

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610164431.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 1/34 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月6日

[11] 公开号 CN 1975425A

[22] 申请日 2006.12.8

[21] 申请号 200610164431.7

[30] 优先权

[32] 2006.2.10 [33] CN [31] 200610033611.1

[71] 申请人 厦门华侨亚热带植物引种园

地址 361000 福建省厦门市鼓浪屿鼓声路4号

[72] 发明人 明艳林 郑国华 童庆宣 李梅
陈良华

[74] 专利代理机构 厦门市新华专利商标代理有限公司

代理人 许伟

权利要求书2页 说明书6页

[54] 发明名称

齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒及其制备和检测方法

[57] 摘要

本发明公开了齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒及其制备方法和检测方法，试剂盒由盒体，设在盒体内的各种用液和酶标板组装成经济实用的检测试剂盒。试剂盒的制备方法简便、快捷、安全、可靠且经济实用。样品用量少，在较短的时间内就可以完成检测，且结果易于保存，应用该检测试剂盒进行双抗夹心酶联检测的方法与其他血清学检验方法相比具有简单、快速、敏感、特异性强等特点，并具有较高的可重复性、经济实用等更多的优点，所以便于在基层单位推广应用。

1、齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒，主要由盒体，设在盒体内的各种用液和酶标板组成，各种用液主要包括高效价抗血清、标记抗体、阳性样品和阴性样品，各种缓冲液和显色剂，其特征在于：

所述的阳性样品为纯化的齿兰环斑病毒；

所述的阴性样品为封闭缓冲液研磨健康叶制备的溶液。

2、如权利要求1所述的齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒，其特征在于：所述的缓冲液包括：

包被缓冲液：20-80 mmol/L pH9.6 碳酸盐溶液；

封闭缓冲液：20-100mmol/L pH7.4 PBS+1-5%脱脂奶粉；

洗涤缓冲液：50-200mmol/L pH7.4 PBS + 0.05-0.3% Tween20；

底物缓冲液：5-20% pH9.8 二乙醇胺溶液；

终止液：1-5 mol/L 硫酸溶液；

所述的显色剂为 0.05 - 0.5mg/ml pH9.8 PNP-Na 溶液。

3、如权利要求1所述的齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒的制备方法，其特征在于：所述的制备方法主要包括下列制备过程：

1)、齿兰环斑病毒的提取和纯化：取苋色藜病叶加 0.52 倍重量 (g) 体积 (ml) 的 1/15M, pH7.0 的 PB 缓冲液，同时加入 1% 巯基乙醇和正丁醇、三氯甲烷，在捣碎机中将病叶捣碎，过滤，将滤液分装于离心管内，6000rpm 离心 20 分钟；上清液加入 4% 体积重量的 PEG (MW6000) 和 2% 体积重量的 NaCl 搅拌溶解，4℃ 过夜；6000rpm 离心 20 分钟，沉淀加入 1% TritonX-100 和 1/15M PB 悬浮搅拌 1 小时，7000rpm 离心 20 分钟；取上清，32000rpm · min (Beckman SW40) 离心 2 小时，沉淀用 1/15M PB 悬浮，5000 rpm · min (BeckmanJA-14) 离心 15 分钟，上清即为粗提提纯病毒制剂，此后进行病毒的精提纯，将以上粗提纯的病毒 10%-40% 的蔗糖密度梯度柱上，在超速离心机上以 30000 rpm 离心 2.5 小时，离心结束后将病毒带取出；

2)、抗血清的制备及纯化：选用雄性白兔作免疫动物，加等量 Freund 氏不完全佐剂乳化的提纯病毒做免疫原，采用三次肌肉注射和两次静脉注射免疫家兔，每次注射病毒的量分别是 0.5mg、0.75mg、1mg、1.5mg 和 2mg，间隔时间为 7 天，最后一次注射后 7-10 天采血 2 次，析出血清用琼脂双扩散法测定效价；通过辛酸沉淀法结合 DEAE 离子交换层析纯化抗体，用 2 倍体积 0.1M 醋酸铵调节抗血清至 pH4.8，按 0.75ml 辛酸/1ml 血清加入正辛酸，混合搅拌 1 小时，5000rpm 离心 30 分钟，取上清，将透析袋置于 10mM Tris-Cl pH8.5 缓冲液过夜，透析除盐，取透析完全的溶液上样于离子交换柱中，用 10mM Tris-HCl pH8.5 缓冲液 5ml/min 冲洗 15 分钟，再用含 0⁻1M NaCl 的

