



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109946448 A

(43)申请公布日 2019.06.28

(21)申请号 201811559017.5

(22)申请日 2018.12.20

(30)优先权数据

17208994.8 2017.12.20 EP

18199404.7 2018.10.09 EP

(71)申请人 欧蒙医学诊断技术有限公司

地址 德国吕贝克

(72)发明人 J·布拉施 S·奥斯特曼

M·马茨凯维奇

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 傅宇昌

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书22页

序列表4页 附图9页

(54)发明名称

毛形线虫属物种的抗原检测

(57)摘要

本发明旨在用于检测组织提取物样品中的毛形线虫属(*Trichinella*)物种的方法,根据本发明的检测系统用于检测毛形线虫属物种的用途,以及试剂盒,所述试剂盒包含:(a)检测载体,其包含针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的一抗,和(b)(i)针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的二抗,其中所述二抗与信号分子相连接,或(b)(ii)与信号分子相连接的毛形线虫属物种的一种或多种抗原,其中来自(b)(ii)的抗原如此来设置,从而使得它们通过竞争性排挤来解除来自(a)的抗原与一抗的结合。

1. 用于检测组织提取物样品中的毛形线虫属物种的方法,其中在所述组织提取物样品中90%的颗粒具有300 μm 或更小的直径 ($D_{90} \leq 300\mu\text{m}$)。
2. 根据权利要求1的方法,其中所述组织提取物样品为哺乳动物样品,优选地来自猪的样品。
3. 根据权利要求1或2之一的方法,其中在所述组织提取物样品中90%的颗粒具有250 μm 或更小的直径 ($D_{90} \leq 250\mu\text{m}$), 优选地200 μm 或更小的直径 ($D_{90} \leq 200\mu\text{m}$)。
4. 根据权利要求1至3之一的方法,其中所述组织提取物样品来源于肌肉系统。
5. 根据权利要求1至4之一的方法,其中在所述组织提取物样品的制备中:
 - (a) 不超过45 $^{\circ}\text{C}$, 优选地40 $^{\circ}\text{C}$ 的温度;和/或
 - (b) 不进行组织的酶促和/或化学解离。
6. 根据权利要求1至5之一的方法,其中所述方法:
 - (a) 不包括显微术步骤;
 - (b) 在肉类检验的情景下进行使用;和/或
 - (c) 具有 $\leq 7\text{ng}$ 抗原/ml组织提取物的检测极限。
7. 根据权利要求1至6之一的方法,其中所述方法通过免疫测定法,优选地通过ELISA、侧流测定法、线印迹测定法、Western印迹测定法、基于珠粒的测定法、垂直过滤测定法或3D-免疫过滤测定法来进行。
8. 根据权利要求1至7之一的方法,其中所述毛形线虫属物种为旋毛形线虫。
9. 检测系统用于检测毛形线虫属物种的用途,优选地用于肉类检验,其中所述检测系统包含:
 - (a) 检测载体,其包含针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的一抗,和
 - (b) (i) 针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的二抗,其中所述二抗与信号分子相连接,或
 - (b) (ii) 与信号分子相连接的毛形线虫属物种的一种或多种抗原,其中来自(b) (ii)的抗原如此来设置,从而使得它们通过竞争性排挤来解除来自(a)的抗原与一抗的结合。
10. 试剂盒,其包含:
 - (a) 检测载体,其包含针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的一抗,和
 - (b) (i) 针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的二抗,其中所述二抗与信号分子相连接,或
 - (b) (ii) 与信号分子相连接的毛形线虫属物种的一种或多种抗原,其中来自(b) (ii)的抗原如此来设置,从而使得它们通过竞争性排挤来解除来自(a)的抗原与一抗的结合。
11. 根据权利要求10的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包含关于根据权利要求1至8之一的方法的说明书。

毛形线虫属物种的抗原检测

[0001] 本发明旨在用于检测组织提取物样品中的毛形线虫属 (*Trichinella*) 物种的方法, 根据本发明的检测系统用于检测毛形线虫属物种的用途, 以及试剂盒, 所述试剂盒包含: (a) 检测载体, 其包含针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的一抗, 和 (b) (i) 针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的二抗, 其中所述二抗与信号分子相连接, 或 (b) (ii) 与信号分子相连接的毛形线虫属物种的一种或多种抗原, 其中来自 (b) (ii) 的抗原如此来设置, 从而使得它们通过竞争性排挤来解除来自 (a) 的抗原与一抗的结合。

[0002] 旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*) 是毛形线虫属的线虫, 并且可以在人中引起严重的疾病。所谓的毛形线虫病通过食用了被毛形线虫感染的生的或未充分加热的肉类而发生。该疾病的症状最初是恶心、腹泻和肌肉疼痛。随着疾病进展, 尤其出现麻痹现象、面部肿胀 (特别是眼眶周围)、结膜炎、头痛、皮疹和心肌炎 [1]。通常, 该寄生虫通过各种不同的哺乳动物例如家猪、马、熊、野猪或啮齿动物的肉来进行传播。已经知道毛形线虫属的 11 种不同物种, 其被划分为两个群组: 在宿主生物的肌细胞中形成它们被其持久地包围的胶原包囊的物种, 例如旋毛形线虫; 和不形成包囊的物种, 例如假旋毛形线虫 (*T. pseudospiralis*) [2]。

[0003] 除了很少的例外, 旋毛形线虫不依赖于气候地在世界范围内存在。在欧盟 (EU), 在来源于商业育种场和育肥场的家猪中罕见有毛形线虫病的病例, 但是在野生动物例如野猪、狐狸和貉或者私人饲养的猪中患病率明显较高。在中国, 猪中的患病率通常为直至 4%。在那里在 1964 年和 2002 年之间发生了超过 500 起爆发, 总共超过 25,000 人患病 [3]。

[0004] 旋毛形线虫的生活史是广泛已知的。在经口摄入被旋毛形线虫感染的食物后, 通过胶原包囊被消化液瓦解, 幼虫在大约 24 小时后被释放到小肠中。经过四次蜕皮, 幼虫发育为成虫形态并且与雌虫发生交配。在 5-10 天后, 新的幼虫出生 (NBL-新生幼虫), 其通过血液和淋巴管系统进行散布。6-12 天后, 幼虫侵入横纹肌肉系统中 (ML-肌幼虫), 和在 4-6 周后, 包囊形成开始, 其中所述包囊随着时间而逐渐钙化。经过数年至数十年, 发生与组织的代谢交换 [4]。

[0005] 为了在宿主的肌肉系统中存活多年, 旋毛形线虫借助于分泌到周围组织中的众多蛋白质来操纵宿主免疫系统。所谓的排泄型和分泌型蛋白 (E/S 蛋白质) 主要由杆状体 (stichosome) 分泌, 所述杆状体由大约 50 个大的腺细胞即杆细胞 (stichocyte) 组成并且位于食管壁中。

[0006] 毛形线虫检查 (以前称为毛形线虫监察) 是在屠宰后就旋毛形线虫对提供食物的动物的肉进行的检查。它是在必须进行检查的肉畜的情况下官方的肉畜和肉类检查的一部分, 并且由于 19 世纪中叶发生了数次流行病而被引入。因此, 1866 年在普鲁士王国中已经引入了强制性的毛形线虫监察。如果肉类将会交付用于人类食用, 那么在 EU 内的所有可能是旋毛形线虫的携带者的动物 (例如家猪、马、熊或野猪) 都必须进行检查 (EC No. 2015/1375)。

[0007] 毛形线虫检查的花费为每只猪合计 0.12 € 至 3.70 €, 取决于屠宰场的大小和与此相关的肉畜数量 [5]。

[0008] 血清学在毛形线虫检查中并不适用,这是因为血清转变在20,000条幼虫的感染剂量的情况下在3-4周后发生和在100条幼虫的感染剂量的情况下在5-7周后发生[6]。

[0009] 存在各种不同的用于检测组织中的旋毛形线虫的检测系统,其根据EU规章(EC No.2015/1375)是准许的并且被用于屠宰场或实验室中。除了用Stomacher Lab-blender 3500的依靠机械的人工消化方法、用Trichomatic-**35**[®]-Mixer的用于直至35g的集合样品(Sammelproben)的自动化消化方法和借助于**PrioCHECK**[®]Trichinella AAD试剂盒的通过人工消化的查验外,还存在两种其他方法,即用于集合样品的人工消化的磁力搅拌方法和具有借助于乳胶凝聚测试的幼虫检测(Bio-Rad的Trichin-L-抗原测试试剂盒)的“过滤器上分离(On-Filter-Isolation)”技术。在该背景下,应当说明,最经常进行和同时被视为参考的方法是用于人工消化的磁力搅拌方法。最新的方法是具有随后的“过滤器上分离”技术和借助于乳胶凝聚测试的幼虫检测的用于集合样品的人工消化的磁力搅拌方法。

[0010] 用于集合样品的人工消化的磁力搅拌方法是技术人员充分知晓的[7]。该方法具有许多缺点,例如所使用的胃蛋白酶的变化品质,温度和时间敏感性(消化应当在46°C至48°C下进行30分钟),高的时间强度(通过消化过程、沉降步骤、器具清洗和显微术),由经特殊教育的人员来进行手动评价,通过例如与盐酸打交道的单个步骤的困难和部分地危险的操作,难以评价(例如,消化液可能未被充分洗涤,和幼虫因此可能由于过强的浑浊度而被忽视),和由于经差地清洗的设备而引起的污染风险。

[0011] “过滤器上分离”技术和随后的借助于乳胶凝聚测试的幼虫检测Trichin-L也具有许多缺点。例如,在此所述及的方法同样显现出上面提及的在消化方面的缺点,这是因为消化步骤是相同的。进一步地,测试的灵敏度可以由于清洗溶液中的化学制品例如去污剂而强烈地受到影响。另外,存在许多必须彻底清洗的器具,由此污染的风险是很高的。

[0012] 因此,存在对于这样的方法的需要,所述方法允许通过简单的操作来进行快速、便宜和首要地可靠的在动物组织(特别是肌肉组织)中的毛形线虫属物种检测。

[0013] 允许快速、便宜和可靠的在组织中的毛形线虫属物种检测的方法、用途和试剂盒在下面进行描述并且是所描述的发明的目标。

[0014] 本发明的发明人令人惊讶地发现,通过对被毛形线虫属物种感染的组织进行(机械)破碎,可以经由免疫测定法来进行毛形线虫属物种检测。这样的测定法允许检测 ≤ 7 ng毛形线虫属物种抗原/ml组织提取物或更少。特别地,可以显示,一旦在组织提取物样品中90%的其中所包含的颗粒具有300 μ m或更小的直径($D_{90} \leq 300 \mu\text{m}$),就可以进行有效的毛形线虫属物种的检测。

[0015] 因此,在第一个方面,本发明旨在用于检测组织提取物样品中的毛形线虫属物种的方法,其中在所述组织提取物样品中90%的颗粒具有300 μ m或更小的直径($D_{90} \leq 300 \mu\text{m}$)。在此,优选地,借助于免疫测定法通过检测在组织提取物样品中的毛形线虫属物种的抗原(优选地,特异于毛形线虫属物种的抗原)来检测毛形线虫属物种。

[0016] 在本发明的优选的实施方案中,所述组织提取物样品为哺乳动物样品,优选地来自猪的样品。

[0017] 在优选的实施方案中,在所述组织提取物样品中90%的颗粒具有100 μ m或更小的直径($D_{90} \leq 100 \mu\text{m}$),优选地20 μ m或更小的直径($D_{90} \leq 20 \mu\text{m}$)。

[0018] 在进一步优选的实施方案中,所述组织提取物样品来源于肌肉系统。

[0019] 在根据本发明的方法的优选的实施方案中,在所述组织提取物样品的制备中:(a) 不超过45°C,优选地40°C的温度;和/或(b) 不进行组织的酶促和/或化学解离。

[0020] 进一步地,在优选的实施方案中,所述方法:(a) 不包括显微术步骤;(b) 在肉类检验的情景下进行使用;和/或(c) 具有 $\leq 7\text{ng}$ 抗原/ml组织提取物的检测极限。

[0021] 在进一步优选的实施方案中,根据本发明的方法通过免疫测定法,更优选地通过ELISA、线印迹(line blot)测定法、Western印迹测定法、基于珠粒的测定法、侧流测定法、垂直过滤测定法或3D-免疫过滤测定法来进行。

[0022] 在优选的实施方案中,所述毛形线虫属物种为旋毛形线虫。

[0023] 在第二个方面,本发明旨在检测系统用于检测毛形线虫属物种的用途,优选地在肉类检验的情景下,其中所述检测系统包含:(a) 检测载体,其包含针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的一抗,和(b) (i) 针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的二抗,其中所述二抗与信号分子相连接,或(b) (ii) 与信号分子相连接的毛形线虫属物种的一种或多种抗原,其中来自(b) (ii) 的抗原如此来设置,从而使得它们通过竞争性排挤来解除来自(a) 的抗原与一抗的结合。

[0024] 在第三个方面,本发明旨在试剂盒,其包含:(a) 检测载体,其包含针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的一抗,和(b) (i) 针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的二抗,其中所述二抗与信号分子相连接,或(b) (ii) 与信号分子相连接的毛形线虫属物种的一种或多种抗原,其中来自(b) (ii) 的抗原如此来设置,从而使得它们通过竞争性排挤来解除来自(a) 的抗原与一抗的结合。

[0025] 在一个优选的实施方案中,所述试剂盒进一步包含关于根据本发明的用于检测毛形线虫属物种的方法的说明书。

[0026] 如已经描述的,本发明的第一个方面旨在用于检测组织提取物样品中的毛形线虫属物种的方法,其中在所述组织提取物样品中90%的颗粒具有 $300\mu\text{m}$ 或更小的直径($D_{90} \leq 300\mu\text{m}$)。

[0027] 在本文中所使用的表述“检测”描述了毛形线虫属物种的定性或定量测定。定性测定意味着,仅测定毛形线虫属物种的存在或不存在。定量测定是指测定在样品中的毛形线虫属物种的相对或绝对量。

