



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102012433 B

(45) 授权公告日 2015.02.04

(21) 申请号 201010532340.0

(22) 申请日 2010.11.05

(73) 专利权人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街 427 号

(72) 发明人 孙建宏 刘景利 胡井雷 张从禄
戴志红 韩正博 徐姗姗 田国彬

(74) 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务所 11305

代理人 郑明

(51) Int. Cl.

G01N 33/96 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2009/131487 A1, 2009.10.29,

田国斌. 禽流感病毒人工感染鸡抗体的监

测及血凝素分型血清的制备.《中国畜禽传染病》.1998,第20卷(第1期),第32-34页.

杨晓利.鸡新城疫高免血清的制备和实际应用观察.《畜牧兽医科技信息》.2005,第44页.

钟功勋.H9N2亚型禽流感病毒血凝素和神经氨酸酶基因的遗传分析.《中国预防兽医学报》.2007,第29卷(第12期),第946-950页.

李翠.兽药标准物质原材料的筛选条件.《中国兽药杂志》.2007,第41卷(第12期),第54-55页.

DOREEN L. STEWART,.International Reference Preparation of Anti-Newcastle-Disease Serum.《Bull. Wld Hlth Org.》.1968,第38卷第925-934页.

李翠.鸡新城疫高免血清的制备.《鸡新城疫高免血清的制备》.2008,第42卷(第2期),第30-31页.

审查员 刘迎鸣

权利要求书1页 说明书15页

(54) 发明名称

禽流感病毒 H9 亚型阳性血清和阴性血清标准物质及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及禽流感病毒 H9 亚型阳性血清和阴性血清标准物质及制备方法。本标准物质阳性血清系用青年或成年 SPF 鸡,经肌肉注射禽流感病毒 H9 亚型油乳剂灭活疫苗后,采集 SPF 鸡血清并进行半成品检验,加入适宜稳定剂后冻干;阴性血清系采自 SPF 鸡血,分离血清并进行半成品检验,冻干;经成品检验、均一性检验及稳定性检验及标准物质的标定、定值等一系列的工艺过程而制成。该标准物质是禽流感 H9 亚型准确诊断、免疫监测及其疫苗免疫效果进行正确评价的根本保障,提高禽流感的防控水平。对禽流感 H9 亚型进行诊断和相关产品检验工作进行评价和质量控制的基本保障。

1. 一种禽流感病毒 H9 亚型阳性血清和阴性血清标准物质,其特征在于阳性血清标准物质有强阳性血清标准物质和弱阳性血清标准物质,此两种阳性血清标准物质只与禽流感病毒 H9 亚型抗原呈阳性反应,其 HI 分别为 $\geq 7\log_2$ 和 $4\log_2 \sim 5\log_2$;此两种阳性血清与 H7 和 H5 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应;阴性血清标准物质在同一条件下,分别与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验,血清对禽流感 H5、H7、H9 亚型、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均为阴性反应。

2. 一种禽流感病毒 H9 亚型阳性血清和阴性血清标准物质的制备方法,其特征在于:

(1) 按常规方法用禽流感病毒 H9 亚型 A/Chicken/Shanghai/10/01 (H9N2) 株病毒制备的油乳剂灭活疫苗;

(2) 阳性血清标准物质候选物系用青年或成年 SPF 鸡,经肌肉注射禽流感病毒 H9 亚型油乳剂灭活疫苗,制备强阳性血清候选物需经 2 次免疫,制备弱阳性血清候选物仅 1 次免疫,选取 HI 抗体效价 $\geq 8\log_2$ 和 $5\log_2$ 的免疫鸡只,分别采集 SPF 鸡血清并进行无菌检验、HI 抗体价的测定和特异性鉴定 3 项半成品检验,并分别加入海藻糖和甘氨酸的冻干保护剂后冻干;

(3) 阴性血清系采自 SPF 鸡血,分离血清并进行无菌检验、HI 抗体价的测定和特异性鉴定 3 项半成品检验,并分别加入海藻糖和甘氨酸的冻干保护剂后冻干;

(4) 以上制备的强阳性血清、弱阳性血清和阴性血清标准物质候选物经检验、均一性检验及稳定性检验及标准物质的标定、定值而成为强阳性血清、弱阳性血清和阴性血清标准物质。

3. 如权利要求 2 所述一种禽流感病毒 H9 亚型阳性血清和阴性血清标准物质的制备方法,其特征在于其中的冻干保护剂是按血清 (W/V) 3% 加入海藻糖和 0.5% 的甘氨酸。

4. 如权利要求 2 所述一种禽流感病毒 H9 亚型阳性血清和阴性血清标准物质的制备方法,其特征在于其中半成品检验的特异性鉴定是将待检血清在同一条件下分别与 H5、H7 和 H9 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验,仅与禽流感病毒 H9 亚型抗原呈阳性反应, $HI \geq 7\log_2$; 与 H7 和 H5 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应, $HI \leq 4\log_2$ 。

5. 如权利要求 2 所述一种禽流感病毒 H9 亚型阳性血清和阴性血清标准物质的制备方法,其特征在于其中均一性检验和稳定性检验是:

均一性检验是按冻干数量在 500 支以上时取样 25 支;冻干数量在 500 只以下时取样 15 支,分别称量每支内容物的净重量,用统计学方法分析其均一性;

稳定性检验是将血清分别在 -20°C 、 4°C 、 37°C 条件下保存,并定期进行 HA 价测定,每一时间均要进行数次重复测量,用统计学方法剔除可疑值,再计算每次的平均值,该值与定值的偏差应不大于标准偏差。

禽流感病毒 H9 亚型阳性血清和阴性血清标准物质及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种禽流感病毒 H9 亚型阳性血清合阴性血清标准物质及制备方法,属于兽用生物制品领域。

背景技术

[0002] 英国药典 (BP) 的化学对照物质是从 1963 年才开始提出,由于 WHO 在英国建立了国际生物标准物质中心,所以英国一直沿用国际标准物质,而其本国标准物质建立较晚,至 1970 年后,欧洲药典问世,英国除引用国际标准物质外,也用欧洲药典标准物质,少量使用本国的标准物质。即使如此,BP1968 年版及其增补本再加英国药典 (1968 年) 收录的数量已超过 260 个,1980 年版已超过 300 个,BP1993 版收录了 371 个。美国药典委员会可提供约 1805 多种药品标准物质;欧洲药典委员会有 2098 种,其中生物制品标准物质有 319 种。