10mM Tris-HCl pH8.5 缓冲液浓度梯度进行洗脱, 收集洗脱峰部分, 浓缩透析, 获得纯化的齿兰环斑病毒多克隆抗体;

3)、抗体标记: 通过戊二醛二步法将碱性磷酸酶标记到纯化抗体, 每 1mg 抗体加 0.1%戊二醛 0.05ml, 静置 1 小时, 置于透析袋中除去多余戊二醛, 加入 0.5mg 碱性磷酸酶, 混匀后置于 4 °C 备用;

4)、阳性、阴性样品的制备:

阳性样品为纯化的齿兰环斑病毒病毒, 浓度在 0.1 μ g-100 μ g/ml 范围; 阴性样品为封闭缓冲液研磨健康叶制备的溶液;

5)、各种用液的制备:

包被缓冲液: 20-80 mmol/L pH9.6 碳酸盐溶液;

封闭缓冲液: 20-100mmol/L pH7.4 PBS+1-5%脱脂奶粉;

洗涤缓冲液: 50-200mmol/L pH7.4 PBS + 0.05-0.3% Tween20;

底物缓冲液: 5-20% pH9.8 二乙醇胺溶液;

终止液: 1-5 mol/L 硫酸溶液;

显色剂为 0.1 - 0.5mg/ml pH9.8 PNP-Na 溶液。

4、如权利要求 1 所述的齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒的检测方法, 其特征在于: 所述的检测方法为双抗夹心酶联检测法, 包括以下步骤:

- 1) 包被: 用碳酸盐包被缓冲液, 将 ORSV 多克隆标记抗体抗体稀释至 1~10 μ g/ μ l, 在酶标板各反应孔中, 每孔 100 μ l, 37°C, 孵育 2 小时;
- 2) 封闭: 倾去包被液, 脱脂奶粉的封闭液, 每孔 100 μ l, 37°C 孵育 1 小时, 而后用洗涤缓冲液洗涤三次;
- 3) 加样: 加入待检测的样品, 每孔 100 μ l, 并设立阴性、阳性和空白对照, 37°C 孵育 1 小时, 而后用洗涤缓冲液洗涤三次;
- 4) 标记示踪: 加入酶标抗体, 每孔 100 μ l, 37°C 孵育 1 小时, 而后用洗涤缓冲液洗涤三次;
- 5) 显色: 加入用 5-20% pH9.8 二乙醇胺底物缓冲液配制的显色液, 每孔 100 μ l, 37°C 孵育 30 分钟;
- 6) 终止反应与检测判定: 加入 1-5 mol/L 硫酸的终止液, 每孔 50 μ l, 在酶标仪上测定 OD405 值。

齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒及其制备和检测方法

技术领域

本发明涉及检测齿兰环斑病毒的试剂盒及其制备和检测方法，特别是涉及齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒及制备该试剂盒的方法与应用该试剂盒进行齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测的检测方法。

背景技术

齿兰环斑病毒 (*Odnoglossum ringspot virus*, ORSV) 属烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*)，是危害兰科植物的两种主要病毒之一，分布世界各地，主要危害齿兰、建兰等。兰花一旦感染ORSV，其叶片常产生黄化条纹或不规则褪绿色斑块，病株花部甚至出现畸形或褪色斑，红色系花朵褪色斑尤为明显，对兰花的观赏价值和经济价值造成严重影响。我国兰花资源丰富，但研究表明，无论是盆栽的地生兰花还是组培的兰花，该病毒病均相当普遍。鉴于ORSV对我国兰花产业的危害性，研究其检测技术已十分重要。

