

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/569



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03110811.3

[43] 公开日 2004 年 4 月 7 日

[11] 公开号 CN 1487297A

[22] 申请日 2003.1.5 [21] 申请号 03110811.3

[71] 申请人 中国人民解放军军需大学

地址 130062 吉林省长春市西安大路 175 号

[72] 发明人 刘明远 卢强 吴秀萍 付宝全

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限
责任公司

代理人 陈宏伟

权利要求书 2 页 说明书 7 页

[54] 发明名称 一种人与动物旋毛虫病的检测方法
及试剂盒

[57] 摘要

一种人与动物旋毛虫病的检测方法及试剂盒，利用旋毛虫排泄分泌物(ES)抗原，采用酶联免疫吸附试验(ELISA)技术，检测人与动物旋毛虫病的抗体，通过抗原制备、抗原包被等方法制成检测试剂盒，本检测方法(试剂盒)在对人及动物旋毛虫病的检测，特异、敏感、简便快速，可检出 1 个虫体/每克肉，既适用于小批量屠宰又适用于大批量屠宰，30 分钟内可判定结果，制作成本低廉，可确保阳性猪的 100% 检出。该发明克服了常规方法镜检法和集样消化法检测旋毛虫时存在的敏感性差，检验步骤繁琐等问题。从而大大地降低了工作量，该试剂盒还为人旋毛虫病的诊断提供了准确的诊断方法。

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

1、一种人与动物旋毛虫病的检测方法，其特征在于：利用旋毛虫排泄分泌物（ES）抗原，采用酶联免疫吸附试验（ELISA）技术，检测人与动物旋毛虫病的抗体，包括以下工艺流程：

抗原制备：

1) 旋毛虫肌幼虫收集：采用国际旋毛虫标准虫种中国分离株 ISS534 制备抗原，取保种 OF1 小鼠，扑杀后，用人工胃液消化法收集肌幼虫，经口腔感染 OF1 小鼠，200-400 条/只，30-40d 后扑杀，以人工胃液消化法大量收集肌幼虫；

2) 旋毛虫排泄分泌物 ES 抗原制备：将人工胃液消化法收集的肌幼虫用细胞培养液充分洗涤，并于二氧化碳培养箱中培养；

3) 用自然沉淀法祛除虫体，收集培养液；

4) 将培养液用透析袋进行透析浓缩，祛除小分子蛋白；

抗原包被：

1) 将 ES 抗原用碳酸盐缓冲液稀释；

2) 将稀释后的 ES 抗原包被 96 孔反应板，100 μ l/孔，4 $^{\circ}$ C 包被 12-24h；

3) 用含 0.05%吐温-20 的洗涤液对反应板洗涤 3 次，30 秒/次，每次洗涤后须甩干或拍干；

4) 用封闭液对反应板进行封闭，100-300 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C，1-3 小时；

5) 用含 0.05%吐温-20 的洗涤液对反应板洗涤 3 次，30 秒/次，

每次洗涤后须甩干或拍干；

6) 对反应板进行真空干燥并进行真空包装。

2、根据权利要求1所述的检测方法，其特征在于：所述的营养液为：含有2mM谷酰胺，1%丙酮酸钠、100U/ml青霉素及100 μ g/ml链霉素的RPMI1640或MEM细胞培养液。

3、根据权利要求1所述的检测方法，其特征在于：碳酸盐缓冲液为碳酸钠1.59g，碳酸氢钠2.93g，加蒸馏水稀释至1000ml，调pH为9.6。

4、根据权利要求1所述的检测方法，其特征在于：磷酸盐缓冲液为磷酸二氢钾(KH₂PO₄)0.1g，磷酸二氢钠(Na₂HPO₄·12H₂O)1.45g，氯化钠(NaCl)4.0g，氯化钾(KCl)0.1g，使用时用蒸馏水稀释至500ml。

