



(12) 实用新型专利

(10) 授权公告号 CN 203178277 U

(45) 授权公告日 2013. 09. 04

(21) 申请号 201220536124. 8

G01N 33/532 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 10. 18

(73) 专利权人 上海疾控生物科技有限公司

地址 200331 上海市普陀区绥德路 118 弄 60 号 4 层

(72) 发明人 刘静 蔡黎 郁嘉铭 唐月红
李宝良 张明敏

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
31002

代理人 王洁 郑暄

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/544 (2006. 01)

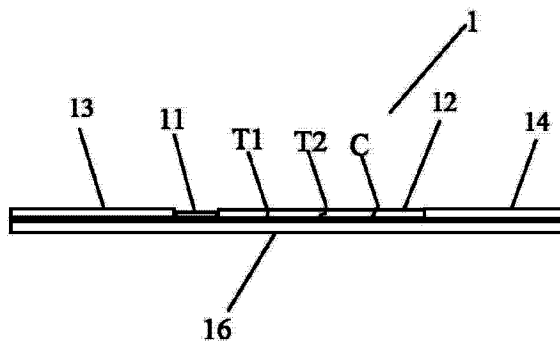
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 实用新型名称

胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒

(57) 摘要

本实用新型涉及一种胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,包括胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条,其金标垫上具有间日疟检测胶体金标记抗体和恶性疟检测胶体金标记抗体,其硝酸纤维素膜上包被有间日疟检测抗体和恶性疟检测抗体。较佳地,间日疟检测胶体金标记抗体和间日疟检测抗体分别是第一和第二抗疟原虫乳酸脱氢酶抗体。恶性疟检测胶体金标记抗体和恶性疟检测抗体分别是第一和第二抗富组氨酸蛋白 II 抗体。试纸条还包括样品垫、吸水滤纸、盖板和底板,试剂盒还包括裂解液存放容器。本实用新型可以通过一次取样同时检测间日疟和恶性疟,应用简便,联检结果为下一步准确治疗提供了有力依据,适于大规模推广应用。



1. 一种胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,其特征在于,包括胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条的金标垫上具有间日疟检测胶体金标记抗体和恶性疟检测胶体金标记抗体,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条的硝酸纤维素膜上包被有间日疟检测抗体和恶性疟检测抗体;其中所述间日疟检测抗体所处位置为检测区 T1 区,所述恶性疟检测抗体所处位置为检测区 T2 区。

2. 根据权利要求 1 所述的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,其特征在于,所述间日疟检测胶体金标记抗体和所述间日疟检测抗体为不同的间日疟检测抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,其特征在于,所述恶性疟检测胶体金标记抗体和所述恶性疟检测抗体为不同的恶性疟检测抗体。

4. 根据权利要求 1 所述的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,其特征在于,所述间日疟检测胶体金标记抗体是第一抗疟原虫乳酸脱氢酶抗体,所述间日疟检测抗体是第二抗疟原虫乳酸脱氢酶抗体。

5. 根据权利要求 1 所述的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,其特征在于,所述恶性疟检测胶体金标记抗体是第一抗富组氨酸蛋白 II 抗体,所述恶性疟检测抗体是第二抗富组氨酸蛋白 II 抗体。

6. 根据权利要求 1 所述的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,其特征在于,所述间日疟检测胶体金标记抗体、所述恶性疟检测胶体金标记抗体、所述间日疟检测抗体和所述恶性疟检测抗体均为鼠源抗体,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条的硝酸纤维素膜上还包被羊抗鼠 IgG 抗体,所述羊抗鼠 IgG 抗体所处位置为质控区 C 线。

7. 根据权利要求 1 所述的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,其特征在于,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条还包括样品垫和吸水滤纸,所述样品垫通过所述金标垫连接所述硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜连接所述吸水滤纸。

8. 根据权利要求 7 所述的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,其特征在于,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条还包括盖板和底板,所述盖板上设置有加样窗口和检测窗口,所述盖板盖设在所述底板上从而在所述盖板和所述底板之间形成内部容纳腔,所述样品垫、所述金标垫、所述硝酸纤维素膜和所述吸水滤纸位于所述内部容纳腔中,所述加样窗口位于所述样品垫上,所述检测窗口位于所述硝酸纤维素膜上。

9. 根据权利要求 1 所述的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,其特征在于,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒还包括裂解液存放容器,所述裂解液存放容器中装有裂解液。

胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型涉及检测试剂盒技术领域,具体涉及联检试剂盒技术领域,特别涉及一种胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒。

