

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610000293.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月18日

[11] 公开号 CN 101000344A

[22] 申请日 2006.1.9

[21] 申请号 200610000293.9

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物
流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号军医
科院微生物流行病学研究所

[72] 发明人 端青 檀华 朱虹 何君
左庭婷 苏裕心

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关畅

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸
及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸及其制备方法。该免疫层析试纸,包括依次紧密串联的样品垫、含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针的金标垫、硝酸纤维膜和吸水垫;所述硝酸纤维膜上包被有相互分离的一条检测线和一条质控线,所述检测线为炭疽芽孢杆菌抗原,所述质控线为 IgG。本发明可检测人和动物血清中抗炭疽芽孢杆菌荚膜抗原的抗体,用于炭疽芽孢杆菌感染诊断。

1、一种检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸，包括依次紧密串联的样品垫、含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针的金标垫、硝酸纤维膜和吸水垫；所述硝酸纤维膜上包被有相互分离的一条检测线和一条质控线，所述检测线为炭疽芽孢杆菌抗原，所述质控线为 IgG。

2、根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸，其特征在于：所述检测线为炭疽杆菌荚膜多糖抗原。

3、根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸，其特征在于：所述质控线为兔 IgG。

4、根据权利要求 1 所述的免疫层析试纸，其特征在于：所述样品垫、吸水垫、金标垫均由吸水材料制成；所述吸水垫的下面还紧密连接有背板。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的免疫层析试纸，其特征在于：所述金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针由下述方法制备：用纯水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%，煮沸后每 100ml 氯金酸溶液进行以下操作：加入 1%的柠檬酸三钠水溶液 1.6ml，继续煮沸 12 分钟，用纯水恢复原体积 100ml，冷却至室温后用 0.2 M K_2CO_3 或 0.1 M HCl 调节胶体金溶液 pH5.9-6.9，磁力搅拌下按 7ug/ml 加入 SPA，15min 后加入 2ml 10%的聚乙二醇 20000，继续搅拌 20min，23,000g 离心 15 分钟，吸出上清，20,000-32,500g 离心 25-35 分钟，弃上清，沉淀即为 SPA 标记胶体金探针，用 0.35%四硼酸钠保存液恢复至原体积的 1/10，即 10ml，即为 SPA 标记胶体金探针溶液；所述百分含量均为质量百分含量。

6、一种制备检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原；用 0.01M pH 7.2 的 PB 缓冲液将炭疽芽孢杆菌多糖抗原稀释为 0.25-0.75mg/ml，包被 NC 膜的一个区域，得到检测线；用 0.01M pH 7.2 的 PBS 缓冲液将 IgG 稀释为 2-5mg/ml，包被 NC 膜的另一区域，得到质控线；37°C 干燥 2-4 小时，然后将其一端粘贴在吸水纸垫上；

2) 制备含有金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针；取金黄色葡萄球菌蛋白 A 标记胶体金探针 5ml 加入 0.5g 蔗糖，充分溶解后将玻璃纤维膜、树脂浸入上述探针溶液中，得到金标垫，在 -20°C ~ -50°C 干燥 8-12 小时后，将其粘贴在步骤 1) 中得到的硝酸纤维膜的另一端；

3) 在步骤 2) 中的金标垫上面再贴样品垫，得到检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述炭疽芽孢杆菌抗原的浓度为

0.5 mg/ml; 所述 IgG 的浓度为 3 mg/ml; 所述吸水垫的下面还粘贴有背板; 所述调节 pH 值的 K_2CO_3 的浓度为 0.15-0.25M; 所述调节 pH 值 HCl 的浓度为 0.08-0.12mol/L。

8、根据权利要求 6 或 7 所述的方法, 其特征在于: 所述 IgG 为兔 IgG。

9、根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于: 所述炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原按照下述方法制备: 经活化的炭疽芽孢杆菌 17003-59 接种葡萄糖半胱氨酸血琼脂斜面, 37°C 培养 72 小时, 无菌生理盐水洗下菌苔于三角烧瓶中, 加棉塞, 流通蒸汽 1.5 小时, 10,000g 离心, 收集上清即得到炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原。

