

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/569

G01N 33/577

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01112707.4

[43] 公开日 2002 年 12 月 4 日

[11] 公开号 CN 1382989A

[22] 申请日 2001.4.24 [21] 申请号 01112707.4

[71] 申请人 杜凤鸣

地址 200433 上海市黑山路 181 号

[72] 发明人 杜凤鸣

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 王 巍

权利要求书 6 页 说明书 16 页 附图 0 页

[54] 发明名称 柯萨奇病毒 B 抗原酶免试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种柯萨奇病毒 B1-6 混合型抗原试剂盒。该试剂盒用 CoxB 病毒 B1-6 混合型单克隆抗体包被,免抗 CoxB1-6 病毒抗体 IgG 联接辣根过氧化物酶为检测抗体,检测血清中的 CoxB 病毒 B1-6 混合型抗原。本发明的试剂盒灵敏度和特异性高。本发明提供了制备方法。

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

1. 一种柯萨奇病毒 B1-6 混合型抗原 ELISA 试剂盒, 其特征在于该试剂盒用 CoxB 病毒 B1-6 混合型单克隆抗体包被, 兔抗 CoxB1-6 病毒抗体 IgG 连接辣根过氧化物酶为检测抗体, 检测血清中的 CoxB 病毒 B1-6 混合型抗原, 试剂盒由下列组成:

预包被反应条	48 孔/96 孔	酶标记液	1 瓶(3ml)
样品稀释液	1 瓶(6ml)	阳性对照	1 支(200 $\mu$ l)
阴性对照	1 支(200 $\mu$ l)	20 倍浓洗涤液	1 瓶(13ml)
显色剂 A	1 瓶(3ml)	显色剂 B	1 瓶(3ml)
终止液	1 瓶(3ml)		

2. 一种如权利要求 1 所述的一种柯萨奇病毒 B1-6 混合型抗原 ELISA 试剂盒的制备方法, 其特征在于该方法包括下列步骤:

一、包被抗体(CoxB 病毒 1-6 混合单克隆抗体)的制备

(一)CoxB 病毒 1-6 型的制备

(1) CoxB 病毒 1-6 型毒种来源: 昆明生物所

(2) Hela 细胞来源: 中科院细胞所

(3) 细胞传代:

①培养剂配制: PRMI1640 基础培养过滤除菌, 200ml 基础培养剂中含:  
牛血清 10%;

青霉素 4 万单位

链霉素 4 万单位

6%NaHCO<sub>3</sub> 4ml

3%谷氨酰胺 6ml

②胰酶(DT)配制: 用无 Ca、Mg 离子溶液配制 0.3%胰酶消化液, 用分散、消化细胞;

③细胞传代: 将成片的细胞倾去培养液, 加入 DT 进行细胞消化, 观察细胞已呈疏松网状, 既倒去 DT, 加入营养液后, 分瓶培养培养 3-5 天;

(4) 病毒的感染、培养、收毒和鉴定:

①将形态完整、成片的单层细胞倾去培养液后, 用不含牛血清的洗液洗一次;

②细胞感染病毒后, 在 37℃吸附 1 小时;

③补充培养液, 在 37℃培养;

④逐日观察细胞: 至所有细胞产生细胞病变后, 用无菌方法收获病毒;

⑤微量平底板进行病毒浓度的滴定和病毒鉴定;

病毒滴定: 用 10 倍的倍比稀释的方法进行病毒的稀释, 病毒加入微量板中, 每孔加 50  $\mu$  l 病毒, 每个稀释度加 4 孔, 然后加

入细胞 50  $\mu$  l, 设细胞对照, 按 Reed-Muench 方法计算病毒的 TCID<sub>50</sub>;

病毒的鉴定: 应用免疫电镜法及应用中和试验方法(微量滴定法)

病毒取 100TCID<sub>50</sub>, 加入含抗血清的孔内, 25  $\mu$  l/孔, 抗血清作 1:4-1:1024 连续 4 倍稀释, 25  $\mu$  l/孔, 每个稀释度 4 孔, 将板加盖, 37°C 中培育 2 小时; 然后每孔内加 Hela 细胞 50  $\mu$  l, 同时设病毒阴性、阳性对照, 逐日观察细胞病变; 是同型的病毒, 能被抗血清中和、而不出现 CPE;

(5) 抗原的制备、浓缩和纯化:

①病毒灭活;

②去除病毒碎片: 用冷冻离心的方法去除细胞碎片;

③初步浓缩、提纯: 用 PEG 方法进行提纯;

④病毒的进一步纯化: 用葡聚糖过柱、洗脱的方法, 然后在 A280 的分光光度计进行蛋白含量的测定;

(二) CoxB 病毒 1-6 型混合单克隆(Mc)抗体的制备

(1) CoxB 病毒 1-6 型混合后, 免疫 Balb/c 小鼠;

(2) SP2/0 骨髓瘤细胞培养准备;

(3) 细胞融合、筛选、克隆;

(4) 单克隆鼠抗 CoxB1-6 型混合抗体 IgG 鉴定, 滴度 $>10^6$ , 特异性符合要求;

二、兔抗 CoxB 病毒 1-6 型混合抗体 IgG 的制备

用已制备、浓缩和纯化好的 CoxB 病毒 1-6 型制备兔抗体 IgG

(1) CoxB 病毒 1-6 型混合后取 1mg/ml 加等量完全福氏佐剂钵中研磨乳化;

(2) 每只兔颈背部多点皮内注射, 每两周 1 次共 5-6 次;

(3) 双扩散效价达 1:64 以上时采集血清;

(4) 辛酸法纯化抗血清 IgG 部分

(5) 抗血清 IgG 蛋白定量;

三、酶标记抗体制备

用过碘酸钠法把兔抗 CoxB 病毒 1-6 型混合抗体 IgG 与辣根过氧化物酶偶联对 PBS 充分透析, 加等体积甘油, -20°C 以下保存, 效价 $>1:1000$ (用方阵滴定法测定);

四、兔抗 CoxB 病毒 1-6 型抗体 IgG 浓度测定

采用方阵滴定法选择酶标记抗体工作浓度为 1:1000

五、预包被抗体板及试剂盒原料的制备

(1) 包被

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>            0.6g

Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>           1.58g

重蒸水 500ml

加入适量 CoxB 病毒 1-6 混合型 Mc 抗体, 调整 PH 至 9.5 加入板条各孔中, 置湿盒中加盖, 4℃过夜后甩干;

(2) 洗涤

Tris 2.42g

重蒸水 1000ml

加入板条各孔中, 静置 5 秒后甩干, 上述操作重复 3 次, 以除去剩余抗原;