背景技术

[0002] 疟疾是严重危害人类健康的虫媒传染病,如果不能及时诊断和治疗,常常会引起病人的死亡,同时也引起疾病的进一步传播。快速而准确地检测疟原虫是有效防治疟疾的关键。到目前为止,对可疑病人采血制作厚薄血片经染色后显微镜检查法(简称镜检法)一直被认为是疟疾诊断的“金标准”,其优点是费用低、能鉴定疟原虫虫种;但是也存在着缺陷,即需要非常专业的检验人员,当原虫密度较低时,可出现假阴性,引起误诊或漏诊,同时还需要显微镜、染色液等一些辅助设备。随着临床机构,特别是一些现代化程度越高的医院,由于检验人员更依赖仪器设备,对镜检能力的掌握程度明显下降;而在一些欠发达地区,由于种种原因,未能配备镜检的相关设备和试剂。这些因素限制了临床对疟疾快速有效的诊断。

[0003] 疟疾快速诊断试验(RDT)是一种能快速且简便地对患者血液中的疟原虫进行检测的诊断技术,它通过在基体上包被抗体以检测患者样本的抗原,通过标记跟踪物的第二抗体使原来的抗原抗体复合物显示出来。RDT 改变了过去疟疾的诊断依赖临床基础或显微镜技术,对那些缺乏显微镜和染色试剂、镜检能力较差的地区这一特性更加明显。该法操作简便,非专业人员按照说明书即可进行操作,15 分钟内通过肉眼就能观察结果,结果易于判断,实验过程不需电源和仪器,因此适于现场和基层人员使用。

[0004] 目前,用于疟疾免疫层析快速诊断检测的特异性靶抗原主要有 3 种:富组氨酸蛋白 II (HRP-II)、乳酸脱氢酶(pLDH)和醛缩酶(ALD)。

[0005] (1) HRP-II 是恶性疟原虫消化血红蛋白后形成的代谢产物,由血液期无性体和早期配子体合成,含有大量组氨酸,具有种特异性,由于是水溶性抗原其可在疟疾患者的血浆、尿、全血中检测到,是诊断恶性疟的理想靶抗原。

[0006] (2) pLDH 是疟原虫体内代谢酶,红内期疟原虫无性期和配子体期均有表达,其物理生化、免疫学特征、酶催化作用等与人体红细胞和其他许多微生物的乳酸脱氢酶(LDH)差异性大,疟原虫 LDH 具有种属特异性,可作为免疫诊断的靶抗原。

[0007] (3) ALD 是间日疟原虫特有的抗原,从而诊断样本是否感染间日疟原虫。

[0008] 由于镜检法这些的缺陷和 RDT 优势,使得世界卫生组织(WHO)十分重视和支持 RDT 的发展。在过去的几年,全球多个企业研发并批量生产出了多个 RDT 的产品,使得全球使用 RDT 的数量和使用范围都有了快速的增长。为了有效评估不同厂家所研发和生产 RDT 的敏感性、特异性等相关指标,为各个国家疟疾控制项目在采购 RDT 和实施何种防治措施提供依据,WHO、热带病研究和培训特别规划署(TDR)、创新诊断学基金会(FIND)于 2008、2009 和 2011 年全球生产的 RDT 产品进行了 3 轮测试。在 95 个接受完全测试且不重复的产品中,29 个为只检测恶性疟;57 个为检测和鉴别恶性疟和非恶性疟(属特异性或种特异性);8 个为检

测恶性疟和非恶性疟,但不做鉴别诊断;只有 1 个产品是只检测间日疟的。在 WHO 测试的近百个产品中,来自中国的产品只有 1 个。

[0009] WHO 对 RDT 产品的测试结果显示,在检测高原虫密度(2000 或 5000 个/ μ l)样本时,大多数产品都有很高的检出率,但在检测低原虫密度(<200 个/ μ l)样本时,各个产品检测的结果差异很大。从几种不同的靶抗原的比较来看,检测恶性疟原虫富组氨酸蛋白 2 (HRP-2)抗原的试验显示了最高的检出率,但是,也有一些检测乳酸脱氢酶(pLDH)的试验检出率很高,而检测醛缩酶(ALD)抗原的产品总体上都不尽人意。

