

ICS 11.020
CCS C 61

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 792—2021

日本血吸虫抗体检测标准 酶联免疫吸附
试验法

Detection standard of antibody against *Schistosoma japonicum*—Enzyme-linked
immunosorbent assay

2021—11—23 发布

2022—05—01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准由国家卫生健康标准委员会寄生虫病标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由中国疾病预防控制中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委疾病预防控制局负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：杭州医学院（浙江省医学科学院）、中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、安徽省血吸虫病防治研究所、宁波市疾病预防控制中心、江西省寄生虫病防治研究所。

本标准主要起草人：闻礼永、严晓岚、熊彦红、郑彬、张剑锋、汪天平、俞丽玲、许国章、林丹丹、周晓农。

日本血吸虫抗体检测标准 酶联免疫吸附试验法

1 范围

本标准规定了检测日本血吸虫抗体的酶联免疫吸附试验方法。
本标准适用于各级疾病预防控制机构和医疗机构对人体血清中日本血吸虫抗体的检测。

2 规范性引用文件

本标准没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

酶联免疫吸附试验 enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA

利用抗原抗体之间专一性键结之特性，对检体进行检测；由于结合于固体承载物上之抗原或抗体仍可具有免疫活性，因此设计其键结机制后，配合酵素呈色反应，即可显示特定抗原或抗体是否存在，并可利用呈色之深浅进行定量分析的试验。

3.2

可溶性虫卵抗原 soluble egg antigen

血吸虫虫卵经匀浆和超声破碎等处理后离心收集的上清液，含蛋白质、糖蛋白、多糖等多种成分复合物。

3.3

金黄色葡萄球菌蛋白A staphylococcal protein A

从金黄色葡萄球菌细胞壁分离的蛋白质，能与人及多种哺乳动物血清中IgG分子的Fc片段结合，作为第二抗体。

4 仪器设备

4.1 台式低速离心机

最高转速大于或等于2 500 r/min，或最大相对离心力大于或等于800 g。

4.2 酶标专用比色计

带有450 nm、492 nm和630 nm滤光片，分辨率0.001光密度（optical density, OD）值。

4.3 恒温水浴箱

控温范围 5℃~99.9℃，温度分辨率/波动度0.1℃/±0.5℃。

4.4 微量移液器

量程范围1 μL~10 μL，增量0.1 μL；量程范围10 μL~100 μL，增量1 μL；量程范围100 μL~1 000 μL，增量5 μL。

5 试剂或材料

5.1 酶标反应板

96孔或40孔微量聚苯乙烯或聚氯乙烯塑料凹孔反应板。

5.2 包被抗原

可溶性虫卵抗原，制备方法见附录A中A.1。

5.3 包被缓冲液

0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液，制备方法见附录A.2。

5.4 样品洗涤液

含0.05% 吐温-20 的 0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液（PBS-T），制备方法见附录A.3。

5.5 封闭液

2% 牛血清白蛋白（BSA），制备方法见附录A.4。

5.6 阳性对照血清

感染日本血吸虫的兔混合血清，制备方法见附录A.5。

5.7 阴性对照血清

健康兔混合血清，制备方法见附录A.6。

5.8 样品稀释液

含0.1% BSA的PBS-T，制备方法见附录A.7。

5.9 酶标记物

金黄色葡萄球菌蛋白A标记辣根过氧化物酶，制备方法见附录A.8。

5.10 底物缓冲液

pH 5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液，制备方法见附录A.9。

5.11 底物使用液

3,3', 5,5' -四甲基联苯胺（TMB）或邻苯二胺（OPD），制备方法见附录A.10。

5.12 终止液

2 mol/L 硫酸，制备方法见附录A.11。

6 检测步骤 示意图和注意事项见附录 B。

6.1 样本准备

采集末梢血100 μL 或静脉血2 mL，室温下放置至血块收缩后，800 g 离心5 min，分离出血清进行检测。

6.2 样本检测

6.2.1 抗原包被

于酶标反应板凹孔中，加入 100 μL 以包被缓冲液 1:1000~1:3000 稀释的可溶性虫卵抗原，置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。次日，倾去抗原，用样品洗涤液洗涤 3 次，每次 3 min~5 min，甩干。为减少非特异性反应，小孔中可再加 100 μL 封闭液过夜，甩干。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

