



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102012430 B

(45) 授权公告日 2013. 09. 04

(21) 申请号 201010532313. 3

(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 田国彬 胡井雷
韩正博 张从禄 曾显营 杨帆
徐姗姗

(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 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

田国彬等. 禽流感 H5、H9 二价灭活疫苗 (H5N1 Re-1 株, H9N2 Re-2 株) 研究及应用. 《中国畜牧兽医学学会畜牧兽医生物技术学分会暨中国免疫学会兽医免疫分会第六次研讨会论文

集》. 2005, 42-47.

田国彬等. H5N1 亚型禽流感变异株灭活疫苗种毒 Re-4 株的生物学特性及免疫原性研究. 《中国预防兽医学报》. 2009, 第 31 卷 (第 9 期), 717-720.

张贵云. 蛋鸡重组高致病性禽流感 H5N1 (Re-4+Re-5) 2 价灭活疫苗免疫效果的评价. 《北京农业》. 2009, 48-50.

田国彬等. 禽流感灭活疫苗 (H5N1 亚型, Re1 株) 研究及应用. 《中国畜牧兽医学学会禽病学分会第 12 次学术研讨会论文集》. 2004, 404-407.

审查员 李保安

权利要求书2页 说明书12页
序列表1页

(54) 发明名称

禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质及其制备方法。本标准物质是由禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株病毒经过病毒液的制备与检验 ;病毒液灭活、半成品检验 ;冻干、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 H5 亚型准确诊断、H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗体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。

1. 一种禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株病毒血凝抑制试验抗原标准物质,其特征在於:

(1) 该抗原标准物质含有灭活的禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株病毒;

(2) 该抗原标准物质符合以下标准:抗原标准物质的对鸡红细胞凝集价均 $\geq 8\log_2$;该抗原只能被禽流感病毒 H5 亚型 Re-5 株阳性血清所抑制,而对禽流感病毒 H9 亚型、H7 亚型阳性血清,鸡新城疫阳性血清和减蛋综合征病毒阳性血清均呈阴性反应。

2. 一种禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株病毒血凝抑制试验抗原标准物质的制备方法,其特征在於是通过利用由重组的禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株病毒经过以下步骤:

(1) H5N1 亚型 Re-5 株禽流感病毒毒种的制备与检验;按照常规方法,制造禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质的病毒毒株为重组禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株,毒种是用 SPF 鸡胚复制的;毒种经检验应符合以下标准:

1) HA 效价:Re-5 株毒种对 1% 鸡红细胞凝集价应 $\geq 9\log_2$;

2) 鸡胚半数感染量每 ml 病毒含量应 $\geq 10^{7.0}EID_{50}$;

3) 基因鉴定:AIVRe-5 株 HA 基因裂解位点氨基酸序列应为 -RETR ↓ -,符合典型低致病力特征;

4) 对鸡胚的毒力:将 Re-5 株毒种用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释至 10^{-4} ,用此浓度病毒液接种 10 枚 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,每胚 0.1ml,置 36℃ 孵育 72h,应至少 9 枚鸡胚不死亡,且胚体无肉眼可见病变;

5) 对雏鸡的毒力:将 Re-5 株毒种用灭菌生理盐水作 10 倍稀释,静脉接种 5~6 周龄 SPF 鸡 10 只,每只 0.1ml,静脉接种致病指数为 0;滴鼻接种 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只,每只 0.1ml (含 10^6EID_{50}),另取条件相同的 SPF 鸡 10 只,不接种作为对照,在同条件下分别饲养,观察 14 日,均应不出现死亡或明显异常反应;

6) 特异性:Re-5 株毒种对禽流感病毒 H5 亚型抗血清应为阳性反应,对禽流感病毒 H1~H4、H6~H15 亚型、鸡新城疫病毒和减蛋综合征病毒单特异性抗血清均应为阴性反应;

7) 纯净性应无细菌、霉菌、支原体及外源病毒污染;

(2) 标准物质抗原的制备与检验;

1) 抗原标准物质的制备

按照常规方法,将毒种接种 SPF 鸡胚,收获鸡胚液制备禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原半成品,经 β -丙内酯灭活、浓缩,进行无菌检验、效价测定后,按每瓶 1ml 分装冻干,保护剂为用注射用水配制蔗糖浓度为 100% 的冻干保护剂,过滤除菌后,保护剂与鸡胚液按 1:9 比例配制;

