



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 209327357 U

(45)授权公告日 2019.08.30

(21)申请号 201820862282.X

(22)申请日 2018.06.05

(73)专利权人 中国兽医药品监察所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街8号

专利权人 上海容晖生物科技有限公司

(72)发明人 印春生 姚文生 刘业兵 张莹辉
王团结 朱真 康凯 黄华
王学生

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 肖艳 华珊

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

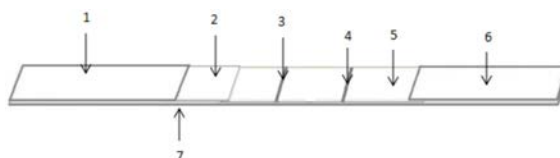
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)实用新型名称

犬细小病毒免疫荧光检测试剂及试剂盒

(57)摘要

本实用新型公开了一种犬细小病毒免疫荧光检测试剂,该检测试剂包括一检测卡(侧流片)和一卡盒,该检测卡包括背衬7以及位于背衬上的样品垫1,荧光乳胶垫2,检测区3,质控区4,硝酸纤维素膜5,吸收垫6,荧光乳胶垫2包被有荧光乳胶标记的犬细小病毒抗体-1;并且检测区3包被有犬细小病毒抗体-2。本荧光检测试剂可通过荧光仪定量检测犬细小病毒,适用于犬、猫、狐狸以及水貂等犬细小病毒病的诊断和防控。



1. 一种犬细小病毒免疫荧光检测试剂,其特征在于,所述检测试剂包括一检测卡,所述的检测卡包括背衬(7),以及位于所述背衬上的从近端到远端的以下结构:样品垫(1)、荧光乳胶垫(2)、检测区(3)、质控区(4)、硝酸纤维素膜(5)、和吸收垫(6);

并且所述的荧光乳胶垫(2)包被有荧光乳胶标记的犬细小病毒抗体-1;

并且所述的背衬(7)为PVC板;

并且所述样品垫(1)为玻璃纤维;

并且所述的样品垫(1)和荧光乳胶垫(2)部分重叠;

并且所述检测区(3)包被有犬细小病毒抗体-2;

所述检测卡的长度为60-70mm,且宽度为3-4mm。

2. 如权利要求1所述的检测试剂,其特征在于,所述的质控区(4)包被有能结合于所述犬细小病毒抗体-1的二抗。

3. 如权利要求1所述的检测试剂,其特征在于,所述的检测区(3)设置在靠近荧光乳胶垫(2)的一侧,且所述的质控区(4)设置在靠近吸收垫(6)的一侧。

4. 如权利要求1所述的检测试剂,其特征在于,所述检测试剂还包括卡盒(8),以及位于所述卡盒上的加样孔(9)和观察窗(10)。

5. 如权利要求4所述的检测试剂,其特征在于,所述的检测卡完全设置于卡盒(8)中,所述加样孔(9)对应于所述检测卡上的样品垫(1),且所述观察窗(10)对应于所述检测卡上的检测区(3)和质控区(4)。

6. 如权利要求4所述的检测试剂,其特征在于,所述卡盒的长度为80-90mm,宽度为10-20mm,且高度为4-5mm。

7. 如权利要求1所述的检测试剂,其特征在于,所述的检测区(3)和质控区(4)位于硝酸纤维素膜(5)上。

8. 一种犬细小病毒免疫荧光检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

(i) 一容器;以及

(ii) 如权利要求1-7任一所述的检测试剂。

9. 如权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括说明书。

犬细小病毒免疫荧光检测试剂及试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型涉及检测检验技术领域,具体地涉及一种犬细小病毒免疫荧光检测试剂。

背景技术

[0002] 犬细小病毒病(Canine Parvovirus,CPV)是细小病毒科、细小病毒属,病毒基因组为单股线状DNA。CPV是一种引起犬急性高度接触性传染病,临床上主要以出血性肠炎、非化脓性心肌炎、白细胞减少为特征。CPV传染性强,并可以感染所有年龄的犬,且一年四季均有发生和流行,对幼犬的致病性较高,发病率高达90%,病死率为10%~50%,是危害养犬业最为严重的传染病之一。近年来研究表明CPV宿主范围广泛,不仅对犬具有致病性,对狐狸、狼、貉、水獭、猫和大熊猫等也具有致病性,而且CPV自发现以来就不断发生变异,由原始的CPV-2型分化成a、b、c等三个基因型。目前我国流行株以CPV-2a 为主,也呈混合感染状况,虽然加强防疫和临床上疫苗使用,但病毒的变异等诸因素,此病毒仍未得到有效控制,而每年这种病对我国皮毛等特种经济动物养殖和宠物业造成严重的经济损失,建立快速有效的检测法是防止和减少疾病传播,和由此类疾病带来的经济损失。