5、一种人与动物旋毛虫病的检测试剂盒，由以下试剂构成：

旋毛虫排泄分泌物抗原包被的反应板、阴性对照血清、阳性对照血清、固体清洗剂、酶标结合物、显色剂A液、显色剂B液、终止液；

其中，固体清洗剂为磷酸盐缓冲液；

酶标结合物包括用辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗动物及人IgG抗体；

A液：磷酸二氢钠1.84g，过氧化氢脲0.03g，用时蒸馏水溶解并定容至50ml；

B液：先用1ml二甲基亚砷(DMSO)溶解10mg的四甲基联苯胺(TMB)，再取0.515g柠檬酸，将二者用于双蒸水溶解并定容至50ml；

终止反应液：配方2MH₂SO₄。

一种人与动物旋毛虫病的检测方法及其试剂盒

技术领域：

本发明涉及酶联免疫吸附试验（ELISA）在检测（检验）人与动物旋毛虫病上的应用，提供了一种人与动物旋毛虫病的检测方法，并公开了适用于该检测方法的试剂盒，属于肉类食品检疫技术领域。

背景技术：

目前，我国对于屠宰动物（猪）中旋毛虫的检验一般是采用“肉品卫生检验试行规程”的镜检法和集样消化法。然而这两方法均存在一定的弊端，镜检法费时费力而且敏感性差，其敏感性为肉中虫体密度达到每克肉中 3 个虫体时方可检出。集样消化法虽可大大提高检出率，敏感性为肉中虫体密度达到每克肉中 1 个虫体时可检出，该方法虽较镜检法在敏感性及检测时间上有所改进，但仍十分烦琐，因为在发现阳性样品时仍需对阳性组（20 头）采用镜检法进行逐头镜检。对于其他屠宰动物旋毛虫病的检验主要参照猪旋毛虫病的检验，尚无具体的检验方法。对于人的旋毛虫病尚无有效的诊断方法，主要根据流行病学（有无食生肉或半生肉史）及临床症状进行诊断，但误诊率高达 30%。

发明内容：

本发明利用酶联免疫吸附试验（ELISA）提供了一种动物旋毛虫

病的检测方法，克服了镜检法和集样消化法检测旋毛虫时存在的敏感性差，检验步骤烦琐等问题。

本发明还提供了用于诊断人患旋毛虫病的诊断方法。

本发明同时公开了适用于上述检测方法的试剂盒。

本发明的技术解决方案如下：

利用旋毛虫排泄分泌物（ES）抗原，采用酶联免疫吸附试验（ELISA）技术，检测人与动物旋毛虫病的抗体。

具体方法包括以下工艺流程：

1、抗原制备：

1) 旋毛虫肌幼虫收集：采用国际旋毛虫标准虫种 ISS534（中国分离株）制备抗原。取保种 OF1 小鼠，扑杀后，用人工胃液消化法收集肌幼虫，经口腔感染 OF1 小鼠，200-400 条/只。30-40d 后扑杀，以人工胃液消化法大量收集肌幼虫。

2) 旋毛虫排泄分泌物抗原（ES 抗原）制备：将人工胃液消化法收集的肌幼虫用细胞培养液(含有 2mM 谷酰胺, 1%丙酮酸钠、100U/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI1640 细胞培养液)充分洗涤，并于 37℃、5-10%二氧化碳培养箱中培养 24h 左右。

3) 用自然沉淀法祛除虫体，收集培养液。

4) 将培养液用 3000 Da 的透析袋进行透析浓缩，祛除小分子蛋白。

5) 对培养液进行纯度鉴定：a) SDS-PAGE 电泳应含 20-30 条蛋白带，b) 涂板培养 24-48h 无菌落生长，c) 280/260 吸光度必须大于 1。

2、抗原包被：

1) 将 ES 抗原用包被缓冲液(即碳酸盐缓冲液, 取碳酸钠 1.59g, 碳酸氢钠 2.93g, 加蒸馏水稀释至 1000ml, 调 pH 为 9.6) 稀释至 1-10 μ g/ml。

2) 将稀释后的 ES 抗原包被 96 孔反应板, 100 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 包被 12-24h。

