



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102243232 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 16

(21) 申请号 201010171862. 2

G01N 21/31 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 05. 14

(71) 申请人 北京贝尔生物工程有限公司

地址 102612 北京市大兴区黄村镇芦城工业
区创新路 99 号

(72) 发明人 常延滨 邵育晓

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 诊断试剂盒 (酶联免疫法)

(57) 摘要

本发明涉及生物医药领域,具体涉及一种检测肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 的酶联免疫诊断试剂盒及其制备方法和应用。由肠道病毒 71 型引起手足口病,发生重症感染的比例较大 (病毒性脑炎、病毒性脑脊髓膜炎、肺水肿),病死率也较高可达 10% - 25%, EV71-IgM 抗体酶联免疫诊断试剂盒,可用于 EV71 感染的诊断。EV71-IgM 检测已有相关文献报道,多是 EV71 病毒培养物作为包被抗原的间接 ELISA,特异性、灵敏度和稳定性方面尚存诸多不足;由于病毒培养成本高,效率低,无法大量供应市场。本发明克服上述不足,提供一种临床检验急需、操作简便、适合各医疗疾控部门使用的检测人血清中 EV71-IgM 的试剂盒及其制备方法和应用。技术方案是首先将血清加入到微孔板中,其中的 IgM 抗体被预包被在微孔板上的抗 μ 链捕获,未结合的其他成分被洗涤除去,第二步,加入酶标记物,被捕获的 IgM 中的 EV71-IgM 会与 HRP 标记的 EV71 重组抗原特异性的结合,洗涤后,HRP 会和后续加入的底物反应。最终达到检测 EV71-IgM 抗体的目的。

1. 一种肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 的酶联免疫测定试剂盒,其特征在于该试剂盒包括抗人 -IgM(μ 链) 单克隆抗体预包被的微孔板、辣根过氧化物酶标记的重组肠道病毒 71 型抗原、阳性对照血清、阴性对照血清、浓缩洗涤液 (20 \times)、底物液 A、底物液 B 和终止液。

2. 根据权利要求 1 所述的一种肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 的酶联免疫测定试剂盒的制备方法,其特征在于该方法包括下列步骤:

2.1. 抗人 -IgM(μ 链) 单克隆抗体预包被微孔板的制备

2.1.1 包被

0.05mol/L(0.05 毫摩尔 / 升), pH9.6 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲系统,加入适量抗人 -IgM(μ 链) 单克隆抗体,混匀后按每孔 100ul(微升) 加入到微孔板中,37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时,室温过夜,然后甩去孔内液体,拍干;

2.1.2 洗涤

0.01mol/L PBS-T(0.01 毫摩尔 / 升磷酸氢钠 - 磷酸二氢钠缓冲系统,0.05% 的 Tween-20), pH7.2,按每孔加入 150ul 的量加入到微孔板中,然后甩去,重复洗涤一次,拍干。

2.1.3 封闭

0.01mol/L PBS,10% 小牛血清,0.25% 酪蛋白,0.1% 硫柳汞钠, pH7.2,按每孔加入 110ul 的量加入到微孔板中,37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时,然后甩去孔内液体,拍干;

2.1.4 干燥

封闭后的微孔板,甩去孔内液体拍干后,放置于干燥室(相对湿度小于 45%) 过夜,然后放入有干燥剂的铝箔袋中封口,保存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 环境。

2.2. 酶标抗原工作液的制备

0.01mol/L PBS,10% 小牛血清,0.25% 酪蛋白,1/1000 Proclin300, pH 7.2 的 buffer 中加入适量辣根过氧化物酶标记的重组肠道病毒 71 型 VP1 抗原,保存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 环境。

2.3. 阳性对照的制备

取 A_{450} 值 ≥ 2.0 的抗 EV71-IgM 阳性多份人血清混匀,用 56 $^{\circ}$ C 水浴锅加热 120 分钟,用 0.01mol/L PBS,20% BSA, pH 7.2 的 buffer 调整到 A_{450} 值 > 1.0 ,加入万分之五的硫柳汞钠,保存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 环境。