10、含有权利要求 1-5 中任一所述的检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸的试剂盒。

一种检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测炭疽芽孢杆菌感染的试纸及其制备方法，特别涉及一种检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸及其研制方法。

背景技术

炭疽（anthrax）是由炭疽杆菌引起的动物源性急性传染病，是人畜共患传染病。原系食草动物（主要是食草动物，如牛、马、羊、驴、骡等）的传染病，其次是猪、犬、猫等，人是次要的传染源。但是，当人直接或间接地接触病畜和染菌的皮、毛、肉及其产品或食用病畜的肉类等，也会感染炭疽。人感染炭疽，主要是由于职业的关系与病畜或染菌的产品接触所造成的。病畜主要经尿和粪便排菌，病畜死亡后其皮毛、血液及肉中含有大量炭疽杆菌。人的炭疽往往在畜疫发生后随之出现，在牧区及特殊情况下（如水灾时），应特别警惕炭疽的传播与流行。炭疽多发生于农牧业地区，包括拉丁美洲、南欧、东欧、亚洲、非洲、加勒比海和中东地区。

人类对炭疽普遍易感，但到目前尚无人与人直接传播的报告，感染后有持久的免疫力。

以感染途径不同可分为皮肤型、肠型和肺型三种：皮肤炭疽、肺炭疽和肠炭疽。当机体抵抗力降低时，致病菌即迅速沿淋巴管及血管向全身扩散，形成败血症和继发性脑膜炎。病程潜伏期一般在12小时至12天，平均2-5天。三种类型的炭疽均有可能致死，但皮肤型常能自愈。

全世界人炭疽病例中，皮肤型炭疽占95%-99%。皮肤炭疽是通过皮肤损伤而感染的，开始表现为类似蚊虫叮咬的小疱，但是一到两天之后则呈疱疹状，然后溃破成溃疡，直径通常为1-3厘米并且中间有黑色的坏死区域，周围也会出现淋巴结肿胀，在没有接受任何治疗的皮肤炭疽患者中，死亡率大约是20%，如经及时诊治，几乎不会有死亡的情况发生。肺炭疽是通过吸入炭疽芽孢所致，主要的症状与感冒类似，出现病症几天后，病人出现严重的呼吸问题和中风，肺炭疽通常可以致人死亡。肠炭疽是通过胃肠粘膜损伤而致，主要是由于进食带菌肉类所致，以急性肠道感染为特征，其主要症状为恶心、厌食、呕吐和发热，重者腹痛、吐血并有严重的水样便，肠炭疽导致的死亡病例占患者25%-60%。

炭疽杆菌败血症患者，全身各组织及脏器均为广泛性出血性浸润、水肿及坏死，并有肝、肾浊肿和脾肿大。脑膜炭疽（炭疽性脑膜炎）多为继发性，起病急骤，有

剧烈头痛、呕吐、昏迷、抽搐，明显脑膜刺激症状，脑脊液多呈血性，少数为黄色，压力增高，细胞数增多，脑膜炭疽的软脑膜及脑实质均极度充血、出血及坏死，大脑、桥脑和延髓等组织切面均见显著水肿及充血，蛛网膜下腔有炎性细胞浸润和大量菌体。病情发展迅猛，常因误诊得不到及时治疗而死亡。

炭疽杆菌为革兰阳性粗大杆菌，长5-10 μm ，宽1-3 μm ，排列如竹节，无鞭毛，不能运动。在人及动物体内有荚膜，在体外不适宜条件下形成芽胞。本菌繁殖体的抵抗力同一般细菌，在普通琼脂肉汤培养基上生长良好，其芽胞抵抗力很强，在土壤中可存活数十年，在皮毛制品中可生存90年。煮沸40分钟、140 $^{\circ}\text{C}$ 干热3小时、高压蒸气10分钟、20%漂白粉和石灰乳浸泡2日、5%石碳酸24小时才能将其杀灭。