植物病毒检测常用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法，酶免疫分析是将抗原抗体结合的特异性与酶的高效催化性相结合的技术，具有灵敏度高，特异性强等特点，但操作步骤多，耗时长，且需要相对昂贵的酶标抗体和 96 孔酶标板。

双抗夹心酶联检测是在酶联免疫吸附测定方法基础上发展起来的检测方法，适于检测大量样品的较为灵敏、可靠和操作简便的检测技术，但目前尚未见有关双抗夹心酶联用于检测齿兰环斑病毒的文献报道以及用于检测该病毒的双抗夹心酶联检测试剂盒产品。

发明内容

本发明的目的在于提供简便、快捷、安全、可靠且经济实用的齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测的试剂盒。

本发明的另一目的，在于提供制备齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒的方法。

本发明的再一目的，在于提供利用制备的齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒进行双抗夹心酶联检测齿兰环斑病毒的方法。

为实现上述目的，本发明的技术解决方案是：

齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒，主要由盒体，设在盒体内的各种用液和酶标板组成，各种用液主要包括高效价抗血清、标记抗体、阳性样品和阴性样品，各种缓冲液和显色剂。

所述的阳性样品为纯化的齿兰环斑病毒。

所述的阴性样品为封闭缓冲液研磨健康叶制备的溶液。

所述的缓冲液包括：

包被缓冲液：20-80 mmol/L pH9.6 碳酸盐溶液；

封闭缓冲液：20-100mmol/L pH7.4 PBS+1-5%脱脂奶粉；

洗涤缓冲液：50-200mmol/L pH7.4 PBS + 0.05-0.3% Tween20；

底物缓冲液：5-20% pH9.8 二乙醇胺溶液；

终止液：1-5 mol/L 硫酸溶液；

所述的显色剂为 0.05 - 0.5mg/ml pH9.8 PNP-Na 溶液。

所述的齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒的制备方法，它主要包括下列步骤：

1、齿兰环斑病毒的提取和纯化：取苜蓿色藜病叶加 0.52 倍重量(g) 体积(ml)的 1/15M, pH7.0 的 PB 缓冲液，同时加入 1%巯基乙醇和正丁醇、三氯甲烷，在捣碎机中将病叶捣碎，过滤，将滤液分装于离心管内，6000rpm 离心 20 分钟，上清液加入 4%体积重量的 PEG (MW6000) 和 2%体积重量的 NaCl 搅拌溶解，4℃过夜；6000rpm 离心 20 分钟，沉淀加入 1%TritonX-100 和 1/15M PB 悬浮搅拌 1 小时，7000rpm 离心 20 分钟；取上清，32000rpm · min (Beckman SW40) 离心 2 小时，沉淀用 1/15M PB 悬浮，5000 rpm · min (BeckmanJA-14) 离心 15 分钟，上清即为粗提提纯病毒制剂。此后进行病毒的精提纯，将以上粗提纯的病毒 10%-40%的蔗糖密度梯度柱上，在超速离心机上以 30000 rpm 离心 2.5 小时，离心结束后将病毒带取出。

2、抗血清的制备及纯化：选用雄性白兔作免疫动物，加等量 Freund 氏不完全佐剂乳化的提纯病毒做免疫原，采用三次肌肉注射和两次静脉注射免疫家兔。每次注射病毒的量分别是 0.5mg、0.75mg、1mg、1.5mg 和 2mg，间隔时间为 7 天，最后一次注射后 7-10 天采血 2 次，析出血清用琼脂双扩散法测定效价；通过辛酸沉淀法结合 DEAE 离子交换层析纯化抗体。用 2 倍体积 0.1M 醋酸铵调节抗血清至 pH4.8，按 0.75ml 辛酸/1ml 血清加入正辛酸，混合搅拌 1 小时，5000rpm 离心 30 分钟，取上清，将透析袋置于 10mM Tris-Cl pH8.5 缓冲液过夜，透析除盐。取透析完全的溶液上样于离子交换柱中，用 10mM Tris-HCl pH8.5 缓冲液 5ml/min 冲洗 15 分钟，再用含 0.1M NaCl 的 10mM Tris-HCl pH8.5 缓冲液浓度梯度进行洗脱，收集洗脱峰部分，浓缩透析，获得纯化的齿兰环斑病毒多克隆抗体。

