

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)



[12] 实用新型专利说明书

专利号 ZL 200820063447.3

[45] 授权公告日 2009 年 7 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 201277973Y

[22] 申请日 2008.5.19

[21] 申请号 200820063447.3

[73] 专利权人 四川农业大学

地址 625014 四川省雅安市雨城区新康路 46 号

[72] 发明人 杨光友 刘德昊 彭雪蓉

[74] 专利代理机构 成都信博专利代理有限责任公司

代理人 舒启龙 卓仲阳

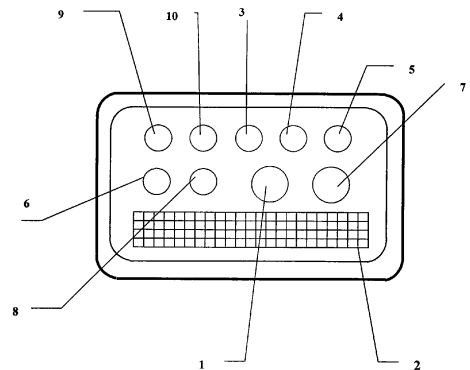
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

[54] 实用新型名称

一种检测犬恶丝虫的斑点酶联免疫试剂盒

[57] 摘要

一种检测犬恶丝虫的斑点酶联免疫试剂盒，涉及犬类免疫抗体检测技术领域，属犬恶丝虫的测试及其试剂盒。其特征是包括包被有包被原的诊断膜片和酶标记物，所述包被原是犬恶丝虫抗原；所述诊断膜片是包被有包被原的硝酸纤维素膜(NC)，所述酶标记物是酶标二抗，试剂盒内还设置有犬恶丝虫病阴性血清、阳性血清、底物溶液、洗涤液小瓶。本实用新型采用硝酸纤维素膜作为固相载体，采用粗提抗原检测犬恶丝虫抗体，制成了所说的诊断膜片，提高了检测方法的特异性和敏感性，检测犬恶丝虫感染犬血清的最高抗体滴度达 1：1024。可快速有效的检测犬恶丝虫感染的抗体水平。从而为预防、诊断犬恶丝虫病奠定了一个良好的基础。



1、一种检测犬恶丝虫的斑点酶联免疫试剂盒，其特征是试剂盒内设置有诊断膜片（2），酶标二抗（3）、犬恶丝虫病阴性对照血清（4）、犬恶丝虫病阳性对照血清（5）、底物溶液（6）、洗涤液（7），所述包被原是犬恶丝虫抗原，所述诊断膜片（2）是包被有包被原的硝酸纤维素膜，以上液体均分装放于小瓶中并置于测试盒中。

一种检测犬恶丝虫的斑点酶联免疫试剂盒

技术领域

本实用新型属犬类免疫抗体检测技术领域，涉及针对犬类感染犬恶丝虫的诊断及其检测试剂盒。

背景技术

在我国，犬恶丝虫感染动物的现象极为普遍，侯洪烈等[中国病原生物学杂志, 2007, 2(1):35-40]对辽宁丹东地区犬的感染情况调查显示，血清阳性感染率为**28.5%**。全国的绝大多数省份已经报道有犬恶丝虫病的存在，除犬猫外，狼、小熊猫、狐、狐尾猴、猩猩、黑猩猩等30多种野生动物和人均可以作为其终末宿主。值得注意的是，免疫力低下的人会被偶尔感染，第三期幼虫可以引起患者肺部及皮下出现结节，病人出现胸痛和咳嗽等症状。寄生虫学分类上犬恶丝虫属线虫类、双瓣科、恶丝属（*Dirofilaria*）的犬恶丝虫（*D. immitis*），感染后寄生于感染者的右心室及肺动脉等处，引起食欲不振、循环障碍、贫血、慢性心内膜炎、右心室扩张、呼吸困难及痉挛性咳嗽等症状，严重时出现心力衰竭、便血、尿血、肝硬化和腹水等[杨光友.动物寄生虫病学[M].成都:四川科学技术出版社,2005:185-187]，称之为犬恶丝虫病或称犬心丝虫病。目前，该病呈全球性分布，在热带和亚热带地区流行程度较高，流行时间比温带和寒带长，特别是在热带地区，该病几乎是全年流行，传播媒介为七十多种蚊虫。近几年在意大利、北美和澳大利亚的流行情况日趋严重。由于犬恶丝虫病的难根治性和广泛分布性，自六、七十年代以来，学者们对其进行了大量的研究工作。到目前为止，国内的资料主要是关于犬恶丝虫的生物学特性、流行病学调查及药物治疗等方面的报道；其检测仍停留在传统的一些方法上，比如虫检法，很少有关于免疫学方面的报道。随着免疫学和分子生物学技术的发展，我们研制了犬恶丝虫免疫抗体的测试试剂盒。