3) 用含 0.05%吐温-20 的磷酸盐缓冲液(简称 PBS-T, pH 7.4) 对反应板洗涤 3 次, 30 秒/次, 每次洗涤后须甩干或拍干。

4) 用含 5%脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液(简称 PBS-T, pH 7.4) 对反应板进行封闭, 100-300 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C, 1-3 小时。

5) 用含 0.05%吐温-20 的磷酸盐缓冲液(简称 PBS-T, pH 7.4) 对反应板洗涤 3 次, 30 秒/次, 每次洗涤后须甩干或拍干。

6) 对反应板进行真空干燥并进行真空包装。

3、检测试剂盒由以下试剂构成：

旋毛虫排泄分泌物抗原包被的反应板、阴性对照血清、阳性对照血清、固体清洗剂、酶标结合物、显色剂 A 液、显色剂 B 液、终止液；

其中，固体清洗剂为磷酸盐缓冲液；

酶标结合物包括用辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗动物及人 IgG 抗体；

A 液：磷酸二氢钠 1.84g, 过氧化氢脲 0.03g, 用时蒸馏水溶解并定容至 50ml；

B 液：先用 1ml 二甲基亚砷(DMSO)溶解 10mg 的四甲基联苯胺

(TMB),再取 0.515g 柠檬酸,将二者用于双蒸水溶解并定容至 50ml;

终止反应液: 配方 $2M H_2SO_4$ 。

本发明的使用方法如下:

- 1、 **样品稀释:** 将固体清洗剂完全溶于 500 ml 蒸馏水中配成洗液,用洗液将待检血清按 1: 40 稀释。
- 2、 **加入一抗:** 每孔加入稀释待检的血清 $100\mu l$, 同时设阴, 阳性及空白对照, 空白对照只加入洗液 $100\mu l$, $37^\circ C$, 15 分钟。甩净板中样品, 加洗液满孔但不溢出, 室温放置 30 秒, 甩净, 拍干。如此重复洗 3 次。
- 3、 **加酶标结合物:** 每孔加入酶标结合物 $100\mu l$, $37^\circ C$, 15 分钟。甩净板中样品, 加洗液满孔但不溢出, 室温放置 30 秒, 甩净, 拍干。如此重复洗 5 次。
- 4、 **显 色:** 每孔加入显色剂 A、B 液各 1 滴, 室温避光作用 5-10 分钟, 可直接进行眼观观测结果。
- 5、 **终 止:** 每孔加终止液 $50\mu l$ 或 1 滴, 立即用酶标仪测定 OD 值。

结果判定: 1) 眼观判定: 颜色深度等于或大于阳性对照者为阳性。

2) OD 值判定: 选波长 450nm, 空白调零, 待检血清 OD 值与阴性对照 OD 值比值 >3 者为阳性。

本发明的积极效果在于: 本检测方法(试剂盒)在对人及动物旋毛虫病的检测, 特异、敏感、简便快速, 可检出 1 个虫体/每克肉, 既适用于小批量屠宰又适用于大批量屠宰, 30 分钟内可判定结果,

制作成本低廉，可确保阳性猪的 100%检出。该发明克服了常规方法镜检法和集样消化法检测旋毛虫时存在的敏感性差，检验步骤烦琐等问题。从而大大地降低了工作量，该试剂盒还为人旋毛虫病的诊断提供了准确的诊断方法。从而使旋毛虫的检验达到既快速又准确。

具体实施方式：

实施例 1

1、抗原制备：

1) 旋毛虫肌幼虫收集：采用国际旋毛虫标准虫种 ISS543（中国分离株）制备抗原。取保种 OF1 小鼠，扑杀后，用人工胃液消化法收集肌幼虫，经口腔感染 OF1 小鼠，400 条/只。35d 后扑杀，以人工胃液消化法大量收集肌幼虫。

2) 旋毛虫排泄分泌物抗原（ES 抗原）制备：将人工胃液消化法收集的肌幼虫用细胞培养液(含有 2mM 谷酰胺, 1%丙酮酸钠、100U/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI1640 细胞培养液)充分洗涤，并于 37°C、5%二氧化碳培养箱中培养 24h。