6.2.2 加受检和对照血清

用样品稀释液 1:100 比例稀释受检者、阴性对照和阳性对照血清，各取 100 μL 稀释血清加入酶标反应板的小孔中，每板同时设置两孔阴性对照血清、一孔阳性对照血清和一孔样品稀释液空白对照，置恒温水浴箱内 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。如 6.2.1 洗涤甩干。

6.2.3 加酶标记物

用样品缓冲液 1:1 000~1:4 000 比例稀释酶标记物，取 100 μL 加入酶标反应板的小孔中，置恒温水浴箱内 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。如 6.2.1 洗涤甩干。

6.2.4 加底物

每孔加入新配置的底物使用液 100 μL ，置恒温水浴箱内 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。

6.2.5 终止反应

每孔加入 50 μL 终止液终止反应。

6.2.6 结果判定

以空白对照调零，读取酶标专用比色计上各孔 450 nm（TMB 为底物）或 492 nm（OPD 为底物）波长的 OD 值，以 630 nm 作为参比波长。

以受检样本孔 OD 值/阴性对照孔 OD 值（P/N） ≥ 2.1 倍判为阳性。当阴性对照 OD 值低于 0.05 时，按 0.05 计算。

附 录 A
(资料性)
主要试剂材料制备方法

A.1 包被抗原

取冻干虫卵, 0.01%硫柳汞生理盐水配制悬液, 组织匀浆器研磨并置 - 20 °C 反复冻融3次, 10 000 g 离心30 min, 取上清液。测定蛋白含量后, 用硫柳汞生理盐水稀释至0.75 mg/mL, 分装后置 - 20 °C 保存备用。

A.2 包被缓冲液

称取碳酸钠 (Na_2CO_3) 1.59 g, 碳酸氢钠 (NaHCO_3) 2.93 g, 加去离子水 (或蒸馏水) 至1 000 mL, 即为 0.05 mol/L pH 9.6碳酸盐缓冲液, 密封盖好, 4 °C 保存备用, 有效期2周。

A.3 样品洗涤液 (PBS-T)

称取磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.2 g, 十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.9 g, 氯化钠 (NaCl) 8.0 g, 氯化钾 (KCl) 0.2 g, 加去离子水 (或蒸馏水) 至1 000 mL, 即为0.15 mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液 (PBS), 再加0.5 mL 吐温-20, 即配成含0.05% 吐温-20的洗涤缓冲液 (PBS-T), 4 °C 保存备用。

A.4 封闭液

称取2 g BSA, 加入PBS-T缓冲液100 mL, 即为2%牛血清白蛋白, 4 °C 保存备用。

A.5 阳性对照血清

选择体重2.5 kg~3.0 kg的健康家兔, 每只感染800条~1 000条日本血吸虫尾蚴, 饲养60 d后, 抽取心脏全血, 分离血清, 混合后按每支0.1 mL分装于微量离心管冻干, 作为阳性对照血清。阳性对照血清检测效价不低于1: 640。

A.6 阴性对照血清

选择体重2.5 kg~3.0 kg的健康家兔, 抽取心脏全血, 分离血清, 选出没有溶血的血清灭活补体 (56 °C 灭活30 min), 混合后按每支0.1 mL分装微量离心管冻干, 作为阴性对照血清。阴性对照血清检测效价不高于1: 5。