2) 抗原检验

① 物理性状:抗原为白色或灰白色海绵状疏松团块,易与瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解;

② 无菌检验:抽样检验,应无细菌或霉菌生长;

③ 效价测定:按冻干时不同部位随机抽取 3 个样品进行 HA 测定,每个样品重复测 2 次,凝集价应均不低于 $8\log_2$;

④ 特异性检验:;该抗原分别对禽流感病毒 H5 亚型、H7 亚型和 H9 亚型阳性血清、鸡新城疫阳性血清、减蛋综合征病毒阳性血清进行血凝抑制试验,该抗原只能被禽流感病毒

H5N1 亚型 (Re-5 株) 阳性血清所抑制, 而对其它阳性血清均呈阴性反应;

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 3%;

⑥ 真空度测定: 按《中国兽药典》方法进行, 用高频电子火花仪进行检测, 应符合规定;

(3) 标准物质的定值

1) 均一性检验: 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;

2) 稳定性检验: 抗原在 -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 2 次重复测量, 用统计学方法从统计上剔除可疑值, 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 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原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 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原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) H5 亚型属于高致病性病毒,H5N1 亚型 Re-5 株是针对我国当前流行的高致病性禽流感病毒而研制的。用该毒株研制的禽流感灭活疫苗是我国目前禽流感防治中应用最广泛的首选疫苗,这个疫苗在实际应用中取得了十分显著的免疫效果,因此近年来我国的禽流感防治非常令人满意。目前 AIV H5N1 亚型的诊断、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 AIV H5 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 AIV 标准物质的需求越来越多,特别是 H5 亚型和 H9 亚型相关的诊断试剂标准物质,因此研制 AIV H5 亚型血凝抑制抗原标准物质尤为迫切,该标准物质是 AIV H5 亚型准确诊断、对 AIV H5N1 亚型 Re-5 株免疫情况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。

发明内容

[0007] 本发明为制备一种禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质,该抗原标准物质含有灭活的禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株病毒;血凝抑制试验抗原对鸡红细胞凝集价均 $\geq 8\log_2$;该抗原只能被禽流感病毒 H5 亚型 Re-5 株阳性血清所抑制,而对禽流感病毒 H9 亚型、H7 亚型阳性血清,鸡新城疫阳性血清和减蛋综合征病毒阳性血清均呈阴性反应。

[0008] 主要制备方法是:(1)制备禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株病毒血凝抑制试验抗原标准物质候选物:H5N1 亚型 Re-5 株禽流感病毒毒种的制备与检验;病毒液的制备与检验;病毒液的 β -丙内酯灭活、半成品检验;冻干、成品检验、均一性检验及稳定性检验;

[0009] (2)标准物质的标定、定值。

[0010] 本发明技术方案的详细阐述

[0011] 包括禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制试验抗原标准物质、其制备方法和程序、其制备规程和协作标定操作规范等内容。

[0012] 本发明人在国家现行的 AIVH5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制方法基础上,制定了禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质的质量标准和制备规程,研制出了禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质,并与中国兽医药品监察所、中国农业大学等 8 家单位对其效价进行了协作标定。

[0013] 一、禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质的制备

[0014] 1. 病毒毒种

[0015] (1) 病毒毒种的来源

[0016] 本发明用于制造禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质的病毒毒株为重组禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株,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。

[0017] (2) 病毒毒种的特性

[0018] 1) HA 效价按本说明书附录(简称《附录》)的方法进行鸡红细胞凝集价测定,Re-5 株毒种对 1% 鸡红细胞凝集价应 $\geq 9\log_2$ 。

[0019] 2) 鸡胚半数感染量将 Re-5 株毒种用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释,取 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 3 个稀释度,各尿囊腔内接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 个,每胚 0.1ml。置 37℃ 继续孵育,24h 前死亡的鸡胚弃去不计,24~72h 内死亡的鸡胚随时取出并于 2~8℃ 冷藏保存。至 72h,测定所有鸡胚液的红细胞凝集价(《附录》),凝集价 $\geq 4\log_2$ 者判为感染,计算 EID₅₀(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,本发明简称《中国兽药典》),每 ml 病毒含量应 $\geq 10^{7.0}$ EID₅₀。