[0010] 从 WHO 的检测结果来看,目前 RDT 产品的主要不足是对于低原虫密度的检测灵敏度不高,和检测相同抗原的不同产品之间的敏感性和特异性差异极大(从 0 ~ 100%),提示不同产品使用的检测抗体的质量差异也较大。疟疾检测试剂的性能除了本身的质量以外,还受疟疾的传播和疾病流行区当地条件的多种因素影响,如疟原虫的种类、靶抗原的变异性、人群的感染强度(原虫密度)和气候等。因此,有针对性的开发适合特定区域的目标人群的检测试剂是疟疾抗原检测产品的发展方向。

实用新型内容

[0011] 本实用新型的目的是克服了上述现有技术中的缺点,提供一种胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,该胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒可以通过一次取样同时检测间日疟和恶性疟,应用简便,联检结果为下一步准确治疗提供了有力依据,适于大规模推广应用。

[0012] 为了实现上述目的,本实用新型的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒,其特点是,包括胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条的金标垫上具有间日疟检测胶体金标记抗体和恶性疟检测胶体金标记抗体,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条的硝酸纤维素膜上包被有间日疟检测抗体和恶性疟检测抗体。

[0013] 较佳地,所述间日疟检测胶体金标记抗体和所述间日疟检测抗体为不同的间日疟检测抗体。

[0014] 较佳地,所述恶性疟检测胶体金标记抗体和所述恶性疟检测抗体为不同的恶性疟检测抗体。

[0015] 较佳地,所述间日疟检测胶体金标记抗体是第一抗疟原虫乳酸脱氢酶抗体,所述间日疟检测抗体是第二抗疟原虫乳酸脱氢酶抗体。

[0016] 较佳地,所述恶性疟检测胶体金标记抗体是第一抗富组氨酸蛋白 II 抗体,所述恶性疟检测抗体是第二抗富组氨酸蛋白 II 抗体。

[0017] 较佳地,所述间日疟检测胶体金标记抗体、所述恶性疟检测胶体金标记抗体、所述间日疟检测抗体和所述恶性疟检测抗体均为鼠源抗体,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条的硝酸纤维素膜上还包被羊抗鼠 IgG 抗体。

[0018] 较佳地,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条还包括样品垫和吸水滤纸,所述样品垫通过所述金标垫连接所述硝酸纤维素膜,所述硝酸纤维素膜连接所述吸水滤纸。

[0019] 更佳地,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条还包括盖板和底板,所述盖

板上设置有加样窗口和检测窗口,所述盖板盖设在所述底板上从而在所述盖板和所述底板之间形成内部容纳腔,所述样品垫、所述金标垫、所述硝酸纤维素膜和所述吸水滤纸位于所述内部容纳腔中,所述加样窗口位于所述样品垫上,所述检测窗口位于所述硝酸纤维素膜上。

[0020] 较佳地,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒还包括裂解液存放容器,所述裂解液存放容器中装有裂解液。

[0021] 本实用新型的有益效果在于:本实用新型包括胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条的金标垫上具有间日疟检测胶体金标记抗体和恶性疟检测胶体金标记抗体,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条的硝酸纤维素膜上包被有间日疟检测抗体和恶性疟检测抗体,从而一次取样,即可对间日疟和恶性疟进行检测;避免了反复取样麻烦以及增加感染的风险。因此本实用新型可以通过一次取样同时检测间日疟和恶性疟,应用简便,联检结果为下一步准确治疗提供了有力依据,适于大规模推广应用。

附图说明

[0022] 图 1 是本实用新型的一具体实施例去掉盖板的主视示意图。

[0023] 图 2 是采用图 1 所示的具体实施例进行检测的阴性结果的俯视示意图。

[0024] 图 3A 是采用图 1 所示的具体实施例进行检测的间日疟阳性结果的俯视示意图。

[0025] 图 3B 是采用图 1 所示的具体实施例进行检测的恶性疟阳性结果的俯视示意图。

[0026] 图 3C 是采用图 1 所示的具体实施例进行检测的间日疟和恶性疟均阳性结果的俯视示意图。

[0027] 图 4A-图 4D 是采用图 1 所示的具体实施例进行检测的无效结果的俯视示意图。

具体实施方式

[0028] 为了能够更清楚地理解本实用新型的技术内容,特举以下实施例详细说明。

[0029] 请参见图 1-图 4D 所示,本实用新型的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒包括胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条 1,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条 1 的金标垫 11 上具有间日疟检测胶体金标记抗体和恶性疟检测胶体金标记抗体,所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条 1 的硝酸纤维素膜 12 上包被有间日疟检测抗体和恶性疟检测抗体。

