



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104502581 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201410745717. 9

(22) 申请日 2014. 12. 07

(71) 申请人 青岛易邦生物工程有限公司

地址 266114 山东省青岛市红岛经济区红岛
街道泉大路东大洋社区岙东南路 21 号

(72) 发明人 马爽 范根成 孙健 宋新宇

郭玉广 郭莉莉 胡潇 程增青

王红 李金积

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务

所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 21/33(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种猪传染性胸膜肺炎抗体检测用抗原及制备方法

(57) 摘要

本发明的目的是为猪群的猪传染性胸膜肺炎抗体检测提供一种检测用抗原及制备方法。本发明中抗原是从猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 1~15 型菌株培养物中提取的多糖抗原,为菌体分泌多糖,具有很强的特异性和敏感性,能真实的检测出猪传染性胸膜肺炎抗体;本发明中抗原标准浓度临界值的确定,为酶联免疫吸附试验检测和间接血凝试验检测提供了保障;操作简单、方便快捷,无需特殊设备和仪器,适合在基层推广应用。

1. 一种猪传染性胸膜肺炎抗体检测用抗原,其特征在于,所述的抗原为猪传染性胸膜肺炎 1 ~ 15 型的混合抗原。

2. 如权利要求 1 所述的抗原,其特征在于,所述的抗原为从猪胸膜肺炎放线杆菌 1 ~ 15 型菌株培养物中提取的多糖抗原。

3. 权利要求 1 所述的抗原的制备方法,其特征在于,所述的方法包括如下的步骤:

1) 生产抗原用种子制备

将 APP1 ~ 15 型冻干菌种分别划线接种于 S 琼脂平板上,置 5% ~ 10% CO₂ 条件下,37℃ 培养 16 ~ 18 小时,分别挑选菌落接种 5 ~ 6 日龄 SPF 鸡胚卵黄囊内,在 37℃ 继续孵育,收集 30 小时内死亡的鸡胚卵黄液作为一级种子;再分别取各型菌株一级种子划线接种 S 琼脂平板,在含 5% ~ 10% CO₂ 条件下 37℃ 培养 16 ~ 18 小时后,挑选菌落或菌苔接种于 S 肉汤培养基中,置 37℃ 振荡培养 10 ~ 12 小时制成二级种子;

2) 菌液的培养

将各型菌株的二级种子按 3% 接种到 S 肉汤中进行扩大培养,37℃ 振荡培养 10 ~ 12 小时,收获菌液;将各型菌液按终浓度为 0.5% 加入甲醛溶液,37℃ 振荡灭活 24 小时,灭活,将菌液 5000r/min 离心 20min 去上清,将沉淀的菌体用 pH6.4PBS 洗涤 2 次,将沉淀的菌体用 pH6.4PBS 稀释,稀释后将各型菌液置于 -20℃ 以下反复冻融 3 ~ 5 次,然后进行冰浴超声裂解,间歇破碎 5min,以 8000r/min 离心 30min,各型上清液分别用 0.22 μm 滤膜无菌抽滤,收集于无菌瓶内,其滤液即为猪传染性胸膜肺炎 1 ~ 15 型单型诊断用抗原液;将 APP1 ~ 15 型标准浓度抗原等量混合完成制备。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述的 S 琼脂,其制备方法如下:取鸡肉汁 100ml,胰蛋白胨血琼脂基质 3g,多聚蛋白胨 0.5g,加热溶解后调 pH 值至 7.2 ~ 7.4,115℃ 灭菌 30 分钟,待冷至 55℃ 左右,加入灭活鸡血清 5ml,1% 辅酶 I 1ml。

5. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述的 S 肉汤,其制备方法如下:取鸡肉汁 100ml,多聚蛋白胨 0.5g,胰蛋白胨 0.5g,氯化钠 0.5g,加热溶解后调 pH 值至 7.2 ~ 7.4,115℃ 灭菌 30 分钟,待冷至 55℃ 左右,加入灭活的鸡血清 5ml,1% 辅酶 I 1ml。