[0028] 在本文中等价地使用的表述“毛形线虫属(物种)”或“毛形线虫”是指一个具有寄生生活方式的线虫的属(线虫门(Nematoda))。哺乳动物(和因此也包括人)和鸟类充当中间宿主和终宿主。至人的主要传播者是被感染的猪,或者其生的(例如作为瘦猪肉馅进行食用的)或未充分煮熟的肉。在分类学上,毛形线虫如下进行分类:门:线虫门(Nematoda);纲:有腺纲(Adenophorea);亚纲:嘴刺亚纲(Enoplea);目:毛首线虫目(Trichocephalida);科:毛形线虫科(Trichinellidae);属:毛形线虫属(Trichinella)。在本发明的优选的实施方案中,毛形线虫属物种选自由下列各项组成的组:旋毛形线虫(*Trichinella spiralis*)、本地毛形线虫(*Trichinella nativa*)、布里托夫氏毛形线虫(*Trichinella britovi*)、默雷尔氏毛形线虫(*Trichinella murrelli*)、T6毛形线虫(*Trichinella T6*)、T7毛形线虫(*Trichinella T7*)、纳尔逊氏毛形线虫(*Trichinella nelsoni*)、T8毛形线虫(*Trichinella T8*)、T9毛形线虫(*Trichinella T9*)、假旋毛形线虫(*Trichinella pseudospiralis*)、巴布亚毛形线虫(*Trichinella papuae*)和津巴布韦毛形线虫(*Trichinella zimbabwensis*)。在

进一步优选的实施方案中,所述毛形线虫属物种为在宿主生物的肌细胞中形成胶原包囊并且被其持久地包围的生物。在更加进一步优选的实施方案中,毛形线虫属物种为旋毛形线虫。旋毛形线虫是一种线虫,并且在中欧是毛形线虫的最重要的代表。它在世界范围内存在,但在热带地区它的重要性不大。旋毛形线虫引起毛形线虫病的临床病状。

[0029] 在本文中所使用的表述“组织提取物样品”在此是指由各种不同的生物来源的物质组成的混合物。生物来源的材料可以是上皮组织(覆盖所有内和外表面的细胞层)、结缔组织和支持组织(导致结构粘结和填充间隙的组织)、特化组织(例如血液、游离细胞等)、肌肉组织(通过用于主动运动的收缩纤丝而特化的细胞)、神经组织(由其构建成脑、脊髓和周围神经的细胞)和组织液例如淋巴液。进一步优选地,所述组织为肌肉组织。所述肌肉组织可以为平滑肌肉系统、心脏肌肉系统和/或骨骼肌肉系统。在进一步优选的实施方案中,所述样品取自待检查的受试者的膈、舌头或肋间肌肉系统。优选地,所述组织为固体组织。

[0030] 组织提取物样品可以是异质的或同质的。异质的组织提取物样品包含各种不同组织类型的组织。同质的组织提取物样品仅包含给定的组织。同质的组织提取物样品是优选的。在备选的实施方案中,所述样品为经汇集的样品,即样品材料来源于各个不同的个体。或者,所述样品仅来源于单一个体。

[0031] 所述提取物可以从组织块或有生存能力的细胞中获得。将这些破碎,并且与水溶液例如缓冲溶液、 H_2O 、细胞培养基和其混合物相混合。优选地,所述制备过程不包括细胞培养。

[0032] 在本发明的优选的实施方案中,所述组织提取物样品为哺乳动物样品。在进一步优选的实施方案中,所述样品来源于猪、马、熊、猫、狗、啮齿动物或人。更加进一步优选地,所述样品来源于家猪(*Sus scrofa domesticus*)、野猪(*Sus scrofa*)、倭野猪(*Sus salvanius*)、髯野猪(*Sus barbatus*)、巴拉望髯野猪(*Sus ahoenobarbus*)、越南疣猪(*Sus bucculentus*)、米沙鄢疣猪(*Sus cebifrons*)、苏拉威西疣猪(*Sus celebensis*)、民都洛疣猪(*Sus oliveri*)、菲律宾疣猪(*Sus philippensis*)、爪哇疣猪(*Sus verrucosus*)或巴韦安疣猪(*Sus blouchi*)。

[0033] 在本文中所使用的表述“颗粒直径”是指所检查的在组织提取物中的颗粒的体积测定或长度的度量。所检查的颗粒可以具有大致圆形的形状或略长的纤维状的结构。在优选的实施方案中,在所述组织提取物样品中90%的颗粒具有 $300\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 300\mu m$), $290\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 290\mu m$), $280\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 280\mu m$), $270\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 270\mu m$), $260\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 260\mu m$), $250\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 250\mu m$), $240\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 240\mu m$), $230\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 230\mu m$), $220\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 220\mu m$), $210\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 210\mu m$), $200\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 200\mu m$), $190\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 190\mu m$), $180\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 180\mu m$), $170\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 170\mu m$), $160\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 160\mu m$), $150\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 150\mu m$), $140\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 140\mu m$), $130\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 130\mu m$), $120\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 120\mu m$), $110\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 110\mu m$), $100\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 100\mu m$), $95\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 95\mu m$), $90\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 90\mu m$), $85\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 85\mu m$), $80\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 80\mu m$), $75\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 75\mu m$), $70\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 70\mu m$), $65\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 65\mu m$), $60\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 60\mu m$), $55\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 55\mu m$), $50\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 50\mu m$), $45\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 45\mu m$), $40\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 40\mu m$), $35\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 35\mu m$), $30\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 30\mu m$), $25\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 25\mu m$), $20\mu m$ 或更小($D_{90} \leq 20\mu m$), $17\mu m$ 或更

小 ($D_{90} \leq 17 \mu\text{m}$), $15 \mu\text{m}$ 或更小 ($D_{90} \leq 15 \mu\text{m}$), $13 \mu\text{m}$ 或更小 ($D_{90} \leq 13 \mu\text{m}$), $10 \mu\text{m}$ 或更小 ($D_{90} \leq 10 \mu\text{m}$), $8 \mu\text{m}$ 或更小 ($D_{90} \leq 8 \mu\text{m}$), 或者 $6 \mu\text{m}$ 或更小 ($D_{90} \leq 6 \mu\text{m}$) 的直径。

[0034] 颗粒直径的测量可以通过采用动态图像分析的器具 (例如, Retsch 公司的 **Camsizer®XT**) 或者基于静态激光散射的工作原理的器具 (例如, HORIBA 公司的 LA-960) 来进行。颗粒尺寸可以以 $x_{c \text{ min}}$ 进行测量, 并且按照 DIN 66141 如下进行定义: 颗粒投影内的最大直径的测量值中的最短颗粒直径 (英语: particle diameter which is the shortest chord of the measured set of maximum chords of a particle projection) [10]。备选地, 颗粒尺寸可以按照费雷特直径 (Ferret diameter) (x_{Fe}) 来进行测量。费雷特直径是沿着某一方向的关于物体尺寸的尺度。通常, 可以将它定义为以与该方向垂直的方式限制该物体的两个平行平面之间的距离。因此, 也称它为口径直径 (caliber diameter), 涉及用游标卡尺测量物体尺寸。在其中费雷特直径被应用于将维 (3D) 物体投影在 2D-平面上的颗粒尺寸的分析 (例如以显微术) 的情况下, 将这定义为两条平行切线而不是两个平面之间的距离。对于凸状的颗粒, 平均费雷特直径 (所有方向的平均值) 等于具有相等周长的圆的直径。最大费雷特直径为在所测量的那批费雷特直径之内的最长的费雷特直径。最小费雷特直径为在所测量的那批费雷特直径之内的最短的费雷特直径。

[0035] 备选地, 所述直径是指平均直径, 其中将所有经测量的可测量颗粒的直径测量值的总和除以经测量的颗粒的总数目。在另一个备选的实施方案中, 当关于颗粒的尺寸进行使用时, 直径可以是指“D50”, 从而大约 50% 的所有经测量的颗粒具有小于所定义的平均颗粒直径值的颗粒直径, 并且大约 50% 的所有经测量的可测量颗粒具有大于所定义的平均颗粒直径值的颗粒直径。

[0036] 在根据本发明的方法的优选的实施方案中, 在所述组织提取物样品的制备中, (a) 不超过 100°C 、 90°C 、 80°C 、 70°C 、 60°C 、 55°C 、 50°C 、 45°C 、 44°C 、 43°C 、 42°C 、 41°C 、 40°C 、 39°C 或 38°C 的温度, 和/或 (b) 不进行组织的酶促和/或化学解离。

[0037] 在本文中所使用的表述“组织提取物样品的制备”是指一个多步骤过程, 其中从待检查的生物中取出组织样品, (机械) 破碎该组织样品, 并将经破碎的组织样品通过过滤和/或离心进行处理。随后, 可以在根据本发明的方法中进行抗原检测。

[0038] 优选地, 纯机械地进行组织样品的破碎, 即例如没有组织的酶促和/或化学解离。机械破碎可以通过切割、撕碎或压碎来进行, 但优选地通过切割 (例如, 通过刀式研磨机) 来实现。通过组织样品的破碎, 存在于组织样品中的毛形线虫属物种幼虫同样也被破碎。经破碎的毛形线虫属物种幼虫在破碎之后具有与经破碎的组织相应的尺寸。

[0039] 在一个优选的实施方案中, 在本文中所使用的表述“不进行酶促解离”是指, 对于破碎组织样品, 不使用酶。特别地, 对于破碎组织样品, 不使用蛋白酶 (例如胃蛋白酶)、脂肪酶、淀粉酶、角质酶、纤维素酶或半纤维素酶。

[0040] 在一个优选的实施方案中, 在本文中所使用的表述“不进行化学解离”是指, 对于破碎组织样品, 不使用化学物质例如酸、碱、氧化剂等。

[0041] 进一步地, 在优选的实施方案中, 本方法: (a) 不包括显微术步骤; (b) 在肉类检验的情景下进行使用; 和/或 (c) 具有 $<20\text{ng}$ 、 $<15\text{ng}$ 、 $<10\text{ng}$ 、 $<9\text{ng}$ 、 $<8\text{ng}$ 、 $<7\text{ng}$ 、 $<6\text{ng}$ 、 $<5\text{ng}$ 、 $<4\text{ng}$ 、 $<3\text{ng}$ 、 $<2\text{ng}$ 、 $<1\text{ng}$ 、 $<0.5\text{ng}$ 、 $<0.25\text{ng}$ 、 $<0.1\text{ng}$ 、 $<0.05\text{ng}$ 、 $<0.01\text{ng}$ 、 $<0.005\text{ng}$ 或 $<0.001\text{ng}$ 抗原/ml 组织提取物的检测极限。

[0042] 在本文中所使用的表述“不包括显微术步骤”是指用于毛形线虫属物种检测的方法的评价,其中为了评价根据本发明的方法,显微镜或显微术鉴定,特别是手动显微术鉴定不是必需的。

[0043] 在本文中所使用的表述“肉类检验”或“肉畜和肉类检查”是指这样的方法,通过所述方法应该能够确保作为食物的某些动物物种的肉仅在它被判定适合于人食用时才能实现流通。这一检查是用于保证肉类卫生的措施的一个基本组成部分。该检查通常由官方兽医或肉类管理员以两个步骤(即动物检查和肉类检查)来进行。

[0044] 在一个优选的实施方案中,在本文中所使用的表述“检测极限”指明了物质(抗原)的这样的最小量,所述量可以以特定概率与不存在该物质相区别。备选地,表述“检测极限”可以是指在溶液中的抗原浓度,在该浓度下所测量出的值大于与此相关联的不确定性。检测极限可以被随意地定义为离开零浓度3个标准偏差(SD)。

[0045] 在进一步优选的实施方案中,根据本发明的方法通过免疫测定法,更优选地通过ELISA、线印迹测定法、Western印迹测定法、基于珠粒的测定法、侧流测定法、垂直过滤测定法或3D-免疫过滤测定法来进行。

[0046] 在一个优选的实施方案中,在本文中所使用的表述“免疫测定法”是指分析物(例如给定的毛形线虫属物种抗原)的检测或定量,其包含抗体与抗原之间的免疫反应。在本发明的范围内,待检测或待定量的分析物可以包括毛形线虫属物种的肽、经翻译后修饰的肽(优选地糖蛋白)、糖类、脂质、核酸和/或其他分子。

[0047] 在一个优选的实施方案中,在本文中所使用的表述“ELISA”表示酶联免疫吸附测定法,并且是指基于抗体的检测方法(测定法)。ELISA属于基于酶促显色反应的免疫测定方法类群,并因此算作酶促免疫吸附方法(EIA)。优选的实施方案包括直接ELISA、间接ELISA、直接夹心式ELISA、桥连ELISA、间接夹心式ELISA和竞争性ELISA。ELISA的所述的形式以及其他的形式和衍生型是技术人员已知的。

[0048] 在一个优选的实施方案中,在本文中所使用的表述“侧流测定法”是一种用于用抗体定性地检测材料/物质/抗原的生物化学方法。侧流测定法是薄层色谱法和免疫染色的组合。侧流测定法可以以测试条的形式进行使用。

[0049] 在一个优选的实施方案中,在本文中所使用的表述“垂直过滤测定法”基于使待检查的配体/抗原与在其上固定了捕获抗体的膜相接触。在这之后紧接着为用于去除弱结合的分子的洗涤过程和所结合的配体的检测。侧流测定法和垂直过滤测定法之间的区别是测试流体的侧向流动和垂流。垂流技术相比于侧流测定法而言具有几个优点,其中例如可以出现更短的检定时间。

[0050] 在一个优选的实施方案中,在本文中所使用的表述“3D-免疫过滤测定法”是指以通流型(Durchfluss)测定法形式的免疫学快速测试,其基于与侧流测定法相同的通过受体结构来进行分析物识别的生物化学工作原理。区别在于,在其上固定有捕获抗体的三维多孔成形体之上顺次添加样品/抗原溶液、缀合物溶液和额外的洗涤溶液。在这种情况下,所有溶液及其组分例如分析物/抗原和检测试剂以通流方式流到成形体的深处。通过利用富集效应,提高检测极限是可能的。

[0051] 在一个优选的实施方案中,表述“线印迹”是指测试条,在其上通过压印而在该条上的经精确地预先确定的位置处涂布至少一种经纯化的抗原。这样的测试条的制备在现有

技术中作了描述。如果在样品中存在抗体,那么就可以通过比色法检测其与抗原的复合物。数据读取目视地或者通过所产生的条带的强度测量来进行。所述测试条可以包含以条带形式的阳性对照,其在当将测试条与血清一起进行温育时将会显现,而不依赖于该血清是否包含待检测的分析物。