[0030] 所述间日疟检测胶体金标记抗体和所述间日疟检测抗体可以是相同的间日疟检测抗体,也可以是不同的间日疟检测抗体,为了检测的准确性,在本实用新型的具体实施例中,所述间日疟检测胶体金标记抗体和所述间日疟检测抗体为不同的间日疟检测抗体。

[0031] 所述恶性疟检测胶体金标记抗体和所述恶性疟检测抗体可以是相同的恶性疟检测抗体,也可以是不同的恶性疟检测抗体,为了检测的准确性,在本实用新型的具体实施例中,所述恶性疟检测胶体金标记抗体和所述恶性疟检测抗体为不同的恶性疟检测抗体。

[0032] 所述间日疟检测胶体金标记抗体和所述间日疟检测抗体可以是任何合适的抗体,在本实用新型的具体实施例中,所述间日疟检测胶体金标记抗体是第一抗疟原虫乳酸脱氢酶抗体,所述间日疟检测抗体是第二抗疟原虫乳酸脱氢酶抗体。

[0033] 所述恶性疟检测胶体金标记抗体和所述恶性疟检测抗体可以是任何合适的抗体，在本实用新型的具体实施例中，所述恶性疟检测胶体金标记抗体是第一抗富组氨酸蛋白 II 抗体，所述恶性疟检测抗体是第二抗富组氨酸蛋白 II 抗体。

[0034] 所述间日疟检测胶体金标记抗体、所述恶性疟检测胶体金标记抗体、所述间日疟检测抗体和所述恶性疟检测抗体可以是任何来源的抗体，在本实用新型的具体实施例中，所述间日疟检测胶体金标记抗体、所述恶性疟检测胶体金标记抗体、所述间日疟检测抗体和所述恶性疟检测抗体均为鼠源抗体，所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条 1 的硝酸纤维素膜 12 上还包被羊抗鼠 IgG 抗体。羊抗鼠 IgG 抗体所处位置即为质控区 (C 线)，而所述间日疟检测抗体和所述恶性疟检测抗体所处位置即为检测区，其中所述间日疟检测抗体所处位置为 T1 区，所述恶性疟检测抗体所处位置为 T2 区。

[0035] 在本实用新型的具体实施例中，所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条 1 还包括样品垫 13 和吸水滤纸 14，所述样品垫 13 通过所述金标垫 11 连接所述硝酸纤维素膜 12，所述硝酸纤维素膜 12 连接所述吸水滤纸 14。

[0036] 为了方便操作，在本实用新型的具体实施例中，所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条 1 还包括盖板 15 和底板 16，所述盖板 15 上设置有加样窗口 17 和检测窗口 18，所述盖板 15 盖设在所述底板 16 上从而在所述盖板 15 和所述底板 16 之间形成内部容纳腔，所述样品垫 13、所述金标垫 11、所述硝酸纤维素膜 12 和所述吸水滤纸 14 位于所述内部容纳腔中，所述加样窗口 17 位于所述样品垫 13 上，所述检测窗口 18 位于所述硝酸纤维素膜 12 上。

[0037] 为了方便操作，在本实用新型的具体实施例中，所述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒还包括裂解液存放容器 (未示出)，所述裂解液存放容器中装有裂解溶液，所述裂解溶液可为水溶液，可按下列配方配制。

[0038]

原料名称	标准用量	级别
Tris 粉剂	2.42g	分析纯
盐酸	1ml	分析纯
氯化钠	17g	分析纯
叠氮钠	1g	分析纯
曲通 X-100	10g	分析纯
酪蛋白	20g	——
超纯水	2000ml	自制

[0039] 包装时，上述胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条 1 可以装入铝箔袋密封，盖板 15 和底板 16 可以采用塑料板制成，例如 ABS 塑料板。胶体金可以是紫红色胶体金。

[0040] 本实用新型检测时采用的是双抗体夹心法，当检测样品中存在针对上述抗体的特异性抗原时，检测样品中的抗原与金标垫 11 中的标记抗体结合，形成抗原-胶体金复合物，并借助层析作用向检测区迁移。当复合物流经检测区时，被相应的包被抗体捕获。若血样中存在间日疟原虫 (*P. v.*) 抗原时，在 T1 区会形成一条紫红色检测线。若血样中存在恶性疟原虫 (*P. f.*) 抗原，在 T2 区会形成一条紫红色检测线。检测样品中若不存在特异性抗原时，检测区不显色。质控区出现的紫红色质控线表示试剂有效并且操作正确。

