



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102004151 A

(43) 申请公布日 2011.04.06

(21) 申请号 201010532373.5

(22) 申请日 2010.11.05

(71) 申请人 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 杨帆
王在时 韩正博 张从禄 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 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

禽流感病毒 H9 亚型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 H9 亚型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 H9 亚型 CKSH01 株病毒经过病毒液的制备与检验；病毒液灭活、浓缩、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 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。

1. 一种禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原标准物质,其特征在于该抗原标准物质含有灭活的禽流感病毒 H9 亚型 CKSH01 株病毒;血凝抑制试验抗原对鸡红细胞凝集价均 $\geq 7\log_2$;该抗原只能被禽流感病毒 H9 亚型阳性血清所抑制,而对禽流感病毒 H5 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 H9 亚型血凝抑制试验抗原标准物质的制备方法,其特征在于是通过利用由我国分离的禽流感病毒 H9 亚型 CKSH01 株病毒经过以下步骤:

(1) 制备禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原标准物质候选物:

H9 亚型禽流感病毒毒种的制备与检验;

病毒液的制备与检验;

病毒液灭活、浓缩、半成品检验;

冻干、成品检验、均一性检验及稳定性检验;

(2) 标准物质的标定、定值。

3. 如权利要求 2 所述的一种禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原标准物质的制备方法,其特征在于制备过程中使用的冻干保护剂为: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。

禽流感病毒 H9 亚型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 H9 亚型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) 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] 本发明为制备一种禽流感病毒 H9 亚型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 H9 亚型 CKSH01 株病毒;血凝抑制试验抗原对鸡红细胞凝集价应 $\geq 7 \log_2$;该抗原只能被禽流感病毒 H9 亚型阳性血清所抑制,而对禽流感病毒 H5 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] 本发明的主要制备方法为：

[0009] (1) 制备禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原标准物质候选物,包括:H9 亚型禽流感病毒毒种的制备与检验;病毒液的制备与检验;病毒液灭活、浓缩、半成品检验;冻干、成品检验、均一性检验及稳定性检验;(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 H9 亚型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禽流感病毒 H9 亚型(株)血凝抑制方法基础上,制定了禽流感病毒 H9 亚型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 H9 亚型血凝抑制抗原标准物质,并与中国兽药监察所、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 H9 亚型(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 H9 亚型(株)血凝抑制抗原标准物质的病毒毒株为 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Shanghai/10/01(H9N2) 株(简称 CKSH01 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) 红细胞凝集价 按附录 1 进行鸡红细胞凝集价测定,毒种对 1% 鸡红细胞凝集价应 $\geq 8 \log_2$ 。

[0019] 2) 病毒含量 将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,凝集价 $\geq 4 \log_2$ 者判为感染,计算 EID_{50} (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,本发明以下称《中国兽药典》),每 ml 病毒含量应 $\geq 10^{7.5} EID_{50}$ 。

[0020] 3) 特异性 将毒种用灭菌生理盐水稀释至 $10^3 EID_{50}/0.1ml$ 与等量禽流感病毒 H9 亚型特异阳性血清混合,置室温中和 1h 后,接种 10 日龄 SPF 鸡胚 10 个,观察 120h。在接种后 24 ~ 120h 内不应引起特异死亡,至少有 8/10 接种鸡胚健活,鸡胚液作红细胞凝集试验,应为阴性。

[0021] 4) 对鸡的毒力 将毒种用灭菌生理盐水作 10 倍稀释,滴鼻接种 4 ~ 5 周龄 SPF 鸡 10 只,每只 0.1ml。另取条件相同的 SPF 鸡 5 只,不接种作为对照,在同条件下分别饲养,观察 14 日,感染鸡和对照鸡均不应出现任何异常反应。

[0022] 5) 纯净性 按《中国兽药典》规定的方法应无细菌、霉菌、支原体及外源病毒污染。

[0023] 6) 基础种子代数 5 代以内。

[0024] 7) 毒种保存 在 -70℃ 以下,保存期为 60 个月。

[0025] 2 实验动物

[0026] 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。

[0027] 3 禽流感病毒 H9 亚型(株)血凝抑制抗原标准物质候选物的制备

[0028] (1) 抗原的制备

[0029] 按照常规方法(《中国兽药典》),将毒种接种 SPF 鸡胚,收获鸡胚液制备禽流感病毒 H9 亚型(株)血凝抑制抗原半成品,经灭活、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),批号为 200901。