[0052] 在一个优选的实施方案中,表述“基于珠粒的测定法”是指这样的测试,其中作为载体,使用珠粒,优选地磁性珠粒,在其上固定有用于进行检测的试剂,优选地针对毛形线虫属物种的抗原的抗体。抗体-抗原复合物的检测可以通过化学发光来进行,优选地借助于携带借助于化学发光可检测的信号分子的二抗。所述珠粒优选地是在化学上惰性的,并且包含反应缓慢的碳水化合物。

[0053] 在根据本发明的方法的优选的实施方案中,该方法包括下列步骤:

[0054] (a) 提供检测载体,其包含针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的一抗;

[0055] (b) 使所述检测载体与样品相接触;

[0056] (c) (i) 使所述检测载体和任选地在其上所结合的样品材料与针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的二抗相接触,其中所述二抗与信号分子相连接,并且其中所述信号分子的信号的存在表明了所述样品中存在毛形线虫属物种;或者

[0057] (c) (ii) 使所述检测载体和任选地在其上所结合的样品材料与毛形线虫属物种的一种或多种抗原相接触,其中来自(c) (ii)的抗原与信号分子相连接,并且如此来设置,从而使得它们通过竞争性排挤来解除来自(a)的抗原与一抗的结合,其中所述信号分子的信号的存在表明了所述样品中存在毛形线虫属物种。

[0058] 在进一步优选的实施方案中,各自在接触步骤(b)、(c) (i)和(c) (ii)之后进行洗涤步骤。

[0059] 进一步地,在方法、用途和试剂盒的优选的实施方案中,通过使用分析技术例如荧光测量、化学发光测量、放射性测量、电子自旋共振测量、紫外/可见光吸收光谱学、质谱法、核自旋共振测量法、磁共振测量法和电化学测量法,可观察到所述信号分子。

[0060] 毛形线虫属物种的合适的抗原是从现有技术中已知的。优选地,所述抗原为泰威糖。

[0061] 在优选的实施方案中,所述一抗和二抗针对相同抗原的不同表位。

[0062] 在进一步优选的实施方案中,所述一抗和/或二抗选自下列各项组成的组:针对(任选地,与底物蛋白质相连接的)翻译后修饰,优选地包含泰威糖的分子的抗体;针对毛形线虫属物种的排泄-分泌型(E/S)抗原的抗体;和通过使用旋毛形线虫的裂解物制备的抗体。

[0063] 在本文中所使用的表述“抗体”是指来自球蛋白类别的蛋白质,其在脊椎动物中作为对于某些物质(所谓的抗原)的反应而形成。抗体是免疫系统的组成部分。抗体由一类白细胞即B-淋巴细胞产生。可以按照不同的类别来区分它们:即免疫球蛋白A、免疫球蛋白D、免疫球蛋白E、免疫球蛋白G、免疫球蛋白M、免疫球蛋白W和免疫球蛋白Y。在优选的实施方案中,所述一抗和/或二抗为免疫球蛋白G。

[0064] 在优选的实施方案中,所使用的抗体选自下列各项组成的组:包含根据SEQ ID NO:1的VH序列和根据SEQ ID NO:2的VL序列的抗体;包含根据SEQ ID NO:3的VH序列和根据SEQ ID NO:4的VL序列的抗体;抗体18H1(IgG2a),其结合泰威糖并且描述在[11]中;和其变

体。

[0065] 在本文中所使用的表述“变体”是指分别与参考抗体和与参考序列具有至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少97%，或至少99%的同源性的抗体和VH和VL序列。优选地，仅使用具有生物学活性的此类变体。在该上下文中所使用的“生物学活性”特别地意味着，相应的肽具有其参考抗体或者参考序列的特异性结合活性的至少30%，至少40%，至少50%，至少60%，至少70%，至少80%，至少90%，至少95%。可以使用抗体或其变体的功能性片段或衍生物，例如具有相应的结合活性的Fab、F(ab')、Fr、ScTv和dAb或适体。

[0066] 在根据本发明的方法的一个优选的实施方案中，组织提取物样品的破碎仅以机械方式来进行。即在该实施方案中，没有通过从外部向该方法添加的分子或化合物而以化学方式和/或以酶促方式进行的破碎步骤。在其他优选的实施方案中，不以这样的量向该方法添加外部的额外的化学和/或酶促分子，所述量使得蛋白水解活性达到蛋白水解背景活性的四倍以上、三倍以上或两倍以上。

[0067] 在根据本发明的方法的一个进一步优选的实施方案中，在所述组织提取物样品中至少30%，至少35%，至少40%，至少45%，至少50%，至少55%，至少60%，至少65%，至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少97%，或至少99%的所有蛋白酶切割位点不被裂解。这些蛋白酶具有针对肽键的水解活性并且属于EC-类别3.4。在根据本发明的方法的其他优选的实施方案中，在所述组织提取物样品中至少30%，至少35%，至少40%，至少45%，至少50%，至少55%，至少60%，至少65%，至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少97%，或至少99%的胃蛋白酶、凝乳酶、组织蛋白酶E、木瓜蛋白酶、组织蛋白酶K、胰天蛋白酶、钙激活中性蛋白酶、小柱孢谷氨酸肽酶(scytoglutamic peptidase)、嗜热芽孢菌蛋白酶、胶原酶、羧肽酶A和B、胰凝乳蛋白酶、纤溶酶、凝血酶、胰蛋白酶、粒酶和/或激肽释放酶的切割位点不被裂解。

[0068] 在根据本发明的方法的一个进一步优选的实施方案中，在所述组织提取物样品中至少30%，至少35%，至少40%，至少45%，至少50%，至少55%，至少60%，至少65%，至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少97%，或至少99%的胃蛋白酶、凝乳酶、胰凝乳蛋白酶和/或胰蛋白酶的切割位点不被裂解。特别地，在所述组织提取物样品中至少30%，至少35%，至少40%，至少45%，至少50%，至少55%，至少60%，至少65%，至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少97%，或至少99%的胃蛋白酶的切割位点不被裂解。

[0069] 上面所述的肽酶的切割位点是从现有技术，例如https://web.expasy.org/peptide_cutter/peptidecutter_enzymes.html#Peps中充分已知的，并且特此通过提及而纳入说明书中。

[0070] 核酸或氨基酸序列的同一性/同源性的测定通过序列比较来进行。该序列比较基于现有技术中已建立的并且通常所采用的BLAST算法(参见[12]和[13])，并且原则上通过相互分配在核酸或氨基酸序列中的核苷酸或氨基酸的相似顺序来实现。相关位置的表格分配被称为比对。另一个在现有技术中可用的算法为FASTA算法。序列比较(比对)，特别是多序列比较，用计算机程序来完成。经常采用例如Clustal系列(参见例如[14])、T-Coffee(参见例如[15])或者基于这些程序或更准确而言算法的程序。进一步地，可能的是用具有

预先给定的标准参数的计算机程序Vector **NTI**® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, USA) 进行的序列比较(比对), 该计算机程序的用于序列比较的AlignX模块基于ClustalW。

[0071] 这样的比较还允许关于所比较的序列的相互之间的相似性作出陈述。它通常以同一性百分比(即在同样的位置或者在比对中相互对应的位置处的相同的核苷酸或氨基酸残基的份额)来陈述。同源性的进一步理解的概念在氨基酸序列的情况下考虑了保守氨基酸置换, 那就是说具有相似的化学活性的氨基酸, 这是因为它们在蛋白质内在大多数情况下行使相似的化学活性。因此, 所比较的序列的相似性也可以以同源性百分比或相似性百分比来陈述。同一性和/或同源性陈述可以关于整个多肽或基因或者仅关于单个区域来做出。因此, 不同的核酸或氨基酸序列的同源或同一的区域通过在所述序列中的一致来定义。这样的区域常常具有相同的功能。它们可以是小的, 并且仅包含几个核苷酸或氨基酸。常常地, 这样的小的区域行使对于蛋白质的总活性来说必要的功能。因此, 可能有意义的是, 序列一致仅涉及单个的、任选地小的区域。除非另外指明, 否则本申请中的同一性或同源性陈述涉及各自所陈述的核酸或氨基酸序列的总长度。

[0072] 在本文中所使用的表述“如此来设置, 从而使得通过竞争性排挤来解除抗原与抗体的结合”是指这样的抗原, 其与已经结合的抗原竞争与给定抗体的结合。所述竞争性抗原具有相互的结构相似性, 并因此可以将所述抗原称为结构类似物。排挤性抗原可以具有比被排挤的抗原更高的与抗体的亲和力, 和/或排挤性抗原以比被排挤的抗原更高的浓度存在。

[0073] 在本文中所使用的表述“抗原”是指抗体和某些淋巴细胞受体可以与之特异性地结合的物质。抗原可以是蛋白质, 但也可以是糖蛋白、碳水化合物、脂质或其他物质。在本申请的情况下, 所述抗原优选地为蛋白质或经翻译后修饰的蛋白质。

[0074] 在第二个方面, 本发明旨在检测系统用于检测毛形线虫属物种的用途, 优选地用于肉类检验, 其中所述检测系统包含: (a) 检测载体, 其包含针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的一抗, 和 (b) (i) 针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的二抗, 其中所述二抗与信号分子相连接, 或 (b) (ii) 与信号分子相连接的毛形线虫属物种的一种或多种抗原, 其中来自 (b) (ii) 的抗原如此来设置, 从而使得它们通过竞争性排挤来解除来自 (a) 的抗原与一抗的结合。

[0075] 在本文中所使用的表述“检测系统”优选地包括: (a) 在本文中所定义的检测载体, 和 (b) 与信号分子相连接的抗原或抗体。来自 (a) 和 (b) 的组分如此协同地共同起作用, 从而使得通过添加待检查的抗原, 产生由所有参与的分子组成的结合复合物, 其允许通过信号的存在来检测在样品中的待检查的抗原。

[0076] 在本文中所使用的表述“检测载体”是指这样的材料, 在其上结合了针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的抗体。所述载体可以为固体物件, 例如载玻片, 6-孔、12-孔、96-孔或384-孔平板, 膜(优选地, 硝酸纤维素膜), 过滤材料, 珠粒(优选地, 磁性珠粒), 或薄层色谱法材料。备选地, 所述检测载体也可以为小球/珠粒, 其中这样的珠粒的直径优选地小于1000 μm 、800 μm 、600 μm 、400 μm 、200 μm 、100 μm 、90 μm 、80 μm 、70 μm 、60 μm 、50 μm 、40 μm 、30 μm 、20 μm 、10 μm 或5 μm 。所述检测载体可以优选地包含塑料、玻璃、金属或其组合。

[0077] 在第三个方面, 本发明旨在试剂盒, 其包含: (a) 检测载体, 其包含针对毛形线虫属

物种的一种或多种抗原的一抗,和(b) (i) 针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的二抗,其中所述二抗与信号分子相连接,或(b) (ii) 与信号分子相连接的毛形线虫属物种的一种或多种抗原,其中来自(b) (ii) 的抗原如此来设置,从而使得它们通过竞争性排挤来解除来自(a) 的抗原与一抗的结合。

[0078] 在本文中所使用的表述“试剂盒”是指配备有容器(例如瓶子、平板、小管、深碟等)的包装,所述容器各自包含特定的材料,在本申请的情况下特别是在本文中所定义的检测载体和与信号分子相连接的抗原或抗体。优选地,给试剂盒附上关于使用上面所述的材料的使用说明书。操作规程可以写在或印刷在纸张或其他媒介上,或者可以以电子媒介(例如磁带、计算机可读的盘或带或者CD-ROM)的形式来提供。所述试剂盒优选地包含阳性对照,优选地与待检测的抗原和/或样品一起,以用于校准曲线的校准或制作。

[0079] 在一个优选的实施方案中,所述试剂盒进一步包含关于根据本发明的用于检测毛形线虫属物种的方法的说明书。

[0080] 图1显示了被包入包囊中的旋毛形线虫幼虫的E/S蛋白质。E/S蛋白质由幼虫分泌入包囊中和周围组织中。通过破碎组织,蛋白质被释放到样品材料中。

[0081] 图2显示了毛形线虫属物种抗原捕获ELISA的温育流程。1) 固定在微量滴定板上的抗毛形线虫属物种Ab C9, 2) 样品(毛形线虫属物种抗原), 3) 经生物素化的检测Ab B7, 其与具有PolyHRP80的链霉抗生物素蛋白相结合。

[0082] 图3显示了用Retsch的刀式研磨机GM200进行破碎的猪肉的颗粒尺寸测定。将100x 1g膈支柱肌肉系统用200ml PBS在GM200中以10,000rpm分别破碎6和9分钟(min.)。将颗粒尺寸对Q3[%](体积百分比)进行作图。各测量大约6千万个颗粒。A) 用**Camsizer®**XT进行的颗粒尺寸测定。 $n=3$ 。B) 用HORIBA LA-960进行的颗粒尺寸测定。 $n=1$ 。

[0083] 图4显示了用**Camsizer®**XT进行测量期间单个肉颗粒的影像。形状大多数不是圆的,而是非常纤维状的和拉长的,以至于宽度与长度之比下降。

[0084] 图5显示了用于检测毛形线虫属物种的抗体抗-[TRISP][B7]和抗-[TRISP][C9]的查验。A) -D) 旋毛形线虫-IIFT(间接免疫荧光测试):将Ab B7和Ab C9以 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度进行温育。A) +B) 用Ab B7进行的温育:该Ab不仅在被包入包囊中的毛形线虫属物种幼虫的情况下在横截面上,而且在肌幼虫的情况下均显示出明显的反应;C) +D) 用Ab C9进行的温育:像B7一样,该Ab不仅在被包入包囊中的毛形线虫属物种幼虫的情况下在横截面上,而且在肌幼虫的情况下均显示出明显的反应;E) Western印迹:各施加 $5\mu\text{g}$ 旋毛形线虫裂解物,并且与Ab B7和Ab C9(浓度: $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$)一起进行温育。

[0085] 图6显示了借助于Western印迹来进行的抗体抗-TRISP[B7]和抗-TRISP[C9]的特异性的查验。泳道1) 克鲁兹锥虫(*Trypanosoma cruzi*), 2) 猪蛔虫(*Ascaris suum*), 3) 鼠类圆线虫(*Strongyloides ratti*), 4) 猫弓首线虫(*Toxocara cati*), 5) 鼠弓浆虫(*Toxoplasma gondii*), 6) 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*), 7) 猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella cholerasuis*) 菌株A, 8) 猪霍乱沙门氏菌菌株B, 9) 猪伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhisuis*), 10) 猪鞭虫(*Trichuris suis*), 11) 旋毛形线虫。所施加的:各 $5\mu\text{g}$ 裂解物。与Ab B7一起进行温育(浓度: $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$, 2小时)。