[0041] 请参见图 2 所示，当只有一条 C 线出现时，为阴性结果，表明无间日疟和恶性疟感染。请参见图 3A 所示，出现 C 线和 T1 线，为阳性结果，表明可能感染间日疟，不感染恶性疟；

请参见图 3B 所示,出现 C 线和 T2 线,为阳性结果,表明可能感染恶性疟,不感染间日疟;请参见图 3C 所示,出现 C 线、T1 和 T2 线,为阳性结果,表明可能感染间日疟和恶性疟。请参见图 4A-4D 所示,无 C 线出现,为无效结果,可能是操作有误或试剂失效,需要重复检测。

[0042] 储存条件及有效期

[0043] 包装后的试剂盒应避光贮存在 4~30℃ 条件下,产品有效期为 18 个月。铝箔袋开封后,试剂盒应在 1 小时内尽快使用。

[0044] 适用仪器

[0045] 试剂盒检测时目测判断结果,无需使用其他仪器。

[0046] 样本要求

[0047] 现场采集的全血样本。

[0048] 抗凝管保存的全血样本:采血后,在 EDTA 抗凝管内摇匀冷藏或冷冻待检,冷藏样本应在 1 周内检测,冷藏样本和适当延长待检的时间,但是冻存样本尽量减少反复冻融,应在室温环境中回暖后使用。

[0049] 全血采集方法:指尖、耳垂末梢或者静脉采集均可。

[0050] 检验方法

[0051] 检测前请阅读使用说明书,检测应在室温下进行。

[0052] 1、沿铝箔袋切口部撕开中取出,将检测盒平放在工作台上,编号代用;

[0053] 2、使用微量移液器,在加样窗口 17 前端垂直缓慢加入 5 μ l 待检全血;

[0054] 3、然后再在加样窗口 17 后端缓慢加入 4 滴裂解液,带液体完全渗透;

[0055] 4、15 分钟内观察检测结果,30 分钟后显示的结果无临床意义。

[0056] 产品性能指标

[0057] 1、与其它物质的交叉反应:与 AIDS、结核、乙肝、三日疟、梅毒、血吸虫和包虫以及类风湿因子等血样中常见病症、常见的寄生虫病原体 and 常见物质不发生交叉反应。

[0058] 2、临床试验结果:所述间日疟检测胶体金标记抗体、所述恶性疟检测胶体金标记抗体、所述间日疟检测抗体和所述恶性疟检测抗体均购自上海市疾病预防控制中心,本次临床实验共收集 1222 例血样,本试剂盒的灵敏度对于恶性疟原虫为 96.9%,对于间日疟原虫为 95.4%。试剂盒对于疟原虫阴性样本的检测特异性为 96.1%。

[0059] 本试剂盒是以双抗体夹心法为原理的胶体金层析技术在疟疾检测中的运用,通过免疫诊断快速有效地利用抗原抗体结合反应,同时检测出间日疟和恶性疟感染。

[0060] 胶体金技术是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体反应的一种新型的免疫标记技术。胶体金(colloidal gold)是由氯金酸在还原剂如抗坏血酸、枸橼酸钠、柠檬酸三钠等作用下,聚合成为特定大小的金颗粒,并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态。胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响蛋白质的生物特性,从而可以作为跟踪标记物应用于生物行业。

[0061] 本实用新型具有以下效果:

[0062] 一、社会效果:

[0063] 疟疾严重影响人类的生命安全,研制简便快捷、敏感价廉适用于基层的诊断产品,是疟疾防治中迫切需要解决的课题。WHO 对此展开了一系列的疟疾检测产品甄选,结果不尽如人意。而中国产品的严重不足,使我国的疟疾防治工作面临空前的窘境。2010 年,由

卫生部等 13 委办局联合制定并下发了《中国消除疟疾行动计划(2010-2020 年)》，提出了到 2020 年要在全国范围内实现消除疟疾的目标，这将是中国在疾病控制历史上一个里程碑的一页，也将为世界范围内消除或遏制疟疾的流行起到决定性的作用。作为为疾病预防和控制为主要服务对象，并将其作为自己的职责，本申请人研发的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒乘势而出，愿为全国的消除疟疾贡献自我的力量。

[0064] 二、技术效果：

[0065] 本试剂盒在以下几方面完成了技术攻关：

[0066] 1. 样本稀释液的配方

[0067] 本试剂盒检测采用的是受检者的全血样本。与血清或其他体液样本材料相比，样本的黏稠度较高，含有大量的血色素，因此，对样本稀释液的要求较高。稀释液需要满足裂解红细胞、稀释样本、提供适宜的抗原抗体反应环境、层析的流体力学及背景洗涤等多种条件的要求。裂解液的质量对层析的速度、反应沉淀线的质量和背景等多方面都有重要影响。