2.4. 阴性对照的制备

取 A_{450} 值 < 0.1 的抗 EV71-IgM 阴性多份人血清混匀,用 56 $^{\circ}$ C 水浴锅加热 120 分钟,自然冷却后,加入万分之五的硫柳汞钠,保存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 环境。

2.5. 底物液 A

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	18g
柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$	5g
乙酸钠	9.25g
乙酸	1.2ml
Na_2O_2	5g
去离子水	1000ml, pH5.0

2.6. 底物液 B

先用 5ml DMSO(二甲亚砜) 溶解 0.25g TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺);取 1000ml 去离

子水加入约 1ml 浓盐酸,混匀后 pH2.5,将 TMB 溶液加入到盐酸溶液中混匀。

2.7. 终止液

浓硫酸 100ml

去离子水 800ml

2.8. 20X 浓缩洗涤液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 58g

NaH_2PO_4 8g

NaCl 160g

Tween-20 10.0ml

去离子水 1000ml,调整 pH7.2

3. 一种人血清中肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 测定方法,其特征在于该方法包括下列步骤操作:

3.1. 取出试剂盒置室温平衡 30 分钟。将 20× 洗涤液用蒸馏水做 20 倍稀释。

3.2. 加样品:取出包被板,作好标记,留 1 孔空白对照,其余加入阴性对照 3 孔阳性对照 2 孔 50u1/ 孔及待测标本 50u1/ 孔于相应的反应板孔内,空白对照不加。将反应板轻轻震荡混匀后,用封板膜封板,置 37℃温箱或水浴中反应 30 分钟。

3.3. 洗板:温育后,将封板膜揭掉,吸干孔内液体,用洗涤液洗板 5 次,每次浸泡 30 秒钟。

3.4. 加酶标工作液:每孔加入 50u1 酶标工作液,空白孔除外。

3.5. 温育:用封板膜封板后,置 37℃温箱或水浴中反应 30 分钟。

3.6. 洗板:温育后,将封板膜揭掉,吸干孔内液体,用洗涤液洗板 5 次,每次浸泡 30 秒钟。

3.7. 显色:每孔加入底物 A、B 液各 50u1,震荡混匀,用封板膜封板后,置 37℃温箱或水浴中反应 15 分钟

3.8. 终止:每孔加入终止液 50u1,轻轻震荡混匀。

3.9. 测定:设定酶标仪波长于 450nm(建议双波长 450/630nm 检测),测定各孔 A450 值。
注意:在终止反应 30 分钟内读数。当使用单波长时,校准空白孔,设定酶标仪波长于 450nm,测定各孔 A450 值,当使用双波长 450/630nm 检测时,可以不设空白孔,直接测定各孔 A 值。

肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 诊断试剂盒 (酶联免疫法)

技术领域：

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及一种检测肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 的酶联免疫测定试剂盒及其制备方法和应用。

技术背景：

[0002] 肠道病毒 EV71 型感染是由人肠道病毒 71 型 (EV71) 引起的疾病的总称,临床上主要表现为手足口病,手足口病多在婴幼儿中爆发流行,部分 EV71 感染患儿表现为疱疹性咽峡炎,重症患者出现病毒性脑炎、病毒性脑脊髓膜炎、肺水肿、肺出血等。引起手足口病的病原,最常见的是柯萨奇病毒 A16 和肠道病毒 71 型;由肠道病毒 71 型感染引起的疾病发生重症感染的比例较大,病死率也较高,重症病例病死率可达 10% -25%,因此病原学诊断意义重大。