炭疽杆菌主要有4种抗原：①荚膜多肽抗原，有抗吞噬作用。②菌体多糖抗原，有种特异性。③芽胞抗原。④保护性抗原，为一种蛋白质，是炭疽毒素的组成部分。有毒株产生的毒素有3种，除保护性抗原外，还有水肿因子，致死因子。炭疽杆菌能产生毒力很强的外毒素，引起局部出血、坏死和周围水肿，并引起毒血症。

在炭疽芽孢杆菌中，有两种不同的质粒。一种决定炭疽芽孢杆菌产生荚膜，可以抵抗动物身体内白细胞的吞噬。另一种决定这种细菌产生致死因子和水肿因子。这些毒素进入细胞，就能使细胞破裂死亡。正由于这些毒素，食草动物感染炭疽后，才会那么快死亡；也由于毒素破坏了血管的细胞，才会那么严重的出血，把细菌带出体外，造成无法收拾的污染。以今天科学发展的水平，至少，现在还没有好的办法，来阻止炭疽污染不断扩大。

在美英开始对阿富汗塔利班政权开始军事打击后，美国国内先后传出了几例病人感染炭疽病的消息，有感染者死亡，美有关部门在经过调查后否定了自然感染的原因，已经初步认定此事可能与恐怖袭击有关。炭疽是一种严重的疾病，不管哪一种类型的炭疽，没有得到正确的治疗，都会发展成败血症炭疽或肺炭疽，很容易引起死亡，还有可能在人与人之间传播。生物恐怖主义者看中这种细菌，还因为它几乎是一种永不死亡的细菌，在环境恶劣的时候，它们能够形成芽孢，因而很不容易死亡。环境条件一变好，又成了能够繁殖的细菌。正因为炭疽芽孢杆菌的这种性质，它成了最早采用的细菌战剂，至今仍在使用。生物恐怖主义者不需要去占领任何土地，而炭疽又能给一个国家造成永久性的，甚至是无法恢复的损害。

自美国“9·11”事件发生后，在“炭疽邮件”事件中，已被证实感染皮肤炭疽18例，其中5例吸入性炭疽患者死亡。当局声称可能与恐怖活动有密切关系，引起国际社会的高度关切。人们从认识这种疾病并与其斗争已经有100多年的历史，积累了丰富的防治经验。自1876年证明其病源以来，本世纪30年代成功地研制出

兽用高效疫苗，并已应用至今；40年代抗生素的应用，收到了良好的预防和治疗效果；80年代国外许多学者采用分子生物学、基因重组技术，在炭疽致病机理、疫苗研制等方面取得了重大进展，并在实验诊断技术方面也有了较大的改进。然而，目前阶段，炭疽对人类仍然构成威胁，在世界各地频繁出现爆发流行，特别是在发展中国家。近年来在非洲最严重的人间流行发病达万余人，每年有大批的牲畜死亡，造成重大的经济损失，人类炭疽病例也不断发生。

炭疽诊断是根据临床诊断和实验室检查进行。主要根据流行病学线索，如病人生活在已被证实存在炭疽的地区内，或在发病前14日内到达过该类地区，接触过可疑的病、死动物或其残骸，食用过可疑的病、死动物肉类或其制品。其次为临床表现，动物没有先兆突然倒地死亡，应疑似炭疽，从死亡动物的鼻、口或肛门中流出血性液就应特别警惕可能是炭疽。实验室检查主要是皮肤损害的分泌物、痰、呕吐物、排泄物或血液等样本中，涂片显微镜检查发现炭疽杆菌。病人未治疗前按采样要求取上述标本，用适宜培养基地进行分离培养，检出革兰阳性，呈链状大杆菌，经鉴别实验确定为炭疽杆菌则是确定诊断的依据。

