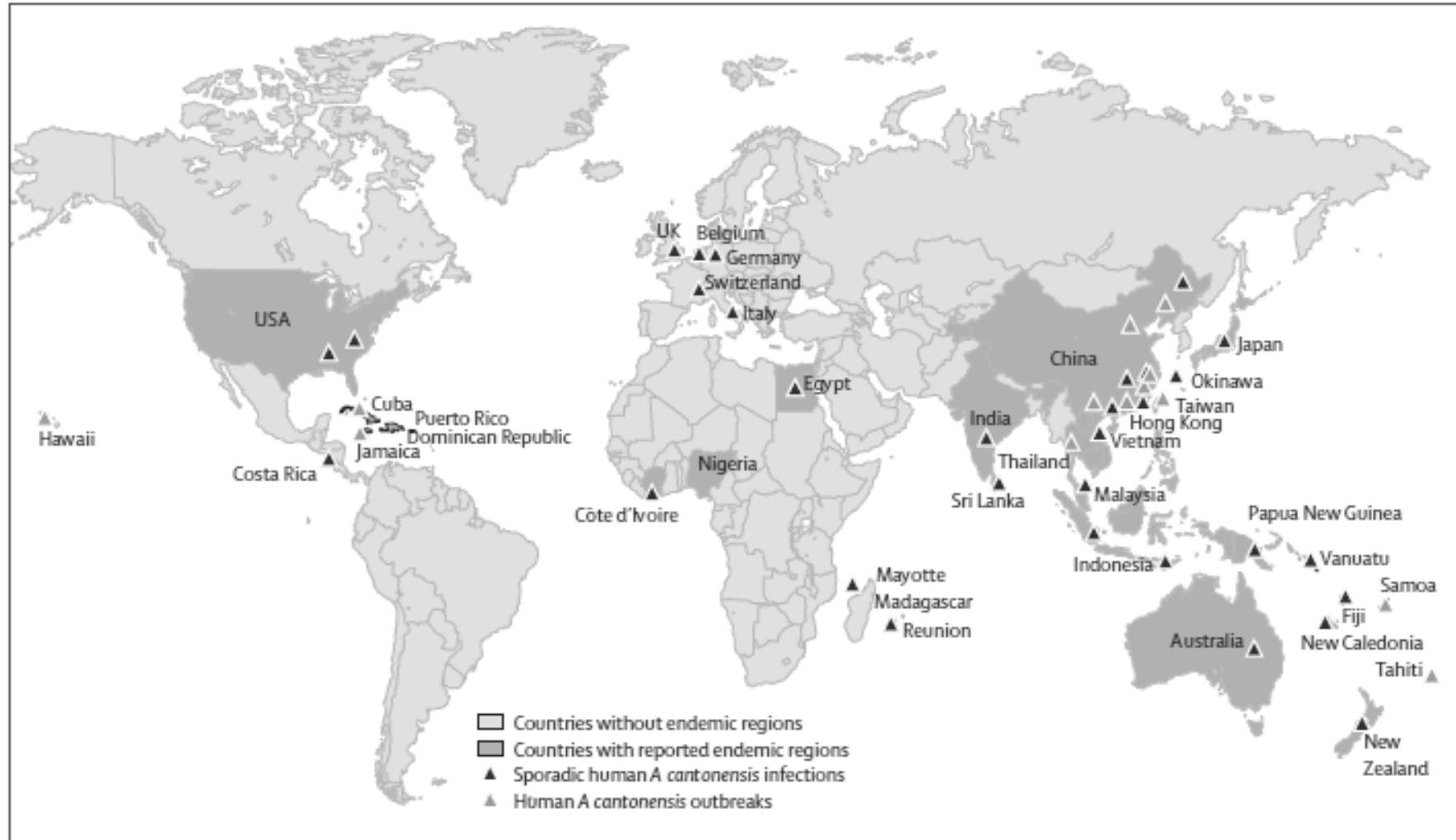


# 广州管圆线虫疫源地溯源及其 诊断循环抗原试剂盒的研发

深圳市CDC: 张仁利 MD, Ph. D

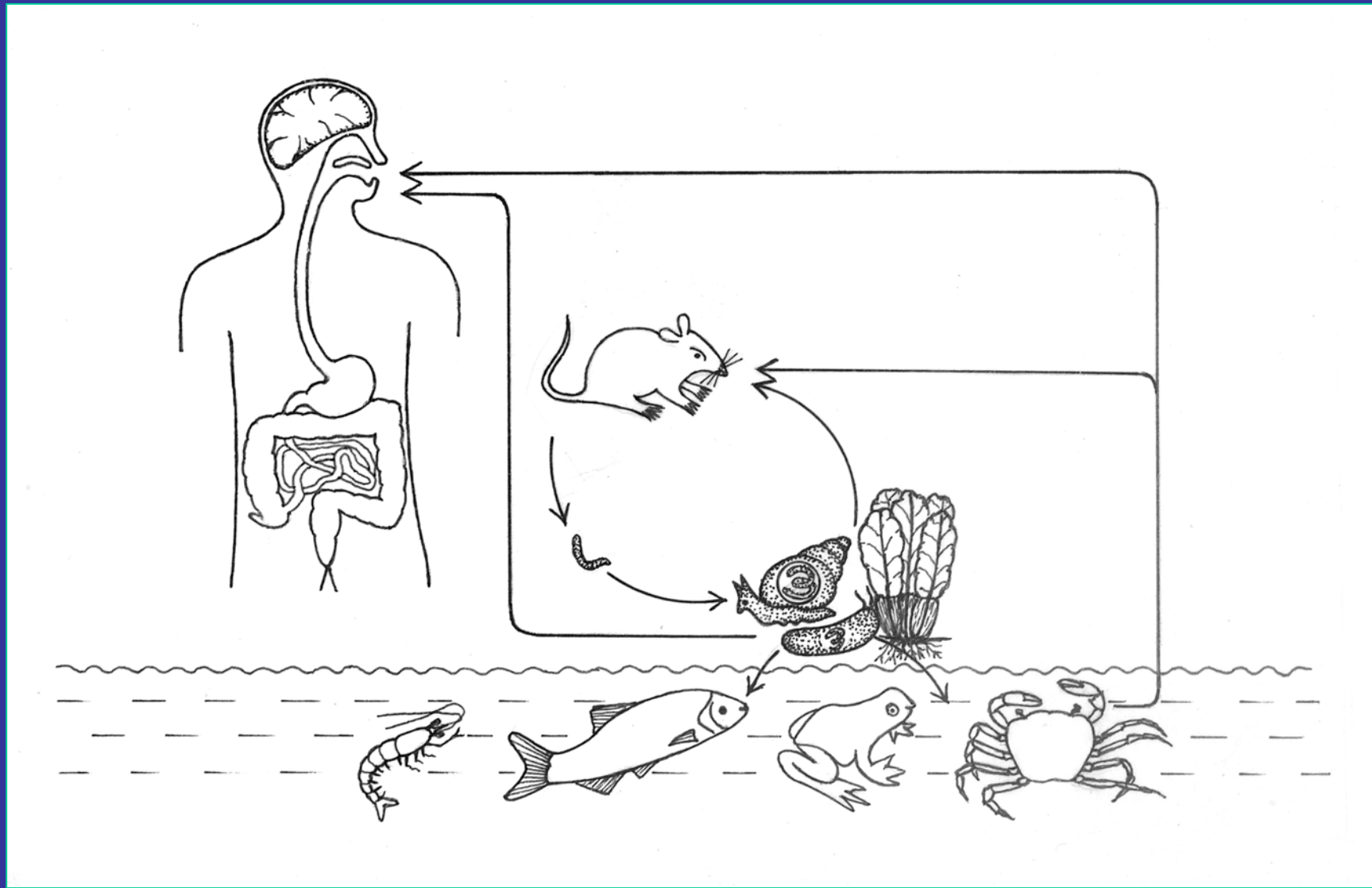


# 广州管圆线虫全球分布情况



# 广州管圆线虫在中国的分布情况





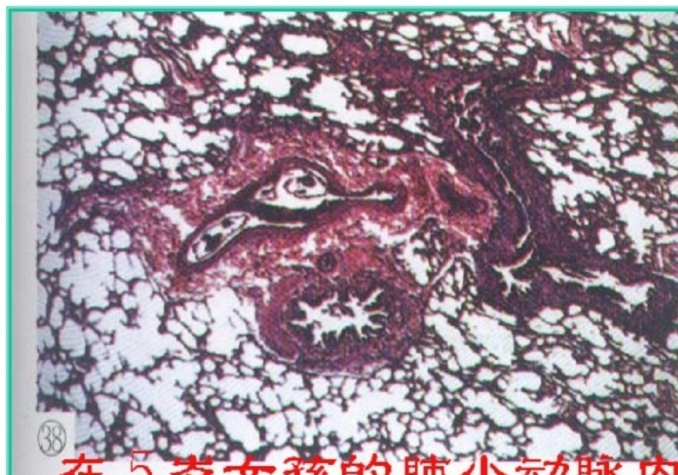
广州管圆线虫生活史

## 一、背景：

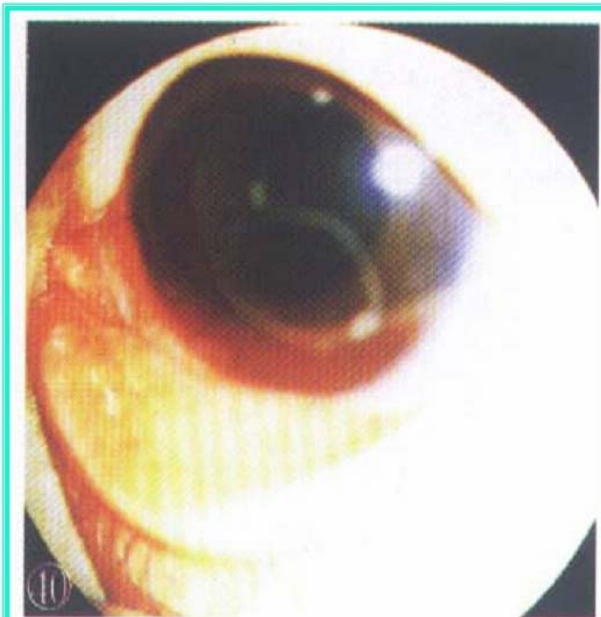
- 1、2006年北京爆发219人群体感染广州管圆线虫，深圳市也不断出现散发临床诊断病例；
- 2、为新发人畜共患自然疫源性疾痼，也是我国感染率急剧上升的主要食源性疾痼之一；
- 3、人体感染后幼虫移行脑部，成虫寄生在肺部引起嗜酸粒细胞增多 性脑膜脑炎等一系列的病理变化；
- 4、由于此虫寄生部位的特异性，导致病原学诊断困难，目前实验室尚无有效诊断试剂。



在 5 岁女孩的蛛网膜下腔找到广州管圆线虫



在 5 岁女孩的肺小动脉内  
发现广州管圆线虫



广州管圆线虫寄生在人眼前房内

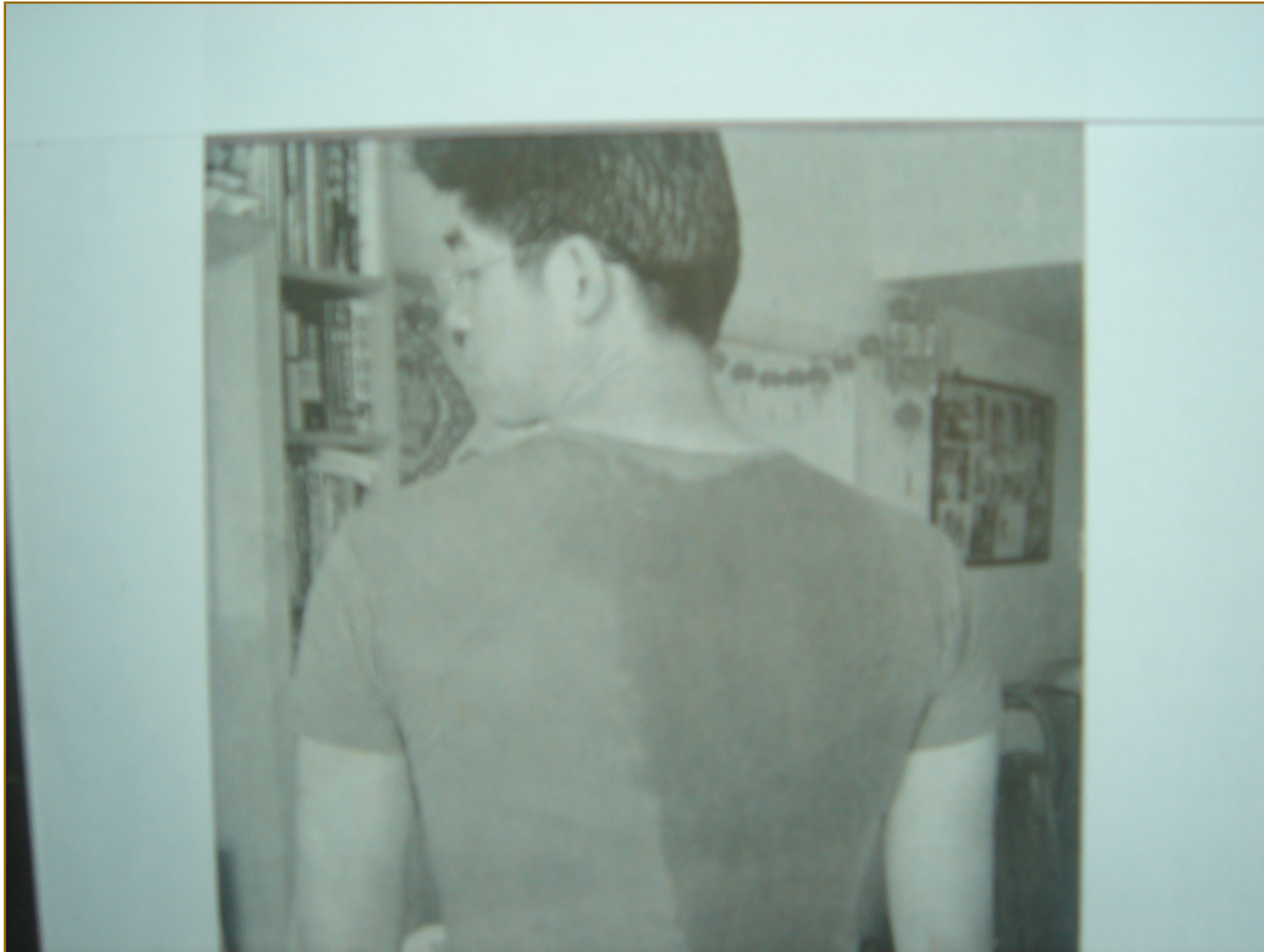


广州管圆线虫感染  
引起患者斜视