[0003] 肠道病毒 71 型 (EV71) 基因组为含有大约 7.5Kb 的单股正链 RNA,包括 5' 端非编码区、3' 端非编码区和由 P1、P2、P3 所组成的多蛋白,共编码 11 种蛋白,其中 4 个结构蛋白 VP1、VP2、VP3、VP4,7 个非结构蛋白 2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D。其中 VP1、VP2、VP3 暴露于病毒外壳的表面,为 EV71 主要的抗原变异位置;VP4 包埋在病毒外壳的内侧与内部的 RNA 结合,其功能类似病毒外壳的锚,用以稳定病毒蛋白的结构。非结构蛋白 2A 为分裂初期先驱蛋白质,也与终止宿主细胞合成其本身所需蛋白有关;3C 则参与大部分的蛋白裂解反应;3D 为 RNA 聚合酶,在病毒 RNA 复制时主导转录及复制反应;2B、2C、3A、3B 等四种蛋白则与病毒 RNA 的复制有关。由于中和抗原表位多集中于 VP1,故 VP1 是 EV71 病毒的主要中和决定因子,因此 VP1 蛋白被认为是最适合来建立 ELISA 方法的抗原。

[0004] 肠道病毒 EV71 的临床诊断主要依据三个方面:一是临床表现,二是血清学证据,三是病原学证据。由于肠道病毒 EV71 型感染临床表现多,因此肠道病毒 EV71 的血清学检测和病原学检测是目前最主要的依据。EV71 感染产生终生免疫保护,感染后可检出 IgM 和 IgG 抗体。IgM 试剂是最适于临床近期感染诊断的重要指标。EV71-IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒,是一种科学、方便、经济的 EV-71 感染的血清学检测方法。

[0005] 肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 的检测已有相关文献报道,基本上是以肠道病毒 71 型的病毒培养物为抗原作为包被抗原的间接 ELISA,试剂盒在特异性、灵敏度和稳定性方面尚存诸多不足之处;并且,由于病毒培养成本高,效率低,无法大量供应市场。

发明内容：

[0006] 本发明要解决的技术问题在于克服上述不足,提供一种临床检验急需、操作简便、适合各医疗疾控部门使用的可检测人血清或血浆中肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 的酶联免疫测定试剂盒及其制备方法和应用。

[0007] 本发明提供了一种肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 的酶联免疫测定试剂盒,其组分包括:抗人 -IgM(μ 链)单克隆抗体预包被的微孔板、辣根过氧化物酶标记的重组肠道病毒 71 型抗原、阳性对照、阴性对照、标本稀释液、浓缩洗涤液 (20 \times)、底物液 A、底物液 B 和终止

液。

[0008] 本发明的技术方案是：首先将血清样本加入到微孔板中，样本中的 IgM 抗体被预包被在微孔板上的抗人 -IgM(μ 链) 单克隆抗体吸附(捕获)，未结合的其他成分(包括特异的 IgG 抗体) 将被洗涤除去，第二步，加入肠道病毒 71 型抗原酶标记物，被捕获的 IgM 中的 EV71-IgM 会与辣根过氧化物酶标记的 EV71 重组抗原特异性的结合，洗去其他未结合物，辣根过氧化物酶会和后续加入的底物反应。最终达到检测 EV71-IgM 抗体的目的。

[0009] 本发明的另一个目的是提供了一种肠道病毒 71 型抗体(IgM) 的酶联免疫测定试剂盒的制备方法，该方法包括下列步骤：

[0010] 1. 抗人 -IgM(μ 链) 单克隆抗体预包被微孔板的制备

[0011] 1.1 包被

[0012] 0.05mol/L(0.05 毫摩尔/升)，pH9.6 碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲系统，加入适量抗人 -IgM(μ 链) 单克隆抗体，混匀后按每孔 100 μ l(微升) 加入到微孔板中，37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时，室温过夜，然后甩去孔内液体，拍干；

[0013] 1.2 洗涤

[0014] 0.01mol/L PBS-T(0.01 毫摩尔/升磷酸氢钠 - 磷酸二氢钠缓冲系统，0.05% 的 Tween-20)，pH7.2，按每孔加入 150 μ l 的量加入到微孔板中，然后甩去，重复洗涤一次，拍干。

[0015] 1.3 封闭

[0016] 0.01mol/L PBS，10% 小牛血清，0.25% 酪蛋白，0.1% 硫柳汞钠，pH7.2，按每孔加入 110 μ l 的量加入到微孔板中，37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时，然后甩去孔内液体，拍干；

