

禽流感 (H₉ 亚型) H I 稳定抗原的制备

徐怀英, 秦卓明, 何叶峰, 李莉

(山东省农业科学院家禽研究所, 山东济南 250100)

[收稿日期] 2006-07-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2006)11-0009-04 [中图分类号] S852.659.5

[摘要] 禽流感 (H₉N₂) 灭活病毒液经浓缩纯化、离心及超声波处理, 分组后加入不同物质如明胶、甘油、蔗糖作为稳定剂, 制备 H I 诊断抗原。通过对不同温度条件 (-20℃、4℃ 和室温)、不同存放时间诊断抗原 HA 效价的比较, 筛选出了 -20℃ 和室温保存 6 个月, 4℃ 保存至少 12 个月抗原 HA 效价不发生改变的稳定剂——甘油。经实验室和田间试验, 用该组抗原检测的禽流感 H₉ 亚型抗体与国家流感中心活病毒抗原检测结果基本一致。

[关键词] 禽流感; H I 稳定抗原; 制备

Preparation of Stabilized Antigen for Hemagglutination Inhibition of Avian Influenza (H₉ Subtype)

XU Huai-ying, QIN Zhuo-ming, HE Ye-feng, LI Li

(Shandong Institute of Poultry Science, Jinan, Shandong 250100; China)

Abstract: Inactivated H₉N₂ A IV was treated by concentration, centrifugation, and ultrasonic, then separately added with stabilizer: gelatin, glycerine and lactose. Then the antigen for H I was prepared which was deposited at -20℃, 4℃ and common temperature conditions. We detected HA titers in different temperature conditions and keeping times. The results showed that glycerine was the best stabilizer, and this group H I antigen can be kept for one year at least at 4℃, and 6 months at -20℃ and common temperature conditions with HA titer having no significant change. After the tests have been done in laboratory and fields, the detection results were conformed to the standard.

Key words: avian influenza; H I stable antigen

H I(血凝抑制)抗体检测是目前生产中抗体检测最常用的检测方法, 具有操作简便、快捷, 敏感度高, 型特异性强等特点。新城疫、禽流感是目前严重危害我国的两种重要的禽类疫病, 而评价二者抗体水平最简便的方法就是 H I。H I 是实际生产中评价疫苗质量、鸡体免疫水平的高低和确定是否免疫的最重要手段^[1~2]。目前存在的首要问题是缺乏稳定的、安全的 H I 诊断抗原^[3], 具体表现在: 由于未被灭活的诊断抗原(如新城疫、禽流感等)存在散

毒的危险, 因此活病毒抗原隐患大; 活的病毒抗原必须冷冻保存, 要求高, 如果在 4℃ 条件下放置, 1 个星期即开始出现蛋白沉淀、效价降低, 而反复冻融又会使蛋白变性, 抗原效价降低; 活的病毒抗原稳定性差, 用其作为诊断抗原需每次测抗原的血凝效价, 增加了工作量, 且简单灭活后病毒血凝素的稳定性差, 受保存条件、缓冲液和灭活剂等因素影响较大, 血凝效价常急剧降低甚至消失。

鉴于上述原因, 我们先将病毒灭活, 然后利用

作者简介: 徐怀英 (1976年~), 女, 山东冠县人, 助理研究员, 主要从事病毒免疫学研究。E-mail: hyingxu@163.com

PALL 浓缩技术对抗原液进行浓缩纯化, 加入不同的稳定剂^[4], 筛选出了具有不散毒、效价稳定和易存放等优点的灭活纯化禽流感 H₉N₂ 亚型诊断抗原, 在临床使用中取得了较好的效果。

1 材 料

1.1 毒种 禽流感病毒 H₉N₂ 亚型, 由山东省农业科学院家禽研究所分离, 经国家流感中心鉴定。

1.2 国家流感中心禽流感病毒 H₉N₂ 亚型 HI 抗原批号 040216, 购自哈尔滨兽医研究所。

1.3 SPF 鸡胚 山东省农业科学院家禽研究所 SPF 鸡研究中心提供

1.4 防腐剂 1% 硫柳汞。

1.5 稳定剂 采用三组稳定剂, 比较各自的效果。明胶组: 主要成分为医用明胶; 甘油组: 主要成分为甘油; 蔗糖组: 主要成分为蔗糖。

1.6 其他 PALL 浓缩仪, PALL 公司产品, Centra-setteTM 5; 膜包, OS300C05, 截留分子量为 300 ku。

2 方 法

2.1 病毒液的制备

2.1.1 病毒培养 采用禽流感病毒 H₉N₂ 亚型毒种以 1:100 倍稀释, 经绒毛尿囊腔途径接种 11 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.1 mL, 接种后置 37℃ 继续孵化, 无菌收获 48~96 h 死亡鸡胚及未死亡鸡胚的尿囊液^[5], 以上操作均在 P3 级实验室中进行。