[0030] (2) 抗原检验

[0031] 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。

[0032] 2) 无菌检验 抽样检验,应无细菌或霉菌生长。

[0033] 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 $7\log_2$ 。

[0034] 4) 特异性检验 采用血凝抑制试验的方法(详见附录 1),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 H9 亚型阳性血清所抑制,而对其它阳性血清均呈阴性反应。

[0035] 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%。

[0036] 6) 真空度测定 按《中国兽药典》进行,用高频电子火花仪进行检测,应符合规定。

[0037] 4 标准物质的定值

[0038] (1) 定值方法 红细胞凝集试验 96 孔微量板法进行测定。

[0039] (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。

[0040] (3) 定值要求

[0041] 1) 应对每个被测标准样品分别做六到八次独立的测定,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。

[0042] 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。

[0043] (4) 数据处理

[0044] 1) 汇总全部原始数据,考察全部测量数据分布的正态性。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 5 均一性检验

[0048] (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。

[0049] (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。

[0050] 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。

[0051] 二、禽流感 H9 亚型血凝抑制抗原标准物质的使用

[0052] 抗原系用 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Shanghai/10/01 (H9N2) 株接种 SPF 鸡胚, 收获感染鸡胚液, 用甲醛溶液灭活, 经浓缩后, 加适宜稳定剂冻干制成。主要用于:

[0053] (一) HA 试验中, 校定 H9 亚型抗原 HA 效价

[0054] 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; 先进行 10 倍、20 倍、80 倍稀释, 然后依次进行 1/320、1/400、1/480、1/560、1/640、1/720、1/800 倍稀释。

[0055] 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、80 倍稀释, 然后依次进行 320、400、480、560、640、720、800... 依次递增 80 倍进行稀释。

[0056] 3 红细胞凝集试验

[0057] (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。

[0058] (2) 对照: 50 μ L 生理盐水 + 25 μ L 1% 鸡红细胞悬液。

[0059] (3) 在微量振荡器振荡 1min ~ 2min。

[0060] (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 (#)。

[0061] (5) 结论: 当标准抗原完全凝集孔对应的最高稀释度为 460 \pm 80 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。

[0062] (二) HI 试验中, 校定禽流感病毒 H9 亚型抗体的 HI 效价

[0063] 1 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 320、400、480、560、640 倍稀释。

[0064] 2 红细胞凝集试验

[0065] (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。

[0066] (2) 对照: 50 μ L 生理盐水 + 25 μ L 1% 鸡红细胞悬液。

[0067] (3) 在微量振荡器振荡 1 ~ 2min。

[0068] (4) 室温 (24 ~ 26 $^{\circ}$ C) 放置 30 分钟, 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 (#)。

[0069] (5) 结论: 完全凝集孔对应的最高稀释度应为 460 \pm 80 倍。

[0070] 3 微量血凝抑制试验

[0071] (1) 4HAU 抗原的配制与验证

[0072] 1) 抗原稀释方法

[0073] 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 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。

[0074] 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。

[0075] 3) 对照 :50 μ L 生理盐水 +25 μ L 1%鸡红细胞悬液。

[0076] 4) 以上试验做 2 个平行重复。

[0077] 5) 在微量振荡器振荡 1 ~ 2min。

[0078] 6) 室温 (24 ~ 26 $^{\circ}$ C) 放置 30min,判定结果。

[0079] 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%凝集点,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%凝集点。应根据测定结果适当调整,使抗原工作液确为 4HAU。

[0080] (2) 血清的稀释

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 3) 被检血清的稀释 在 V 型微量反应板中,每孔加 0.025ml 生理盐水 ;第 1 孔加 0.025ml 被检血清,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 11 孔,从第 11 孔吸取 0.025ml 弃去。

[0084] 3.3V 型微量反应板上所有血清孔加入 4HAU 的抗原液 25 μ L。最后 1 排设 50 μ L 生理盐水和 25 μ L 生理盐水 +25 μ L 4HAU 抗原 (各 4 个孔) 做对照。

[0085] (4) 充分振荡后,室温 (24 ~ 26 $^{\circ}$ C) 下静置 30 分钟。每孔再加入 1%鸡红细胞悬液 25 μ L,充分振荡。

[0086] (5) 室温 (24 ~ 26 $^{\circ}$ C) 放置 30 分钟后判定结果。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 (#)。

[0087] (6) 结论

[0088] 阳性血清 840 倍稀释孔为 (-),960、1080 和 1200 倍稀释孔为 (+)、(++)、(+++) 或

(#); 50 μ L 生理盐水对照孔为 (-), 25 μ L 生理盐水 + 25 μ L 4HAU 抗原孔为 (#), 此时试验方可判为成立。

[0089] 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。

[0090] 本发明的优点

[0091] 本发明涉及禽流感病毒 H9 亚型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 H9 亚型 CKSH01 株病毒经过病毒液的制备与检验; 病毒液灭活、浓缩、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 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。