[0003] 目前,我国已研制出国家一级标准物质 1262 种,二级标准物质 1739 种,涉及钢铁、地质、石油、核材料、环境、食品以及临床检验等领域。兽用生物制品的标准物质研究较滞后,目前只有 192 种,而兽用生物制品检验用标准物质几乎为零。

[0004] 兽用生物制品标准物质是控制和确定兽用生物制品产品质量、校准验证检验仪器和方法是否准确的物质标准,是正确诊断传染病、准确监测免疫情况的物质基础。

[0005] 禽流感 (AI) 是我国重点防控的重大动物疫病,禽流感病毒 (AIV) H9 亚型流行很广泛。目前禽流感诊断、免疫监测及其疫苗免疫效果评价中应用最广泛的方法是 HI 试验,这是 2006 年我国农业部批准通过的方法,但是目前我国尚无禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验用标准物质及其相关研究的报道,国外国际动物卫生组织 (OIE) 等参考实验室也没有,严重影响了前后不同时期检测数据的一致性和不同实验室数据的可比性。近年各级实验室对禽流感标准物质的需求越来越多,特别是 H9 亚型和 H5 亚型相关的诊断试剂标准物质,因此研制禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制抗原标准物质尤为迫切,该标准物质是禽流感 H9 亚型准确诊断、免疫监测及对其疫苗免疫效果进行正确评价的根本保障,提高禽流感的防控水平。

[0006] 目前我国标准物质的研制主要参考和遵循 1987 年 7 月 10 日国家计量局发布实施的《标准物质管理办法》以及一级标准物质技术规范 (JJG 1006-94),但是这个技术规范是适用于化学成分、物理化学特性及工程技术特性一级标准物质的研制,对于生物制品标准物质,特别是兽用生物制品标准物质研制目前尚无技术规范可循。因此兽用生物制品标准物质研制是一项无基础的研究,填补了该项研究领域的空白。

发明内容

[0007] 本发明涉及禽流感病毒 H9 亚型阳性血清和阴性血清标准物质及制备方法。本标准物质的阳性血清标准物质有强阳性血清标准物质和弱阳性血清标准物质,此两种阳性血清标准物质只与禽流感病毒 H9 亚型抗原呈阳性反应,其 HI 分别为 $\geq 7\log_2$ 和 $4\log_2 \sim$

5log₂ ;此两种阳性血清与 H7 和 H5 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应 ;阴性血清标准物质在同一条件下,分别与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验,血清对禽流感 H5、H7、H9 亚型、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均为阴性反应。

[0008] 其制备方法主要为 : (1) 按常规方法用禽流感病毒 H9 亚型 CKSH01 株病毒制备的油乳剂灭活疫苗 ; (2) 阳性血清标准物质候选物系用青年或成年 SPF 鸡,经肌肉注射禽流感病毒 H9 亚型油乳剂灭活疫苗,制备强阳性血清候选物需经 2 次免疫,制备弱阳性血清候选物仅 1 次免疫,选取 HI 抗体效价 $\geq 8\log_2$ 和 $5\log_2$ 的免疫鸡只,分别采集 SPF 鸡血清并进行半成品检验,并分别加入适宜稳定剂后冻干 ; (3) 阴性血清系采自 SPF 鸡血,分离血清并进行半成品检验,冻干 ; (4) 以上制备的强阳性血清、弱阳性血清和阴性血清标准物质候选物经检验、均一性检验及稳定性检验及标准物质的标定、定值而成为强阳性血清、弱阳性血清和阴性血清标准物质。

[0009] 本发明的技术方案 :

[0010] 一、禽流感病毒 H9 亚型阳性血清、弱阳性血清和阴性血清标准物质的制备

[0011] 1. 免疫用疫苗的制备

[0012] (1) 病毒液的制备及检验用禽流感病毒 H9 亚型 CKSH01 株病毒 (由中国国家禽流感参考实验室 (中国哈尔滨市中国农业科学院哈尔滨兽医研究所内) 鉴定、保管和供应) 按照常规方法制备病毒液,并对病毒液进行检验 :

[0013] 1) 无菌检验每瓶鸡胚液分别取样,按《中华人民共和国兽药典》(中国兽药典委员会 . 中华人民共和国兽药典二〇〇五年版三部 . 中国农业出版社,2006,本发明以下简称《中国兽药典》) 规定的方法进行检验,应无细菌或霉菌或支原体生长也无外源病毒。

[0014] 2) HA 价测定每瓶鸡胚液分别取样,按本说明书附录进行 (下称《附录》),样品对鸡红细胞凝集价均 $\geq 7\log_2$ 。

[0015] (2) 病毒液的灭活及检验

[0016] 1) 灭活将上述检验合格的胚液以灭菌多层纱布滤过,混合于一个大容器内,按最终浓度为 0.2% 的量加入甲醛溶液 ;加甲醛溶液后最好倾倒入另一瓶中,以避免瓶颈附近粘附的病毒未能接触灭活剂。然后置于 37℃ 灭活 24h (以瓶内温度达到 37℃ 开始计时,期间振摇 1 次)。灭活后将胚液置于 2 ~ 8℃ 条件下保存。

[0017] 2) 灭活检验取 10 ~ 11 日龄 SPF 鸡胚 5 个,各尿囊腔内接种灭活胚液 0.1ml,37℃ 孵育 72h,收获鸡胚液,测定血凝性为阴性,并盲传 1 代,测定血凝性,也无血凝现象,判为灭活完全。

[0018] (3) 佐剂的选择选用符合生物制品规定的进口佐剂,如德国产的 Marco152 白油、新加坡产的 80 和司盘 80 等为乳化佐剂。

[0019] (4) 保护剂的处理将司盘和白油按 6 : 94 的比例混合后加热至 130℃ 30min,无菌冷却后备用 ;吐温经高压灭菌后备用。

[0020] (5) 疫苗的制备先将灭菌后的吐温按 8% 的比例加入灭活检验合格的病毒液中,将其混匀 ;将冷却的白油佐剂定量加入组织捣碎机内,低速开启组织捣碎机,将混匀吐温的病毒液按白油佐剂 1/2 的量缓慢加入组织捣碎机内,然后将组织捣碎机的转速提高至 8000r/min 工作 10min。将获得油包水型疫苗分装于疫苗瓶内备用。

[0021] 2. 阳性血清制备

[0022] (1) 免疫选用 3~4 月龄 SPF 鸡饲养于负压隔离器内,用制备的禽流感灭活疫苗以胸部肌肉注射方式 2 次接种疫苗,第一次接种剂量为 1.0ml/只,间隔 21 日后进行第二次接种,剂量为 1.5ml/只,且分点注射。