深圳市**CDC**对北京大学深圳医院病例进行个案调查

## 广州管圆线虫病治疗后仍然有植物神经功能紊乱



## 二、研究要解决的主要问题

- 1、探明深圳市是否存在广州管圆线虫自然疫源地，解释深圳人群散发感染的原因；
- 2、应用杂交瘤与单克隆抗体技术，制备诊断循环抗原的单克隆抗体；用于诊断现症感染和考核疗效
- 3、将诊断循环抗原的单抗发展为现场快速诊断、便于推广应用的诊断试剂盒。

## 研究内容一：深圳广州管圆线虫疫源地调查

### 1、中间宿主调查：

#### 深圳市广州管圆线虫中间宿主种群 分布



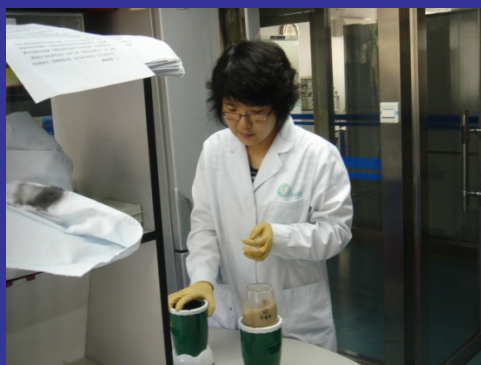
发现主要中间宿主：褐云玛瑙螺，福寿螺

## 广州管圆线虫中间宿主在深圳分布及栖息环境





## 中间宿主实验室检测



中间宿主的感染情况

## 2、不同贝类宿主感染广州管圆线虫 幼虫情况

| 食用螺种类   | 福寿螺  | 褐云玛瑙螺 | 石螺 | 山坑螺 |
|---------|------|-------|----|-----|
| 受检样本数   | 386  | 254   | 22 | 72  |
| 检出样本数   | 125  | 101   | 0  | 0   |
| 感染率 (%) | 32.3 | 39.7  | 0  | 0   |