[0068] 2. 临床使用的便捷性

[0069] 本试剂盒所需使用的样本可以是即刻采集的全血亦可以是添加过 EDTA 抗凝剂的冻存样本。其即可满足现场使用，也可满足实验室所需。且全血使用量仅为 5 μ l。通过指尖、耳垂末梢或者静脉均可得。对“患者”影响较小。

[0070] 3. 与其他方法的比较

[0071] 病原学诊断：取患者耳垂、指尖末梢血或者静脉血涂片、染色、镜检，迄今仍是最可靠的确诊疟疾方法，如发现红内期疟原虫即可确诊。镜检法理论上可检出 4 个疟原虫 / μ l 血，有经验的检验员能检出 50 个原虫 / μ l 血。但镜检法的准确性受到血中原虫密度、制片和染色技术、服药后原虫变形或密度下降，该法需要有经验的检验人员、耗时、费力，对低原虫血症和混合感染容易漏诊、误诊，无法满足快速准确诊断的需要。但因操作简单、经济实用，仍是基层单位检测疟疾的主要手段。

[0072] 免疫学诊断：包括：①检测疟原虫抗原，主要方法有琼脂糖扩散试验、对流免疫电泳、酶联免疫吸附试验、直接荧光或酶免疫染色法和胶体金标记免疫层析法等；②检测疟原虫抗体，借助测定流行区人群抗体水平的高低，来推断疟疾的流行趋势；过筛供血者以预防疟疾输血感染，以及考核抗疟措施的效果等，此外对多次发作又未查明原因者，检测疟疾抗体有助于诊断。较常用的有间接荧光抗体试验、间接血凝试验、酶联免疫吸附试验等。

[0073] IFAT 法：该法在抗原与待测血清结合后加入荧光标记的抗免疫球蛋白抗体进行检测，具有较好的敏感性、特异性和重复性。但有一定主观性，标本无法保存，需荧光显微镜，且只有高滴度 IFAT 才适用于无症状带虫者的确定和临床诊断。

[0074] ELISA 法：该法以酶标记的抗原或抗体与包被在载体上相应的抗体或抗原结合，再与酶底物作用，根据底物显色深浅定性、定量检测抗原和抗体。该方法敏感性好、特异性强、稳定性高。由其衍生出的斑点 ELISA (Dot ELISA)、生物素-亲和素 ELISA (ABC-ELISA)、酶联金黄色葡萄球菌 A 蛋白 ELISA 等一系列方法也具有良好的应用前景。通过基因工程技术合成针对不同抗原多个表位的融合抗体应用于 ELISA 有望建立高特异性、高敏感性的新一代检测试剂盒。

[0075] 免疫层析技术：免疫层析技术是基于双抗体夹心的技术原理，根据待测血样通过检测线时的颜色反应来判断是否有疟原虫感染。免疫层析技术是一类可以快速、批量检测

疟疾的诊断方法；且操作简便，易于判断结果，便于携带、保存、运输，无须贵重仪器设备，适于在偏远地区使用，有望成为自测试纸。

[0076] DNA 探针技术：该方法主要在探针的来源及标记物的选择上有所不同。敏感性、特异性、镜检的阳性符合率均可达到 90%，至少可检出 0.001% 的原虫血症。但因为操作繁复、同位素污染等原因应用较少。

[0077] PCR 方法：PCR 技术因其高度的敏感性、特异性以及对虫种、虫株的鉴别力逐渐取代镜检法成为疟疾诊断的“金标准”，套式 PCR 等方法可进一步提高诊断的敏感性和准确性。但 PCR 方法仍费力耗时，需要多次试验确定混合感染。如何在一次反应中检测多个虫种、虫株、甚至基因型成为近年来研究的热点。反转录 PCR(RT-PCR)、复式 PCR、实时 PCR(real time PCR) 等方法不同程度上满足了这些需要。但检测试剂昂贵，需要专用的仪器设备，不能广泛应用。

[0078] 在攻克上述技术难点后，本试剂盒的优势比较如下：

[0079]