但是，这些诊断和检测手段比较繁琐，都需要特殊的仪器和试剂，必须是有经验的技术人员在实验室中操作，并且标本处理需要较长的时间，因此不适于在基层和突发事件现场使用。不适合于现场诊断及非专业人士使用。因此建立一种炭疽杆菌感染的快速检测方法，对疾病的及时诊断和治疗，减少经济损失非常必要。

发明创造内容

本发明的目的是提供一种检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸。

本发明所提供的检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸，包括依次紧密串联的样品垫、含有金黄色葡萄球菌蛋白A（SPA）标记胶体金探针的金标垫、硝酸纤维素膜（NC膜）和吸水垫；所述硝酸纤维素膜上包被有相互分离的一条检测线和一条质控线，所述检测线为炭疽芽孢杆菌抗原，所述质控线为IgG。

所述检测线为炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原。

所述质控线优选为兔IgG。

为了使用更加方便，所述吸水垫的下面还紧密连接有背板。背板的材料可以是多种多样的，如塑料、树脂等。

所述样品垫、吸水垫、金标垫均由吸水材料制成，如由玻璃纤维膜、吸水纸、树脂等制成。

使用时，可将检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸的样品垫直接浸于样品中；还可将检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸装入带有方便添加样品的样品孔和便

于观察检测线和质控线的检测窗口的盒中，其中，样品孔对准试纸的样品垫，检测窗口对准试纸的检测线和质控线。

本发明的第二个目的是提供一种制备上述检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的方法。

本发明所提供的制备上述检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的方法，包括以下步骤：

1) 制备炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原；用 0.01M pH 7.2 的 PB 缓冲液将炭疽芽孢杆菌抗原稀释为 0.25-0.75mg/ml，包被 NC 膜的一个区域，得到检测线；用 0.01M pH 7.2 的 PBS 缓冲液将 IgG 稀释为 2-5mg/ml，包被 NC 膜的另一区域，得到质控线；37℃干燥 2-4 小时，然后将其一端粘贴在吸水纸垫上；

2) 制备含有金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 标记胶体金探针；取金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 标记胶体金探针 5ml 加入 0.5g 蔗糖，充分溶解后将玻璃纤维膜、树脂浸入上述探针溶液中，得到金标垫，在 -20℃~-50℃干燥 8-12 小时后，将其粘贴在步骤 1) 中得到的硝酸纤维膜 (NC 膜) 的另一端；

3) 在步骤 2) 中的金标垫上面再贴样品垫，得到检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸。

为了使用更加方便，所述吸水垫的下面还粘贴背板。

所述步骤 1) 中，炭疽芽孢杆菌抗原的浓度优选为 0.5 mg/ml；所述 IgG 的浓度优选为 3 mg/ml。

所述 IgG 可为兔 IgG。

本发明所提供的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸及其制备方法中，所述炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原可按下述方法制备：经活化的炭疽芽孢杆菌（军事医学科学院微生物流行病学研究所，保藏号为 17003-59）接种葡萄糖半胱氨酸血琼脂斜面，37℃培养 72 小时，无菌生理盐水洗下菌苔于三角烧瓶中，加棉塞，流通蒸汽 1-1.5 小时，10,000g 离心，收集上清即得到炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原。

所述金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 标记胶体金探针可由下述方法制备：将 HAuCl_4 配制成 0.01% 水溶液，取 100ml 加热至沸，搅动下准确加入 1.6ml 的 1% 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 水溶液，继续加热煮沸 10-15 分钟，直到液体颜色稳定成葡萄酒红色，冷却后用水恢复至原体积，用 K_2CO_3 或 HCl 调 pH 值为 5.9-6.9，按 7ug/ml 加入金黄色葡萄球菌蛋白 A，搅拌 15-20 分钟，然后加入 2ml 10% 聚乙二醇 20000，搅拌 20 分钟，23,000g 离心 15 分钟，吸出上清，20,000-32,500g 离心 25-35min，弃上清，收集沉淀用四硼酸钠洗涤一次后用四硼酸钠保存液收集沉淀 10 ml，即得到金

黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 标记胶体金探针；所述百分含量均为质量百分含量。

所述调节 pH 值的 K_2CO_3 的浓度可为 0.15-0.25M，优选为 0.2M；所述调节 pH 值 HCl 的浓度可为 0.08-0.12mol/L，优选为 0.1mol/L。

在实际应用中，所述纤维膜的厚度可为 2.5-3mm；所述金标垫的厚度可为 30-70mm；所述样品垫的厚度可为 0.1-0.2mm。

炭疽芽孢杆菌荚膜抗原是炭疽芽孢杆菌的特异性抗原，炭疽芽孢杆菌所属的芽孢杆菌属的其它细菌不具备荚膜抗原。另外，炭疽芽孢杆菌有毒株具有丰富的荚膜抗原，而炭疽芽孢杆菌弱毒株和无毒株具有少量或不具有荚膜抗原。本发明的检测原理是将炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原包被在 NC 膜上，用于捕捉样品中炭疽芽孢杆菌抗体，然后用标记了 SPA (金黄色葡萄球菌蛋白 A) 的免疫胶体金探针检测；阳性样品中，炭疽芽孢杆菌抗体的 Fc 端与金颗粒上的 SPA 结合，Fab 端与 NC 膜上的炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原结合，层析 2 分钟后出现肉眼可见的沉淀线。

本发明的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸可检测人和动物血清中炭疽芽孢杆菌荚膜抗原的抗体，用于炭疽芽孢杆菌感染的诊断。本发明的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸及其制备方法与现有的其他方法相比，特异性强，更简便，更快速，检测过程中标本处理简单，不需要专门仪器和人员培训，非专业技术人员即可操作，并可迅速观察结果，很适合突发事件现场和基层使用。

附图说明

图 1 为炭疽芽孢杆菌免疫层析试纸的结构示意图。

具体实施方式

实施例中用到的主要材料

氯化金 ($HAuCl_4$)：购自成都化学试剂厂，1g/瓶包装。

柠檬酸三钠 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)，分析纯，北京化工厂；

碳酸钾 (K_2CO_3)，分析纯，北京化工厂；

SPA (金黄色葡萄球菌蛋白 A)：购自 Amershan Pharmacia Biotech 公司。

NC 膜：购自 Millipore 公司。

炭疽杆菌 (购自军事医学科学院微生物流行病学研究所，保藏号为 17003-59)

下述实施例中的实验方法，如无特别说明，均为常规方法。

下述实施例中的百分含量，如无特别说明，均为质量百分含量。

实施例 1、检测炭疽芽孢杆菌抗体的免疫层析试纸的制备

1、炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原的制备

经活化的炭疽芽孢杆菌 (军事医学科学院微生物流行病学研究所，保藏号为

17003-59) 接种葡萄糖半胱氨酸血琼脂斜面, 37℃培养 72 小时, 无菌生理盐水洗下菌苔于三角烧瓶中, 加棉塞, 流通蒸汽 1.5 小时, 10,000g 离心, 收集上清即得到炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原。

炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原液体为淡黄色透明液体。通过与炭疽芽孢杆菌抗血清双向琼脂扩散实验结果表明, 该炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原与炭疽芽孢杆菌抗血清双向琼脂扩散效价为 1:32。其中, 炭疽芽孢杆菌抗血清是以该炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原为免疫原, 按常规方法免疫兔得到的抗血清。

2、金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 胶体金探针的制备

用纯水溶解氯金酸使其终浓度为 0.01%, 煮沸后每 100ml 氯金酸溶液进行以下操作: 加入 1% 的柠檬酸三钠水溶液 1.6ml, 继续煮沸 12 分钟, 用纯水恢复原体积 100ml, 冷却至室温后用 0.2 M K_2CO_3 或 0.1 M HCl 调节胶体金溶液 pH6.0, 磁力搅拌下按 7ug/ml 加入 SPA, 15min 后加入 2ml 10% 聚乙二醇 20000, 继续搅拌 20min, 23,000g 离心 15 分钟, 吸出上清, 20,000-32,500g 离心 25-35min, 弃上清, 沉淀即为 SPA 标记胶体金探针, 用 0.35% 四硼酸钠保存液恢复至原体积的 1/10, 即 10ml, 即为 SPA 标记胶体金探针溶液, 4℃ 冰箱保存。