## 2、终末宿主种群与感染情况调查



发现深圳市广州管圆主要终末宿主为：褐家鼠，黄胸鼠

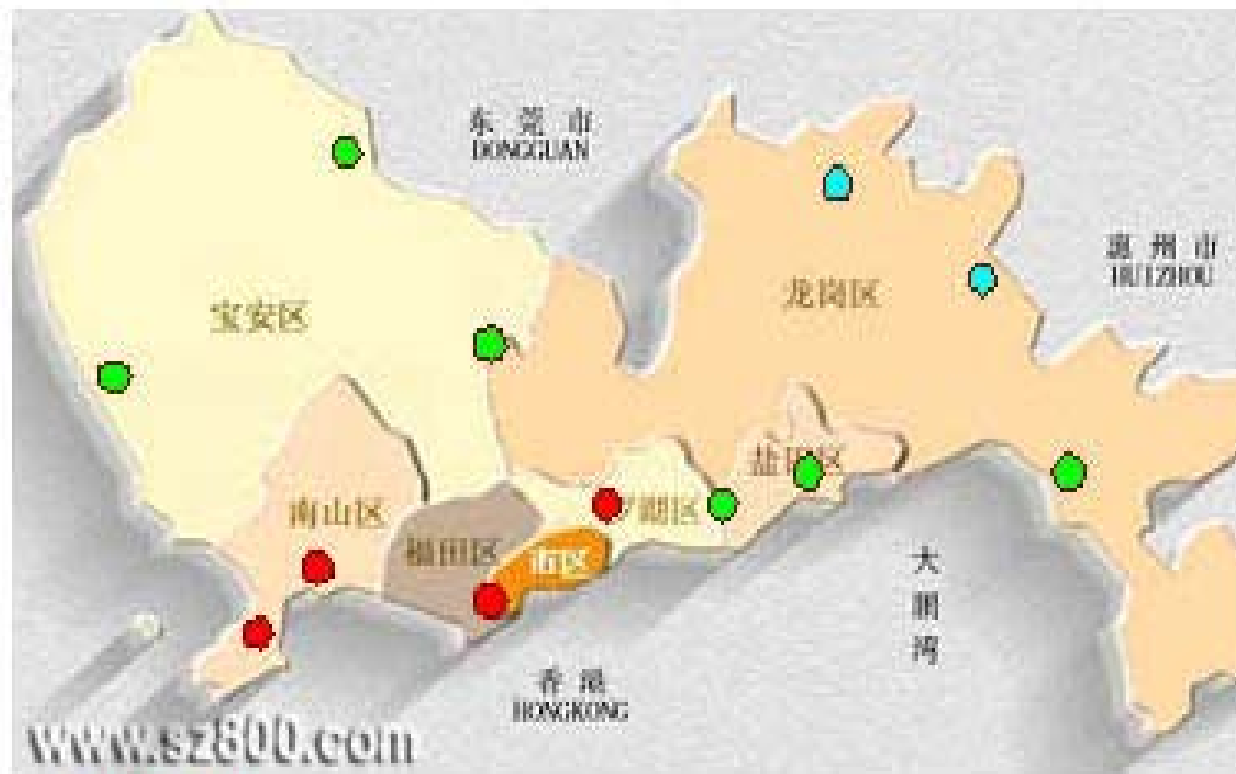
## 鼠感染广州管圆线虫成虫情况

| 鼠类  | 感染率             | 雄鼠感染率          | 雌鼠感染率          |
|-----|-----------------|----------------|----------------|
| 褐家鼠 | 12.69%(16/126)* | 8.3%(6/72)     | 18.5%(10/54)   |
| 黄胸鼠 | 6.38% (6/94)    | 3.77%(2/53)    | 9.75%(4/41)    |
| 臭鼩鼯 | 0% (0/28)       | 0% (0/15)      | 0% (0/13)      |
| 合计  | 8.87%(22/248)   | 5.71%(8/140)** | 12.96%(14/108) |

#褐家鼠感染率显著高于其他鼠类

#雌鼠感染率显著高于雄鼠

### 3、深圳市广州管圆线虫疫源地分布情况



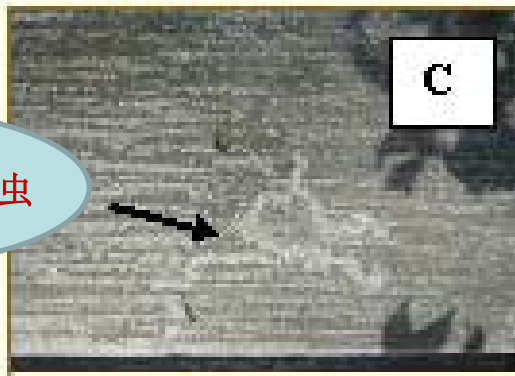
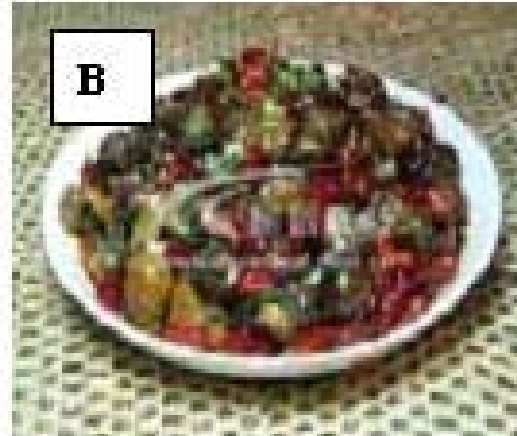
调查点

