

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101600965 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 06

(21) 申请号 200780050927. 4
 (22) 申请日 2007. 03. 30
 (30) 优先权数据
 10-2007-0023093 2007. 03. 08 KR
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2009. 08. 05
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/KR2007/001578 2007. 03. 30
 (87) PCT申请的公布数据
 W02008/108510 EN 2008. 09. 12
 (73) 专利权人 疫免美德有限公司
 地址 韩国江原道
 (72) 发明人 金允源 赵敏基 张仁爱 禹秀东
 金泳辰 李美贞 金真淑 卞容焕
 (74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
 有限公司 44224
 代理人 郑小粤

CN 1443774 A, 2003. 09. 24, 全文.
 KR 20020078629 A, 2002. 10. 19, 全文.
 WILD, C. J. et al.. An improved
 immunohistochemical diagnostic
 technique for canine leptospirosis using
 antileptospiral antibodies on renal
 tissue.. 《J. Vet. Diagn. Invest. 》. 2002, 第 14
 卷 (第 1 期), 20-24.
 PRIYA, C. G. et al.. Identification and
 evaluation of LPS antigen for serodiagnosis
 of uveitis associated wit leptopirosis.
 《J. Med. Microbiol. 》. 2003, 第 52 卷 667-673.

审查员 杨冀川

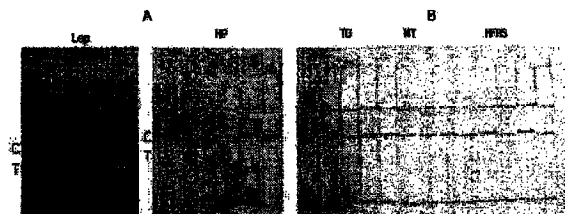
(51) Int. Cl.
 G01N 33/53 (2006. 01)
 (56) 对比文件
 US 7157088 B2, 2007. 01. 02, 全文.
 CN 1514247 A, 2004. 07. 21, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

(54) 发明名称
 钩端螺旋体病诊断试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种诊断钩端螺旋体病的组合物, 所述组合物包括来自钩端螺旋体脂多糖 (LPS) 中的一种多糖作为抗原; 以及一个包括所述多糖的钩端螺旋体病的诊断试剂盒。本发明的诊断试剂盒提供了一种早期, 准确且简便的钩端螺旋体病诊断方法。



* Lep: 钩端螺旋体病患者, HP: 健康人,
 TD: 恙虫病, MT: 鼠斑疹伤寒,
 HFRS: 出血热肾病综合症
 * C: 对照线, T: 测试线

CN 101600965 B

1. 用于钩端螺旋体病的诊断组合物,所述组合物包括来自钩端螺旋体脂多糖的多糖抗原,所述的多糖抗原由核心多糖和 O- 特异侧链组成,其中所述的钩端螺旋体脂多糖中的类脂 A 被除去。

2. 用于钩端螺旋体病的诊断试剂盒,所述试剂盒包括权利要求 1 所述的组合物。

3. 根据权利要求 2 所述的诊断试剂盒,其中所述诊断试剂盒是采用免疫层析的试纸型,采用免疫层析的装置型或微平板型。

4. 根据权利要求 2 所述的诊断试剂盒,其中通过有色颗粒免疫测定法检测抗原-抗体复合物。

5. 一种检测钩端螺旋体抗体的方法,所述方法包括检测由权利要求 1 中所述的组合物与生物样品接触后所形成的抗原-抗体复合物。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述的方法选自包含下列方法的组:蛋白质印迹法,酶联免疫吸附测定法,放射免疫检测法,放射免疫扩散法,Ouchterlony 免疫双扩散法,火箭免疫电泳法,免疫组织染色法,免疫沉淀法,补体结合法,免疫荧光法,免疫层析法,和荧光激活细胞分检仪。

钩端螺旋体病诊断试剂盒

发明领域

[0001] 本发明涉及一种钩端螺旋体病 (Leptospirosis) 的诊断组合物,包括一种来自钩端螺旋体脂多糖 (LPS) 的多糖;以及一个包括上述多糖的钩端螺旋体病的诊断试剂盒;还有一个检测螺旋体的特定抗体的方法,所述方法包括将所述多糖与生物样品相互接触以确认抗原-抗体复合物形成的步骤。

现有技术

[0002] 钩端螺旋体病是由一种螺旋体 (spirochetes) 即问号钩端螺旋体 (*Leptospira interrogans*) 引起的传染病。问号钩端螺旋体可以感染人和动物。1887 年钩端螺旋体病首先被描述成一种伴随黄疸和肾脏异常的严重发热病,被命名为威尔氏病 (Weil's 疾病)。