3、抗体标记：通过戊二醛二步法将碱性磷酸酶标记到纯化抗体。

每1mg 抗体加 0.1%戊二醛 0.05ml, 静置 1 小时, 置于透析袋中除去多余戊二醛。加入 0.5mg 碱性磷酸酶, 混匀后置于 4 °C 备用。

4、阳性、阴性样品的制备:

阳性样品为纯化的齿兰环斑病毒病毒, 浓度在 0.1 μg -100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围; 阴性样品为封闭缓冲溶液研磨健康叶制备的溶液。

5、各种用液的制备:

包被缓冲液: 20-80 mmol/L pH9.6 碳酸盐溶液;

封闭缓冲液: 20-100mmol/L pH7.4 PBS+1-5%脱脂奶粉;

洗涤缓冲液: 50-200mmol/L pH7.4 PBS + 0.05-0.3% Tween20;

底物缓冲液: 5-20% pH9.8 二乙醇胺溶液;

终止液: 1-5 mol/L 硫酸溶液;

显色剂为 0.05 - 0.5mg/ml pH9.8 PNP-Na 溶液。

所述的齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒的检测方法为双抗夹心酶联检测法, 它包括以下步骤:

- 1) 包被: 用碳酸盐包被缓冲液, 将 ORSV 多克隆标记抗体抗体稀释至 1~10 $\mu\text{g}/\text{ul}$, 在酶标板各反应孔中, 每孔 100 μl , 37°C, 孵育 2 小时;
- 2) 封闭: 倾去包被液, 脱脂奶粉的封闭液, 每孔 100 μl , 37°C 孵育 1 小时, 而后用洗涤缓冲液洗涤三次;
- 3) 加样: 加入待检测的样品, 每孔 100 μl , 并设立阴性、阳性和空白对照, 37°C 孵育 1 小时, 而后用洗涤缓冲液洗涤三次;
- 4) 标记示踪: 加入酶标抗体, 每孔 100 μl , 37°C 孵育 1 小时, 而后用洗涤缓冲液洗涤三次;
- 5) 显色: 加入用 5-20% pH9.8 二乙醇胺底物缓冲液配制的显色液, 每孔 100 μl , 37°C 孵育 30 分钟;
- 6) 终止反应与检测判定: 加入 1-5 mol/L 硫酸的终止液, 每孔 50 μl , 在酶标仪上测定 OD405 值。

采用上述方案后, 本发明由盒体, 设在盒体内的各种用液、酶标板组装成经济实用的检测试剂盒。试剂盒的制备方法简便、快捷、安全、可靠且经济实用。样品用量少, 在较短的时间内就可以完成检测, 且结果易于保存, 应用该检测试剂盒进行双抗夹心酶联检测的方法与其他血清学检验方法相比具有简单、快速、敏感、特异性强等特点, 并具有较高的可重复性、经济实用等更多的优点, 所以便于在基层单位推广应用。

具体实施方式

本发明所用的主要试剂: 齿兰环斑病毒多克隆抗体为厦门华侨亚

热带植物引种园制备; PEG6000、2-巯基乙醇、Triton-100、牛血清白蛋白(BSA)购自Sigma公司; 碱性磷酸酶、PNPP-Na、DEAE离子交换填充物、IgG亲和层析填充物购自Pierce公司; 试验中所使用的其他常规药品和试剂均为国产分析纯试剂。

一、试剂盒

齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒, 主要由盒体, 设在盒体内的各种用液和酶标板组成, 各种用液主要包括高效价抗血清、标记抗体、阳性样品和阴性样品, 各种缓冲液和显色剂。

阳性样品为纯化的齿兰环斑病毒。

阴性样品为封闭缓冲液研磨健康叶制备的溶液。

缓冲液包括:

包被缓冲液: 50 mmol/L pH9.6 碳酸盐溶液;

封闭缓冲液: 50mmol/L pH7.4 PBS+1-5%脱脂奶粉;

洗涤缓冲液: 100mmol/L pH7.4 PBS + 0.05-0.3% Tween20;

底物缓冲液: 10% pH9.8 二乙醇胺溶液;

终止液: 2 mol/L 硫酸溶液;

显色剂为 0.1mg/ml pH9.8 PNP-Na 溶液。

二、制备方法

本发明齿兰环斑病毒检测试剂盒的制备方法, 它包括下列步骤:

1、齿兰环斑病毒的提取和纯化: 取苜蓿色藜病叶加 0.52 倍重量(g) 体积(ml) 的 1/15M, pH7.0 的 PB 缓冲液, 同时加入 1%巯基乙醇和正丁醇、三氯甲烷, 在捣碎机中将病叶捣碎, 过滤, 将滤液分装于离心管内, 6000rpm 离心 20 分钟, 上清液加入 4%体积重量的 PEG (MW6000) 和 2%体积重量的 NaCl 搅拌溶解, 4℃过夜; 6000rpm 离心 20 分钟, 沉淀加入 1%TritonX-100 和 1/15M PB 悬浮搅拌 1 小时, 7000rpm 离心 20 分钟; 取上清, 32000rpm · min (Beckman SW40) 离心 2 小时, 沉淀用 1/15M PB 悬浮, 5000 rpm · min (BeckmanJA-14) 离心 15 分钟, 上清即为粗提提纯病毒制剂。此后进行病毒的精提纯, 将以上粗提纯的病毒 10%-40%的蔗糖密度梯度柱上, 在超速离心机上以 30000 rpm 离心 2.5 小时, 离心结束后将病毒带取出。

2、抗血清的制备及纯化: 选用雄性白兔作免疫动物, 加等量 Freund 氏不完全佐剂乳化的提纯病毒做免疫原, 采用三次肌肉注射和两次静脉注射免疫家兔。每次注射病毒的量分别是 0.5mg、0.75mg、1mg、1.5mg 和 2mg, 间隔时间为 7 天, 最后一次注射后 7-10 天采血 2 次, 析出血清用琼脂双扩散法测定效价; 通过辛酸沉淀法结合 DEAE 离子交换层析纯化抗体。用 2 倍体积 0.1M 醋酸铵调节抗血清至 pH4.8, 按 0.75ml 辛酸/1ml 血清加入正辛酸, 混合搅拌 1 小时, 5000rpm 离心 30 分钟, 取上清, 将透析袋置于 10mM Tris-Cl pH8.5 缓冲液过

夜，透析除盐。取透析完全的溶液上样于离子交换柱中，用 10mM Tris-HCl pH8.5 缓冲液 5ml/min 冲洗 15 分钟，再用含 0.1M NaCl 的 10mM Tris-HCl pH8.5 缓冲液浓度梯度进行洗脱，收集洗脱峰部分，浓缩透析，获得纯化的齿兰环斑病毒多克隆抗体。

3、抗体标记：通过戊二醛二步法将碱性磷酸酶标记到纯化抗体。每 1mg 抗体加 0.1% 戊二醛 0.05ml，静置 1 小时，置于透析袋中除去多余戊二醛。加入 0.5mg 碱性磷酸酶，混匀后置于 4℃ 备用。

4、阳性、阴性样品的制备

阳性样品为纯化的齿兰环斑病毒病毒，浓度在 $100\ \mu\text{g/ml}$ ；阴性样品为封闭缓冲液研磨健康叶制备的溶液。

5、各种用液的制备

包被缓冲液：50 mmol/L pH9.6 碳酸盐溶液；

封闭缓冲液：50mmol/L pH7.4 PBS+1-5%脱脂奶粉；

洗涤缓冲液：100mmol/L pH7.4 PBS + 0.05-0.3% Tween20；

底物缓冲液：10% pH9.8 二乙醇胺溶液；

显色剂为 0.1mg/ml pH9.8 PNP-Na 溶液。

终止液：2 mol/L 硫酸溶液。

三、检测方法实施例

齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒的检测方法为双抗夹心酶联检测法，它包括以下步骤：

1) 包被：用 50 mmol/L pH9.6 碳酸盐包被缓冲液，将 ORSV 多克隆标记抗体抗体稀释至 $10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，在酶标板各反应孔中，每孔 100ul，37℃，孵育 2h；