[0086] 图7显示了旋毛形线虫抗原捕获ELISA的结果。A) 旋毛形线虫抗原捕获ELISA的检测极限。将E/S抗原的各种不同浓度对O.D.进行作图。B) 用E/S抗原、阳性组织提取物和阴性

组织提取物作为样品材料的旋毛形线虫抗原捕获ELISA。在阳性组织提取物样品中存在大约100条被包入包囊中的毛形线虫属物种幼虫。虚线：截止值。

[0087] 图8显示了用阳性和阴性组织提取物作为样品材料的旋毛形线虫抗原捕获ELISA的结果。在阳性组织提取物中存在大约100条被包入包囊中的毛形线虫属物种幼虫。样品材料的破碎进行3、6和9分钟。虚线：截止值。 $n=3$ 。

[0088] 图9显示了手动温育的毛形线虫属物种化学发光免疫测定法的温育流程。1) 固定在磁性珠粒上的抗毛形线虫属物种捕获Ab18H1, 2) 样品(毛形线虫属物种抗原), 3) 经生物素化的抗毛形线虫属物种检测Ab B7, 4) Extravidin/吖啶鎓试剂。

[0089] 图10显示了用于自动化的毛形线虫属物种化学发光免疫测定法的化学发光分析仪器的操作流程。磁性棒将固定有抗毛形线虫属物种Ab18H1的珠粒顺次地运送到装有各种不同试剂的反应容器中。样品和触发剂B自动添加。

[0090] 图11显示了自动化的毛形线虫属物种化学发光免疫测定法的结果。在2、3、5和7分钟后用HORIBA公司的颗粒尺寸分析仪LA-960来测量经破碎的猪肉的颗粒尺寸。此外, 将肉类样品(阴性的, 和掺有6、13和30条毛形线虫属物种幼虫的) 破碎2至7分钟。将所产生的组织提取物用自动化的CLIA进行温育。结果以相对光单位(RLU) 给出。

[0091] 序列:

[0092] 在本发明中公开了各种不同的肽序列, 特别是:

[0093] SEQ ID NO:1 (抗-[TRISP][B7]VH):

[0094] AVTLDESGGGLQTPRGGLSLVCKASGYTFSSHMAWVRQAPGKGLEFVAGISNTGSFTLYGAAVKGRAT
ISRDNQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKHAGVGLYSIDAWGHGTEVIVSS

[0095] SEQ ID NO:2 (抗-[TRISP][B7]VL):

[0096] ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGTSDYGWYQQKAPGSAPVTLIYDNTNRPSDIPSRFSGSLSGSTNTLT
ITGVQAEDEAVYFCGSADRTYAGVFGAGTTLTVL

[0097] SEQ ID NO:3 (抗-[TRISP][C9]VH):

[0098] AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFSISSYSMQWVRQAPGKGLEWVAGIYYDNTWYAPAVKGRATI
SRDNQSTVRLRLNNLRAEDTATYFCAKYAGGYSIDAWGHGTEVIVSS

[0099] SEQ ID NO:4 (抗-[TRISP][C9]VL):

[0100] ALTQPSSVSANPGETVKITCSGSSGSYGWYQQKSPGSGPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSASGSTATLT
ITGVQAEDEAVYFCGGYDSSTYVGFAGTTLTVL

[0101] SEQ ID NO:5 (抗-[TRISP][18H1]VH):

[0102] QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGLSLTSNSVGWIRQPPGKGLEWMGI IWSNGGTDYNSAIKSRLSI
SRDTSKSVFLKMHSLQTEDTAMYFCARGPYYSYRLGYFDYWGQGMVTVSS

[0103] SEQ ID NO:6 (抗-[TRISP][18H1]VL):

[0104] DVVMTQSPSSLAVSAGETVTLNQCSSQSLLYSGTQNNYLAWYQQKPGQSPKLLISWASTRQSGVPLRFI
GSGSGTDFTLTITSVQAEDLAIYYCQQFYDTPLTFGSGTKLEIK

[0105] 本发明通过非限制性的实施例来进一步地举例说明, 从所述非限制性的实施例中可以获知本发明的进一步的特征、实施方案、方面和优点。

[0106] 实施例1: 材料与方法

[0107] 材料

[0108]

材料	名称	产品编号	制造商
器具	自动化学发光分析仪 SuperFlex		PerkinElmer
	Biometra WT 15 042-400 摇动器		Biometra
	Centro XS ³ LB 960 微量 培养板发光计		Berthold Technologies
	GM 200 配件: 不锈钢研磨 容器	03 045 0050	Retsch
	GM 200 配件: 锯齿状刀	02 446 0057	Retsch
	HydroFlex TM 微量培养板 洗涤器, 磁性珠粒		Tecan
	培养箱 WTB		BINDER
	刀式研磨机 GRINDOMIX GM 200	20 253 0001	Retsch
	MTS 2/4 数字微量滴定摇 动器	3208001	IKA
	Novex Mini Cell		Invitrogen
	光度计: Sunrise TM		Tecan
	Power Pac HV		Bio-Rad
	台式离心机: Biofuge Fresco		Heraeus
	Washer Columbus		Tecan

[0109]

	XCell SureLock™ Mini-Cell 电泳系统		ThermoFisher Scientific
	离心机 Avanti® J-E (转 子: JA-10)		Beckman Coulter
	倾斜式/滚动式混合器		IKA
耗材	iD PAGE 凝胶, 4-20%	ID-PA4201-015	Eurogentec
	Dynabeads™ M-280, 经 甲苯磺酰基活化的	14203	ThermoFisher Scientific
	微量滴定板 LockWell Maxisorb	446475-EUR	ThermoFisher Scientific
	硝酸纤维素膜	11306	Sartorius
	Nunc™ F96 MicroWell™ 聚苯乙烯平板, 白色	136101	ThermoFisher Scientific
	试剂筒 (SuperFlex)		PerkinElmer
	磁性棒的保护套 (SuperFlex)		PerkinElmer
介质、溶 液和缓冲 液	硫酸铵溶液 (3 M)		Sigma-Aldrich
	抗体稀释缓冲液		EUROIMMUN
	ELISA 封闭缓冲液		EUROIMMUN
	ELISA 生色原/底物溶液 TMB/H₂O₂	ZE 1200-0112 T	EUROIMMUN
	酶缀合物 “经碱性磷酸酶 标记的抗人 IgG (山羊)”	AE 142 1030	EUROIMMUN
	Extravidin/吡啶鎓试剂		EUROIMMUN
	珠粒包被缓冲液		EUROIMMUN
	PBS	ZF 1100-1000 T	EUROIMMUN
	PBS + 0.05% Tween-20 (PBST)	ZF 1110-0102 T	EUROIMMUN
	StabilCoat® Plus	SC01	Surmodics
	ELISA 终止溶液 (0.5 M 硫酸)	ZE 1210-0112 T	EUROIMMUN

[0110]

	印迹底物溶液 氯化氮蓝四唑鎓/5-溴-4- 氯-3-吲哚基磷酸酯 (NBT/BCIP)	ZW 1020-0130 T	EUROIMMUN
	用于 CLIA 的触发剂 A		EUROIMMUN
	用于 CLIA 的触发剂 B		EUROIMMUN
	Tris 缓冲液 (1 M)	#1218	Gerbu Biotechnik
	印迹洗涤缓冲液	ZW 1100-1005 T	EUROIMMUN
	ELISA 洗涤缓冲液	ZE 1120-1000 T	EUROIMMUN
	印迹洗涤缓冲液 Plus	ZW 1110-1005	EUROIMMUN
即用型溶 液和试剂 盒	有色的经预先染色的蛋白 质分子量标准, 宽范围 (11-245 kDa)	P7712S	New England BioLabs
	NuPAGE® LDS 样品缓冲 液 (4X)		ThermoFisher Scientific
	NuPAGE™ MOPS SDS 走样缓冲液 (20X)	NP0001	ThermoFisher Scientific
抗原	猪蛔虫		Prof. Dr. Christina Strube, 兽医大学, Hannover, DE
	鼠伤寒沙门氏菌		Prof. Dr. Michael Hensel, 微生物学, Universität Osnabrück
	猪霍乱沙门氏菌菌株 A		
	猪霍乱沙门氏菌菌株 B		
	猪伤寒沙门氏菌		
	鼠类圆线虫		EUROIMMUN
	猫弓首线虫		EUROIMMUN
	鼠弓浆虫	BA110VS	Virion/Serion
	旋毛形线虫 E/S 抗原		EUROIMMUN
	旋毛形线虫裂解物		EUROIMMUN
猪鞭虫		Prof. Dr. Eva Liebau, 分子生理 学, Universität Münster	
克鲁兹锥虫		Virion/Serion	

[0111]

抗体	抗-[TRISP][B7]		EUROIMMUN
	抗-[TRISP][C9]		EUROIMMUN
	抗-[TRISP][18H1]		EUROIMMUN/ Prof. Dr. Judith Appleton, Cornell University, Ithaca, USA
其他材料	EZ-Link™ NHS-PEG12- 生物素	21312	ThermoFisher Scientific
	IIFT 旋毛形线虫“被包入 包囊中的幼虫”		EUROIMMUN
	IIFT 旋毛形线虫“肌幼虫”		EUROIMMUN
	掺有确定数目的毛形线虫 属物种肌幼虫的猪肉样品		联邦风险评估研究 所 (BfR)
	膈支柱猪肉		Prösch 肉类加工 厂, Krummesse
	Spectra™ 多色宽范围蛋 白质梯		ThermoFisher Scientific
	链霉抗生物素蛋白 -PolyHRP80, 1 mg/ml 储 备溶液	#SP80C	SDT (Stereospecific Detection Technologies)
	以 20-50 条幼虫/克进行感 染的患毛形线虫病的猪肉		联邦风险评估研究 所 (BfR)
Zeba™ 旋转脱盐柱, 40K MWCO, 10 mL	87772	ThermoFisher Scientific	

[0112] 方法

[0113] 用于获得组织提取物样品的方法

[0114] 在本检测方法中,不应当对肉类进行酶促消化,而是进行机械破碎。在该情况下,应当达到<200 μ m的肉颗粒尺寸。幼虫与胶原包囊一起为大约200–600 μ m长和200–300 μ m宽,以至于在所希望的<200 μ m的颗粒尺寸的情况下,可以以被包入包囊中的毛形线虫属物种幼虫必须被破碎仪器的切割刀“抓住”至少一次为出发点。在包囊中存在许多E/S蛋白质,其在破碎时被释放,然后游离地存在于样品材料中(图1)。另外,躯体蛋白质可以通过破碎幼虫来进行检测。

[0115] 在破碎之后,以抗原捕获ELISA或者手动温育的或自动化的化学发光免疫测定法的形式来进行抗原检测。

[0116] 样品准备

[0117] 在屠宰场,通常取大约5g肉/只动物。按照标准,从已被宰杀的动物的膈的肌肉部分中取出样品。对于毛形线虫检查,每只猪使用1g样品材料。对于其他身体部分例如舌头或肋间肌肉系统,样品量可以有所不同。通常,汇集100个猪样品,以至于产生100x 1g的样品量。将样品冷却至4℃。

[0118] 肉类样品的破碎

[0119] 将样品材料(100x 1g肉)送至破碎仪器的预先冷却至4℃的研磨杯中。为此使用Retsch的刀式研磨机Grindomix GM 200。破碎原理基于样品的剪碎。该刀式研磨机可以装备有锯齿状刀,从而使得纤维状材料例如肌肉组织也可以精细地被破碎。向样品提供200ml 4℃冷的PBS。如所指明的,将样品材料在10,000rpm和因此最大功率下破碎,例如9分钟的时间长度。

[0120] 为了检查肉的破碎是否成功,用Retsch公司的**Camsizer®XT**和HORIBA公司的LA-960进行颗粒尺寸测量。LA-960基于静态激光散射的工作原理,而**Camsizer®XT**基于动态图像分析。分别在6分钟和9分钟后各取三个肉类样品,并且随后立即进行测量。平均测量6千万个颗粒。颗粒尺寸以 $x_{c\ min}$ 进行测量,并且按照DIN 66141如下进行定义:颗粒投影内的最大直径的测量值中的最短颗粒直径(英语:particle diameter which is the shortest chord of the measured set of maximum chords of a particle projection) [8]。

[0121] 离心

[0122] 在破碎后,用吸移管从研磨杯中取出1ml至15ml样品。随后,通过在5,000x g和4℃下离心10分钟,进行样品中的粗颗粒的沉降。在沉降后的上清液为用于后面的抗原检测的样品材料并被称为组织提取物。

[0123] 用于检测来自组织提取物样品的旋毛形线虫的方法

[0124] 样品材料的制备

[0125] 旋毛形线虫裂解物

[0126] 旋毛形线虫肌幼虫(ML)由来自在华沙的Witold Stefański Instytut PAS的Justyna Bień提供以供使用。将120,000条ML在16,000x g和室温(RT)下离心10分钟,从而使得所有幼虫形成粒状沉淀。弃去上清液并添加1ml PBS。使幼虫经历五次冷冻-解冻循环,并随后用手动匀浆器进行破碎。最后,将样品用超声波进行处理:20个循环,每次在中等强度下5秒钟(sec.),和在处理之间各在冰上5秒钟的间歇。随后为在16,000x g和4℃下的20分钟离心。上清液为旋毛形线虫裂解物这一抗原。

[0127] E/S抗原

[0128] 旋毛形线虫ML的E/S抗原由来自在华沙的Witold Stefański Instytut PAS的Justyna Bień提供以供使用。

[0129] 抗体的制备

[0130] 用于抗原捕获ELISA的抗体借助于噬菌体展示方法来制备[9]。两种抗体抗-[TRISP][B7]和抗-[TRISP][C9](缩写:Ab B7和Ab C9)的重链和轻链可变区(VH和VL)的序列的内容如下:

[0131] 抗-[TRISP][B7]VH(SEQ ID NO:1):

[0132] AVTLDESGGGLQTPRGGLSLVCKASGYTFSSHMAWVRQAPGKGLEFVAGISNTGSFTLYGAAVKGRAT

ISRDNQGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKHAGVGLYSIDAWGHGTEVIVSS