[0023] (2) 试血于第 2 次免疫接种后 28 日,用翅下静脉采血方式采集血清,采血同时对鸡和血清对应编号,分别测定 HI 抗体效价(《附录》),挑选 HI 抗体效价 $\geq 8\log_2$ 的 SPF 鸡备用。

[0024] (3) 血清的分离选 HI 抗体效价 $\geq 8\log_2$ 的 SPF 鸡用 20ml 无菌注射器在负压隔离器内进行心脏采血,血液采集完毕后先置于 37℃ 4h,然后再置于 4℃ 冰箱内过夜,在无菌室超净工作台内提取血清,若血清中混有红血球,应对其进行无菌离心后混合于同一灭菌后的容器内。

[0025] (4) 血清半成品的检验

[0026] 1) 无菌检验对混合后的血清取样,按《中国兽药典》进行检验,应无细菌或霉菌生长。

[0027] 2) HI 抗体价的测定按附录进行测定,结果应 $\geq 8\log_2$ 。

[0028] 3) 特异性鉴定将待检血清在同一条件下分别与 H5、H7 和 H9 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验(按《附录》进行),仅与禽流感病毒 H9 亚型抗原呈阳性反应(HI $\geq 7\log_2$),与 H7 和 H5 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应(HI $\leq 4\log_2$)。

[0029] (5) 血清的配制经检验合格的血清按总量的 3% 加入海藻糖(由北京拜尔迪生物公司生产)和 0.5% 的甘氨酸(由天津市科密欧化学试剂有限公司生产)作为冻干保护剂并充分搅拌均匀,并按照《中国兽药典》无菌检验法进行检验,应无菌生长。

[0030] (6) 分装与冻干将配好的抗原液用安瓿进行分装,每瓶 1ml,分装后迅速放入冻干机内进行冷冻真空干燥。冻干后扎铝盖、标号后放置 -20℃ 保存。

[0031] (7) 成品检验

[0032] 1) 物理性状呈微黄色海绵状疏松团块,易与瓶壁分离,加稀释液后迅速溶解,溶解后的外观应与液体血清相同。

[0033] 2) 无菌检验按《中国兽药典》规定方法进行,应无菌生长。

[0034] 3) 效价测定按《附录》进行,HI 抗体效价应 $\geq 7\log_2$ 。

[0035] 4) pH 测定将血清按规格稀释后,用 pH 仪测定其 pH 值,应为 7.9~8.2。

[0036] 5) 特异性检验同半成品,应符合规定。

[0037] 6) 剩余水分测定按《中国兽药典》剩余水分测定法进行,应低于 4%。

[0038] 7) 真空度测定按《中国兽药典》真空度测定法进行,符合规定。

[0039] 8) 血清 HI 抗体效价的定值

[0040] ① 定值方法红细胞凝集抑制试验 96 孔微量板法进行测定。

[0041] ② 定值单位由 6~8 家具有资质且事先经过比对确认其定值能力相同的试验室,采用同一方法进行协作标定。

[0042] ③ 定值要求

[0043] (a) 应对每个被测标准样品分别做 6 到 8 次独立的测定,分两个单元,每个单元做

3 次独立测定;两个单元之间相隔不少于 3 天。所获得的 6 个数据应按统计学方法检验异常值,如发现有异常值,应予标明,并补做一次测定。然后报出全部结果。

[0044] (b) 所有用于定值测量的计量器具 / 测量仪器需经检定或校准合格,并在有效期内。

[0045] ④数据处理

[0046] (a) 汇总全部原始数据,考察全部测量数据分布的正态性。

[0047] (b) 在数据服从正态分布或近似正态分布的情况下,将每个实验室的所测数据的平均值视为单次测量值,构成一组新的测量数据。用统计学方法从统计上剔除可疑值。计算出总平均值和标准偏差。

[0048] (c) 当全部数据服从正态分布或近似正态分布情况下,也可视其为一组新的测量数据。用统计学方法从统计上剔除可疑值,再计算全部原始数据的总平均值和标准偏差。

[0049] 9) 均一性检验

[0050] ①抽样数量冻干数量在 500 支以上时取样 25 支;冻干数量在 500 只以下时取样 15 支。

[0051] ②测量分别称量每支内容物的净重量,用统计学方法分析其均一性。

[0052] ③稳定性检验血清分别在 -20°C 、 4°C 、 37°C 条件下保存,并定期进行 HA 价测定,每一时间均要进行数次重复测量,用统计学方法剔除可疑值,再计算每次的平均值,该值与定值的偏差应不大于标准偏差。

[0053] 3. 弱阳性血清制备

[0054] (1) 免疫 选用 3 ~ 4 月龄 SPF 鸡饲养于负压隔离器内,用制备的禽流感灭活疫苗以胸部肌肉注射方式接种疫苗,接种剂量为 0.5ml/ 只。

[0055] (2) 试血 于免疫接种后 14 ~ 21 日,用翅下静脉采血方式采集血清,采血同时对鸡和血清对应编号,分别测定 HI 抗体效价(按《附录》进行),挑选 HI 抗体效价为 $5\log_2$ 的 SPF 鸡备用。

[0056] (3) 血清的分离 选 HI 抗体效价 $5\log_2$ 的 SPF 鸡用 20ml 无菌注射器在负压隔离器内进行心脏采血,血液采集完毕后先置于 37°C 4h,然后再置于 4°C 冰箱内过夜,在无菌室超净工作台内提取血清,若血清中混有红血球,应对其进行无菌离心后混合于同一灭菌后的容器内。

[0057] (4) 血清半成品的检验

[0058] 1) 无菌检验对混合后的血清取样,按《中国兽药典》进行检验,应无细菌或霉菌生长。若有杂菌污染,应用 0.22μ 的滤膜对其进行过滤除菌。

[0059] 2) HI 抗体价的测定 按《附录》进行测定,结果应为 $5\log_2$ 。

[0060] 3) 特异性鉴定 将待检血清在同一条件下分别与 H5、H7 和 H9 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验(按《附录》进行),仅与禽流感病毒 H9 亚型抗原呈阳性反应(HI 为 $5\log_2$),与 H7 和 H5 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应。

[0061] (5) 血清的配制 经检验合格的血清按总量的 3% 加入海藻糖(由北京拜尔迪生物公司生产)和 0.5% 的甘氨酸(由天津市科密欧化学试剂有限公司生产)作为冻干保护剂并充分搅拌均匀,并按照《中国兽药典》无菌检验法进行检验,应无菌生长。

[0062] (6) 分装与冻干 将配好的抗原液用安瓿进行分装,每瓶 1ml,分装后迅速放入冻干机内进行冷冻真空干燥。冻干后扎铝盖、标号后放置 -20°C 保存。

