲液混合前后缓冲液物理或化学特性的改变(如颜色、浊度、通透性等)、检测免疫微球与缓冲液混合前后微球数量以及物理特性的改变(游离的微球的浓度)等。间接方法通常有凝集抑制反应,其原理是幽门螺杆菌抗原标记的微球与一定量抗该细菌的抗体结合而出现凝集反应,当存在该细菌感染时,粪便中的幽门螺杆菌抗原竞争与抗体结合,从而抑制幽门螺杆菌抗原标记微球的凝集。

本发明采用免疫微球技术,检测粪便样品中的幽门螺杆菌。它具有成本低廉、操作方便快捷、结果可靠等优点。

详细描述

本发明的测定方法使用了微球,它有许多种类,如动物或人红细胞、细菌、多种高分子材料聚合成胶乳的微粒(如聚苯乙烯胶乳等)、树脂、皂土、明胶颗

粒、活性炭、火棉胶、玻璃微球等。优选方案中将采用胶乳和红细胞，以胶乳为最优。

胶乳的种类很多，目前常用的是聚苯乙烯胶乳，现有市场上已有各种规格的商品化的胶乳。本发明采用的胶乳直径以 0.2~1.5 微米为优。

本发明使用了抗幽门螺杆菌的抗体，有单克隆抗体和多克隆抗体两种；常用的为多克隆抗体。这些抗体能够从致敏的动物的血清中获得。目前国内外已有多家公司可提供商品化的抗幽门螺杆菌的抗体，可以较经济的价格获得。中国专利(申请号 97103112.6)已详细描述幽门螺杆菌抗体的制备方法。在此仅简述如下：把幽门螺杆菌抗原注射到哺乳动物如兔、羊等体内，多次注射适当剂量的抗原，验证试验动物已产生抗幽门螺杆菌抗体，取试验动物血清，经纯化即可得到所需抗体。

抗体或抗原标记微球的方法有物理吸附和化学交联等。物理吸附是利用胶乳颗粒表面的带电性，物理吸附方法操作简单方便，但这种结合的牢固度往往较差。随着致敏试剂保存期的延长，脱落比较明显。化学交联指采用含有化学活性基团的胶乳作为载体，抗体或抗原以化学键共价交联在胶乳表面。这种化学交联的性能稳定，保存期长，使用效果有明显提高。胶乳的表面活性基团可以是羧基、氨基或一些其它具有化学活性的基团，它与蛋白质抗原或抗体的结合可以通过缩合剂来完成。将抗体或抗原结合在微球上的技术是本领域普通技术人员所熟知的。

A、物理吸附法：先用蒸馏水将胶乳悬液稀释至适当浓度，继将抗体或抗原溶于缓冲液后，逐滴加入稀释的胶乳悬液中，摇动使之充分混和。混合后可放置室温或 37℃，保温一定时间。吸附完成后，离心沉淀，除去游离在上清液中的未吸附物，倾去上清液后，沉淀仍用缓冲液恢复悬浮状态。加入牛血清白蛋白或水解明胶等，使胶乳表面的吸附能力充分饱和，减少非特异性反应；并应严格避免在吸附过程中发生胶乳自凝。

B、化学交联法：带活性基团的微球可采用化学交联法与抗体或抗原结合。不同活性基团其交联方法有所不同。如羧化聚苯乙烯胶乳采用化学交联法与抗体或抗原结合。为了提高交联效果，通常先给胶乳引入“手臂”。如将抗体直接紧贴地交联在羧化聚苯乙烯胶乳上，由于空间位阻，妨碍它与相应的抗原起反应。因此先接上“手臂”ε-氨基己酸，以增大配基与载体表面的距离，这样制成的免疫微球敏感度和特异性均高于物理吸附的，试剂的稳定性也显著提高。胶乳上的氨基和被交联物上的氨基是通过缩合剂碳化二亚胺来完成的。