3) 用自然沉淀法祛除虫体，收集培养液。

4) 将培养液用 3000 Da 的透析袋进行透析浓缩，祛除小分子蛋白。

5) 对培养液进行纯度鉴定：a) SDS-PAGE 电泳应含 25 条蛋白带，b) 涂板培养 24h 无菌落生长，c) 280/260 吸光度必须大于 1。

2、抗原包被：

1) 将 ES 抗原用包被缓冲液(即碳酸盐缓冲液, 取碳酸钠 1.59g,

碳酸氢钠 2.93g, 加蒸馏水稀释至 1000ml, 调 pH 为 9.6) 稀释至 5 μ g/ml。

2) 将稀释后的 ES 抗原包被 96 孔反应板, 100 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 包被 24h。

3) 用含 0.05%吐温-20 的磷酸盐缓冲液(简称 PBS-T, pH 7.4)对反应板洗涤 3 次, 30 秒/次, 每次洗涤后须甩干或拍干。

4) 用含 5%脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液(简称 PBS-T, pH 7.4)对反应板进行封闭, 300 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C, 2 小时。

5) 用含 0.05%吐温-20 的磷酸盐缓冲液(简称 PBS-T, pH 7.4)对反应板洗涤 3 次, 30 秒/次, 每次洗涤后须甩干或拍干。

6) 对反应板进行真空干燥并进行真空包装。

实施例 2

试剂盒的装配:

1) 真空包装的 ES 抗原包被板(96 孔/板)1 块。

2) 阴、阳性对照样品各 1 管 0.5ml/每管。

3) 固体清洗剂 1 袋: 每袋装有磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.1g, 磷酸二氢钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)1.45g, 氯化钠(NaCl)4.0g, 氯化钾(KCl)0.1g。

使用时用蒸馏水稀释至 500ml。

4) 辣根过氧化物酶(HRP)酶标二抗 10ml (效价 1: 2000) (针对不同动物可任意替换,如人、猪和狗等)。

5) 底物显色液: A 液、B 液各 5ml。

配制方法: A 液: 磷酸二氢钠 1.84g, 过氧化氢脲 0.03g, 用时蒸馏水溶解并定容至 50ml。B 液: 先用 1ml 二甲基亚砷(DMSO)溶解

10mg 的四甲基联苯胺 (TMB),再取 0.515g 柠檬酸,将二者用于双蒸水溶解并定容至 50ml。

6) 终止反应液 10mL: 配方 $2M H_2SO_4$ 。

本试剂盒的对人及动物旋毛虫病的检测: 阳性检出率 100%, 假阳性率 0.3%、可检出 1 个虫体/每克肉, 30 分钟内可判定结果。

专利名称(译)	一种人与动物旋毛虫病的检测方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN1487297A	公开(公告)日	2004-04-07
申请号	CN03110811.3	申请日	2003-01-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军需大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军需大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军需大学		
[标]发明人	刘明远 卢强 吴秀萍 付宝全		
发明人	刘明远 卢强 吴秀萍 付宝全		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/569		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种人与动物旋毛虫病的检测方法及试剂盒，利用旋毛虫排泄分泌物(ES)抗原，采用酶联免疫吸附试验(ELISA)技术，检测人与动物旋毛虫病的抗体，通过抗原制备、抗原包被等方法制成检测试剂盒，本检测方法(试剂盒)在对人及动物旋毛虫病的检测，特异、敏感、简便快速，可检出1个虫体/每克肉，既适用于小批量屠宰又适用于大批量屠宰，30分钟内可判定结果，制作成本低廉，可确保阳性猪的100%检出。该发明克服了常规方法镜检法和集样消化法检测旋毛虫时存在的敏感性差，检验步骤繁琐等问题。从而大大地降低了工作量，该试剂盒还为人旋毛虫病的诊断提供了准确的诊断方法。