



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101893628 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 24

(21) 申请号 200910247741. 9

(22) 申请日 2009. 12. 30

(71) 申请人 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

地址 200025 上海市卢湾区瑞金二路 207 号

(72) 发明人 陈家旭 蔡玉春 郭俭

(74) 专利代理机构 上海世贸专利代理有限责任公司 31128

代理人 严新德

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/86 (2006. 01)

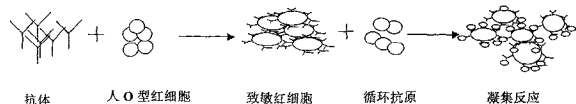
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒及其制造方法

(57) 摘要

本发明提供了一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒及其制造方法,包括冻干抗 SEA 的 IgY 致敏红细胞、致敏红细胞稀释液、标本稀释液、阳性对照品、阴性对照品。本发明还提供了一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒的制造方法,包括一个制备日本血吸虫可溶性抗原的步骤,一个抗原免疫及鸡蛋收集的步骤,一个特异性抗 SEA-IgY 提取纯化的步骤,一个制备醛化红细胞的步骤,一个制备鞣化红细胞的步骤,一个特异抗 SEA-IgY 抗体致敏红细胞的步骤,一个制备冷冻干燥红细胞的步骤。本发明的试剂盒操作简便、快速、敏感性高、特异性强、重复性好。



1. 一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒,所述的试剂盒中载有试剂,其特征在于:所述的试剂由冻干抗 SEA-IgY 致敏红细胞、致敏红细胞稀释液、标本稀释液、阳性对照品和阴性对照品组成,所述的阳性对照品为日本血吸虫可溶性抗原标准稀释液,所述的阴性对照品为人的正常血清。

2. 如权利要求 1 所述的检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒,其特征在于:所述的致敏红细胞稀释液采用双蒸水。

3. 如权利要求 1 所述的检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒,其特征在于:所述的标本稀释液是 0.9%的生理盐水。

4. 如权利要求 1 所述的检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒,其特征在于所述的冻干抗 SEA-IgY 致敏红细胞通过如下方法制备:包括一个制备醛化红细胞的步骤,一个制备鞣化红细胞的步骤,一个特异抗 SEA-IgY 抗体致敏红细胞的步骤,一个制备冷冻干燥红细胞的步骤。

5. 权利要求 1 所述的检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒的制造方法,其特征在于:所述的制造方法包括一个制备日本血吸虫可溶性抗原的步骤,一个抗原免疫及鸡蛋收集的步骤,一个特异性抗 SEA-IgY 提取纯化的步骤,一个制备醛化红细胞的步骤,一个制备鞣化红细胞的步骤,一个特异抗 SEA-IgY 抗体致敏红细胞的步骤,一个制备冷冻干燥红细胞的步骤。

一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒及其制造方法

技术领域：

[0001] 本发明属于生物工程领域，尤其涉及一种试剂盒，具体来说是一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒及其制造方法。

背景技术：

[0002] 1、免疫诊断在日本血吸虫病防治中的重要性

[0003] 血吸虫病是一种广泛流行于热带和亚热带地区的人兽共患寄生虫病，全球 76 个国家和地区的约 2 亿人口受感染，有 6 亿人口受感染威胁。我国是日本血吸虫病流行区，建国初期曾严重影响了人们的正常生产和生活。经过 50 多年的防治，已经取得了举世瞩目的成就，到 2003 年全国共有血吸虫病病人 843 007 人，较建国初期（1161.2 万人）减少了 92.74%。已有广东、上海、福建、广西、浙江等 5 省（区、市）阻断了血吸虫病的传播；仅剩湖南、湖北、江西、安徽、江苏等 5 省湖区及川、滇山区未得到控制。我们在欣喜的同时，也面临着进一步防治工作的巨大挑战。随着防治工作的深入，人群感染度不断下降，低度流行区扩大，血吸虫病的病原学诊断在现场大范围的应用越来越困难，不但敏感性差、费时费力，且不易被群众和工作人员接受。另一方面，现在控制血吸虫病的主要手段是吡喹酮化疗，但大规模，反复单一药物化疗，可能产生药物抗性，据国外报道，已经出现具吡喹酮抗性的曼氏血吸虫株，因此研制用于血吸虫病低度流行区的敏感性和特异性更高的诊断手段已经被列为第三大世界血吸虫病防治规划优先研究项目。