[0003] 1918 年,首次从威尔氏病患者中分离到了该细菌,并命名为黄疸出血性螺旋体 (*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*), 然后又被命名为黄疸出血性钩端螺旋体 (*Leptospira icterohaemorrhagiae*)。分类学上钩端螺旋体属于钩端螺旋体科。根据致病性,钩端螺旋体属被分成问号 (*Leptospira interrogans*) 和双曲钩端螺旋体 (*Leptospira biflexa*)。目前为止,已知致病性的问号钩端螺旋体被分成 19 个血清群,包括约 180 种血清型。已知血清型的分布根据地理区域而变化。

[0004] 威尔氏病 (或钩端螺旋体病) 是一种急性发热病,第一阶段其引起的典型症状如发烧,头疼,肌肉疼痛和疲劳无力,还可以引起更严重的症状如器官出血,黄疸和肾衰竭。

[0005] 流行病学上,钩端螺旋体病通过被感染动物 (如鼠,牛,马,猪等) 的尿液传播。当人们受伤的皮肤或粘膜表面如鼻子和嘴接触到的土壤和水含有这些被感染动物尿液时,就会被感染。因此,主要的危险职业人群包括农民,屠宰场工人和户外训练的士兵。特别是水灾后,洪水造成了大范围的污染,使感染人群的数量增加。

[0006] 已知钩端螺旋体病会在欧洲,美洲,澳洲,越南,泰国,马来西亚,台湾,中国,日本等国家和地区爆发。在 1942 年,韩国首先报道了具有血清学证据的钩端螺旋体病患者,但之后就再没有关于人钩端螺旋体病感染的报道。在 1984 年,首先从咳血患者中分离到了钩端螺旋体,从而证实了钩端螺旋体病在韩国的存在。之后,在韩国钩端螺旋体病和恙虫病,出血热肾病综合症,鼠斑疹伤寒一起被定义为三类传染病。

[0007] 同时,人们也研究了钩端螺旋体病的诊断方法。韩国专利申请号 1990-0000871 公开了一种固相凝集实验试剂,含有一个多价抗原 I,一个多价抗原 II 和一个诊断钩端螺旋体病的阳性对照血清。专利号为 561687 的韩国专利公开了一种包括一个重组蛋白的诊断试剂盒,该蛋白对问号钩端螺旋体赖型 HY10 血清型具有特异性,韩国专利 234876 公开了一种利用免疫杂交的诊断试剂盒,它包括一个问号钩端螺旋体的抗原。

[0008] 但是到目前为止,钩端螺旋体病诊断方法研究成功的都是利用对钩端螺旋体特异的蛋白的方法,其中,该诊断方法中所用的蛋白和显微凝集试验 (MAT) 中所用的抗原有一些差别。显微凝集试验是被 WHO (世界健康组织) 采用的标准的诊断方法。MAT 法是利用脂

多糖 (LPS) 组分中暴露在表面的一种多糖的方法, 该多糖是钩端螺旋体血清型特异的表面抗原。本发明的方法与标准方法即 MAT 法的原理相似, 即采用了钩端螺旋体属的包含特异抗原的脂多糖中的一种多糖。因此, 实现了对钩端螺旋体病的准确的诊断, 同时利用一种抗原就可以诊断钩端螺旋体病的所有类型。MAT 法与其它诊断方法相比的优势就是诊断更准确, 但是也有缺点, 即很难保持并控制 MAT 法中所用的活菌。而且, MAT 法需要昂贵的仪器, 同时由于其复杂和艰难的过程, MAT 法只能被高度熟练的专业人员来操作。因此, 在医院, MAT 法几乎没有应用。所以本发明人致力于开发了一个简单易用的钩端螺旋体病诊断方法, 从而完成了本发明。

发明内容

[0009] 技术方案

[0010] 因此, 本发明的一个目的是提供一种来自钩端螺旋体属脂多糖的多糖作为钩端螺旋体病诊断的新抗原, 以及一种包括所述多糖的诊断钩端螺旋体病的组合物。

[0011] 本发明的另一个目的是提供一种包括所述多糖的钩端螺旋体病的诊断试剂盒, 以及利用该试剂盒检测钩端螺旋体特异抗体的方法。

附图说明

[0012] 图 1 表示分离自双曲钩端螺旋体 patoc 血清型 Patoc 1 菌株和问号钩端螺旋体赖型血清型多糖的 SDS-PAGE (A) 和蛋白质印迹法的结果, 这可以解释被纯化的多糖的抗原性。

[0013] 图 2 表示使用免疫层析法的钩端螺旋体病诊断试纸条的结构。

[0014] 图 3 表示诊断试剂盒对钩端螺旋体病检测的敏感性和特异性的结果。

[0015] 最佳实施方式

[0016] 在一个实施例中, 本发明涉及一种钩端螺旋体病的诊断组合物, 包括一种来自钩端螺旋体脂多糖 (LPS) 的多糖。

[0017] 本发明中使用的术语“诊断”的含义是: 对病理状态和特征的鉴定。对本发明目的而言, 诊断就是对钩端螺旋体病的鉴定。术语“钩端螺旋体病”的含义是: 一种由属于钩端螺旋体属的致病性螺旋体引起的疾病。