[0017] 1.4 干燥

[0018] 封闭后的微孔板，甩去孔内液体拍干后，放置于干燥室(相对湿度小于 45%) 过夜，然后放入有干燥剂的铝箔袋中封口，保存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 环境。

[0019] 2. 酶标抗原工作液的制备

[0020] 0.01mol/L PBS，10% 小牛血清，0.25% 酪蛋白，1/1000Proclin300，pH 7.2 的 buffer 中加入适量辣根过氧化物酶标记的重组肠道病毒 71 型 VP1 抗原，保存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 环境。

[0021] 3. 阳性对照的制备

[0022] 取 A_{450} 值 ≥ 2.0 的抗 EV71-IgM 阳性多份人血清混匀，用 56 $^{\circ}$ C 水浴锅加热 120 分钟，用 0.01mol/L PBS，20% BSA，pH 7.2 的 buffer 调整到 A_{450} 值 > 1.0 ，加入万分之五的硫柳汞钠，保存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 环境。

[0023] 4. 阴性对照的制备

[0024] 取 A_{450} 值 < 0.1 的抗 EV71-IgM 阴性多份人血清混匀，用 56 $^{\circ}$ C 水浴锅加热 120 分钟，自然冷却后，加入万分之五的硫柳汞钠，保存于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 环境。

[0025] 5. 底物液 A

[0026] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 18g

[0027] 柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 5g

[0028] 乙酸钠 9.25g

[0029] 乙酸 1.2ml

- [0030] Na_2O_2 5g
- [0031] 去离子水 1000ml, pH5.0
- [0032] 6. 底物液 B
- [0033] 先用 5ml DMSO (二甲亚砜) 溶解 0.25g TMB (3,3,5,5-四甲基联苯胺); 取 1000ml 去离子水加入约 1ml 浓盐酸, 混匀后 pH2.5, 将 TMB 溶液加入到盐酸溶液中混匀。
- [0034] 7. 终止液
- [0035] 浓硫酸 100ml
- [0036] 去离子水 800ml
- [0037] 8. 20X 浓缩洗涤液
- [0038] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 58g
- [0039] NaH_2PO_4 8g
- [0040] NaCl 160g
- [0041] Tween-20 10.0ml
- [0042] 去离子水 1000ml, 调整 pH7.2
- [0043] 本发明的又一个目的是提供了一种人血清中肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 测定方法, 本发明的试剂盒在使用时可以按下列步骤操作:
- [0044] 1. 取出试剂盒置室温平衡 30 分钟。将 20× 洗涤液用蒸馏水做 20 倍稀释。
- [0045] 2. 加样品: 取出包被板, 作好标记, 留 1 孔空白对照, 其余加入阴性对照 3 孔阳性对照 2 孔 50u1/ 孔及待测标本 50u1/ 孔于相应的反应板孔内, 空白对照不加。将反应板轻轻震荡混匀后, 用封板膜封板, 置 37°C 温箱或水浴中反应 30 分钟。
- [0046] 3. 洗板: 温育后, 将封板膜揭掉, 吸干孔内液体, 用洗涤液洗板 5 次, 每次浸泡 30 秒钟。
- [0047] 4. 加酶标工作液: 每孔加入 50u1 酶标工作液, 空白孔除外。
- [0048] 5. 温育: 用封板膜封板后, 置 37°C 温箱或水浴中反应 30 分钟。
- [0049] 6. 洗板: 温育后, 将封板膜揭掉, 吸干孔内液体, 用洗涤液洗板 5 次, 每次浸泡 30 秒钟。
- [0050] 7. 显色: 每孔加入底物 A、B 液各 50u1, 震荡混匀, 用封板膜封板后, 置 37°C 温箱或水浴中反应 15 分钟
- [0051] 8. 终止: 每孔加入终止液 50u1, 轻轻震荡混匀。
- [0052] 9. 测定: 设定酶标仪波长于 450nm (建议双波长 450/630nm 检测), 测定各孔 A450 值。注意: 在终止反应 30 分钟内读数。当使用单波长时, 校准空白孔, 设定酶标仪波长于 450nm, 测定各孔 A450 值, 当使用双波长 450/630nm 检测时, 可以不设空白孔, 直接测定各孔 A 值。
- [0053] 本发明具有如下特点:
- [0054] 1. 采用捕获两步法进行检测, 血清不用二次稀释简化了操作过程, 避免了间接法中的多种干扰因素, 是检测的灵敏度和特异性得到提高。
- [0055] 2. 操作方法简单, 实用性强, 适合各级医疗单位和疾控中心使用。

