



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104650226 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

---

(21) 申请号 201510093284. 8

(22) 申请日 2008. 06. 12

(30) 优先权数据

11/763, 592 2007. 06. 15 US

(62) 分案原申请数据

200880102765. 9 2008. 06. 12

(71) 申请人 艾德克斯实验室公司

地址 美国缅因州

(72) 发明人 戴维. A. 埃尔斯莫尔 劳里. A. 弗林

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

*G07K 16/18*(2006. 01)

*G01N 33/53*(2006. 01)

权利要求书3页 说明书13页 附图7页

---

(54) 发明名称

蛔虫粪抗原检测

(57) 摘要

一种用于检测粪便样品中是否存在蛔虫的组合物、装置、试剂盒和方法。本发明的组合物、装置、试剂盒和方法可用于证实来自哺乳动物的粪便样品中是否存在蛔虫,所述哺乳动物可能还感染有一种或多种钩虫、鞭虫、和犬心虫。

1. 一种对一种或多种蛔虫抗原特异性的抗体,所述抗体不与自下组的至少一种成员衍生的粪抗原起交叉反应:钩虫、鞭虫和犬心虫。

2. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体是多克隆抗体。

3. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体是通过用整条蛔虫的提取物、蛔虫肠的提取物或蛔虫生殖器官的提取物进行的免疫接种而获得的。

4. 权利要求 3 的抗体,其中衍生所述整条蛔虫的提取物、所述蛔虫肠的提取物和所述蛔虫生殖器官的提取物的蛔虫是犬弓首线虫。

5. 权利要求 1 的抗体,其中所述一种或多种蛔虫抗原是自犬弓首线虫或猫弓首线虫衍生的。

6. 一种用于检测哺乳动物的粪便样品中是否存在蛔虫的装置,其包含固体支持物,其中对一种或多种蛔虫抗原特异性的一种或多种抗体被固定化在所述固体支持物上。

7. 权利要求 6 的装置,其中所述对一种或多种蛔虫抗原特异性的一种或多种抗体对自下组衍生的任何粪抗原不是特异性的:钩虫、鞭虫、和犬心虫。

8. 权利要求 6 的装置,其中所述一种或多种抗体是通过用整条蛔虫的提取物、蛔虫肠的提取物或蛔虫生殖器官的提取物进行的免疫接种而获得的。

9. 权利要求 8 的装置,其中衍生所述整条蛔虫的提取物、所述蛔虫肠的提取物和所述蛔虫生殖器官的提取物的蛔虫是犬弓首线虫。

10. 权利要求 6 的装置,其中所述一种或多种抗体是多克隆的。

11. 权利要求 6 的装置,其中所述一种或多种抗体之一或多种是经过标记的。

12. 权利要求 6 的装置,其中所述装置是酶联免疫吸附测定法装置。

13. 权利要求 12 的装置,其中所述酶联免疫吸附测定法装置是侧流免疫测定法装置。

14. 权利要求 6 的装置,其中所述哺乳动物是犬或猫。

15. 权利要求 6 的装置,其中所述装置进一步包括用于检测下组之一或多种的一种或多种试剂:一种或多种非蛔虫蠕虫寄生物、一种或多种非蠕虫寄生物、一种或多种病毒、和一种或多种细菌。

16. 权利要求 6 的装置,其中所述一种或多种蛔虫抗原是自犬弓首线虫或猫弓首线虫衍生的。

17. 一种检测哺乳动物的粪便样品中是否存在蛔虫的方法,包括:

a. 使所述粪便样品与对一种或多种蛔虫抗原特异性的一种或多种抗体接触;并

b. 检测是否存在所述一种或多种蛔虫抗原,或者检测是否存在一种或多种蛔虫抗体/抗原复合物。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述一种或多种抗体是通过用整条蛔虫的提取物、蛔虫肠的提取物或蛔虫生殖器官的提取物进行的免疫接种而获得的。

19. 权利要求 17 的方法,其中衍生所述整条蛔虫的提取物、所述蛔虫肠的提取物和所述蛔虫生殖器官的提取物的蛔虫是犬弓首线虫。

20. 权利要求 17 的方法,其中所述一种或多种抗体是多克隆的。

21. 权利要求 17 的方法,其中所述哺乳动物是犬或猫。

22. 权利要求 17 的方法,其中所述检测是否存在一种或多种抗体/抗原复合物进一步包括如下步骤,即提供与所述一种或多种抗体/抗原复合物结合的二抗。

23. 权利要求 17 的方法,其中所述一种或多种抗体之一或多种是经过标记的。
24. 权利要求 23 的方法,其中所述二抗是经过标记的。
25. 权利要求 17 的方法,其中所述一种或多种抗体被固定化在固体支持物上。
26. 权利要求 25 的方法,其中所述固体支持物形成酶联免疫吸附测定法装置的一部分。
27. 权利要求 26 的方法,其中所述酶联免疫吸附测定法装置是侧流免疫测定法装置。
28. 权利要求 17 的方法,其进一步包括如下步骤,即使所述粪便样品与一种或多种试剂接触以检测下组之一或多种:一种或多种非蛔虫蠕虫寄生物、一种或多种非蠕虫寄生物、一种或多种病毒、和一种或多种细菌。
29. 权利要求 28 的方法,其中所述用于检测所述一种或多种非蛔虫蠕虫寄生物、所述一种或多种非蠕虫寄生物、所述一种或多种病毒和所述一种或多种细菌之任一种或所有的试剂是由对所述一种或多种非蛔虫蠕虫寄生物、所述一种或多种非蠕虫寄生物、所述一种或多种病毒或所述一种或多种细菌特异性的抗体识别的一种或多种抗原或一种或多种抗体。
30. 权利要求 17 的方法,其中所述一种或多种蛔虫抗原是自犬弓首线虫或猫弓首线虫衍生的。
31. 一种诊断哺乳动物中的肠蛔虫感染的方法,该方法包括以下步骤:
  - a. 自所述哺乳动物获得粪便样品;
  - b. 使所述粪便样品与对一种或多种蛔虫抗原特异性的一种或多种抗体接触;
  - c. 检测是否存在所述一种或多种蛔虫抗原,或者检测是否存在一种或多种蛔虫抗体/抗原复合物;并
  - d. 基于是否存在所述一种或多种蛔虫抗原的检测或者是否存在一种或多种蛔虫抗体/抗原复合物的检测来诊断所述哺乳动物为患有或者为不患有所述蛔虫感染。
32. 权利要求 31 的方法,其中所述一种或多种抗体是通过用整条蛔虫的提取物、蛔虫肠的提取物或蛔虫生殖器官的提取物进行的免疫接种而获得的。
33. 权利要求 32 的方法,其中衍生所述整条蛔虫的提取物、所述蛔虫肠的提取物和所述蛔虫生殖器官的提取物的蛔虫是犬弓首线虫。
34. 权利要求 31 的方法,其中所述一种或多种抗体是多克隆的。
35. 权利要求 31 的方法,其中所述哺乳动物是犬或猫。
36. 权利要求 31 的方法,其中所述检测是否存在一种或多种抗体/抗原复合物进一步包括如下步骤,即提供与所述一种或多种抗体/抗原复合物结合的二抗。
37. 权利要求 31 的方法,其中所述一种或多种抗体之一或多种是经过标记的。
38. 权利要求 37 的方法,其中所述二抗是经过标记的。
39. 权利要求 31 的方法,其中所述一种或多种抗体被固定化在固体支持物上。
40. 权利要求 39 的方法,其中所述固体支持物形成酶联免疫吸附测定法装置的一部分。
41. 权利要求 40 的方法,其中所述酶联免疫吸附测定法装置是侧流免疫测定法装置。
42. 权利要求 31 的方法,其进一步包括如下步骤,即使所述粪便样品与一种或多种试剂接触以检测下组之一或多种:一种或多种非蛔虫蠕虫寄生物、一种或多种非蠕虫寄生

物、一种或多种病毒、和一种或多种细菌。

43. 权利要求 42 的方法,其中所述用于检测所述一种或多种非蛔虫蠕虫寄生物、所述一种或多种非蠕虫寄生物、所述一种或多种病毒和所述一种或多种细菌之任一种或所有的试剂是由对所述一种或多种非蛔虫蠕虫寄生物、所述一种或多种非蠕虫寄生物、所述一种或多种病毒或所述一种或多种细菌特异性的抗体识别的一种或多种抗原或一种或多种抗体。

44. 权利要求 31 的方法,其中所述一种或多种蛔虫抗原是自犬弓首线虫或猫弓首线虫衍生的。

45. 一种用于在哺乳动物的样品中检测一种或多种蛔虫粪抗原的试剂盒,该试剂盒包含权利要求 6-15 任一项的装置,和足以检测所述一种或多种抗原的一种或多种试剂。

46. 权利要求 45 的试剂盒,其中所述一种或多种试剂选自下组:一种或多种指示剂试剂、一种或多种抗体标记化合物、一种或多种抗体、一种或多种抗原捕捉试剂、一种或多种抑制剂、和一种或多种清洗试剂。

## 蛔虫粪抗原检测

[0001] 本申请是基于申请日为 2008 年 6 月 12 日, 优先权日为 2007 年 6 月 15 日, 申请号为 200880102765.9 (PCT/US2008/007363), 发明名称为“蛔虫粪抗原检测”的专利申请的分案申请。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及用于检测动物中的蛔虫 (roundworm) 的组合物、装置、试剂盒和方法。更具体地, 本发明涉及用于检测粪便样品中是否存在蛔虫的组合物、装置、试剂盒和方法。甚至更具体地, 本发明涉及用于检测粪便样品中是否存在蛔虫抗原的抗体组合物、装置、试剂盒、和方法, 所述粪便样品可能还包括一种或多种钩虫 (hookworm)、鞭虫 (whipworm)、和犬心虫 (heartworm) 抗原。

### [0003] 发明背景

[0004] 肠蛔虫感染在动物中是常见的, 并且如果放任不进行治疗, 能引起严重的疾病, 甚至死亡。虽然诊断感染蛔虫的动物为患有某些类型的寄生蠕虫 (worm) (肠虫 (helminth)) 感染是相对容易的, 但是鉴定蛔虫具体为致病蠕虫是显著更困难的。这是一个难题, 因为在受感染动物的护理人员具有蛔虫是感染的特定来源的知识时, 蛔虫感染是最好治疗的。例如, 此类知识容许护理人员用对蛔虫有最佳效力的药物治疗动物, 因此避免使用通常有效针对寄生虫感染、但对蛔虫不具最佳效果的药物或药物混合物。

[0005] 用于诊断蛔虫感染的当前方法主要涉及对粪便样品的显微镜检查, 其或是直接在粪便涂片中或是在通过密度介质中的浮选来浓缩卵和寄生物后进行。尽管此规程被高度采用, 但是该方法具有显著的缺点。这些显微术方法是费时的, 要求专门的仪器, 并且具有低的特异性。另外, 这些方法的结果的准确性高度依赖于操作人员的技术和专长。

