



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107236712 A

(43)申请公布日 2017.10.10

(21)申请号 201710450511.7

(22)申请日 2017.06.15

(71)申请人 山西省农业科学院畜牧兽医研究所
地址 030032 山西省太原市平阳南路150号

(72)发明人 詹丽娥 刘华栋 陆冰洋 王彩先
李婷婷 唐娟 丁树荣

(74)专利代理机构 山西五维专利事务所(有限
公司) 14105

代理人 茹牡花

(51)Int.Cl.

C12N 7/00(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12R 1/93(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种鸡新城疫诊断抗原的制备方法

(57)摘要

本发明属于兽医免疫学技术领域,具体涉及一种鸡新城疫诊断抗原的制备方法。按照第一步,NDV分离鉴定:无菌采集疑似鸡新城疫病的死鸡病料;鸡胚繁殖;RT-PCR扩增,证明为NDV山西株;第二步,诊断抗原的制备:将分离鉴定的NDV在鸡胚中大量繁殖,收获得鸡胚尿囊液保存备用;检测病毒效价:用血凝试验方法检测病毒效价,病毒效价达到26为合格;检测病毒凝集价:病毒凝集价达到 $10\log_2$ 为合格;诊断抗原浓缩;诊断抗原灭活;诊断抗原效价测定,即为诊断抗原。本发明具有既经济又方便、不用花大量资金购买昂贵的仪器,适合于各养鸡场和基层兽医站应用,经多年的试验浓缩的诊断抗原检测达到95%以上,应用效果颇佳等优点。

1. 一种鸡新城疫诊断抗原的制备方法,其特征是,包括以下步骤:

第一步,NDV分离鉴定:无菌采集疑似鸡新城疫病的死鸡病料;鸡胚繁殖;RT-PCR扩增,证明为NDV山西株;

第二步,诊断抗原的制备:将分离鉴定的NDV在鸡胚中大量繁殖,收获得鸡胚尿囊液保存备用;检测病毒效价:用血凝试验方法检测病毒效价,病毒效价达到26为合格;检测病毒凝集价:病毒凝集价达到 $10\log_2$ 为合格;诊断抗原浓缩;诊断抗原灭活;诊断抗原效价测定,即为诊断抗原。

一种鸡新城疫诊断抗原的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于兽医免疫学技术领域,具体涉及一种鸡新城疫诊断抗原的制备方法。

背景技术

[0002] 新城疫(newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(NDV)引起禽的一种急性、热性、败血性和高度接触性传染病。病鸡是本病的主要传染源,鸡感染后就出现临床症状是:呼吸困难,拉绿色稀便,精神沉郁,个别出现转圈的神经症状。病毒从口、鼻分泌物和粪便排出。病毒存在于病鸡所有组织器官、体液、分泌物和排泄物中。在流行间歇期带毒鸡,也是本病的传染源。鸟类也是重要的传播者。病毒可经消化道、呼吸道,也可经眼结膜、受伤的皮肤和泄殖腔黏膜侵入机体。该病一年四季均可发生,但以春秋季节较多。鸡场的鸡群一旦发生本病,可在4-5天内波及全群。具有很高的发病率和病死率,是危害养禽业的一种主要传染病之一。世界动物卫生组织(OIE)将其列为A类疫病。我国列入重大传染病,也是禽类重点防控的传染病之一。

[0003] 目前新城疫的防控主要是:(1)采取分子生物学方法和免疫学方法进行流行病学调查,得到早发现、早诊断、早治疗,将易感鸡提前扑杀,控制易感鸡群感染;(2)新城疫疫苗预防,我国已将新城疫的免疫列入各养鸡场的免疫程序。免疫学方法血清凝集试验和血清凝集抑制试验快速、简便诊断疾病,易于基层兽医站工作人员和鸡场化验员掌握,这就需要新城疫快速诊断抗原,提供一种新城疫诊断抗原的制备方法是目前需要解决的问题。