[0004] 2、循环抗原在日本血吸虫病免疫诊断中的应用

[0005] 经过几十年的发展，血吸虫病免疫诊断技术已具有较高的敏感性、特异性和可行性。检测血吸虫循环抗体是一种成本低、操作简单的检测，也是目前现场流行病学调查时应用最广的途径，但循环抗体在治疗后相当长一段时间内仍保持较高水平，不易区分既往感染和现症感染，无法在现场应用时确定目标化疗人群；而且难以反映药物疗效，不宜用作疗效考核的评价指标。另一种途径是检测循环抗原，循环抗原（circulating antigen, CAg）是存在于患者血液、唾液、尿液等体液中的血吸虫虫体的代谢产物及分泌物，检测患者血清或尿液中的循环抗原，可评估虫负荷数和活动性感染，可以作为诊断的依据。而且，在治疗后，CAg 转阴较快，检测循环抗原可以作为疗效考核的依据，基于循环抗原检测的各种方法曾出不穷，但都困扰在敏感性低、特异性不强的问题上，因此寻找敏感性高、特异性强的循环抗原检测方法和技术是血吸虫病免疫诊断的新方向。

[0006] 3、IgY 用作免疫诊断抗体的可行性

[0007] 卵黄免疫球蛋白（egg yolk immunoglobulin, IgY）是鸟类、两栖和爬行类动物主要的免疫球蛋白。IgY 是一种系统型抗体，可根据抗原分子的大小结合 1~2 个抗原，显示为单价或二价。IgY 相对分子质量（Mr）为 180 000，沉降系数约为 7.8，包含 2 个重链（H）和 2 个轻链（L），重链相对分子质量（Mr）为 68 000，比 IgG（H）（Mr 50 000）稍重。IgY 的免疫学特性：（1）由于种系发生距离相差很大，禽类 IgY 与哺乳动物免疫球蛋白之间不会发生交叉血清学反应。（2）不与类风湿因子（Rheumatoid factors, RF）结合。（3）不会激活

补体系统。(4) 不结合细菌和哺乳动物细胞表面 Fc 受体,使得 IgY 在双重免疫组化方面比 IgG 更具优势。(5) 与 IgG 几无交叉反应,常用于循环复合物的测定。基于以上优点,IgY 技术在医学领域已经得到广泛应用,特别是一些免疫诊断技术如沉淀反应、免疫电泳、ELISA、免疫电镜和免疫印迹,表明 IgY 完全可以取代传统的 IgG。免疫十天后,在鸡体内即可获得高滴度的抗体,而且效价稳定,可以持续 6-28 周。另外,免疫鸡的饲养简单,花费少,符合 3 个 RS[替代 (replacing)、减少 (reducing)、改善 (refining)] 的动物保护原则,减少了对动物的伤害。鉴于 IgY 的产量大、稳定性好、独特的免疫学特性以及动物种系发生学距离远等优点,被称为最有潜力的哺乳动物抗体替代品。

发明内容:

[0008] 本发明的目的在于提供一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒及其制造方法,所述的这种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒及其制造方法要解决现有技术中检测血吸虫循环抗体无法区分既往感染与现症感染,无法进行疗效考核以及检测循环抗原的方法敏感性低、特异性不强的技术问题。

[0009] 本发明提供了一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒,所述的试剂盒中载有试剂,其中,所述的试剂由包括冻干抗 SEA-IgY 致敏红细胞、致敏红细胞稀释液、标本稀释液、阳性对照品、阴性对照品,所述的阳性对照品为日本血吸虫可溶性抗原标准稀释液,所述的阴性对照品为人的正常血清。

[0010] 进一步的,所述的致敏红细胞稀释液采用双蒸水。

[0011] 进一步的,所述的标本稀释液是 0.9% 的生理盐水。

[0012] 进一步的,所述的冻干抗 SEA-IgY 致敏红细胞通过如下方法制备:包括一个制备醛化红细胞的步骤,一个制备鞣化红细胞的步骤,一个特异抗 SEA-IgY 抗体致敏红细胞的步骤,一个制备冷冻干燥红细胞的步骤。