粪便样品制备：将一定量粪便按适当比例稀释于样品缓冲液中，充分搅拌混匀，进行常规离心，如采用 200—500 转/分，3—5 分钟，取上清液，待测。为提高检测敏感度可含粪便的样品缓冲液针对幽门螺杆菌进行离心或过滤等浓集处理。将该上清液以大于 4000 转/分的速度，离心 10 分钟以上，去上清液，将沉淀再打散、混匀，待测。其中的样品稀释液应含有蛋白质及洗涤剂，可减少非特异性反应。蛋白质成分可选自胎牛血清、羊血清、豚鼠血清、马血清、酪蛋白、白蛋白、明胶、牛血清白蛋白、人血清白蛋白等。洗涤剂可含有 Tween-20、Triton X-100 等。

检测粪便样品中可能存在的幽门螺杆菌，其方法有直接法和间接法。直接法是指，将抗幽门螺杆菌抗体标记微球，形成免疫微球；将免疫微球与含粪便的样品缓冲液混合，检测与免疫微球结合的幽门螺杆菌，如：凝集反应、免疫花环、检测免疫微球与缓冲液混合前后缓冲液物理或化学特性的改变(如颜色、浊度、通透性等)、检测免疫微球与缓冲液混合前后微球数量以及物理特性的改变(游离

的微球的浓度)等等。间接方法通常有凝集抑制反应,其原理是幽门螺杆菌抗原标记的微球与一定量抗该细菌的抗体结合而出现凝集反应,当存在该细菌感染时,粪便中的幽门螺杆菌抗原竞争与抗体结合,从而抑制幽门螺杆菌抗原标记微球的凝集。凝集抑制反应包括:

(a)把幽门螺杆菌的抗原标记微球,形成免疫微球;

(b)把怀疑含有幽门螺杆菌的粪便悬浮于样品缓冲液中;

(c)将一定量的抗幽门螺杆菌抗体与含粪便的样品缓冲液混合,2—10分钟后加入幽门螺杆菌抗原标记的微球;

(d)将上述液体充分混合、连续摇动2—10分钟即可观察结果:出现凝集颗粒的为阴性反应,说明粪样品中无幽门螺杆菌或者量很少;保持均匀乳液状为阳性反应,说明粪便样品中存在幽门螺杆菌。

凝集试验分试管法与玻片法。玻片法操作简便,一定体积上述方法制备粪便样品(为提高灵敏度通常要将样品浓集处理)和等体积抗幽门螺杆菌抗体致敏的胶乳试剂在玻片(一般为黑色背景)上混匀后,连续摇动数分钟即可观察结果。出现凝集颗粒的为阳性反应,说明粪便样品中存在幽门螺杆菌;保持均匀乳液状为阴性反应,说明粪样品中无幽门螺杆菌或者量很少。

免疫微球花环形成试验 取一定体积上述方法制备粪便样品和等量的抗幽门螺杆菌抗体致敏的免疫微球试剂在小试管中,混合后置室温或37℃温度10—40分钟。以磷酸盐缓冲液离心洗涤2次。取末次沉淀细胞一滴置载玻片上,然后染色,在显微镜下检测免疫花环。显微镜下,幽门螺杆菌的典型形态为:s状、海鸥状弯曲。如果有免疫花环形成,则在细菌的四周有免疫微球粘附,似花环一样,故称免疫微球花环试验。如果发现S状或海鸥状弯曲的被染色细菌,同时在其四周有2~3个以上的微球粘附,则表示花环试验阳性,据此可推测该粪便样品中存在幽门螺杆菌;如未发现免疫花环形成,则说明粪样品中无幽门螺杆菌或者量很少。

检测缓冲液的物理或化学特性改变的方法常用的有浊度法。浊度法是根据抗幽门螺杆菌抗体致敏的免疫微粒与其相应的抗原结合后形成凝集颗粒,使反应混合物系统的浊度变小,透射光增强,浊度的改变与幽门螺杆菌的浓度呈函数关系,由此可测出样品中幽门螺杆菌的量。可利用实验室常用分光光度计以340—500nm波长的入射光进行测定。亦可用光散射法测定凝集颗粒在某一角度的散射光强度的改变,检测灵敏度高于透射光浊度法。浊度法的灵敏度比粒子计数法约低1—2倍,但已能满足定量测定要求。