(3) 封闭

蔗糖 100g

羊血清 25ml

0.1MPBS 1000ml

加入板条各孔中放入湿盒中(加盖)37℃2h, 弃去液体, 吸水纸上拍干重复一次, 待干燥后, 放入有干燥剂的塑料袋封口, 保存于 4℃;

(4) 阳性对照制备

诊断心肌炎患者的血清, 60℃放置 1 小时, 除菌过滤, 用本试剂盒测定 A 值>0.8 备用, 分装;

(5) 阴性对照的制备

正常人血清用本试剂盒测定 A 值 0-0.09 用万分之二硫柳汞防腐备用分装;

(6) 酶标记抗体配制

兔抗 CoxB 病毒 1-6 型 IgG-HRP	30%小牛血清
	50% 0.15MPBS
	20%甘油

—————→稀释 20 倍分装

(7) 酶标记抗体稀释液

小牛血清 30ml

0.15MPBS 50ml

甘油 20ml

20% Tween-20 2.5ml

调 PH 至 7.2

(8) 显色剂 A

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 1.7g

柠檬酸 · H<sub>2</sub>O 0.5g

3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μ l

重蒸水 100ml

调 PH 至 5.0

## (9) 显色剂 B

EDTA 17.5mg

柠檬酸·H<sub>2</sub>O 0.5g

重蒸水 100ml

加入 10ml DMSO 含 60mg TMB 的溶液 25 μl

## (10) 终止液

浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10ml

蒸馏水 80ml

## (11) 20X 洗涤液

Tris 4.84g

重蒸水 100ml

## (12) CoxB1-6 混合抗原检测流程夹心法如下:

- ① 予包板 Mc 板
- ② 加待测患者血清
- ③ 酶标记兔抗 CoxB1-6 混合病毒抗体 IgG
- ④ 加显色剂 A、B
- ⑤ 450nm 波长读 O.D 值
- ⑥ 结果判定

## 六、半成品的检定

(1) 包被板的检定: CV (%) &lt; 10% (n=10)

(2) 稳定性检定:

① 阴性对照和阳性对照 +4℃— +8℃ 的稳定性检定

试剂盒内设定阴性对照及阳性对照均 +4℃—+8℃ 放置 12 个月, 再用该试剂盒测定吸光度在正常范围内;

② 试剂盒 37℃ 稳定性检定

装配前一星期将兔抗 CoxB 病毒 1-6 型 IgG-HRP (1+100) (同一批 CoxB 病毒 1-6 型 IgG-HRP 检测一次) 置 37℃, 并于第 1 天, 第 3 天, 第 5 天, 第 7 天各测定一次, 并用兔抗 CoxB 病毒 1-6 型 IgG-HRP 置 -20℃ 作对照, 测得质控血清 7 天基本不变, 则可以使用;

(3) 特异性检定:

用 62 份质控参比血清来检测半成品, 阴性参比血清 42 份允许出现阳性 1 份, 阳性参比血清 20 份允许出现阴性 1 份;

阴性质控血清组成: T1-3: HAV 抗体阳性血清, T4-6: HCV 抗体阳性血清; T7-9: HEV 抗体阳性血清, T10-14: HBV 表面抗体阳性血清, T15-24: CoxB-IgM 阴性血清, T25-27: 类风湿因子阳性血清, T28-30: TB 阳性血清, T31-33: EBV 阳性血清, T34-36: CMV 阳性血清, T37-39: Hop1 阳性血清, T40-42: 抗核抗体阳性血清; 42 份特异性血清应允许 1 份为阳性;

阳性质控血清20份组成:Y1-20 CoxB1-6抗原阳性血清,20份阳性血清,应允许1份为CoxB1-6抗原阴性,其余19份应检测为阳性;

#### (4) 灵敏度检定

##### ①组成:

L1#按以下稀释度稀释:1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024

L2#按以下稀释度稀:1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048

L3#按以下稀释度稀:1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512

##### ②判断标准:

L1#灵敏度应检测到1:64

L2#灵敏度应检测到1:128

L3#灵敏度应检测到1:32

#### (5) 精密度测定

将同一样品平行加样10孔,其检测值的变异系数小于15%(CV% <15);

(6) 酶标抗体稀释液,底物液经过 37℃细菌培养试验,发现无菌生长;

### 七、试剂盒组装

(1) 上述制备步骤所用试剂用过滤器除菌过滤后 GMP 车间中超净分装;

(2) 试剂盒必需有外包装盒,海棉垫,塑料瓶 6 瓶, eppenkof 管 2 支,包被板,说明书,内标签纸 9 张,外标贴纸 1 张,批号 lot/EXP, 48T/96T;

### 八、成品检定

#### (1) 物理检查

①药盒外包装,标签,批号,规格(48T/96T)有无遗漏;

②药盒内试剂瓶完整无渗漏,试剂瓶数和说明书无欠缺,标签完整,有效期应清楚明晰;

③药盒试剂(酶标抗体稀释液,底物液甲,底物液乙,洗涤液)核对 PH 值及溶液是否澄清;

(2) 稳定性检定:完全同半成品检定

(3) 特异性检定:完全同半成品检定;

(4) 灵敏度:完全同半成品检定;

(5) 精密性:完全同半成品检定;

(6) 抽样合格后,留下 5 个试剂盒剩余入库;

3 个试剂盒

4℃ 2 个 隔一个月测定 1 次

37℃ 1 个 第一次隔三天测定 1 次,以后每星期测定 1 次,

记录数据,绘制图表;

2 个试剂盒留库备查

九、保存与有效期

保存于 2-8℃，自检定后合格之日起有效期为 12 个月；

## 柯萨奇病毒 B 抗原酶免试剂盒及制备方法

本发明涉及生物技术产品，具体涉及一种柯萨奇病毒(Cox) B1-6 混合型抗原试剂盒及制备方法。

柯萨奇病毒 B1-6 对易感人群具有高度的传染性，儿童是最敏感的人群，病毒流行期儿童的感染率通常为 10-20%家庭中所有敏感成员通常都被感染，因此，柯萨奇病毒 B 感染所致的相关疾病发病率较高，尤其柯萨奇病毒性心肌炎对儿童具有很大威胁和危害。临床的早期诊断和有效治疗有很重要意义。以往柯萨奇病毒 B 感染和致病的病原学确诊法是病毒分离和心肌荧光染色，但这两种方法的标本采集和处理较复杂，病毒分离和取心肌荧光染色程序烦琐，实验时间很长，由于临床确诊越早其疗效越好。因此病毒分离技术和取心肌荧光法的临床早期诊断优势不大。CoxB1-6 病毒符合一般病毒感染后抗原和抗体(IgM、IgG)出现规律。病毒(抗原)血症期，首先在患者血中检测到病毒(抗原)，此期可持续 1 个月左右。病毒(抗原)出现 1-2 周后，出现 CoxB1-6 IgM(可持续 1-2 周)，而后大约 2 周出现 CoxB1-6-IgG，因此 CoxB1-6 混合抗原(CoxB1-6 Ag)试剂盒能从血清中直接检测病毒是病毒早早期感染和复制的最主要标志。