3、检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的制备

如图 1 所示, 检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸由吸水垫 4、硝酸纤维膜 3、金标垫 2 和玻璃纤维膜样品垫 1 四部分组成; 硝酸纤维膜 3 上包被有检测线 5 和质控线 6。

用 0.01M pH 7.2 的 PB 缓冲液 ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.39 g, Na_2HPO_4 1.07g, 去离子水 1000ml) 稀释炭疽芽孢杆菌荚膜多糖抗原, 浓度为 0.25-0.75mg/ml, 用于包被检测线 5。用 0.01M pH 7.2 的 PBS 缓冲液 ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.39 g, Na_2HPO_4 1.07g, NaCl 8.5g, 去离子水 1000ml) 稀释兔 IgG, 浓度为 2-5mg/ml, 用于包被质控线 6。用 BIODOT 公司 XYZ3000 喷膜机分别喷于 2.5mm 厚的硝酸纤维素膜 3 上, 形成相互分离的检测线和质控线, 37℃干燥 3h, 然后将其用双面胶粘贴在吸水纸垫 4 上; 取步骤 2 制备的 SPA 标记胶体金探针溶液 5ml 加入 0.5g 蔗糖, 充分溶解均匀加在玻璃纤维上, -20℃~-50℃放置 10 小时, 冻干机抽干, 得到金标垫 2。将该金标垫 2 用双面胶粘贴在上述具有检测线和质控线的硝酸纤维膜 3 上, 再在该金标垫上面用双面胶粘贴 0.15mm 厚的玻璃纤维膜样品垫 1, 最后将它们用双面胶粘贴在塑料背板上, 按所需大小切割, 即为检测炭疽杆菌感染的免疫层析试纸, 加干燥剂后密封保存。

结果表明检测线炭疽芽孢杆菌荚膜抗原包被浓度选择 0.5mg/ml, 质控线兔 IgG 包被浓度选择 3mg/ml 时, 效果最好。

4、炭疽芽孢杆菌免疫层析试纸的使用方法和原理

测定时将试纸条样品垫 1 浸入液体标本中，样品垫 1 即吸取液体向上端移动，流经金标垫 2 时使干片上的 SPA 标记胶体金探针复溶，并带动其向硝酸纤维膜 3 渗透。若标本中有待测特异抗体，其可与金颗粒上的 SPA 结合，此抗原抗体复合物流至检测线 5 即被固相抗原所获，在膜上显出红色反应线条。过剩的抗原抗体复合物继续前行，至质控线 6 与固相兔 IgG 结合，而显出红色质控线条。反之，阴性标本则无反应线条，而仅显示质控线条。

实施例 2、检测临床血清样品

2005 年 8 月沈阳郊区出现炭疽疫情，当地几位农民剖解病死牛患病，临床诊断为皮肤炭疽，使用本发明的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸检测患者血清标本：

炭疽患者血清 5 份，辽宁省疾病预防控制中心提供；健康人血清 5 份，辽宁省疾病预防控制中心提供。

将待检血清标本用生理盐水按 1:40 稀释，将实施例 1 制备的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸装入带有方便添加样品的样品孔和便于观察检测线和质控线的检测窗口的盒中，制成试剂盒，其中样品孔对准试纸的样品垫，检测窗口对准试纸的检测线和质控线。

测定时，分别往试剂盒的样品孔加入上述样品检测液 3 滴（150 μ l），2 分钟后通过检测窗口开始观察结果，15 分钟观察终止。结果报告：检测线处无沉淀线，质控线处出现 1 条红沉淀线为阴性，即无炭疽芽孢感染；质控线和检测线处各出现 1 条红色沉淀线为阳性，即有炭疽芽孢杆菌感染。质控线和检测线处均无红色沉淀线，说明试纸失效。