[0020] 3) 基因鉴定方法和标准取 Re-5 株毒种 200 μ l,用 QIAGEN RNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司)提取病毒 RNA,用上游引物 ACATAGTGAGAAGAGCTG 和下游引物 TCCCACTCACTATCAGCTG,采用 RT-PCR 方法扩增 HA 裂解位点的基因片段,对扩增的 PCR 产物进行序列分析。AIV Re-5 株 HA 基因裂解位点氨基酸序列应为 -RETR ↓ -,符合典型低致病力特征。

[0021] 4) 对鸡胚的毒力将 Re-5 株毒种用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释至 10^{-4} ,用此浓度病毒液接种 10 枚 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,每胚 0.1ml,置 36℃ 孵育 72h,应至少 9 个鸡胚不死亡,且胚体无肉眼可见病变。

[0022] 5) 对雏鸡的毒力将 Re-5 株毒种用灭菌生理盐水作 10 倍稀释, 静脉接种 5 ~ 6 周龄 SPF 鸡 10 只, 每只 0.1ml, 静脉接种致病指数为 0; 滴鼻接种 3 ~ 4 周龄 SPF 鸡 10 只, 每只 0.1ml (含 10^6 EID₅₀), 另取条件相同的 SPF 鸡 10 只, 不接种作为对照, 在同条件下分别饲养, 观察 14 日, 均应不出现死亡或明显异常反应。

[0023] 6) 特异性用微量法进行 HI 试验, Re-5 株毒种对禽流感病毒 H5 亚型抗血清应为阳性反应, 对禽流感病毒 H1 ~ H4、H6 ~ H15 亚型、鸡新城疫病毒和减蛋综合征病毒单特异性抗血清均应为阴性反应。

[0024] 7) 纯净性应无细菌、霉菌、支原体及外源病毒) 污染 (按《中国兽药典》规定方法进行检验)。

[0025] 8) 基础种子代数 2 ~ 5 代。

[0026] 9) 毒种保存在 -70℃ 以下, 保存期为 60 个月。

[0027] 2. 实验动物

[0028] 所使用的 SPF 鸡及 SPF 鸡胚均由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

[0029] 3. 禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质候选物的制备

[0030] (1) 抗原的制备

[0031] 按照常规方法, 将毒种接种 SPF 鸡胚, 收获鸡胚液制备禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原半成品, 经 β-丙内酯灭活、浓缩, 进行无菌检验、效价测定后, 按每瓶 1ml 分装冻干。保护剂采用本课题研制的配方和配制方法 (用注射用水配制蔗糖浓度为 100% 的冻干保护剂, 过滤除菌后, 保护剂与鸡胚液按 1 : 9 比例配制)。

[0032] (2) 抗原检验

[0033] 1) 物理性状抗原为白色或灰白色海绵状疏松团块, 易与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解。

[0034] 2) 无菌检验抽样检验, 应无细菌或霉菌生长。

[0035] 3) 效价测定按冻干时不同部位随机抽取 3 个样品进行 HA 测定, 每个样品重复测 2 次, 凝集价应均不低于 $8\log_2$ 。

[0036] 4) 特异性检验采用血凝抑制试验的方法 (详见《附录》), 用该抗原分别对禽流感病毒 H5 亚型、H7 亚型和 H9 亚型阳性血清、鸡新城疫阳性血清、减蛋综合征病毒阳性血清进行血凝抑制试验, 该抗原只能被禽流感病毒 H5N1 亚型 (Re-5 株) 阳性血清所抑制, 而对其它阳性血清均呈阴性反应。

[0037] 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 3%。

[0038] 6) 真空度测定按《中国兽药典》方法进行, 用高频电子火花仪进行检测, 应符合规定。

[0039] 4 标准物质的定值

[0040] (1) 定值方法红细胞凝集试验 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] 1) 应对每个被测标准样品分别做 6 ~ 8 次独立的测定, 测定分两个单元, 每个单元做三次独立测定; 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] 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。

[0045] (4) 数据处理

[0046] 1) 汇总全部原始数据,考察全部测量数据分布的正态性。

[0047] 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。剔除可疑值。计算出总平均值和标准偏差。

[0048] 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。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] 5. 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] 6. 稳定性检验抗原在 -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 2 次重复测量,用统计学方法从统计上剔除可疑值,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] 二、禽流感 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质的使用

[0054] 抗原系用重组禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株接种 SPF 鸡胚,收获感染鸡胚液,用 β -丙内酯灭活,经浓缩后,加适宜稳定剂冻干制成。主要用于:

[0055] (一) HA 试验中,校定 H5N1 亚型 Re-5 株抗原 HA 效价

[0056] 1. 标准抗原的稀释取禽流感 H5N1 亚型 Re-5 株抗原冻干安瓿 1 支,启封后加 1ml 生理盐水恢复原量;先进行 10 倍、20 倍稀释,然后依次进行 80、160、320、400、480、560 倍稀释。

[0057] 2. 工作抗原的稀释取禽流感 H9 亚型工作抗原 1 支,启封后加生理盐水恢复原量;先进行 10 倍、20 倍稀释,然后进行 80、160、320、400、480、560、640、720、800... 依次递增 80 倍进行稀释。

[0058] 3. 红细胞凝集试验

[0059] (1) 取 96 孔 V 型微量血凝板,每一稀释度分别取 $25\ \mu\text{L}$ 加入到孔中,加入生理盐水 $25\ \mu\text{L}$,再加入 1% 鸡红细胞悬液 $25\ \mu\text{L}$ 。

[0060] (2) 对照: $50\ \mu\text{L}$ 生理盐水 + $25\ \mu\text{L}$ 1% 鸡红细胞悬液。

[0061] (3) 在微量振荡器振荡 $1\text{min} \sim 2\text{min}$ 。

[0062] (4) 室温 ($24 \sim 26^{\circ}\text{C}$) 放置 30min,判定结果。将血凝板倾斜 70° 且静置 10 秒左右开始记录,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 (#)。

[0063] (5) 结论当标准抗原完全凝集孔对应的最高稀释度为 300 ± 60 倍,且对照孔呈 (-) 时,工作抗原完全凝集孔对应的最高稀释度即为该抗原的红细胞凝集价。

[0064] (二) HI 试验中,校定禽流感病毒 H5N1 亚型 (Re-5 株) 抗体的 HI 效价

[0065] 1. 抗原的稀释:取禽流感 H5N1 亚型 Re-5 株抗原冻干安瓿 1 支,启封后加 1ml 生理盐水恢复原量;先做 10 倍、20 倍稀释。然后依次进行 80、160、320、400、480、560 倍稀释。

[0066] 2. 红细胞凝集试验

[0067] (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。

[0068] (2) 对照:50 μ L 生理盐水 +25 μ L 1% 鸡红细胞悬液。

[0069] (3) 在微量振荡器振荡 1 ~ 2min。

[0070] (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 10 秒左右开始记录,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 (#)。

[0071] (5) 结论:完全凝集孔对应的最高稀释度应为 300 \pm 60 倍。

[0072] 3. 微量血凝抑制试验

[0073] (1) 4HAU 抗原的配制与验证

[0074] 1) 抗原稀释方法

[0075] 将含有 320 个血凝单位的抗原先进行 10 倍稀释,再进行 8 倍稀释,即 80 倍稀释液为 4HAU 血凝素。将配制的 4HAU 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。

[0076] 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。

[0077] 3) 对照:50 μ L 生理盐水 +25 μ L 1% 鸡红细胞悬液。

[0078] 4) 以上试验做 2 个平行重复。

[0079] 5) 在微量振荡器振荡 1 ~ 2min。

[0080] 6) 室温 (24 ~ 26 $^{\circ}$ C) 放置 30min,判定结果。

[0081] 7) 判定标准:如果配制的抗原液为 4HAU,则 1 : 4 稀释度将给出 100% 凝集,即反应孔底部无红细胞,整个反应孔完全凝集;如果 4HAU 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。应根据测定结果适当调整,使抗原工作液确为 4HAU。

[0082] (2) 血清的稀释

[0083] 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 倍稀释;然后进行 80、160、240、320、400、480、560 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。

[0084] 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。

[0085] 3) 被检血清的稀释

[0086] 血清恢复原量后,依次进行 10 倍、20 倍稀释;然后进行 80、160、240、320、400、480、560…依次 120 倍递增进行稀释。将稀释好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。

[0087] (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 25 μL,充分振荡。

[0088] (5) 室温(24~26℃)放置 30min 后判定结果。将血凝板倾斜 70°且静置 10 秒左右开始记录,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(#)。

[0089] (6) 结论

[0090] 阳性血清 HI 效价为 200±40 倍;50 μL 生理盐水对照孔为(-),25 μL 生理盐水+25 μLHAU 抗原孔为(#),此时试验方可判为成立。