[0018] 钩端螺旋体病的诊断通过直接从患者的血液, 脑脊液和尿液中分离细菌或者检测血清中的抗体来进行。在本发明的一个具体实施例中, 钩端螺旋体病的诊断是通过检测血清中的抗体来实现的。一种来自钩端螺旋体属脂多糖的多糖, 被用作检测血清中抗体的方法中的抗原。本发明人通过 western 印迹和点杂交的方法证实从钩端螺旋体属脂多糖中分离出来的该多糖能够作为钩端螺旋体病诊断中的抗原。本发明人利用钩端螺旋体病患者的血液进行了 ELISA 检测, 并证实钩端螺旋体病患者的血清中存在的抗体利用本发明的多糖可以被显著鉴定。术语“显著性”指的是: 具有高度的正确性和可靠性。“高度正确性”指的是: 诊断的结果是准确的, 而“高度可靠性”指的是: 在重复的检测中结果是一致的。当用 MAT 法诊断过的患者血清再用蛋白抗原的诊断方法检测时, 敏感性和特异性会稍微下降。但是, 当 MAT 法中用本发明中的多糖作为抗原的时候, 将比用蛋白抗原的方法得到更准确的诊断结果。

[0019] 为了检测包括血浆,血清和全血等生物样品中的钩端螺旋体的抗体,采用来自钩端螺旋体脂多糖的一种多糖作为抗原。钩端螺旋体的脂多糖(LPS)包括类脂A,核心多糖和O-特异侧链。类脂A和核心多糖通过2-酮-3-脱氧辛酸(2-keto-3-deoxyoctanicacid, KDO)连接,核心多糖含有葡萄糖,半乳糖和N-乙酰葡萄糖胺。在本发明的一个具体实施例中,所述多糖对钩端螺旋体属有特异性,且含有O-特异侧链和核心多糖,其中不含类脂A。采用上述多糖作为抗原可以增强抗原-抗体反应。

[0020] 在本发明的另一个实施例中,本发明涉及一种钩端螺旋体病的诊断试剂盒,包括来自钩端螺旋体脂多糖(LPS)中的所述多糖。

[0021] 这个试剂盒通过检测生物样品中的钩端螺旋体抗体水平来诊断钩端螺旋体病。这个试剂盒包括来自钩端螺旋体脂多糖的所述多糖,它作为抗原与钩端螺旋体抗体进行反应,来确认抗原-抗体复合物的形成。

[0022] 抗原-抗体复合物的形成可以通过免疫技术进行检测,以western印迹,酶联免疫检测(ELISA),放射免疫检测(RIA),放射免疫扩散法,Ouchterlony免疫双扩散方法,火箭免疫电泳,免疫组织染色检测,免疫沉淀法,补体结合检测,免疫荧光检测,免疫层析法和荧光激活细胞分检仪(FACS)为例,但不限于此。

[0023] 本发明的钩端螺旋体病诊断试剂盒包括与所述抗体特异性结合的上述多糖,和其它免疫分析中常用的工具,试剂或其类似物。这些工具或试剂包括合适的载体,可以产生检测信号的标记底物,增溶剂,去污剂,缓冲试剂和稳定剂,但不限于此。本发明的诊断试剂盒可以是微平板,标尺(dip-stick device),免疫层析试纸条,径向分离免疫测定装置,流通装置或其类似物。本发明的诊断试剂盒还包括标准的正对照和负对照。

[0024] 本发明的诊断试剂盒最好是利用免疫层析的试纸条型或装置类型。采用免疫层析诊断中,生物样品血清中的抗体与胶体金颗粒上的示踪抗体反应,接着通过硝酸纤维素膜上微孔的毛细作用进行转膜。转膜过程中,抗体与与微孔内表面上的捕捉抗原结合,形成色带,从而用眼睛确定检测结果是阳性还是阴性。“示踪抗体”指的是:与有色颗粒结合,且能与钩端螺旋体抗体反应的抗体。

[0025] 本发明的诊断试剂盒中,抗原-抗体复合物可以通过有色颗粒免疫实验来检测,其中有色颗粒可以是胶体金颗粒,有色玻璃珠或塑料(如,聚苯乙烯,聚丙烯,橡胶等)珠,优选胶体金颗粒。

[0026] 在一个具体实施例中,如图2所示,用于检测钩端螺旋体抗体的钩端螺旋体病诊断试剂盒包括一个吸收样品的样品垫;一个胶体金结合垫,其中含有可以与样品中抗体结合的示踪抗体;一个实验膜,包括含有本发明的多糖的检测线,含有对照蛋白的对照线和一个去除非特异性抗体的预检测线;以及一个试纸条,该试纸条中含有吸附剩余样品的吸收垫。