[0063] (7) 成品检验

[0064] 1) 物理性状 同阳性血清。

[0065] 2) 无菌检验 同阳性血清。

[0066] 3) 效价测定 按《附录》进行,HI 抗体效价应 $4\log_2$ 或 $5\log_2$ 。

[0067] 4) pH 测定 将血清按规格稀释后,用 pH 计测定其 pH 值,应为 $7.6 \sim 8.2$

[0068] 5) 特异性检验 同阳性血清。

[0069] 6) 剩余水分测定 同阳性血清。

[0070] 7) 真空度测定 同阳性血清。

[0071] 8) 血清 HI 抗体效价的定值 同阳性血清。

[0072] 9) 均一性检验 同阳性血清。

[0073] 10) 稳定性检验 同阳性血清。

[0074] 4. 阴性血清

[0075] (1) 血清分离 青年 SPF 鸡饲养于生物安全动物实验室内的负压隔离器内,以无菌注射器在生物安全动物实验室内的负压隔离器内进行心脏采血,血液采集完毕后先置于 37°C 4h,然后再置于 4°C 冰箱内过夜,在无菌室超净工作台内提取血清,然后混合于同一灭菌后的容器内。

[0076] (2) 血清半成品的检验

[0077] 1) 无菌检验 对混合后的血清取样,按《中国兽药典》进行检验,应无细菌或霉菌生长。

[0078] 2) 效价测定 按附录进行,HI 抗体效价应为阴性。

[0079] 3) 特异性 将血清在同一条件下(按《附录》进行),分别与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验,血清对禽流感 H5、H7、H9 亚型、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均为阴性反应。

[0080] (3) 血清的配制 按总量的 3% 加入海藻糖(由北京拜尔迪生物公司生产)和 0.5% 的甘氨酸(由天津市科密欧化学试剂有限公司生产)作为冻干保护剂并充分搅拌均匀,并按照二〇〇五年版《中国兽药典》无菌检验法进行检验,应无菌生长。

[0081] (4) 分装与冻干 按 2ml/瓶进行定量分装,分装后迅速冷冻真空干燥冻干,按《中华人民共和国兽用生物制品规程》(中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程二〇〇〇年版,化学工业出版社,2001,本发明简称《规程》)规定方法进行。

[0082] (5) 成品检验

[0083] 1) 物理性状 呈微黄色海绵状疏松团块,易与瓶壁分离,加稀释液后迅速溶解,溶解后的外观应与液体血清相同。

[0084] 2) 无菌检验 按《中国兽药典》无菌检验法进行,应无菌生长。

[0085] 3) 效价测定 同阳性血清。

[0086] 4) 特异性 同阳性血清。

[0087] 5) 剩余水分测定 按《中国兽药典》剩余水分测定法进行,应低于 4%。

[0088] 6) 真空度测定 按《中国兽药典》真空度测定法进行,符合规定。

[0089] 二、H9 亚型阳性血清、弱阳性血清和阴性血清标准物质的使用

[0090] 阳性、弱阳性血清系用青年或成年 SPF 鸡,经肌肉注射禽流感病毒 H9 亚型油乳剂灭活疫苗后,采集 SPF 鸡血清并加入适宜稳定剂后冻干制成;阴性血清系采自 SPF 鸡血,分离血清,冻干制成。

[0091] 主要用于:禽流感病毒 H9 亚型 HI 试验对照。

[0092] 1. 标准抗原的稀释:取禽流感 H9 亚型抗原冻干安瓿 1 支,启封后加 1ml 生理盐水恢复原量;先做 10 倍、20 倍、80 倍稀释。然后依次进行 1/320、1/400、1/480、1/560、1/640 倍稀释。

[0093] 2. 红细胞凝集试验

[0094] (1) 取 96 孔 V 型微量血凝板,每一稀释度分别取 25 μ L 加入到孔中,加入生理盐水 25 μ L,再加入 1% 鸡红细胞悬液 25 μ L。

[0095] (2) 对照:50 μ L 生理盐水 +25 μ L 1% 鸡红细胞悬液。

[0096] (3) 微量振荡器振荡 1min ~ 2min。

[0097] (4) 室温 (24 ~ 26 $^{\circ}$ C) 放置 30min,判定结果。将血凝板倾斜 70 $^{\circ}$ 且静置 10min 左右开始记录,凡反应孔底部有红细胞沉积且沿倾斜面向下呈泪珠状流淌,呈现与红细胞对照孔一样者为完全不凝集孔 (-);反应孔底部有红细胞沉积且沿倾斜面缓慢向下呈泪珠状流淌者为不完全凝集孔 (+);反应孔底部有红细胞沉积但不沿倾斜面流淌者为 50% 凝集孔 (++) ;除底部有少许红细胞外,反应孔其他部位几乎为完全凝集孔者 (+++) ;反应孔底部无红细胞,整个反应孔完全凝集者为完全凝集孔 (#)。

[0098] (5) 结论:完全凝集孔对应的最高稀释度应为 1/400 倍稀释。

[0099] 3. 微量血凝抑制试验

[0100] (1) 4HA₁₀₀ 抗原的配制与验证

[0101] 1) 抗原稀释方法将含有 400 个血凝单位的抗原先进行 10 倍稀释,再进行 100 倍稀释,即 100 倍稀释液为 4HA₁₀₀ 血凝素。将配制的 4HA₁₀₀U 血凝素用生理盐水进行 1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6 和 1 : 7 稀释。

[0102] 2) 取 96 孔 V 型微量血凝板,每一稀释度分别取 25 μ L 加入到孔中,加入生理盐水 25 μ L,再加入 1% 鸡红细胞悬液 25 μ L。

[0103] 3) 对照 50 μ L 生理盐水 +25 μ L 1% 鸡红细胞悬液。

[0104] 4) 以上试验做 2 个平行重复。

[0105] 5) 在微量振荡器振荡 1min ~ 2min。

[0106] 6) 室温 (24 ~ 26 $^{\circ}$ C) 放置 30min,判定结果。

[0107] 7) 判定标准:如果配制的抗原液为 4HA,则 1 : 4 稀释度将给出 100% 凝集点,即反应孔底部无红细胞,整个反应孔完全凝集;如果 4HA₁₀₀ 高于 4 个单位,可能 1 : 5 或 1 : 6 为 100% 凝集点;如果较低,则可能 1 : 2 或 1 : 3 为 100% 凝集点。应根据测定结果适当调整,其准确稀释倍数 = 使 100% 红细胞凝集终点的稀释倍数 \times 400/4,使抗原工作液确为 4HA₁₀₀。