发明内容

本实用新型的目的在于克服上述技术领域中的不足，提供一种检测犬恶丝虫的斑点酶联免疫试剂盒，可快速有效的检测犬恶丝虫感染的抗体水平。从而为预防、诊断犬恶丝虫病奠定一个良好的基础。

实现本实用新型的目的的技术方案是这样的：

一种检测犬恶丝虫的斑点酶联免疫试剂盒,其特征是试剂盒内设置有诊断膜片 2、酶标二抗 3、犬恶丝虫病阴性对照血清 4、犬恶丝虫病阳性对照血清 5、底物溶液 6、洗涤液 7,所述包被原是犬恶丝虫抗原,所述诊断膜片 2 是包被有包被原的硝酸纤维素膜,以上液体均分装放于小瓶中并置于测试盒中。

所述犬恶丝虫抗原按照如下步骤制备:

(1) 用磷酸缓冲液 (PBS) 清洗收集到的犬恶丝虫,清洗 3 次。(2) 用玻璃研钵在冰浴上研磨,直到用显微镜检查无完整虫体组织。(3) 然后将研磨好的犬恶丝虫组织匀浆倒入微量离心管 (Eppendorf) 管中, -20°C 条件下反复冻融 5 次, 4°C 条件下 10000 转/分离心 30 分钟,取上清液。(4) 将上清液无菌过滤 0.22 微米后作为可溶性抗原,并用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量合格后分装于小瓶中, -20°C 条件下保存。

所述的诊断膜片 2 是按照如下步骤制备:

(1) 在硝酸纤维素膜 (NC) 的光滑面将膜划成 5×5 毫米的小方块,(2) 将硝酸纤维素膜 (NC) 在蒸馏水中浸泡 20 分钟,完全湿透后取出,室温晾干,备用;(3) 用微量加样器在小格中央滴加犬恶丝虫抗原 1 微毫升, 37°C 下静置 1 小时;(4) 将包被好的膜片浸入 1% 小牛血清白蛋白 (BSA) 封闭液中, 37°C 封闭 50 分钟;(5) 将封闭好的膜片置洗涤液中泡洗 3 次,每次 5 分钟。置室温晾干,即为诊断膜 2,并放入干燥的塑料袋中保存。

所述的酶标二抗 3 按照如下步骤制备:

(1) 取 5 毫克辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 0.5 毫升双馏水中,加入新配制的 0.06Mol/L (摩尔/升) NaIO_4 水溶液(10ml 双馏水+128mg NaIO_4) 0.5 毫升,混匀, 4°C 下置 30 分钟;(2) 取出后加入 0.16Mol/L 乙二醇水溶液(10ml H_2O +0.09ml 乙二醇)0.5 毫升,室温放置 30 分钟;(3) 加入含 5 毫克葡糖球菌 A 蛋白 (SPA) 的水溶液 1 毫升,混匀,并装入透析袋,对 0.05Mol/L pH 9.5 碳酸盐缓冲液(CBS) 缓缓搅拌透析 6 小时或过夜,使之结合;(4) 加入 NaBH_4 溶液(5mg/ml)0.2 毫升,混匀,置 4°C 2 小时;(5) 在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,混匀, 4°C 30 分钟,离心,去上清液,沉淀以少许 0.02Mol/L pH7.4 磷酸缓冲液 (PBS) 溶解,装入透析袋,以同样液体在 4°C 透析除盐过夜;(6) 次日取出离心,以除