一种猪传染性胸膜肺炎抗体检测用抗原及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于兽用生物制品技术领域,具体涉及一种猪传染性胸膜肺炎抗体检测用抗原及制备方法。

背景技术

[0002] 猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actionobacillus pleuropneumoniae*, APP) 引起猪的一种呼吸系统重要传染病。本病主要是引起猪的一种伴有胸膜炎的纤维素性、出血性、坏死性肺炎,多呈最急性或急性病程而迅速致死,发病率和死亡率均在 50% 以上,它可发生于任何年龄的猪只,猪传染性胸膜肺炎在世界各国均有发生,阳性率逐年上升,近年来几乎全国各省均有本病发生的报道。尤其在集约化养猪场,一旦发生会造成重大经济损失。(进口猪嗜血杆菌胸膜肺炎血清学检查中国畜禽传染病 1988(1)31 ~ 32;陈小玲,杨旭夫,朱士盛.猪传染性胸膜肺炎的流行现状和措施.中国兽医杂志,2001,37:33-35;Nicolet J. Taxonomy and serological identification of *Actionobacillus pleuropneumoniae*. Can Vet, 1988, 29:578-580)。根据细菌荚膜多糖和脂多糖 (LPS) 抗原对血清的反应,可将生物 I 型分为 12 个血清型;生物 II 型至少有 3 个血清型(本病至今已有 15 个血清型),现有的而各型毒力有所差异,型间交叉保护性极差或缺少。由于本病病原的血清型众多,给本病的预防和控制带来了一定的难度,这就要求加强口岸检疫和猪群抗体的检测;因此血清学抗体检测是最重要的诊断方法之一。但由于 APP 各型之间缺少交叉保护,如果将每个样本都进行 15 个血清型的检测,操作繁琐,工作量大,难以实施,不能满足临床检测需求。

发明内容

[0003] 本发明的目的是为猪群的猪传染性胸膜肺炎抗体检测提供一种检测用抗原及制备方法,从而克服现有检测抗原的不足。

[0004] 本发明所提供的猪传染性胸膜肺炎抗体检测用抗原,为猪传染性胸膜肺炎 1 ~ 15 型的混合抗原;

[0005] 本发明的抗原优选为从猪胸膜肺炎放线杆菌 1 ~ 15 型菌株培养物中提取的多糖抗原;采用以下步骤制备:

[0006] 1) 生产抗原用种子制备

[0007] 将 APP1 ~ 15 型冻干菌种分别划线接种于 S 琼脂平板上,置 5% ~ 10% CO₂ 条件下,37℃ 培养 16 ~ 18 小时,分别挑选菌落接种 5 ~ 6 日龄 SPF 鸡胚卵黄囊内,在 37℃ 继续孵育,收集 30 小时内死亡的鸡胚卵黄液作为一级种子;再分别取各型菌株一级种子划线接种 S 琼脂平板,在含 5% ~ 10% CO₂ 条件下 37℃ 培养 16 ~ 18 小时后,挑选菌落或菌苔接种于 S 肉汤培养基中,置 37℃ 振荡培养 10 ~ 12 小时制成二级种子;

[0008] 2) 菌液的培养

[0009] 将各型菌株的二级种子按 3% 接种到 S 肉汤中进行扩大培养,37℃ 振荡培养 10 ~

12 小时,收获菌液;将各型菌液按终浓度为 0.5%加入甲醛溶液,37℃振荡灭活 24 小时,灭活,将菌液 5000r/min 离心 20min 去上清,将沉淀的菌体用 pH6.4PBS 洗涤 2 次,将沉淀的菌体用 pH6.4PBS 稀释,稀释后将各型菌液置于 -20℃以下反复冻融 3~5 次,然后进行冰浴超声裂解,间歇破碎 5min,以 8000r/min 离心 30min,各型上清液分别用 0.22 μm 滤膜无菌抽滤,收集于无菌瓶内,其滤液即为猪传染性胸膜肺炎 1~15 型单型诊断用抗原液;将 APP1~15 型标准浓度抗原等量混合,即成为 1 个光吸收单位的标准浓度多型混合抗原。