[0108] (2) 血清的稀释

[0109] 1) 标准阳性血清的的稀释血清恢复原量后,依次进行 10 倍、20 倍和 120 倍稀释;然后进行 720、840、960、1080 和 1200 倍稀释。将稀释好的阳性血清每一稀释倍数取

0.025ml,分别加入到V型微量反应板对应孔中。

[0110] 2) 阴性血清的稀释在V型微量反应板中,每孔加0.025ml生理盐水;第1孔加入恢复原量后的阴性血清0.025ml,反复抽打3~5次混匀;从第1孔吸取0.025ml血清加入第2孔,混匀后吸取0.025ml加入第3孔,如此进行对倍稀释至第6孔,从第6孔吸取0.025ml弃去。

[0111] 3) 被标定血清的稀释血清恢复原量后,依次进行10倍、20倍和120倍稀释;然后进行480、600、720、840、960、1080...依次递增120倍进行稀释。将稀释好的阳性血清每一稀释倍数取0.025ml,分别加入到V型微量反应板对应孔中。

[0112] (3)V型微量反应板上所有血清孔加入4HA₁₀₀的抗原液25μL。最后1排设50μL生理盐水和25μL生理盐水+25μL4HA₁₀₀抗原(各4个孔)做对照。

[0113] (4)充分振荡后,室温(24~26℃)下静置30min。每孔再加入1%鸡红细胞悬液25μL,充分振荡。

[0114] (5)室温(24~26℃)放置30min后判定结果。将血凝板倾斜70°且静置10min左右开始记录,凡反应孔底部有红细胞沉积且沿倾斜面向下呈泪珠状流淌,呈现与红细胞对照孔一样者为完全不凝集孔(-);反应孔底部有红细胞沉积且沿倾斜面缓慢向下呈泪珠状流淌者为不完全凝集孔(+);反应孔底部有红细胞沉积但不沿倾斜面流淌者为50%凝集孔(++);除底部有少许红细胞外,反应孔其他部位几乎为完全凝集孔者(+++);反应孔底部无红细胞,整个反应孔完全凝集者为完全凝集孔(#)。

[0115] (6)结论

[0116] 标准阳性血清840倍稀释孔为(-),960、1080和1200倍稀释孔和阴性血清所有稀释孔为(+)、(++、(+++)或(#);50μL生理盐水对照孔为(-),25μL生理盐水+25μL4HA₁₀₀抗原孔为(#),此时试验方可判为成立。

[0117] 被标定血清的完全不凝集孔对应的最高稀释度即为该血清的红细胞凝集抑制价。

[0118] 本发明的优点

[0119] 本发明涉及禽流感病毒H9亚型阳性血清和阴性血清标准物质及制备方法。本标准物质阳性血清系用青年或成年SPF鸡,经肌肉注射禽流感病毒H9亚型油乳剂灭活疫苗后,采集SPF鸡血清并进行半成品检验,加入适宜稳定剂后冻干;阴性血清系取自SPF鸡血,分离血清并进行半成品检验,冻干;经成品检验、均一性检验及稳定性检验及标准物质的标定、定值等一系列的工艺流程而制成。该标准物质是禽流感H9亚型准确诊断、免疫监测及其疫苗免疫效果进行正确评价的根本保障,提高禽流感的防控水平。对禽流感H9亚型进行诊断和相关产品检验工作进行评价和质量控制的基本保障。

[0120] 实施例1

[0121] 阳性血清制造及半成品检验

[0122] 1. 阳性血清制造

[0123] (1)免疫 选用3~4月龄SPF鸡饲养于负压隔离器内,用制备的禽流感灭活疫苗以胸部肌肉注射方式2次接种疫苗,第一次接种剂量为1.0ml/只,间隔21日后进行第二次接种,剂量为1.5ml/只,且分点注射。

[0124] (2)试血 于第2次免疫接种后28日,用翅下静脉采血方式采集血清,采血同时对鸡和血清对应编号,分别测定HI抗体效价(按《附录》进行),挑选HI抗体效价 $\geq 8\log_2$ 的

SPF 鸡备用。

[0125] (3) 血清的分离 选 HI 抗体效价 $\geq 8\log_2$ 的 SPF 鸡用 20ml 无菌注射器在负压隔离器内进行心脏采血,血液采集完毕后先置于 37°C 4h,然后再置于 4°C 冰箱内过夜,在无菌室超净工作台内提取血清,若血清中混有红血球,应对其进行无菌离心后混合于同一灭菌后的容器内。

[0126] 2. 阳性血清半成品的检验

[0127] (1) 无菌检验 对混合后的血清取样,按《中国兽药典》进行检验,应无细菌或霉菌生长。

[0128] (2) HI 抗体价的测定 按附录进行 HI 抗体价的测定,结果应 $\geq 8\log_2$ 。

[0129] (3) 特异性鉴定 将待检血清在同一条件下分别与 H5、H7 和 H9 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验(按《附录》进行),仅与禽流感病毒 H9 亚型抗原呈阳性反应 ($\text{HI} \geq 7\log_2$),与 H7 和 H5 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应 ($\text{HI} \leq 4\log_2$)。

[0130] (4) 血清的配制 经检验合格的血清按总量的 3% 加入海藻糖(由北京拜尔迪生物公司生产)和 0.5% 的甘氨酸(由天津市科密欧化学试剂有限公司生产)作为冻干保护剂并充分搅拌均匀,并按《中国兽药典》无菌检验法进行检验,应无菌生长。

[0131] (5) 分装与冻干 将配好的抗原液用安瓿进行分装,每瓶 1ml,分装后迅速放入冻干机内进行冷冻真空干燥。冻干后扎铝盖、标号后放置 -20°C 保存。

[0132] 实施例 2

[0133] 弱阳性血清制造及半成品检验

[0134] 1. 弱阳性血清制造

[0135] (1) 免疫 选用 3 ~ 4 月龄 SPF 鸡饲养于负压隔离器内,用制备的禽流感灭活疫苗以胸部肌肉注射方式接种疫苗,接种剂量为 0.5ml/ 只。

[0136] (2) 试血 于免疫接种后 14 ~ 21 日,用翅下静脉采血方式采集血清,采血同时对鸡和血清对应编号,分别测定 HI 抗体效价(按《附录》进行),挑选 HI 抗体效价为 $5\log_2$ 的 SPF 鸡备用。