阳性螺区域, 鼠自然感染区

阴性螺区域

无螺区域

## 4、广州管圆线虫的主要感染途径研究



腺液内发现感染期幼虫

采集螺类



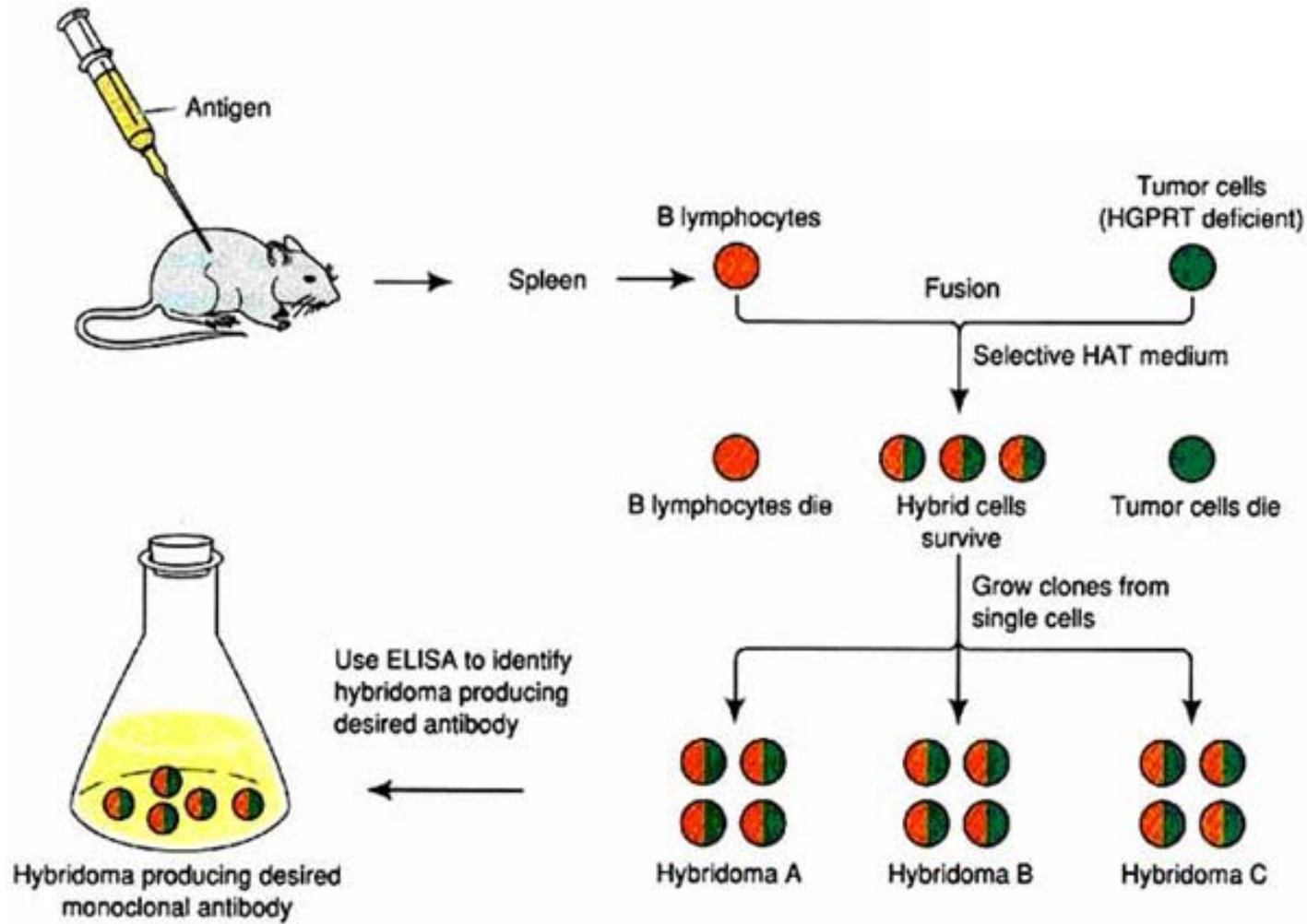
加工螺类



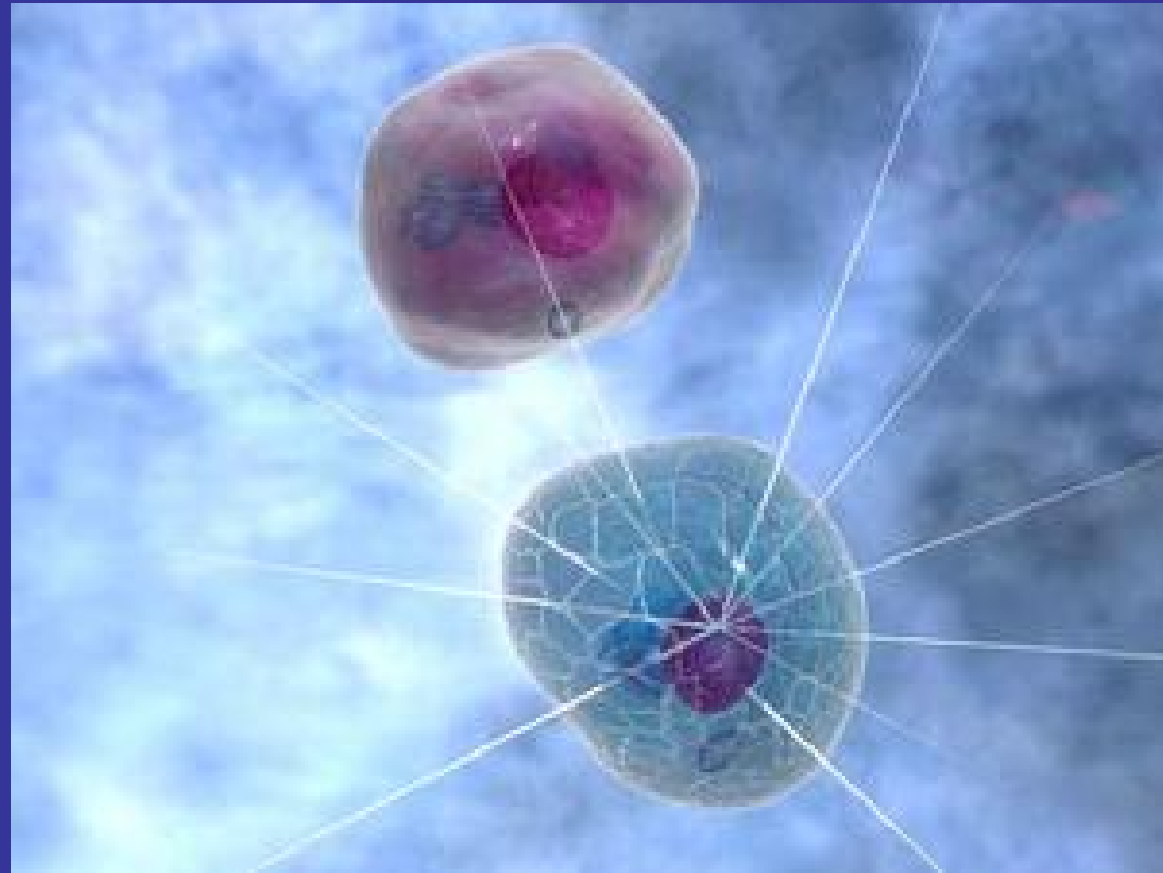
美食螺类

# 研究内容二、诊断循环抗原单克隆抗体制备及免疫学特征分析

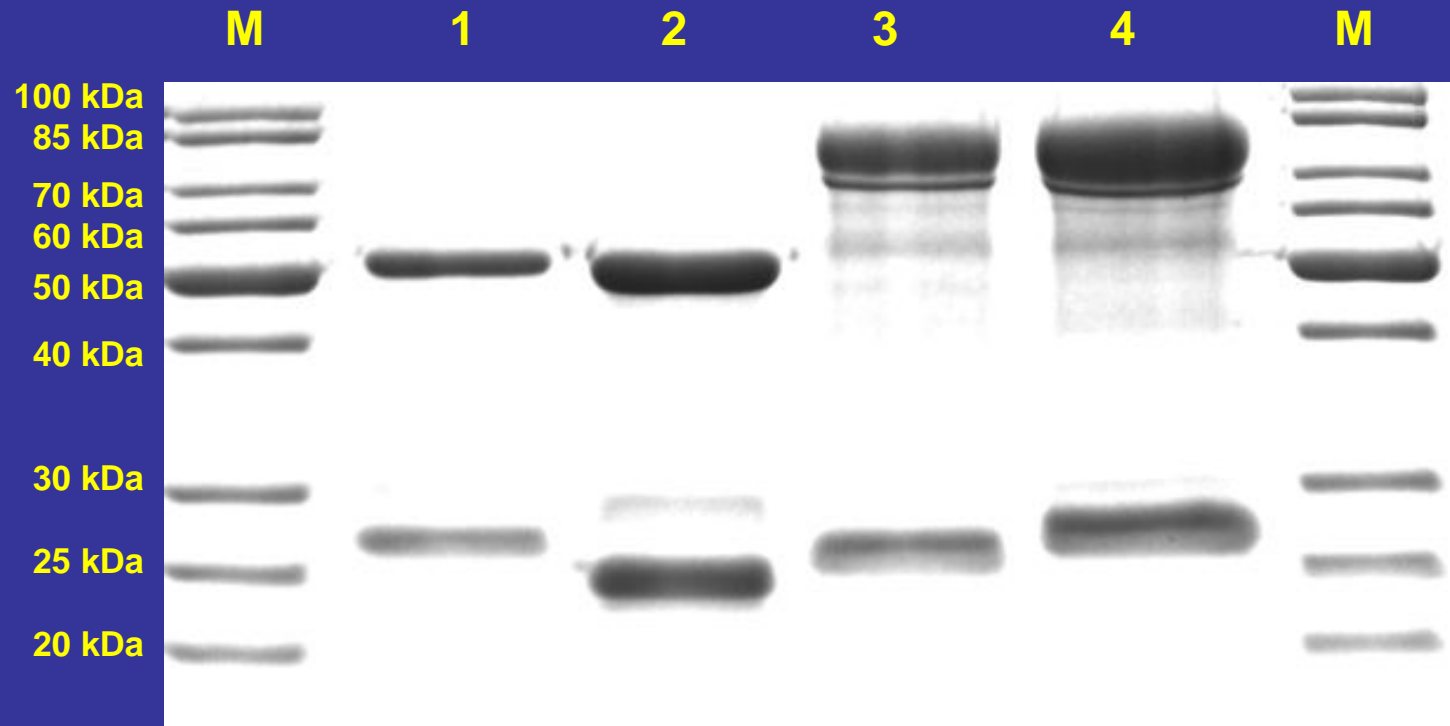
## 1、杂交瘤细胞的形成



扫描电镜观察筛选的杂交瘤细胞株  
能够稳定的分泌特异性单抗