[0013] 具体的,在制备醛化红细胞的步骤中:取人“0”型红细胞生理盐水洗 5 次,放入刻度离心管,3000r/min 离心 10min,取 1ml 压积红细胞加 pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 25ml 混匀后,缓慢滴加 2.5% 戊二醛 3ml,室温,用磁力搅拌器搅拌滴至最后一滴,开始计时 1 小时,如上离心后用 PBS 洗 3 次,双蒸水洗 2 次,生理盐水配成 10% 红细胞悬液,置 4℃ 保存备用。

[0014] 具体的,在制备鞣化红细胞的步骤中:称取 10mg 鞣酸,溶于 100ml 生理盐水中,等鞣酸完全溶解后,将其和 2.5% 醛化红细胞悬液等量混和,37℃ 水浴 15min,期间不断振荡,如上离心后 PBS 洗 3 次。

[0015] 具体的,在特异抗 SEA-IgY 抗体致敏红细胞的步骤中:将纯化后特异抗 SEA-IgY 用 PBS (pH7.0) 稀释,将其和 2.5% 鞣化红细胞悬液等量混和,37℃ 水浴 45min,期间不断振荡,如上离心后 PBS 洗 3 次。再用 1% 正常兔血清 (经 56℃ 灭活 30min 后,用 pH7.2 的 PBS 配制) 洗涤两次,以除去多余的抗原。

[0016] 具体的,在制备冷冻干燥红细胞的步骤中:在致敏红细胞中加 10% 蔗糖和 1% 灭活正常兔血清的 pH7.2 PBS 保护液,浓缩成 5% 致敏红细胞充分振荡使蔗糖溶解,吸取 0.5ml 分装于 2ml 的安瓿内,液氮速冻后放入冷冻干燥机抽干,取出后测定效价。

[0017] 本发明还提供了一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒的制造方法,包括一个制备日本血吸虫可溶性抗原的步骤,一个抗原免疫及鸡蛋收集的步骤,一个特异性 IgY

提取纯化的步骤,一个制备醛化红细胞的步骤,一个制备鞣化红细胞的步骤,一个特异抗 SEA-IgY 抗体致敏红细胞的步骤,一个制备冷冻干燥红细胞的步骤。

[0018] 本发明应用特异性抗日本血吸虫可溶性抗原 (SEA) 的 IgY 抗体和反向间接血凝技术 (Reverse indirect hemagglutination test, RIHA) 研制出了一种检测日本血吸虫循环抗原试剂盒。该试剂盒操作简便、快速;敏感性高、特异性强、重复性好。本发明非常适合医院检验科、疾病防控中心、社康中心、私人诊所等部门用于日本血吸虫病的临床辅助诊断、疗效考核和流行病学调查,具有很高的实用价值和可观的经济及社会效益。

[0019] 本发明试剂盒的工作原理:在血凝板上将待测血清不同浓度稀释后,将用稀释液稀释的特异抗 SEA-IgY 致敏红细胞加入孔内,致敏红细胞与血清中相应血吸虫病循环抗原结合而使红细胞拉聚在一起,出现可见凝集反应。

[0020] 本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0021] 1. 检测循环抗原,可作为临床诊断、疗效考核和流行病学调查,具有很高的实用价值和广阔的应用前景。

[0022] 2. 本发明的试剂盒,具有操作简便快速、敏感性高、特异性强、重复性好、结果直观、无需专用设备、不受环境条件的干扰、易于在广大群众中推广。

[0023] 3. 本发明的试剂盒的制备方法简便、稳定性好、重复性好,适合高校和科研机构参考学习。

附图说明:

[0024] 图 1 是采用本发明的试剂盒测定结果示意图。

[0025] 图 2 是本发明的试剂盒检测血吸虫循环抗原的原理图。

具体实施方式:

[0026] 实施例 1:抗日本血吸虫虫卵抗原 (SEA) 特异性 IgY 制备和纯化

[0027] 1. 日本血吸虫可溶性抗原的制备:将每只感染 1500 条日本血吸虫尾蚴 (来自中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所) 的 7 只新西兰兔在 42 天后按常规方法解剖,从肝脏中分离收集虫卵并冻干。取干卵称重,按 1% 的比例溶于 0.9% 的生理盐水中,置 4℃ 冷浸 4 天,期间每天振摇 2 次,每次 2 分钟。4 天后冰浴超声粉碎,每次 3 分钟,间歇 3 分钟,共 3 次。再如上冷浸 2 天,10000rpm 4℃ 离心 30 分钟,取上清,收集分装,用 Bradford 法测定抗原蛋白浓度, -20℃ 保存备用。

[0028] 2. 抗原免疫及鸡蛋的收集:将日本血吸虫 SEA 抗原 50 μg 与等量弗氏完全佐剂混合、充分乳化后,经海蓝蛋鸡双翅翅根静脉注射。4 周后,用 SEA 抗原与等体积弗氏不完全佐剂加强免疫一次,剂量同上。以后每月直接用抗原加强免疫一次,剂量同首次。收集免疫后 4-20 周的鸡蛋,并做好标记,4℃ 冰箱储存。

[0029] 3. 特异抗 SEA-IgY 抗体的提取与纯化:用卵黄分离器取卵黄,双蒸水清洗后量筒计量,与 PH 为 5.2 的双蒸水按 1 : 8 稀释,置常温搅拌 2.5 小时,后在 -20℃ 冷冻 3 小时,再放 4℃ 缓慢融化,4℃ 5000rpm 离心 25 分钟,取上清即获得 IgY 粗提液。加入等体积的饱和硫酸铵溶液,放置 3 小时,在 4℃ 10000rpm, 25 分钟离心,将离心后的沉淀稀释到原卵黄液体积,再加入 1/2 的饱和硫酸铵溶液,4° 放置 3 小时。此过程反复 2-3 次。所得沉淀经透析、

浓缩至原蛋黄液的 1/10(或用聚乙二醇 6000 浓缩),分装到冷冻管中 -20° 保存。

[0030] 4. 醛化红细胞的制备:取人“O”型红细胞生理盐水洗 5 次,放入刻度离心管,用 3000r/min 离心 10min,取 1ml 压积红细胞加 pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 25ml 混匀后,缓慢滴加 2.5% 戊二醛 3ml,室温,用磁力搅拌器搅拌滴至最后一滴,开始计时 1 小时,如上离心后用 PBS 洗 3 次,双蒸水洗 2 次,生理盐水配成 10% 红细胞悬液,置 4°C 保存备用。

[0031] 5. 鞣化红细胞的制备:称取 100mg 鞣酸,溶于 100ml 生理盐水中,等鞣酸完全溶解后,将其和 2.5% 醛化红细胞悬液等量混和, 37°C 水浴 15min,期间不断振荡,如上离心后 PBS 洗 3 次。

[0032] 6. 特异抗 SEA-IgY 抗体致敏红细胞:将纯化后特异抗 SEA-IgY 用 PBS (pH7.0) 稀释,将其和 2.5% 鞣化红细胞悬液等量混和, 37°C 水浴 45min,期间不断振荡,如上离心后 PBS 洗 3 次。再用 1% 正常兔血清(经 56°C 灭活 30min 后,用 pH7.2 的 PBS 配制)洗涤两次,以除去多余的抗原。

[0033] 7. 冷冻干燥红细胞的制备:在致敏红细胞中加 10% 蔗糖和 1% 灭活正常兔血清的 pH7.2 PBS 保护液,浓缩成 5% 致敏红细胞充分振荡使蔗糖溶解,吸取 0.5ml 分装于 2ml 的安瓿内,液氮速冻后放入冷冻干燥机抽干,取出后测定效价。

[0034] 实施例 2:本发明提供了一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒及其制造方法,包括冻干抗 SEA-IgY 致敏红细胞、致敏红细胞稀释液、标本稀释液、阳性对照品、阴性对照品,所述的阳性对照品为日本血吸虫可溶性抗原标准稀释液,所述的阴性对照品为人的正常血清。