本发明的目的在于克服以往方法的不足之处，研制一种灵敏度高和特异性高的能直接检测出 CoxB1-6 型病毒感染诊断试剂盒，可以比 CoxB1-6 IgM 和 IgG 更早的确诊病原。

本发明提供了一种 CoxB1-6-Ag ELISA 试剂盒，该试剂盒用 CoxB 病毒 B1-6 混合型单克隆抗体包被，兔抗 CoxB1-6 病毒抗体 IgG 联接辣根过氧化物酶为检测抗体，检测血清中的 CoxB 病毒 B1-6 混合型抗原，试剂盒由下列组成：

预包被反应条	48 孔/96 孔	酶标记液	1 瓶(3ml)
样品稀释液	1 瓶(6ml)	阳性对照	1 支(200 $\mu$ l)
阴性对照	1 支(200 $\mu$ l)	20 倍浓洗涤液	1 瓶(13ml)
显色剂 A	1 瓶(3ml)	显色剂 B	1 瓶(3ml)
终止液	1 瓶(3ml)		

本发明的另一目的是提供了上述柯萨奇病毒 B1-6 混合型抗原 ELISA 试剂盒的制备方法，该方法包括下列步骤：

### 一、原材料及其规格

#### (一) 试剂盒制备用的原料

病毒 B1-6 混合单克隆(Mc)抗体 1:10000

阳性对照：诊断心肌炎患者血清，用本试剂盒测定 A 值>0.8，放置-20

℃备用。

阴性对照：选正常人血清，用本试剂盒测定 A 值 $<0.09$ ，放置 $-20^{\circ}\text{C}$ 备用。

酶标抗体：兔抗 CoxB1-6 病毒 IgG-HRP，辣根过氧化物酶，RZ $>3.0$   
Sigma 进口酶标记兔抗 CoxB1-6 病毒 IgG，双扩散 1: 64。

其它试剂：

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	A. R
$\text{NaHCO}_3$	A. R
小牛血清	杭州四季清厂生产
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	A. R
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	A. R
NaCl	A. R
Tweel-20	化学纯
甘油	化学纯
$\text{H}_2\text{O}_2$	A. R
柠檬酸 $\cdot\text{H}_2\text{O}$	A. R
TMB	熔点: $168^{\circ}\text{C}$
EDTA	A. R
$\text{H}_2\text{SO}_4$	A. R
Tris	A. R

蒸馏水必需符合《中国药典》(1990)之规定

细胞及动物要求：

- (1)Hela 细胞(ATCC CCL-2)
- (2)新西兰大白兔 2 公斤左右

二、包被抗体(CoxB 病毒 1-6 混合单克隆抗体)的制备。

(一)CoxB 病毒 1-6 型的制备

- (1) CoxB 病毒 1-6 型毒种来源：昆明生物所
- (2) Hela 细胞来源：中科院细胞所
- (3) 细胞传代：

①培养剂配制：PRMI1640 基础培养过滤除菌，200ml 基础培养剂中含：  
牛血清 10%

- 青霉素 4 万单位
- 链霉素 4 万单位
- 6% $\text{NaHCO}_3$  4ml
- 3%谷氨酰胺 6ml

②胰酶(DT)配制：用无 Ca、Mg 离子溶液配制 0.3%胰酶消化液，用分散、消化细胞。

③细胞传代：将成片的细胞倾去培养液，加入 DT 进行细胞消化，观

察细胞已呈疏松网状，既倒去 DT，加入营养液后，分瓶培养培养 3-5 天。

(4) 病毒的感染、培养、收毒和鉴定：

- ①将形态完整、成片的单层细胞倾去培养液后，用不含牛血清的洗液洗一次。
- ②细胞感染病毒后，在 37℃ 吸附 1 小时。
- ③补充培养液，在 37℃ 培养。
- ④逐日观察细胞：至所有细胞产生细胞病变后，用无菌方法收获病毒。
- ⑤微量平底板进行病毒浓度的滴定和病毒鉴定。

病毒滴定：用 10 倍的倍比稀释的方法进行病毒的稀释，病毒加入微量板中，每孔加 50  $\mu$  l 病毒，每个稀释度加 4 孔，然后加入细胞 50  $\mu$  l，设细胞对照，按 Reed-Muench 方法计算病毒的 TCID<sub>50</sub>；

病毒的鉴定：应用免疫电镜法及应用中和试验方法(微量滴定法)

病毒取 100TCID<sub>50</sub>，加入含抗血清的孔内，25  $\mu$  l/孔，抗血清作 1:4-1:1024 连续 4 倍稀释，25  $\mu$  l/孔，每个稀释度 4 孔，将板加盖，37℃ 中培育 2 小时。然后每孔内加 Hela 细胞 50  $\mu$  l，同时设病毒阴性、阳性对照，逐日观察细胞病变。是同型的病毒，能被抗血清中和、而不出现 CPE；

(5) 抗原的制备、浓缩和纯化：

- ①病毒灭活；
- ②去除病毒碎片：用冷冻离心的方法去除细胞碎片；
- ③初步浓缩、提纯：用 PEG 方法进行提纯；
- ④病毒的进一步纯化：用葡聚糖过柱、洗脱的方法，然后在 A280 的分光光度计进行蛋白含量的测定；

(二) CoxB 病毒 1-6 型混合单克隆(Mc)抗体的制备

- (1) CoxB 病毒 1-6 型混合后，免疫 Balb/c 小鼠；
- (2) SP2/0 骨髓瘤细胞培养准备；
- (3) 细胞融合、筛选、克隆；
- (4) 单克隆鼠抗 CoxB1-6 型混合抗体 IgG 鉴定，滴度  $>10^6$ ，特异性符合要求。

三、兔抗 CoxB 病毒 1-6 型混合抗体 IgG 的制备

用已制备、浓缩和纯化好的 CoxB 病毒 1-6 型制备兔抗体 IgG

- (1) CoxB 病毒 1-6 型混合后取 1mg/ml 加等量完全福氏佐剂钵中研磨乳化。
- (2) 每只兔颈背部多点皮内注射，每两周 1 次共 5-6 次。
- (3) 双扩散效价达 1:64 以上时采集血清。
- (4) 辛酸法纯化抗血清 IgG 部分

(5) 抗血清 IgG 蛋白定量。

#### 四、酶标记抗体制备

用过碘酸钠法把兔抗 CoxB 病毒 1-6 型混合抗体 IgG 与辣根过氧化物酶偶联对 PBS 充分透析，加等体积甘油，-20℃ 以下保存，效价 >1:1000 (用方阵滴定法测定)。