检测免疫微球与缓冲液混合前后微球数量以及物理特性的改变。常用的方法有粒子计数法。粒子计数法的原理是根据包被了抗幽门螺杆菌抗体的免疫微球,与其相应的抗原结合发生凝集反应,使原来处于分散状态的免疫微球数量减少。被测物浓度越高,凝集反应愈强,游离免疫微球数量愈少,通过计数反应前后游离状态免疫微球数量的变化,就能对样品中被测物-幽门螺杆菌作出定量分析。该方法操作简便,检测灵敏度高,一般为0.1—1ng/ml范围;所用仪器设备可以和临床实验室常用的血细胞计数仪及生化自动分析仪DIAS系统通用。

(四)附图说明:

表1为现有的酶联免疫检测方法和本发明所述乳胶凝集进行检测的结果对比。

表2为酶联免疫检测方法和本发明所述乳胶凝集同时检测4份粪便样品的结果。

以下通过一些非限定性实施例对本发明作进一步说明。

(五) 具体实施方案:

实施例一: 物理方法致敏微球

材料准备: 直径0.6~1.2微米的聚苯乙烯微球(可向美国SIGMA公司购买), 羊抗幽门螺杆菌的多克隆抗体、幽门螺杆菌抗原(抗原标准品或可溶性抗原)(可向美国KPL公司、中国深圳晶美生物工程有限公司购买)。

缓冲液配制:

0.27mol/L 甘氨酸缓冲液: 7.51 克甘氨酸、9.95 克氯化钠溶于蒸馏水, 用1mol/L 氢氧化钠调至 pH8.2, 蒸馏水补足至 1 升。

0.27mol/L 甘氨酸缓冲液+1%人血清白蛋白: 1 克人血清白蛋白溶于 100 毫升 0.27mol/L 甘氨酸缓冲液。

0.054 mol/L 甘氨酸缓冲液: 用蒸馏水将 0.27mol/L 甘氨酸缓冲液作 1: 5 稀释即可。

先用蒸馏水将 1 毫升 10%的胶乳悬液稀释至 1—2%, 用 0.054 mol/L 甘氨酸缓冲液将乳胶洗压积 3 次(10000g 离心 20 分钟)。然后重新悬浮于 10 毫升 0.054 mol/L 甘氨酸缓冲液, 逐渐将 1 毫克抗体或抗原加入稀释的胶乳悬液中, 摇动使之充分混和。(1%胶乳悬液 1ml 一般能吸附 0.1~1mg 物质)。混合后可放置室温或 37℃保温, 时间一般为 30~60 分钟。吸附完成后, 10, 000g 离心沉淀 30 分钟, 除去游离在上清液中的未吸附物, 倾去上清液后, 沉淀用 0.27mol/L 甘氨酸缓冲液+1%人血清白蛋白缓冲液恢复悬浮状态。加 0.04%叠氮钠, 于 4℃保存, 备用。

实施例二: 化学交联法致敏微球

带醛基的聚醛基聚苯乙烯微球 1%乳胶 1 毫升加 0.1 毫克抗体或抗原, 加 10 毫升 0.1mol/L pH5.3 醋酸盐缓冲液。室温下, 使容器搅拌 10 小时, 然后 10000g 离心 20 分钟, 去上清液。沉淀加 10 毫升 pH 9.5 1mol/L 乙醇胺/0.1%Tween-20。搅拌 3 小时, 然后 10000g 离心 20 分钟, 去上清液。沉淀加 10 毫升 Tris 缓冲液, 搅拌 24 小时, 离心 10000g 20 分钟, 去上清液。加含 1%人血清白蛋白的磷酸盐缓冲液 10 毫升, 重新悬浮; 加 0.04%叠氮钠, 于 4℃保存, 备用。

0.1mol/L pH5.3 醋酸盐缓冲液: 0.1mol/L 醋酸 10 毫升, 0.1mol/L 醋酸钠 40 毫升。

Tris 缓冲液: 0.05mol/L Tris 0.1mol/氯化钠。

实施例三: 粪便样品准备

将粪便样品按 1: 4 或 1: 6 稀释, 将适当粪便样品加入样品稀释液中, 充分混合。200 转/分, 离心 3 分钟。取上清液, 待测。在采用凝集反应以及凝集抑制反应检测幽门螺杆菌时, 为提高检测灵敏度, 可将样品浓集处理, 将该上清液 12000g 离心 15 分钟, 去上清液, 将沉淀再打散、混匀, 待测。