[0035] 具体的,所述的致敏红细胞稀释液采用双蒸水 (DDH_2O),所述的标本稀释液是 0.9% 的生理盐水。

[0036] 阳性对照标准品制备:选择 2.5GK 健康家兔,按常规法感染每只兔 1500-2000 条尾蚴,8 周后从肝脏中分离收集虫卵并冻干。取干卵称重,按 1% 的比例溶于 0.9% 的生理盐水中,置 4°C 冷浸 4 天,期间每天振摇 2 次,每次 2 分钟。4 天后冰浴超声粉碎,每次 3 分钟,间歇 3 分钟,共 3 次。再如上冷浸 2 天,10000rpm 4°C 离心 30 分钟,取上清,收集分装,用 Bradford 法测定抗原蛋白浓度,分装到 EP 管里, -20°C 保存备用。

[0037] 阴性对照血清制备:到血吸虫病非疫区采集正常人血清,用 RIHA 进行测定,1 : 5 阴性者作为阴性参考血清,然后分装到 EP 管里, -20°C 保存备用。

[0038] 进一步的,所述的抗 SEA-IgY 致敏红细胞通过如下方法制备,所述的制备方法包括一个制备醛化红细胞的步骤,一个制备鞣化红细胞的步骤,一个特异抗 SEA-IgY 抗体致敏红细胞的步骤,一个制备冷冻干燥红细胞的步骤。

[0039] 具体的,在制备醛化红细胞的步骤中:取人“O”型红细胞生理盐水洗 5 次,放入刻度离心管,3000r/min 离心 10min,取 1ml 压积红细胞加 pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 25ml 混匀后,缓慢滴加 2.5% 戊二醛 3ml,室温,用磁力搅拌器搅拌滴至最后一滴,开始计时 1 小时,如上离心后用 PBS 洗 3 次,双蒸水洗 2 次,生理盐水配成 10% 红细胞悬液,置 4°C 保存备用。

[0040] 具体的,在制备鞣化红细胞的步骤中:称取 100mg 鞣酸,溶于 100ml 生理盐水中,等鞣酸完全溶解后,将其和 2.5% 醛化红细胞悬液等量混和, 37°C 水浴 15min,期间不断振荡,如上离心后 PBS 洗 3 次。

[0041] 具体的,在特异抗 SEA-IgY 抗体致敏红细胞的步骤中:将纯化后特异抗 SEA-IgY 用

PBS(pH7.0) 稀释,将其和 2.5%鞣化红细胞悬液等量混和,37℃水浴 45min,期间不断振荡,如上离心后 PBS 洗 3 次。再用 1%正常兔血清(经 56℃灭活 30min 后,用 pH7.2 的 PBS 配制)洗涤两次,以除去多余的抗原。

[0042] 具体的,在制备冷冻干燥红细胞的步骤中:在致敏红细胞中加 10%蔗糖和 1%灭活正常兔血清的 pH7.2PBS 保护液,浓缩成 5%致敏红细胞充分振荡使蔗糖溶解,吸取 0.5ml 分装于 2ml 的安瓿内,液氮速冻后放入冷冻干燥机抽干,取出后测定效价。

[0043] 实施例 3:检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒使用:

[0044] 1、操作步骤:

[0045] (1)、配置致敏红细胞悬液:取冻干致敏红细胞加稀释液 1ml,充分混匀。

[0046] (2)、每次试验均应设阴性、阳性对照。阳性、阴性对照血清为冻干品,使用前每管加 100 μl 蒸馏水稀释,充分溶解后使用。

[0047] (3)、血凝板的第 1 列第 1 孔加标本稀释液 100 μl,第 2~4 孔加标本稀释液。于第 1 孔加 30 μl 待测血清,充分混匀后吸出 30 μl 于第 2 孔,第 2 孔充分混匀后依次倍比稀释至第 4 孔,在第 4 孔混匀后弃去多余的 30 μl,第 2 至第 4 孔血清稀释度分别为 1:10、1:20 和 1:40。然后于第 2~4 孔每孔加致敏红细胞悬液 1 滴,震荡 1~2 分钟,置 37℃ 30min 后观察结果。

[0048] 2、结果判定:

[0049] (1)、本实验阳性对照出现凝集反应,阴性对照不出现凝集反应,结果方可成立(如图 2 所示)。

[0050] (2)、根据红细胞凝集程度以“-”,“+”,“++”,“+++”记录结果,以呈“+”凝集的血清最高稀释度作为血清的效价,以效价 \geq 1:10 作为阳性判断标准。