[0010] 所述的 S 琼脂,其制备方法如下:取鸡肉汁 100ml,胰蛋白胨琼脂基质 3g,多聚蛋白胨 0.5g,加热溶解后调 pH 值至 7.2~7.4,115℃灭菌 30 分钟,待冷至 55℃左右,加入灭活鸡血清 5ml,1%辅酶 I 1ml。

[0011] 所述的 S 肉汤,其制备方法如下:取鸡肉汁 100ml,多聚蛋白胨 0.5g,胰蛋白胨 0.5g,氯化钠 0.5g,加热溶解后调 pH 值至 7.2~7.4,115℃灭菌 30 分钟,待冷至 55℃左右,加入灭活的鸡血清 5ml,1%辅酶 I 1ml。

[0012] 本发明中抗原是从猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 1~15 型菌株培养物中提取的多糖抗原,为菌体分泌多糖,具有很强的特异性和敏感性,能真实的检测出猪传染性胸膜肺炎抗体;本发明中抗原标准浓度临界值的确定,为酶联免疫吸附试验检测和间接血凝试验检测提供了保障;操作简单、方便快捷,无需特殊设备和仪器,适合在基层推广应用;本发明是目前国内唯一可以用于酶联免疫吸附试验和间接血凝试验检测的诊断抗原。而本发明基于稳定性好、特异强、敏感性高等突出优点的同时,还能用于酶联免疫吸附试验和间接血凝试验检测方法中,且检测效果均良好,能够在临床检测上得到更好的应用。

具体实施方式

[0013] 本发明提供一种可同时应用猪传染性胸膜肺炎酶联免疫吸附试验和间接血凝试验应用免疫原性良好的 APP1~15 型菌株制备,按本发明能制备出稳定性好、特异强、敏感性高的 APP1~15 型混合抗原,本发明抗原主要优点还可同时进行猪传染性胸膜肺炎酶联免疫吸附试验和间接血凝试验,本发明要解决的技术问题在于克服现有检测抗原的不足,现有的检测用抗原仅能应用一种检测方法,而本发明抗原可同时用于猪传染性胸膜肺炎酶联免疫吸附试验和间接血凝试验检测,无论应用哪一种检测方法进行检测,本发明抗原检测效果均良好。该方法的建立还可满足抗体检测快速、准确,为进出口种猪抗体检测提供保障。

[0014] 本发明的抗原的制备方法如下:

[0015] 1 生产抗原用种子制备

[0016] 1.1 鸡肉汤琼脂(简称 S 琼脂)制备取鸡肉汁 100ml,胰蛋白胨琼脂基质 3g,多聚蛋白胨 0.5g,加热溶解后调 pH 值至 7.2~7.4,115℃灭菌 30 分钟,待冷至 55℃左右,按无菌要求加入灭活鸡血清 5ml,1%辅酶 I (NADH) 1ml。

[0017] 1.2 一级种子繁殖与鉴定将 APP1~15 型冻干菌种划线接种于 S 琼脂平板上,置 5%~10% CO₂条件下,37℃培养 16~18 小时,挑选 5 个以上具有虹彩光泽的典型菌落(或菌苔),接种 5~6 日龄 SPF 鸡胚卵黄囊内,在 37℃继续孵育,收集 30 小时内死亡的鸡胚卵黄液,经纯粹检验合格后,作为一级种子。-20℃保存,使用期应不超过 1 个月;-70℃以下保存,使用期应不超过 3 个月,在培养基上继代应不超过 6 代。

[0018] 1.3 二级种子繁殖取各型菌株一级种子,划线接种 S 琼脂平板,在含 5%~10% CO₂ 条件下,37℃培养 16~18 小时,挑选具有虹彩光泽的典型菌落或菌苔,接种于 S 肉汤培养基中,置 37℃振荡培养 10~12 小时,经纯检合格后,即为二级种子。2~8℃保存,应不超过 24 小时。