去不溶物，即得所述的酶标二抗结合物，再以 0.02Mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液（PBS）加至 5 毫升；（7）效价测定合格后，加入等量优质甘油，分装小瓶，低温保存。

本实用新型采用硝酸纤维素膜作为固相载体，采用提取抗原检测犬恶丝虫抗体，制成了所说的诊断膜片 2，提高了检测方法的特异性和敏感性，检测犬恶丝虫感染犬血清的最高抗体滴度达 1: 1024。

采用本实用新型对某单位曾用国外试剂盒检测犬恶丝虫呈阳性的小熊猫血清进行检测；同时将采集到的 2 份高免血清，5 份自然感染阳性血清，采用国外试剂盒进行检测。对比实验结果显示，本实用新型的检测敏感性明显高于琼脂扩散实验和国外试剂盒，能够检出感染度较低的病犬，而且待检样品需求量显著小于上述两种方法，更有利于临床应用。

附图说明

图 1 为本实用新型所述的斑点酶联免疫试剂盒构成示意图。

具体实施方式

结合附图与实施例给出更具体的说明。

本实用新型所说的试剂盒包括诊断膜片 2、酶标二抗 3、阴性血清对照品 4、阳性血清对照品 5、底物溶液 6、洗涤液 7（0.01M pH7.4PBST），以上均分装放于小瓶中，装于盒中构成诊断试剂盒。其斑点酶联免疫试剂盒操作判断标准是：出现的斑点呈深蓝色记为“+++”；斑点呈蓝色记为“++”；斑点呈灰蓝色记为“+”；仅有微弱的界限不清的斑点记为“±（可疑）”；无可见斑点记为：“—”。以出现斑点（++）的最高稀释度为阳性血清的抗体滴度。

实施例 1 试剂盒检测操作程序如下：

1、将诊断膜剪成小片放入 96 孔微量反应板中，并使点样面向上。以下反应均在 37℃ 温度条件下进行。

2、加血清：每孔内加入倍比稀释的待检血清 50 微升，作用 1 小时。加洗涤液洗涤，并尽量拍干洗涤液。

3、加酶标二抗：加入 1:4000（推荐工作浓度）辣根过氧化物酶（HRP）—葡萄糖球菌 A 蛋白（SPA）50 μl/孔，作用 1h（小时）。如上洗涤，甩干。

4、加底物：加入底物溶液 50 μl/孔，避光显色 20 分钟后弃去底物。

5、终止反应：用自来水冲洗终止反应，晾干。

试剂盒检测操作结果判定：通过肉眼观察进行结果判定。操作时均须设立阳性血清对照、阴性血清对照、对照成立方可判定。依反应色泽深浅记录反应等级。+++：斑点呈深蓝色；++：斑点呈蓝色；+：斑点呈灰蓝色；±：无可见斑点。±（可疑）：仅有微弱的界限不清的斑点。以出现斑点（++）的最高稀释度为阳性血清的抗体滴度，达到了方便快捷有效的检测出犬恶丝虫感染的抗体水平。

实施例 2 试剂盒应用检测试验：

A、采集 50 份未出现犬恶丝虫临床症状、剖检后未发现有虫体的待检犬血清，根据上述确定的最佳反应条件进行犬恶丝虫斑点酶联免疫检测。其中有 2 份犬血清出现微弱的界限不清的斑点，其余 48 份血清没有出现任何斑点。

B、临床采集 20 份出现犬恶丝虫病临床症状、剖检后发现有虫体的待检犬血清进行犬恶丝虫酶联免疫检测。结果其中有 1 份犬血清出现微弱的界限不清的斑点，其余 19 份血清均有明显的斑点出现。判定为阳性。