2.1.2 灭活 向鸡胚尿囊液中加入终浓度为 0.16% 的甲醛, 充分混匀后置 37℃ 恒温摇床中灭活 24 h。

2.1.3 灭活检验 将灭活的尿囊液经绒毛尿囊腔途径接种 10 个 11 胚龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.2 mL, 接种后置 37℃ 继续孵化至 16 胚龄, 观察鸡胚发育情况并检测鸡胚尿囊液有无血凝性。

2.1.4 浓缩纯化 鸡胚尿囊液浓缩过程参照何叶峰^[6]方法, 将浓缩病毒液经 6 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 然后超声波处理, 使病毒粒子均匀分散。

2.1.5 效价监测 浓缩纯化后病毒液 HA 效价。

2.1.6 特异性检查 浓缩后的 H₉N₂ 禽流感病毒液分别与新城疫 (ND)、鸡传染性支气管炎 (B)、肉鸡减蛋综合征 (EDS)、禽流感病毒 H₉N₂ 亚型、鸡毒支原体 (MG)、鸡传染性喉气管炎病毒 (LT)、鸡滑液囊支原体 (MS) 等多种阳性血清做 HI 交叉抑制实验。

2.2 稳定抗原的制备

2.2.1 抗原制备 每组稳定剂与病毒液以 1:7 的比例配制, 然后加防腐剂硫柳汞至终浓度为 10⁻⁴, 采用相同方法制备 5 批抗原 040307、040721、040816、041010、050109。

2.2.2 HA 测定 明胶组、甘油组、蔗糖组、对照组 (无稳定剂组) 和活病毒抗原分别放置于冷冻 (-20℃)、4℃ 及室温下, 检测保存 1 周、1 个月、2 个月、3 个月、6 个月、9 个月、12 个月、15 个月抗原 HA 效价, 每次每组取 5 支。

2.3 不同批次甘油组稳定抗原不同保存条件稳定性及批间检测可重复性研究 将来自种鸡场的送检血清, 分别用 040307、040816、050109 三批抗原重复检测, 比较检测结果。

2.4 HI 抗原检测效果对比实验 以甘油保护剂稳定抗原与国家流感中心禽流感 (H₉N₂) 活病毒抗原分别对鸡血清进行对比监测。

2.5 推广应用实验 山东农业大学及烟台、东营、临沂、平邑、河北等地的大中型种鸡场使用我们研制的该抗原, 对不同日龄和不同免疫时间的鸡群进行 H₉N₂ 抗体检测。

3 结 果

3.1 灭活检验 接种灭活尿囊液的鸡胚发育正常, 尿囊液 HA 效价为 0, 表明病毒已完全灭活。

3.2 诊断抗原特异性、稳定性检测

3.2.1 HA 效价检测 浓缩后病毒液 HA 效价为 2¹¹。

3.2.2 特异性试验 制备抗原的 H₉N₂ 禽流感病毒液与多种单因子阳性血清做交叉实验, 结果见表 1。由检测结果可知, H₉N₂ 禽流感病毒液均不与多种阳性血清反应, 说明制备的抗原特异性好。

表 1 H₉N₂ 禽流感病毒液特异性检测

禽流感 H ₉ N ₂ 病毒液	阳性血清							
	ND	B	EDS	A H ₅	A I H ₉	L T	M G	M S
	-	-	-	-	-	+	-	-

注: “-”表示阴性, “+”表示阳性。

3.3 HI 抗原稳定性试验

3.3.1 -20℃ 冷冻保存 融化后, 无稳定剂组和活病毒组抗原有少量沉淀出现, 其他组物理性状基本无变化, HA 效价结果见图 1。由图 1 可知, 在 -20℃ 冷冻条件下, 各组抗原的 HA 效价均逐渐下降, 甘油组抗原可保持 HA 效价 6 个月不变; 无稳

