

# 动物传染病学实验

主讲教师：文心田 曹三杰 黄勇



# 实验一、布氏杆菌病的血清学检测

## 一、实验目的

掌握布氏杆菌病的血清学诊断方法。

## 二、实验原理

动物感染布氏杆菌以后先出现的是凝集抗体，过一段时间出现补体结合抗体，最后产生变态反应性。如果非免疫动物有血清抗体、补体存在或皮内变态反应阳性，则说明被检动物为布氏杆菌病患畜。

我国家畜布病检疫主要采用凝集试验，补体结合试验及变态反应试验。常用试管凝集试验。

### 三、实验材料：

**布病抗原：**由兽医生物药品厂生产。使用时用0.5%石炭酸生理盐水作1:20稀释。

**被检血清：**必须新鲜无明显蛋白凝固，无溶血现象和腐败气味。

**阳性血清和阴性血清：**由兽医生物药品厂生产。

**稀释液：**0.5%石炭酸生理盐水。检疫羊用稀释液用0.5%石炭酸10%氯化钠溶液。



## 四、实验步骤:

牛、马、骆驼用1:50、1:100、1:200、1:400四个稀释度；猪、山羊、绵羊和狗用1:25、1:50、1:100、1:200四个稀释度。

1、血清稀释：取5支小试管。先加入稀释液0.5%石炭酸生理盐水，第1管加2.3ml，从第2管不加，第3、4、5管加0.5ml。取被检血清0.2ml加入到第一管中，混匀，分别取0.5加入2、3管中。将第3管混匀，吸0.5ml加入第4管，混匀，吸0.5ml加入第5管。

2、加抗原：从第2管起，加1:20稀释抗原0.5ml。血清最后稀释度为1:25 1:50 1:100 1:200, 震荡使血清和抗原充分混合

3、抗原抗体作用：37℃温箱18-20小时，取出后室温静置2小时，记录每管反应情况，出现50%以上凝集的最高稀释度就是这份血清的凝集价

实验应该设立阴性、阳性和抗原对照。

## 4、比浊管的配制

主要用于记录结果的依据

管号	抗原稀释液 (ml)	实验用稀释液 (ml)	清亮度 (%)	标记
1	0.0	1.0	100	++++
2	0.25	0.75	75	+++
3	0.5	0.5	50	++
4	0.75	0.25	25	+
5	1.0	0.0	0	-

## 5、结果判定:

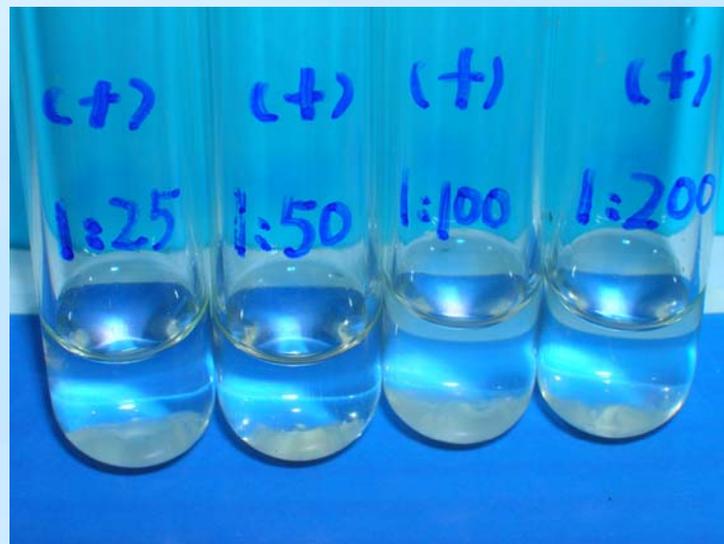
牛、马、骆驼血清凝集价在1:100以上；猪、山羊、绵羊和狗在1:50以上，判定为阳性。