[0137] (3) 血清的分离 选 HI 抗体效价 $5\log_2$ 的 SPF 鸡用 20ml 无菌注射器在负压隔离器内进行心脏采血,血液采集完毕后先置于 37°C 4h,然后再置于 4°C 冰箱内过夜,在无菌室超净工作台内提取血清,若血清中混有红血球,应对其进行无菌离心后混合于同一灭菌后的容器内。

[0138] 2. 弱阳性血清半成品的检验

[0139] (1) 无菌检验 对混合后的血清取样,按《中国兽药典》进行检验,应无细菌或霉菌生长。若有杂菌污染,应用 0.22μ 的滤膜对其进行过滤除菌。

[0140] (2) HI 抗体价的测定 按附录进行 HI 抗体价的测定,结果应为 $5\log_2$ 。

[0141] (3) 特异性鉴定 将待检血清在同一条件下分别与 H5、H7 和 H9 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验(按《附录》进行),仅与禽流感病毒 H9 亚型抗原呈阳性反应 (HI 为 $5\log_2$),与 H7 和 H5 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应。

[0142] (4) 血清的配制 经检验合格的血清按总量的 3% 加入海藻糖(由北京拜尔迪生物

公司生产)和0.5%的甘氨酸(由天津市科密欧化学试剂有限公司生产)作为冻干保护剂并充分搅拌均匀,并按照二〇〇五年版《中国兽药典》无菌检验法进行检验,应无菌生长。

[0143] (5) 分装与冻干 将配好的抗原液用安瓿进行分装,每瓶 1ml,分装后迅速放入冻干机内进行冷冻真空干燥。冻干后扎铝盖、标号后放置 -20℃保存。

[0144] 实施例 3

[0145] 阴性血清制造及半成品检验

[0146] 1. 阴性血清制造

[0147] 青年 SPF 鸡饲养于生物安全动物实验室内的负压隔离器内,以无菌注射器在生物安全动物实验室内的负压隔离器内进行心脏采血,血液采集完毕后先置于 37℃ 4h,然后再置于 4℃ 冰箱内过夜,在无菌室超净工作台内提取血清,然后混合于同一灭菌后的容器内。

[0148] 2. 阴性血清半成品的检验

[0149] (1) 无菌检验 对混合后的血清取样,按《中国兽药典》进行检验,应无细菌或霉菌生长。

[0150] (2) 效价测定 按附录测定 HI 抗体效价,应为阴性。

[0151] (3) 特异性 将血清在同一条件下(按《附录》进行),分别与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验,血清对禽流感 H5、H7、H9 亚型、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均为阴性反应。

[0152] (4) 血清的配制 按总量的 3% 加入海藻糖(由北京拜尔迪生物公司生产)和 0.5% 的甘氨酸(由天津市科密欧化学试剂有限公司生产)作为冻干保护剂并充分搅拌均匀,并按照二〇〇五年版《中国兽药典》无菌检验法进行检验,应无菌生长。

[0153] (5) 分装与冻干 按 2ml/瓶进行定量分装,分装后迅速冷冻真空干燥冻干,按照《规程》规定方法进行。

[0154] 实施例 4

[0155] 血清成品检验

[0156] 1. 物理性状检验结果 均为微黄色海绵状疏松团块,易与瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解。

[0157] 2. 无菌检验结果 检验结果见表 1,所有冻干制品全部呈阴性。

[0158] 表 1 无菌检验统计表

[0159]

名称	批号	37℃三角瓶		37℃小管		25℃小管	
		T. G	G. A	T. G	G. A	T. G	G. P
H9 亚型阳性血清	200901	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)
H9 亚型弱阳性血清	200901	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)
H9 亚型阴性血清	200901	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)

[0160] 3. 效价测定结果测定结果见表 2、3、4。结果表明,禽流感 H9 亚型阳性血清效价为 9log₂,弱阳性血清效价为 7log₂,阴性血清效价为 0。

[0161] 表 2 阳性血清效价检测结果

[0162]

样品	血清稀释倍数 (2 ^x)											抗原对照	HI 价	平均 HI 价		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11					
1 号	1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#	9log2	9log2	
	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#		9log2
2 号	2-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#		9log2
	2-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#		9log2
3 号	3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#		9log2
	3-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#		9log2

[0163] 注:表中“#”表示全部凝集,“++”表示部分全部凝集,“-”表示不凝集。

[0164] 表 3 弱阳性血清效价检测结果

[0165]

样品	血清稀释倍数 (2 ^x)											抗原对照	HI 价	平均 HI 价	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				
1 号	1-1	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#	#	#	7log2	7log2
	1-2	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#	#	#	7log2	
2 号	2-1	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#	#	#	7log2	
	2-2	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#	#	#	7log2	
3 号	3-1	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#	#	#	7log2	
	3-2	-	-	-	-	-	-	-	++	#	#	#	#	7log2	

[0166] 注:表中“#”表示全部凝集,“++”表示部分全部凝集,“-”表示不凝集。

[0167] 表 4 阴性血清效价检测结果

[0168]

样品	血清稀释倍数 (2 ^x)											抗原对照	HI 价	平均 HI 价	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				
1 号	1-1	++	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	0	0
	1-2	++	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	0	
2 号	2-1	++	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	0	
	2-2	++	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	0	
3 号	3-1	++	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	0	
	3-2	++	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	0	

[0169] 注:表中“#”表示全部凝集,“++”表示部分全部凝集,“-”表示不凝集。

[0170] 4. 特异性检验结果

[0171] 结果见表 5,结果表明阳性血清和弱阳性血清只能被 H9 亚型抗原所抑制,而对其它抗原均呈阴性反应;阴性血清对所有抗原均呈阴性反应。

[0172] 表 5 抗原特异性检验统计表

	血清	凝集结果		
		阳性血清	弱阳性血清	阴性血清
[0173]	H5 亚型抗原	#	#	#
	H9 亚型抗原	-	-	#
	H7 亚型抗原	#	#	#
	新城疫抗原	#	#	#
	鸡减蛋综合征抗原	#	#	#

[0174] 注：表中“#”表示全部凝集，即抗原与血清未产生抑制反应；“-”表示不凝集，即抗原与血清产生抑制反应。

[0175] 5. 剩余水分测定结果

[0176] 检验结果见表 6，结果显示，所有样品的剩余水份的含量均小于 3%，符合标准物质的要求。

[0177] 表 6 剩余水份检验结果

[0178]

名称	样品编号				结论
	1	2	3	4	
阳性血清	2.01%	1.98%	1.76%	1.99%	符合规定
弱阳性血清	2.19%	1.88%	1.76%	1.56%	符合规定
阴性血清	1.12%	1.98%	2.16%	1.57%	符合规定