定剂组下最快,冻存1周后病毒效价由 2^{11} 降至 2^7 ,冻存1年后降为0;明胶组和蔗糖组抗原的效价介于甘油组和无稳定剂组之间,冷冻使活病毒组抗原效价发生缓慢的降低。

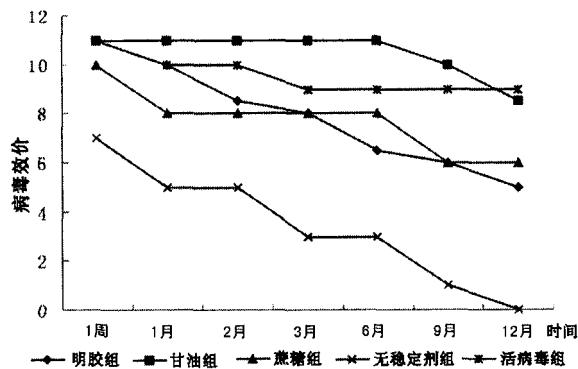


图1 - 20 保存条件下不同稳定剂抗原 HA 效价 (\log_2)

3.3.2 4 冰箱保存 4 条件下活病毒抗原在放置1周后开始出现沉淀,其它各组物理性状较好,HA效价结果见图2。

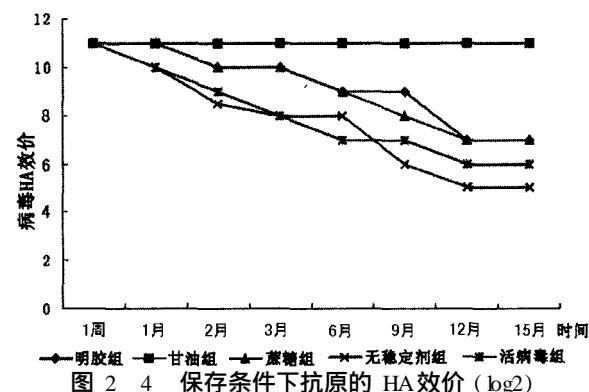


图2 4 保存条件下抗原的 HA 效价 (\log_2)

由图2可知,在4条件下,甘油组抗原的HA效价在15个月内保持 2^{11} 不变;加入明胶和蔗糖稳定剂的抗原的HA效价可以保持1个月不降,1个月后开始降低;无稳定剂组和活病毒组抗原的HA效价均逐渐下降。

3.3.3 室温存放 在室温条件下,甘油组、明胶组和蔗糖组抗原在3个月内均无沉淀出现,明胶组和蔗糖组分别在第5和4月出现沉淀;无稳定剂组在1个月内无沉淀出现,此后出现蛋白沉淀;活病毒组抗原在室温放置10d后开始出现少量沉淀,随后蛋白沉淀越来越多。各组抗原HA效价结果见图3。

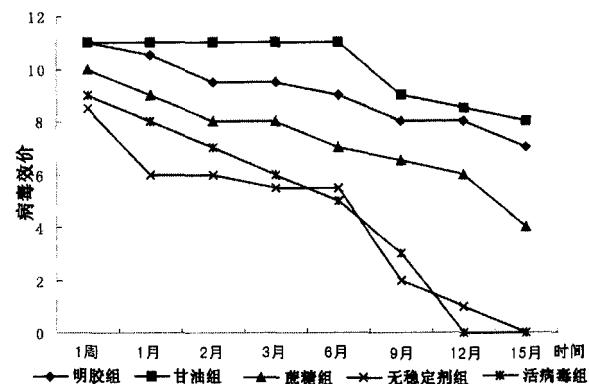


图3 室温保存条件下抗原的 HA 效价 (\log_2)

由图3可知,在室温条件下,甘油组抗原的HA效价在6个月内保持不变,而其他各组抗原的HA效价下降较快。

3.4 不同批次甘油组 HI检测抗原在不同保存条件下HA结果及对样品检测结果的可重复性检测见表2和表3。

表2 甘油组 HI稳定抗原检测 HA 效价 (\log_2)

抗原批次	- 20				4				室温		
	3月	6月	9月	6月	9月	12月	15月	6月	8月	9月	
040307	11	11	10	11	11	11	11	11	11	9	
040816	11	11	10	11	11	11	11	11	10	9	
050109	11	11	10	11	11	11	11	11	10	8	