[0133] 抗-[TRISP][B7]VL (SEQ ID NO:2) :

[0134] ALTQPSSVSANLGGTVKITCSGGTSDYGWYQQKAPGSAPVTLIYDNTNRPSDIPSRFSGSLSGSTNTLT
ITGVQAEDEAVYFCGSADRTYAGVFGAGTTLTVL

[0135] 抗-[TRISP][C9]VH (SEQ ID NO:3) :

[0136] AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFSISSYSMQWVRQAPGKGLEWVAGIYYDNTWYAPAVKGRATI
SRDNQGQSTVRLRLNNLRAEDTATYFCAKYAGGYSIDAWGHGTEVIVSS

[0137] 抗-[TRISP][C9]VL (SEQ ID NO:4) :

[0138] ALTQPSSVSANPGETVKITCSGSSGSYGWYQQKSPGSGPVTVIYYNDKRPSDIPSRFSGSASGSTATLT
ITGVQAEDEAVYFCGGYDSSTYVGFAGTTLTVL

[0139] 抗体抗-[TRISP][B7]的生物素化

[0140] 对于抗原捕获ELISA,将Ab B7与20倍摩尔过量的EZ-Link™ NHS-PEG12-生物素一起在旋转式摇动器上在室温下温育一小时。为了去除过量的生物素,将抗体(Ab)按照制造商的指导通过大小排阻色谱法柱(Zeba™旋转脱盐柱)进行纯化。

[0141] SDS PAGE和Western印迹分析

[0142] 对于SDS PAGE,各将5μg旋毛形线虫裂解物或者克鲁兹锥虫、猪蛔虫、鼠类圆线虫、猫弓首线虫、鼠弓浆虫、鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌菌株A、猪霍乱沙门氏菌菌株B、猪伤寒沙门氏菌和猪鞭虫的裂解物加载在聚丙烯酰胺凝胶上,并且在175V下在MOPS缓冲液中进行电泳50分钟。在400mA下在转移缓冲液中在硝酸纤维素膜上进行转移60分钟。对于封闭,将膜在摆动式摇动器上在洗涤缓冲液Plus中温育30分钟。随后,以0.4μg/ml的浓度施加在洗涤缓冲液Plus中的Ab B7和C9,并且在摆动式摇动器上温育过夜。在用洗涤缓冲液进行洗涤后,将膜与在洗涤缓冲液Plus中进行稀释的EUROIMMUN的酶缀合物“经碱性磷酸酶标记的抗人IgG”一起进行温育。最后,在再次的洗涤步骤后,给予底物溶液(NBT/BCIP)并进行温育直至看见明显的颜色骤变。

[0143] 间接免疫荧光测试

[0144] 为了检查哪些结构结合所发展出的Ab,开发了用于旋毛形线虫的间接免疫荧光测试。给BIOCHIPS装上旋毛形线虫肌幼虫和被包入包囊中的幼虫的冷冻切片。温育和显微术按照EUROIMMUN的抗孟氏裂体吸虫(Schistosoma mansoni) IIFT (订购号:FI 2300-1005G)的指导来进行。作为样品,将Ab B7和C9以2μg/ml的浓度施加在BIOCHIPS上。

[0145] 借助于抗原捕获ELISA来进行的抗原检测

[0146] 对于抗原检测,使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)作为检测方法。在4℃下将96-孔微量滴定板用在PBS中的0.25μg/ml Ab C9包被过夜。次日,用PBST(PBS+0.05% Tween-20)洗涤微量滴定板一次,用封闭缓冲液封闭2小时,和随后干燥2小时。

[0147] 作为对于与Ab C9相结合的抗原的检测,将以0.05μg/ml的浓度的Ab B7和以0.1μg/ml的浓度的链霉抗生物素蛋白-PolyHRP80一起放入Ab稀释缓冲液中并温育过夜。

[0148] 样品的温育

[0149] 如以在图2中所描绘的流程那样进行温育。作为样品,将以各种不同浓度(0-50ng/ml)的旋毛形线虫的E/S抗原和以100μl的体积的组织提取物样品施加在微量滴定板上。在旋转式摇动器上在室温下进行温育一小时。通过下述方式来制备“阳性”组织提取物样品:

在破碎前向阴性膈支柱组织给予患毛形线虫病的猪肉,从而使得在样品中存在大约100条被包入包囊中的毛形线虫属物种幼虫。

[0150] 在用洗涤缓冲液洗涤六次后,同样地将缀合物以100 μ l的体积在旋转式摇动器上在室温下温育一小时。随后,再次洗涤六次并施加底物。在15分钟后,用终止溶液来结束反应,并且用光度计在450nm的波长下测定样品的光密度(O.D.)。

[0151] 实施例2:结果

[0152] 肉类样品的破碎

[0153] 在用刀式研磨机GM200将猪肉破碎后立即用**Camsizer**[®]XT和HORIBA LA-960进行颗粒尺寸测定。取样分别在6和9分钟后进行。质量分布的结果可以在图3中看到,其中在线图中将颗粒尺寸[μ m]对Q3[%]进行作图。Q3是以百分比显示的相关于总体积而言的比x小的颗粒的份额。由于这两种颗粒尺寸测量仪器基于不同的测量方法,因而结果相互有所不同。

[0154] 用HORIBA LA-960进行测量的结果显示,95%的颗粒<26 μ m和所有颗粒<100 μ m。用**Camsizer**[®]XT进行测量,95%的颗粒<300 μ m。仅70%的肉颗粒<100 μ m。在图4中示例性地描绘了肉颗粒具有哪些形状。由于肌纤维和肌原纤维而导致结构是非常纤维状的,这使得宽度与长度之比明显降下来。

[0155] 在任何情况下,毛形线虫属物种幼虫的胶原包囊(如果存在)从统计学上来说被刀切开至少一次,以至于可以释放出E/S蛋白质。这些释放出的蛋白质是在下一个步骤中用抗原捕获ELISA可检测的。

[0156] 样品材料和抗体的制备

[0157] 为了检查抗体抗-[TRISP][B7]和抗-[TRISP][C9]是否适合于旋毛形线虫抗原检测,进行间接免疫荧光测试(IIFT)和Western印迹作为功能查验。结果描绘在图5中。

[0158] 在使用Ab B7的情况下,被切开的包囊所发出的荧光最强(图5A)。在内部的幼虫和在包囊表面上的单个蛋白质同样也发荧光。肌幼虫的冷冻切片显示出在外膜上的明显的反应(图5B)。

[0159] 在被包入包囊中的幼虫的横截面中,在与Ab C9一起进行温育的情况下,整个幼虫所发出的荧光最强(图5C)。在包囊表面上的单个蛋白质和被切开的包囊所发出的荧光弱。在肌幼虫的情况下,不仅外膜,而且幼虫内部均显示出明显的反应(图5D)。

[0160] 在Western印迹中,对于Ab B7和C9同样看到明显的反应(图5E)。这两种Ab显示出相同的条带样式。强条带出现于大约48、50、52、60、65和110kDa处。被所述Ab所结合的表位看起来在数种蛋白质或糖蛋白中存在,这可以对在样品材料中非常低浓度的毛形线虫属物种抗原的检测产生积极的影响。

[0161] 为了检查所述Ab是否仅结合旋毛形线虫的特定结构而不结合其他寄生虫和/或细菌的抗原性结构,进行Western印迹。在该情况下,施加在猪中存在的病原体的裂解物。结果可以在图6中看到。所测试的裂解物不具有被Ab B7或Ab C9所结合的结构。在后面的抗原捕获ELISA中可以以高的概率对于这些病原体排除假阳性反应。

[0162] 抗原捕获ELISA

[0163] 对于所开发出的旋毛形线虫ELISA的功能查验,在该测试中使用E/S抗原的各种不同浓度(图7A)。检测极限位于大约6ng/ml,具有0.30.D.的截止值。

[0164] 在图7B中描绘了按照在本文中所描述的方法制备的组织提取物样品的结果。不仅测试了阳性样品(其中在猪肉中存在大约100条被包入包囊中的幼虫),而且还测试了阴性样品。抗原捕获ELISA显示了在阳性和阴性组织提取物样品之间的几乎20.D.的明显差异。

[0165] 在所述组织提取物样品中的旋毛形线虫抗原浓度相应于大约30ng/ml E/S抗原。因此,100条经破碎的被包入包囊中的幼虫将差不多该数量的蛋白质释放到肉汁中,所述蛋白质是通过抗原捕获ELISA可检测的。

[0166] 用以不同方式进行破碎的样品材料进行的抗原捕获ELISA

[0167] 在图8中描绘了阳性和阴性组织提取物的破碎(在3、6和9分钟后)的结果。可以看到,在所述样品材料中没有幼虫的阴性组织提取物没有显示出显著的反应,这是因为在ELISA中的O.D.在0.3的截止值之下。与之相反,从肉中制备的并且在其中存在大约100条被包入包囊中的旋毛形线虫幼虫的组织提取物显示出明显的反应,具有>1.50.D.。由破碎规模造成的后果是引人注目的,这是因为反应随着破碎时间增加而提高。O.D.在9分钟破碎的情况下比在3分钟破碎的情况下高0.5。

[0168] 在ELISA中的反应在破碎3分钟的样品材料的情况下比在破碎9分钟后低。因此,样品材料的更长时间的破碎导致更高量的释放出的旋毛形线虫抗原。通过延长的破碎,所有被包入包囊中的毛形线虫属物种幼虫极有可能被破碎仪器的切割刀抓住至少一次和在大多数情况下多次,以至于相比于缩短的破碎而言,在样品材料中有更多的对于ELISA来说可检测的抗原可供使用。

[0169] 实施例3:借助于手动温育的和自动化的化学发光免疫测定法来进行的抗原检测

[0170] 对于手动温育的和基于珠粒的化学发光免疫测定法(CLIA),捕获抗体不与微量滴定板,而是与磁性珠粒相偶联。为此,使用甲苯磺酰基活化的Dynabeads™。在该情况下,用甲苯磺酰基基团使疏水性聚氨酯表面活化,由此可以将抗体与珠粒共价地相连接。用1ml的1M Tris-缓冲液来使4mg的珠粒平衡。向经平衡的珠粒给予30mM Tris、0.4M硫酸铵和28μg抗-[TRISP][18H1]-抗体(缩写:Ab18H1)。在滚动式混合器上在37°C下进行温育过夜。次日,将珠粒用每次1ml **StabilCoat®**Plus洗涤三次,然后在滚动式混合器上在37°C下温育过夜,以便封闭仍然具反应性的官能团。在封闭后,将珠粒接纳在新鲜的**StabilCoat®**Plus中,并且以1mg/ml的浓度贮存于4°C直至使用。

[0171] 对于CLIA,将用18H1-Ab进行包被的珠粒以各10μg吸移到微量滴定板的孔(Nunc™聚苯乙烯平板)中。另外再给予100μl的未稀释的组织提取物样品,并且在旋转式摇动器上温育30分钟。在用HydroFlex™微量培养板洗涤器进行三次自动洗涤后,将100μl的经生物素化的B7-Ab以0.1μg/ml的浓度在旋转式摇动器上温育30分钟。随后为三次自动洗涤。对于化学发光反应,以80ng/ml的浓度和100μl的体积向珠粒给予Extravidin/吖啶鎓试剂并温育15分钟。在三次洗涤后,用Centro XS³微量培养板发光计进行测量。所述发光计自动地向每个批料(Ansatz)添加100μl的触发剂A和B,以便启动化学发光反应。在425nm波长下测量光发射1秒钟,并且以相对光单位(Relative Light Units,RLU)来给出。手动温育的CLIA的温育流程可以在图9中看到。

[0172] 自动化的和基于珠粒的化学发光免疫测定法基于手动温育的CLIA的构造。区别是,该测试借助于自动化的化学发光分析仪器(自动化学发光分析仪SuperFlex, PerkinElmer)来执行。在该情况下,用磁性棒将珠粒依次浸入各种不同的试剂中。磁性棒能

够产生电场,并且因此可以提起、交出珠粒和以预先规定的间隔彻底混合试剂。

[0173] 对于自动化的CLIA,将组织提取物样品加载到分析仪器的样品格层中。如在图10中所描绘的那样,装满试剂筒。每个反应使用10 μ g的用18H1-Ab进行包被的珠粒。将这些与100 μ l组织提取物样品和100 μ l以0.25 μ g/ml的浓度的经生物素化的抗-TRISP[B7]-Ab一起温育30分钟。在温育后,用磁性棒提起珠粒并在洗涤缓冲液(V=400 μ l)中洗涤三次。随后,与100 μ l的0.1 μ g/ml Extravidin/吖啶鎗试剂一起进行10分钟的温育。在三次洗涤后,将珠粒送至100 μ l触发剂A中,并且此外由分析仪器吸移触发剂B(V=100 μ l),以便启动化学发光反应。用集成在分析仪器中的发光计在425nm波长下测量光发射1秒钟,并且以相对光单位(RLU)来给出。

[0174] 手动温育的化学发光免疫测定法(CLIA)的结果

[0175] 用手动温育的CLIA,将各种不同浓度的旋毛形线虫裂解物样品进行温育。检测极限为1ng/ml旋毛形线虫裂解物。

[0176] 自动化的化学发光免疫测定法(CLIA)的结果

[0177] 同样地,用自动化的化学发光测定法,将各种不同浓度的旋毛形线虫裂解物样品进行温育。检测极限为10pg/ml旋毛形线虫裂解物。除了被毛形线虫属物种感染的肉类样品外,还将掺有确定量的毛形线虫属物种肌幼虫的肉类样品破碎。它们装备有3至30条幼虫。对于所述确定量的肌幼虫,自动化的CLIA的检测极限为3条幼虫/100克肉。

[0178] 在图11中,描绘了经破碎的和毛形线虫属物种阳性的组织提取物的颗粒尺寸与CLIA结果之间的相关性。可以看到,肉的颗粒尺寸随着破碎时间前进而减小,而CLIA的反应则增加。随着肉和因此还有幼虫的破碎前进,释放出增多的毛形线虫属物种抗原。然后,这些可以通过CLIA来检测。相对光单位(RLU)也随着肉类样品中的幼虫数目上升而增加。从掺有30条幼虫的肉类样品产生的毛形线虫属物种阳性的组织提取物在6分钟破碎后所显示出的反应是6条幼虫的组织提取物(50,000RLU)的三倍(150,000RLU)。