[0179] 6. 真空度测定结果

[0180] 所有安瓶真空度均符合要求。

[0181] 实施例 5

[0182] 1. 标准物质的效价定值

[0183] (1) 定值方法 红细胞凝集抑制试验 96 孔微量板法进行测定。

[0184] (2) 定值单位 由 6 ~ 8 家具有资质且事先经过比对确认其定值能力相同的试验室，采用同一方法进行协作标定。

[0185] (3) 定值要求

[0186] 1) 应对每个被测标准样品分别做 6 到 8 次独立的测定，分两个单元，每个单元做 3 次独立测定；两个单元之间相隔不少于 3 天。所获得的 6 个数据应按统计学方法检验异常值，如发现有异常值，应予标明，并补做一次测定。然后报出全部结果。

[0187] 2) 所有用于定值测量的计量器具 / 测量仪器需经检定或校准合格，并在有效期内。

[0188] (4) 数据处理

[0189] 1) 汇总全部原始数据，考察全部测量数据分布的正态性。

[0190] 2) 在数据服从正态分布或近似正态分布的情况下，将每个实验室的所测数据的平均值视为单次测量值，构成一组新的测量数据。用统计学方法从统计上剔除可疑值。计算出总平均值和标准偏差。

[0191] 3) 当全部数据服从正态分布或近似正态分布情况下，也可视其为一组新的测量数据。用统计学方法从统计上剔除可疑值，再计算全部原始数据的总平均值和标准偏差。

[0192] (5) 血清效价的定值结果

[0193] 协作标定结果见表 7、8、9。汇总全部原始数据,考察全部测量数据分布的正态性。经描述性统计学分析,该批阳性血凝抑制效价为 840 ± 80 ,最终定值为 840;该批弱阳性血凝抑制效价为 160 ± 60 ,最终定值为 160;该批阴性血凝抑制效价为 0。

[0194] 表 7 协作标定结果

[0195]

协作标定单位	阳性血清血凝抑制效价					
	1	2	3	4	5	6
HWK	1:840	1:840	1:840	1:840	1:960	1:960
ZSYJ	1:840	1:840	1:840	1:840	1:840	1:840
XNMD	1:720	1:720	1:720	1:720	1:120	1:120
YD	1:960	1:960	1:960	1:1080	1:1080	1:1080
ZND	1:840	1:840	1:840	1:840	1:840	1:840
HY	1:840	1:840	1:960	1:840	1:840	1:960
DN	1:840	1:840	1:840	1:840	1:840	1:960
JN	1:720	1:720	1:720	1:720	1:720	1:840

[0196] 注:表中数值为抗原全部凝集的最高稀释倍数。

[0197] 表 8 协作标定结果

[0198]

协作标定单位	弱阳性血清血凝抑制效价					
	1	2	3	4	5	6
HWK	1:160	1:160	1:160	1:160	1:220	1:220
ZSYJ	1:220	1:220	1:220	1:220	1:220	1:220
XNMD	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:160
YD	1:280	1:280	1:280	1:280	1:280	1:280
ZND	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
HY	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:220
DN	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160
JN	1:160	1:160	1:160	1:160	1:160	1:220

[0199] 注:表中数值为抗原全部凝集的最高稀释倍数。

[0200] 表 9 协作标定结果

[0201]

协作标定单位	阴性血清血凝抑制效价					
	1	2	3	4	5	6
HWK	0	0	0	0	0	0
ZSYJ	0	0	0	0	0	0
XNMD	0	0	0	2	2	2
YD	8	8	8	8	8	8
ZND	0	0	0	0	0	0
HY	0	0	0	0	0	0
DN	0	0	0	0	0	0
JN	8	8	8	8	8	8

[0202] 2. 均一性检验

[0203] 随机抽取阳性血清、弱阳性血清和阴性血清样品各 15 支,用电子分析天平分别称量其净重量,结果见表 10。描述性生物统计分析得出:阳性血清样品重量均在 0.096 ~ 0.114g 之间,平均数为 0.103g, CV 为 4.8%,均在 95% 正常值范围内;弱阳性血清样品重量均在 0.095 ~ 0.107g 之间,平均数为 0.100g, CV 为 4.0%,均在 95% 正常值范围内;阴性血清样品重量在 0.105 ~ 0.123g 之间,平均数为 0.114g, CV 为 4.4%,均在 95% 正常值范围内;结果表明阳性血清、弱阳性血清和阴性血清标准品装量均一。

[0204] 表 10 样品称重分析结果

[0205]

序号	净重 (g)			平均值 X (g)			s			CV		
	阳性血清	弱阳性血清	阴性血清	阳性血清	弱阳性血清	阴性血清	阳性血清	弱阳性血清	阴性血清	阳性血清	弱阳性血清	阴性血清
1	0.106	0.098	0.11									
2	0.098	0.103	0.105									
3	0.097	0.101	0.118									
4	0.101	0.096	0.109									
5	0.105	0.098	0.112									
6	0.106	0.107	0.123									
7	0.097	0.099	0.107									
8	0.107	0.102	0.117	0.103	0.100	0.114	0.005	0.004	0.005	4.8%	4.0%	4.4%
9	0.096	0.096	0.116									
10	0.114	0.097	0.114									
11	0.102	0.105	0.12									
12	0.105	0.095	0.118									
13	0.099	0.099	0.108									
14	0.108	0.101	0.118									
15	0.107	0.107	0.12									

[0206] 3. 稳定性检验

[0207] 结果见表 11、12、13,结果表明阳性血清和弱阳性血清在 37℃ 条件下保存 2 个月 HI 价未下降,3 个月略有降低;4℃ 保存 6 个月和 -20℃ 保存 18 个月时 HI 价未下降。

[0208] 表 11 稳定性检验结果 (一)

[0209]

保存温度 (°C)	名称	HI 效价 (log ₂)				
		1 个月	2 个月	6 个月	12 个月	18 个月
-20	阳性血清	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂
	弱阳性血清	7log ₂	7log ₂	7log ₂	7log ₂	7log ₂

[0210] 表 12 稳定性检验结果 (二)

[0211]

保存温度 (°C)	名称	HI 效价 (log ₂)					
		10 天	1 个月	3 个月	4 个月	5 个月	6 个月
4	阳性血清	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂
	弱阳性血清	7log ₂	7log ₂	7log ₂	7log ₂	7log ₂	7log ₂

[0212] 表 13 稳定性检验结果 (三)

[0213]

保存温度 (°C)	名称	HI 效价 (log ₂)					
		7 天	14 天	21 天	1 个月	2 个月	3 个月
37	阳性血清	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	8log ₂
	弱阳性血清	7log ₂	7log ₂	7log ₂	7log ₂	7log ₂	6log ₂