[0006] 一般而言, 也可以如下在分子水平进行分类学区别, 即测定动物中是否存在针对特定蠕虫物种或规定的蠕虫物种组的一种或多种抗体的一种或多种抗原。例如, Hill 等 (Veterinary Parasitology (1997), 第 68 卷, 第 91 页 - 第 102 页) 披露了一种酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测试, 其用于在来自猪动物的血清中检测对鞭虫特异性的抗体。虽然 Hill 等的测试不与来自感染有蛔虫或钩虫的猪的血清起交叉反应, 但是尚未确定该测试是否与来自感染有犬心虫的猪的血清起交叉反应。类似地, Yamasaki 等 (J. Clin. Microbiology (2000), 第 38 卷, 第 1409 页 - 第 1413 页) 披露了一种 ELISA 测试, 其利用重组蛔虫抗原来检测人血清中对蛔虫特异性的抗体。尽管 Yamasaki 等的测定法已经显示了不与钩虫或犬心虫起交叉反应, 但是尚未确定其是否与鞭虫起交叉反应。Bungiro 和 Cappello (A. J. Trop. Med. Hyg. (2005), 第 73 卷, 第 915 页 - 第 920 页) 披露了一种 ELISA 以检测实验仓鼠模型系统中由钩虫斯里兰卡钩口线虫 (*Ancylostoma ceylanicum*) 引起的感染, 但是尚未确定他们的测试是否还与蛔虫、鞭虫和犬心虫中的一种或多种起交叉反应。

[0007] 临床医生对使用这些测定法来诊断感染蠕虫的动物显示出很少的兴趣。尚不采用这些测定法的一个原因在于研究人员尚未证明它们中的任一种能够特异性检测特定类型的蠕虫而排除所有其它主要类型的蠕虫。例如, 还没有人开发出如下测定法, 其特异性检测

蛔虫,而且还已经显示出与钩虫、鞭虫和犬心虫起交叉反应。这种没有将动物的感染指向单一来源的能力会造成诊断的不确定,因此可能会导致次佳治疗的施用。

[0008] 此外,这些测定法中的一些仅已经显示出对于检测血清样品中的抗原或抗体是有用的。这是限制性的,因为从患病动物获得血清样品经常是不切实际的或者是困难的。例如,在不配合的动物的情况中,为了抽取血液的目的而使动物稳定可能是有困难的,而在生病严重的动物的情况中,为了相同目的而将动物运输至临床医生的诊所可能是不切实际的。因此,使用如下动物材料能更好地实施测试是否存在特定的蠕虫类型,所述动物材料能容易获得,而且不需要运输动物,诸如粪便。存在于粪便样品中的抗原称为粪抗原。在作为本发明主题的寄生虫抗原的情况中,粪抗原是存在于宿主动物的粪便样品中的蠕虫抗原。

[0009] 这些测定法中的一些的另一项固有限制在于它们涉及特定重组抗原的生成和纯化。具体地,由于生成和纯化此类抗原所需要的步骤可以是昂贵且费时的,所以这是限制性的。

[0010] 因此所需要的是用于检测粪便样品中是否存在蛔虫的组合物、装置、试剂盒和方法。所需要的组合物、装置、试剂盒、和方法应当进一步能够特异性检测粪便样品中是否存在蛔虫,所述粪便样品含有钩虫、鞭虫、和犬心虫中的一种或多种。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明部分基于出乎意料的多克隆抗体特性的发现。具体地,确定了可以使用针对整条蛔虫提取物、蛔虫生殖道提取物、或蛔虫肠道提取物制备的多克隆抗体来捕捉哺乳动物中的蛔虫粪抗原和检测哺乳动物中是否存在蛔虫粪抗原,所述哺乳动物寄生有鞭虫、犬心虫和钩虫之一种或多种。这种对蛔虫的特异性是令人惊讶的,因为蛔虫、鞭虫、犬心虫和钩虫均是相关的线虫(nematodes),并且预期针对这些蠕虫之任一种的全部提取物、蛔虫生殖道提取物、或蛔虫肠道提取物制备的多克隆抗体会与其它蠕虫、宿主抗原、或其它粪便成分之一种或多种起交叉反应。本发明包括如下测定条件,在该测定条件下可以使用本发明的抗体来特异性捕捉哺乳动物中的蛔虫粪抗原和检测哺乳动物中是否存在蛔虫粪抗原,所述哺乳动物可能还寄生有鞭虫、犬心虫和钩虫之一种或多种。

[0013] 一方面,本发明是用于检测哺乳动物(诸如例如犬、猫、牛、或人)的粪便样品中是否存在蛔虫的装置。本发明进一步提供了一种用于检测哺乳动物的粪便样品中是否存在蛔虫的装置,所述哺乳动物可能还感染有钩虫、鞭虫、和犬心虫之一种或多种。在本发明的一方面,所述装置包括固体支持物,其中对一种或多种蛔虫抗原特异性的一种或多种多克隆抗体被固定化在固体支持物上。

[0014] 在本发明的某些方面,本发明的装置包括侧流免疫测定法装置。在本发明的其它方面,本发明的装置包括 ELISA 装置。

[0015] 本发明还包括抗体和抗体组合物。更具体地,本发明涉及能够特异性结合哺乳动物中的蛔虫粪抗原的多克隆抗体,所述哺乳动物可能还感染有钩虫、鞭虫或犬心虫之一种或多种。本发明的抗体基本上不结合粪便样品中的钩虫、鞭虫或犬心虫抗原。本发明进一步包括生产此类抗体的方法。

[0016] 本发明还是一种检测粪便样品中是否存在蛔虫的方法。该方法包括使粪便样品与所述抗体接触,并捕捉该粪便样品中的蛔虫粪抗原和检测该粪便样品中是否存在蛔虫粪抗原。检测步骤可以包括检测是否存在抗原/抗体复合物。所述方法可以进一步涉及提供其

能与抗原 / 抗体复合物中的抗原结合的第二抗体。

[0017] 本发明进一步包括用于在自哺乳动物获得的粪便样品中检测蛔虫粪抗原的测定试剂盒。因此试剂盒可以包括本发明的一种或多种组合物和 / 或装置。例如,所述试剂盒可以包括抗蛔虫抗体和用于测定所述抗体与样品中的蛔虫抗原的结合的手段。在一个具体的例子中,此类试剂盒包括具有固定化的抗蛔虫抗体的装置、一种或多种抗原捕捉试剂(例如非固定化的经标记抗原捕捉试剂和固定化的抗原捕捉试剂)和清洗试剂,以及检测试剂及阳性和阴性对照试剂(若想要或适当的话)。此类测试试剂盒中可以包括其它成分诸如缓冲液、对照、等等。试剂盒可以进一步包括关于实施本发明的一种或多种方法的说明书,包括关于使用与试剂盒一起包括在内的本发明的任何装置的说明书。

[0018] 附图简述

[0019] 图 1A 显示了本发明的多孔板装置。

[0020] 图 1B 显示了图 1A 板的单孔的近视图及其固定化的抗体的例示。

[0021] 图 2 显示了第一项实验中通过遵循本发明的方法从犬粪便样品获得的光密度(OD)值的图。

[0022] 图 3 显示了第二项实验中通过遵循本发明的方法从犬粪便样品获得的 OD 值的图。

[0023] 图 4 显示了第三项实验中通过遵循本发明的方法从犬粪便样品获得的 OD 值的图。

[0024] 图 5 显示了第四项实验中通过遵循本发明的方法从猫粪便样品获得的 OD 值的第一幅图。

[0025] 图 6 显示了第四项实验中通过遵循本发明的方法从猫粪便样品获得的 OD 值的第二幅图。

[0026] 图 7 显示了第五项实验中通过遵循本发明的方法从犬粪便样品获得的 OD 值的第一幅图。

[0027] 图 8 显示了第五项实验中通过遵循本发明的方法从犬粪便样品获得的 OD 值的第二幅图。

[0028] 发明详述

[0029] 一方面,本发明是用于在哺乳动物(诸如例如犬、猫、牛、或人)中检测肠蛔虫感染的装置。该装置安排成帮助检测来自哺乳动物的粪便样品中是否存在蛔虫粪抗原,所述哺乳动物可能还感染有钩虫、鞭虫、和犬心虫之一种或多种。在本发明的一方面,所述装置包括固体支持物,其中针对整条蛔虫提取物、蛔虫生殖道提取物、和 / 或蛔虫肠道提取物制备的、且对一种或多种蛔虫抗原特异性的一种或多种多克隆抗体被固定化在所述固体支持物上。所述固体支持物可以是例如侧流装置中的板或基片。

[0030] 如图 1A 和 1B 中所显示的,本发明的装置是例如多孔板 10,其包括多个孔 12。每个孔 12 提供固体支持物 14,用于在其上固定化对蛔虫特异性的多克隆抗体 16。板 10 可以是 Immulon 1B 96 孔板,但是不限于此。或者,所述装置可以是侧流测定法,诸如记载于美国专利 5,726,010 的。

[0031] 如下生成在固体支持物 14 上固定化的多克隆抗体 16(一般称作“抗弓首线虫(*Toxocara*)pAB”),即给动物(诸如例如家兔)施用弓首线虫物种的整条提取物或弓首线虫物种的一部分(诸如整个或部分生殖道或整个或部分肠道)的提取物,自该动物收集血清,并纯化抗弓首线虫 pAB。具体地,通过物理吸附将抗弓首线虫 pAB 固定化至板 10 的孔

12 的固体支持物 14 上。实施抗弓首线虫 pAB 在固体支持物 14 上的固定化以使得抗弓首线虫 pAB 不会被可能实施的任何规程洗掉,而且使得在实施本发明的方法时粪便样品中的抗原与抗弓首线虫 pAB 的特异性结合不受固体支持物 14 或其它装置表面妨碍。本发明的装置 10 适合于通过本发明的方法来检测蛔虫抗原,这可以包括实施 ELISA 测定法。

[0032] 可以使用本发明的方法来检测样品中的一种或多种蛔虫抗原。本发明的方法中所使用的测试样品是粪便样品。可以使用本发明的方法来测试来自任何哺乳动物(诸如例如犬、猫、牛、或人)的粪便样品。

[0033] 可以与本发明的方法一起使用本发明的装置 10(其包括在固体支持物 14 上固定化的抗弓首线虫 pAB)以检测粪便样品中的蛔虫。具体地,可以通过用被固定化在装置 10 的固体支持物 14 上的抗弓首线虫 pAB 检测一种或多种蛔虫粪抗原来诊断动物的活动性蛔虫感染。“蛔虫粪抗原”指粪便样品中存在的能特异性且稳定地结合抗弓首线虫 pAB 的任何蛔虫成分。因此,蛔虫粪抗原可以是整条蛔虫、蛔虫卵、蛔虫碎片、自蛔虫分泌、排泄或脱落的产物或其组合。

[0034] “对…特异性的”或“稳定结合”意味着抗弓首线虫 pAB 以比对其它粪抗原(例如,来自非蛔虫寄生虫的粪抗原)更大的亲和力识别和结合蛔虫粪抗原。可以使用本领域中公知的方法(例如,ELISA 或放射性免疫测定法(RIA))来测试结合特异性。在本发明的方法中,通过 ELISA 检测蛔虫抗原。以下有本发明的 ELISA 方法的一个具体的实施例。虽然参照具体的 ELISA 方法描述了本发明,然而要理解的是,本领域普通技术人员会认识到备选的、别的或代替的 ELISA 步骤可以在不背离基本目的的前提下使用。