A.7 样品稀释液

称取0.1 g BSA, 加入PBS-T缓冲液至100 mL, 4 °C 保存备用。

A.8 酶标记物

常用过碘酸钠法标记。称取5 mg辣根过氧化物酶(HRP)溶于0.5 mL蒸馏水中,加入新鲜配制的0.06 mol/L过碘酸钠(NaIO_4)水溶液0.5 mL,混匀置4 °C 30 min,取出加入0.16 mol/L 乙二醇水溶液0.5 mL,室温放置30 min后,加入含5 mg纯化抗体的水溶液1 mL,混匀并装透析袋,在0.05 mol/L pH 9.5碳酸缓冲液缓慢搅拌透析6 h或过夜,然后加5 mg/mL 硼氢化钠(NaBH_4)溶液0.2 mL,置4 °C 2 h。将上述结合物混合液加入等体积饱和硫酸铵,4 °C 30 min后离心,将所得沉淀物溶于少许0.02 mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲液中,并透析过夜,次日离心除去不溶物,即得酶-抗体结合物,用磷酸盐缓冲液加至5 mL进行测定后冷冻干燥保存。

A.9 底物缓冲液

称取磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 28.4 g,加去离子水(或蒸馏水)至1 000 mL,为A液;称取柠檬酸19.2 g,加去离子水(或蒸馏水)至1 000 mL,为B液。取A液25.7 mL,B液24.3 mL混合,并加去离子水(或蒸馏水) 50 mL,即为 pH 5.0磷酸-柠檬酸缓冲液。现配现用。

A.10 底物使用液

A.10.1 TMB使用液

称取100 mg TMB溶解在10 mL二甲基亚砜(DMSO)或无水乙醇中,配成1% TMB溶液,4 °C保存6个月以内使用。用底物缓冲液9.9 mL加入0.1 mL 1% TMB保存液,使用前,按每1 mL TMB溶液加入30%过氧化氢(H_2O_2) 1 μL ,混匀后立即使用。

