

适用于中国区域 CDV,CPV,CCV 病毒诊断的配对单抗全新上市

武玉香

一，研究背景

犬瘟热是一种急性、传染性极强的病毒病,在幼犬中本病的死亡率较任何其他传染病为高。犬瘟热也是水貂的一种传染病,又称貂瘟,死亡率很高,引起严重的经济损失。

犬瘟热病毒(Canine distemper virus)粒子呈现多形性,多数为球形,病毒粒子的直径为110~550nm,大多数在150~330nm之间,亦有畸形和长丝状的病毒粒子,病毒的基因组为不分节、非重叠的负链RNA,由15616个核苷酸组成,从它的3'端到5'端依次为3'端前导序列、核衣壳基因、磷蛋白基因、基质膜蛋白基因、融合蛋白基因、附着或血凝蛋白基因和5'端引导序列。病毒粒子中的主要蛋白质有核衣壳蛋白(nucleocapsid protein,N)、磷蛋白(phosphoprotein,P)、融合蛋白(fusion protein,F)、附着或血凝蛋白(attachment protein or hemagglutinin protein,H)。负链RNA被一个螺旋状衣壳包裹,主要由N组成,P和L也是核衣壳的成分。核衣壳呈螺旋状,总长度为1000nm,螺旋直径15~19nm,螺旋中心有5nm的孔,螺距5~6nm,核衣壳由囊膜包裹,其内部为M,厚约5nm,表面为H和F两个糖蛋白组成的纤突,纤突的长度为9nm。本病毒在-10度可生存几个月,在-70℃或冻干条件下可长期存活;在0℃以上感染力迅速丧失。干燥的病毒在室温中尚稳定。病毒在pH3.0时不稳定,在pH4.5以上时尚稳定,pH7.0有利于病毒的保存。可见光容易将病毒灭活。对乙醚敏感。0.1%甲醛或1%煤酚皂溶液在几小时内灭活病毒,病毒经甲醛灭活后仍能保留其抗原性。

犬细小病毒(Canine parvovirus,CPV)于1978年同时从澳大利亚(Kely)、加拿大(Thomson等)患肠炎的病犬中分离获得,是继1967年Binn等从犬分离的第二种细小病毒,是继1967年Binn等从犬分离的第二种细小病毒,它与Binn早期从健康犬分离的犬极小病毒(Minute virus of canine,MVC)在致病性上显著不同,抗原性上也有明显差异。CPV可引起犬出血性腹泻和心肌炎,并使白细胞大量减少,在幼犬中的发病率和死亡率都很高,症状与猫泛白细胞减少症相似。而

MVC 的致病性迄今尚未明确, 虽然某些犬群的抗体阳性率很高(达 70%)。

本病虽发现时间不长, 但在欧、美等一些商业性饲犬场, 相继有流行和造成幼犬群损失的报道。除上述最早报道的两个国家外, 已相继在美国、英国、德国和法国发现, 当前已成为犬的一种重要传染病, 我国亦有本病的暴发流行, 并已分离获得多株病毒, 研究报道日趋增多, 并发现它在抗原性上与猫泛白细胞减少症病毒有密切关系。

犬冠状病毒 (Canine coronavirus, CCV) 引起犬的胃肠炎, 1971 年首次在美国发生腹泻军犬的粪便中电镜检出该病毒。犬冠状病毒性腹泻原为比较缓和的疾病, 病犬大多能够康复, 但因经常与犬细小病毒等发生混合感染, 而引起严重乃至致死性转归的疾病。近年来世界上许多国家和地区都有本病流行的报道, 我国亦已多次发现本病暴发。

犬冠状病毒具有冠状病毒的一般形态特征, 呈圆形或椭圆形, 长径 80~120nm, 宽径为 75~80nm; 有囊膜, 囊膜表面有花瓣状纤突, 长约 20nm; 核衣壳呈螺旋状。

各种品种和年龄的犬都易感, 但幼犬症状较重, 潜伏期 1~3 天, 常迅速蔓延全群。病犬精神萎顿、厌食、呕吐, 随后排稀软带粘液的糊状粪便, 灰白色或黄白色, 常有恶臭, 有时呈水样, 橙色至绿色, 含有血液。病犬迅速脱水, 消瘦, 但体温常不明显升高, 多数病例在 7~10 天内康复, 某些幼犬可能呈严重症状, 并因发热、脱水和衰竭而死。

二, 目的意义

10 多年来, 中国的宠物市场越来越大, 在宠物店, 我们能看到琳琅满目的写着英文字母的诊断产品, 可食用产品, 治疗性用品, 喜爱宠物的人们不计价钱的高低信赖进口的产品。即使是开发抗原诊断试纸产品的原材料——单克隆抗体, 也是依赖进口, 几年来芬兰 HyTest, 韩国金诺 JBT 等品牌几乎如垄断性的占据了中国大部分市场, 但是由于他们开发抗体用的免疫原都是分离的他们本国本土的病毒, 正如技术背景所说, 在不同国家, 不同区域都可以分离获得多株病毒, 变异程度随区域而改变。市场客户反馈的问题大多于某些株型出现漏检现象, 灵敏度逊色于进口产品。本项目通过分离中国区域内不同株病毒, 选择致病强的毒株作为免疫原, 耗时 3 年多时间, 肩负着沉重的社会责任感, 致力于为中国市场