[0035] 参照两个实施例(它们一起包括 5 次实验)明确描述了本发明的方法;然而,其不应解释为局限于此。

[0036] 实施例 A

[0037] 使用以下材料和方法来产生下文所描述的实验 1、2、3、和 4 中所描述的数据。

[0038] 多克隆抗体制备。在家兔中针对整条蛔虫(犬弓首线虫(*Toxocara canis*))提取物制备多克隆抗体“抗弓首线虫 pAB”(IgG)(Antibody Systems Inc., Hurst, Texas),并通过使用标准方法自血清纯化。简言之,如下制备破裂的整条蛔虫的提取物,即自受感染的犬科动物收获蛔虫,清洗它们,并将它们在溶液中重悬。然后通过组织均浆化来破坏所重悬的蠕虫,通过离心来沉淀,并在溶液中重悬。给家兔施用此重悬液,并自经免疫接种的家兔收集血清。如下自经免疫接种的家兔的血浆纯化抗弓首线虫 pAB,即通过蛋白 G 亲和层析分离 IgG 抗体。

[0039] 犬科和猫科动物的感染和抗肠虫处理。对于所有四项实验,通过给健康犬或猫口服施用约 150-300 颗蛔虫(弓首线虫)、钩虫(犬钩口线虫(*Ancylostoma canium*))、或鞭虫(狐鞭虫(*Trichuris vulpis*))的遮掩卵(larvated egg)来实现寄生线虫感染。(具体地,犬弓首线虫是给犬施用的蛔虫,而猫弓首线虫(*Toxocara cati*)是给猫施用的蛔虫。)对于实验 2,从已知天然感染有犬心虫(犬恶丝虫(*Dirofilaria immitis*))的犬收集粪便样品。此外,仅对于实验 3 和实验 4,用 **Interceptor®**(其是可购自 Novartis Animal Health Inc. (Basel, Switzerland) 的驱肠虫药)依照制造商的方案在感染后第 91 天时处理犬,而在感染后第 56 天时处理猫。本领域普通技术人员公知的是, **Interceptor®**对于从犬科和

猫科动物除去蛔虫、钩虫、鞭虫和犬心虫是有效的。通过在自这些犬科和猫科动物获得的粪便样品中显微镜观察蠕虫卵来证实感染。认为产生通过显微镜检查发现无蠕虫卵的粪便样品的犬和猫是未受感染的。

[0040] 犬和猫粪便样品制备。已知无寄生虫感染或者要用蛔虫、钩虫、鞭虫或犬心虫之一感染的犬科和猫科动物提供粪便样品的来源。将来自新鲜的、未防腐处理的犬或猫粪便样品的样品(约1克)在4ml稀释剂溶液(“稀释剂溶液”是0.05M Tris碱;1mM EDTA;0.45% Kathon;16mg/ml 硫酸庆大霉素;0.05% Tween-20;40%胎牛血清;10%家兔血清;和5%小鼠血清)中悬浮。以4000rpm离心悬浮液达20分钟以产生第一上清液。以12000rpm离心第一上清液达5分钟以产生第二上清液,其在本文中称为“粪便提取物”。

[0041] ELISA测定法。通过物理吸附在Immulon 1B 96孔板上于4°C固定化纯化的抗弓首线虫pAB(5 $\mu$ g/ml;100 $\mu$ l/孔)过夜。然后用0.1M Tris pH 7.0中的1%BSA于4°C封闭板过夜,接着于室温干燥。将约100 $\mu$ l粪便提取物添加至每孔,并容许于室温温育1小时。依照本领域普通技术人员已知的标准方法用PBS-Tween-20溶液清洗各孔5次。如下用辣根过氧化物酶(HRP)标记游离的抗弓首线虫pAB,即使用交联剂琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)来产生偶联物,并将10 $\mu$ g/ml此偶联物添加至96孔板的每孔。于室温的30分钟温育期后,依照本领域普通技术人员已知的标准方法使用PBS-Tween-20溶液自各孔清洗未结合的偶联物。然后将50 $\mu$ l TMBLUE®过氧化物酶底物(SeraCare Life Sciences, West Bridgewater, MA)添加至每孔,并于室温温育板达10分钟。10分钟温育期后用0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)停止每个酶促反应后,通过使用ELISA读板仪进行的标准分光光度法技术于A650测量96孔板中每孔的光密度(OD)值。在此安排中,为96孔板的任何特定孔获得的OD值与该孔中存在的特异性结合的抗原量成正比。

[0042] 实验1:抗弓首线虫pAB在犬粪便样品中特异性结合蛔虫,但没有特异性结合钩虫或鞭虫。

[0043] 实验1的目的是确定抗弓首线虫pAB是否特异性结合犬中的蛔虫、钩虫、和/或鞭虫的粪抗原。图2中显示了实验1中所获得的20份犬粪便样品的OD测定。具体地,这些粪便样品自如下犬科动物获得:5只已知无寄生虫感染的犬科动物(阴LCZ5d62、阴RCZ5d87、阴SBY5d62、阴SVY5d62、和阴TIY5d62)、5只已知感染有蛔虫的犬科动物(蛔+KWZ5d62、蛔+QKZ5d62、蛔+RYZ d62、蛔+SPY5d69、和蛔+WHY5d62)、5只已知感染有钩虫的犬科动物(钩+LEY5d62、钩+OGY5d62、钩+RKY5d62、钩+SKZ5d62、和钩+SXZ5d62)、和5只已知感染有鞭虫的犬科动物(鞭+KXZ5d87、鞭+REY5d85、鞭+RQZ5d85、鞭+SEZ d85、和鞭+TGZ d85)。感染后第62天(“d62”)、第69天(“d69”)、第85天(“d85”)、或第87天(“d87”)时获得粪便样品。为每只特定的犬科动物选择的具体的感染后天数基于蠕虫卵排出量处于或接近峰水平的天数,如通过显微镜检查所测定的。

[0044] 未感染的、受钩虫感染的、和受鞭虫感染的样品所测量的平均OD分别是0.091、0.099、和0.172(这些样品之每份所测量的OD均小于0.25),指明抗弓首线虫pAB没有特异性结合任何这些样品中的抗原。相反地,来自受蛔虫感染的犬的粪便样品的平均OD是1.40,其比为受鞭虫感染的样品获得的平均OD高约8倍,并且比为未感染的和受钩虫感染的样品两者获得的平均OD高约15倍。这些数据指明抗弓首线虫pAB特异性结合一种或多

种蛔虫抗原,但没有特异性结合任何钩虫或鞭虫粪抗原。

[0045] 实验 2 :抗弓首线虫 pAB 没有特异性结合犬粪便样品中的犬心虫。

[0046] 实验 2 的目的是确定抗弓首线虫 pAB 是否特异性结合犬心虫粪抗原。图 3 中显示了第 2 项实验中所获得的 25 份犬粪便样品的 OD 测定。具体地,图 3 显示了作为测试来自如下犬科动物的粪便样品的结果获得的数据 :3 只已知无寄生虫感染的犬科动物 ( 阴 ILS 11、阴 ILS 12、和阴 ILS 13 )、7 只已知天然感染有犬心虫的犬科动物 ( 阴 TRS 403、阴 TRS 404、阴 TRS 405、阴 TRS 406、阴 TRS 583、阴 TRS 749、和阴 TRS 868 )、11 只已知感染有蛔虫的犬科动物 ( 蛔 +ILS 10、蛔 +ILS 18、蛔 +ILS 20、蛔 +ILS 22、蛔 +ILS 29、蛔 +ILS 32、蛔 +ILS 36、蛔 +ILS 38、蛔 +ILS 41、蛔 +ILS 67、和蛔 +ILS 51 )、2 只已知感染有钩虫的犬科动物 ( 钩 +ILS 9 和钩 +ILS 23 )、和 2 只已知感染有鞭虫的犬科动物 ( 鞭 +ILS 34 和鞭 +ILS 39 )。

[0047] 未感染的、受犬心虫感染的、受钩虫感染的、和受鞭虫感染的样品的平均 OD 分别是 0.058、0.061、0.074、和 0.074 ( 这些样品之每份所测量的 OD 均是 0.101 或更小 ), 指明抗弓首线虫 pAB 没有特异性结合任何这些样品中的抗原。相反地,来自受蛔虫感染的犬的粪便样品的平均 OD 是 0.599, 其比未感染的和受犬心虫感染的样品中所测量的平均 OD 高约 10 倍, 并且比受鞭虫感染的样品和受钩虫感染的样品的平均 OD 高约 8 倍。在进一步证实抗弓首线虫 pAB 特异性结合一种或多种蛔虫抗原但没有特异性结合任何钩虫或鞭虫粪抗原外,此第 2 项实验证明抗弓首线虫 pAB 没有特异性结合任何犬心虫粪抗原。

[0048] 实验 3 :抗弓首线虫 pAB 仅在犬科动物患有活动性蛔虫感染时在来自该动物的粪便中检测出蛔虫。

[0049] 一旦确定抗弓首线虫 pAB 特异性结合蛔虫,但没有特异性结合钩虫、鞭虫或犬心虫,实施实验 3 以确定抗弓首线虫 pAB 是否仅在合适的时间 ( 即仅在宿主动物患有活动性蛔虫感染时 ) 才检测出蛔虫。为此目的,自实验 1 和实验 2 中所描述的所有未感染的犬和受蛔虫感染的犬获得 ELISA 数据。具体地,在感染前 1 天 ( “-1” ) 及感染后第 23 天、第 31 天、第 38 天、第 44 天、第 48 天、第 52 天、第 93 天、和第 105 天时自所有或一些这些受蛔虫感染的动物获得粪便样品,并自所述粪便样品产生数据。对这些粪便样品的显微镜检查指明,第 38 天、第 44 天、第 48 天、第 52 天、和第 93 天但不是第 -1 天、第 23 天、第 31 天、和第 105 天时获得的样品基本上感染有蛔虫卵。( 第 23 天和第 31 天时缺乏实质数目的蛔虫卵与蛔虫在犬中的生活周期一致。即,本领域中公知的是,口服施用的蠕虫卵不以实质数目在犬粪便材料中显示,直至引入后约 1 个月。此外,预期第 105 天时缺乏实质数目的蛔虫卵是由于第 91 天时施用的驱肠虫药处理。 )

[0050] 如图 4 中所显示的,仅在显微术确定基本上感染有蛔虫卵的粪便样品中 ( 即,仅在第 38 天、第 44 天、第 48 天、第 52 天、和第 93 天时获得的样品中 ) 通过本发明的方法检测出蛔虫。具体地,在第 -1 天、第 23 天、第 31 天、和第 105 天之每一天来自受蛔虫感染的犬的粪便样品 ( 以显微术确定其基本上无蛔虫卵 ) 产生的平均 OD 值小于 0.180。在第 38 天、第 44 天、第 48 天、第 52 天、和第 93 天之每一天来自受蛔虫感染的犬的粪便样品产生的平均 OD 值是 1.316、1.842、1.896、2.295、1.104, 其表示在 OD 方面比无卵样品升高约 6 倍至约 12 倍的范围。

[0051] 因此实验 3 指明,抗弓首线虫 pAB 仅在宿主动物患有活动性蛔虫感染时才特异性

结合蛔虫粪抗原。

[0052] 实验 4 :抗弓首线虫 pAB 特异性结合猫粪便样品中的蛔虫粪抗原,并且仅在从其中获得该样品的猫患有活动性蛔虫感染时才如此。

[0053] 实验 4 的目的是确定抗弓首线虫 pAB 是否特异性结合猫中的蛔虫粪抗原。

[0054] 图 5 和图 6 中分别显示了为自未感染的猫和受蛔虫感染的猫获得的粪便样品测量的 OD 值。具体地,图 5 显示了 75 天过程里使用来自未感染猫的粪便样品测量的平均 OD 值(和标准偏差)。(图 5 中所显示的每个 OD 值是 6 次分开的 ELISA 反应中自同一粪便样品获得的 6 个 OD 值的平均值。)对于第 -1 天(即,向受钩虫感染的动物施用钩虫感染前 1 天)和第 54 天及对于其间选定的天数,显示了来自相同的 6 只未感染猫(其被称作 C081-N、C098-N、C118-N、C091-N、C097-N、和 C106-N)的数据。此外,对于第 60 天、第 68 天和第 74 天之每一天也显示了来自这 6 只猫中的 3 只,即 C081-N、C098-N 和 C118-N 的数据。