牛、马、骆驼血清凝集价在1:50以上；猪、山羊、绵羊和狗在1:25以上，判定为可疑。

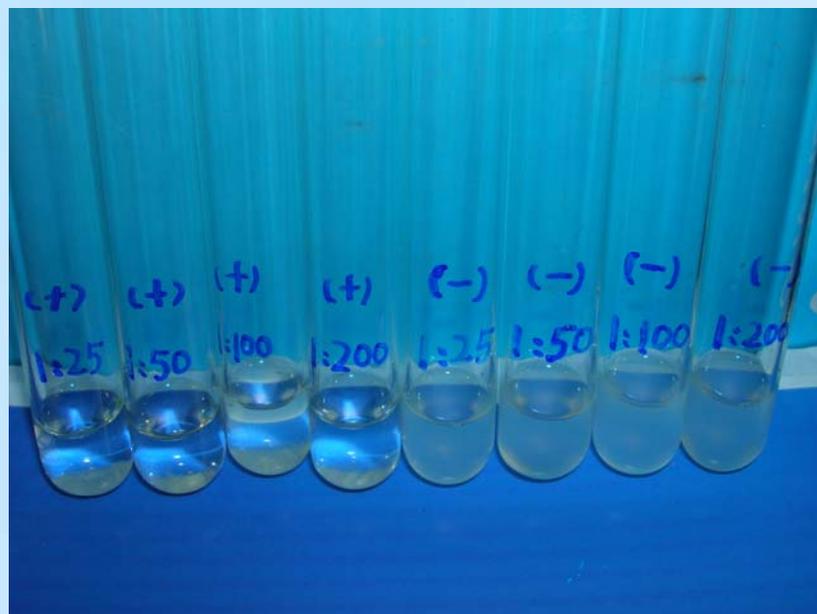
可疑家畜经过3-4周重检，牛羊重检仍然为可疑，可判定为阳性，猪马重检仍然为可疑，但是无临床症状判定为阴性。每次试验须制备比浊管。