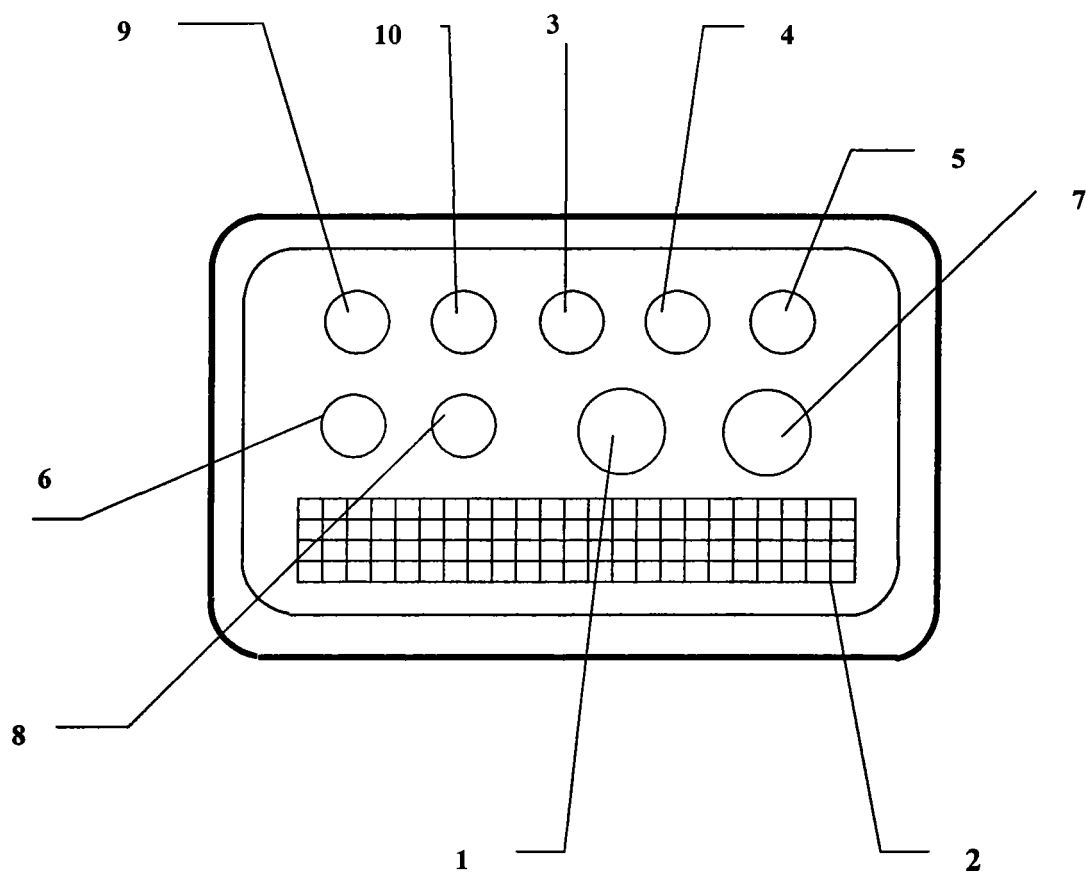


图 1

专利名称(译)	一种检测犬恶丝虫的斑点酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	CN201277973Y	公开(公告)日	2009-07-22
申请号	CN200820063447.3	申请日	2008-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川农业大学		
[标]发明人	杨光友 刘德昊 彭雪蓉		
发明人	杨光友 刘德昊 彭雪蓉		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测犬恶丝虫的斑点酶联免疫试剂盒，涉及犬类免疫抗体检测技术领域，属犬恶丝虫的测试及其试剂盒。其特征是包括包被有包被原的诊断膜片和酶标记物，所述包被原是犬恶丝虫抗原；所述诊断膜片是包被有包被原的硝酸纤维素膜(NC)，所述酶标记物是酶标二抗，试剂盒内还设置有犬恶丝虫病阴性血清、阳性血清、底物溶液、洗涤液小瓶。本实用新型采用硝酸纤维素膜作为固相载体，采用粗提抗原检测犬恶丝虫抗体，制成了所说的诊断膜片，提高了检测方法的特异性和敏感性，检测犬恶丝虫感染犬血清的最高抗体滴度达1:1024。可快速有效的检测犬恶丝虫感染的抗体水平。从而为预防、诊断犬恶丝虫病奠定了一个良好的基础。