结果如表 1 所示，5 位炭疽患者血清全部检测为阳性，5 位家属和辽宁省疾病预防控制中心工作人员全部检测为阴性，与临床诊断结果一致。表明实施例 1 制备的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸敏感性和特异性均为 100%。

表 1 炭疽芽孢杆菌免疫层析试纸检测临床血清的敏感性和特异性结果

	份数	阳性份数	阴性份数	敏感性	特异性
炭疽患者血清	5	5	0	100%	
健康人血清	5	0	5		100%

实施例 3、检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸的稳定性试验

按照制造检定规程要求，对检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸的质量进行稳定

性考核，以确定试剂保存条件及有效期。

将实施例 1 制备的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸试剂盒中的三批（批号：020101、020102、020103）分别放入 37℃ 和 20℃ 孵箱中。37℃ 孵箱中的试剂盒，于放置后 10 天、20 天、30 天取出检测。20℃ 孵箱中的试剂盒盒，于放置后每个月检测 1 次，观察并记录 14 个月的实验结果。

将标准炭疽杆菌阳性血清 5 份（由炭疽芽孢杆菌 17003-59 株免疫家兔获得），用生理盐水按 1:5000 稀释用作样品检测液。取实施例 2 制备的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸试剂盒，分别加入上述样品检测液 3 滴（约 150 μ l），2 分钟后开始观察结果，15 分钟观察终止。结果报告：检测线处无沉淀线，质控线处出现 1 条红沉淀线为阴性，即无炭疽芽孢杆菌检出；质控线和检测线处各出现 1 条红色沉淀线为阳性，即有炭疽芽孢杆菌检出。质控线和检测线处均无红色沉淀线，说明试纸失效。

检测结果如表 3~5 所示，表明本发明的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸 37℃ 30 天放置和 20℃ 14 个月放置，检测效果不变。本发明的检测炭疽芽孢杆菌的免疫层析试纸 4-25℃ 避光保存，有效期定为 12 个月。

表 3. 020201 批稳定性试验结果

批次	放置温度	放置时间	标准炭疽阳性血清					盐水
			1	2	3	4	5	
020201	37℃	10 天	+	+	+	+	+	-
		20 天	+	+	+	+	+	-
		30 天	+	+	+	+	+	-
	20℃	1 个月	+	+	+	+	+	-
		2 个月	+	+	+	+	+	-
		3 个月	+	+	+	+	+	-
		4 个月	+	+	+	+	+	-
		5 个月	+	+	+	+	+	-
		6 个月	+	+	+	+	+	-
		7 个月	+	+	+	+	+	-
		8 个月	+	+	+	+	+	-
		9 个月	+	+	+	+	+	-
		10 个月	+	+	+	+	+	-
		11 个月	+	+	+	+	+	-
12 个月	+	+	+	+	+	-		
13 个月	+	+	+	+	+	-		
14 个月	+	+	+	+	+	-		

表 4. 020202 批稳定性试验结果

批 次	放置温度	放置时间	标 准 炭 疽 阳 性 血 清					盐 水
			1	2	3	4	5	
020202	37℃	10 天	+	+	+	+	+	—
		20 天	+	+	+	+	+	—
		30 天	+	+	+	+	+	—
	20℃	1 个月	+	+	+	+	+	—
		2 个月	+	+	+	+	+	—
		3 个月	+	+	+	+	+	—
		4 个月	+	+	+	+	+	—
		5 个月	+	+	+	+	+	—
		6 个月	+	+	+	+	+	—
		7 个月	+	+	+	+	+	—
		8 个月	+	+	+	+	+	—
		9 个月	+	+	+	+	+	—
		10 个月	+	+	+	+	+	—
		11 个月	+	+	+	+	+	—
12 个月	+	+	+	+	+	—		
13 个月	+	+	+	+	+	—		
14 个月	+	+	+	+	+	—		