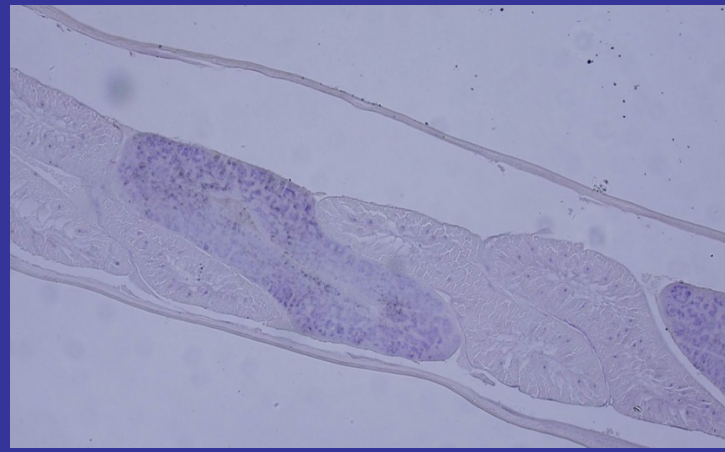
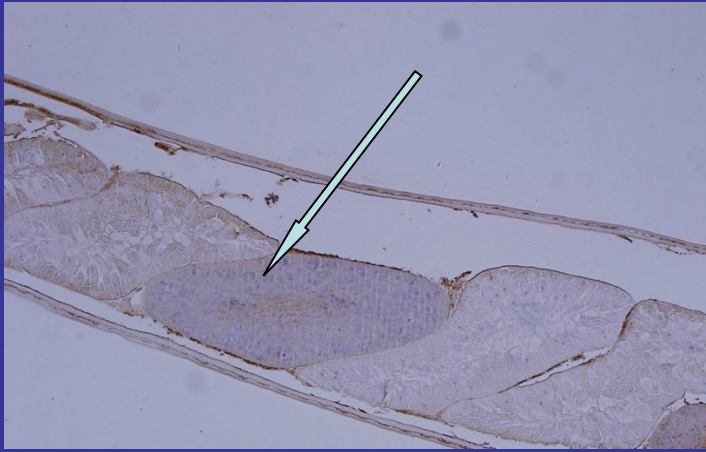
## 2、杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体亚类分析(SDS-PAGE电泳图)



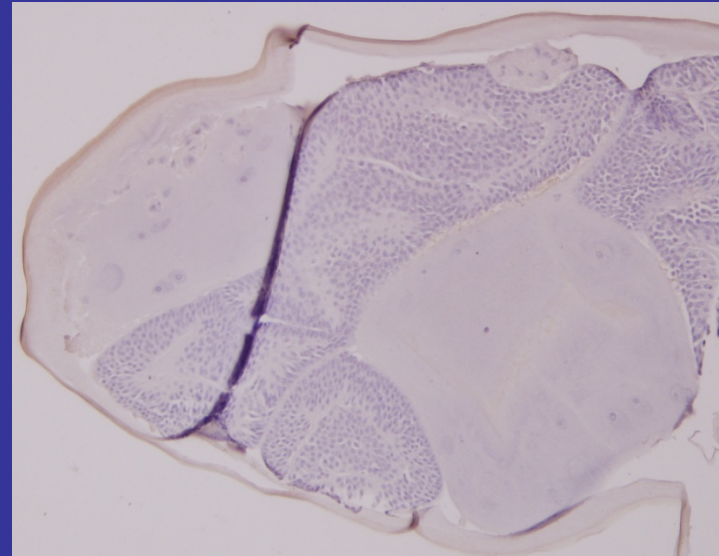
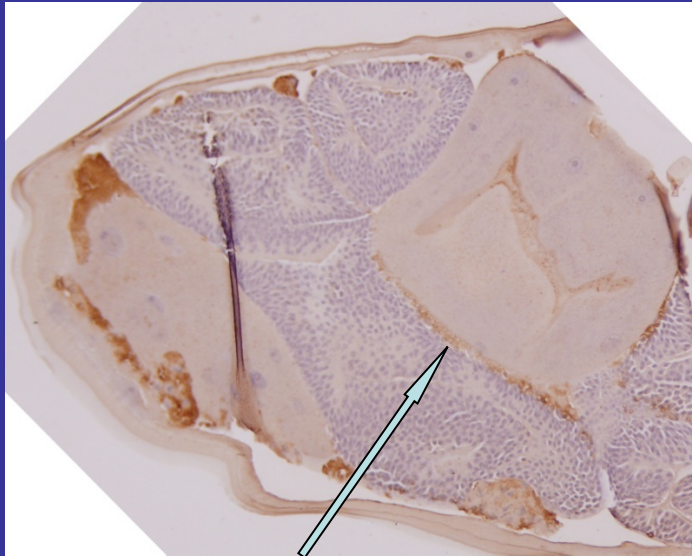
M.为标准参照物；1.为单抗12D5；2.为单抗15F8；3.为单抗21B7；4.为单14G10。