2) 封闭：倾去包被液，加入 50mmol/L pH7.4 PBS+1%脱脂奶粉的封闭液，每孔 100ul，37℃孵育 1h，而后用 100mmol/L pH7.4 PBS + 0.1% Tween20 的洗涤缓冲液洗涤三次；

3) 加样：加入待检测的样品，每孔 100ul，并设立阴性、阳性和空白对照，37℃孵育 1h，而后用 100mmol/L pH7.4 PBS + 0.1% Tween20 的洗涤缓冲液洗涤三次；

4) 标记示踪：加入酶标抗体，每孔 100ul，37℃孵育 1h，而后用 100mmol/L pH7.4 PBS + 0.1% Tween20 的洗涤缓冲液洗涤三次；

5) 显色：加入用 10% pH9.8 二乙醇胺底物缓冲液配制的显色液，每孔 100ul，37℃孵育 30min；

6) 终止反应与检测判定：加入 2 mol/L 硫酸的终止液，每孔 50ul，在酶标仪上测定 OD405 值。

双抗夹心酶联检测判定标准：

待测样品按 $\text{OD}_{405}/\text{阴性}$ $\text{OD}_{405} > 2$ 判定为阳性， $\text{OD}_{405}/\text{阴性}$ $\text{OD}_{405} < 2$ 判定为阴性。

待测样品按以上标准，定性判断待测样品检测结果的阴、阳；
为检验双抗夹心酶联检测试剂盒效果，用该法检测了 40 份兰花
样品。

检测结果如下：

	RT-PCR (+)	RT-PCR (-)	合计
DIBA (+)	30	1	31
DIBA (-)	1	8	9
合计	31	9	40

注：“+”代表阳性；“-”代表阴性

31 份由 RT-PCR 检测阳性的样品，DIBA 检测阳性样品 30 份，1
份阴性；

9 份由 RT-PCR 检测阴性的样品，DIBA 检测阴性样品份，阳性样
品 1 份；

由检测结果可知：DIBA 的敏感性为 96.77%；特异性 88.89%；检测
准确性为 95%。

专利名称(译)	齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN1975425A	公开(公告)日	2007-06-06
申请号	CN200610164431.7	申请日	2006-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	厦门华侨亚热带植物引种园		
申请(专利权)人(译)	厦门华侨亚热带植物引种园		
当前申请(专利权)人(译)	厦门华侨亚热带植物引种园		
[标]发明人	明艳林 郑国华 董庆宣 李梅 陈良华		
发明人	明艳林 郑国华 董庆宣 李梅 陈良华		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N21/78 G01N1/34 G01N33/531		
代理人(译)	许伟		
优先权	200610033611.1 2006-02-10 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了齿兰环斑病毒双抗夹心酶联检测试剂盒及其制备方法和检测方法，试剂盒由盒体，设在盒体内的各种用液和酶标板组装成经济实用的检测试剂盒。试剂盒的制备方法简便、快捷、安全、可靠且经济实用。样品用量少，在较短的时间内就可以完成检测，且结果易于保存，应用该检测试剂盒进行双抗夹心酶联检测的方法与其他血清学检验方法相比具有简单、快速、敏感、特异性强等特点，并具有较高的可重复性、经济实用等更多的优点，所以便于在基层单位推广应用。

检测结果如下:

	RT-PCR(+)	RT-PCR(-)	合计
DIBA (+)	30	1	31
DIBA (-)	1	8	9
合计	31	9	40

注：“+”代表阳性：“-”代表阴性