



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103123350 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 29

(21) 申请号 201210449829. 0

(22) 申请日 2012. 11. 12

(71) 申请人 福州大北农生物技术有限公司

地址 350000 福建省福州市晋安区鼓山镇园
中村 110 号

(72) 发明人 陈晟生 詹先强 陈景容

(74) 专利代理机构 福州君诚知识产权代理有限
公司 35211

代理人 戴雨君

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清的制备方法。其包括选兔、免疫接种、采集兔血清。本发明通过猪繁殖与呼吸综合征病毒免疫兔制备阳性血清,通过兔体对猪繁殖与呼吸综合征病毒刺激所产生免疫反应获得免疫抗体——阳性血清,减小了用猪制备阳性血清因同源动物而引起的同源其他外源病毒污染的风险,为阳性血清的制备提供了新的思路,此外使用兔子作为实验动物跟猪相比,也降低了经济成本。

1. 一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清的制备方法,其特征在于:其包括步骤如下:

1) 选兔:选用满足条件的兔:体重 2.0-3.0Kg 符合国家规定的一级动物标准的成年公兔,且其不带有猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体,猪瘟病毒及其抗体,猪圆环 II 型病毒及其抗体,猪伪狂犬病病毒及其抗体;

2) 免疫接种:分别对每只兔进行 3-5 次免疫接种:

第一次免疫接种:对每只兔皮下或肌肉注射 1-2.5 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗;

中间多次免疫接种:第一次免疫接种后每隔 7-10 天分别对每只兔进行皮下或肌肉多点注射猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗,免疫接种量为每只兔每次依上次剂量增加 1 倍;

最后一次免疫接种:中间多次免疫接种后 7-10 天分别对每只兔用 0.5-1mL 猪繁殖与呼吸综合征病毒液体抗原做静脉注射,同时皮下或肌肉多点注射 10-20 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗;

3) 采集兔血清:最后一次免疫接种后 28-42 天采集兔血清,用猪繁殖与呼吸综合征病毒 ELISA 抗体试剂盒,以及 Marc-145 细胞的中和抗体效价检测法,确认兔血清为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性且细胞中和抗体效价在 1:16 以上,即得猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清。

一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及兽医医药生物领域,特别涉及一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清的制备方法。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS),俗称“猪蓝耳病”,是一种引起母猪繁殖障碍及新生仔猪呼吸道症状和高死亡率的新 RNA 病毒传染病。其病原猪繁殖与呼吸综合征病毒最早于 1987 年发现于美国,1991 年荷兰人 Wensvoot 等首次从发病仔猪和母猪体内分离到了该病毒,当时称为 Lelystad 病毒(LV)。随后德国、美国、英国等也分离到了该病毒,目前,该病已遍及北美洲及欧洲,在全球范围内传播,亚太地区也呈蔓延之势,日本、韩国、菲律宾及我国台湾等均有疫情报道。郭宝清等 1996 首次从国内疑似 PRRS 感染猪群中分离出 PRRSV 从而证实了本病在我国的存在。近年来各地相继发生流行性感染,给养猪业造成的经济损失严重。

[0003] 为了减少该病对养猪业造成的经济损失,猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗的研制具有重大的意义,因此为保证疫苗(菌毒种)的特异性,鉴别检验是动物活疫苗质量检验的重点之一,猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清是目前主要应用于检验、诊断的蛋白类物质。氨基酸和多肽片段可用于各种免疫物质的合成,由氨基酸到多肽最后合成蛋白质。免疫球蛋白(抗体)是一种能攻击异己物质(抗原)并促进嗜中性粒细胞和巨噬细胞吞噬免疫球蛋白——抗原复合物的蛋白质,因此它们在清除细菌和病毒中起着重要作用。

[0004] 申请号 CN201110356735.4 的专利公开了鸡新城疫血凝抑制试验用阳性血清的制备,申请号 CN201010237919.4 公开了猪瘟阳性血清的制备,申请号 CN201010532340.0 公开了禽流感病毒 H9 亚型阳性血清的制备,尚未见有猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清制备方法的报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于通过兔体对猪繁殖与呼吸综合征病毒刺激所产生免疫反应获得免疫抗体——阳性血清,从而降低用猪制备阳性血清更易造成同源外源病毒污染的风险,提供一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清的制备方法。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清的制备方法,其包括步骤如下:

1) 选兔:选用满足条件的兔:体重 2.0-3.0Kg 符合国家规定的一级动物标准的成年公兔,且其不带有猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体,猪瘟病毒及其抗体,猪圆环 II 型病毒及其抗体,猪伪狂犬病病毒及其抗体;

2) 免疫接种:分别对每只兔进行 3-5 次免疫接种:

第一次免疫接种:对每只兔皮下或肌肉注射 1-2.5 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗;

中间多次免疫接种：第一次免疫接种后每隔 7-10 天分别对每只兔进行皮下或肌肉多点注射猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗，免疫接种量为每只兔每次依上次剂量增加 1 倍；

最后一次免疫接种：中间多次免疫接种后 7-10 天分别对每只兔用 0.5-1mL 猪繁殖与呼吸综合征病毒液体抗原做静脉注射，同时皮下或肌肉多点注射 10-20 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗；

3) 采集兔血清：最后一次免疫接种后 28-42 天采集兔血清，用猪繁殖与呼吸综合征病毒 ELISA 抗体试剂盒，以及 Marc-145 细胞的中和抗体效价检测法，确认兔血清为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性且细胞中和抗体效价在 1:16 以上，即得猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清。

[0007] 猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清被收集后经过辐照、过滤后，抽样做无菌检验、支原体检验、外源病毒检验，将无细菌、霉菌、支原体、外源病毒污染的猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清进行分装、冻干后低温保存，再次抽样检验，确认无污染后冻存备用。

[0008] 本发明采用以上技术方案，通过猪繁殖与呼吸综合征病毒免疫兔子制备阳性血清，减小了用猪制备阳性血清因同源动物而引起的同源其他外源病毒污染的风险，为阳性血清的制备提供了新的思路，此外使用兔子作为实验动物跟猪相比，也降低了经济成本。

具体实施方式

[0009] 本发明的技术方案为：

一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清的制备方法，其包括步骤如下：

1) 选兔：选用满足条件的兔：体重 2.0-3.0Kg 符合国家规定的一级动物标准的成年公兔，且其不带有猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体，猪瘟病毒及其抗体，猪圆环 II 型病毒及其抗体，猪伪狂犬病病毒及其抗体；

2) 免疫接种：分别对每只兔进行 3-5 次免疫接种：

第一次免疫接种：对每只兔皮下或肌肉注射 1-2.5 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗；

中间多次免疫接种：第一次免疫接种后每隔 7-10 天分别对每只兔进行皮下或肌肉多点注射猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗，免疫接种量为每只兔每次依上次剂量增加 1 倍；

最后一次免疫接种：中间多次免疫接种后 7-10 天分别对每只兔用 0.5-1mL 猪繁殖与呼吸综合征病毒液体抗原做静脉注射，同时皮下或肌肉多点注射 10-20 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗；

3) 采集兔血清：最后一次免疫接种后 28-42 天采集兔血清，用猪繁殖与呼吸综合征病毒 ELISA 抗体试剂盒，以及 Marc-145 细胞的中和抗体效价检测法，确认兔血清为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性且细胞中和抗体效价在 1:16 以上，即得猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清。

[0010] 猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清被收集后经过辐照、过滤后，抽样做无菌检验、支原体检验、外源病毒检验，将无细菌、霉菌、支原体、外源病毒污染的猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清进行分装、冻干后低温保存，再次抽样检验，确认无污染后冻存备用。

[0011] 下面将结合具体实施例对本发明进一步说明：

实施例 1

1) 选兔 : 选用满足条件的兔 : 体重 2.0-3.0Kg 符合国家规定的一级动物标准的成年公兔, 且其不带有猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体, 猪瘟病毒及其抗体, 猪圆环 II 型病毒及其抗体, 猪伪狂犬病病毒及其抗体 ;

2) 免疫接种 : 分别对每只兔进行 3 次免疫接种 :

第一次免疫接种 : 对每只兔皮下或肌肉注射 1 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

第二次免疫接种 : 第一次免疫接种后 7 天, 对每只兔皮下或肌肉注射 2 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

最后一次免疫接种 : 第二次免疫接种后 7 天, 对每只兔用 0.5mL 猪繁殖与呼吸综合征病毒的液体抗原做静脉注射, 同时皮下或肌肉多点注射 10 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

3) 采集兔血清 : 最后一次免疫接种后 28-42 天采集兔血清, 用猪繁殖与呼吸综合征病毒 ELISA 抗体试剂盒, 以及 Marc-145 细胞的中和抗体效价检测法, 确认兔血清为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性且细胞中和抗体效价为 1:16, 即得猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清。