样品稀释液: 100 毫升 0.27mol/L 甘氨酸缓冲液, 加入人血清白蛋白 1 克, 加 Tween-20 3 毫升。同时加 0.04%叠氮钠。

实施例四: 乳胶凝集反应

凝集试验(采用玻片法) 12cm×16cm 玻璃凝集反应板(板上分 1cm×1.5cm 的 30 个小方格, 一般为黑色背景)。一滴(约 30—50 微升)上述方法制备粪便样品和一滴(约 30—50 微升)抗幽门螺杆菌抗体致敏的胶乳试剂在玻片上混匀后, 连续摇动数分钟(顺时针或反时针方向)即可观察结果。出现凝集大颗粒的为阳性反应, 说明粪便样品中存在幽门螺杆菌; 保持均匀乳液状为阴性反应, 说明粪样品

中无幽门螺杆菌或者量很少。

对照设置：以生理盐水为空白对照，以酶联免疫检测为阴性的粪便标本做为阴性对照。

判断结果

“++++”：乳胶颗粒全部凝集出现粗颗粒，并且四周成一白色框边，一般 1~2 分钟出现凝集颗粒，液体清亮为特强阳性“++++”。

“+++”：乳胶颗粒全部凝集出现粗颗粒，四周白色框边不太明显，一般 3~4 分钟出现凝集颗粒，液体较清亮为强阳性“+++”。

“++”：乳胶出现凝集颗粒，液体微混浊，一般 5~6 分钟出现凝集颗粒为较强阳性“++”。

“+”：乳胶出现凝集颗粒，液体混浊，一般 8~10 分钟出现凝集颗粒为弱阳性“+”。

“-”：不凝集，呈白色均匀混浊为阴性“-”。

阳性判断标准：凡出现凝集就判为阳性。

必要时可将粪便标本作一系列等倍稀释，进行半定量测定。

将粪便样品浓集处理后（两次离心，200 转/分，离心 3 分钟，取上清液，再将该上清液 12000g 离心 15 分钟，去上清液，将沉淀再打散、混匀，待测），乳胶凝集反应灵敏度与酶联免疫方法类似。

通过把已知数量的幽门螺杆菌抗原，配制成校准品，同时采用中国专利(申请号 97103112.6)所述酶联免疫检测方法和本发明所述乳胶凝集进行检测，结果见表 1。

两种方法同时检测 4 份粪便样品，结果见表 2。

从表 1、2 可以看出将粪便样品经浓集处理后所作乳胶凝集反应的灵敏度与酶联免疫方法相当。

实施例五、凝集抑制反应：

把适当稀释度的 50 微升抗幽门螺杆菌抗体与实施例三制备的含粪便的样品缓冲液充分混合，然后加入等体积幽门螺杆菌抗原标记的免疫微球；将上述液体充分混合、连续摇动数分钟（顺时针或反时针方向）即可观察结果。

结果判定：出现凝集颗粒的为阴性反应，说明粪样品中无幽门螺杆菌或者量很少；保持均匀乳液状为阳性反应，说明粪便样品中存在幽门螺杆菌。

凝集抑制反应较乳胶凝集反应敏感度高

实施例六、免疫微球花环形成试验

取一滴(50 微升)实施例三制备粪便样品和一滴(50 微升)抗幽门螺杆菌抗体致敏的免疫微球试剂在小试管中，混合后置 37℃ 间断振摇 30~60 分钟。然后用磷酸盐缓冲液以 4000 转 / 分离心 20 分钟洗涤 2 次。取末次沉淀细胞一滴置载玻片上，同时加一滴美蓝溶液，染色 3~15 分钟加上盖玻片；在高倍镜或油镜下检测免疫花环。显微镜下，幽门螺杆菌被美蓝染成蓝色，其典型的形态为：s 状、海鸥状弯曲。如果有免疫花环形成，则在该细菌的四周有微球粘附，似花环一样，故称免疫微球花环试验。在显微镜下，如果发现 S 状或海鸥状弯曲的被染成蓝色细菌，同时在其四周有 2~3 个以上的微球粘附，则表示花环试验阳性，该粪便样品中存在幽门螺杆菌；如未发现免疫花环形成，则说明粪样品中无幽门螺杆菌或者量很少。