对比项目	病原学诊断 (显微镜)	间接荧光抗体试验 (IFAT)	酶联免疫吸附试验 (ELISA)	基因诊断 (PCR)	免疫层析技术 (本项目)
纳入诊断标准	是	否	否	否	是
专用仪器设备	需要	需要	需要	需要	不需要
专业技术人员	需要	需要	需要	需要	不需要
确诊现患感染	可以	不可以	不可以	可以	可以
虫种特异性	是	否	否	是	是
检测时间	1.5 小时	2 小时	2 小时	3-4 小时	15 分钟
检测成本	低	中	中	高	中
检测稳定性	视镜检人员的经验而定	稳定	稳定	不稳定	稳定
现场检测	否	否	否	否	是

[0080] 三、经济效果：

[0081] 本试剂盒为疟疾病体外诊断、筛选使用。由于生产成本不低，本申请人承担着一一定的社会责任，故经济利益不明显。该产品主要为人类健康服务，为政府服务，为社会服务。

[0082] 综上，本实用新型的胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒可以通过一次取样同时检测间日疟和恶性疟，应用简便，联检结果为下一步准确治疗提供了有力依据，适于大规模推广应用。

[0083] 在此说明书中，本实用新型已参照其特定的实施例作了描述。但是，很显然仍可以作出各种修改和变换而不背离本实用新型的精神和范围。因此，说明书和附图应被认为是