其中，1、2为IgG1，3、4为IgM，单抗轻重链大小与IgG和IgM相符。

### 3、筛选的单抗12D5和21B7组织学定位分析



大  
100×放

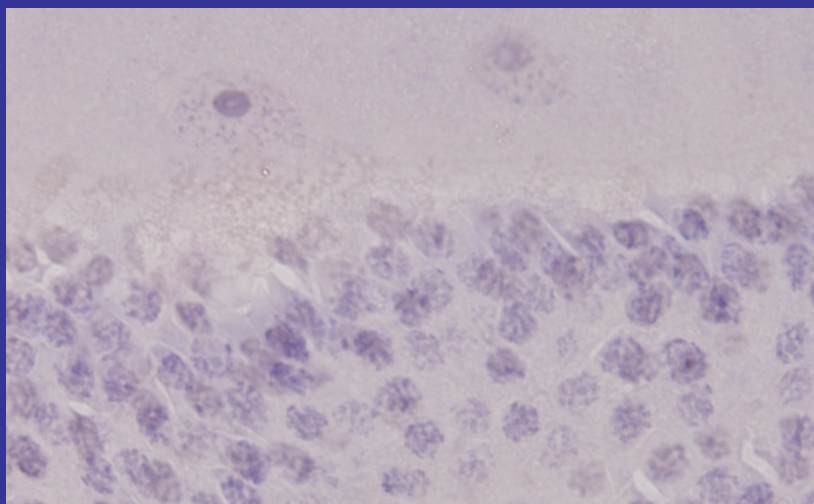


200×放大

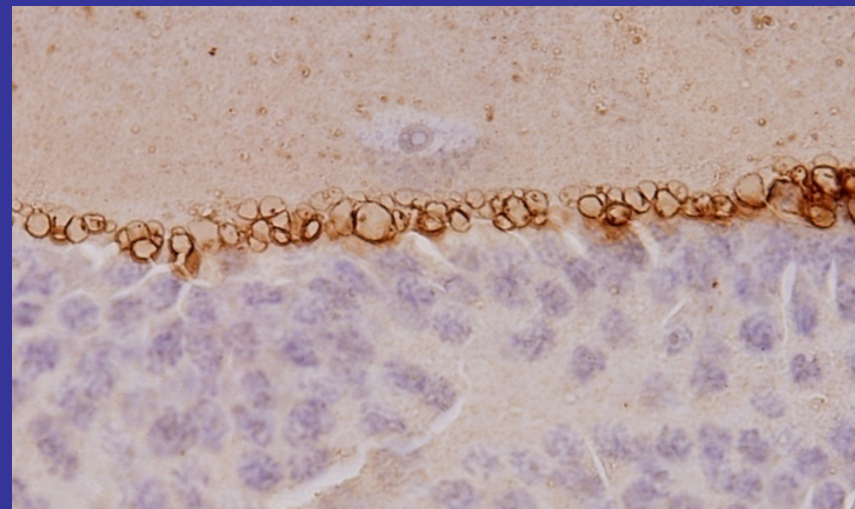
阳性反应

阴性控制

## 广州管圆线虫单抗12D5和21B7组织学鉴定



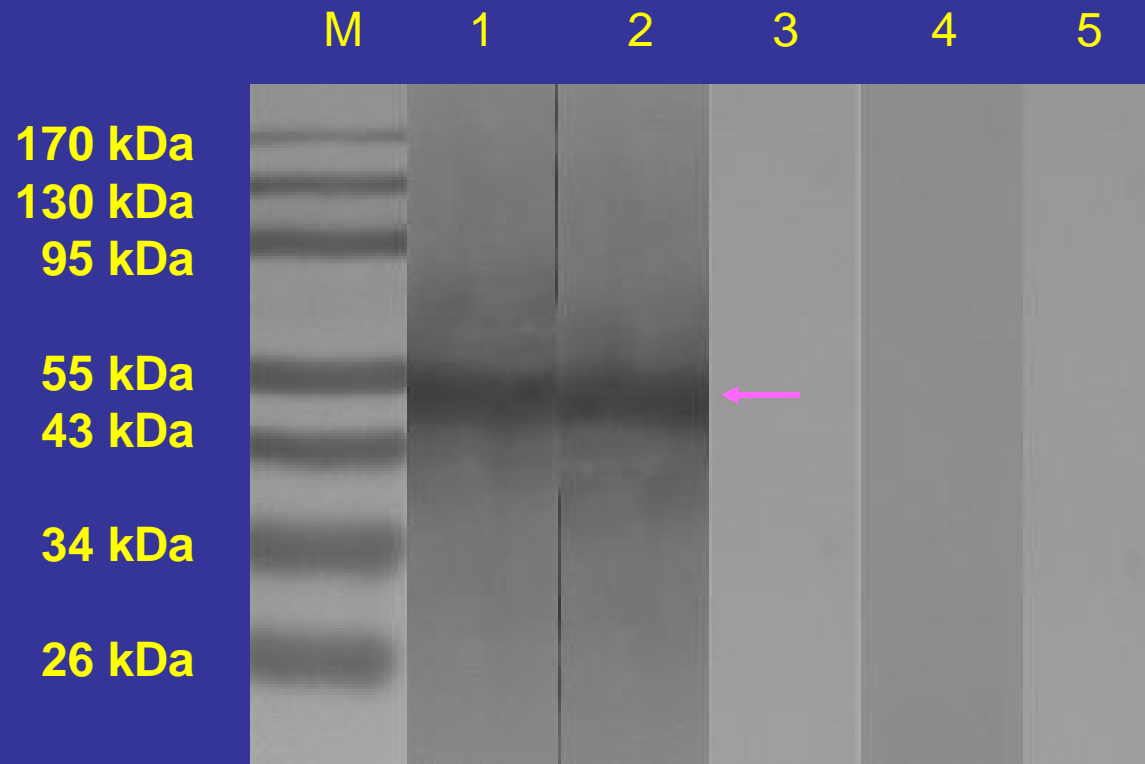
实验对照（**PBS**为一抗）



阳性反应（**12D5**为一抗）

## 4、单抗特异性分析

### 4.1 单抗12D5、21B7与其它寄生虫抗原交叉反应性 Westeron-Blot分析



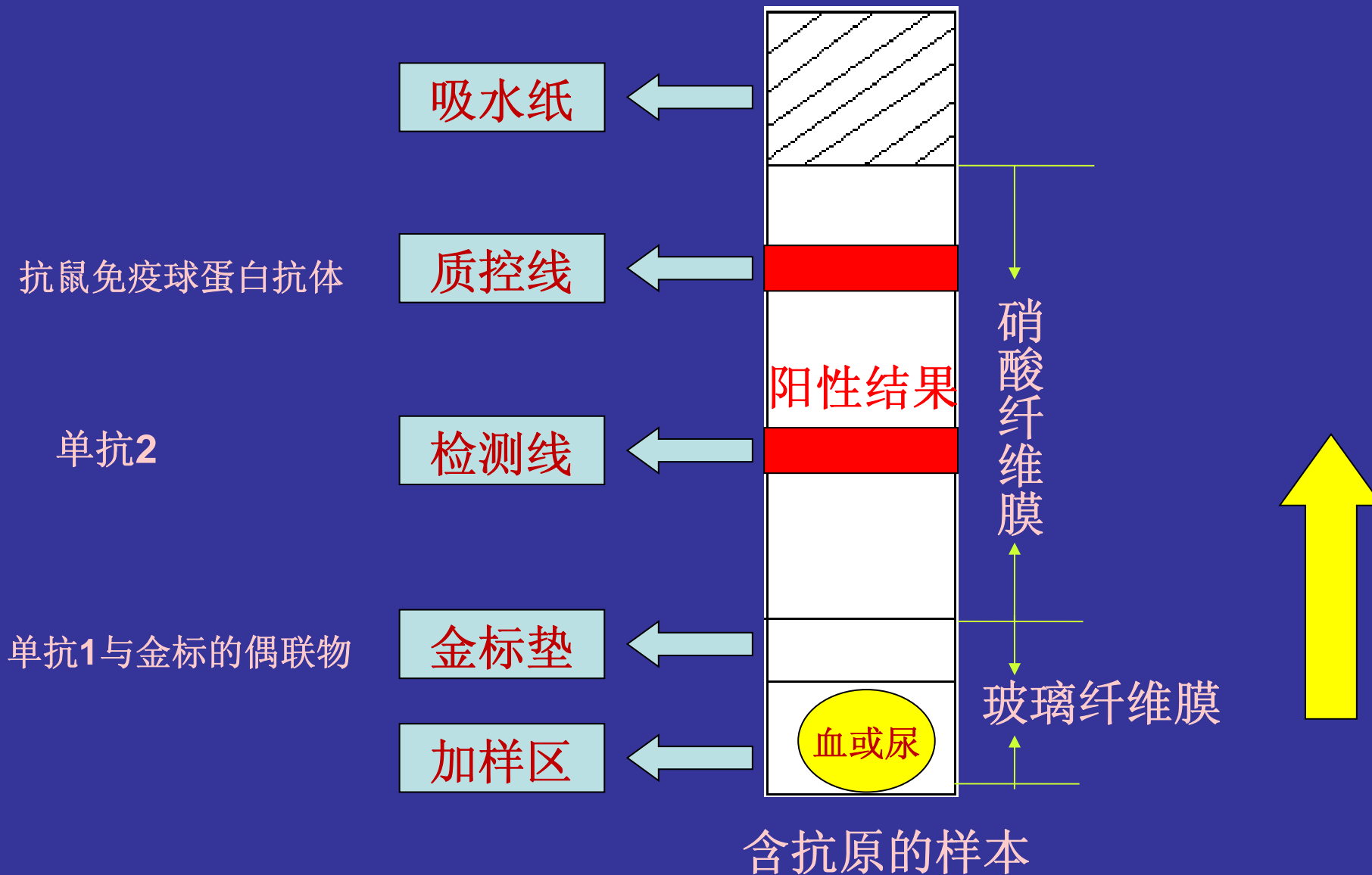
M.蛋白参照物；1、2分别为单抗12D5、21B7识别广州管圆线成虫抗原；  
3、4、5分别为12D5、21B7单抗混合物与血吸虫、肝吸虫和人蛔虫抗原反应

## 4.2 ELISA分析单抗12D5、21B7特异性（双抗体夹心法）

| 样本          | 例数(份) | 阳性数 | 阳性率(%) |
|-------------|-------|-----|--------|
| 广州管圆线虫病病人血清 | 102   | 102 | 100    |
| 日本血吸虫病病人血清  | 68    | 0   | 0      |
| 肝吸虫病病人血清    | 60    | 0   | 0      |
| 肺吸虫病病人血清    | 54    | 0   | 0      |
| 蛔虫病病人血清     | 87    | 0   | 0      |
| 囊虫病病人血清     | 52    | 0   | 0      |
| 包虫病病人血清     | 27    | 0   | 0      |
| 旋毛虫病病人血清    | 13    | 0   | 0      |
| 健康人血清       | 80    | 0   | 0      |