本方法较乳胶凝集试验及酶联免疫均敏感。

用于幽门螺杆菌染色的方法有很多种，这是本研究领域技术人员所熟知的，如革兰氏染色、银染色、美蓝染色。在此仅选择一种较方便的染色方法。

美蓝染液：美蓝(亚甲基蓝)1.0g，硼酸 0.5g，加蒸馏水至 100 ml。

实施例七、透射比浊法

应用 RA—50 半自动生化分析仪上采用透射比浊法检测粪便样品幽门螺杆菌。

采用前述物理吸附方法将抗幽门螺杆菌的抗体标记到较细的微球上(直径 0.2 微米左右)。

幽门螺杆菌抗原标准品(可向深圳晶美生物工程公司购买)，标准曲线制备：用 0.1mol/L 甘氨酸缓冲液(pH7.4)将幽门螺杆菌标准品稀释成 1.1×10^6 、 3×10^6 、 9×10^7 、 1.9×10^7 /毫升，按下列步骤操作，作标准曲线。

操作方法：将实施例三所制备的粪便样品(只一次离心后取上清液)200 微升加免疫微球 100 微升，充分混匀，30℃水浴 1 分钟，RA—50 半自动生化分析仪，340NM 波长终点法测定，仪器根据内存的标准曲线计算打印测定结果。标准曲线测定时加标准品与免疫微球，同上水浴后，读数。为避免粪便样品本身浊度干扰，应设样品对照。

浊度法的灵敏度比酶联免疫方法低，但已能满足定量测定要求。

表 1

<u>有机体的数目(每毫升)</u>	<u>酶联免疫检测</u>	<u>乳胶凝集检测</u>
3×10^7	特强阳性	特强阳性
1.9×10^7	较强阳性	较强阳性
4.6×10^6	阳性	阴性/浓集后弱阳性
1.1×10^6	阴性	阴性

表 2

<u>样品</u>	<u>酶联免疫检测</u>	<u>乳胶凝集检测</u>
1	强阳性	较强阳性
2	较强阳性	强阳性
3	阳性	阴性/浓集后弱阳性
4	阴性	阴性

专利名称(译)	测定粪便样品中幽门螺杆菌的免疫微球方法		
公开(公告)号	CN1378084A	公开(公告)日	2002-11-06
申请号	CN02115746.4	申请日	2002-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	王滔		
申请(专利权)人(译)	王滔		
当前申请(专利权)人(译)	王滔		
[标]发明人	王滔		
发明人	王滔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 G01N33/574 G01N33/577		
其他公开文献	CN1173183C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种测定粪便样品中幽门螺杆菌的免疫微球方法,它解决了现有技术中所采用的试剂和仪器成本高、操作费工费时的问题。本发明的方法是:(a)把抗幽门螺杆菌的抗体/或幽门螺杆菌抗原标记微球,形成免疫微球;(b)把怀疑含有幽门螺杆菌的粪便悬浮于样品缓冲液中;(c)将已标记抗幽门螺杆菌抗体的免疫微球与含粪便的样品缓冲液混合;或将一定抗幽门螺杆菌抗体与含粪便的样品缓冲液混合,然后加入幽门螺杆菌抗原标记微球;(d)检测粪便中可能存在的幽门螺杆菌。本发明采用免疫微球技术,检测粪便样品中的幽门螺杆菌。它具有成本低廉、操作方便快捷、结果可靠等优点。本发明的方法主要用于对粪便样品中幽门螺杆菌中的免疫微球的测定。

表 1

有机体的数目(每毫升)	酶联免疫检测	乳胶凝集检测
3×10^7	特强阳性	特强阳性
1.9×10^7	较强阳性	较强阳性
4.6×10^6	阳性	阴性/浓集后弱阳性
1.1×10^6	阴性	阴性

表 2

样品	酶联免疫检测	乳胶凝集检测
1	强阳性	较强阳性
2	较强阳性	强阳性
3	阳性	阴性/浓集后弱阳性
4	阴性	阴性