[0003] 目前细小病毒检测方法主要有分子核酸检测、酶联免疫和胶体金法,前两种方法无法在小型诊所和现场检测且检测时间长、操作烦琐,胶体金法灵敏稍逊,检测结果不能保存和量化。

[0004] 因此,本领域急需开发稳定性好、灵敏度高、可以定量、检测结果能够保存且使用方便快速特异性的检测试剂,本实用新型犬细小病毒免疫荧光检测试剂现实上述特性要求。

实用新型内容

[0005] 本实用新型的目的在于提供一种犬细小病毒免疫荧光检测试剂。

[0006] 具体地,本实用新型的目的在于提供一种免疫荧光法快速定量检测犬细小病毒的检测卡,本实用新型的检测卡具有较高的灵敏度和准确性,同时检测结果可以借助仪器进行定量、保存、打印和传递。

[0007] 在本实用新型的第一方面,提供了一种犬细小病毒免疫荧光检测试剂,所述检测试剂包括一检测卡(侧流片),所述的检测卡包括背衬(7),以及位于所述背衬上的从近端到远端的以下结构:样品垫(1)、荧光乳胶垫(2)、检测区(3)、质控区(4)、硝酸纤维素膜(5)、和吸收垫(6);

[0008] 并且所述的荧光乳胶垫(2)包被有荧光乳胶标记的犬细小病毒抗体-1;

[0009] 并且所述检测区(3)包被有犬细小病毒抗体-2。

[0010] 在另一优选例中,所述的抗体-1和所述的抗体-2结合于犬细小病毒的不同表位。

[0011] 在另一优选例中,所述的抗体-1和所述的抗体-2为犬细小病毒特异性抗体。

[0012] 在另一优选例中,所述的质控区(4)包被有能结合于所述犬细小病毒抗体-1的二

抗。

[0013] 在另一优选例中,所述的二抗为羊抗鼠 IgG。

[0014] 在另一优选例中,所述的荧光乳胶为Eu³⁺荧光乳胶微粒。

[0015] 在另一优选例中,所述的背衬(7)为PVC板。

[0016] 在另一优选例中,所述样品垫(1)为玻璃纤维。

[0017] 在另一优选例中,所述吸收垫(6)为吸水纸。

[0018] 在另一优选例中,所述的样品垫(1)、荧光乳胶垫(2)、硝酸纤维素膜(5)、和吸收垫(6)粘贴于所述背衬上。

[0019] 在另一优选例中,所述的样品垫(1)和荧光乳胶垫(2)部分重叠。

[0020] 在另一优选例中,所述的检测区(3)设置在靠近荧光乳胶垫(2)的一侧,且所述的质控区(4)设置在靠近吸收垫(6)的一侧。

[0021] 在另一优选例中,所述检测试剂还包括卡盒(8),以及位于所述卡盒上的加样孔(9)和观察窗(10)。

[0022] 在另一优选例中,所述的检测卡完全设置于卡盒(8)中,所述加样孔(9)对应于所述检测卡上的样品垫(1),且所述观察窗(10)对应于所述检测卡上的检测区(3)和质控区(4)。

[0023] 在另一优选例中,所述卡盒的长度为80-90mm,宽度为10-20mm,且高度为4-5mm。

[0024] 在另一优选例中,所述检测卡的长度为60-70mm,且宽度为3-4mm。

[0025] 在另一优选例中,所述的检测区(3)和质控区(4)位于硝酸纤维素膜(5)上。

[0026] 在另一优选例中,所述检测试剂检测的样本包括全血、血浆、血清、尿液、排泄物或组织样本。

[0027] 在本实用新型的第二方面,提供了一种用于犬细小病毒免疫荧光检测试剂盒,所述试剂盒包括:

[0028] (i)一容器;以及

[0029] (ii)如本实用新型第一方面所述的犬细小病毒免疫荧光检测试剂。

[0030] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括说明书。

[0031] 应理解,在本实用新型范围内中,本实用新型的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0032] 图1为本实用新型一种优选例的检测卡的结构剖视图。其中,1为样品垫,2为荧光乳胶垫,3为检测区,4为质控区,5为硝酸纤维素膜,6为吸收垫,7为背衬。

[0033] 图2为本实用新型一种优选例的犬细小病毒免疫荧光检测试剂(检测卡和卡盒)的俯视图。其中,8为卡盒,9为加样孔,10为观察窗。

具体实施方式

[0034] 本实用新型人经过广泛而深入地研究,首次开发了一种犬细小病毒免疫荧光检测试剂,所述检测试剂包括一检测片和一卡盒,检测片包括背衬7以及位于背衬上的样品垫1,

荧光乳胶垫2,检测区3,质控区4,硝酸纤维素膜5,吸收垫6,所述的荧光乳胶垫(2)包被有荧光乳胶标记的犬细小病毒抗体-1;并且所述检测区(3)包被有犬细小病毒抗体-2。本实用新型的检测试剂可特异性检测犬细小病毒,稳定性好、灵敏度高、使用方便。在此基础上,完成了本实用新型。

[0035] 检测方法和工作原理

[0036] 为了便于理解本实用新型,给出本实用新型检测试剂的检测原理。应理解,本实用新型的保护范围并不受该原理的影响或限制。

[0037] 本发明提供一种快速检测犬细小病毒的免疫荧光定量检测试剂,其包括一检测卡和一卡盒,采用双抗体免疫夹心法原理检测犬细小病毒。具体地,是将荧光乳胶标记的特异性抗犬细小病毒的抗体-1并吸附在结合垫上,将特异性抗犬细小病毒的抗体-2固定在硝酸纤维素膜上,再将结合垫和硝酸纤维素膜组装到PVC板上,两头分别贴样品垫和吸水纸便形成检测条。检测时,当待检样本加到试纸条(检测卡)一端的样品垫后,液体样通过毛细作用向前移动,溶解结合垫上的荧光乳胶标记物,如果样本中含有被检测的病毒时,病毒被乳胶标记的抗体捕获形成复合物,当复合物移动到膜的检测线处,又被固定在膜上的抗体捕获形成双夹心复合物,也就是病毒与荧光乳胶抗体(抗体-1)的结合物又被检测线处的特异性抗体(抗体-2)结合而截留聚积在检测带上形成荧光带,通过特定波长的荧光仪检测到荧光强弱程度,也就是样品中病毒情况;如果样品中没有病毒,溶解的荧光乳胶没有被检测线截留,荧光仪在检测区检测不到荧光带,样品为阴性样品。为了便于判断反应进行和试剂的好坏,在质控区(C)固定质控线,所以不管结果怎样,质控线C始终出现荧光带,来证明试剂有效性。由此所述的荧光免疫定量检测试剂便于携带和保存、操作简单、检测过程10min之内完成。

[0038] 灵敏度

[0039] 本实用新型的犬细小病毒免疫荧光检测试剂的灵敏度在 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml以上。

[0040] 特异性

[0041] 本实用新型的犬细小病毒荧光检测试剂对狂犬病病毒、犬瘟热病毒、犬腺病毒、犬副流感病毒、犬冠状病毒等病原检测结果均为阴性。

[0042] 检测试剂的制造

[0043] 在本实用新型中,所述检测试剂的各组分(或组件)可选用本领域已有的材料制成。

[0044] 背衬7可以用任何稳定的、无孔的材料制成,其强度应足以支承材料和粘于其上的各组分。因为许多测定用水作为扩散介质,因此背衬7较佳地是基本上不透水的。在一个优选例中,背衬7是用聚合物膜制成的,更佳地是用聚氯乙烯膜制成的(如PVC胶板)。

[0045] 样品垫1可用任何吸收性材料制成。可使用的材料例子包括:纤维素、玻璃纤维等。

[0046] 吸收垫6可以用任何能吸收样品检测液的材料制成。吸收垫6的吸收能力应足够大,以便吸收添加至检测卡的液体全部经过检测区。适用于吸收垫6的材料的例子包括纤维素和吸水滤纸。