[0091] 被检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。

[0092] 本发明的优点

[0093] 本发明涉及禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质及制备方法。本标准物质是由禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株病毒经过病毒液的制备与检验;病毒液灭活、半成品检验;冻干、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 H5N1 亚型准确诊断、禽流感 H5N1 亚型 Re-5 株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。

[0094] 实施例 1

[0095] 抗原制造及半成品检验

[0096] 1 生产用毒种制备

[0097] (1) 毒种繁殖:将毒种用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释,取 10⁻⁴ 稀释度,尿囊腔内接种 10 日龄 SPF 鸡胚,每胚 0.1ml,密封针孔,置 36℃继续孵育,不必翻蛋。接种 24h 后,每 12h 照蛋 1 次,死亡的鸡胚随时取出弃去不用,至 72h 收集所有活胚,在 2~8℃中冷却。将冷却 4~24h 的鸡胚取出,用碘酊消毒气室部位,然后以无菌手术剔除气室部的卵壳,揭去卵黄壳膜,剪破绒毛尿囊膜及羊膜(勿使卵黄破裂),吸出鸡胚液(尿囊液和羊水)。尿囊液分别收集于一灭菌容器内。逐一进行无菌检验和 HA 价测定,将检验无菌且对 1%鸡红细胞悬液凝集效价≥10log₂ 的鸡胚液混合,定量分装,-70℃保存,注明收获日期、毒种代次等。

[0098] (2) 病毒液的制备

[0099] 1) 接种取生产用毒种,用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释至 10⁻⁴,尿囊腔内接种 11 日龄 SPF 鸡胚,每胚 0.1ml,密封针孔,置 37℃继续孵育,不必翻蛋。

[0100] 2) 孵育和观察鸡胚接种后,每日照蛋 2 次,将 24h 前死亡的鸡胚弃去,24h 后死亡的鸡胚随时取出,至 72h,无论死亡与否,全部取出,气室向上直立,置于 2~8℃冷却 8h 以上。

[0101] 3) 收获将冷却的鸡胚取出,用碘酊消毒气室部位,然后以无菌手术剥除气室部位

卵壳膜,剪破绒毛尿囊膜及羊膜(谨防卵黄破裂),用灭菌小镊子压住鸡胚,用10ml 无菌注射器吸取胚液。在吸取胚液前应对每个鸡胚仔细检查,凡胎儿腐败、胚液混浊及有任何污染可疑者,弃去不用。死胚和活胚分别收获,每若干个鸡胚分为一组,吸取胚液放于同一灭菌中性瓶中,每更换一中性瓶时同时更换注射器,每吸取完一枚胚应将镊子在火焰上烧一下再用来接触下一枚胚。收获的鸡胚液放在2~8℃条件下保存。

[0102] (3) 病毒液的检验

[0103] 1) 无菌检验每瓶鸡胚液分别取样,按《中国兽药典》规定的方法进行检验,无细菌或霉菌或支原体生长也无外源病毒。

[0104] 2) HA 价测定每瓶鸡胚液分别取样,样品对鸡红细胞凝集价不低于 $9\log_2$ 。

[0105] 3) 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0.03%的量加入 β -丙内酯,充分混匀,置于4℃灭活24h后取出再置于37℃水浴终止灭活1h。灭活后将胚液置于2~8℃条件下保存。

[0106] 4) 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(详见《附录》),为阴性,并盲传1代,测定血凝性,无血凝现象,判为灭活完全。

[0107] 5) 半成品检验鸡胚液分别取样,进行无菌检验,无细菌或霉菌生长。鸡胚液分别取样,样品对1%鸡红细胞凝集价 $\geq 9\log_2$ 。

[0108] 7) 抗原配制、分装及冻干

[0109] 保护剂的配制用注射用水配制蔗糖浓度为100%的冻干保护剂,过滤除菌后备用。

[0110] 抗原制备将检验合格的鸡胚液,混入同一容器内,保护剂与鸡胚液按1:9比例配制。

[0111] 分装与冻干将配好的抗原液用安瓶进行分装,每瓶1ml,精确度在 $\pm 5\%$ 以内,分装后迅速进行冷冻真空干燥。密封后放置-20℃保存。

[0112] 实施例2

[0113] 成品检验

[0114] 1. 物理性状白色或灰白色海绵状疏松团块,易与瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解。