[0027] 检测线含有本发明的多糖浓度为0.5-2.5mg/ml,优选1-2mg/ml。对照线含有对照蛋白浓度为0.1-1mg/ml,优选0.1-0.2mg/ml,对照蛋白可以是兔抗羊IgG,和兔抗蛋白A。预检测线含有如大肠杆菌和假单胞菌这些革兰氏阴性菌脂多糖,其浓度为0.5-1mg/ml,其中脂多糖与本发明中的钩端螺旋体的脂多糖结构相似。胶体金结合垫含有金标记的羊抗人IgM,金标记的羊抗人IgG,金标记的蛋白A或其类似物。

[0028] 采用免疫层析法用条带型诊断试剂盒诊断钩端螺旋体病的方法如下。首先,将待

分析的生物样品滴加到诊断试剂盒的样品吸收垫上,样品吸收垫是吸收样品的部分。生物样品通过毛细作用迁移到含有胶体金的垫上。这时,在含有胶体金的样品垫中,样品中的抗体与示踪抗体如金标记的羊抗人 IgM,金标记的羊抗人 IgG 或金标记的蛋白 A 结合,从而形成胶体。待分析的生物样品不是固定在含有胶体金的样品垫中,而是继续迁移到检测线,其中本发明的多糖抗原是固定化的。如果是来自感染钩端螺旋体病患者的样品,该样品与多糖抗原反应来诱导抗原-抗体反应。也就是,钩端螺旋体抗体与含有胶体金的样品垫中的特定示踪抗体结合,又与固定在检测线中的多糖抗原结合,从而形成紫红色的条带。因此,所形成的条带能用肉眼直接观察。含有胶体金的样品垫剩下的示踪抗体没有与生物样品中的抗体反应,迁移到对照线以与对照蛋白反应形成紫红色的条带,从而确保实验的一致性。如上所述,本发明的诊断试剂盒利用了抗原-抗体反应的免疫层析法进行。因此,任何设备都不需要,且结果可以直接用肉眼迅速观察到。进而,诊断试剂盒的预检测线去除任何可能的钩端螺旋体抗体引起的误诊,从而提高钩端螺旋体病诊断的准确性。

[0029] 在另一个实施例中,本发明涉及一个检测钩端螺旋体抗体的方法,包括一个检测所述多糖与生物样品接触后形成的抗原-抗体复合物步骤。

[0030] 可以检测钩端螺旋体抗体的生物样品的实例包括血液,血清和血浆,但不限于此。

[0031] 下文中,参考实施例详细描述本发明。但是这些例子只是为了说明的目的,并且本发明不限于这些例子。

具体实施方式

[0032] 实施例 1. 钩端螺旋体抗原的制备

[0033] 1-1. 钩端螺旋体菌株的培养

[0034] EMJH(钩端螺旋体培养基,基于 Ellinghausen McCullough Hohnson Harris)0.23g 溶解于 90ml 水中,灭菌备用。加入 10ml 钩端螺旋体富集的 EMJH 于上述培养基中,制备本发明所用的培养基。在上述制得的培养基中接种钩端螺旋体,30℃ 摇瓶培养 5 天。

[0035] 1-2. 钩端螺旋体抗原的制备

[0036] 钩端螺旋体细菌在 EMJH 培养基中培养 5 天后,4000g 离心 20 分钟。沉淀用 1PBS 缓冲液 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 和 2mM KH₂PO₄) 洗涤三次后,100℃ 加热 1 小时。加入 150g/ml 蛋白酶 K, 37℃ 反应 16 小时。加入 EGTA 至终浓度 2mM, 70℃ 反应 15 分钟后,180000g, 4℃ 离心 2 小时。所得沉淀用水悬浮,即得到脂多糖 (Westpha 和 Jann, 1965)。纯化的 LPS 抗原用 1% 醋酸处理后,100℃ 加热 1 小时,然后 3000g 离心 20 分钟。去除沉淀下来的类脂 A, 制得多糖抗原。制得的抗原用标准多糖进行定量检测,其中所述标准多糖是用与上述相同方法从大肠杆菌 (Sigma) 的纯化的脂多糖中制备的。

[0037] 实施例 2: 钩端螺旋体多糖的抗原性分析

[0038] 2-1. Western 印迹分析

[0039] 制备 1mm 或 1.5mm 厚的 12% 的 SDS-PAGE 凝胶,并利用 Bio-Rad II 电泳仪进行 SDS-PAGE。用 Bio-Rad 转膜盒 80V, 30min 使蛋白质从电泳凝胶转移到膜上。膜用含有 5% 脱脂奶, 0.1% 吐温-20 的 1×TBS 缓冲液封闭。兔免疫血清 (L. interrogans strain WH-19) 作为一抗,辣根过氧化物酶结合的抗兔 IgG (Bio-Rad) 稀释 10000 倍后作为二抗。免疫反应