说明性的而非限制性的。

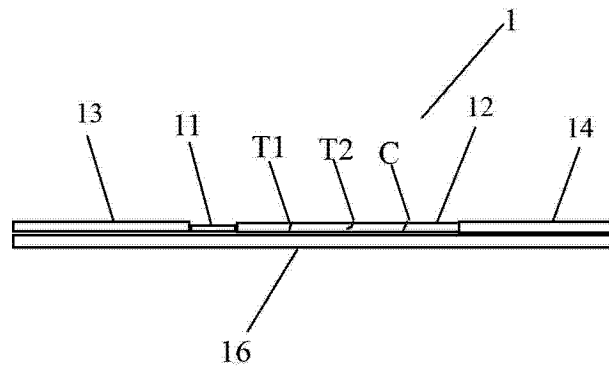


图 1

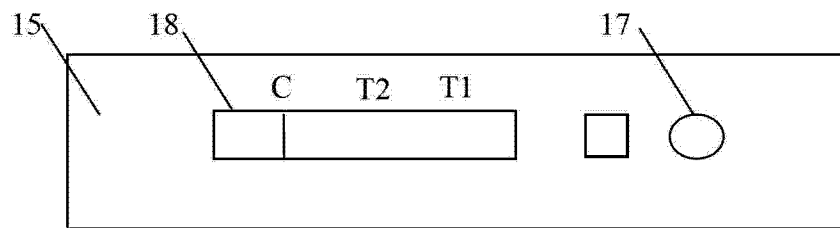


图 2

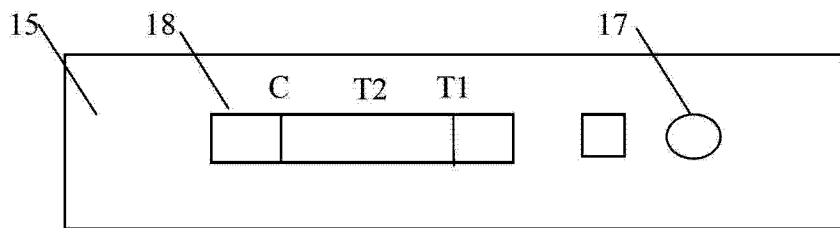


图 3A

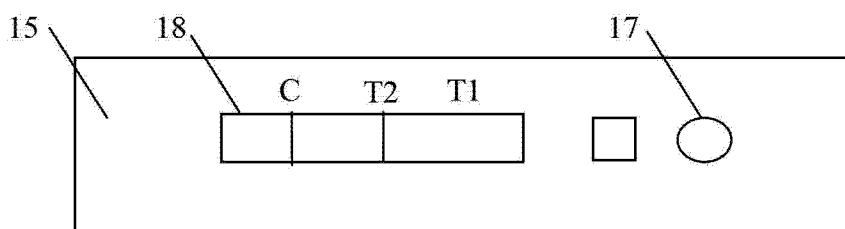


图 3B

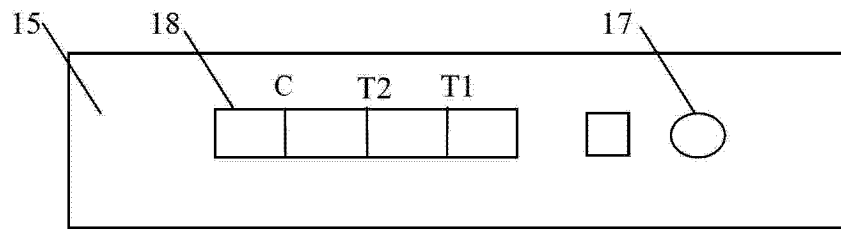


图 3C

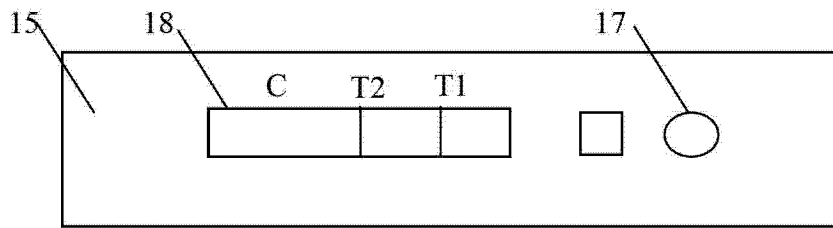


图 4A

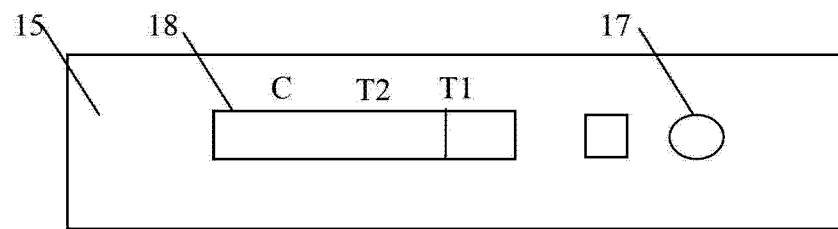


图 4B

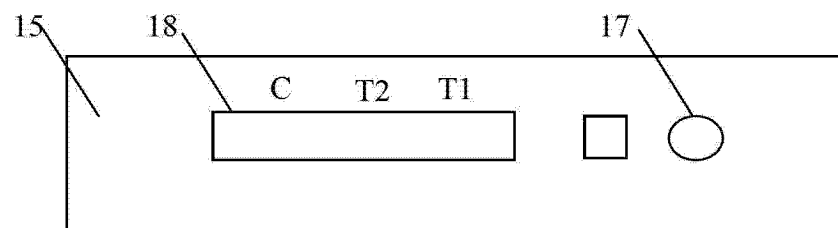


图 4C

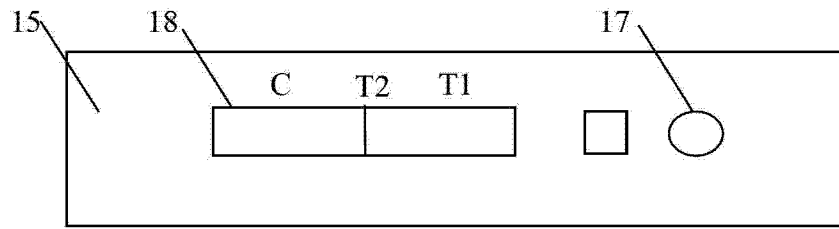


图 4D

专利名称(译)	胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒		
公开(公告)号	CN203178277U	公开(公告)日	2013-09-04
申请号	CN201220536124.8	申请日	2012-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	上海疾控生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海疾控生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海疾控生物科技有限公司		
[标]发明人	刘静 蔡黎 郁嘉铭 唐月红 李宝良 张明敏		
发明人	刘静 蔡黎 郁嘉铭 唐月红 李宝良 张明敏		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/544 G01N33/532		
CPC分类号	Y02A50/58		
代理人(译)	王洁 郑暄		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试剂盒，包括胶体金免疫层析法疟疾抗原联检试纸条，其金标垫上具有间日疟检测胶体金标记抗体和恶性疟检测胶体金标记抗体，其硝酸纤维素膜上包被有间日疟检测抗体和恶性疟检测抗体。较佳地，间日疟检测胶体金标记抗体和间日疟检测抗体分别是第一和第二抗疟原虫乳酸脱氢酶抗体。恶性疟检测胶体金标记抗体和恶性疟检测抗体分别是第一和第二抗富组氨酸蛋白II抗体。试纸条还包括样品垫、吸水滤纸、盖板和底板，试剂盒还包括裂解液存放容器。本实用新型可以通过一次取样同时检测间日疟和恶性疟，应用简便，联检结果为下一步准确治疗提供了有力依据，适于大规模推广应用。