[0179] 在本文中一般性地和总体性地描述了本发明。在一般性公开内容范围之内更窄的类型和亚组中的每一个也构成本发明的一部分。这包括具有保留限制或负限制(其去除(亚)组的每个对象)的本发明的总体性描述,而不依赖于所剪除的对象是否在此特别地被引用。其他实施方案被包括在下面的权利要求书中。

[0180] 技术人员将会容易地认识到,本发明很好地适合于完成所述任务并且实现所希望的优点以及与此相关的目标。进一步地,对于技术人员来说毫无问题地显而易见的是,可以实施对于在本文中所公开的发明的各种不同的替换和修改,而不背离本发明的范围和精神。在本文中所描述的方法、用途、处理、分子和试剂盒对于优选的实施方案来说是代表性的,所述优选的实施方案是示例性的而并不旨在作为本发明的范围的限制。其中的改变和其他应用是技术人员能够想起的,它们包括在本发明的范围中并且通过权利要求书的范围来定义。在该说明书中的以前出版的文献的清单或讨论不应当必然地被理解为承认了所述文献属于现有技术或是普遍已知的。

[0181] 在本文中举例说明性地描述的发明可以在不存在任何在此没有特别地公开的要素或限制的情况下以合适的方式来施行。因此,例如,表述“包含”、“包括”、“含有”等全面地且没有限制地来阅读。与此相应地,词语“包含”或“包括”被理解为内含性的,即例如将所指明的数包括在内,而不是排除。另外,在本文中所使用的术语和表述用作描述性而非限制性

的表述,并且没有这样的术语和表述限制所显示的和所描述的特征或其部分的任何等价物的意图。也就是说,在所要求保护的发明的保护范围之内的各种不同的修改是可能的。因此,应当理解,虽然通过示例性的实施方案和任选的特征而特别地公开了本发明,但是在本文中所公开的本发明的修改和变化也可以由本领域技术人员来进行使用;并且这样的修改和变化被看作是在本发明的保护范围之内。

[0182] 在本文中所引用的所有文献和专利文件的内容通过提及而以其整体合并入本文。

[0183] 缩写

缩写	英语	中文
μg	microgram	微克
μl	microliter	微升
AG (或 Ag)	antigen	抗原
AB (或 Ab)	antibody	抗体
CLIA	Chemiluminescent Immunoassay	化学发光免疫测定法
E/S	Excretory/Secretory	排泄型/分泌型
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定法
EU	European Union	欧盟
g	gram	克
IIFT	Indirect Immonofluorescence Test	间接免疫荧光测试
l	liter	升
mg	milligram	毫克
min.	minute	分钟
ml	milliliter	毫升
ML	Muscle Larvae	肌幼虫
NBL	New Born Larvae	新生幼虫
NBT/BCIP	nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate	氯化氮蓝四唑鎓/5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯
ng	nanogram	纳克
nm	nanometer	纳米
O.D.	Optical Density	光密度
rpm	rounds per minute	转/分钟
RT	Room Temperature	室温
sec.	second	秒钟
SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0184]

[0185] 参考文献

- [0186] 1. Dupouy J, Murrell KD: FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis; 2007.
- [0187] 2. Mitreva M, Jasmer DP: WormBook: Biology and genome of *Trichinella spiralis*; 2006.
- [0188] 3. Zarlenga DS, La Rosa G, Pozio E, Rosenthal B: Identification and classification within the genus *Trichinella*, with special emphasis on non-encapsulated species. *Vet Parasitol* 2004, 125:75-78.
- [0189] 4. Liu M, Boireau P: Trichinellosis in China: epidemiology and control. *Trends Parasitol* 2002, 18(12):553-556.
- [0190] 5. BfR: Trichinellose-Erkennung, Behandlung und Verhütung. Information BfR 2007.
- [0191] 6. Kapel CM: Changes in the EU legislation on *Trichinella* inspection--new challenges in the epidemiology. *Vet Parasitol* 2005, 132(1-2):189-194.
- [0192] 7. Nöckler K, Serrano FJ, Boireau P, Kapel CM, Pozio E: Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet Parasitol* 2005, 132(1-2):85-90.
- [0193] 8. RKI: Ringversuch zum Nachweis von Trichinellen in Fleisch. In.: Robert Koch Institut; 2016.
- [0194] 9. Report on the validation of the Trichin-L antigen test kit of the Bio-Rad company In.: European Union Reference Laboratory for Parasites; 2010.
- [0195] 10. Retsch GmbH: **CAMSIZER®** Characteristics-Basis of definition DIN 66141. 2009.
- [0196] 11. Appleton J A, Schain LR, and McGregor DD. 1988. Rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats: mediation by monoclonal antibodies. *Immunology* 65:487-492.
- [0197] 12. Altschul SF, Gish, W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410
- [0198] 13. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang H, Miller W, and Lipman DJ. (1997) : Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; *Nucleic Acids Res.*, 25, pp.3389-3402
- [0199] 14. Chenna 等人 (2003) : Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acid Research* 31, 3497-3500
- [0200] 15. Notredame 等人 (2000) : T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 302, 205-217

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Thr Ser Asp Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln
 20 25 30
 Lys Ala Pro Gly Ser Ala Pro Val Thr Leu Ile Tyr Asp Asn Thr Asn
 35 40 45
 Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ser Gly Ser
 50 55 60
 Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val
 65 70 75 80
 Tyr Phe Cys Gly Ser Ala Asp Arg Thr Tyr Ala Gly Val Phe Gly Ala
 85 90 95
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
 100

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-[TRISP][C9] VH

<400> 3

Ala Val Thr Leu Asp Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gln Thr Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Tyr Tyr Asp Gly Asn Thr Trp Tyr Ala Pro Ala Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Gln Ser Thr Val Arg Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Lys Tyr Ala Gly Gly Tyr Ser Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu
 100 105 110
 Val Ile Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 104