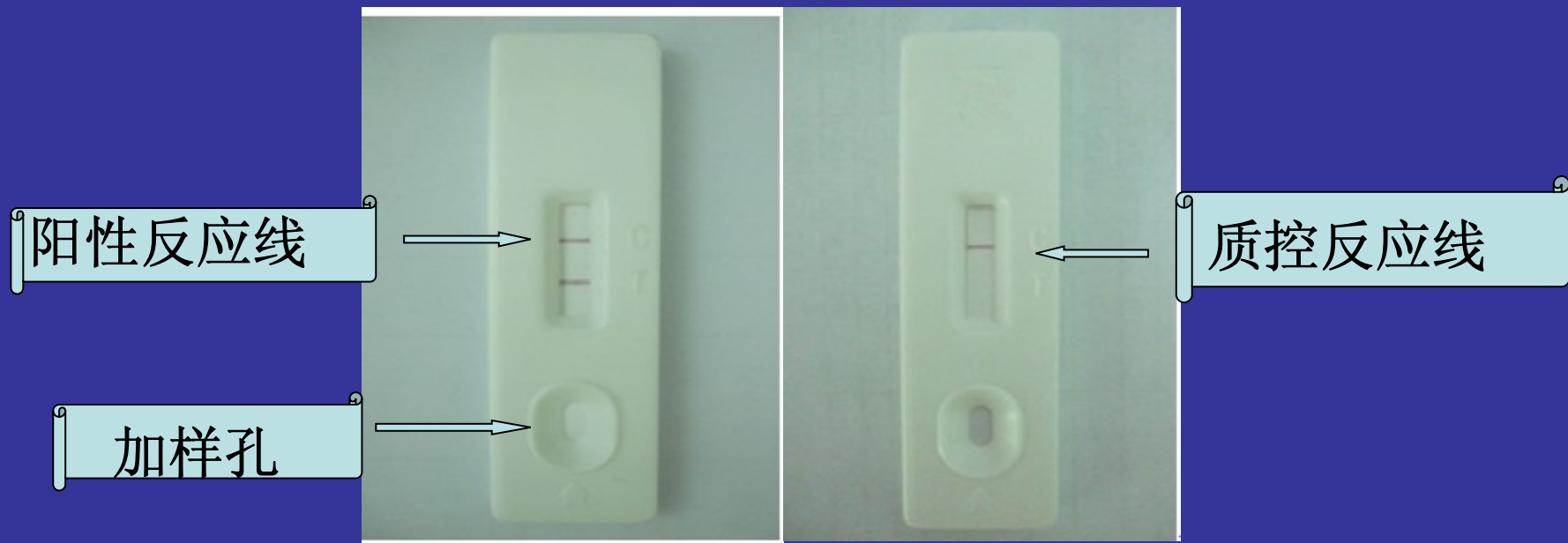
# 研究内容三、金标层析检测体系的建立

应用两个识别同一抗原不同表位的单抗为最优组合



# 1、研制的检测循环抗原金标层析试剂的验证

- \* 15分钟内出结果，不需任何设备与试剂；
- \* 动物实验证明宿主体内虫体杀灭7天后就检测不到此抗原；
- \* 证实了单抗检测的是活虫肠道分泌性蛋白；
- \* 诊断现症感染和考核治疗效果。



### 3、诊断循环抗原金标层析检测试剂盒的形成



# 专利申请

研制的诊断试剂2008年  
申报，目前尚进入实质  
性审查

共 1 页

中华人民共和国国家知识产权局

邮政编码: 518020 A  
广东省深圳市罗湖区田贝一路21号  
张仁利  
申请号: 200810142747.5

发文日期:  
2008年8月5日

### 专利申请受理通知书

根据中华人民共和国专利法第二十八条及其实施细则第三十九条、第四十条的规定, 申请人提出的专利申请国家知识产权局予以受理。现将确定的申请号和申请日通知如下:

申请号: 200810142747.5

申请日: 2008年8月5日

申请人: 深圳市疾病预防控制中心

发明名称: 广州管圆线虫循环抗原的检测方法及其酶联免疫试剂盒

经核实确认国家知识产权局专利局收到如下文件:

|      |         |      |       |        |      |
|------|---------|------|-------|--------|------|
| 请求书  | 每份页数:3  | 份数:2 | 摘要    | 每份页数:1 | 份数:2 |
| 摘要附图 | 每份页数:1  | 份数:2 | 权利要求书 | 每份页数:2 | 份数:2 |
| 说明书  | 每份页数:15 | 份数:2 | 说明书附图 | 每份页数:1 | 份数:2 |

简要说明

- 根据专利法第二十八条规定, 申请文件是邮寄的, 以寄出的邮戳日为申请日。若申请人发现上述申请日与邮寄申请文件之日不一致时, 可在收到本通知书起两个月内向国家知识产权局专利局受理处提交意见陈述书及挂号存根, 要求办理更正申请日手续。
- 申请号是国家知识产权局给予每一件被受理的专利申请的代号, 是该申请最有效的识别标志。申请人向我局办理各种手续时, 均应准确、清晰写明申请号。
- 寄给审查员个人的文件或汇款不具法律效力。
- 中间文件、分案申请、要求本国优先权的申请应直接寄交国家知识产权局受理处。

中华人民共和国国家知识产权局

审查员: 张剑 0832-2-C10627

专利局受理章 (2/6)

邮政编码: 100088 地址: 北京市海淀区前门桥西土城路六号国家知识产权局专利局受理处 邮政信箱: 北京 8020 信箱

中华人民共和国国家知识产权局

518020  
广东省深圳市罗湖区田贝一路21号  
张仁利

发文日期:  
2010年03月10日

申请号或专利号: 200810142747.5 发文序号: 2010030400528630

申请人或专利权人: 深圳市疾病预防控制中心

发明创造名称: 广州管圆线虫循环抗原的检测方法及其酶联免疫试剂盒

### 发明专利申请公布通知书

上述专利申请, 经初步审查, 符合专利法实施细则第44条的规定。根据专利法第34条的规定, 该申请在 20 卷 06 号专利公报上予以公布。

注: 附发明专利申请单行本一份。

提示:

- 发明专利申请人可以自申请日起3年内提交实质审查请求书, 缴纳实质审查费, 申请人期满未提交实质审查请求书或期满未足额缴纳实质审查费的, 该申请被视为撤回。
- 费用可以直接到国家知识产权局缴纳, 也可以通过邮局或者银行汇付, 如通过邮局汇付, 收款人姓名: 国家知识产权局专利局收费处; 户名: 110000860, 如通过银行汇付, 开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行; 户名: 中华人民共和国国家知识产权局专利局; 账号: 0200010009014400518。

汇款时应当准确写明申请号、费用名称(或简称)及分项金额, 未写明申请号和费用名称(或简称)的视为未办理缴费手续。

- 申请文件修改格式要求:  
对权利要求修改的应当提交相应的权利要求替换项, 涉及权利要求引用关系时, 则需要将相应项一起替换补正。如果申请人需要删除部分权利要求, 申请人应当提交整理后连续编号的部分权利要求书。  
对说明书修改的应当提交相应的说明书替换项, 不得增加和删除段号, 仅能对有修改部分进行替换。如果要增加内容, 则只能增加在某一段中; 如果要删除一个整段内容, 应当保留该段号, 并在此段号后注明: “此段删除” 字样。段号以国家知识产权局回传的公布、授权公告的说明书段号为准。  
对说明书附图、摘要、摘要附图修改的应当提交相应的说明书附图、摘要、摘要附图替换页。  
同时, 申请人应当在补正书或意见陈述书中标明修改涉及的权利、段号、页。

审查员: 胡晓锋 审查部门: 专利局初审及复议处受理部

联系电话: 62088070

210305 纸质申请, 四篇请客, 100088 北京市海淀区前门桥西土城路6号 国家知识产权局专利局受理处  
2010.2 电子申请, 应当通过电子专利申请系统以电子文件格式提交相关文件, 除有规定外, 以系统生成的电子格式提交的文件视为未提交。

1 / 1

# 对人群常到和污染市民食物链的疫源地进行了杀灭宿主的处理



试剂盒在全国广州管圆线虫流行区应用两年来，**诊断和鉴别诊断2700多名感染者**，同类专家评价是特异性强、敏感性高，特别适合在农村等基层地区使用。

福建省CDC

**应用证明**

|          |                       |
|----------|-----------------------|
| 项目名称     | 广州管圆线虫诊断循环抗原金标层析检测试剂  |
| 应用单位     | 福建省疾病预防控制中心           |
| 通讯地址     | 福州市津泰路26号             |
| 应用成果起止时间 | 2019.7.2 - 2021.11.18 |
| 经济效益(万元) |                       |
| 年度       |                       |
| 新增利润     | 0                     |
| 新增税收     | 0                     |
| 创收外汇(美元) | 0                     |
| 增收节支总额   | 0                     |

本中心应用深圳市疾病预防控制中心研制的“广州管圆线虫诊断循环抗原金标层析检测试剂”进行广州管圆线虫的现场诊断和疗效考核。该试剂盒操作简便、快速、敏感性高、特异性强，应用效果良好。

应用单位(财务)专用(盖章)  
日期: 2021.11.18

厦门市CDC

**应用证明**

|          |                       |
|----------|-----------------------|
| 项目名称     | 广州管圆线虫诊断循环抗原金标层析检测试剂  |
| 应用单位     | 厦门市疾病预防控制中心           |
| 通讯地址     | 厦门市集美区杏林路181号         |
| 应用成果起止时间 | 2019.8.4 - 2021.11.18 |
| 经济效益(万元) |                       |
| 年度       |                       |
| 新增利润     | 0                     |
| 新增税收     | 0                     |
| 创收外汇(美元) | 0                     |
| 增收节支总额   | 0                     |

深圳市疾病预防控制中心研制的“广州管圆线虫诊断循环抗原金标层析检测试剂”诊断特异性强、敏感性高，应用效果良好。

应用单位(财务)专用(盖章)  
日期: 2021.11.18

杭州市CDC

**应用证明**

|          |                      |
|----------|----------------------|
| 项目名称     | 广州管圆线虫诊断循环抗原金标层析检测试剂 |
| 应用单位     | 杭州市疾病预防控制中心          |
| 通讯地址     | 杭州钱江世纪城绿荫路4号楼419     |
| 应用成果起止时间 |                      |
| 经济效益(万元) |                      |
| 年度       |                      |
| 新增利润     | 0                    |
| 新增税收     | 0                    |
| 创收外汇(美元) | 0                    |
| 增收节支总额   | 0                    |