[0047] 荧光乳胶标记

[0048] 选择200-300nm的PS的Eu³⁺表面带有羧基荧光乳胶,偶联剂为EDC.HCl,乳胶垫为玻璃纤维,免疫荧光乳胶垫需37℃烘房中干燥。

[0049] 检测试剂的制备

[0050] 本实用新型检测试剂的各组成分(或组件)采用本领域通用的技术方法制造和组装。

[0051] 优选地,用包被缓冲液稀释犬细小病毒抗体-2和质控抗体,将稀释后的两种捕获液分别均匀地包被于作为检测部件的硝酸纤维膜上,两种捕获液体渗入硝酸纤维素膜后分别形成检测区和质控区。

[0052] 分别将样品垫、荧光乳胶垫、硝酸纤维素膜、吸收垫通过粘合剂粘贴于背衬上。用切条机切成4mm的检测卡,置于卡盒内,加样孔对准检测卡样品垫位置,压紧后组装成检测试剂盒,加入干燥剂用铝箔密封包装保存。

[0053] 检测试剂的结构

[0054] 本实用新型的犬细小病毒免疫荧光检测试剂包括卡盒和位于卡盒内的检测卡(侧流片、试纸条、检测条、或测试条)。

[0055] 一种优选的检测卡的结构如图1所示,其包括背衬7,以及位于背衬上的:样品垫1、荧光乳胶垫2、检测区3、质控区4(或对照区、对照线、质控线)、硝酸纤维素膜5、和吸收垫6。

[0056] 一种优选的卡盒8的结构如图2所示,其上包括加样孔9和观察窗10。并且,所述的检测卡完全设置于卡盒8中,所述加样孔9对应于所述检测卡上的样品垫1,且所述观察窗10对应于所述检测卡上的检测区3和质控区4。

[0057] 具体地,本实用新型的检测试剂具有以下特点:

[0058] 背衬7的长度与检测卡相同。

[0059] 样品垫1位于检测卡的一端,吸收垫6位于检测卡的另一端。

[0060] 荧光乳胶垫2上负载有荧光乳胶标记的犬细小病毒抗体-1。

[0061] 检测区3(也称检测线)位于样品垫1和吸收垫6之间,检测区3位于靠近样品垫1的一端,通常检测区设置在硝酸纤维素膜5上,通过所述硝酸纤维素膜连接标记的荧光乳胶垫2和吸收垫6。优选地,所述硝酸纤维素膜5上还设置有质控区4(也称质控线),质控区4位于检测区3和吸收垫6之间。

[0062] 其中,所述的检测区3包被有犬细小病毒抗体-2,质控区4包被有二抗,所述二抗结合于所述的犬细小病毒抗体-1。

[0063] 本实用新型的优点:

[0064] 本实用新型荧光检测试剂可特异性检测犬细小病毒,稳定性好、灵敏度高、使用方便、常温保存和运输,试剂通过荧光仪可定量检测样品的病毒含量、实现数据的保存、打印和传送。

[0065] 下面结合具体实施例,进一步阐述本实用新型。应理解,这些实施例仅用于说明本实用新型而不适用于限制本实用新型的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0066] 实施例1

[0067] 犬细小病毒抗原制备

[0068] 1.生产毒种

[0069] 制造本品所用毒种为犬细小病毒DD株,由中国兽医药品监察所鉴定、保管和供应。

[0070] 2.制造本品所用细胞为能够形成致密单层、生长良好的F81细胞,由中国兽医药品监察所鉴定、保管和供应。

[0071] 3.毒液制备

[0072] 将犬细小病毒毒株的冻干毒种按安瓿瓶标签标明装量用无血清MEM细胞营养液水化,按细胞生长液的3%接种F81细胞单层,置37℃吸附1小时后,加入含2%牛血清的MEM细胞营养液,37℃培养5~6日,待细胞病变达到80%-85%左右时,将细胞瓶移至-20℃,反复冻融3次后收获病毒液,分别分装并置-20℃冻结保存。

[0073] 4.抗原浓缩和灭活

[0074] 将抗原分别解冻后,以12000rpm,离心30min后,取上清,经超滤浓缩包浓缩10倍,将浓缩后的悬液按照体积比1:4000的比例加入β-丙内酯,4℃条件下边搅拌,边灭活,连续灭活36h,将灭活后的病毒液置37℃水解2h,-20℃冻结保存。