[0055] 图 6 显示了 78 天过程里使用自受钩虫感染的猫采集的粪便样品产生的平均 OD 值(和标准偏差)。(图 6 中所显示的每个 OD 值是 6 次分开的 ELISA 反应中自同一粪便样品产生的 6 个 OD 值的平均值。)对于第 -1 天(即,向动物施用蛔虫感染前 1 天)和第 54 天及对于其间的选定天数,显示了来自相同的 6 只猫科动物(其被称作 C085-R、C087-R、C104-R、C096-R、C100-R 和 C107-R)的数据。此外,对于第 60 天和第 77 天及对于其间选定的天数,显示了来自这 6 只猫中的 3 只,即 C085-R、C087-R 和 C104-R 的数据。

[0056] 参考图 5,对于第 -1 天和第 74 天及其间选定的天数之每一天,为未感染的猫测量的平均 OD 值的平均值是 0.059 或更小。参考图 6,对于第 -1 天和第 34 天及其间选定的天数之每一天,为受蛔虫感染的猫测量的平均 OD 值的平均值是 0.053 或更小。在第 40 天,为受蛔虫感染的猫测量的平均 OD 值的平均值是 0.312,其比在未感染的猫中为第 -1 天和第 74 天及其间选定的天数之每一天及在受蛔虫感染的猫中在第 -1 天和第 34 天及其间选定的天数所看到的高约 10 倍。此外,在感染后第 42 天、第 46 天、第 48 天、第 50 天和第 54 天为一些受蛔虫感染的猫所测量的数个平均 OD 值比未感染的猫中为第 -1 天和第 74 天及其间选定的天数之每一天及在受蛔虫感染的猫中在第 -1 天和第 34 天及其间选定的天数所看到的高数倍。

[0057] 这些数据指明,抗弓首线虫 pAB 特异性结合一种或多种蛔虫粪抗原。这些数据进一步指明,可以使用抗弓首线虫 pAB 来确定猫是否感染有蛔虫。

[0058] 实验 4 的另一个目的是确定抗弓首线虫 pAB 是否仅在猫科动物患有活动性蛔虫感染时才检测出蛔虫。

[0059] 对感染后第 60 天自受蛔虫感染的犬科动物采集的粪便样品的显微镜观察显示,样品适度地无蛔虫卵,而对感染后第 63 天、第 68 天、第 70 天、第 74 天和第 77 天自受钩虫感染的动物采集的粪便样品的显微镜检查显示,样品基本上无蛔虫卵。预期感染后第 60 天的卵适度减少及感染后第 63 天、第 68 天、第 70 天、第 74 天和第 77 天的卵实质减少是由于感染后第 56 天施用的驱肠虫药处理。参考图 6,为受蛔虫感染的猫所测量的平均 OD 值的平均值与所观察到的自这些动物采集的粪便样品中的卵数目减少一致。具体地,在驱肠虫药处理后的天数为这些犬所测量的平均 OD 值的平均值是 0.063(第 60 天)或更小。

[0060] 这些数据指明,抗弓首线虫 pAB 特异性结合一种或多种蛔虫粪抗原。这些数据进一步指明,可以使用抗弓首线虫 pAB 来确定猫是否患有活动性蛔虫感染。

[0061] 实施例 B

[0062] 使用以下材料和方法来产生下文所描述的实验 5 中所描述的数据。

[0063] 多克隆抗体制备。在家兔中针对来自蛔虫（犬弓首线虫）肠的提取物制备抗弓首线虫 pAB (IgG) 的一种制备物，并在家兔中针对来自蛔虫（犬弓首线虫）生殖器官的提取物制备抗弓首线虫 pAB (IgG) 的第二种制备物，并且这两种制备物均是通过使用标准方法从血清纯化的。（为了清楚，针对肠制备的抗弓首线虫 pAB 更具体地称为是“抗 TGUT pAB”而针对生殖器官制备的抗弓首线虫 pAB 更具体地称为是“抗 TOVA pAB”。）简言之，如下制备来自剖开的雌性蛔虫肠或雄性和雌性生殖器官的提取物，即自感染的犬科动物收获蛔虫，清洗它们，并解剖所述器官。在液氮中研磨所述器官，并在具有蛋白酶抑制剂的 Hanks 平衡盐溶液中悬浮。给家兔施用此悬浮液，并自经免疫接种的家兔收集血清。如下自经免疫接种的家兔的血浆纯化抗 TGUT pAB 和抗 TOVA pAB，即通过蛋白 G 亲和层析分离 IgG 抗体。

[0064] 犬科动物的感染和抗肠虫处理。对于实验 5，通过给健康犬口服施用约 150-300 颗蛔虫（犬弓首线虫）、钩虫、或鞭虫的遮掩卵来实现寄生线虫感染。通过在自这些犬科动物获得的粪便样品中显微镜观察蠕虫卵来证实感染。认为产生通过显微镜检查发现无蠕虫卵的粪便样品的犬是未受感染的。

[0065] ELISA 测定法。通过物理吸附在 Immulon 1B 96 孔板上于 4℃ 固定化纯化的抗 TGUT pAB 或抗 TOVA pAB (3-9 μg/ml ; 100 μl / 孔) 过夜。然后用 0.1M Tris pH 7.0 中的 1% BSA 于 4℃ 封闭板过夜，接着于室温干燥。将约 100 μl 粪便提取物（如上文所描述的那样制备的）添加至每孔，并容许于室温温育 1 小时。依照本领域普通技术人员已知的标准方法用 PBS-Tween-20 溶液清洗各孔 5 次。如下用 HRP 标记游离的抗 TGUT pAB 或抗 TOVA pAB，即使用 SMCC 来产生偶联物，并将 3-9 μg/ml 此偶联物添加至 96 孔板的每孔。于室温的 30 分钟温育期后，依照本领域普通技术人员已知的标准方法使用 PBS-Tween-20 溶液自各孔清洗未结合的偶联物。然后将 50 μl TMBLUE® 过氧化物酶底物 (SeraCare Life Sciences, West Bridgewater, MA) 添加至每孔，并于室温温育板达 10 分钟。10 分钟温育期后用 0.1% SDS 停止每个酶促反应后，通过使用 ELISA 读板仪进行的标准分光光度法技术于 A650 测量 96 孔板中每孔的 OD 值。在此安排中，为 96 孔板的任何特定孔获得的 OD 值与该孔中存在的特异性结合的抗原量成正比。

[0066] 实验 5：抗 TGUT pAB 和抗 TOVA pAB 之每一种在犬粪便样品中特异性结合蛔虫，但均没有特异性结合钩虫或鞭虫。

[0067] 实验 5 的目的是确定针对蛔虫肠道制备的抗体（具体称为“抗 TGUT pAB”）和 / 或针对蛔虫生殖道制备的抗体（具体称为“抗 TOVA pAB”）是否特异性结合蛔虫、钩虫、和 / 或鞭虫的粪抗原。图 7 和图 8 之每一幅中显示了实验 5 中所获得的 16 份犬粪便样品的 OD 测定。（图 7 显示了使用抗 TGUT pAB 所获得的 OD 值，而图 8 显示了使用抗 TOVA pAB 所获得的 OD 值。）具体地，自如下犬科动物获得这些粪便样品：4 只已知无寄生虫感染的犬科动物（阴 TIY5d62、阴 SVY5d62、阴 SBY5d62、和阴 LCZ5d62）、4 只已知感染有蛔虫的犬科动物（蛔 + QKZ5d62、蛔 + SPY5d62、蛔 + RYZ d69、和蛔 + WHY5d69）、4 只已知感染有钩虫的犬科动物（钩 + LEY5d76、钩 + OGY5d76、钩 + SXZ5d84、和钩 + SKZ5d69）、和 4 只已知感染有鞭虫的犬科动物（鞭 + SEZ d62、鞭 + KXZ5d69、鞭 + RQZ5d62、和鞭 + REY5d62）。感染后第 62 天（“d62”）、第 69 天（“d69”）、第 76 天（“d76”）、或第 84 天（“d84”）时获得粪便样品。为每只特定

的犬科动物选择的具体的感染后天数基于蠕虫卵排出量处于或接近峰水平的天数,如通过显微镜检查所测定的。

[0068] 具体参考图7,对于抗TGUT pAB,未感染的、受钩虫感染的、和受鞭虫感染的样品的所测量的平均OD分别是0.075、0.083、和0.082(这些样品之每份所测量的OD小于0.096),指明抗TGUT pAB没有特异性结合任何这些样品中的抗原。相反地,来自受蛔虫感染的犬的粪便样品的平均OD是0.385,其比为未感染的、受钩虫感染的和受鞭虫感染的样品所获得的平均OD高约4.5至5倍。这些数据指明抗TGUT pAB特异性结合一种或多种蛔虫抗原,但没有特异性结合任何钩虫或鞭虫粪抗原。

[0069] 具体参考图8,对于抗TOVA pAB,未感染的、受钩虫感染的、和受鞭虫感染的样品的所测量的平均OD分别是0.588、0.820、和0.590(这些样品之每份所测量的OD小于0.916)。相反地,来自受蛔虫感染的犬的粪便样品的平均OD是3.244,其比为未感染的、受钩虫感染的和受鞭虫感染的样品所获得的平均OD高约4至5.5倍。这些数据指明抗TGUT pAB特异性结合一种或多种蛔虫抗原,但没有特异性结合任何钩虫或鞭虫粪抗原。

[0070] 虽然已经参照具体的实施方案和具体的实施例描述了本发明的组合物、装置和方法,但是要理解的是可以在不背离本发明的精神和范围的前提下产生本发明的装置和/或方法的变化形式。例如,要理解的是不同于抗弓首线虫 pAB 的多克隆抗体、或单克隆抗体、单链抗体(scFv)、嵌合抗体、或抗体片段可以替换抗弓首线虫 pAB。可以通过例如给动物施用一种或多种对蛔虫特异性的抗原来制备另一种对蛔虫特异性的多克隆抗体。此外,虽然抗弓首线虫 pAB 是在家兔中制备的,但是也可以在例如人或其它灵长类、小鼠、大鼠、豚鼠、山羊、猪、牛、绵羊、驴、犬、猫、鸡、或马中制备多克隆抗体。在本发明的装置中所使用的抗体还可以是任何抗体类,包括例如 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。用于制备和表征抗体的手段是本领域中公知的。参见例如 Dean, Methods Mol. Biol. 80:23-37(1998); Dean, Methods Mol. Biol. 32:361-79(1994); Baileg, Methods Mol. Biol. 32:381-88(1994); Gullick, Methods Mol. Biol. 32:389-99(1994); Drenckhahn 等, Methods Cell. Biol. 37:7-56(1993); Morrison, Ann. Rev. Immunol. 10:239-65(1992); Wright 等, Crit. Rev. Immunol. 12:125-68(1992)。