阴性结果



阳性结果



合照



合照

## 五、实验报告

如何才能对布氏杆菌病进行确切的诊断。

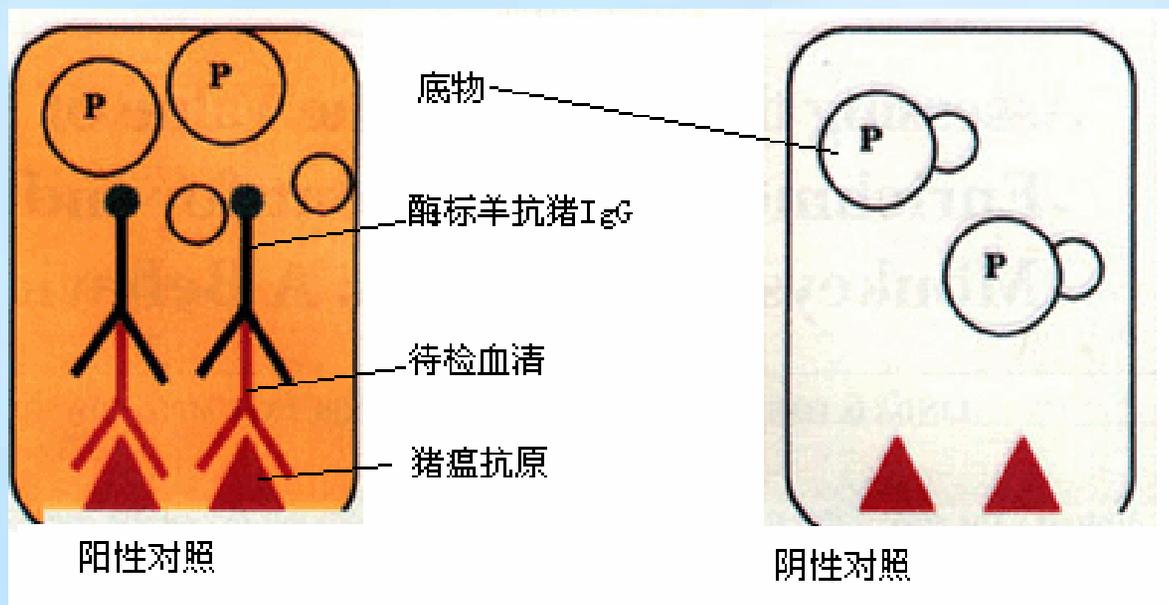
# 实验二、猪瘟的ELISA抗体检测

## 一、实验目的:

**掌握间接ELISA技术检测猪瘟抗体的原理和  
操作技术**

## 二、实验原理：

猪免疫猪瘟疫苗后一段时间会产生ELISA抗体，ELISA抗体和猪抗猪瘟的免疫力正相关。生产上可通过检测猪血清中的抗猪瘟ELISA抗体来评价猪瘟疫苗的免疫效果和进行猪瘟免疫程序的调整。



**间接ELISA检测猪瘟抗体的原理是：先用猪瘟抗原包被ELISA版，然后加入待检血清（可能含抗猪瘟抗体），再加入酶标羊抗猪IgG，如果猪血清中含有抗猪瘟抗体，则猪瘟抗原-抗猪瘟抗体-酶标羊抗猪IgG之间会形成搭桥反应。酶标羊抗猪IgG上的酶作用于底物后在溶液中释放有色基团而使溶液显色。最后用酶标仪测溶液的光密度值（OD值）。**

### 三、实验材料

1 猪瘟抗体ELISA检测试剂盒：含标准阳性血清、阴性血清、包被抗原的U型96孔微孔版，羊抗猪IgG-辣根过氧化物酶结合物、20浓缩洗涤液，底物A、B液各12ml，终止液12ml，样品稀释液50ml。

2 主要仪器：水浴锅、微量移液器（10ul、200ul、1000ul）、酶标仪。

3 其他材料：吸管、吸头、EP管等。

4 待检血清：

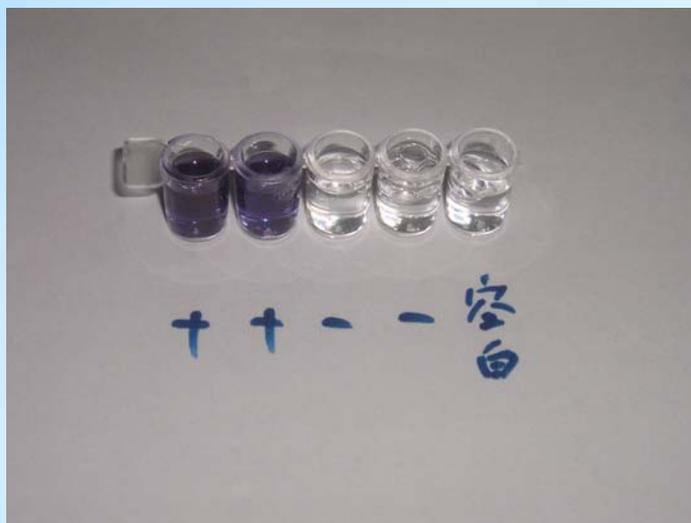


#### 四. 实验步骤:

- 1、用样品稀释液将待检血清1: 40稀释, 取预包被猪瘟抗原的微孔板, 每孔加稀释血清 $100\ \mu\text{l}$ 。同样1: 40稀释阴、阳性对照血清, 阴、阳性对照各设2孔, 每孔 $100\ \mu\text{l}$ 。另设一空白对照孔, 空白对照孔加 $100\ \mu\text{l}$ 稀释液,  $37^{\circ}\text{C}$ 温浴30分钟。
- 2、甩掉板孔中的溶液, 用洗涤液洗板5次。
- 3、每孔加酶标二抗 $100\ \mu\text{l}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ 温浴30分钟。
- 4、洗涤5次, 方法同2。
- 5、每孔加底物A、B液各1滴, 混匀, 室温避光显色10分钟
- 6、每孔加终止液1滴, 15分钟内测定结果。