[0075] 5.抗原纯化

[0076] 将每种灭活后的抗原分别解冻后,经镍离子琼脂糖凝胶6FF亲和层析纯化,收集犬细小病毒抗原,-20℃冻结保存。

[0077] 实施例2

[0078] 犬细小病毒抗体制备

[0079] 1.试验动物

[0080] 2-3月龄健康比格犬,狂犬病病毒、犬瘟热病毒、犬细小病毒、犬副流感病毒、犬腺病毒、犬冠状病毒等抗原和抗体均为阴性。

[0081] 2.动物免疫

[0082] 将犬细小病毒抗原解冻后与等体积的弗氏完全佐剂(弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自Sigma公司)混合均匀,并乳化完全,免疫3只比格犬,分点背部皮下注射,每只犬免疫5点,1ml/点。14天后进行第二次免疫,二免时,将每种抗原解冻后分别与等体积的弗氏不完全佐剂混合均匀,并乳化完全,免疫方法同一免。此后每间隔14天按照弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂分别进行免疫,三免后每次免疫前采血测定血清中和抗体,直至中和抗体效价达到1:1024以上时,一周后心脏采血,血液收集在灭菌容器内,置37℃孵育2小时,2~8℃过夜。无菌提取血清。将每种抗原的犬血清混合后用0.45μm滤器过滤除菌。分装,2ml/瓶,置-20℃以下保存,或冻干保存。

[0083] 3.抗体纯化,饱和硫酸铵和免疫血清按1:2沉淀,离心弃上清,沉淀用10mM pH7.2的PBS透析,再用亲核柱进一步纯化得抗犬细小病毒抗体。

[0084] 实施例3

[0085] 检测犬细小病毒的检测卡的制备

[0086] 1、制备包裹Eu³⁺的荧光乳胶标记犬细小病毒抗体-1:

[0087] 取100ul质量浓度为1%的粒径为200nm表面带有羧基的钡乳胶微球,加 900ul 0.01M MES pH 6.1洗涤,14000rpm离心10min,弃上清。加1ml 0.01M MES pH6.1超声重悬,加15ul 10mg/ml的NHS(N-羟基丁二酰亚胺)和15ul 10mg/ml的EDC.HCl(1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐),室温下活化反应1小时,14000rpm离心10min,弃上清。用1ml 0.01M MES pH6.1 超声重悬,加入犬细小病毒抗体-1 0.06mg混匀,室温(25-30℃)反应2h。标记后的乳胶以14000rpm离心30min,弃上清。加入1ml 0.01M pH6.1含0.2%BSA 的MES超

声重悬,在室温下封闭2小时,14000rpm离心,10分钟,弃上清,用0.2ml 10mM pH7.2PBS含0.1%BSA稀释液超声重悬乳胶微粒,即浓度为0.5%标记荧光乳胶。

[0088] 2、乳胶荧光标记垫的制备:

[0089] 将制备的标记荧光乳胶用含0.5%BSA、4%蔗糖和0.1%吐温-20表面活性剂的pH7.4的10mM磷酸盐缓冲溶液稀释,配成0.1%浓度,均匀地包被在聚酯膜上,包被好的标记结合垫在37℃,相对湿度小于20%干燥室干燥8小时。

[0090] 3、硝酸纤维素膜检测区和对照区的制备

[0091] 在硝酸纤维膜的检测区上包被浓度0.6mg/ml含2%蔗糖的0.01M pH7.2磷酸盐缓冲液中的犬细小病毒抗体-2,同时在对照区包被浓度为0.8mg/ml含2%蔗糖的0.01M pH7.2磷酸盐缓冲的羊抗鼠IgG,包被量为每30cm长的硝酸纤维膜喷24μl,在37℃,相对湿度小于20%干燥室干燥8小时。

[0092] 4、样品垫的制备

[0093] 胆酸钠0.5%、1%的S17 (Rhodasurf ON-870, RHODIA, INC), 0.3%的S9 (Tetronic-1037, RHODIA, INC), 均匀铺在样品处理垫上并维持在37℃,相对湿度小于20%干燥室干燥8-10小时。

[0094] 5、测试卡组装

[0095] 将包被抗犬细小病毒抗体和羊抗鼠IgG的硝酸纤维素膜、吸水纸、荧光乳胶标记垫、样品垫依次贴在PVC板上组成测试条,并装卡中,如图1所示,将试卡装入铝箔袋中封好组成完整的测试卡。