完成后,用 ECL 试剂盒 (Amersham Pharmacia 生物技术公司) 进行免疫印迹。结果如图 1 所示。

[0040] 如图 1 所示,问号钩端螺旋体赖血清型和双曲钩端螺旋体 patoc 血清型 Patoc 1 菌株多糖的 SDS-PAGE 凝胶电泳图非常相似。14KDa 或更大位置的多糖出现在赖血清型和 patoc 血清型中。假定以上述多糖作为抗原。

[0041] 2-2. 点杂交分析

[0042] $1\mu\text{g}$ ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 抗原滴加到硝酸纤维膜上, 37°C 干燥 1 小时。干燥后的膜用含有 5% 脱脂奶的 TBST 封闭 1 小时, 与作为一抗的患者血清 (1 : 3,000 稀释) 反应 1 小时, 辣根过氧化物酶结合的抗人 IgG (稀释 10000 倍) 作为二抗。免疫反应完成后, 用 ECL 试剂盒进行免疫印迹, 然后与 MAT 法的结果进行比较 (表 1)。结果显示: 大多数患者血清都有阳性信号。

[0043] 表 1. 点杂交与 MAT 法结果比较

[0044]

患者编号	MAT		点杂交
	赖型	犬型 (Canicola)	
90-34	320	-	-
90-94	640	160	+++
90-227	1280	40	+++
91-23	-	20	-
91-121	-	20	+
91-211	320	-	+++
91-276	20	-	-
94-200	320	-	+
95-2	20	320	-
95-85	-	-	+
96-40	80	80	-
97-39	80	-	+
97-163	1280	80	++
97-212	1280	80	+++
97-330	80	160	+
98-111	640	80	+++
98-156	320	160	+++
98-166	640	-	++

[0045] 2-3 酶联免疫检测 (ELISA) 检测

[0046] 在 Engvall 和 Perlmann (1972) 介绍的方法的基础上进行多糖的 ELISA 检测。聚-L-赖氨酸 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 用 0.01MPBS 稀释预处理微孔板, 然后在室温反应 24 小时。然后微孔板用含有 0.05% 吐温-20 的 PBS 缓冲液洗涤二次。所述多糖悬浮在 PBS 缓冲液中, 每孔加入 $100\mu\text{l}$ 处理微孔板。微孔板 37°C 反应 1 小时, 然后用含有 0.05% 吐温-20 的 PBS 缓冲液洗涤三次。微孔板用羊血清在 37°C 进行封闭。来自 20 名钩端螺旋体病患者和 20 名

健康人的血清作为一抗,辣根过氧化物酶结合的抗人 IgG (Bio-Rad) 稀释 10000 倍后作为二抗。每个孔都加入底物进行孵育,用酶标仪在 490nm 检测每个孔的吸光度。结果显示:钩端螺旋体鞭毛的重组蛋白有 72-88% 的灵敏性,88-95% 的特异性;而本发明的多糖具有 95% 的灵敏性和 95% 的特异性。相应地,作为钩端螺旋体病早期诊断的候选抗原,所述多糖好于上述蛋白(表 2)。

[0047] 表 2. ELISA 的灵敏性和特异性

[0048]

抗原	多糖	
	patoc 血清型	赖血清型
灵敏性 (%) ^a	95	95
特异性 (%) ^b	95	95

[0049] a: MAT 法检测的患者血清个数: 20

[0050] b: 正常血清数: 20

[0051] 实施例 3. 诊断试剂盒的生产

[0052] 3-1. 钩端螺旋体抗原(多糖)在硝酸纤维素膜上的固定化

[0053] 通过静电相互作用,在硝酸纤维素(NC)膜(孔径: 5 μm)上固定特定抗原以捕捉特定抗体。用分布器以 1 μl/cm 的速度,将纯化的抗原(多糖)线性加到距硝酸纤维素膜条(5×25mm)底部 1cm 的地方,硝酸纤维素膜条背面有塑料背板,对照抗体(兔抗羊 IgG 或兔抗蛋白 A)线性加到距硝酸纤维素膜条底部 1.4cm 的地方。硝酸纤维素膜在 37°C 干燥 1 小时。

[0054] 以不同浓度的纯化多糖进行实验。结果,当抗原浓度为 1mg/ml 的时候检测到的信号最强。浓度高于或低于 1mg/ml 检测到的信号都减弱。因此,为了获得最强的信号,需要足够量的抗原去结合目标抗体。但是反应区域的抗原过量使得抗原-抗体反应需要的必要空间距离难得到。从而使得免疫粘着反应的机会减少。

[0055] 3-2. 成线形用的抗原缓冲液

[0056] 吐温-20 影响抗原的非特异性反应。随着其浓度的增加,信号强度减弱。但是为了去除交叉反应,必需加入吐温-20 溶液。检测了 0.01, 0.05 和 0.1% 吐温-20 的效果。去除交叉反应最有效的浓度是 0.05%。因此,吐温-20 的最适浓度为 0.05%。