判定标准：阳性对照平均OD630值 $\geq 1.0$ ，阴性对照平均OD630值必须 $< 0.2$ 使方可进行结果判定。样品OD630值 $> 0.42$ ，判为阳性；样品OD630值在 $0.38—0.42$ 之间，判为可疑；样品OD630值 $< 0.38$ ，判为阴性。

阳性结果表明免疫力达标，阴性结果表明免疫力不达标。



## **五. 实验报告**

**(1) 间接ELISA的原理是什么**

**(2) 如何评价 ELISA 抗体检测在猪瘟防疫中的作用**

# 新城疫弱毒疫苗的制造

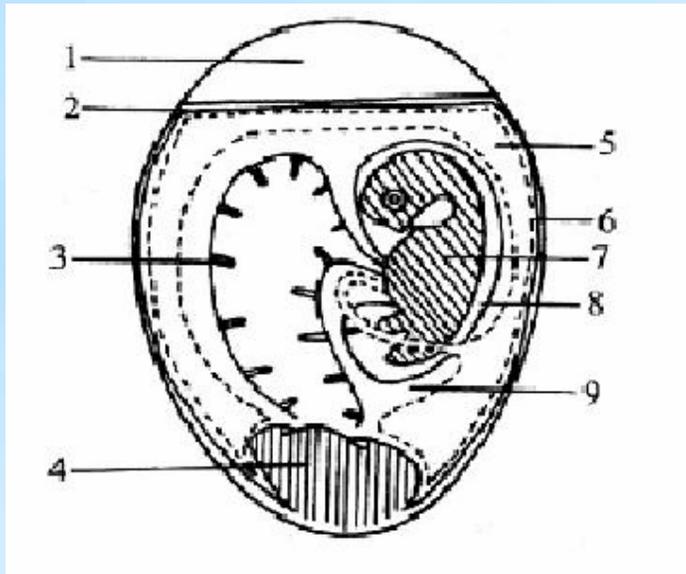


# 一、实验的目的

- 1. 掌握鸡胚的结构和鸡胚接种技术**
- 2. 掌握鸡新城疫弱毒疫苗的制造程序和方法**

## 二、实验原理：

### 1、鸡胚结构



1.气室 2.卵壳 3.卵黄囊 4.卵白 5.尿囊腔 6.绒毛  
尿囊 7.胚胎 8.羊水腔 9.胚外体液

## **2、NDV弱毒疫苗生产：**

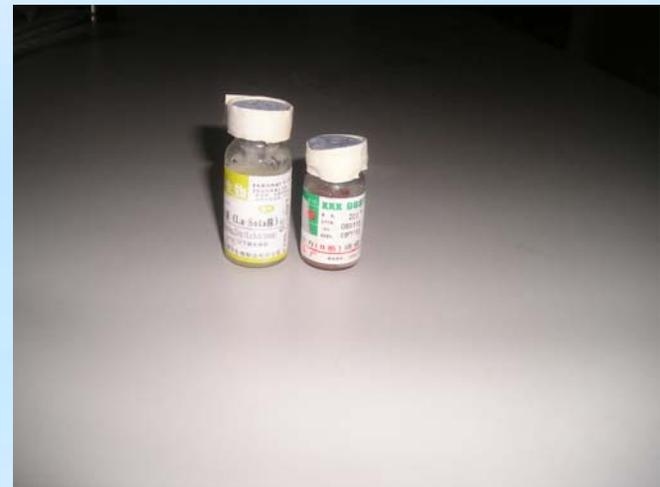
**NDV可通过鸡胚绒毛尿囊腔接种并繁殖，收获感染鸡胚死亡后的尿囊液，其中含有大量的疫苗毒，该尿囊液无须进行病毒的纯化，加保护剂冻干后即为成品。**