[0019] 2 菌液的培养

[0020] 2.1 鸡肉汤培养基(简称 S 肉汤)制备取鸡肉汁 100ml,多聚蛋白胨 0.5g,胰蛋白胨 0.5g,氯化钠 0.5g,加热溶解后调 pH 值至 7.2~7.4,115℃灭菌 30 分钟,待冷至 55℃左右,按无菌要求加入灭活的鸡血清 5ml,1%辅酶 I (NADH) 1ml。

[0021] 2.2 培养方法将纯检合格的各型菌株的二级种子按 3%接种到 S 肉汤中进行扩大培养,37℃振荡培养 10~12 小时,收获菌液进行纯粹检验。

[0022] 2.3 纯粹检验将培养物涂片进行革兰氏染色镜检,应纯粹。

[0023] 3 菌液处理将各型菌液按终浓度为 0.5%加入甲醛溶液,37℃振荡灭活 24 小时,灭活检验合格后,将菌液 5000r/min 离心 20min 去上清,将沉淀的菌体用 pH6.4PBS 洗涤 2 次,将沉淀的菌体用 pH6.4PBS 稀释,按比浊法测定,每毫升含菌量约为 90 亿。稀释后将各型菌液置于 -20℃以下反复冻融 3~5 次,然后进行冰浴超声裂解,间歇破碎 5min,以 8000r/min 离心 30min,各型上清液分别用 0.22 μm 滤膜无菌抽滤,收集于无菌瓶内,其滤液即为猪传染性胸膜肺炎 1~15 型单型诊断用抗原液。

[0024] 4 各型抗原最佳浓度标定将 APP1~15 型抗原液分别按适宜比例稀释,在紫外分光光度计波长 260nm 处测定其浓度(以光吸收单位表示),然后将各单型抗原用 pH6.4PBS 稀释成 1 个光吸收单位,作为各型抗原的标准浓度。

[0025] 5 APP1~15 型混合抗原的配制将 APP1~15 型标准浓度抗原等量混合,即成为 1 个光吸收单位的标准浓度多型混合抗原。

[0026] 6 成品检验

[0027] 【性状】对制备的 3 批猪传染性胸膜肺炎诊断抗原进行了性状检测,结果均为无色透明液体。

[0028] 【无菌检验】对本发明所制备的 3 批猪传染性胸膜肺炎诊断抗原按 2010 年版《中国兽药典》附录进行检验,均无菌生长。

[0029] 【效价测定】我们对所抽取的诊断用抗原,进行了 ELISA、间接血凝(IHA)效价的测定,达不到要求全部报废。对制备的 3 批猪传染性胸膜肺炎诊断抗原进行了检测,结果均符合要求。详见表 1。

[0030] 表 1 :3 批诊断抗原效价测定结果

[0031]

批号	ELISA 效价	IHA 效价	结果
2012001	S/N ≥ 4.0	≥ 1:32	合格
2012002	S/N ≥ 4.0	≥ 1:32	合格
2012003	S/N ≥ 4.0	≥ 1:32	合格

[0032] 【特异性检验】对本发明所制备的 3 批猪传染性胸膜肺炎 1~15 型混合型诊断

抗原,将各型抗原分别与 APP1 ~ 15 型阳性血清进行 ELISA 试验,均应得到阳性结果;分别与阴性对照血清、猪瘟、猪喘气病、猪萎缩性鼻炎及猪细小病毒的单因子血清进行 ELISA 试验,均应为阴性。详见表 2。

[0033] 表 2 :3 批诊断抗原特异性检验结果

[0034]

血清种类	ELISA 效价	IHA 效价	结果
APP1 ~ 15 型阳性血清	$S/N \geq 4.0$	$\geq 1:32$	阳性
APP 阴性血清	$S/N \leq 4.0$	$\leq 1:2$	阴性
猪瘟阳性血清	$S/N \leq 4.0$	$\leq 1:2$	阴性
猪喘气病阳性血清	$S/N \leq 4.0$	$\leq 1:2$	阴性
猪萎缩性鼻炎阳性血清	$S/N \leq 4.0$	$\leq 1:2$	阴性

[0035]