#### 五、兔抗 CoxB 病毒 1-6 型抗体 IgG 浓度测定

采用方阵滴定法选择酶标记抗体工作浓度为 1:1000

#### 六、预包被抗体板及试剂盒原料的制备

##### (1) 包被

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.6g
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	1.58g
重蒸水	500ml

加入适量 CoxB 病毒 1-6 混合型 Mc 抗体，调整 PH 至 9.5 加入板条各孔中，置湿盒中加盖，4℃ 过夜后甩干。

##### (2) 洗涤

Tris	2.42g
重蒸水	1000ml

加入板条各孔中，静置 5 秒后甩干，上述操作重复 3 次，以除去剩余抗原。

##### (3) 封闭

蔗糖	100g
羊血清	25ml
0.1MPBS	1000ml

加入板条各孔中放入湿盒中(加盖)37℃ 2h，弃去液体，吸水纸上拍干重复一次，待干燥后，放入有干燥剂的塑料袋封口，保存于 4℃。

##### (4) 阳性对照制备

诊断心肌炎患者的血清，60℃ 放置 1 小时，除菌过滤，用本试剂盒测定 A 值 >0.8 备用，分装。

##### (5) 阴性对照的制备

正常人血清用本试剂盒测定 A 值 0-0.09 用万分之二硫柳汞防腐备用分装。

##### (6) 酶标记抗体配制

	30%小牛血清
兔抗 CoxB 病毒 1-6 型 IgG-HRP	50% 0.15MPBS
	20%甘油
—————→ 稀释 20 倍分装	

##### (7) 酶标记抗体稀释液

- |              |       |
|--------------|-------|
| 小牛血清         | 30ml  |
| 0.15MPBS     | 50ml  |
| 甘油           | 20ml  |
| 20% Tween-20 | 2.5ml |
| 调 PH 至 7.2   |       |
- (8) 显色剂 A
- |   |       |
|---|-------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 1.7g  |
| 柠檬酸 · H <sub>2</sub> O                                | 0.5g  |
| 3%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                       | 200ul |
| 重蒸水   | 100ml |
| 调 PH 至 5.0  |       |
- (9) 显色剂 B
- |                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| EDTA                            | 17.5mg |
| 柠檬酸.H <sub>2</sub> O            | 0.5g   |
| 重蒸水                             | 100ml  |
| 加入 10mlDMSO 含 60mg TMB 的溶液 25ul |        |
- (10) 终止液
- |                                  |      |
|----------------------------------|------|
| 浓 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 10ml |
| 蒸馏水                              | 80ml |
- (11) 20X 洗涤液
- |      |       |
|------|-------|
| Tris | 4.84g |
| 重蒸水  | 100ml |
- (12) CoxB1-6 混合抗原检测流程夹心法如下:
- ① 予包板 Mc 板
  - ② 加待测患者血清
  - ③ 酶标记兔抗 CoxB1-6 混合病毒抗体 IgG
  - ④ 加显色剂 A、B
  - ⑤ 450nm 波长读 O.D 值
  - ⑥ 结果判定

## 七、半成品的检定

(1) 包被板的检定: CV(%)<10%(n-10)

(2) 稳定性检定:

① 阴性对照和阳性对照+4℃— +8℃的稳定性检定

试剂盒内设定阴性对照及阳性对照均+4℃—+8℃放置 12 个月,再用该试剂盒测定吸光度在正常范围内。

② 试剂盒 37℃稳定性检定

装配前一星期将兔抗 CoxB 病毒 1-6 型 IgG-HRP(1+100)(同一批 CoxB 病毒 1-6 型 IgG-HRP 检测一次)置 37℃,并于第 1 天,第 3 天,

第5天,第7天各测定一次,并用兔抗CoxB病毒1-6型IgG-HRP置-20℃作对照,测得质控血清7天基本不变,则可以使用。

### (3) 特异性检定:

用62份质控参比血清来检测半成品,阴性参比血清42份允许出现阳性1份,阳性参比血清20份允许出现阴性1份。

阴性质控血清组成:T1-3:HAV抗体阳性血清,T4-6:HCV抗体阳性血清:T7-9:HEV抗体阳性血清,T10-14:HBV表面抗体阳性血清,T15-24:CoxB-IgM阴性血清,T25-27:类风湿因子阳性血清,T28-30:TB阳性血清,T31-33EBV阳性血清,T34-36CMV阳性血清,T37-39Hopl阳性血清,T40-42抗核抗体阳性血清。42份特异性血清应允许1份为阳性。

阳性质控血清20份组成:Y1-20CoxB1-6抗原阳性血清,20份阳性血清,应允许1份为CoxB1-6抗原阴性,其余19份应检测为阳性。

### (4) 灵敏度检定

#### ①组成:

L1#按以下稀释度稀释:

1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024

L2#按以下稀释度稀:

1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048

L3#按以下稀释度稀:

1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512

#### ②判断标准:

L1#灵敏度应检测到1:64

L2#灵敏度应检测到1:128

L3#灵敏度应检测到1:32

### (5) 精密度测定

将同一样品平行加样10孔,其检测值的变异系数小于15%(CV% <15)。

(6) 酶标抗体稀释液,显色剂经过37℃细菌培养试验,发现无菌生长。

## 八、试剂盒组装

(1) 上述制备步骤所用试剂用过滤器除菌过滤后GMP车间中超净分装。

(2) 试剂盒必需有外包装盒,海棉垫,塑料瓶6瓶,eppenkof管2支,包被板,说明书,内标签纸9张,外标贴纸1张,批号lot/EXP,48T/96T。

## 九、成品检定

(1) 物理检查

- ①药盒外包装, 标签, 批号, 规格(48T/96T)有无遗漏。
  - ②药盒内试剂瓶完整无渗漏, 试剂瓶数和说明书无欠缺, 标签完整, 有效期应清楚明晰。
  - ③药盒试剂(酶标抗体稀释液, 显色剂 A, 显色剂 B, 洗涤液)核对 PH 值及溶液是否澄清。
- (2) 稳定性检定: 完全同半成品检定
  - (3) 特异性检定: 完全同半成品检定。
  - (4) 灵敏度: 完全同半成品检定。
  - (5) 精密性: 完全同半成品检定。
  - (6) 抽样合格后, 留下 5 个试剂盒剩余入库。

3 个试剂盒

4℃ 2 个 隔一个月测定 1 次

37℃ 1 个 第一次隔三天测定 1 次, 以后每星期测定 1 次,

记录数据, 绘制图表。

2 个试剂盒留库备查

#### 十、保存与有效期

保存于 2-8℃, 自检定后合格之日起有效期为 12 个月。

柯萨奇病毒于 1948 年在美国柯萨奇地区分离而得名, 属小 RNA 病毒, 分为 A、B 两组, 其中 B 组病毒(称 CoxB1-6 病毒)在人类病毒性心肌炎, 呼吸道感染等疾病中占有重要地位, 为了进一步认识人 CoxB1-6 病毒感染的特征, 特作临床应用。