A.10.2 OPD使用液

称取4 mg OPD溶解在10 mL底物缓冲液中,再加30% H_2O_2 15 μL ,避光保存。使用前现配现用。

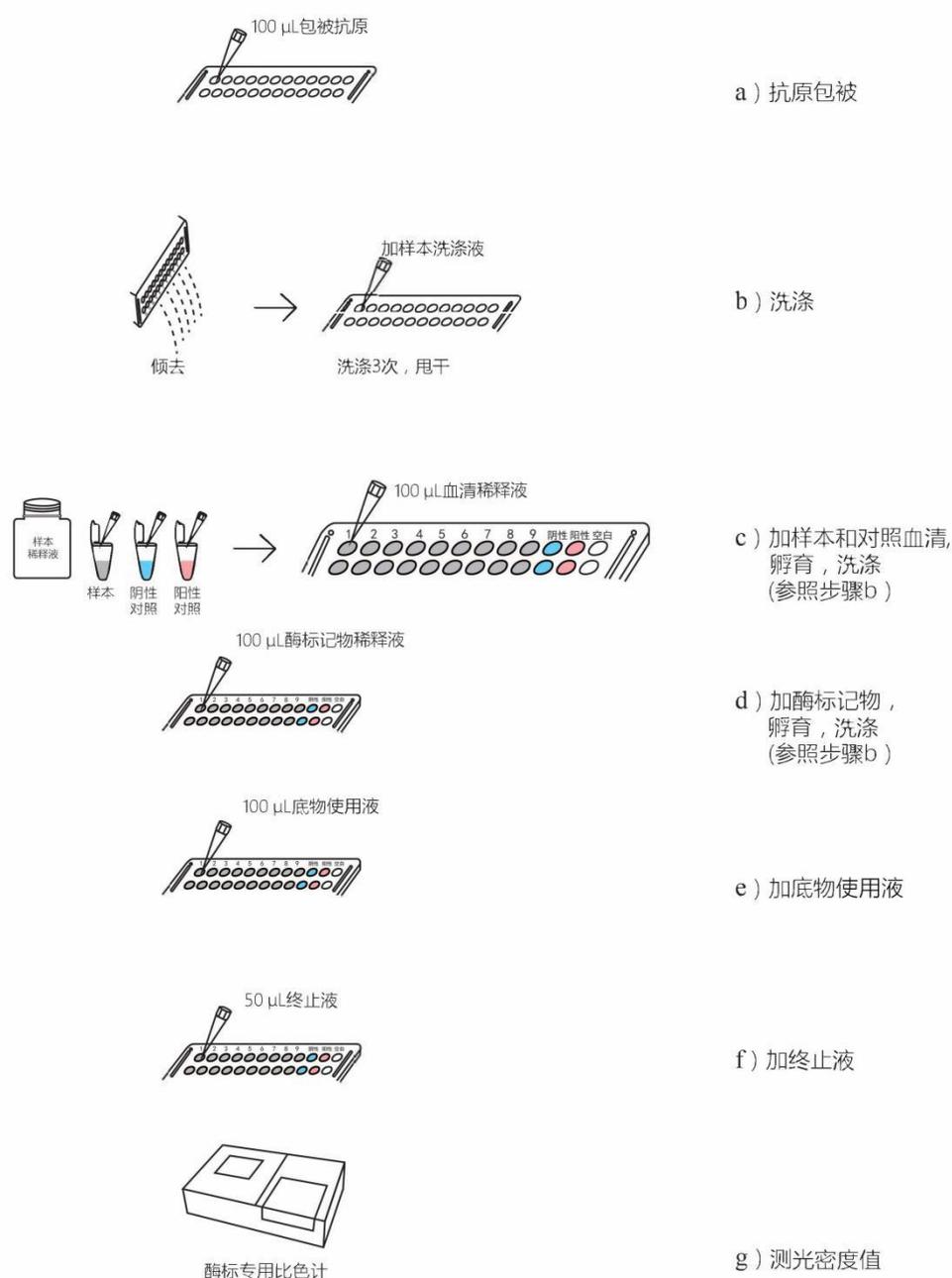
A.11 终止液

蒸馏水178.3 mL,逐滴加入98%浓硫酸21.7 mL,即为2 mol/L终止液。

附录 B
(资料性)
检测步骤和注意事项

B.1 检测步骤

检测步骤示意图见图B.1。



图B.1 检测步骤示意图

B.2 注意事项

B.2.1 样本采集与保存：末梢血一般采用聚乙烯塑料管采集，塑料管孔径2 mm，长度10 cm。静脉血一般采用一次性真空采血管采集。全血采集后应在4 h内进行血清分离。血清样本不能混有红细胞或被细菌污染，血清量应不少于10 μ L。血清样本若不能及时检测，可在2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存3 d~5 d，长时间保存应置于-20 $^{\circ}$ C以下冷冻保存。

B.2.2 试剂准备：检测试剂如果从冰箱取出，应放在室温条件下平衡30 min以上再行使用。

B.2.3 加样：使用移液器加样，每检测一个样本应更换吸头，加样时应将液体加在孔底，避免产生气泡，从而影响吸液量的准确性；加底物和终止液时也要去除孔内气泡，避免影响样本OD值。

B.2.4 洗涤：每次洗涤时一定要彻底洗净甩干，否则影响结果。

B.2.5 加样后的酶标反应板应封板（加盖玻璃板或一次性封口膜，或放置密闭湿盒内）后，方可置37 $^{\circ}$ C恒温水浴箱湿育。

B.2.6 加底物前，酶标反应板经洗涤甩干后，不宜在空气中暴露过久，应速加底物，以免影响酶的活力而影响结果。底物溶液需放置在棕色瓶（或其它避光瓶）内，溶液应清晰无色，反应需在暗处进行。底物OPD有一定毒性，应避免污染。

B.2.7 结果判定：应在10 min内完成结果测量，测定OD值时应注意擦干反应板底部的小水珠，以免影响结果测量。

B.2.8 实验室应设置独立的工作区域，包括样品处理区与ELISA检测区，以防止交叉污染。

参 考 文 献

- [1] WS 261—2006 血吸虫病诊断标准.
- [2] 吴观陵.人体寄生虫学（第4版）[M].北京：人民卫生出版社，2013.
- [3] 闻礼永.血吸虫病监测手册[M].北京：人民卫生出版社，2014.
- [4] 周晓农.血吸虫病消除手册[M].上海：上海科学技术出版社，2021.
- [5] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G[J]. Immunochemistry, 1971, 8(9):871-874.
- [6] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. 上海免疫学杂志, 1983, 3(2): 97-100.
-