[0057] 3-3. 预检测线中使用的抗原的确定

[0058] 在抗原(多糖)产生非特异性信号的情况下,在抗原线前设置了预检测线以去除非特异性抗体。然后,本发明中,钩端螺旋体和其类似细菌(大肠杆菌,铜绿假单胞菌)的脂多糖分别单独或一起使用。从结果来看,0.6mg/ml 的大肠杆菌 LPS 是非常有效的。

[0059] 3-4. 示踪抗体-金络合物在玻璃纤维上的沉积

[0060] (1) 玻璃纤维的选择和预处理条件的确定

[0061] 羊抗人 IgM(μ-特异)胶体金偶联溶液,羊抗人 IgG(H+L)胶体金偶联溶液,或用蛋白 A 标记的胶体金溶液,用 50% 海藻糖溶液(海藻糖终浓度 5%)和蒸馏水稀释到光密度为 3。玻璃纤维膜(Millipore)浸入制备的上述溶液中,然后 37°C 干燥 2 小时。然后将膜切成 0.5cm 宽的长条。

[0062] (2) 成线型胶体金偶联体的量和干燥条件的确定

[0063] 分析系统产生的特定信号强度的增加正比于所使用的胶体金与抗体结合的量。但是,如果胶体金-抗体结合物过量,测试样品中相对低浓度抗体或非特异性抗体产生的非特异性信号会增加,从而产生假阳性结果。在本发明中,采用胶体金(40nm)标记的羊抗人 IgM(μ -特异),胶体金(40nm)标记的羊抗人 IgG(γ -特异),胶体金(40nm)标记的羊抗人 IgG(H+L)或胶体金(40nm)标记的蛋白 A 作为胶体金偶联体。根据每种偶联体的光密度进行比较实验。IgG 在所有的金偶联体中都检测的不好(表 3)。这是因为 LPS 通常是一种 T 细胞非依赖型抗原。认为在免疫应答中, T 细胞非依赖型抗原产生 IgM,却不产生 IgG。因此,在钩端螺旋体病检测中,可以断定 IgM 检测比 IgG 检测更重要(表 3)。可以看到,对胶体金标记的 IgM 最适的光密度是 3。

[0064] 表 3. MAT 法和诊断试剂盒结果的比较

[0065]

患者编号	MAT 法			试剂盒			
	赖血清型	犬血清型	Yeonchon 血清型	蛋白 A	IgG (H+L)	IgG (r)	IgM
2000-100	-	640	-	-	-	-	+
2000-224	0	80	-	+++	+	+	++
2000-307	0	320	320	-	-	-	+
2000-355	-	80	-	+/-	-	-	+
2000-407	0	640	160	-	-	-	+
2001-21	0	160	160	-	-	-	+
2001-116	-	80	-	-	-	-	+
2001-404	0	1280	160	+/-	-	-	++
2001-478	0	640	80	-	-	-	+
2001-479	280	40	1280	++	-	+/-	++

[0066] 3-5. 试纸条的制备

[0067] 设计的系统包括:具有塑料背板的硝酸纤维素膜作为主要结构固定抗原,在硝酸纤维素膜较低的位置沉积有金偶联体的玻璃纤维膜(偶联体垫),和位于硝酸纤维素膜两端,彼此相连,吸附有过量溶液的纤维素膜(样品垫和吸附垫)。玻璃纤维膜在系统较低的位置,由于其较高的吸附能力它不仅可以通过很快吸收样品,而且可以通过延长其向上部迁移的保留时间,诱导待测材料和溶解的胶体金有效的反应。在免疫试纸条的中部,检测待测材料的抗原(检测线或捕捉线)和能检测胶体金的特定抗体(对照线)分别被固定。而且纤维素膜位于免疫试纸条的上部(吸附垫)以快速吸附任何过多的样品(图 2)。

[0068] 3-6. 人血清浓度的确定

[0069] 人血清浓度实验结果显示,过量的血清可以引起非特异反应。以 100 μ l 血清进行测试,并稀释到 1/1000, 1/100, 1/50, 1/10 或 100 μ l 不稀释的血清进行测试。结果:血清稀

释到 1/100 可以得到最好的结果。

[0070] 3-7. 快速诊断试剂盒的灵敏性和特异性

[0071] 为了确定钩端螺旋体病诊断试剂盒的灵敏性和特异性,钩端螺旋体病患者血清和其它发热病(鼠型斑疹伤寒,出血热肾病综合症,恙虫病)患者的血清作为样品。6 个钩端螺旋体病患者血清用 MAT 法进行诊断。5 分钟后,6 个血清全为阳性,因此 IgM(μ -特异)的诊断灵敏性是 100% (图 3)。