本发明的柯萨奇 B1-6 病毒 ELISA 检测试剂盒经第二军医大学附属长海医院临床结果如下:

##### 1. 试剂盒:

《CoxB1-6 病毒混合型抗原检测试剂盒》和《CoxB1-6 混合型抗体 IgM 检测试剂盒》均由上海新新医学生物工程公司生产、提供。

检测 CoxB1-6 型混合抗原(Ag)系采用夹心 ELISA 法, 检测 CoxB1-6 IgM 抗体系采用间接 ELISA 法。

##### 2. 血清标本:

本院儿科经院患儿 148 例和体检正常儿童 30 例的血清标本。

##### 3. 检测结果

##### 3.1. CoxB1-6 病毒 Ag 和抗 CoxB1-6 IgM 阳性检出率见表 1

表 1 CoxB 抗原和抗 CoxB IgM 抗体阳性率

诊断	例数	CoxB-Ag(+)	阳性率(%)	CoxB IgM 抗体(+)	阳性率(%)
呼吸道感染	80	19	23.8	31	38.8
心肌炎	51	12	23.5	19	37.3
非感染疾患	17	0	0	1	5.9
正常儿童	30	0	0	0	0

经数据统计分析,呼吸道感染与心肌炎间的 CoxB 抗原和 IgM 抗体阳性检出率无明显差异,但这二组的二项指标阳性率明显高于非感染疾患组和正常儿童组,  $P < 0.01$ 。在病程观察中,发现凡 CoxB1-6 病毒 Ag(+) 的血清标本均出现了 CoxB1-6 病毒 IgM 抗体阳性,而有部分 CoxB1-6 IgM 抗体阳性血清抗原检测为阴性,这说明该公司生产的 CoxB1-6 病毒抗原和抗体检测试剂盒测定结果较可靠。

### 3.2. CoxB1-6 病毒 Ag 持续时间的检测结果见表 2

表 2 两组 CoxB Ag 动态观察结果

诊断	例数	<2W 消失		2-3W 消失		>3W 仍阳性	
		n	%	n	%	n	%
呼吸道感染	19	12	2	6	31.6	1	5.3
心肌炎	12	3	25.0	6	50.0	3	25.0

检测结果显示,大约有一半病例的 CoxB1-6 病毒 Ag 阳性,可以在二周内转阴(15/31 例, 48.4%),超过 3 周,仍未转阴的病例占 12.9%(4/31),在呼吸道感染和心肌炎这二种疾病中,前者的 2 周转阴率明显高于后者,这也与疾病的病程相一致。

## 4. 讨论

动物实验资料显示, CoxB1-6 病毒感染后 2-3 天出现病毒血症,15 天后血液中病毒开始消退,一个月后消退 90%以上。但临床上如何监测 CoxB1-6 病毒感染状态? CoxB1-6 病毒 IgM 指标能反映有近期感染,对 CoxB 病毒感染的诊断有价值,但该指标并不能直接说明 CoxB1-6 病毒是否存在于机体之中。病毒分离和病毒 PCR 技术因方法复杂,耗时太长以及后者特异性又不甚理想等原因,现一般无法在临床常规中应用,国内也未见有其它检测 CoxB1-6 病毒 Ag 试剂盒供应。因此,上海新新医学生物工程公司生产的 CoxB1-6 病毒 Ag 和 Ab 试剂盒为柯萨奇感染性疾病的诊断提供了有效的检测手段。本研究结果显示,在 131 例心肌炎和呼吸道感染病例中, CoxB1-6 病毒 Ag(+) 31 例,阳性率 23.7%,而 47 例非感染患者和正常儿童中, CoxB1-6 病毒 Ag 全部阴性。对 CoxB1-6 病毒 Ag(+) 病例的追踪观察结果表明,其中 48.4% 病例该指标在 2 周内转阴,持续 3 周以上仍阳性的病例占 12.9%。心肌炎与呼吸道感染相比较,前者的 CoxB1-6 病毒 Ag 二周内转阴率明显比后者低,这与疾病的病程规律相符。检测结果说明上海新新医学生物工程公司生产的 CoxB1-6 病毒 Ag 和 IgM 抗体 ELISA 试剂盒质量较好。

经第二军医大学附属长征医院临床结果如下:

### 一、材料和方法

#### 1. 标本

本院儿科住院病人 172 例,其中心肌炎 30 例,上呼吸道感染 29

例，下呼吸道感染 113 例。

## 2. 试剂盒

《柯萨奇 B1-6Ag 和 IgM 抗体 ELISA 试剂盒由上海新新医学生物工程公司生产提供。检测 CoxB1-6 病毒 Ag 为 ELISA 夹心法，检测 CoxB1-6 病毒 IgM 为 ELISA 间接法。按试剂盒说明书严格操作。

## 3. 统计学处理：

组间阳性率显著性比较采用 X<sup>2</sup> 检验。

## 二、结果：

### 1. 心肌炎病例中 CoxB1-6 病毒阳性例数见表 3

表 3

		CoxB1-6 病毒 IgM		
		+	-	合计
CoxB1-6	+	3	7	10
Ag	-	7	13	20
合计		10	20	30

如表 1 所示，在 30 例心肌炎病例中，检测血清 CoxB1-6 病毒 IgM 抗体 (+) 者 10 例，血清 CoxB1-6 病毒 Ag (+) 者也是 10 例，因此，CoxB1-6 病毒抗原和抗体的阳性率各为 33.3%，但 CoxB1-6 病毒 Ag (+) CoxB1-6 病毒 IgM (-) 及 CoxB1-6 病毒 Ag (-) CoxB1-6 病毒 IgM (+) 者各有 7 例，由此，CoxB1-6 病毒抗原或抗体一项以上阳性的病例共 17 例 (56.5%)，这 17 例可确诊为病毒性心肌炎。

呼吸道感染 CoxB1-6 病毒 Ag 和 IgM 的阳性检出率见表 4

表 4 呼吸道感染 CoxB1-6 病毒 Ag 和抗体 IgM 阳性检出率

诊断	例数	CoxB1-6 Ag (+) %	CoxB1-6 IgM (+) %	共同(+) %	%	一项以上(+) %
上呼吸道感染	29	8 27.6	10 34.5	4 13.8	14 48.3	
下呼吸道感染	113	23 20.4	40 35.4	10 8.8	53 46.9	
X <sup>2</sup>		0.7	0.008	0.63	0.017	
P		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	