[0071] 本发明的装置、方法和试剂盒中所使用的抗体还可以是单链抗体(scFv)、或抗体的抗原结合片段。抗体的抗原结合片段是完整抗体的、包含完整抗体中抗原结合位点或可变区的部分,其中所述部分是没有完整抗体的Fc区的重链恒定域的。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>和 F<sub>v</sub>片段。

[0072] 可以通过本领域中已知的任何方法来将本发明的装置中所使用的抗体固定化在固体支持物上,包括例如,共价地或非共价地,直接地或间接地,将所述抗体附着至所述固体支持物。因此,虽然在所描述的实施方案中通过物理吸附(即,在不使用化学接头的情况中)将抗弓首线虫 pAB 附着至固体支持物,但是涵盖的是,可以通过本领域技术人员容易知道的任何化学结合(即,在使用化学接头的情况中)方法来将抗弓首线虫 pAB 或其它抗体固定化至固体支持物。

[0073] 所述装置的固体支持物不限于是聚苯乙烯 96 孔板。固体支持物可以是任何适合于对蛔虫特异性的抗体的固定化的材料。例如,固体支持物可以是珠、颗粒、管、孔、探针、浸渍片(dipstick)、吸管尖(pipette tip)、载玻片、纤维、膜、纸、天然的和改良的纤维素、聚

丙烯酰胺、琼脂糖、玻璃、聚丙烯、聚乙烯、右旋糖苷、尼龙、淀粉酶、塑料、磁石 (magnetite) 或本领域技术人员容易知道的任何其它合适的材料。

[0074] 本发明的装置也不限于是适合于实施 ELISA 测定法的装置。例如,所述装置可以是适合于实施侧流测定法的装置。对于实施在本发明中有用的侧流测定法有用的例示性装置记载于美国专利号 5,726,010,本文通过提及而收录其全部内容。因此用于实施侧流测定法的装置可以是 SNAP® 装置,其可购自 IDEXX Laboratories, Inc. (Westbrook, ME)。

[0075] 任选地,所述装置可以包括一种或多种经标记的抗原捕捉试剂,其可以在对本发明的装置应用之前与粪便样品混合。在包括经标记的抗原试剂时,可以在所述装置的固体表面上沉积或干燥经标记的抗原捕捉试剂,或者不这样做。“抗原捕捉”指对感兴趣抗原特异性的任何化合物。经标记的抗原捕捉试剂(无论添加至粪便样品还是预先沉积在所述装置上)可以是例如对蛔虫抗原特异性的经标记抗体。例如,与辣根过氧化物酶偶联的蛔虫特异性抗体可以作为经标记的抗原捕捉试剂使用。

[0076] 任选地,所述装置还可以包括液体试剂,其自反应区(固相)运离(诸如例如在该装置包括 SNAP® 装置时)或有助于除去(诸如例如在该装置包括 96 孔板时)未结合的材料(例如未反应的粪便样品和未结合的抗原捕捉试剂)。液体试剂可以是清洗试剂,并仅用来自反应区除去未结合的材料,或者它可以包括检测剂试剂,并用来除去未结合的材料和促进抗原检测。例如,在偶联有酶的抗原捕捉试剂的情况中,检测剂试剂包括在反应区(固相)与酶-抗体偶联物反应后产生可检测信号的底物。或者,在偶联有放射性的、荧光的、或吸收光的分子的经标记抗原捕捉试剂的情况中,检测剂试剂仅起清洗溶液的作用,其通过洗去未结合的经标记试剂来促进对反应区复合物形成的检测。

[0077] 液体试剂可以进一步包括有限数量的“抑制剂”,即,阻断可检测的终产物形成的物质。有限数量定义为是足以阻断终产物形成直至大部分或全部过量的、未结合的材料被运离第二区域(此时产生可检测的终产物)的抑制剂量。

[0078] 本发明的装置还可以包括在与抗原捕捉试剂不同的位置处固定化的各种结合试剂。例如,可以包括识别经标记抗体或抗原捕捉试剂的物种特异性(例如,蠕虫特异性)抗体部分或酶标记的试剂的酶部分的免疫试剂(抗体、抗原或肽)作为阳性对照以评估试剂在装置内的耐久性(viability)。例如,阳性对照可以是抗辣根过氧化物酶抗体,其在例如山羊或小鼠中制备。另外,可以包括自衍生抗原-抗体复合物的抗体部分的物种的非免疫成员分离的试剂(例如,抗体)作为阴性对照以评估免疫复合物(即,抗原-抗体复合物)形成的特异性。

[0079] 在被设计成检测粪便样品中的蛔虫外,任选地,可以将本发明的装置设计成容许实施一种或多种其它诊断测试。例如,固体支持物还可以包括用于检测一种或多种非蛔虫蠕虫寄生虫、一种或多种非蠕虫寄生虫、一种或多种病毒、或一种或多种细菌的试剂。用于检测一种或多种非蛔虫蠕虫寄生虫、一种或多种非蠕虫寄生虫、一种或多种病毒或一种或多种细菌的试剂可以是例如由对一种或多种非蛔虫蠕虫寄生虫、一种或多种非蠕虫寄生虫、一种或多种病毒或一种或多种细菌特异性的抗体所识别的一种或多种抗原或一种或多种抗体。

[0080] 在本发明的方法中,通过检测粪便样品中是否存在一种或多种蛔虫抗原来实现蛔虫感染的检测。可以通过本领域中已知的任何方案来收集要测试的粪便样品的可溶性部

分。例如,在上文所描述的特定方案外,可以使用过滤、离心、或者简单混合接着进行重力沉降 (gravimetric settling) 来收集样品的可溶性部分。

[0081] 所述方法包括在容许抗原 / 抗体复合物,即免疫复合物形成的条件下使粪便样品与对一种或多种蛔虫抗原特异性的一种或多种抗体接触。即,抗体特异性结合粪便样品中存在的蛔虫抗原。本领域技术人员会熟悉用于检测抗原 / 抗体复合物结合的测定法和条件。例如,可以使用结合抗原 / 抗体复合物的二抗来检测抗原 / 抗体复合物。可以使用本领域中已知的任何适合的方法来检测蛔虫抗原和抗蛔虫抗体之间的复合物在样品中的形成。此外,可以通过本领域中已知的方法来测定抗体 - 抗原复合物的量。比对照样品中形成的水平高的水平指明蛔虫感染。

[0082] 本发明方法的备选步骤可以包括向本发明的装置 (其包括固定化的对蛔虫抗原特异性的抗体) 应用粪便样品,并检测粪便样品中是否存在蛔虫抗原。可以将对蛔虫抗原特异性的抗体直接或间接附着至固体支持物或基片诸如微量滴定孔、磁珠、非磁性珠、柱、基质、膜、由合成的或天然的纤维 (例如,玻璃或基于纤维素的材料或热塑性聚合物,诸如聚乙烯、聚丙烯、或聚酯) 构成的纤维毯片 (fibrous mat)、由颗粒材料 (例如,玻璃或各种热塑性聚合物) 构成的烧结结构、或由硝酸纤维素、尼龙、聚砒等 (一般而言,本质上是合成的) 构成的浇铸膜薄膜。可以以合适的形状 (诸如薄膜、片、或板) 使用所有这些基片材料,或者可以将它们包被至合适的惰性载体 (诸如纸、玻璃、塑料薄膜、或织物) 上、或者与合适的惰性载体键合、或者覆盖惰性载体。适合于将肽固定化在固相上的方法包括离子、疏水、共价相互作用等。

[0083] 然而,本发明的方法不需要包括固相或基片的使用。例如,所述方法可以包括免疫沉淀方法,其不需要固相或基片的使用。

[0084] 在本发明的一些实施方案中,在指示剂试剂诸如酶偶联物 (其被结合至抗体) 催化可检测反应时检测出抗原 / 抗体复合物。任选地,可以在容许可检测的抗原 / 抗体 / 指示剂复合物形成的条件下向抗原 / 抗体复合物应用包括信号产生化合物的指示剂试剂。任选地,可以在形成抗原 / 抗体复合物前用指示剂试剂标记抗体。

[0085] 具体地,可以通过辐射度测量、色度测量、荧光测量、大小分离、或沉淀方法来检测本发明的一些方法中的抗原 / 抗体复合物或抗原 / 抗体 / 指示剂复合物的形成。也可以通过添加与包括信号产生化合物的指示剂试剂偶联的二抗来实现抗原 / 抗体复合物的检测。包括与多肽 / 抗体复合物结合的信号产生化合物 (标记物) 的指示剂试剂可以使用上文所描述的方法来检测,并且可以包括显色剂、催化剂诸如酶偶联物、荧光化合物诸如荧光素和罗丹明 (rhodamine)、化学发光化合物诸如二氧烷 (dioxetane)、吡啶盐 (acridinium)、菲啶盐 (phenanthridinium)、钆、和鲁米诺 (luminol)、放射性元素、直接可见的标记物,以及辅因子、抑制剂、磁性颗粒等。酶偶联物的例子包括碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶等。特定标记物的选择不是至关重要的,但是它要能够单独地或与一种或多种别的物质一起产生信号。

[0086] 可以用本领域中已知的任何类型的标记物 (包括例如荧光的、化学发光的、放射性的、酶、胶体颗粒、放射性同位素和生物发光的标记物) 来标记抗体 (包括二抗)。在本发明的各种实施方案中,用酶、胶体颗粒、放射性核素或荧光体来标记本发明的一种或多种抗体。颗粒标记物可以是例如,与对蛔虫抗原特异性的抗体偶联的有色乳胶颗粒、染料溶胶、

或金溶胶。

[0087] 本发明的方法包括但不限于那些基于竞争、直接反应或三明治型测定法的,包括但不限于ELISA、RIA、免疫荧光测定法(IFA)、血凝(HA)、荧光偏振免疫测定法(FPIA)、和微量滴定板测定法(在微量滴定板的一个或多个孔中进行的任何测定法)。本发明的一种测定法包括可逆流层析结合测定法,其可以通过例如使用SNAP®装置来实施。参见美国专利号5,726,010。

[0088] 本发明的方法便于三明治或竞争型特异性结合测定法。在三明治式测定法中,在反应区中固定化抗原捕捉试剂。这些抗原捕捉试剂可以特异性结合所测试粪便样品中的抗原。具体地,这些抗原捕捉试剂特异性结合来自蛔虫的抗原(若存在于粪便样品中的话)。结合来自样品的抗原后,通过任何合适的方法来检测抗原捕捉试剂/抗原复合物。例如,所述复合物可以与经标记的特异性结合试剂(例如,酶-抗体偶联物)起反应,并检测抗原(例如,在与底物反应后)。

[0089] 在本发明方法的其它实施方案中,实施竞争测定法。在竞争测定法中,在反应区固定化抗原捕捉试剂,并同时与来自样品的抗原和经标记的抗原(例如抗原-酶偶联物)接触。在反应区检测出的标记物量与样品中的抗原量成反比。

[0090] 在本发明的一些实施方案中,将对一种或多种蛔虫抗原特异性的抗体附着至固相或基片。将潜在包括来自蛔虫的抗原的粪便样品添加至基片。添加能特异性结合蛔虫的抗体。抗体可以是固相上使用的相同抗体,或者它们可以来自不同来源或物种。此外,可以将这些抗体与指示剂试剂诸如酶偶联物连接。可以在每次添加前实施清洗步骤。可以添加生色团或酶底物,并且可以容许显现颜色。可以停止颜色反应,并可以使用例如分光光度计来量化该颜色。