猪细小病毒阳性血清	$S/N \leq 4.0$	$\leq 1:32$	阴性
-----------	----------------	-------------	----

[0036] 实施例 1

[0037] 1 生产抗原用种子制备

[0038] 1.1 一级种子繁殖与鉴定将 APP1 ~ 15 型冻干菌种划线接种于 S 琼脂平板上,置 5% ~ 10% CO₂条件下,37℃培养 16 ~ 18 小时,挑选 5 个以上具有虹彩光泽的典型菌落(或菌苔),接种 5 ~ 6 日龄 SPF 鸡胚卵黄囊内,在 37℃继续孵育,收集 30 小时内死亡的鸡胚卵黄液,经纯粹检验合格后,作为一级种子。-20℃保存,使用期应不超过 1 个月;-70℃以下保存,使用期应不超过 3 个月,在培养基上继代应不超过 6 代。

[0039] 1.2 二级种子繁殖取各型菌株一级种子,划线接种 S 琼脂平板,在含 5% ~ 10% CO₂条件下,37℃培养 16 ~ 18 小时,挑选具有虹彩光泽的典型菌落或菌苔,接种于 S 肉汤培养基中,置 37℃振荡培养 10 ~ 12 小时,经纯检合格后,即为二级种子。2 ~ 8℃保存,应不超过 24 小时。

[0040] 2 菌液的培养

[0041] 2.1 培养方法将纯检合格的各型菌株的二级种子按 3%接种到 S 肉汤中进行扩大培养,37℃振荡培养 10 ~ 12 小时,收获菌液进行纯粹检验。

[0042] 2.2 纯粹检验将培养物涂片进行革兰氏染色镜检,应纯粹。

[0043] 3 菌液处理将各型菌液按终浓度为 0.5%加入甲醛溶液,37℃振荡灭活 24 小时,灭活检验合格后,将菌液 5000r/min 离心 20min 去上清,将沉淀的菌体用 pH6.4PBS 洗涤 2 次,将沉淀的菌体用 pH6.4PBS 稀释,按比浊法测定,每毫升含菌量约为 90 亿。稀释后将各型菌液置于 -20℃以下反复冻融 3 ~ 5 次,然后进行冰浴超声裂解,间歇破碎 4min,以 8000r/min 离心 30min,各型上清液分别用 0.22 μm 滤膜无菌抽滤,收集于无菌瓶内,其滤液即为猪传染性胸膜肺炎 1 ~ 15 型单型诊断用抗原液。

[0044] 4 各型抗原浓度标定将 APP1 ~ 15 型抗原液分别按适宜比例稀释,在紫外分光光度

计波长 260nm 处测定其浓度（以光吸收单位表示），然后将各单型抗原用 pH6.4PBS 稀释成 1 个光吸收单位，作为各型抗原的标准浓度。

[0045] 5APP1 ~ 15 型混合抗原的配制将 APP1 ~ 15 型标准浓度抗原等量混合，即成为 1 个光吸收单位的标准浓度多型混合抗原。

[0046] 6 田间血清样品检测

[0047] 表 3 :APP 血清学样品 ELISA 抗体检测结果

[0048]

省市	送检头数	阳性头数	阳性率 (%)
----	------	------	---------

[0049]

山东省	1262	221	17.5
安徽省	858	163	19
广东省	560	103	18.4
广西省	768	84	11
总计	3448	571	16.5

[0050] 实施例 2

[0051] 1 生产抗原用种子制备

[0052] 1.1 一级种子繁殖与鉴定将 APP1 ~ 15 型冻干菌种划线接种于 S 琼脂平板上，置 5% ~ 10% CO₂ 条件下，37℃ 培养 16 ~ 18 小时，挑选 5 个以上具有虹彩光泽的典型菌落（或菌苔），接种 5 ~ 6 日龄 SPF 鸡胚卵黄囊内，在 37℃ 继续孵育，收集 30 小时内死亡的鸡胚卵黄液，经纯粹检验合格后，作为一级种子。-20℃ 保存，使用期应不超过 1 个月；-70℃ 以下保存，使用期应不超过 3 个月，在培养基上继代应不超过 6 代。