[0051] (3)、血凝反应强度的判定(如图 1 所示):

[0052] -:红细胞全部下沉在孔底,形成肉眼可见紧密、边缘光滑的小圆点。

[0053] +:多数红细胞下沉在孔底形成圆点,周围可见少量凝集红细胞。

[0054] ++:孔底中心可见少量红细胞下沉的小圆点,多数凝集红细胞在孔底周围形成小薄层。

[0055] +++:红细胞形成薄层凝集,布满整个孔底。

[0056] 实施例四:一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒灵敏度检测

[0057] 灵敏度试验:检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒,用于检测稀释液倍比稀释的日本血吸虫可溶性抗原,30 分钟判定结果(见表 1),基于 IgY 的血吸虫病循环抗原反向间接血凝检测试剂盒低至 10 μg/ml 的循环抗原量,显示出较高的检测灵敏度。

[0058] 表 1 基于 IgY 的血吸虫循环抗原间接血凝检测试剂盒敏感性的测定结果

[0059]

SEA 抗原	5 μg/ml	10 μg/ml	20 μg/ml	40 μg/ml	80 μg/ml
检测结果	-	+	+	+	+

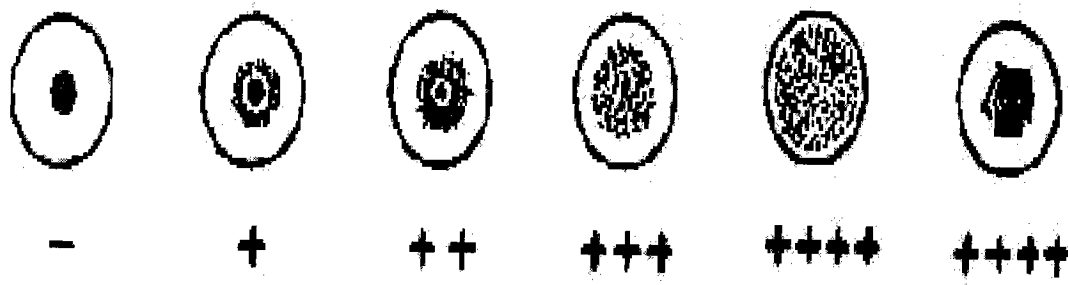


图 1

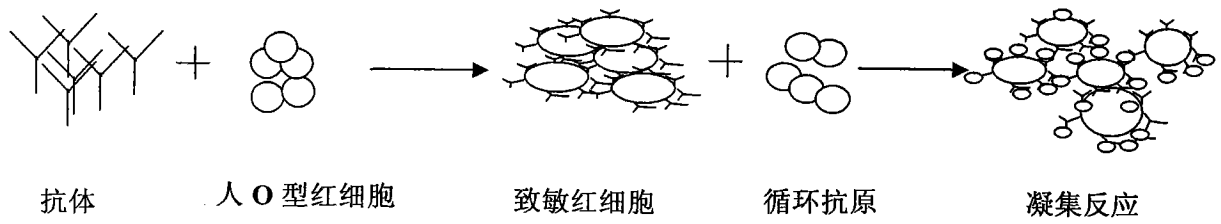


图 2

专利名称(译)	一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒及其制造方法		
公开(公告)号	CN101893628A	公开(公告)日	2010-11-24
申请号	CN200910247741.9	申请日	2009-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
当前申请(专利权)人(译)	中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所		
[标]发明人	陈家旭 蔡玉春 郭俭		
发明人	陈家旭 蔡玉春 郭俭		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/86		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒及其制造方法，包括冻干抗SEA的IgY致敏红细胞、致敏红细胞稀释液、标本稀释液、阳性对照品、阴性对照品。本发明还提供了一种检测血吸虫循环抗原间接血凝试剂盒的制造方法，包括一个制备日本血吸虫可溶性抗原的步骤，一个抗原免疫及鸡蛋收集的步骤，一个特异性抗SEA-IgY提取纯化的步骤，一个制备醛化红细胞的步骤，一个制备鞣化红细胞的步骤，一个特异抗SEA-IgY抗体致敏红细胞的步骤，一个制备冷冻干燥红细胞的步骤。本发明的试剂盒操作简便、快速、敏感性高、特异性强、重复性好。