表 4 中说明，在上、下呼吸道感染中有 48.3%和 46.9%病例伴有 CoxB1-6 病毒感染，且它们各有 27.6%和 20.4%的病例血清中 CoxB1-6 病毒 Ag(+), 但两组的各项阳性率经 X<sup>2</sup> 检验处理，差异均不显著。

## 三、讨论

1. 从表 3 和表 4 可以看出，心肌炎和呼吸道感染中均存在部分 CoxB1-6 病毒 Ag (+) 而 CoxB1-6 病毒 IgM (-) 的病例，因此 CoxB1-6 病毒 Ag 的检测使 CoxB1-6 病毒感染的诊断的正确性更加提供，在 30 例心肌炎病例中，若单检测 CoxB1-6 病毒 IgM 指标，其阳性率为

33.3%，同时再检 CoxB1-6 病毒 Ag 指标，使 CoxB1-6 病毒感染的总阳性率为 56.6%，同样对上下呼吸道感染。CoxB1-6 病毒 IgM (+) 各为 34.5%和 35.4%，而结合 CoxB1-6 病毒 Ag 指标，CoxB1-6 病毒感染的阳性率各为 48.3%和 46.9%。国内尚未见有其它公司生产 CoxB1-6 病毒 Ag 检测试剂盒。因此，上海新新医学生物工程公司研制的 CoxB1-6 病毒 Ag 试剂盒对研究 CoxB1-6 病毒在多种疾病的发病机理有重要意义。

2. 呼吸道感染属急性感染性疾病入院较早，病程较短，但在上下呼吸道感染中各有 34.5%和 35.4%已出现 CoxB1-6 病毒 IgM(+), 但此时同时存在 CoxB1-6 病毒 Ag (+) 只有 13.8%和 8.8%，也即各有 20.7%和 26.6%是处于 CoxB1-6 病毒 IgM(+ )而 CoxB1-6 病毒 Ag(-)，由此可推断在柯萨奇感染中 CoxB1-6 病毒的病毒血症期较短。

3. 80 年代以来，呼吸道合胞病毒已替代腺病毒成为小儿呼吸道感染的首位病毒病原体，其它常见的呼吸道病毒是流感，副流感和鼻病毒等。但近年来研究小儿呼吸道感染的病毒谱已远远超出上述范围，国内已有急性上呼吸道感染合并 CoxB1-6 病毒感染的报导，而对下呼吸道感染与 CoxB1-6 病毒关系的研究较少，在血液中检测到 CoxB1-6 病毒 Ag 或 CoxB1-6 病毒 IgM 均可视为 CoxB1-6 病毒感染，本组 142 例上下呼吸道感染中的阳性率各为 48.3%和 46.9%，提示 CoxB1-6 病毒感染在小儿呼吸道感染中占有重要地位。

经上海华东医院临床结果如下：

1998 年 4 月至 2000 年 3 月期间我们使用上海新新医学生物工程公司的 CoxB1-6 病毒 Ag 和 CoxB1-6 IgM 抗体酶标试剂盒对 852 例门诊和住院病例进行了血清 CoxB1-6 病毒检测，结果见表 5 和表 6。

表 5 CoxB1-6 病毒抗原和抗体检测阳性率

诊断	例数	CoxB1-6Ag(+)	(%)	CoxB1-6IgM(+)	(%)
上感	72	24	33.3	21	29.2
急性支气管炎	48	12	25.0	10	20.8
慢性支气管炎	90	3	3.3	18	20.0
支气管肺炎	35	8	22.8	11	31.4
肝炎	27	1	4.2	5	18.5
冠心病	112	4	3.6	20	17.9
心律失常	75	0	0	8	10.7
高血压	83	1	1.2	7	8.4
糖尿病	47	0	0	2	4.2
脑血管意外	21	0	0	1	4.8
其它疾病	24.2	11	4.5	18	7.4
合计	852	64	7.5	121	14.2

表6 同份血清 CoxB1-6Ag 和 CoxB1-6 IgM 阴阳性分析

诊断	例数	Ag(+)		Ag(-)		IgM(+)		IgM(-)		总阳性数 (%)
		Ag(+)	(%)	Ag(-)	(%)	IgM(+)	(%)	IgM(-)	(%)	
上感	72	15	20.8	9	12.5	6	8.3	30	41.7	
急性支气管炎	48	8	16.7	4	8.3	2	4.2	14	29.2	
慢性支气管炎	90	3	3.3	0	0	15	16.7	18	20.0	
支气管肺炎	35	5	14.3	3	8.5	6	17.1	14	40.0	
肝炎	27	1	3.7	0	0	4	14.8	5	18.5	
冠心病	112	3	2.6	1	0.89	17	15.2	21	18.8	

## 分析和评价:

1. CoxB1-6 病毒 Ag 和 IgM 阳性是 CoxB1-6 病毒现行感染的指标, 表 5 结果说明多种疾病同时伴有 CoxB1-6 病毒感染, 尤其是感染性疾病同时伴发 CoxB1-6 感染的阳性率较高, 非感染性疾病出现 CoxB1-6 感染的阳性率较低。

2. 急性感染性疾病的 CoxB1-6Ag 阳性率与 CoxB1-6 IgM 阳性率接近, 如上感、急性气管炎和急性支气管肺炎。而对病程较长的疾病, CoxB1-6Ag 阳性率明显低于 CoxB1-6IgM 阳性率。

3. 在急性感染性疾病中, 由于发病较早, 病程较短, 故有部分病例出现 CoxB1-6 Ag(+) 而 CoxB1-6 IgM(-), 如上感、急性支气管炎和支气管肺炎, 这种情况的阳性率分别为 12.5%、8.3%和 8.5%, 使 CoxB1-6 病毒的总阳性率高于 CoxB1-6Ag 及 CoxB1-6 IgM 单项阳性率, 而对病程较长的疾病, CoxB1-6 Ag(+) 而 CoxB1-6 IgM(-) 的阳性率几乎接近于 0; 也即入院检测时, CoxB1-6 病毒已经消失, 使 CoxB1-6 病毒的总阳性率不明显高于 CoxB1-6 IgM 单项阳性率, 由此提示, CoxB1-6 Ag 的检测对急性感染性疾病的诊断较重要, 而对慢性疾病意义不大。

4. 国内尚未见, 其它公司有 CoxB1-6 Ag 检测试剂盒, 而上海新新公司生产的该试剂盒, 在急性感染性疾病中阳性率较高, 而在慢性感染性疾病以及非感染性疾病中的阳性率很低, 表 5 中有 3 种疾病计 143 例阳性率为 0, 这说明该试剂盒的特异性较好, 对 CoxB 病毒感染的诊断有很高的价值。