[0012] 猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清被收集后经过辐照、过滤后, 抽样做无菌检验、支原体检验、外源病毒检验, 将无细菌、霉菌、支原体、外源病毒污染的猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清进行分装、冻干后低温保存, 再次抽样检验, 确认无污染后冻存备用。

[0013] 实施例 2

1) 选兔 : 选用满足条件的兔 : 体重 2.0-3.0Kg 符合国家规定的一级动物标准的成年公兔, 且其不带有猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体, 猪瘟病毒及其抗体, 猪圆环 II 型病毒及其抗体, 猪伪狂犬病病毒及其抗体 ;

2) 免疫接种 : 分别对每只兔进行 4 次免疫接种 :

第一次免疫接种 : 对每只兔皮下或肌肉注射 2 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

第二次免疫接种 : 第一次免疫接种后 8 天, 对每只兔皮下或肌肉注射 4 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

第三次免疫接种 : 第二次免疫接种后 8 天, 对每只兔皮下或肌肉注射 8 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

最后一次免疫接种 : 第三次免疫接种后 8 天, 对每只兔用 1.0mL 猪繁殖与呼吸综合征病毒的液体抗原做静脉注射, 同时皮下或肌肉多点注射 20 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

3) 采集兔血清 : 最后一次免疫接种后 28-42 天采集兔血清, 用猪繁殖与呼吸综合征病毒 ELISA 抗体试剂盒, 以及 Marc-145 细胞的中和抗体效价检测法, 确认兔血清为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性且细胞中和抗体效价为 1:32, 即得猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清。

[0014] 猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清被收集后经过辐照、过滤后, 抽样做无菌检验、支原体检验、外源病毒检验, 将无细菌、霉菌、支原体、外源病毒污染的猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清进行分装、冻干后低温保存, 再次抽样检验, 确认无污染后冻存备用。

[0015] 实施例 3

1) 选兔 : 选用满足条件的兔 : 体重 2.0-3.0Kg 符合国家规定的一级动物标准的成年公兔, 且其不带有猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体, 猪瘟病毒及其抗体, 猪圆环 II 型病毒及其抗体, 猪伪狂犬病病毒及其抗体 ;

2) 免疫接种 : 分别对每只兔进行 5 次免疫接种 :

第一次免疫接种 : 对每只兔皮下或肌肉注射 2.5 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

第二次免疫接种 : 第一次免疫接种后 10 天, 对每只兔皮下或肌肉注射 5 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

第三次免疫接种 : 第二次免疫接种后 10 天, 对每只兔皮下或肌肉注射 10 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

第四次免疫接种 : 第三次免疫接种后 10 天, 对每只兔皮下或肌肉注射 20 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

最后一次免疫接种 : 第四次免疫接种后 10 天, 对每只兔用 1.0mL 猪繁殖与呼吸综合征病毒的液体抗原做静脉注射, 同时皮下或肌肉多点注射 20 头份的猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗 CH-1R 株 ;

3) 采集兔血清 : 最后一次免疫接种后 28-42 天采集兔血清, 用猪繁殖与呼吸综合征病毒 ELISA 抗体试剂盒, 以及 Marc-145 细胞的中和抗体效价检测法, 确认兔血清为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性且细胞中和抗体效价为 1:28, 即得猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清。

[0016] 猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清被收集后经过辐照、过滤后, 抽样做无菌检验、支原体检验、外源病毒检验, 将无细菌、霉菌、支原体、外源病毒污染的猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清进行分装、冻干后低温保存, 再次抽样检验, 确认无污染后冻存备用。

专利名称(译)	一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清的制备方法		
公开(公告)号	CN103123350A	公开(公告)日	2013-05-29
申请号	CN201210449829.0	申请日	2012-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	福州大北农生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	福州大北农生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	福州大北农生物技术有限公司		
[标]发明人	陈晟生 詹先强 陈景容		
发明人	陈晟生 詹先强 陈景容		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	戴雨君		
其他公开文献	CN103123350B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清的制备方法。其包括选兔、免疫接种、采集兔血清。本发明通过猪繁殖与呼吸综合征病毒免疫兔制备阳性血清，通过兔体对猪繁殖与呼吸综合征病毒刺激所产生免疫反应获得免疫抗体——阳性血清，减小了用猪制备阳性血清因同源动物而引起的同源其他外源病毒污染的风险，为阳性血清的制备提供了新的思路，此外使用兔子作为实验动物跟猪相比，也降低了经济成本。