### 三、实验材料

9-11日龄非免疫鸡胚；  
一次性注射器（5号针头）；  
生理盐水等

蛋盘，庆大霉素，指形管架，灭菌指形管（放于烧杯  
灭菌），移液器，装有 Tip头的灭菌Tip盒。

新城疫弱毒疫苗种毒（Lasota株）



## 四、实验步骤:

### 1. 鸡胚孵化

一般选用SPF鸡胚(免疫鸡胚卵黄囊中可能存在抗体)。

先将卵放入适当的自动孵化器内孵化，温度为38-39℃，相对湿度为60%-70%，通常9-11日龄接种。

孵化5-6天后照蛋检查，确定受精和非受精或死胚，弃掉弱胚、非受精胚或异常胚。

鸡胚接种途径有：绒毛尿囊腔，绒毛尿囊膜，卵黄囊，羊膜腔。

## 2. 鸡新城疫弱毒疫苗的制造

2.1 种毒 新城疫弱毒疫苗种毒Lasota由中国兽药监察所负责鉴定、保管和供给。对种毒的继代和保存按所规定标准和方法做。

**2.2 湿苗的制造方法** 鸡胚孵化9~10天，挑选活力强的鸡胚，划好气室和接种部位。将种毒做1: 100 稀释，接种9~11日龄鸡胚尿囊腔内，每胚0.1ml，封闭接种孔后，置37℃孵化箱内继续孵化，并每日照蛋2次。鸡胚应于接种后24小时后死亡。将死亡鸡胚即取出，气室向上，置4~8℃冰箱冷却4~24h后取出，将气室部位用5%碘酒消毒，然后以无菌剥除气室部位的蛋壳，揭去蛋壳膜，剪破绒毛尿囊膜及羊膜，吸出胚液，按照每毫升胚液加入青霉素500单位ug，分装小瓶，-10℃~-15℃冰箱内，待检验合格后方可使用。

**2.3 疫苗检验** 每批疫苗制好后，必须进行下列几项实验，均合格后方可预防免疫接种。

**(1) 无菌检验** 每批疫苗任抽5瓶作为样品，供作无菌检验，方法同上，应无菌生长。在做细菌培养时，也可注射小鼠若干只，每只皮下注射0.2ml，观察10天应该全部健活。若有细菌生长或小鼠死亡者，此苗作废。

**(2)安全检查** 用4~12月龄未经鸡新城疫疫苗免疫过的健康鸡3只，每只鸡肌肉注射100倍稀释疫苗1ml，观察10~14天，应无任何反应，或有轻度反应，且在14天内恢复，认为合格。如有严重反应不能复员时，应该重检一次。

**(3)效力检验** 每批疫苗抽样一瓶，用无菌生理盐水将疫苗按含毒量稀释成 $10^{-5}$ ，接种10日龄鸡胚5个，每胚尿囊腔接种0.1ml，鸡胚应该在24~72h内死亡，胚胎有明显病变。混合鸡胚液对1%红细胞的凝集价在1:80以上者为合格。

其次选取4~12日龄未经鸡新城疫免疫过的健康鸡若干只，分为两组，一组为实验组，一组为对照组。实验组每只鸡以100000倍稀释的疫苗肌肉注射1ml,或将疫苗做1:1000倍稀释用钢笔尖蘸取疫苗皮下接种两次，观察10~14天后与对照组鸡用新城疫强毒攻击，其剂量为每只鸡肌肉注射1000倍稀释的鸡胚液强毒1ml，观察10~14天，实验组鸡应该全部健活，而对照组鸡应全部发病，至少有2/3死亡方可合格。若对照组鸡不能全部发病，或虽全部发病而死亡少于2/3时，应该重检一次。如实验组鸡发病或死亡时，这批疫苗为无效，予以废弃。

**(4)疫苗的保存** 自鸡胚液收获日期起算起， $-15^{\circ}\text{C}$ 保存不超过1年， $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存不超过2个月； $15\sim 20^{\circ}\text{C}$ 不超过14天。疫苗运输中应该有冷藏设备。

## 五、实验报告

如何进行新城疫弱毒疫苗的检验