[0096] 实施例4

[0097] 样品的检测

[0098] 1.标准曲线建立

[0099] 用于0.01M pH7.2的PBS含0.5%BSA溶液分别配制1.0ml培养的犬细小病毒浓度为 10^8 TCID₅₀/ml, 10^7 TCID₅₀/ml, 10^6 TCID₅₀/ml, 10^5 TCID₅₀/ml, 10^4 TCID₅₀/ml, 10^3 CID₅₀/ml以及PBS为空白对照。取100u1标准品直接加于加样孔中,室温下反应8分钟,再将检测卡插入荧光读数仪进行检测T和C区的荧光值。

[0100] 2.数据处理

[0101] 获得T线和C线的荧光值后,计算出T/C比值,以样品浓度为X轴,T/C 比值为Y轴作曲线图,即标准曲线图。

[0102] 3.检测步骤:

[0103] 3.1采集检测样本,样本可以是全血、血浆、血清、尿液、排泄物或组织样本,本实施例采用排泄物粪便的稀释液作为检测样本;

[0104] 3.2将检测卡平放,用移液枪吸取100u1待检样本液,垂直滴加于加样孔中,加样后开始计时。

[0105] 3.3室温反应8min后将检测卡插入荧光读数仪进行测量其荧光值,经转换直接得到测定结果。

[0106] 在本实用新型提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本实用新型的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本实用新型作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求

书所限定的范围。

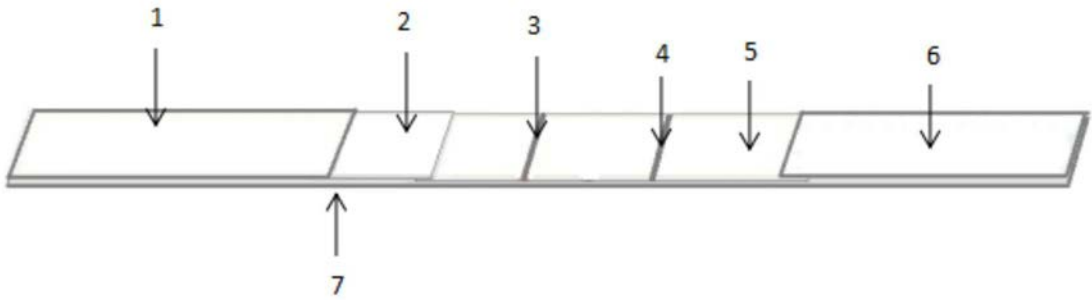


图1

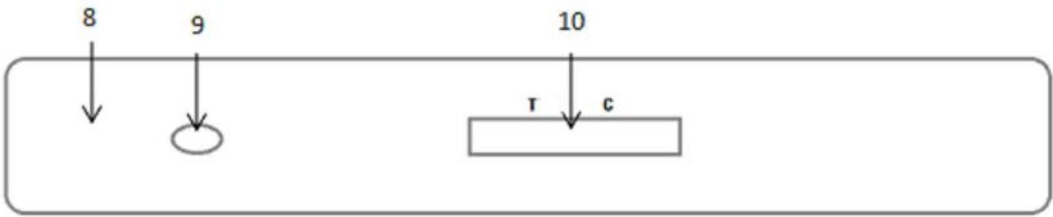


图2

专利名称(译)	犬细小病毒免疫荧光检测试剂及试剂盒		
公开(公告)号	CN209327357U	公开(公告)日	2019-08-30
申请号	CN201820862282.X	申请日	2018-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
当前申请(专利权)人(译)	中国兽医药品监察所		
[标]发明人	印春生 姚文生 刘业兵 张莹辉 王团结 朱真 康凯 黄华 王学生		
发明人	印春生 姚文生 刘业兵 张莹辉 王团结 朱真 康凯 黄华 王学生		
IPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	肖艳 华珊		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型公开了一种犬细小病毒免疫荧光检测试剂，该检测试剂包括一检测卡(侧流片)和一卡盒8，该检测卡包括背衬7以及位于背衬上的样品垫1，荧光乳胶垫2，检测区3，质控区4，硝酸纤维素膜5，吸收垫6，荧光乳胶垫2包被有荧光乳胶标记的犬细小病毒抗体-1；并且检测区3包被有犬细小病毒抗体-2。本荧光检测试剂可通过荧光仪定量检测犬细小病毒，适用于犬、猫、狐狸以及水貂等犬细小病毒病的诊断和防控。