[0214] 附录

[0215] 禽流感血凝 (HA) 和血凝抑制 (HI) 试验

[0216] 1 材料

[0217] 1.1 96 孔 V 型 (90 度) 微量反应板、单道及多道微量移液器 (配有吸头)、加样槽、吸管、烧杯等。

[0218] 1.2 0.85% 生理盐水

[0219] 1.2.1 生理盐水配制量取 8.5g NaCl, 加蒸馏水至 1000ml ;

[0220] 1.2.2 以 121°C 灭菌 30min, 备用 ;

[0221] 1.2.3 生理盐水一经使用, 于 2 ~ 8°C 保存不超过 1 周。

[0222] 1.3 阿氏 (Alsevers) 液称葡萄糖 2.05g、柠檬酸钠 0.8g、柠檬酸 0.055g、氯化钠 0.42g, 加蒸馏水至 100ml, 加热溶解后调 pH 值至 6.1, 69Kpa 15min 高压灭菌, 2 ~ 8°C 保存备用。

[0223] 1.4 1% 鸡红细胞悬液采集 2 ~ 3 只 SPF 公鸡或无禽流感和新城疫等抗体的健康公鸡的血液与等体积阿氏液混合, 用 0.85% 生理盐水洗涤 3 次, 每次均以 3000rpm/min 离心 5min, 洗涤后用生理盐水配成 1% (V/V) 红细胞悬液, 2 ~ 8°C 保存备用。

[0224] 1.5 抗原溶解冻干的抗原和血清均按瓶签上规格标注的量, 用生理盐水溶解。

[0225] 2 操作术式

[0226] 2.1 血凝 (HA) 试验

[0227] 2.1.1 在 V 型微量反应板中, 每孔加 0.025ml 生理盐水。

[0228] 2.1.2 第 1 孔加 0.025ml 抗原, 反复抽打 3 ~ 5 次混匀。

[0229] 2.1.3 从第 1 孔吸取 0.025ml 抗原加入第 2 孔, 混匀后吸取 0.025ml 加入第 3 孔, 如此进行对倍稀释至第 11 孔, 从第 11 孔吸取 0.025ml 弃去。

[0230] 2.1.4 每孔加 0.025ml 生理盐水。

[0231] 2.1.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 鸡红细胞悬液。

[0232] 2.1.6 将反应板在振荡器上震荡 1 ~ 2min 或轻扣反应板混合反应物, 在室温 (20 ~ 25℃) 下静置 20 ~ 30min 或 2 ~ 8℃ 45 ~ 60min。在对照孔红细胞显著呈钮扣状时判定结果。

[0233] 2.1.7 结果判定将反应板倾斜 60 度, 观察红细胞有无泪珠状流淌, 完全无泪珠样流淌 (100%凝集) 的最高稀释倍数为血凝效价。

[0234] 2.2 血凝抑制 (HI) 试验

[0235] 2.2.1 根据 HA 试验测定的效价, 计算配制 4 个血凝单位 (4HAU) 抗原。HA 效价除以 4 即为含 4HAU 抗原的稀释倍数。例如, HA 效价为 1 : 256, 则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1 : 64 (256 除以 4)。

[0236] 2.2.2 第 1 ~ 11 孔加入 0.025ml 生理盐水, 第 12 孔加入 0.05ml 生理盐水。

[0237] 2.2.3 第 1 孔加入 0.025ml 血清, 充分混匀后吸 0.025ml 于第 2 孔, 依次对倍稀释至第 10 孔, 从第 10 孔吸取 0.025ml 弃去。

[0238] 2.2.4 第 1 ~ 11 孔均加入 0.025ml 的 4HAU 抗原, 在室温 (20 ~ 25℃) 下静置 30min 或 2 ~ 8℃ 50min。

[0239] 2.2.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 的鸡红细胞悬液, 震荡混匀, 在室温 (20 ~ 25℃) 下静置 20 ~ 30min 或 2 ~ 8℃ 45 ~ 60min, 对照红细胞将呈明显钮扣状沉于孔底。

[0240] 3 结果判定 以完全抑制 4HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 效价。当阳性对照血清的 HI 效价与已知效价误差不超过 1 个滴度, 阴性对照血清效价不高于 $2\log_2$ 时, 试验方可成立。被检血清 HI 效价 $\leq 3\log_2$ 判为阴性; $= 4\log_2$ 判为可疑 (可疑样品应重检, 重检效价 $\geq 4\log_2$ 判为阳性, $\leq 3\log_2$ 判为阴性); $\geq 5\log_2$ 判为阳性。

专利名称(译)	禽流感病毒H9亚型阳性血清和阴性血清标准物质及制备方法		
公开(公告)号	CN102012433B	公开(公告)日	2015-02-04
申请号	CN201010532340.0	申请日	2010-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	孙建宏 刘景利 胡井雷 张从禄 戴志红 韩正博 徐姗姗 田国彬		
发明人	孙建宏 刘景利 胡井雷 张从禄 戴志红 韩正博 徐姗姗 田国彬		
IPC分类号	G01N33/96 G01N33/531 C07K16/10 C07K16/06		
代理人(译)	郑明		
其他公开文献	CN102012433A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及禽流感病毒H9亚型阳性血清和阴性血清标准物质及制备方法。本标准物质阳性血清系用青年或成年SPF鸡，经肌肉注射禽流感病毒H9亚型油乳剂灭活疫苗后，采集SPF鸡血清并进行半成品检验，加入适宜稳定剂后冻干；阴性血清系采自SPF鸡血，分离血清并进行半成品检验，冻干；经成品检验、均一性检验及稳定性检验及标准物质的标定、定值等一系列的工艺过程而制成。该标准物质是禽流感H9亚型准确诊断、免疫监测及对其疫苗免疫效果进行正确评价的根本保障，提高禽流感的防控水平。对禽流感H9亚型进行诊断和相关产品检验工作进行评价和质量控制的基本保障。

名称	批号	37°C三角瓶		37°C小管		25°C小管	
		T.G	T.G	G.A	T.G	G.A	G.P
H9亚型阳性血清	200901	S/S(-)	S/S(-)	S/S(-)	S/S(+)	S/S(+)	S/S(-)
H9亚型弱阳性血清	200901	S/S(-)	S/S(-)	S/S(-)	S/S(+)	S/S(+)	S/S(-)
H9亚型阴性血清	200901	S/S(-)	S/S(-)	S/S(-)	S/S(-)	S/S(+)	S/S(-)