<212> PRT

<213> 人工序列

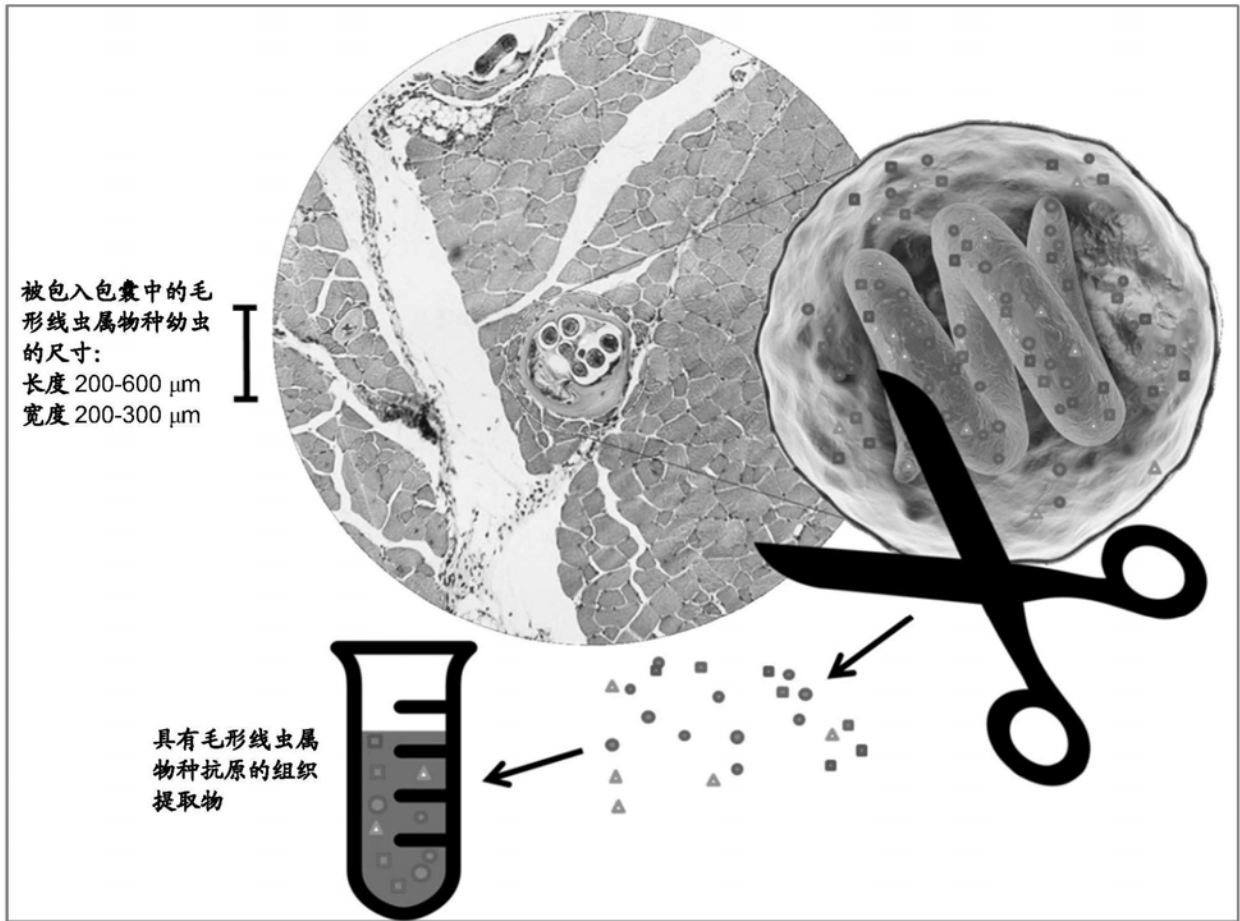


图1

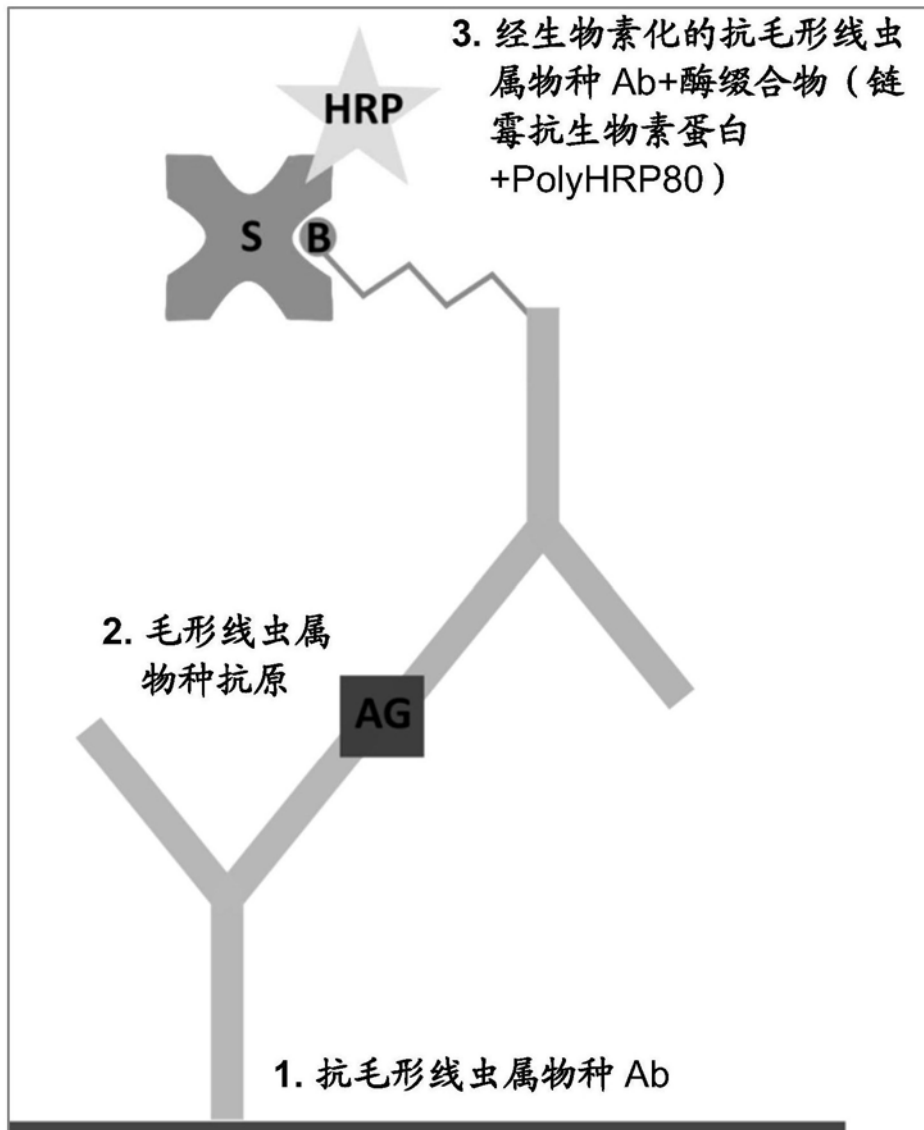


图2

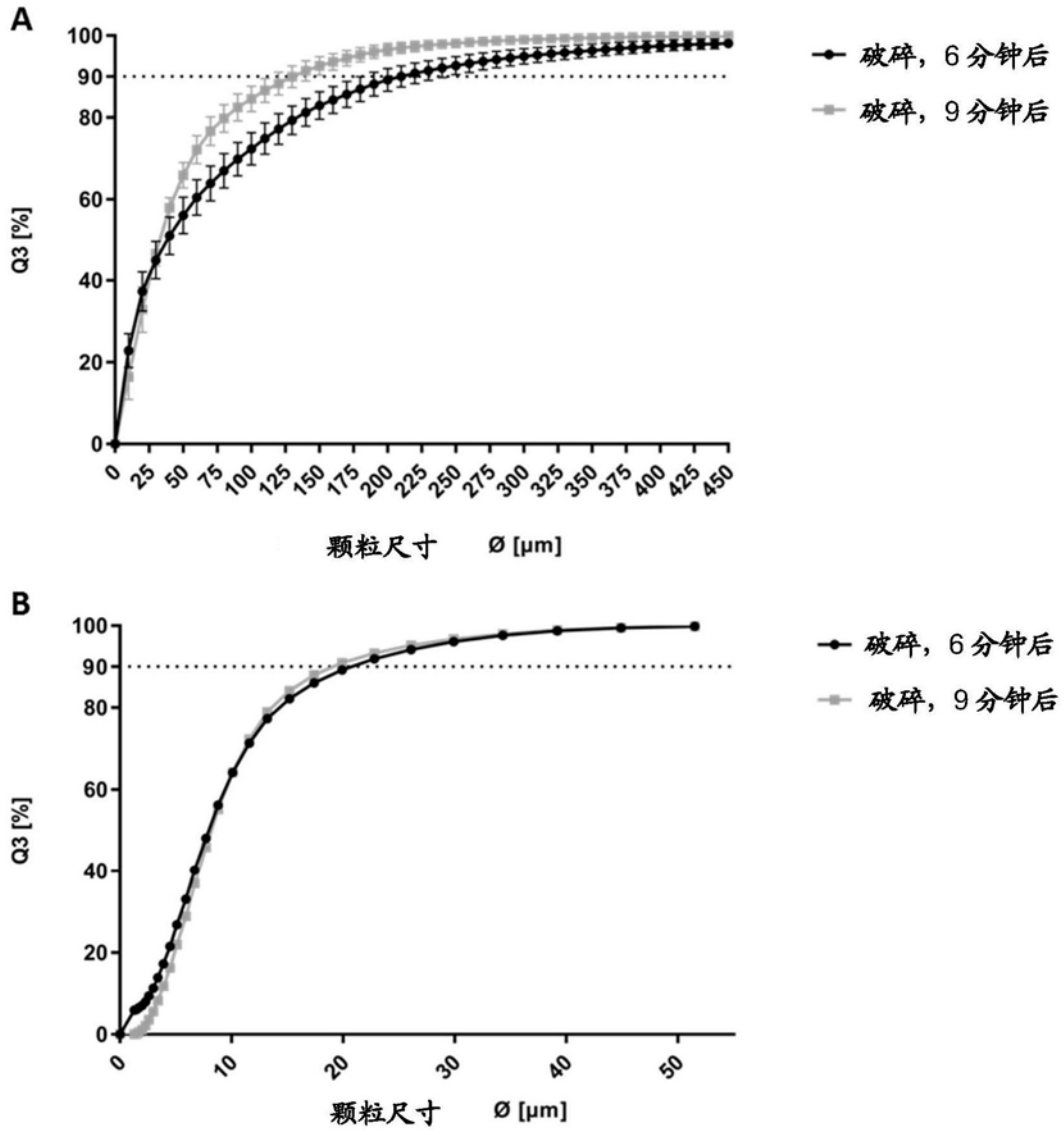


图3

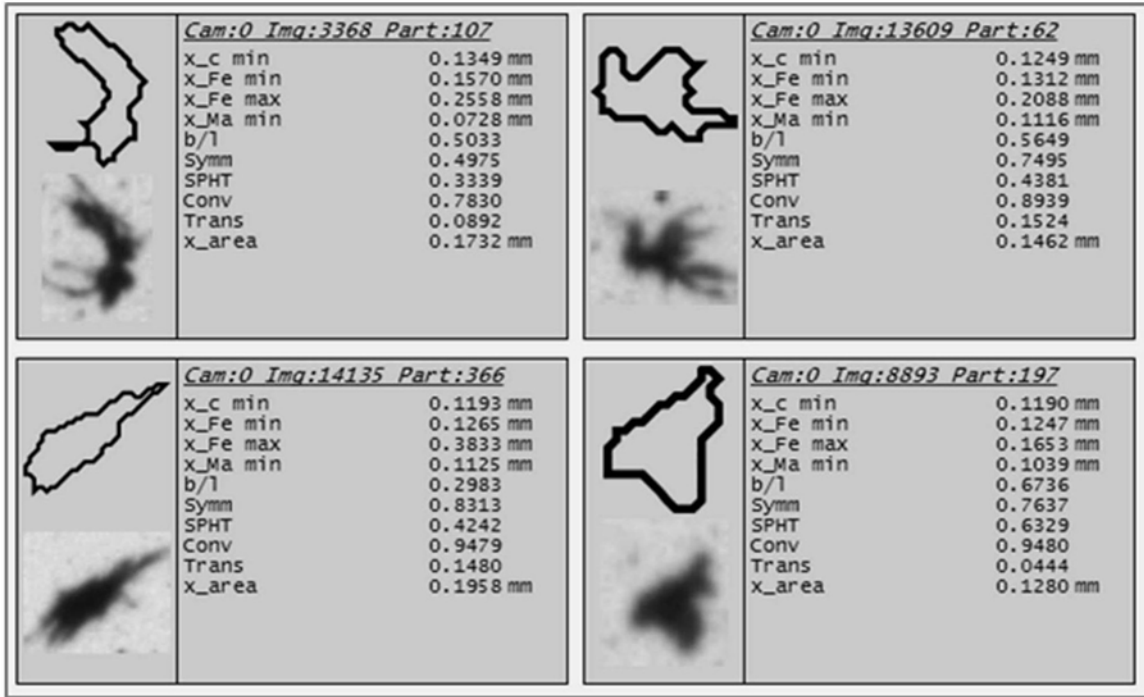


图4

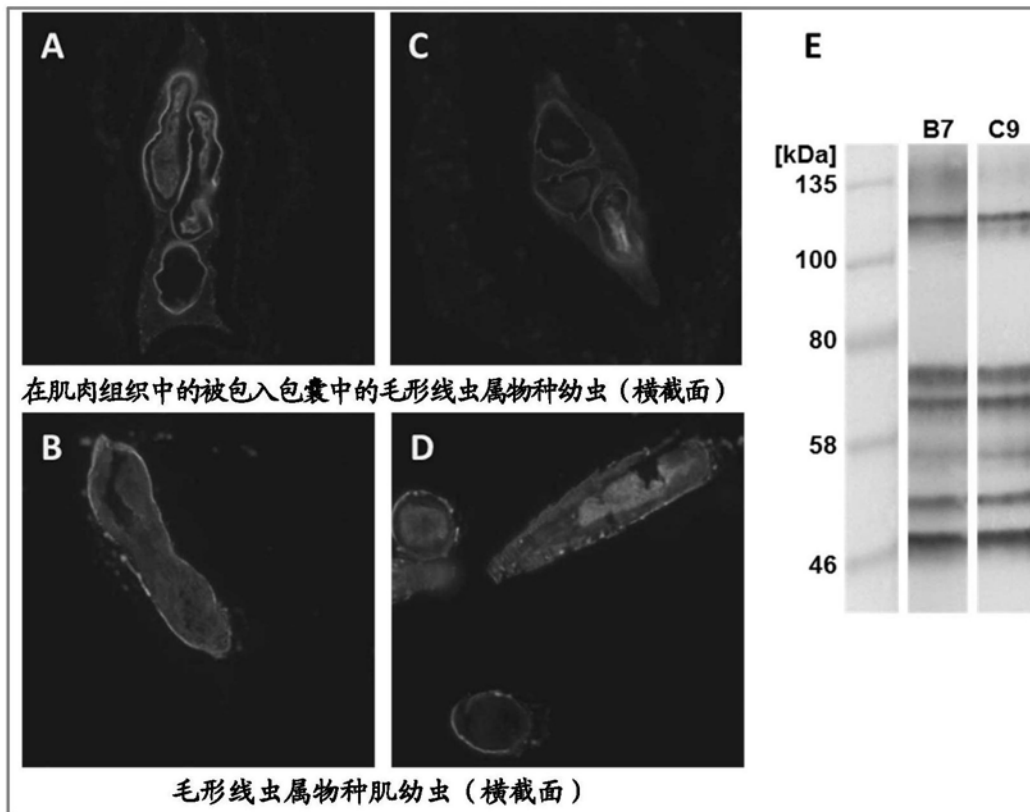


图5

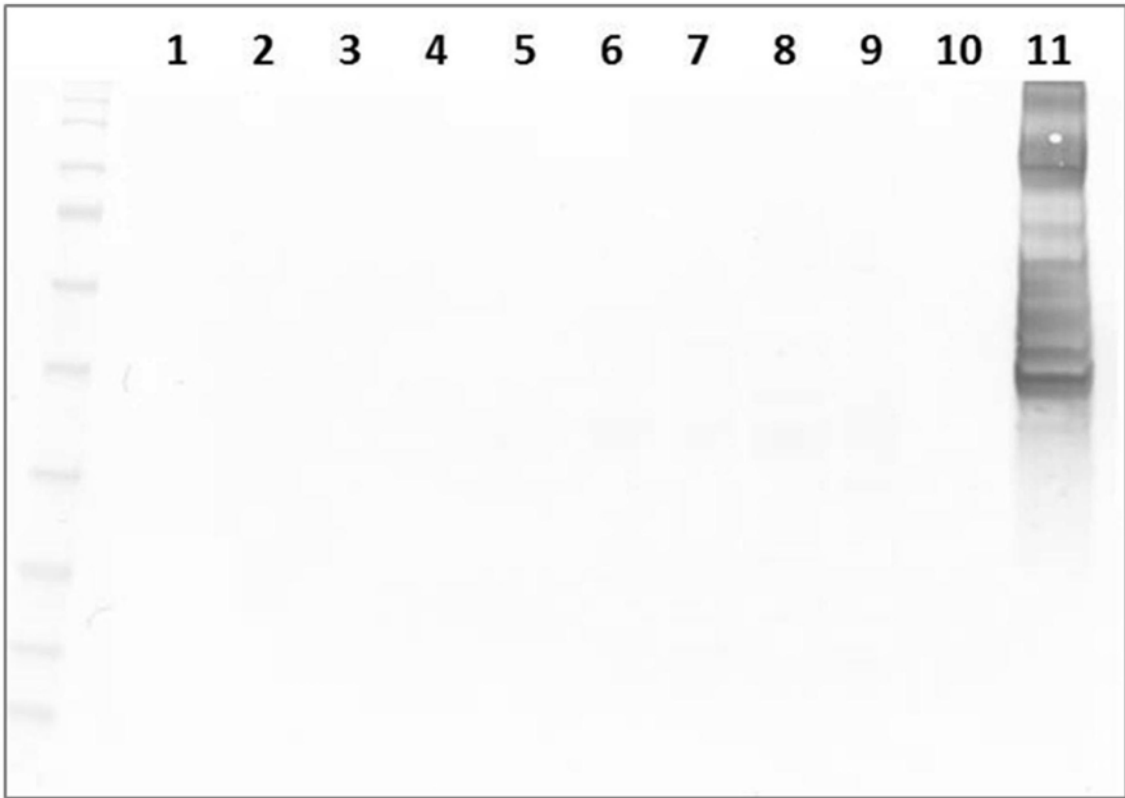


图6

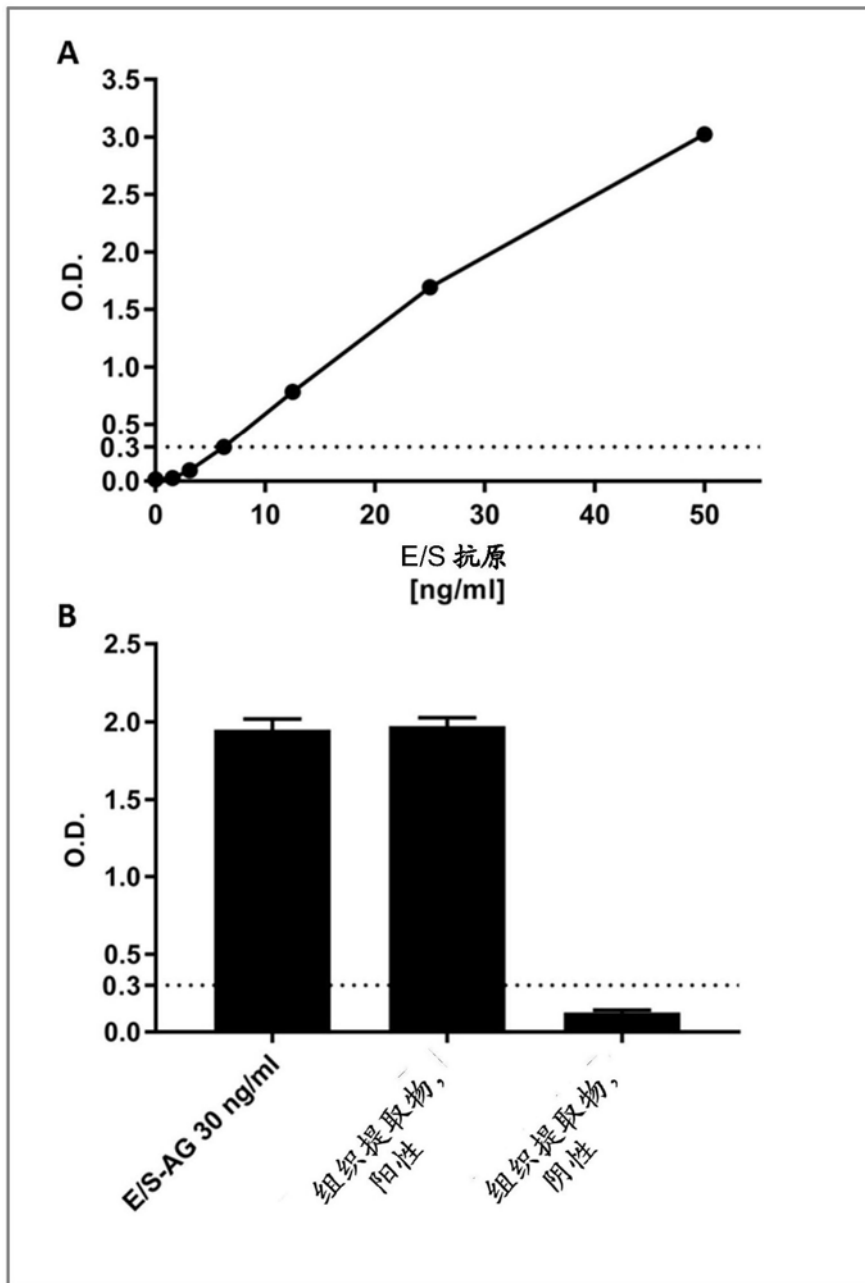


图7

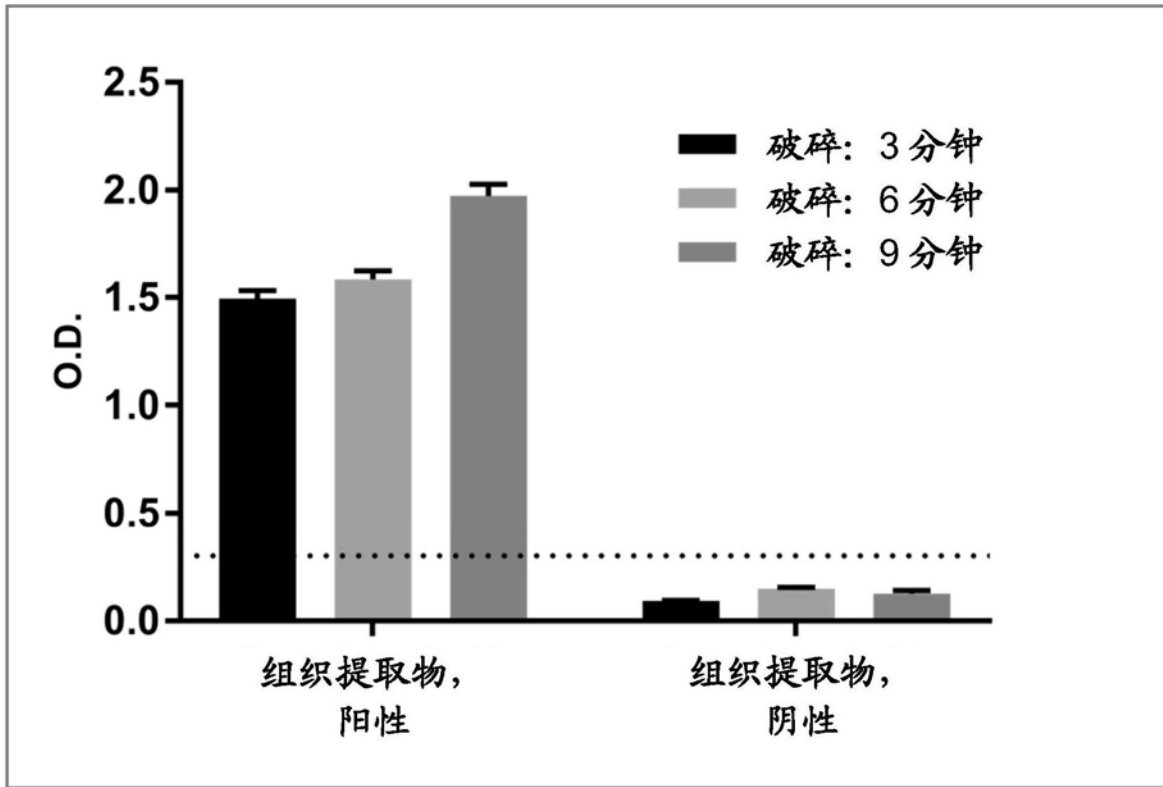


图8

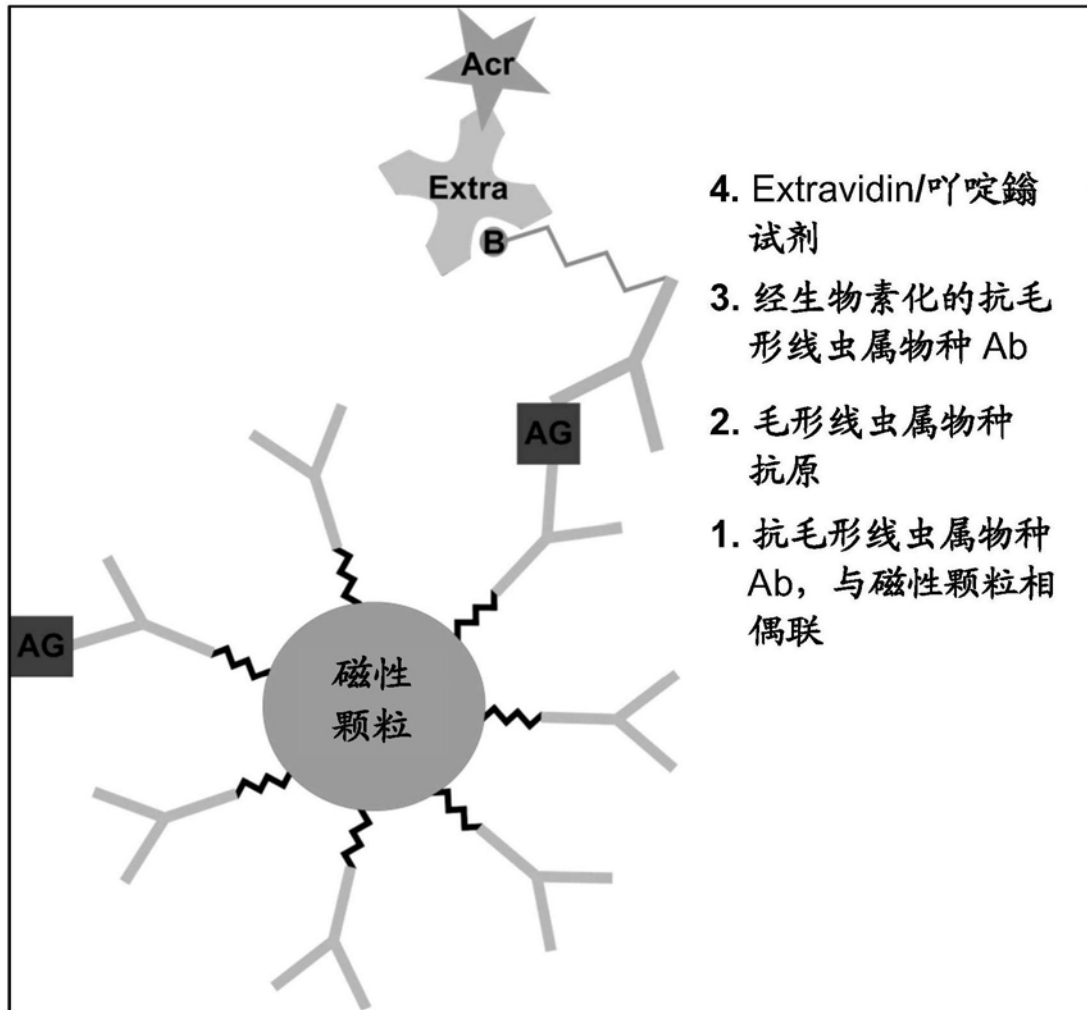


图9

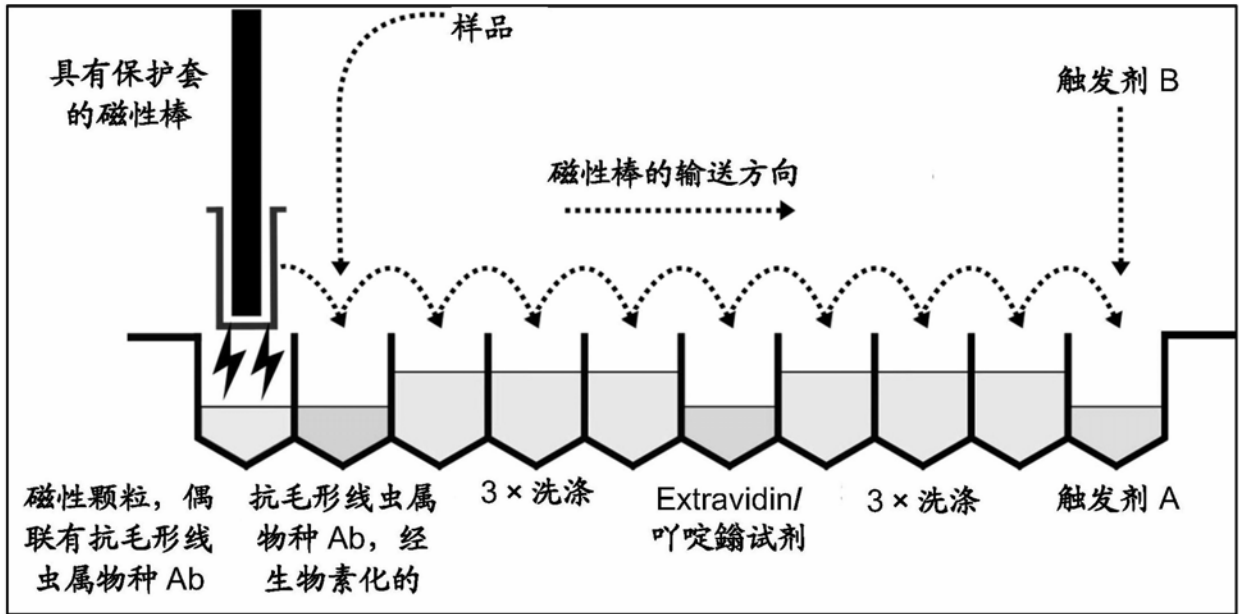


图10

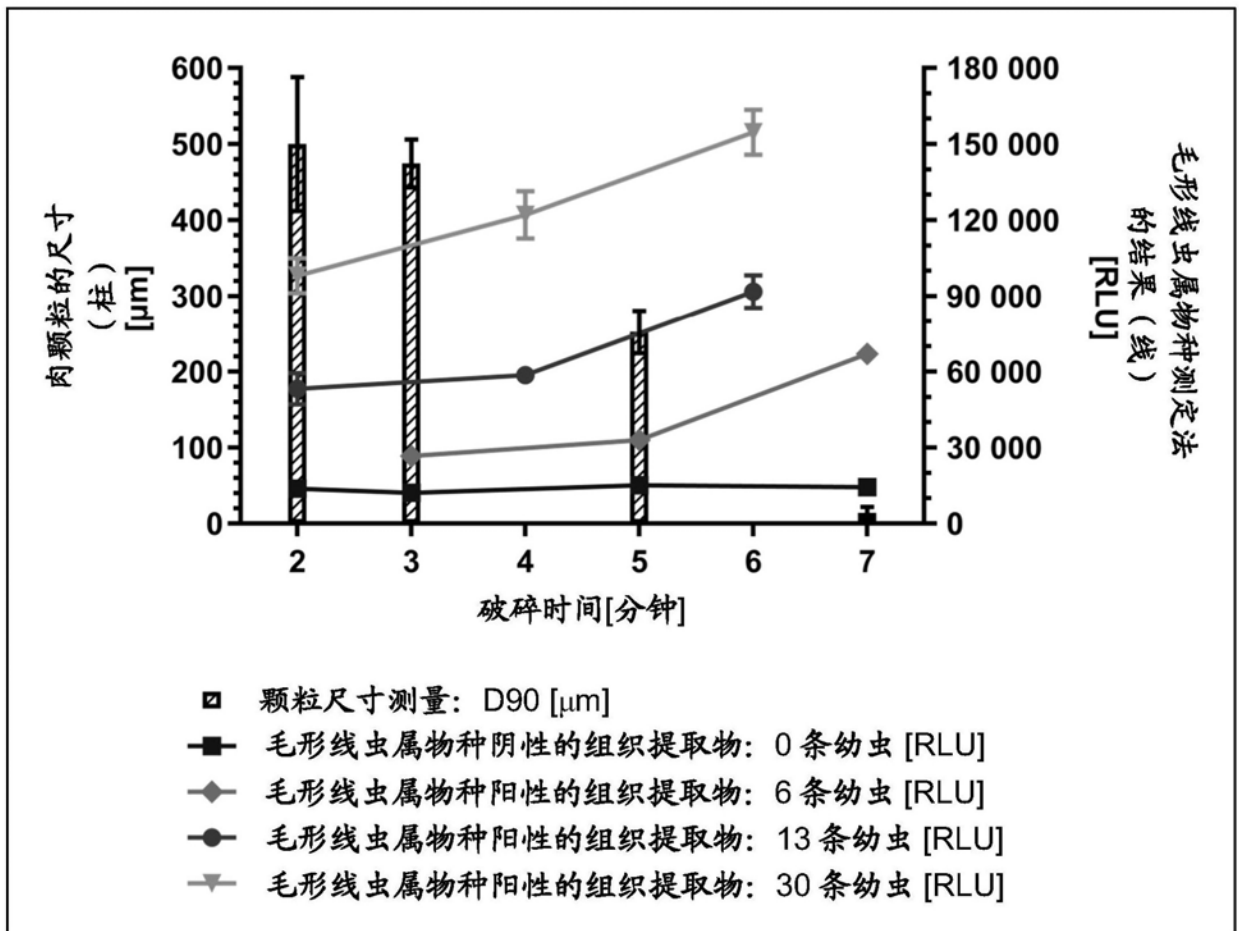


图11

专利名称(译)	毛形线虫属物种的抗原检测		
公开(公告)号	CN109946448A	公开(公告)日	2019-06-28
申请号	CN201811559017.5	申请日	2018-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	欧蒙医学诊断技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	欧蒙医学诊断技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	欧蒙医学诊断技术有限公司		
[标]发明人	J布拉施		
发明人	J·布拉施 S·奥斯特曼 M·马茨凯维奇		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/12 G01N33/53 G01N33/48735 G01N33/5308 G01N33/569 G01N2333/4353 C07K14/4354 C07K16/18 G01N33/58 G01N33/6854		