[0091] 在本发明的其它实施方案中,将对一种或多种蛔虫抗原特异性的抗体附着至固相或基片。将潜在包括蛔虫抗原的粪便样品添加至基片。添加能特异性结合蛔虫抗原的第二抗物种抗体。这些第二抗体来自不同于固相抗体的物种。添加第三抗物种抗体,其特异性结合第二抗体,并且不会特异性结合固相抗体。第三抗体可以包括指示剂试剂,诸如酶偶联物。可以在每次添加前实施清洗步骤。可以添加生色团或酶底物,并且可以容许显现颜色。可以停止颜色反应,并可以使用例如分光光度计来量化该颜色。

[0092] 在一个具体的例子中,如下与装置(其是侧流测定法装置)一起实施本发明的方法,即向该装置在第一区(样品应用区)的流动基质(flow matrix)添加制备好的粪便样品。制备好的粪便样品在液体流动路线中通过毛细管作用被携带至流动基质的第二区,在那里颗粒标记物能够与粪便样品中的抗原结合并形成第一复合物。颗粒标记物可以是例如与对蛔虫抗原特异性的抗体偶联的有色乳胶颗粒、染料溶胶、或金溶胶。第一复合物被携带至流动基质的第三区,在那里特异性结合蛔虫抗原的抗体被固定化在独特位置。在固定化的抗体和第一复合物之间形成第二复合物。可以直接显现第二复合物一部分的颗粒标记物。

[0093] 蛔虫抗体可以是反应区(固相)中的固定化抗原捕捉试剂。可以将第二抗原捕捉试剂,即,已经与标记物偶联的第二蛔虫抗体添加至样品,之后将样品添加至装置,或者可以将第二抗原捕捉试剂掺入装置中。例如,可以在提供样品应用区和固相间液体交流的液体流动路线上沉积并干燥经标记抗原捕捉试剂。经标记抗原捕捉试剂与测试样品的接触能

导致经标记抗原捕捉试剂的溶解。

[0094] 本发明进一步包括用于检测粪便样品中的蛔虫的测定试剂盒（例如，制品）。因此，试剂盒可以包括本发明的一种或多种装置。例如，试剂盒可以包括抗蛔虫抗体和用于测定所述抗体对样品中的蛔虫抗原的结合的手段。在一个具体的例子中，此类试剂盒包括具有固定化抗蛔虫抗体的装置、一种或多种抗原捕捉试剂（例如，非固定化的经标记抗原捕捉试剂和固定化的抗原捕捉试剂）和清洗试剂，以及检测试剂及阳性和阴性对照试剂（若想要或合适的话）。本领域普通技术人员已知的其它成分诸如缓冲液、对照等可以包括在此类测试试剂盒内。各种试剂的相对量可以有所变化，以提供试剂溶液中的各个浓度，其充分优化测定法的灵敏性。具体地，可以以干粉（通常是冻干的）提供试剂，其溶解后会提供具有适合于与样品组合的浓度的试剂溶液。本发明的抗体、测定法、和试剂盒在例如患者中蛔虫感染的各个病例的诊断，以及蛔虫爆发的流行病学研究中是有用的。试剂盒可以进一步包括关于实施本发明的一种或多种方法的说明书，包括关于使用与试剂盒一起包括在内的本发明的任何装置的说明书。

[0095] 用于检测蛔虫感染的本发明的方法可以与其它诊断测定法组合以检测其它生物体或疾患的存在。例如，本发明的测定法可以与检测一种或多种非蛔虫蠕虫粪便寄生物、一种或多种非蠕虫粪便寄生物、一种或多种病毒、一种或多种细菌、一种或多种血液传播的寄生物或潜血/隐血或其组合的试剂组合。通过在单一测定装置中提供两个或更多个独特的结合位点（诸如例如，SNAP®测定装置上的两个独特点），本发明容许检测来自单一样品的两种或更多种生物体。在一个实施方案中，有3个独特点（所述点是抗原或抗体结合试剂），其用于检测来自单一样品的3种生物体的过去或现在的感染（即，相同的、单一样品被呈递至单一装置上的3种捕捉试剂）。

[0096] 本文中合适地例示性描述的发明可以在缺乏未在本文中明确公开的任何一种或多种元件、一项或多项限制的情况下实施。如此，例如在本文中的每种情况中，术语“包含”、“主要由…组成”和“由…组成”之任一项可以被其它两项之任一替换，同时保留它们普通的意义。已经被采用的术语和表述作为描述的术语使用而并非限制，使用此类术语和表述并不意图排除所显示和描述的特征或其部分的任何等同物，而是认识到在本发明所要求保护的范围内的各种修饰是有可能的。如此，应当理解的是，尽管已经通过优选的实施方案明确地公开了本发明，但是本领域技术人员可以采取任选的特征、本文中公开的概念的修饰和变化，并且此类修饰和变化被认为是在说明书和所附的权利要求书所限定的本发明的范围内的。

[0097] 另外，在按马库什组或其它备选分组描述本发明的特征或方面时，本领域技术人员会认可本发明也由此是以马库什组或其它组的任何成员个体或成员亚组的方式描述的。

[0098] 已经描述了许多实施例来帮助阐明本发明。然而，要理解的是，可以在不背离本发明的精神和范围的前提下进行各种修饰。因而，其它实施方案也在本文所附权利要求书的范围内。