表 5. 020203 批稳定性试验结果

批 次	放置温度	放置时间	标 准 炭 疽 阳 性 血 清					盐 水
			1	2	3	4	5	
020203	37℃	10 天	+	+	+	+	+	—
		20 天	+	+	+	+	+	—
		30 天	+	+	+	+	+	—
	20℃	1 个月	+	+	+	+	+	—
		2 个月	+	+	+	+	+	—
		3 个月	+	+	+	+	+	—
		4 个月	+	+	+	+	+	—
		5 个月	+	+	+	+	+	—
		6 个月	+	+	+	+	+	—
		7 个月	+	+	+	+	+	—
		8 个月	+	+	+	+	+	—
		9 个月	+	+	+	+	+	—
		10 个月	+	+	+	+	+	—
		11 个月	+	+	+	+	+	—
12 个月	+	+	+	+	+	—		
13 个月	+	+	+	+	+	—		
14 个月	+	+	+	+	+	—		

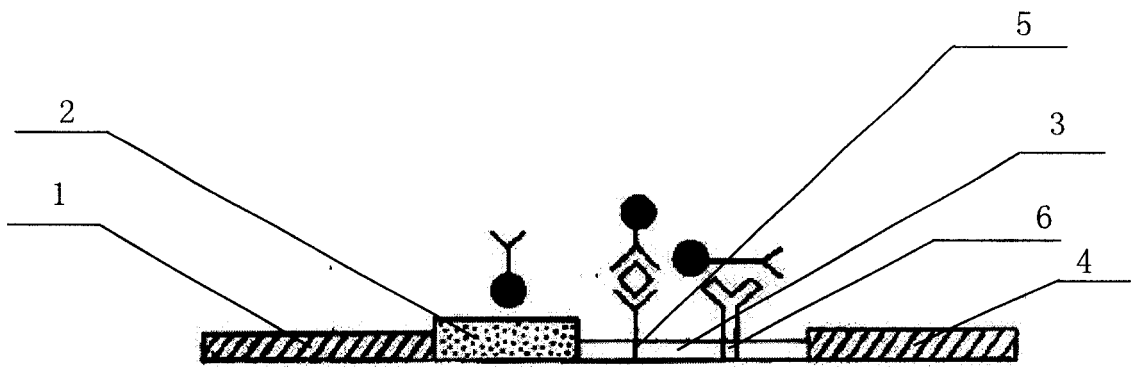


图 1

专利名称(译)	一种检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN101000344A	公开(公告)日	2007-07-18
申请号	CN200610000293.9	申请日	2006-01-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	端青 檀华 朱虹 何君 左庭婷 苏裕心		
发明人	端青 檀华 朱虹 何君 左庭婷 苏裕心		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/532 G01N21/78		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测炭疽芽孢杆菌感染的免疫层析试纸及其制备方法。该免疫层析试纸，包括依次紧密串联的样品垫、含有金黄色葡萄球菌蛋白A标记胶体金探针的金标垫、硝酸纤维膜和吸水垫；所述硝酸纤维膜上包被有相互分离的一条检测线和一条质控线，所述检测线为炭疽芽孢杆菌抗原，所述质控线为IgG。本发明可检测人和动物血清中抗炭疽芽孢杆菌荚膜抗原的抗体，用于炭疽芽孢杆菌感染诊断。

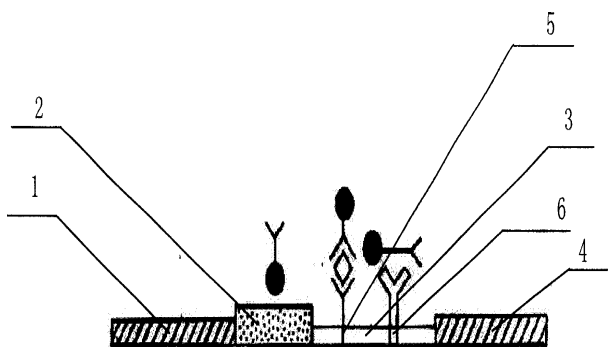


图 1