本申请的柯萨奇病毒 B1-6 抗原 ELISA 试剂盒。其检测方法简便快速, 收费低廉, 灵敏度和特异性均较高, 可以直接检测出 CoxB1-6 型病毒, 它是柯萨奇病毒 B 感染疾病早早期诊断的鉴别诊断的可靠病原学指标, 对于越早明确病原治疗效果越好的 CoxB 病毒感染, 临床应用价值较 CoxB-IgM 和 CoxB-IgG 试剂盒更高, 有明显的社会和经济效益。

## 实施例

检测 CoxB1-6 混合型抗原试剂盒的制备。

### 一、主要原材料

1. HeLa细胞	中科院细胞所
2. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	上海新华化工厂
3. NaCl	上海试剂一厂
4. KCl	江苏常熟化工厂
5. CaCl <sub>2</sub>	江苏常熟化工厂
6. 葡萄糖	成都化学试剂厂
7. EDTA	上海试剂一厂
8. 水解乳蛋白	上海试剂二厂
9. 谷氨酸	上海试剂二厂
10. 谷氨酰胺	上海化学试剂分装厂
11. L赖氨酸	上海生化所
12. L精氨酸 L组氨酸 L蛋氨酸	上海试剂二厂
13. 小牛血清	杭州四季青生物材料工程公司
14. 胰蛋白酶	美国Sigma公司
15. 氯化铯	美国Sigma公司
16. 辣根过氧化物酶	美国Sigma公司
17. TMB	上海东风试剂厂
18. 高碘酸钠	上海化学试剂分装厂
19. 硼氢化钾	上海试剂一厂
20. 酶标板	华东理工大学新分离技术研究室

### 二、CoxB1-6包被病毒抗体的制备

#### (一) CoxB1-6病毒抗原的制备

1. CoxB病毒1-6型毒种来源：昆明生物所
2. HeLa 细胞来源：中科院细胞所
3. 细胞传代：

#### ① 培养剂配制：

PRMI1640基础培养剂过滤除菌, 200ml基础培养剂中含：

牛血清	10%
青霉素	4万单位
链霉素	4万单位
6%NaHCO <sub>3</sub>	4ml
3%谷氨酰胺	6ml

#### ② 胰酶(DT)配制：

用无Ca、Mg离子溶液配制0.3%胰酶消化液, 用分散、消化细胞。

#### ③ 细胞传代：

将成片的细胞倾去培养液,加入DT进行细胞消化,观察细胞已呈疏松网状,即倒去DT,加入营养液后,分瓶培养3-5天。

#### 4. 病毒的感染、培养、收毒和鉴定:

- ① 将形态完整、成片的单层细胞倾去培养液后,用不含牛血清的洗液洗一次。
- ② 细胞感染病毒后,在37℃吸附1小时。
- ③ 补充培养液,在37℃培养。
- ④ 逐日观察细胞,至所有细胞产生细胞病变后,用无菌方法收获病毒。
- ⑤ 微量平底板进行病毒浓度的滴定和病毒鉴定;

##### 病毒滴定:

用10倍的倍比稀释方法进行病毒的稀释,病毒加入微量板中,每孔加50 μl病毒,每个稀释度加4孔,然后加入细胞50 μl,设细胞对照,按Reed-Muench方法计算病毒的TCID<sub>50</sub>,本法培养病毒效价为TCID<sub>50</sub>>10<sup>-5</sup>。

##### 病毒的鉴定:

- A. 应用免疫电镜法;
- B. 应用中和试验方法(微量滴定法)

病毒取 100TCID<sub>50</sub>,加入含抗血清的孔内,25μl/孔,抗血清作1:4-1:1024连续4倍稀释,25 μl/孔,每个稀释度4孔,将板加盖,37℃中培育2小时。然后每孔内加Hela细胞50 μl,同时设病毒阴性、阳性对照,逐日观察细胞病变。是同型的病毒,能被抗血清中和、而不出现CPE;

#### (二) 抗原的制备、浓缩和纯化:

1. 病毒灭活;
2. 去除病毒碎片:用冷冻离心的方法去除细胞碎片;
3. 初步浓缩、提纯:用PEG方法进行提纯;
4. 病毒的进一步纯化:用葡聚糖过柱、洗脱的方法,然后在A280的分光光度计进行蛋白含量的测定;

#### (三) CoxB病毒1-6型混合单克隆(MC)抗体的制备:

1. CoxB病毒1-6型混合后,免疫Balb/c小鼠;
2. SP2/0骨髓瘤细胞培养,准备;
3. 细胞融合(瘤细胞与Balb/C小鼠融合)筛选,克隆得MC-IgG;
4. 单克隆鼠抗CoxB病毒1-6型混合抗体IgG鉴定,滴定>10<sup>6</sup>,特异性符合要求。

#### 三、兔抗CoxB病毒1-6型混合抗体IgG制备

- ① 1mg/ml CoxB1-6混合抗原加等量福氏完全佐剂研钵中研磨乳化。
- ② 每只兔颈背部多点注射3mg抗原,2周一1个月1次,共5-8次,

双扩效价达 1:64 以上时采集血清。

③ 辛酸法纯化 CoxB1-6 混合抗原抗血清 IgG 部份, 蛋白定量。

四、兔抗CoxB病毒1-6型混合抗体IgG酶标记物的制备。

1. 称5mg辣根过氧化物酶加0.5ml蒸馏水, 再加0.5ml 60mM 过碘酸钠液氧化15' 4°C中。
2. 加0.16M乙二醇0.5ml中止氧化, 4°C30'。
3. 加10mg/ml 兔抗CoxB病毒1-6型混合抗体IgG 0.5ml, 装袋对碳酸钠缓冲液透析过夜。
4. 加5mg/ml硼氢化钾0.2ml, 4°C3h再装透析袋对PH7.2 0.01M PBS 透析24h, 换液4-5次。
5. 取出兔抗CoxB病毒1-6型混合抗体IgG -HRP作工作浓度测定, 配成1mg/ml浓度时的工作效价为1:2000。

五、阴, 阳性对照血清配制。

从病毒攻击的细胞保护试验筛选阴性和阳性对照血清, 并将阴阳性血清定值。

六、显色剂配制

A液:

1. 各称磷酸氢二钠18.4克, 柠檬酸5克, PM50mg放入容量瓶中, 加双蒸水至1000ml, 搅拌溶解后再加30%双氧水400ul。
2. 过滤除菌后分装小瓶。

B液:

1. 称EDTA150mg加入1000ml双蒸水中, 加热溶解。
2. 上液冷却后加柠檬酸1.05克, 再加用二甲亚砷溶解的TMB250mg。
3. 分装入黑色小瓶中备用。