[0115] 2. 无菌检验抽样检验,无细菌或霉菌生长。检验结果见表1,所有冻干制品全部呈阴性。

[0116] 表1 无菌检验统计表

[0117]

批号	37℃三角瓶	37℃小管		25℃小管		
	T. G	T. G	G. A	T. G	G. A	G. P
01	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)

[0118] 3. 效价测定按冻干时不同部位随机抽取样品进行血凝集性测定(按《附录》进行),测定结果见表2。结果表明对1%鸡红细胞的凝集价均为 $8\log_2$ 。

[0119] 表201 抗原效价检测结果

[0120]

样品	抗原稀释倍数 (2 ^x)											对照	HA 价	平均 HA 价	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				
1 号	1-1	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	-	8log ₂	8log ₂
	1-2	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	-	8log ₂	
2 号	2-1	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	-	8log ₂	
	2-2	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	-	8log ₂	
3 号	3-1	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	-	8log ₂	
	3-2	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	-	8log ₂	

[0121] 注:表中“#”表示全部凝集,“++”表示部分全部凝集,“-”表示不凝集。

[0122] 4. 特异性检验采用血凝抑制试验的方法(详见《附录》),用该抗原分别对禽流感病毒 H5 亚型、H7 亚型和 H9 亚型阳性血清、鸡新城疫阳性血清、减蛋综合征病毒阳性血清进行血凝抑制试验,该抗原只能被禽流感病毒 H5 亚型 Re1 株的阳性血清所抑制,而对其它阳性血清均不抑制。

[0123] 表 3 抗原特异性检验统计表

	血清	凝集结果
		抗原 (01)
[0124]	H5 亚型阳性血清	-
	H9 亚型阳性血清	#
	H7 亚型阳性血清	#
	新城疫阳性血清	#
	减蛋综合征阳性血清	#

[0125] 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。

[0126] 5. 剩余水分测定按《中国兽药典》剩余水分测定法进行,检验结果见表 4,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。

[0127] 表 4 剩余水份检验结果

[0128]

批号	样品编号				结论
	1	2	3	4	
01	1.89%	0.98%	1.56%	1.79%	符合规定

[0129] 6. 真空度测定按《中国兽药典》规定真空度测定法进行,所有安瓶真空度均符合要求,出现应有的辉光。

[0130] 实施例 3

[0131] 1. 标准物质效价的定值

[0132] (1) 定值方法

[0133] 红细胞凝集试验 96 孔微量板法进行测定。

[0134] (2) 定值单位

[0135] 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。

[0136] (3) 定值要求

[0137] 1) 应对每个被测标准样品分别做六到 8 次独立的测定,测定分两个单元,每个单元做三次独立测定;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。

[0138] 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。

[0139] (4) 数据处理

[0140] 1) 汇总全部原始数据,考察全部测量数据分布的正态性。

[0141] 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。用统计学方法剔除可疑值。计算出总平均值和标准偏差。

[0142] 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。剔除可疑值,再计算全部原始数据的总平均值和标准偏差。

[0143] 4) 抗原效价的定值结果协作标定结果见表 5。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,该批抗原血凝效价为 300 ± 60 ,最终定值为 320。

[0144] 表 5 协作标定结果

[0145]

协作标定单位	抗原血凝效价					
	1	2	3	4	5	6
HWK	1:240	1:240	1:240	1:240	1:160	1:160
ZSYJ	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320	1:320
FJNLD	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
YD	1:240	1:240	1:240	1:240	1:240	1:240
ZND	1:240	1:240	1:240	1:240	1:240	1:240
HWSJDS	1:240	1:240	1:240	1:240	1:240	1:240
DN	1:240	1:240	1:240	1:240	1:240	1:240
JN	1:240	1:240	1:240	1:240	1:240	1:240

[0146] 注:表中数值为抗原全部凝集的最高稀释倍数。

[0147] 2. 均一性检验

[0148] 随机抽取样品 15 支,用电子分析天平分别称量其净重量,结果见表 6。描述性生物统计分析得出:样品重量均在 0.102 ~ 0.12g 之间,平均数为 0.114g;CV 为 4.3%,均在 95% 正常值范围内;结果表明该批标准品装量均一。