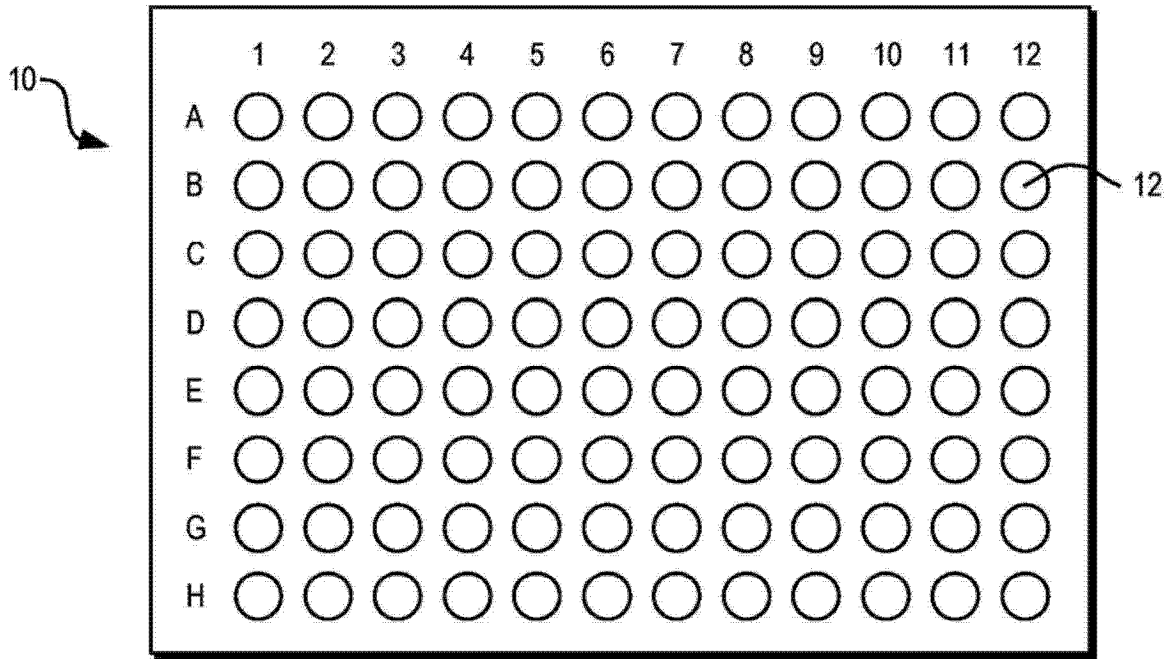


图 1A

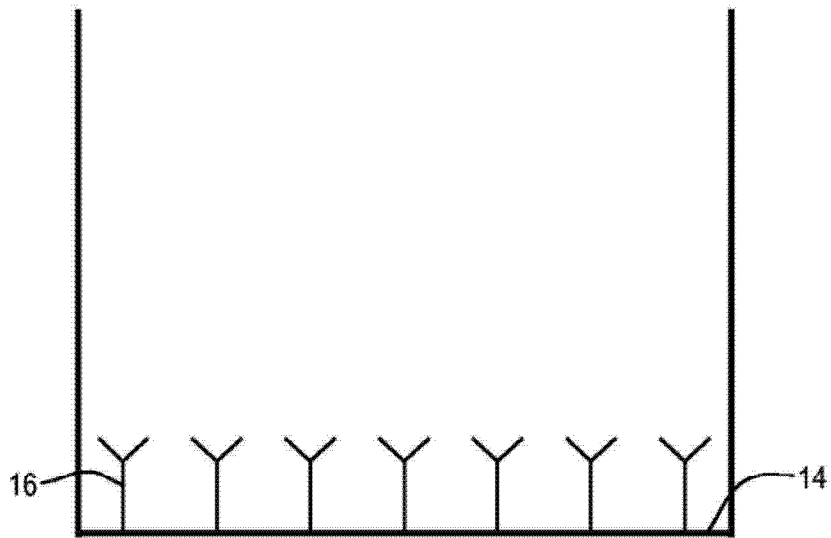


图 1B

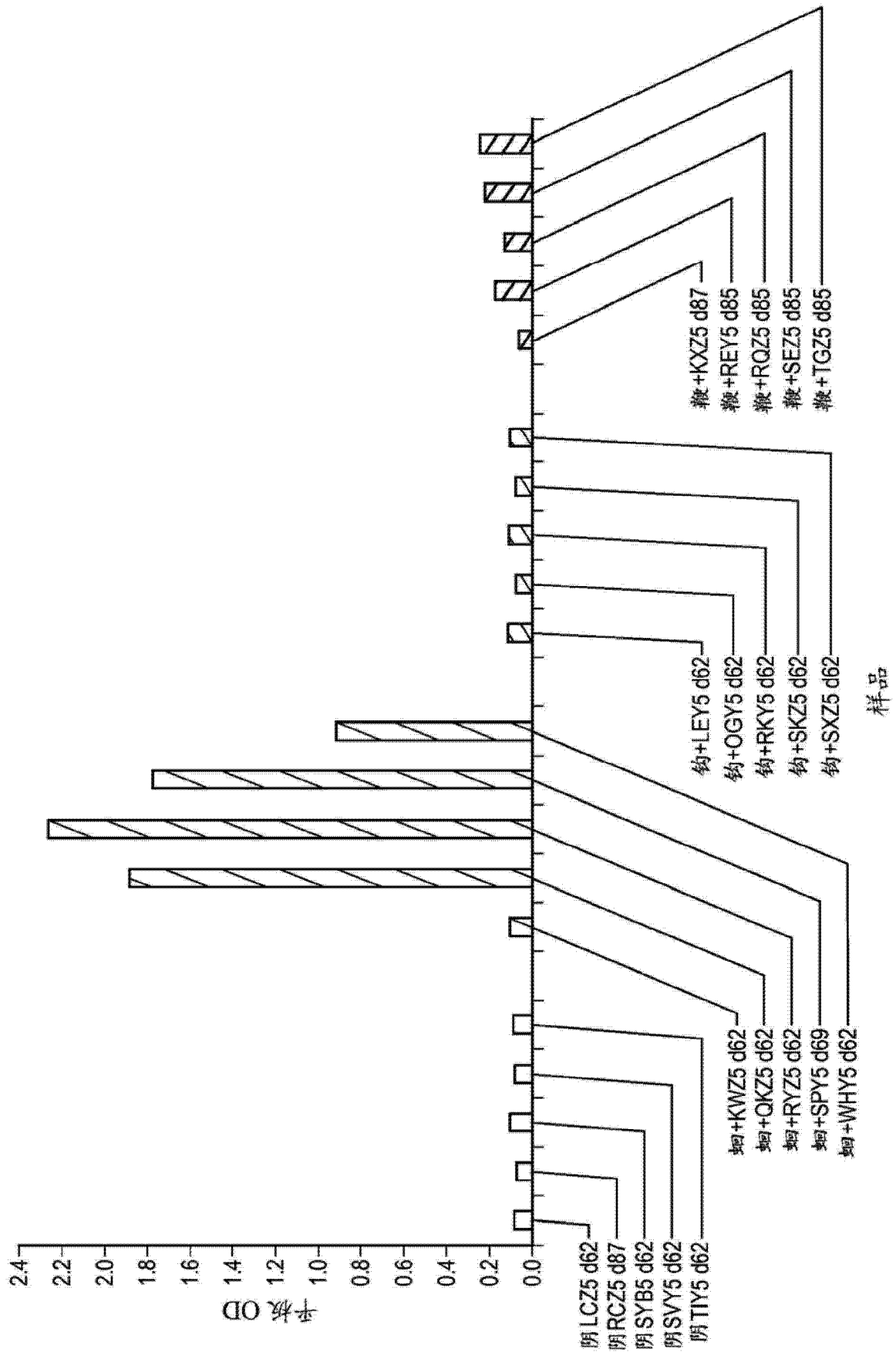


图 2

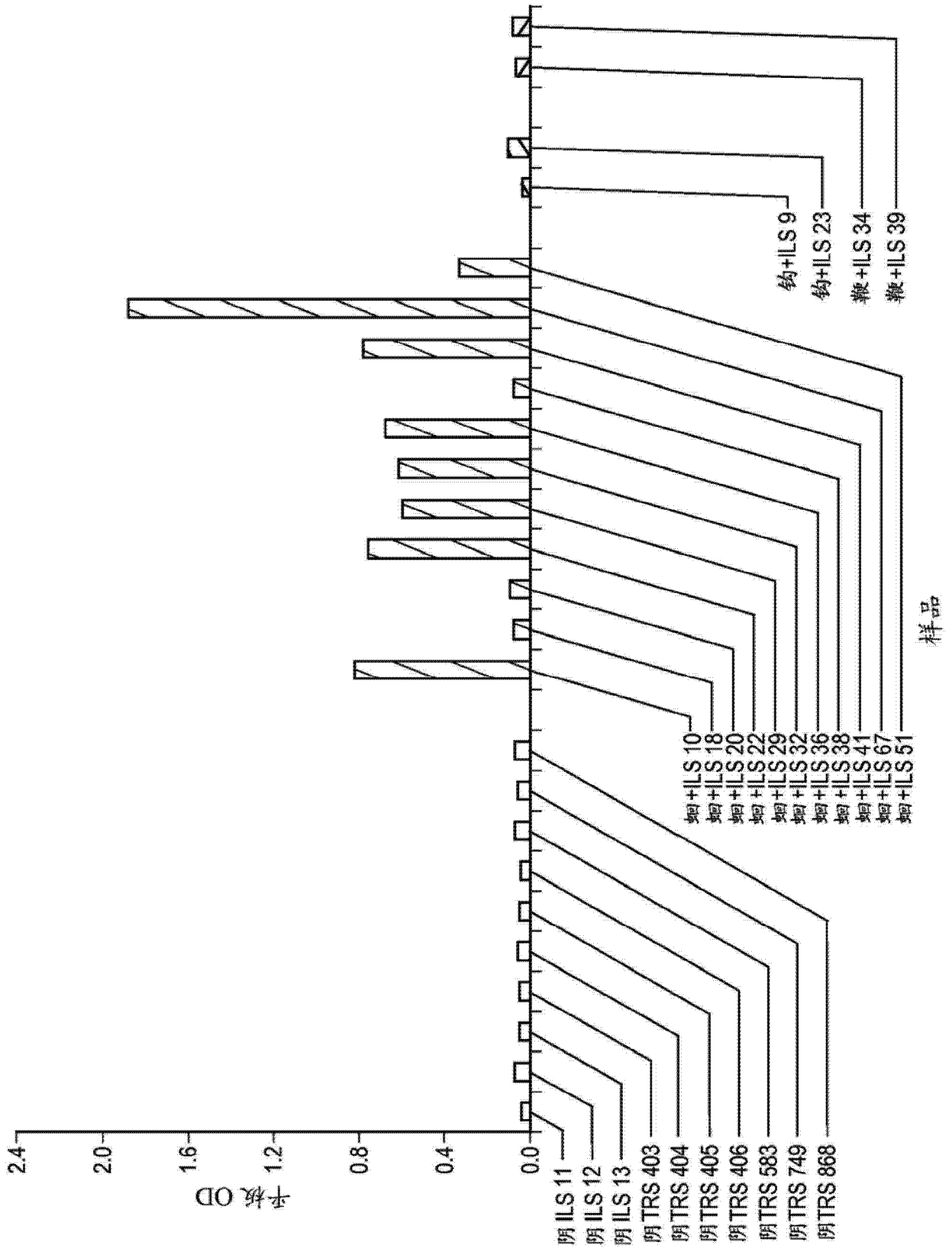


图 3

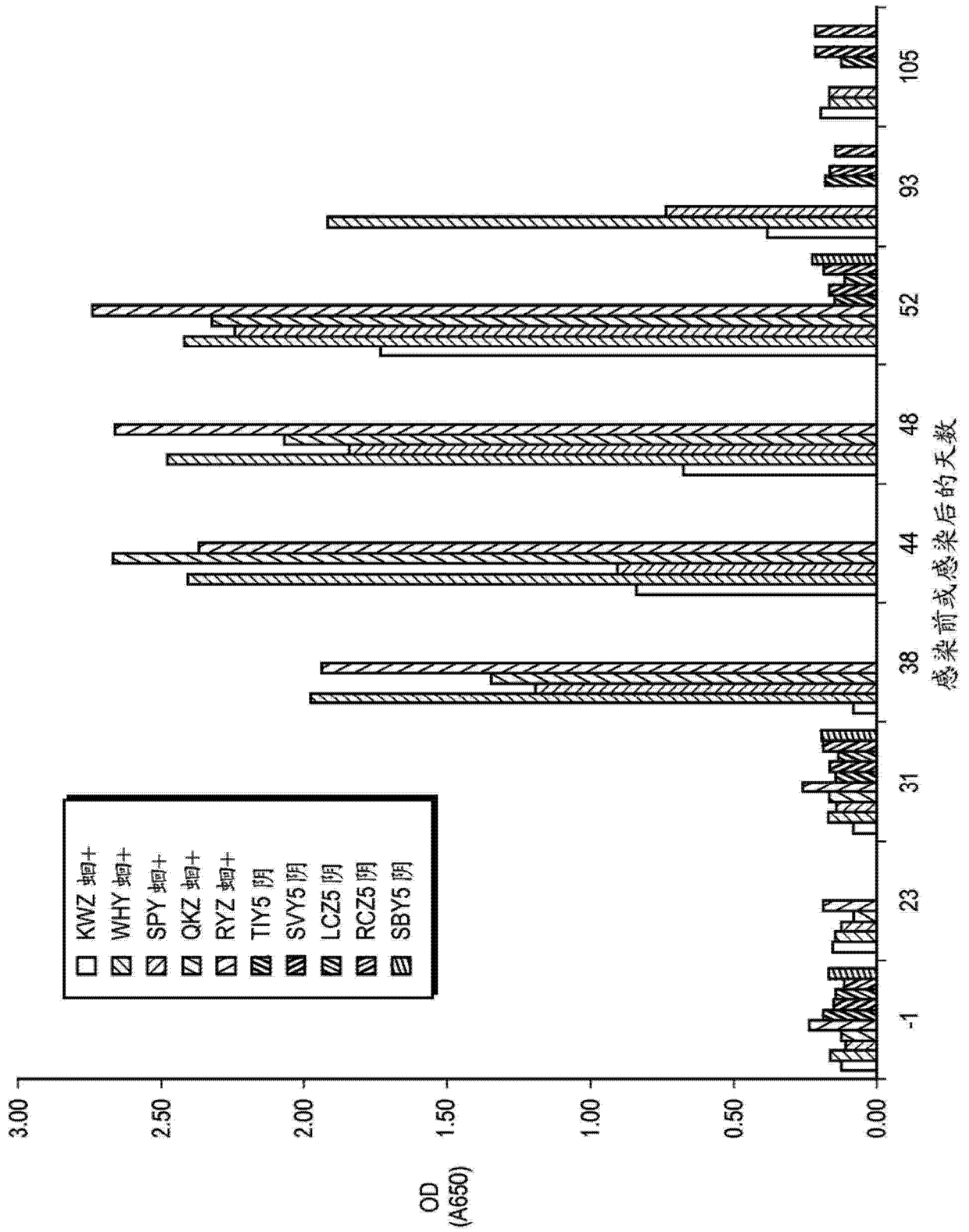


图 4

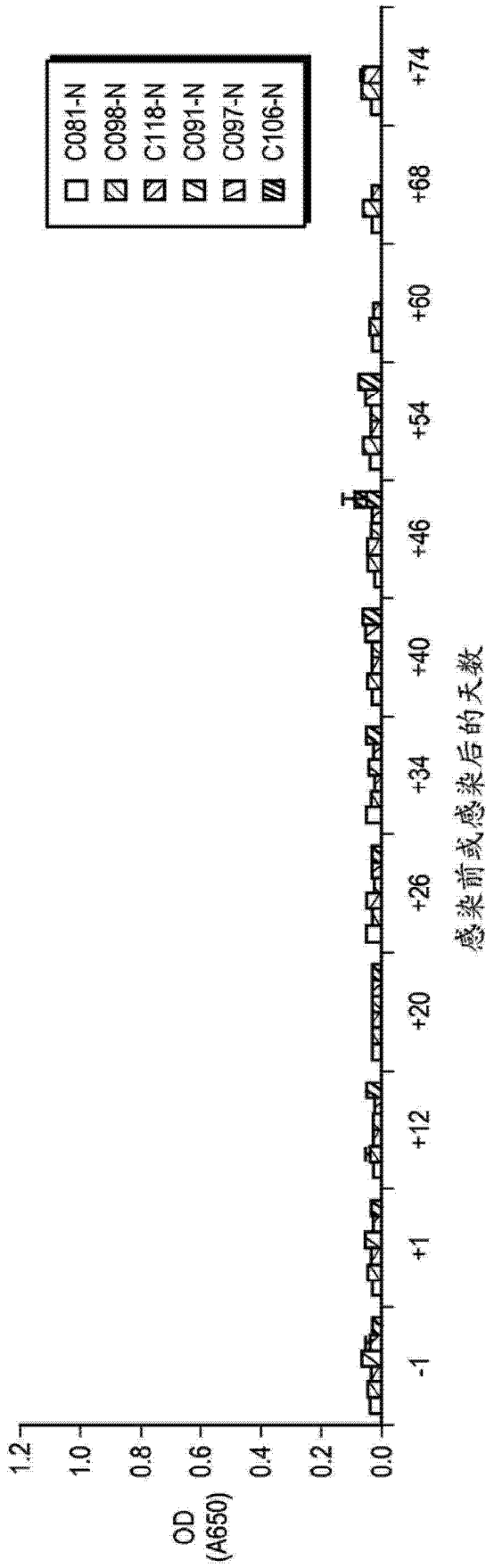


图 5

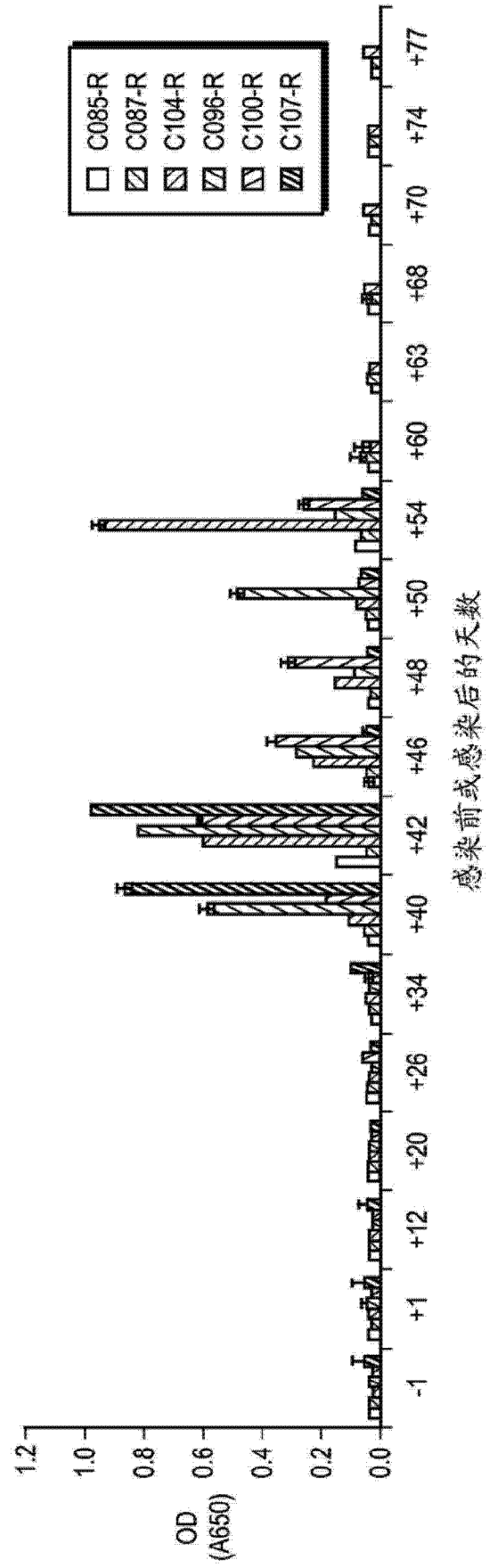


图 6

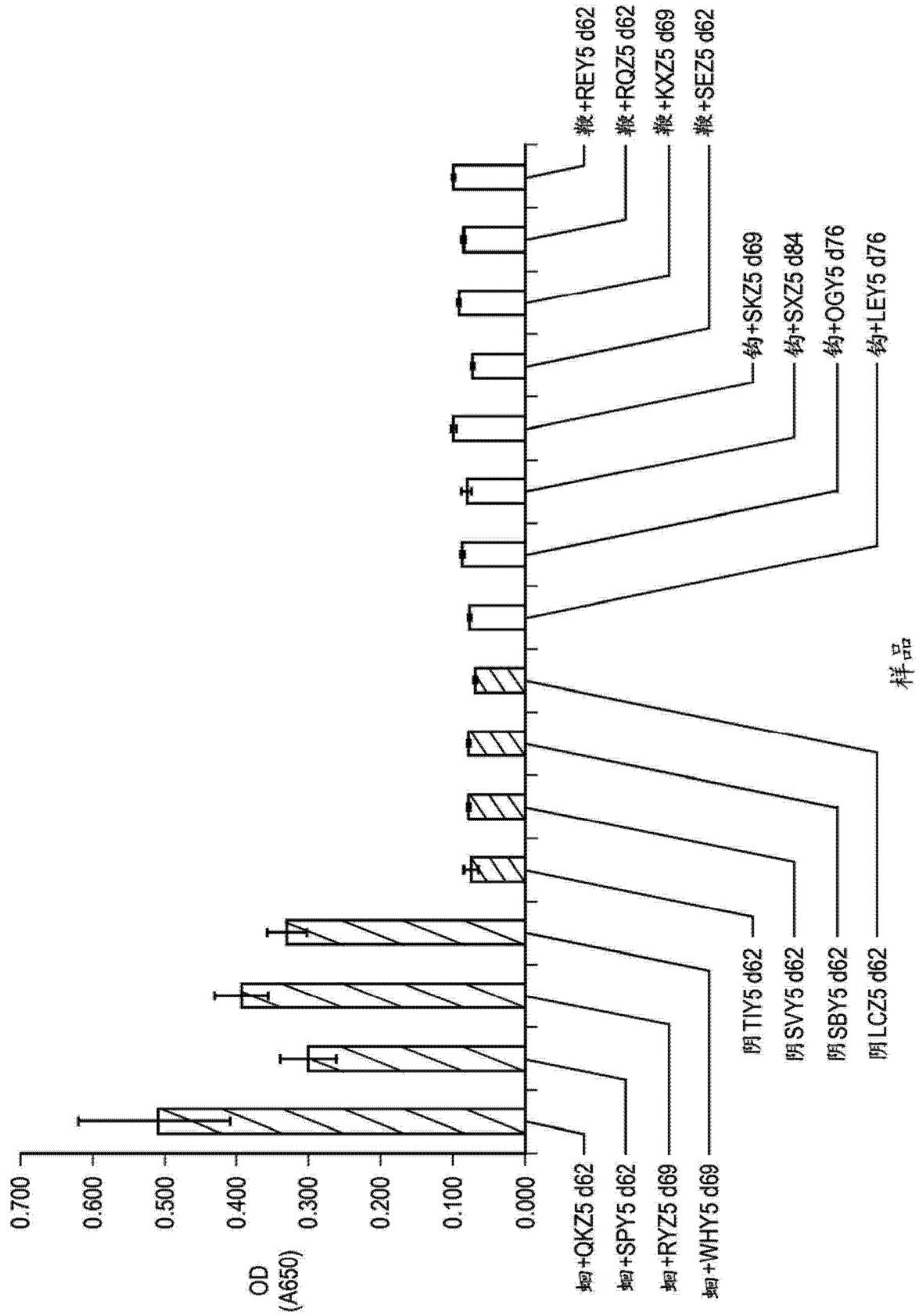
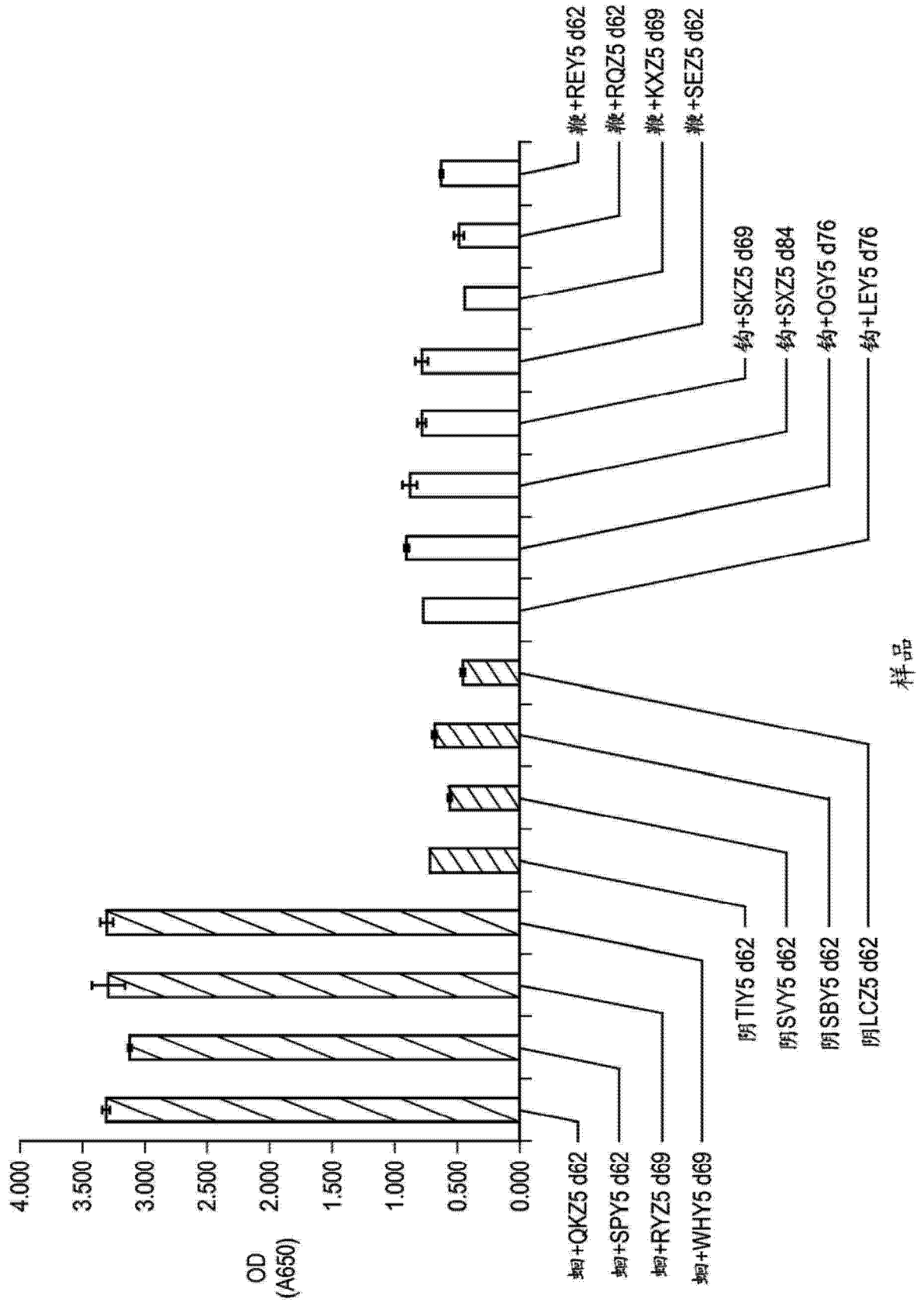


图 7



专利名称(译)	蛔虫粪抗原检测		
公开(公告)号	<a href="#">CN104650226A</a>	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201510093284.8	申请日	2008-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	艾德克斯实验室公司		
申请(专利权)人(译)	艾德克斯实验室公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾德克斯实验室公司		
[标]发明人	戴维 A 埃尔斯莫尔 劳里 A 弗林		
发明人	戴维.A.埃尔斯莫尔 劳里.A.弗林		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/5308 G01N2333/4353 G01N2800/06		
代理人(译)	张文辉		
优先权	11/763592 2007-06-15 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种用于检测粪便样品中是否存在蛔虫的组合物、装置、试剂盒和方法。本发明的组合物、装置、试剂盒和方法可用于证实来自哺乳动物的粪便样品中是否存在蛔虫，所述哺乳动物可能还感染有一种或多种钩虫、鞭虫、和犬心虫。