提供自给自足的原材料，减弱进口的垄断，至此 CDV, CPV, CCV 病毒诊断的配对单抗全新上市，在灵敏度方面、货期的迅速程度、漏检控制等方面都做了全新的测试。

三、单抗质量鉴定

①免疫荧光鉴定

CDV:

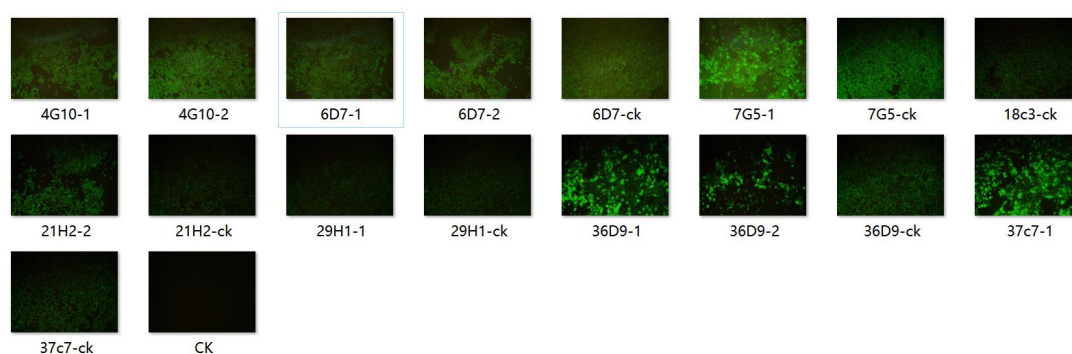
- 1.Vero 细胞铺 96 孔板一个，同时接毒，按照 5%接毒，每孔接 50ul。
- 2.第 3-5 日病变。用 0.01Mpbs 洗三次后弃掉 pbs，拍干。
- 3.加入冷乙醇（-20℃存放）固定 20 分钟，放入-20℃后弃掉上清，不拍板。
- 4.pbs 洗三次，弃上清，不用拍板，吸干水分。
- 5.加入一抗，按照 0.1 mg/ml 加入。37℃防置 40 分钟，pbs 洗三次，吸干水分。
- 6.加入二抗（按 1:40 加入，pbs 稀释）37 °C防置 40 分钟。Pbs 洗 4 次，吸干水分，不拍板，观察。
- 7.显微镜亮度：1.5 亮度

②.注意：1.做不接毒的空白细胞对照。

2.pbs 洗要同一位点加入，要温柔。

3.铺板同步接毒。

4.接毒后注意观察病变情况，出现 60%左右的病变测免疫荧光。



图中显示 37C7 36D9 7G5 细胞株均表现了强荧光。

CPV:



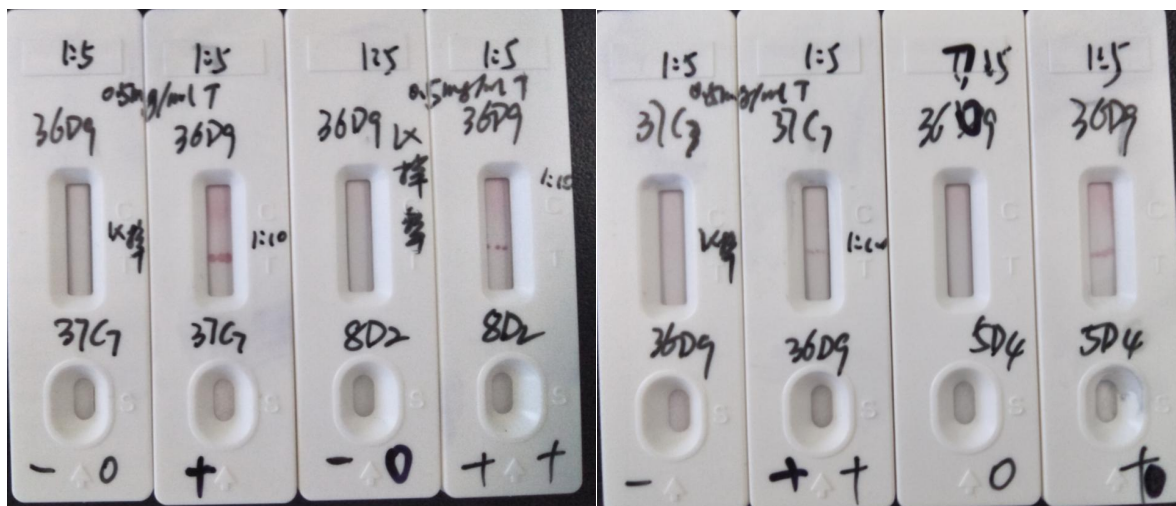
从患病狗粪便中分离细小病毒，在 F81 细胞里体外增值，然后用几株单抗识别活病毒的荧光鉴定试验，可以看到，荧光信号特别强，也就是说这几株单抗识别野毒的能力特别强，特异性特别好。