[0149] 表 6 样品称重分析结果

	净重 (g)	平均值 X(g)	s	CV	
	1	0.102			
	2	0.112			
[0150]	3	0.118	0.114	0.005	4.3%
	4	0.119			
	5	0.116			
	6	0.109			
	7	0.113			
	8	0.106			
	9	0.120			
	10	0.120			
[0151]	11	0.109			
	12	0.115			
	13	0.117			
	14	0.114			
	15	0.120			

[0152] 3. 稳定性检验

[0153] 结果见表 7、8、9, 结果表明该抗原在 37℃ 条件下保存 28 天 HA 价未下降, 35 天略有降低。4℃ 保存 6 个月和 -20℃ 保存 12 个月时 HA 价未下降。

[0154] 表 7 稳定性检验结果 (一)

[0155]	保存温度 (°C)	HA 效价 (log ₂)			
		1 个月	2 个月	6 个月	12 个月
	-20	8log ₂	8log ₂	8log ₂	8log ₂

[0156] 表 8 稳定性检验结果 (二)

[0157]

[0157]	保存温度 (°C)	HA 效价 (log ₂)					
		10 天	1 个月	3 个月	4 个月	5 个月	6 个月
	4	8log ₂	8log ₂	8log ₂	8log ₂	8log ₂	8log ₂

[0158] 表 9 稳定性检验结果 (三)

[0159]	保存温度 (°C)	HA 效价 (log ₂)					
		3 天	7 天	14 天	21 天	28 天	35 天
	37	8log ₂	8log ₂	8log ₂	8log ₂	8log ₂	7log ₂

[0160] 附录

[0161] 禽流感血凝 (HA) 和血凝抑制 (HI) 试验

[0162] 1 材料

[0163] 1. 196 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。

[0164] 1. 20. 85% 生理盐水

[0165] 1. 2. 1 生理盐水配制量取 8. 5g NaCl, 加蒸馏水至 1000ml ;

[0166] 1. 2. 2 以 121℃ 灭菌 30min, 备用 ;

[0167] 1. 2. 3 生理盐水一经使用, 于 2 ~ 8℃ 保存不超过 1 周。

[0168] 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℃ 保存备用。

[0169] 1. 41% 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℃ 保存备用。

[0170] 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。

[0171] 2 操作术式

[0172] 2. 1 血凝 (HA) 试验

[0173] 2. 1. 1 在 V 型微量反应板中, 每孔加 0. 025ml 生理盐水。

[0174] 2. 1. 2 第 1 孔加 0. 025ml 抗原, 反复抽打 3 ~ 5 次混匀。

[0175] 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。

[0176] 2. 1. 4 每孔加 0. 025ml 生理盐水。

[0177] 2. 1. 5 每孔加入 0. 025ml 1% (V/V) 鸡红细胞悬液。

[0178] 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。

[0179] 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。

[0180] 2. 2 血凝抑制 (HI) 试验

[0181] 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)。

[0182] 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。

[0183] 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。

[0184] 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。

[0185] 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。

[0186] 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。

[0001]

序列表

<110> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所

<120> 禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株血凝抑制抗原标准物质及制备方法

<160> 2

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> 扩增禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株 HA 裂解位点的基因片段所用的上游引物

<223> 人工合成

<400> 1

ACATAGTGAG AAGAGCTG 18

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 扩增禽流感病毒 H5N1 亚型 Re-5 株 HA 裂解位点的基因片段所用的下游引物

<223> 人工合成

<400> 2

TCCCACTCAC TATCAGCTG 19

专利名称(译)	禽流感病毒H5N1亚型Re-5株血凝抑制抗原标准物质及制备方法		
公开(公告)号	CN102012430B	公开(公告)日	2013-09-04
申请号	CN201010532313.3	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 田国彬 胡井雷 韩正博 张从禄 曾显营 杨帆 徐姗姗		
发明人	孙建宏 刘景利 田国彬 胡井雷 韩正博 张从禄 曾显营 杨帆 徐姗姗		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	郑明		
审查员(译)	李保安		
其他公开文献	CN102012430A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及禽流感病毒H5N1亚型Re-5株血凝抑制抗原标准物质及其制备方法。本标准物质是由禽流感病毒H5N1亚型Re-5株病毒经过病毒液的制备与检验；病毒液灭活、半成品检验；冻干、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H5亚型准确诊断、H5N1亚型Re-5株血凝抑制抗体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。