[0053] 1.2 二级种子繁殖取各型菌株一级种子，划线接种 S 琼脂平板，在含 5% ~ 10% CO₂ 条件下，37℃ 培养 16 ~ 18 小时，挑选具有虹彩光泽的典型菌落或菌苔，接种于 S 肉汤培养基中，置 37℃ 振荡培养 10 ~ 12 小时，经纯检合格后，即为二级种子。2 ~ 8℃ 保存，应不超过 24 小时。

[0054] 2 菌液的培养

[0055] 2.1 培养方法将纯检合格的各型菌株的二级种子按 3% 接种到 S 肉汤中进行扩大培养，37℃ 振荡培养 10 ~ 12 小时，收获菌液进行纯粹检验。

[0056] 2.2 纯粹检验将培养物涂片进行革兰氏染色镜检，应纯粹。

[0057] 3 菌液处理将各型菌液按终浓度为 0.5% 加入甲醛溶液，37℃ 振荡灭活 24 小时，灭活检验合格后，将菌液 5000r/min 离心 20min 去上清，将沉淀的菌体用 pH6.4PBS 洗涤 2 次，将沉淀的菌体用 pH6.4PBS 稀释，按比浊法测定，每毫升含菌量约为 90 亿。稀释后将各型菌液置于 -20℃ 反复冻融 3 ~ 5 次，然后进行冰浴超声裂解，间歇破碎 4min，以 8000r/min 离心 30min，各型上清液分别用 0.22 μm 滤膜无菌抽滤，收集于无菌瓶内，其滤液即为猪传染性胸膜肺炎 1 ~ 15 型单型诊断用抗原液。

[0058] 4 各型抗原浓度标定将 APP1 ~ 15 型抗原液分别按适宜比例稀释,在紫外分光光度计波长 260nm 处测定其浓度(以光吸收单位表示),然后将各单型抗原用 pH6.4PBS 稀释成 1 个光吸收单位,作为各型抗原的标准浓度。

[0059] 5 APP1 ~ 15 型混合抗原的配制将 APP1 ~ 15 型标准浓度抗原等量混合,即成为 1 个光吸收单位的标准浓度多型混合抗原。

[0060] 6 田间血清样品检测

[0061] 表 4 :APP 血清样品 IHA 抗体检测结果

[0062]

省市	送检头数	阳性头数	阳性率(%)
北京市	1083	152	14
四川省	972	96	9.8
福建省	1366	175	12.8
宁夏	791	85	10.7
总计	4212	508	12.1

专利名称(译)	一种猪传染性胸膜肺炎抗体检测用抗原及制备方法		
公开(公告)号	CN104502581A	公开(公告)日	2015-04-08
申请号	CN201410745717.9	申请日	2014-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	青岛易邦生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	青岛易邦生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	青岛易邦生物工程有限公司		
[标]发明人	马爽 范根成 孙健 宋新宇 郭玉广 郭莉莉 胡潇 程增青 王红 李金积		
发明人	马爽 范根成 孙健 宋新宇 郭玉广 郭莉莉 胡潇 程增青 王红 李金积		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/33		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56911 G01N2333/195		
其他公开文献	CN104502581B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的是为猪群的猪传染性胸膜肺炎抗体检测提供一种检测用抗原及制备方法。本发明中抗原是从猪传染性胸膜肺炎放线杆菌1~15型菌株培养物中提取的多糖抗原，为菌体分泌多糖，具有很强的特异性和敏感性，能真实的检测出猪传染性胸膜肺炎抗体；本发明中抗原标准浓度临界值的确定，为酶联免疫吸附试验检测和间接血凝试验检测提供了保障；操作简单、方便快捷，无需特殊设备和仪器，适合在基层推广应用。

批号	ELISA 效价	IHA 效价	结果
2012001	S/N \geq 4.0	\geq 1:32	合格
2012002	S/N \geq 4.0	\geq 1:32	合格
2012003	S/N \geq 4.0	\geq 1:32	合格

】对本发明所制备的3批猪传染性胸膜肺炎