CCV: 感染人的 SARS 病毒，未做免疫荧光鉴定。检测时注意个人防护。

②胶体金确认鉴定



所开发 CDV 检测卡用于测试病毒培养情况，表明病毒的分布在上清和细胞内均存在。



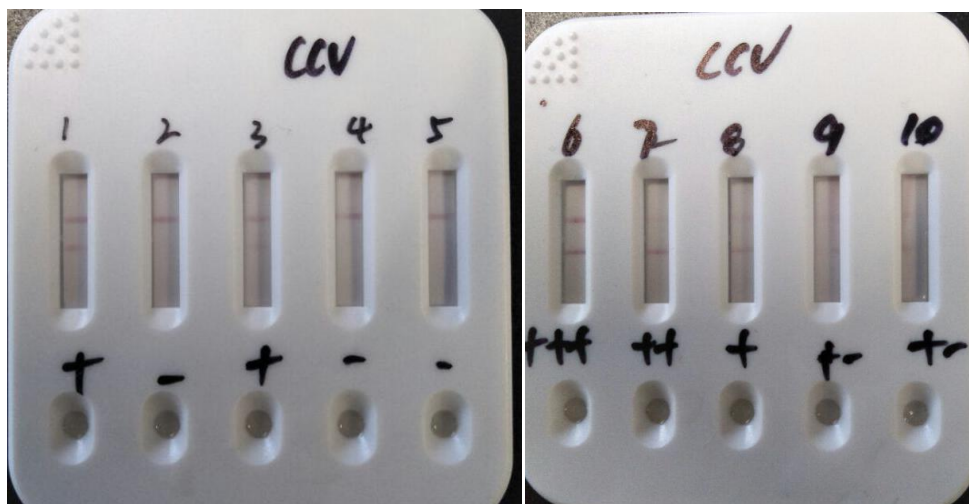
CDV 单抗配对测试，第一代为（5D4-8D1），胶体金条件： 5-6 微克蛋白/ml 金液，5D4 标记；8D1 划线 0.5-1mg/ml。经过配对对比，筛选出了更好的配对组合，37C7 标记；36D9 划线 0.5-1mg/ml。（37C7- 36D9 ）配对的灵敏度是其余组合的 3-10 倍。

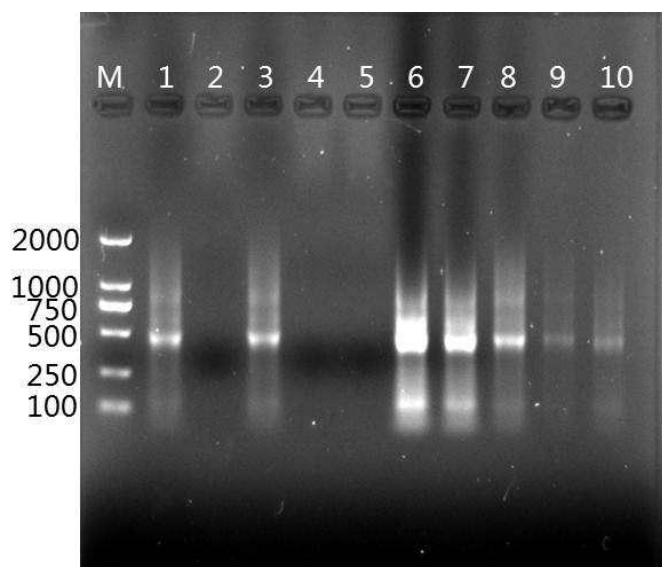


CPV 配对情况（7D6-5B10/5E2）；（4E10-5E2）；（5B10-4E10），可以用于配对的组合有 4 组，每一组的灵敏度达到了最低检测限 0.1 微克/毫升病毒液。

【胶体金条件】： 5-6 微克蛋白/ml 金液，划线 0.3-0.5mg/ml，5B10-4E10 均可以用于划线和标记，推荐 5B10 包被，4E10 标记。

CCV:





10 份临床疑似感染样本，PCR 鉴定 S 基因 480pb 结果与此一致。

四、配套羊抗鼠与万能 C 反应蛋白； CDV、cpv 纯化标准阳性抗原。

五、产品说明书附录

生产公司：山东绿都生物科技有限公司

地址：山东省滨州市黄河二路 169 绿都生物高科技园

网址：<http://www.lvdu.net>

24 小时技术销售服务：18266598399 武经理

传真：+86-0543-3418283

Email：lvdukeji@126.com

邮编：256600