发明内容

[0004] 本发明的目的是利用制备的抗原,对各养鸡场鸡群进行鸡新城疫免疫抗体的检测,达到减少发病,提高鸡场经济效益的目的。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0006] 一种鸡新城疫诊断抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0007] 第一步,NDV分离鉴定:无菌采集疑似鸡新城疫病的死鸡病料;鸡胚繁殖;RT-PCR扩增,证明为NDV山西株;

[0008] 第二步,诊断抗原的制备:将分离鉴定的NDV在鸡胚中大量繁殖,收获得鸡胚尿囊液保存备用;检测病毒效价:用血凝试验方法检测病毒效价,病毒效价达到2⁶为合格;检测病毒凝集价:病毒凝集价达到10¹log₂为合格;诊断抗原浓缩;诊断抗原灭活;诊断抗原效价测定,即为诊断抗原。

[0009] 本发明诊断抗原原理分析:

[0010] (1)浓缩透吸袋的功效:透吸袋是由聚脂纤维制成的,经过反复试验,此透吸袋装水后容易被蔗糖将透吸袋里的水份吸出,这样既经济又实惠,可以提高病毒浓度。

[0011] (2)浓缩蔗糖的功效:蔗糖除了有一般化学试剂的功效,还有吸水性很强功能,而且市场上容易购买,价格便宜。

[0012] (3)浓缩病毒尿囊液的作用:NDV在鸡胚中繁殖收获的尿囊液中水份所占的比例

大,经过浓缩,将多余的水份去掉,病毒含量提高,对ND检测更加准确。

[0013] 本发明用透吸袋和蔗糖浓缩抗原,经多年应用检测效果达到95%以上。首先是对鸡群进行流行病学调查,降低新城疫病的发生和流行,增加养鸡场的经济效益;其次是对鸡场免疫前后的鸡群进行抗体检测,为鸡场制定科学的免疫程序。

[0014] 与现有的M1LL1PORE PELL1CON超滤、PEG 6000沉淀、蔗糖-甘油垫等方法浓缩技术相比,本发明既经济又方便。不用花大量资金购买昂贵的仪器,本发明适合于各养鸡场和基层兽医站应用,经多年的试验浓缩的诊断抗原检测达到95%以上,应用效果颇佳。

具体实施方式

[0015] 本实施例一种鸡新城疫诊断抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0016] 第一步,NDV分离鉴定:无菌采集疑似鸡新城疫病的死鸡病料;鸡胚繁殖;RT-PCR扩增,证明为NDV山西株;

[0017] 第二步,诊断抗原的制备:将分离鉴定的NDV在鸡胚中大量繁殖,收获得鸡胚尿囊液保存备用;检测病毒效价:用血凝试验方法检测病毒效价,病毒效价达到26为合格;检测病毒凝集价:病毒凝集价达到 $10\log_2$ 为合格;诊断抗原浓缩;诊断抗原灭活;诊断抗原效价测定,即为诊断抗原。

[0018] 本发明用制备的诊断抗原,对鸡群进行ND流行病学调查和免疫前后抗体效价的检测,为鸡场的防控提供有力依据。诊断抗原的制备主要试剂和材料是:鸡胚、新城疫病毒RT-PCR检测试剂盒、蔗糖和聚脂纤维透吸袋、医用止血钳、糖瓷白盘等。具体实施方式如下:

[0019] 1、分离鉴定

[0020] (1) ND乳液制备:从山西省不同地区鸡场无菌采集疑似鸡新城疫病的病死鸡心、肝、脾等病料,经研磨制成乳液。

[0021] (2) RT-PCR扩增:使用新城疫病毒RT-PCR检测试剂盒进行扩增,结果可见被检样本与阳性对照出现同一位置的明显条带,证明有NDV。

[0022] (3) 鸡胚繁殖:无菌制备的乳液,稀释后接种11日龄鸡胚,盲传几代,收集尿囊液进行血凝试验检测病毒效价达到26为合格。

[0023] 2、诊断抗原制备方法

[0024] (1)NDV感作反应:取分离鉴定的NDV作10倍稀释,为了抑制杂菌,可加入5000单位的青霉素进行感作反应。

[0025] (2)鸡胚繁殖:购买SPF鸡蛋60枚,用消毒水洗净凉干,放入37度、湿度65%的孵化机孵育,每天翻两次蛋,孵育5-6日去除死胚和白蛋,11日龄接种分离鉴定的NDV,每枚接种0.2/ml,继续孵育,每天观察鸡胚发育情况,24小时以内死亡的鸡胚弃掉,24-120h死、活鸡胚从孵化机里取出放入4℃冰箱保存,收获鸡胚尿囊液。