[0072] 用 6 个健康人的血清,3 个鼠型斑疹伤寒患者的血清,4 个恙虫病患者的血清和 6 个出血热肾病综合症患者的血清进行交叉反应实验,其特异性为 95% (图 3)。

[0073] 3-8. 在其它研究机构检测实验产品的效率的结果

[0074] 为了确定本发明的钩端螺旋体病诊断试剂盒的灵敏性和特异性,从合作研究机构—翰林大学(Hallym University)获得的钩端螺旋体病患者血清和其它急性发热病(鼠型斑疹伤寒,出血热肾病综合症,恙虫病)患者的血清作为测试样品。用 MAT 法检测 5 个钩端螺旋体病患者血清,5 分钟后,5 个血清全为阳性。因此 IgM(μ -特异)的诊断灵敏性是 100% (表 4)。

[0075] 用 10 个健康人的血清,10 个鼠型斑疹伤寒患者的血清,恙虫病患者的血清和出血热肾病综合症患者的血清进行交叉反应实验,其特异性为 95% (表 4)。

[0076] 表 4

[0077]

	RDK(1 : 100) ^a
钩端螺旋体病 (n = 5)	5
其他的 AFI (n = 10)	1
健康人对照 (n = 10)	0

[0078] a :血清稀释倍数

[0079] 灵敏性 : $5/5 = 100\%$

[0080] 在其它急性发热病(鼠型斑疹伤寒,出血热肾病综合症,恙虫病)中的特异性和健康对照 : $19/20 = 95\%$

[0081] 工业实用性

[0082] 如上所述,本发明新抗原的应用可以实现对钩端螺旋体病的准确,快速,简便的诊断。

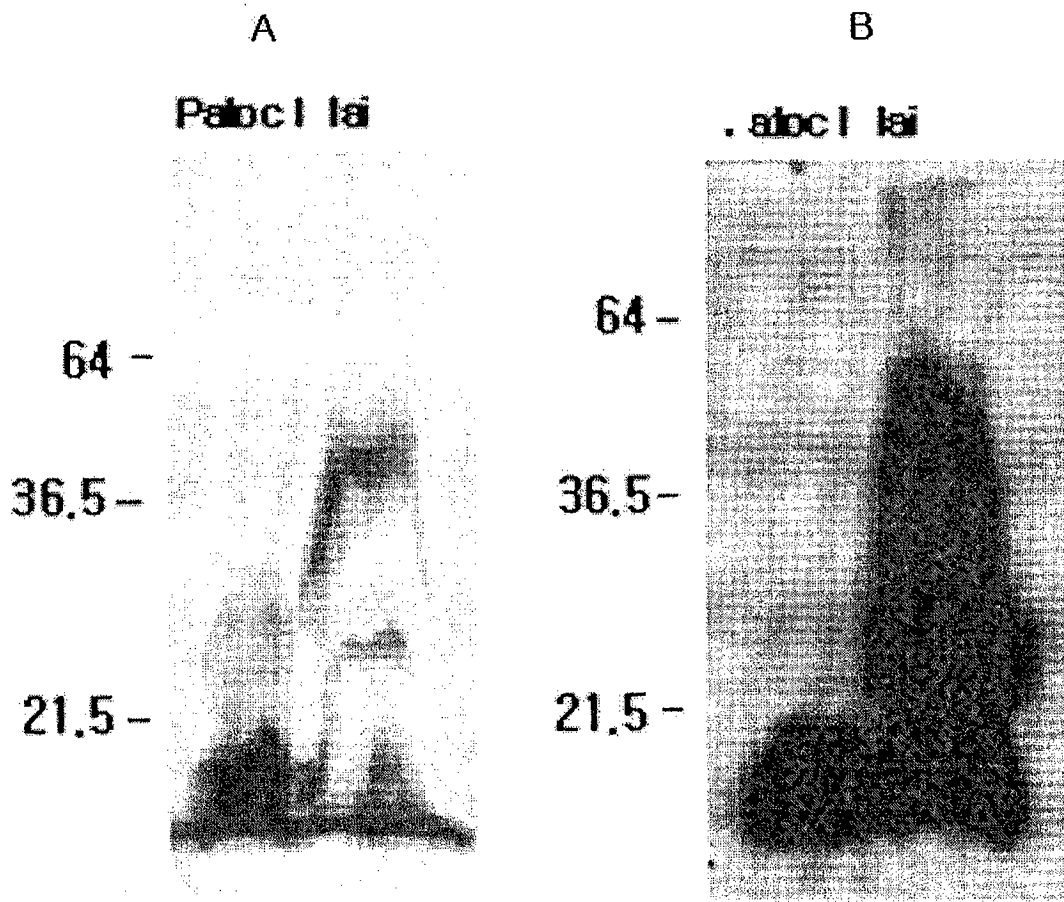


图 1

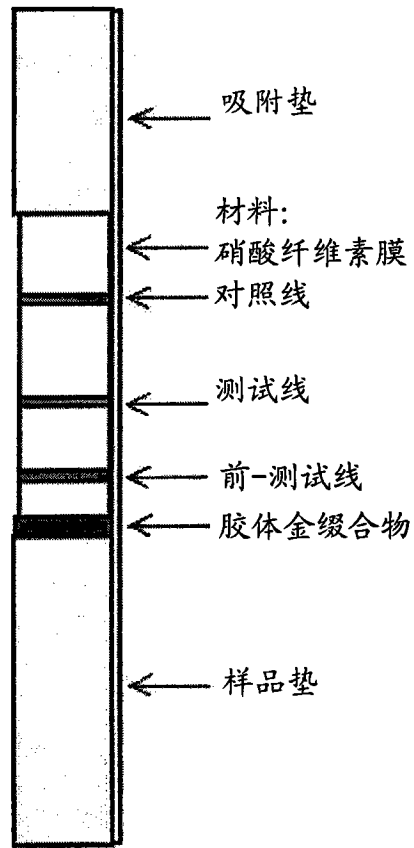
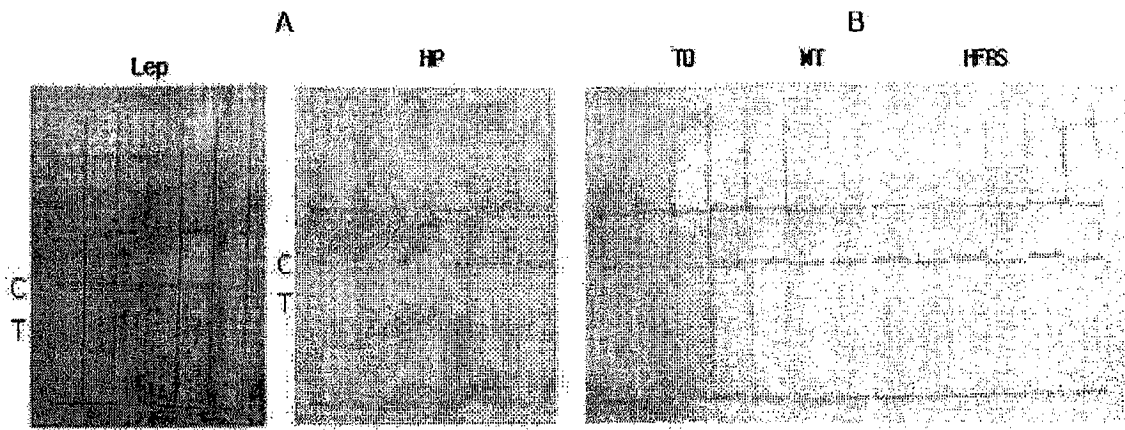