本疾控中心应用深圳市疾病预防控制中心研制的“广州管圆线虫诊断循环抗原金标层析检测试剂”作为食源性寄生虫的血清学诊断，应用效果良好。

应用单位(财务)专用(盖章)  
日期: 2021.11.18

军科院微生物所

**应用证明**

|          |                        |
|----------|------------------------|
| 项目名称     | 广州管圆线虫诊断循环抗原金标层析检测试剂   |
| 应用单位     | 军事医学科学院微生物与流行病学研究所     |
| 通讯地址     | 北京丰台东大街20号             |
| 应用成果起止时间 | 2019.1.15 - 2021.11.18 |
| 经济效益(万元) |                        |
| 年度       |                        |
| 新增利润     | 0                      |
| 新增税收     | 0                      |
| 创收外汇(美元) | 0                      |
| 增收节支总额   | 0                      |

本所应用深圳市疾病预防控制中心研制的“广州管圆线虫诊断循环抗原金标层析检测试剂”进行广州管圆线虫的现场诊断和疗效考核。该试剂盒操作简便、快速、敏感性高、特异性强，应用效果良好。

应用单位(财务)专用(盖章)  
日期: 2021.11.18

广东省省CDC

**应用证明**

|          |                      |
|----------|----------------------|
| 项目名称     | 广州管圆线虫诊断循环抗原金标层析检测试剂 |
| 应用单位     | 广东省疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所 |
| 通讯地址     | 广州中新路176号            |
| 应用成果起止时间 |                      |
| 经济效益(万元) |                      |
| 年度       |                      |
| 新增利润     | 0                    |
| 新增税收     | 0                    |
| 创收外汇(美元) | 0                    |
| 增收节支总额   | 0                    |

广州管圆线虫严重影响人民健康的人畜共患自然疫源性寄生虫病，也是我国的主要食源性寄生虫病之一。其感染途径多，人体感染途径引起以嗜酸性粒细胞增多性脑膜炎为主的一系列神经系统和其他器官病变。我国存在着广州管圆线虫的自然疫源地，且不断有广州管圆线虫病病例出现。但广州管圆线虫感染率不到10%，为有效控制我国的广州管圆线虫病，本所应用深圳市疾病预防控制中心研制的“广州管圆线虫诊断循环抗原金标层析检测试剂”进行广州管圆线虫的现场诊断和疗效考核。该试剂盒操作简便、快速、敏感性高、特异性强，应用效果良好。

应用单位(财务)专用(盖章)  
日期: 2021.11.18

## 7、发表相关论文目录 论文被它引42次

- 1、 Ren-li Zhang, Mu-xin Chen, Shi-tong Gao, Yi-jie Geng, Da-na Huang, Jian-ping Liu, Yuan-liang Wu, Xingquan Zhu. Enzootic *Angiostrongyliasis* in Shenzhen, China. *Emerging Infectious Diseases*. 2008, 12(14):1955-1957. IF=6.275
- 2、 Mu-xin Chen, Lin Ai, Min-jun Xu, Ren-li Zhang, Shao-hong Chen, Yong-nian Zhang, Jian Guo, Yu-chen Cai, Li-Guang Tian, Ling-Ling Zhang, Xing-quan Zhu, Jia-Xu Chen. *Angiostrongylus cantonensis*: identification and characterization of microRNAs in male and female adults. *Experiment Parasitology*. 2011, 128:116-120. IF=2.8
- 3、 Mu-Xin Chen, Ren-li Zhang, Jia-Xu Chen, Shao-Hong Chen, Xiao-Heng Li, Shi-tong Gao, Yi-jie Geng, Da-na Huang, Lin Ai, Min-Jun Xu, Xing-Quan Zhu. Monoclonal Antibodies Against Excretory/ Secretory Antigens of *Angiostrongylus cantonensis*. *Hybridoma* 2010, 8:447-452. IF=1.9
- 4、 C.Y. Liu, R.L. Zhang, M.X.Chen, J.Li, L.Ai, C.Y.Wu, X.Q. Zhu, R.Q. Lin. Characterisation of *Angiostrongylus cantonensis* Isolates from China by Sequence of Internal Transcribed Spacers of Nuclear Ribosomal DNA. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2011, 10(5):593-596. IF=0.29
- 5、 Mu-Xin Chen, Kun Wang, Lin Ai, Wen-Hao Yan, Liang Peng, Ren-Li Zhang. Development of a double antibody sandwich elisa assay for the diagnosis of *Angiostrongyliasis*. *J.parasitol* 2011, 97(4):1-4. IF=1.6
- 6、 Mu-Xin Chen, Ren-Li Zhang, Kun Wang, Lin Ai, Wen-Hao Yan, Liang Peng, Xing-quan Zhu. Seroprevalence of *Angiostrongylus cantonensis* infection in Humans in China. *Research Notes. J.parasitol* 2011, 97(1):144-145. IF=1.6
- 7、 Chun-Yan Liu, Hui-qun Song, Ren-Li Zhang, Mu-Xin Chen, Min-Jun Xu, Lin Ai, Xiao-Guang Chen, Xi-Mei Zhang, Shao-Bui Liang, Zi-Guo Yuan, Rui-Qing Lin, Xing-Quan Zhu. Specific detection of *Angiostrongylus cantonensis* in the snail *Achatina fulica* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Molecular and Cellular Probes*. 2011, 25:164-167. IF=2.6
- 8、 Li JJ, Zhang RL, Fu YC, et al. Monoclonal antibody 12D5 inhibits eosinophil infiltration in the brain of *Angiostrongylus cantonensis*-infected BALB/c mice: *Acta Trop*. 2011 Nov 2; [Epub ahead of print]. IF=2.7
- 9、 Peng Zhou, Ning Chen, Ren-li Zhang, Rui-Qing Lin and Xing-Quan Zhu. Food-Borne Parasitic zoonoses in China: perspective for control. *Trends in Parasitology*, 2008, 1(1):7-. IF=4.4
10. 张仁利, 高世同, 耿艺介, 黄达娜, 陈木新, 刘建平, 吴元良, 甄茵, 戴传文, 张起文, 吴泰顺, 马智超, 陈戌生, 黎大林. 深圳市广州管圆线虫疫源地调查及其流行特征分析. *中华流行病学杂志*, 2008, 6 (290): 573-576.
11. 张仁利, 陈木新, 耿艺介, 黄达娜, 吴双, 高世同, 李晓恒, 朱兴全. 广州管圆线虫单抗结合抗原定位分布及在免疫诊断上的应用. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2011, 31 (2): 173-177.
12. 黄达娜, 陈木新, 耿艺介, 李晓恒, 高世同, 张仁利. 应用 12D5 和 21B7 单抗检测广州管圆线虫循环抗原的研究. *中华流行病学杂志*, 2010, 31 (1): 79-82.
13. 张仁利, 黄薇, 张天, 高世同, 耿艺介, 黄达娜, 陈木新, 刘建平, 吴元良, 深圳市褐云玛瑙螺广州管圆线虫感染调查. *中国热带医学*, 2008, 8 (6): 929-930.
14. 黄达娜, 耿艺介, 谢旭, 高世同, 李晓恒, 王敬忠, 张仁利. 深圳市鼠类广州管圆线虫感染状况调查. *国际医学寄生虫杂志*. 2011, 38 (3): 3-5.
15. 刘义, 高世同, 耿艺介, 黄达娜, 张仁利. 广州管圆线虫对淡水螺感染性的实验研究. *中国热带医学*, 2007, 7 (9): 1517-1519.
16. 耿艺介, 黄达娜, 高世同, 李晓恒, 张倩, 张艳炜, 张仁利. 阿笨达唑治疗广州管圆线虫感染的免疫学效应研究. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2011, 18 (2):
17. 耿艺介, 黄达娜, 谢旭, 邓平建, 高世同, 李晓恒, 王敬忠, 谭京广, 张仁利. 深圳市广州管圆线虫动物宿主感染状况调查. *中华疾病预防控制中心杂志*, 2011, 15(9):802-805.
18. 李晓恒, 张仁利, 陈木新, 耿艺介, 高世同, 黄达娜. 广州管圆线虫感染致大鼠肺组织病理改变及其免疫组化研究. *热带医学杂志*, 2009, 9 (8): 852-855