[0026] (3)检测病毒效价:用血凝试验方法检测病毒效价,病毒效价达到26为合格。

[0027] (4)检测病毒凝集价:ND标准阳性血清从中国兽医药品监察所购买,分离的诊断抗原作4倍和8倍稀释,用血凝抑制试验方法检测病毒的凝集价,病毒凝集价达到 $10\log_2$ 为合格。

[0028] (5)诊断抗原浓缩:①主要材料:聚脂纤维透吸袋(简称透吸袋)、蔗糖(分析纯)、医用止血钳、糖瓷白盘、鸡胚繁殖病毒尿囊液;②浓缩方法:取鸡胚繁殖病毒尿囊液50ml加入

透吸袋里,透吸袋两头用医用止血钳挟住;500克蔗糖(分析纯)倒入糖瓷白盘里铺开;将装有50ml病毒尿囊液透吸袋放入倒有蔗糖的糖瓷盘里,蔗糖将装有50ml病毒尿囊液透吸袋里的水份慢慢吸出,大约透吸袋里的病毒尿囊液有10-15ml即可停止浓缩;用试管将透吸袋里的病毒尿囊液吸入无菌瓶里,-20℃冻存备用。

[0029] (6)诊断抗原灭活:灭活剂为福尔马林(分析纯),浓缩的病毒用福尔马林灭活,100ml病毒液里加入0.2ml福尔马林,摇匀备用。

[0030] (7)诊断抗原效价测定:用血凝试验和血凝抑制试验对灭活病毒进行测定,血凝价为28;血凝抑制价为 $10\log_2$,即为诊断抗原。

[0031] 本发明诊断抗原的使用方法:使用自制的诊断抗原,对不同鸡群进行鸡新城病的流行病学调查和免疫抗体的检测,达到早发现、快速诊断、早治疗的目的,减少鸡场的经济损失。

专利名称(译)	一种鸡新城疫诊断抗原的制备方法		
公开(公告)号	CN107236712A	公开(公告)日	2017-10-10
申请号	CN201710450511.7	申请日	2017-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	山西省农业科学院畜牧兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	山西省农业科学院畜牧兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	山西省农业科学院畜牧兽医研究所		
[标]发明人	詹丽娥 刘华栋 陆冰洋 王彩先 李婷婷 唐娟 丁树荣		
发明人	詹丽娥 刘华栋 陆冰洋 王彩先 李婷婷 唐娟 丁树荣		
IPC分类号	C12N7/00 G01N33/531 C12R1/93		
CPC分类号	C12N7/00 C12N2760/18151 G01N33/531 G01N2333/125		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于兽医免疫学技术领域，具体涉及一种鸡新城疫诊断抗原的制备方法。按照第一步，NDV分离鉴定：无菌采集疑似鸡新城疫病的死鸡病料；鸡胚繁殖；RT-PCR扩增，证明为NDV山西株；第二步，诊断抗原的制备：将分离鉴定的NDV在鸡胚中大量繁殖，收获得鸡胚尿囊液保存备用；检测病毒效价：用血凝试验方法检测病毒效价，病毒效价达到26为合格；检测病毒凝集价：病毒凝集价达到 $10\log_2$ 为合格；诊断抗原浓缩；诊断抗原灭活；诊断抗原效价测定，即为诊断抗原。本发明具有既经济又方便、不用花大量资金购买昂贵的仪器，适合于各养鸡场和基层兽医站应用，经多年的试验浓缩的诊断抗原检测达到95%以上，应用效果颇佳等优点。