具体实施方式:

[0056] 实例 1. 抗人 -IgM(u 链) 单克隆抗体预包被微孔板的制备

[0057] 1.1 包被

[0058] Na₂CO₃ 1.6g

[0059] NaHCO₃ 2.9g

[0060] 去离子水 1000ml,

[0061] 调整 pH9.6, 加入适量抗人 -IgM(μ 链) 单克隆抗体, 混匀后按每孔 100u1 (微升) 加入到微孔板中, 37℃ 放置 2 小时, 室温过夜, 然后甩去孔内液体, 拍干;

[0062] 1.2 洗涤

[0063] Na₂HPO₄·12H₂O 3.72g

[0064] NaH₂PO₄ 0.4g

[0065] NaCl 6.8g

[0066] Tween-20 0.5ml

[0067] 去离子水 1000ml,

[0068] 调整 pH7.2 按每孔加入 150u1 的量加入到微孔板中, 然后甩去, 重复洗涤一次, 拍干。

[0069] 1.3 封闭

[0070] Na₂HPO₄·12H₂O 3.72g

[0071] NaH₂PO₄ 0.4g

[0072] NaCl 6.8g

[0073] 牛血清 100.0ml

[0074] 去离子水 1000ml,

[0075] 硫柳汞钠 1g

[0076] 调整 pH7.2, 按每孔加入 110u1 的量加入到微孔板中, 37℃ 放置 2 小时, 然后甩去孔内液体, 拍干;

[0077] 1.4 干燥

[0078] 封闭后的微孔板, 甩去孔内液体拍干后, 放置于干燥室 (相对湿度小于 45%) 过夜, 然后放入有干燥剂的铝箔袋中封口, 保存于 2 ~ 8℃ 环境。

[0079] 实例 2. 酶标抗原工作液的制备

[0080] Na₂HPO₄·12H₂O 3.72g

[0081] NaH₂PO₄ 0.4g

[0082] NaCl 6.8g

[0083] 牛血清 100.0ml

[0084] 酪蛋白 2.5g

[0085] 小牛血清 100ml

[0086] Proclin300 1ml

[0087] 去离子水 900ml,

[0088] 调整 pH 7.2, 加入适量辣根过氧化物酶标记的重组肠道病毒 71 型 VP1 抗原, 保存于 2 ~ 8℃ 环境。

[0089] 实例 3. 阳性对照的制备

[0090] 取 A_{450} 值 ≥ 2.0 的抗 EV71-IgM 阳性多份人血清混匀,用 56℃ 水浴锅加热 120 分钟,自然冷却后,用 0.01mol/L PBS,20% BSA,pH 7.2 的 buffer 调整到 A_{450} 值 > 1.0 ,加入万分之五的硫柳汞钠,保存于 2 ~ 8℃ 环境。

[0091] 实例 4. 阴性对照的制备

[0092] 取 A_{450} 值 < 0.1 的抗 EV71-IgM 阴性多份人血清混匀,用 56℃ 水浴锅加热 120 分钟,自然冷却后,加入万分之五的硫柳汞钠,保存于 2 ~ 8℃ 环境。

[0093] 实例 5. 底物液 A

[0094] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 18g
 [0095] 柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 5g
 [0096] 乙酸钠 9.25g
 [0097] 乙酸 1.2ml
 [0098] Na_2O_2 5g
 [0099] 去离子水 1000ml, pH5.0

[0100] 实例 6. 底物液 B

[0101] 先用 5ml DMSO (二甲亚砜) 溶解 0.25g TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺);取 1000ml 去离子水加入约 1ml 浓盐酸,混匀后 pH2.5,将 TMB 溶液加入到盐酸溶液中混匀。

[0102] 实例 7. 终止液

[0103] 浓 H_2SO_4 100ml
 [0104] 去离子水 800ml

[0105] 实例 8. 20X 浓缩洗涤液

[0106] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 58g
 [0107] NaH_2PO_4 4g
 [0108] NaCl 160g
 [0109] Tween-20 10.0ml
 [0110] 去离子水 1000ml, 调整 pH7.2

[0111] 实例 9.