优先权	2017208994 2017-12-20 EP 2018199404 2018-10-09 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明旨在用于检测组织提取物样品中的毛形线虫属(Trichinella)物种的方法，根据本发明的检测系统用于检测毛形线虫属物种的用途，以及试剂盒，所述试剂盒包含：(a)检测载体，其包含针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的一抗，和(b)(i)针对毛形线虫属物种的一种或多种抗原的二抗，其中所述二抗与信号分子相连接，或(b)(ii)与信号分子相连接的毛形线虫属物种的一种或多种抗原，其中来自(b)(ii)的抗原如此来设置，从而使得它们通过竞争性排挤来解除来自(a)的抗原与一抗的结合。

材料	名称	产品编号	制造商
器具	自动化学发光分析仪 SuperFlex		PerkinElmer
	Biometra WT 15 042-400 摇动器		Biometra
	Centro XS ³ LB 960 微量 培养板发光计		Berthold Technologies
	GM 200 配件: 不锈钢研磨 容器	03 045 0050	Retsch
	GM 200 配件: 锯齿状刀	02 446 0057	Retsch
	HydroFlex™ 微量培养板 洗涤器, 磁性珠粒		Tecan
	培养箱 WTB		BINDER
	刀式研磨机 GRINDOMIX GM 200	20 253 0001	Retsch
	MTS 2/4 数字微量滴定摇 动器	3208001	IKA
	Novex Mini Cell		Invitrogen
	光度计: Sunrise™		Tecan
	Power Pac HV		Bio-Rad
	台式离心机: Biofuge Fresco		Heraeus
	Washer Columbus		Tecan