图 2



* Lep: 钩端螺旋体病患者,

HP: 健康人,

TD: 恙虫病,

MT: 鼠斑疹伤寒,

HFRS: 出血热肾病综合症

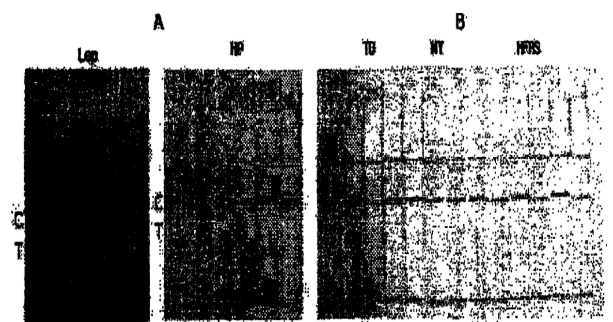
* C: 对照线, T: 测试线

图 3

专利名称(译)	钩端螺旋体病诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN101600965B	公开(公告)日	2013-03-06
申请号	CN200780050927.4	申请日	2007-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社疫免美德		
[标]发明人	金允源 赵敏基 张仁爱 禹秀东 金泳辰 李美贞 金真淑 卞容焕		
发明人	金允源 赵敏基 张仁爱 禹秀东 金泳辰 李美贞 金真淑 卞容焕		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N2469/20 G01N33/56916 G01N2333/20 Y02A50/56		
优先权	1020070023093 2007-03-08 KR		
其他公开文献	CN101600965A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种诊断钩端螺旋体病的组合物，所述组合物包括来自钩端螺旋体脂多糖(LPS)中的一种多糖作为抗原；以及一个包括所述多糖的钩端螺旋体病的诊断试剂盒。本发明的诊断试剂盒提供了一种早期，准确且简便的钩端螺旋体病诊断方法。



* Lep: 钩端螺旋体病患者, HP: 健康人,
 TD: 恙虫病, MT: 鼠斑疹伤寒,
 HFRS: 出血热肾病综合症
 * C: 对照线, T: 测试线