七、CoxB1-6 混合抗原检测方法的建立

1. CoxB1-6 病毒混合 McAb 包被用 20mM Tris-Hcl 液稀释 CoxB1-6 病毒混合 Mc IgG 为 1:1000 浓度, 各反应微孔中加 0.1 置 4°C 中 24h, 弃去上清液, 拍干;
2. 取出已包被条孔, 插入支架上, 用胶布固定, 以防脱落;
3. 各孔中分别加待检血清 50  $\mu$  l, 同时做阳性对照 1 孔, 阴性对照 1 孔 (各加 50  $\mu$  l), 空白对照 1 孔 (孔含蒸馏水 100  $\mu$  l); 除空白对照孔外每孔滴加酶标记液 1 滴 (50  $\mu$  l), 置 37°C 中反应 1 小时。
4. 取出反应板甩去孔内液体先在草纸上拍 2-3 下, 然后用洗涤液洗 5 次, 每次加满后停留 30 分钟, 每次甩去洗涤液后都要在草纸上拍干, 以便洗涤彻底 (10 倍浓洗涤液 1ml+9ml 蒸馏水即为工作浓度)。
5. 各孔滴加显色剂 A、B 各 1 滴, 置 37°C 中反应 10-15 分钟再每孔

滴加终止液 1 滴，置酶标仪中 450nm 波长读数；

6. 结果判定：阴性对照 A 值  $\times 2.5$  = 临界值，凡待检标本孔 A 值大于临界值即为阳性。阴性对照小于 0.08 按 0.08 计算；

#### 八、灵敏度、特异性精密度试验和稳定性试验

##### 1. 灵敏度测定

将细胞中和实验中滴定为效价 64u/0.1ml (640u/ml)，16u/0.1ml (160u/ml) 及 2u/0.1ml (20u/ml) 的 3 份阳性血清用样品稀释液作不同浓度的稀释后，按实验操作方法作灵敏度测定，结果如下：

方法灵敏度测定：

检测	抗体效价 (u/ml)										
血清	640	320	160	80	40	30	20	15	10	5	2.5
阳性血清 1	>2*	>2	1.91	1.53	1.06	0.63	0.41	0.27	0.15	0.11	0.08
阳性血清 2			>2	1.88	1.72	1.13	0.93	0.64	0.41	0.24	0.13
阳性血清 3						0.63	0.44	0.29	0.16	0.09	0.07

\* 450 值

阴性血清测定值：

1	2	3	4	5	6
0.09	0.08	0.10	0.07	0.09	0.11

A 阴性平均值为 0.09，阳性临界值 =  $0.09 \times 2.5 = 0.225$

则本检测方法对 3 份阳性血清的检测灵敏度分别为 15u/ml，5u/ml 和 15u/ml，平均为 11.7u/ml

##### 2. 特异性测定：

将细胞中和实验中判为阴性的血清 20 份按实验操作方法测定，结果如下：

待检血清测定值：

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.07	0.13	0.08	0.07	0.12	0.11	0.14	0.06	0.05	0.11
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0.04	0.09	0.10	0.08	0.07	0.05	0.07	0.12	0.11	0.09

用 6 份小牛血清液按实验操作方法测定的 A 值分别为：

0.10	0.11	0.09	0.10	0.04	0.07
------	------	------	------	------	------

平均值为 0.085 阳性临界值 =  $0.085 \times 2.5 = 0.213$

则上面 20 份细胞中和实验阴性血清用本 ELISA 法测定也全部阴性，特异性 100%。

##### 3. 精密度测定

取实验吸光度分别为高中低 A 值的 3 份阳性血清做精密度试验，批内试验为每份血清同时做 10 个复孔，批间试验为每份血清间隔 2-3 天，实验 1 次，共测定 6 次，结果如下：

## 批内试验:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	S	CV(%)
1	1.27	1.30	1.25	1.24	1.31	1.25	1.23	1.32	1.26	1.33	1.276	0.036	2.8
2	0.76	0.65	0.66	0.68	0.71	0.73	0.70	0.69	0.74	0.77	0.709	0.041	5.7
3	0.36	0.38	0.36	0.37	0.37	0.41	0.35	0.40	0.37	0.34	0.371	0.021	5.7

平均批间 CV=4.73%

## 批间试验:

	1	2	3	4	5	6	X	S	CV(%)
1	1.29	1.40	1.10	1.30	1.32	1.15	1.26	1.113	8.9
2	0.77	0.62	0.65	0.81	0.73	0.61	0.715	0.071	10
3	0.35	0.40	0.37	0.34	0.33	0.40	0.365	0.030	8.3

平均批间 CV=9.1%

4. CoxB1-6 混合型抗原三批试剂盒置 37℃温箱中保存的稳定性试验。

## 第980519批试剂盒

A450	0天	一天	二天	三天	四天	五天	六天	七天
药盒阴性对照	0.071	0.068	0.066	0.063	0.060	0.059	0.051	0.048
药盒阳性对照	0.803	0.808	0.801	0.789	0.785	0.768	0.761	0.761

## 第980603批试剂盒

A450	0天	一天	二天	三天	四天	五天	六天	七天
药盒阴性对照	0.078	0.070	0.071	0.065	0.063	0.058	0.055	0.054
药盒阳性对照	0.852	0.847	0.838	0.830	0.823	0.814	0.801	0.789

## 第980615批试剂盒

A450	0天	一天	二天	三天	四天	五天	六天	七天
药盒阴性对照	0.075	0.074	0.070	0.068	0.065	0.066	0.063	0.064
药盒阳性对照	1.126	1.130	1.128	1.101	0.987	0.975	0.971	0.965

CoxB 病毒 1-6 型混合抗原试剂盒的灵敏度高、特异性好、精密度高和稳定性好。

专利名称(译)	柯萨奇病毒B抗原酶免试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1382989A</a>	公开(公告)日	2002-12-04
申请号	CN01112707.4	申请日	2001-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
当前申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
[标]发明人	杜凤鸣		
发明人	杜凤鸣		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/569 G01N33/577		
代理人(译)	王巍		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种柯萨奇病毒B1 - 6混合型抗原试剂盒。该试剂盒用CoxB病毒B1 - 6混合型单克隆抗体包被,免抗CoxB1 - 6病毒抗体IgG连接辣根过氧化物酶为检测抗体,检测血清中的CoxB病毒B1 - 6混合型抗原。本发明的试剂盒灵敏度和特异性高。本发明提供了制备方法。

表 4 两组 COXD 血清学检测结果

诊断	例数	<2W 消失		2-3W 消失		>3W 仍存	
		n	%	n	%	n	%
呼吸道感染	19	12	2	6	31.6	1	5
心肌炎	12	3	25.0	6	50.0	3	25

从表中可以看出,上组在 2 周内消失的病例占 26.3%, 3 周内消失的病例占 31.6%, 3 周后仍存的病例占 42.1%。