[0112] 9.1 用本发明的试剂盒与卫生部医药生物工程技术研究中心和中山大学达安基因股份有限公司研制生产的肠道病毒 EV71 逆转录 - 聚合酶链反应试剂盒在宁波市疾病预防控制中心和河北省疾病预防控制中心平行检测临床血清 650 例 (其中健康人员血清 450 例, EV71 急性期阳性血清 192 例, CA16 阳性血清 18 例), 具体结果如下:

[0113] 表 1 贝尔公司生产的 EV71-IgM 试剂和 PCR 试剂的比较

[0114]

实验分组	例数	北京贝尔		达安基因 PCR 试剂	
		阳性	阴性	阳性	阴性
EV71 急性期 阳性血清	192	192	0	192	0
CA16 阳性血清	18	0	18	0	18
正常人群	450	0	450	0	450

[0115] 9.2 用本发明的试剂盒与病毒病预防控制所国家麻疹实验室研制的肠道病毒 EV71 中和试验试剂平行检测临床血清 400 例（其中健康人员血清 50 例，EV71 急性期阳性血清 230 例，A16 阳性血清 20 例），

[0116] 表 2 贝尔公司生产的 EV71-IgM 试剂和中和试剂的比较

实验分组	例数	北京贝尔		中和试验	
		阳性	阴性	阳性	阴性
[0117] EV71 急性期 阳性血清	230	230	0	230	0
CA16 阳性血清	20	0	20	0	20
正常人群	50	0	50	0	50

[0118] 以上结果表明，本发明用于测定人血清中肠道病毒 71 型抗体 (IgM) 具有良好的灵敏度和特异性，适用于手足口病的病原学实验室辅助诊断，且操作简便，适合各级医疗和疾控部门使用。

专利名称(译)	肠道病毒71型抗体(IgM)诊断试剂盒(酶联免疫法)		
公开(公告)号	CN102243232A	公开(公告)日	2011-11-16
申请号	CN201010171862.2	申请日	2010-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	北京贝尔生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京贝尔生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京贝尔生物工程有限公司		
[标]发明人	常延滨 邵育晓		
发明人	常延滨 邵育晓		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/535 G01N21/31		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物医药领域，具体涉及一种检测肠道病毒71型抗体(IgM)的酶联免疫诊断试剂盒及其制备方法和应用。由肠道病毒71型引起手足口病，发生重症感染的比例较大(病毒性脑炎、病毒性脑脊髓膜炎、肺水肿)，病死率也较高可达10%-25%，EV71-IgM抗体酶联免疫诊断试剂盒，可用于EV71感染的诊断。EV71-IgM检测已有相关文献报道，多是EV71病毒培养物作为包被抗原的间接ELISA，特异性、灵敏度和稳定性方面尚存诸多不足；由于病毒培养成本高，效率低，无法大量供应市场。本发明克服上述不足，提供一种临床检验急需、操作简便、适合各医疗疾控部门使用的检测人血清中EV71-IgM的试剂盒及其制备方法和应用。技术方案是首先将血清加入到微孔板中，其中的IgM抗体被预包被在微孔板上的抗 μ 链捕获，未结合的其他成分被洗涤除去，第二步，加入酶标记物，被捕获的IgM中的EV71-IgM会与HRP标记的EV71重组抗原特异性的结合，洗涤后，HRP会和后续加入的底物反应。最终达到检测EV71-IgM抗体的目的。

实验分组	例数	北京贝尔		达安基因 PCR 试剂	
		阳性	阴性	阳性	阴性
EV71 急性期 阳性血清	192	192	0	192	0
CA16 阳性血清	18	0	18	0	18
正常人群	450	0	450	0	450