[0092] 实施例 1

[0093] 抗原制造及半成品检验

[0094] 1 生产用毒种制备

[0095] (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 11 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.1 ml, 密封针孔, 置 37 $^{\circ}$ C 继续孵育, 不必翻蛋。接种 24h 后, 每 8h 照蛋 1 次, 至 72h, 死亡的鸡胚随时取出, 气室部向上直立, 在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 中冷却, 接种后 24h 前死亡者弃去不用。将冷却 8 ~ 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)。尿囊液收集于一灭菌容器内。制备的病毒毒种经检验应符合该病毒毒种的标准 (见附录 2《禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原毒种标准》)。

[0096] (2) 病毒液的制备

[0097] 1) 接种 取生产用毒种, 用灭菌生理盐水作 10⁻⁴ 稀释, 尿囊腔内接种 11 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.1 ml, 密封针孔, 置 37 $^{\circ}$ C 继续孵育, 不必翻蛋。

[0098] 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 $^{\circ}$ C 冷却 8h 以上。

[0099] 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), 用灭菌小镊子亚压住鸡胚, 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 $^{\circ}$ C 条件下保存。

[0100] (3) 病毒液的检验

[0101] 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, 应无细菌或霉菌或支原体生长也无外源病毒。

[0102] 2) HA 价测定 每瓶鸡胚液分别取样, 样品对鸡红细胞凝集价均 $\geq 7 \log 2$ 。

[0103] 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 0.1% 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 $^{\circ}$ C 灭活 24h (以瓶内温度达到 37 $^{\circ}$ C 开始计时, 期间振摇 1 次)。灭活后将胚液置于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 条件下保存。

[0104] 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。

[0105] 5) 浓缩与保存 将灭活彻底的鸡胚液分装到灭菌的透析袋中, 袋外铺加聚乙二醇, 在室温下透析浓缩 5 倍左右。

[0106] 浓缩后的鸡胚液分别收集于灭菌容器内, 置于 4 ~ 8℃ 条件下存放, 不得超过 3 个月。

[0107] 6) 半成品检验 透析后鸡胚液分别取样, 进行无菌检验, 无细菌或霉菌生长。透析后鸡胚液分别取样, 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, 应无细菌或霉菌生长。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
200901	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 1 进行), 测定结果见表 2。结果表明对 1% 鸡红细胞的凝集价均不低于 $7\log_2$, 达到 $9\log_2$ 。

[0119] 表 2 01 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	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	9log2	9log2
	1-2	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	9log2	
2 号	2-1	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	9log2	
	2-2	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	9log2	
3 号	3-1	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	9log2	
	3-2	#	#	#	#	#	#	#	#	#	++	-	-	9log2	

[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 1),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 H9 亚型阳性血清所抑制,而对其它阳性血清均呈均不能抑制。

[0123] 表 3 抗原特异性检验统计表

血清	凝集结果	
	抗原 (01)	
H5 亚型阳血清	#	
[0124] 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	
200901	1.89%	2.35%	2.56%	1.69%	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,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 460 ± 80 ,最终定值为 400。

[0144] 表 5 协作标定结果

[0145]

协作标定单位	抗原 HA 效价					
	1	2	3	4	5	6
HWK	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
ZSYJ	1:560	1:560	1:560	1:560	1:560	1:560
XNMD	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
YD	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
ZND	1:560	1:560	1:560	1:560	1:560	1:560
HY	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
DN	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
JN	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400

[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 2-6。描述性生物统计分析得出:样品重量均在 0.112 ~ 0.13g 之间,平均数为 0.123g;CV 为 4.1%,均在 95% 正常值范围内;结果表明该批标准物质装量均一。

[0149] 表 6 样品称重分析结果

	样品号	净重 (g)	平均值 X (g)	s	CV
	1	0.122			
	2	0.118			
	3	0.119			
	4	0.119			
	5	0.125			
	6	0.128			
	7	0.126			
[0150]	8	0.116	0.123	0.005	4.1%
	9	0.120			
	10	0.120			
	11	0.129			
	12	0.112			
	13	0.119			
	14	0.124			
	15	0.130			

[0151] 3 稳定性检验

[0152] 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 18 个月时 HA 价未下降。

[0153] 表 7 稳定性检验结果 (一)

保存温度 (°C)	HA 效价 (log ₂)				
	1 个月	2 个月	6 个月	12 个月	18 个月
[0154] -20	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂

[0155] 表 8 稳定性检验结果 (二)

[0156]

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	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂

[0157] 表 9 稳定性检验结果 (三)

[0158]

保存温度 (°C)	HA 效价 (log ₂)					
	3 天	7 天	14 天	21 天	28 天	35 天
37	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	8log ₂

[0159] 附录 1

[0160] 禽流感血凝 (HA) 和血凝抑制 (HI) 试验

[0161] 1 材料

[0162] 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。

[0163] 1.2 0.85% 生理盐水

[0164] 1.2.1 生理盐水配制量取 8.5g NaCl, 加蒸馏水至 1000ml ;

[0165] 1.2.2 以 121°C 灭菌 30 分钟, 备用 ;

[0166] 1.2.3 生理盐水一经使用, 于 2 ~ 8°C 保存不超过 1 周。

[0167] 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。

[0168] 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。

[0169] 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。

[0170] 2 操作术式

[0171] 2.1 血凝 (HA) 试验

[0172] 2.1.1 在 V 型微量反应板中, 每孔加 0.025ml 生理盐水。

[0173] 2.1.2 第 1 孔加 0.025ml 抗原, 反复抽打 3 ~ 5 次混匀。

[0174] 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。

[0175] 2.1.4 每孔加 0.025ml 生理盐水。

[0176] 2.1.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 鸡红细胞悬液。

[0177] 2.1.6 将反应板在振荡器上震荡 1 ~ 2 分钟或轻扣反应板混合反应物, 在室温 (20 ~ 25°C) 下静置 20 ~ 30 分钟或 2 ~ 8°C 45 ~ 60 分钟。在对照孔红细胞显著呈钮扣状时判定结果。

[0178] 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。

[0179] 2.2 血凝抑制 (HI) 试验

[0180] 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)。

- [0181] 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。
- [0182] 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。
- [0183] 2.2.4 第 1 ~ 11 孔均加入 0.025ml 的 4HAU 抗原,在室温 (20 ~ 25℃) 下静置 30 分钟或 2 ~ 8℃ 50 分钟。
- [0184] 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 ~ 30 分钟或 2 ~ 8℃ 45 ~ 60 分钟,对照红细胞将呈明显纽扣状沉于孔底。
- [0185] 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。
- [0186] 附录 2
- [0187] 禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原毒种标准
- [0188] 1 红细胞凝集价 对 1% 鸡红细胞凝集价应 $\geq 8\log_2$ 。
- [0189] 2 病毒含量 将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,24 小时前死亡的鸡胚弃去不计,24 ~ 72 小时内死亡的鸡胚随时取出并于 2 ~ 8℃ 冷藏保存。至 72 小时,测定所有鸡胚液的红细胞凝集价,凝集价 $\geq 4\log_2$ 者判为感染,计算 EID₅₀,每 ml 病毒含量应 $\geq 107.5\text{EID}_{50}$ 。
- [0190] 3 特异性 用微量法进行红细胞凝集抑制试验,对禽流感病毒 H9 亚型抗血清应为阳性反应,对 H5 和 H7 亚型禽流感、鸡新城疫和减蛋综合征病毒阳性血清均应为阴性反应。
- [0191] 4 对鸡的毒力 将毒种用灭菌生理盐水作 10 倍稀释,滴鼻接种 4 ~ 5 周龄 SPF 鸡 10 只,每只 0.1ml。另取条件相同的 SPF 鸡 5 只,不接种作为对照,在同条件下分别饲养,观察 14 日,感染鸡和对照鸡均不应出现任何异常反应。
- [0192] 5 纯净 按《中国兽药典》进行,应无细菌、霉菌、支原体及外源病毒污染。
- [0193] 6 基础种子代数 5 代以内。
- [0194] 7 毒种保存 在 -70℃ 以下,保存期为 60 个月。

专利名称(译)	禽流感病毒H9亚型血凝抑制抗原标准物质及制备方法		
公开(公告)号	CN102004151A	公开(公告)日	2011-04-06
申请号	CN201010532373.5	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 杨帆 王在时 韩正博 张从禄 田国彬		
发明人	孙建宏 刘景利 胡井雷 杨帆 王在时 韩正博 张从禄 田国彬		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 C12N7/04		
代理人(译)	郑明		
其他公开文献	CN102004151B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及禽流感病毒H9亚型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H9亚型CKSH01株病毒经过病毒液的制备与检验；病毒液灭活、浓缩、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。

批号	37℃三角瓶	37℃小管	25℃小管
	T.G	T.G	G.A
	T.G	G.A	G.P
200901	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)
	5/5(-)	5/5(-)	5/5(-)