表3 不同批次稳定抗原对样品检测的可重复性检验 (\log_2)

血清样品	重复性				
	050109	040307	040721	040816	041010
1	10	10	10	10	10
2	11	10	11	11	11
3	6	6	6	6	6
4	7	7	7	8	7
5	4	4	4	4	4
6	2	1	1	2	2
7	0	0	0	0	0
8	9	9	9	9	9

以上数据证实不同批次甘油组抗原具有较好的稳定性和检测结果的可重复性。

3.5 血清样品检测 HI实验 结果见图4。由结果可知,用稳定抗原检测鸡群血清抗体结果与国家流感中心提供抗原的检测结果基本一致,符合率达95%。

3.6 推广应用结果 两年来在各地大中型种鸡场中使用该稳定抗原,对不同日龄和不同免疫时间的

鸡群进行检测,累积检测血清样品 7.2万余份,与国家流感中心检测抗原结果符合率达 96.5%以上,且各地用户反映抗原效价稳定,存放方便,检测结果准确。

4 结论

4.1 H₉N₂型禽流感活病毒抗原在各保存条件(-20℃、4℃、室温),其稳定性均较差。收获鸡胚尿囊液的 HA 效价为 2⁹,在冷冻和 4℃ 存放一周后 HA 效价降低,而且瓶底出现沉淀,影响结果的准确性。不加稳定剂的浓缩灭活抗原,在不同保存条件下,HA 效价均降低较快,易出现沉淀,说明灭活后病毒表面的血凝素结构易受外界条件的影响,引起病毒蛋白变性沉淀析出,效价降低。

4.2 加入稳定剂的各组抗原在各保存条件和保存期内,物理性状好和抗原 HA 效价较高,优于活病毒组抗原。试验结果表明,甘油是一种较好的稳定剂,该组诊断抗原在 4℃ 条件下,HA 效价在一年内不变,为 2¹¹;在 -20℃ 和室温下,该组抗原的 HA 效价 2¹¹ 可维持 6 个月,便于运输,而且作为灭活抗

原,种鸡场使用时较安全无散毒危险。

4.3 从多个批次稳定 H I 诊断抗原的稳定性和检测结果重复性的实验结果分析,说明本研究所制备抗原工艺可靠,批间重复性较好,与国家流感中心抗原符合率较高。

参考文献:

- [1] 甘孟候. 禽流感 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1995. : 95 - 101.
- [2] 林祥梅, 赵增连, 田国斌, 等. 间接 ELISA、H I 及 AGP 检测鸡血清中抗 AIV 抗体的敏感性比较 [J]. 中国兽医学报, 1998, 18(5): 454 - 456.
- [3] 郭慧琳. 鸽新城疫浓缩抗原的制备及稳定性测定 [J]. 甘肃畜牧兽医, 1999, 5: 18.
- [4] Chepumov A A. The Effect of Some Physical and Chemical Factors on Inactivation of the Ebola Virus [J]. Vopr Virusol, 1995, 40 (2): 74 - 76.
- [5] 高福, 等译. 禽病学 [M]. 第 10 版.
- [6] 何叶峰, 徐怀英, 欧阳文军, 等. 重大禽病浓缩疫苗的研制 [J]. 山东家禽, 2003, (12): 8 - 11.

您身边的兽医专家

兽医工作者必备读本

《兽医导刊》杂志(月刊)

邮发代号 80 - 328

全年定价: 96 元

经中华人民共和国新闻出版总署批准,原《动物保健》杂志将于 2007 年 1 月 1 日正式更名为《兽医导刊》,国际标准刊号: ISSN1671 - 1025,国内统一刊号: CN15 - 1347/s,邮发代号: 80 - 328,大 16 开本,全年 12 期,每册定价 8 元,全年 96 元。

办刊宗旨:报道国内外最新兽医科技成果、推广普及兽医科技知识、交流兽医门诊经验。

读者对象:主要为全国兽医从业人员。

主要栏目:特别关注、疫病控制、兽药管理、兽药研究与应用、动物性食品安全检测、兽医门诊、动物医院、环球视野、行业动态、名家访谈、兽医从业故事、商务信息。

全国各地邮政局(所)均可订阅。也可汇款到本刊编辑部直接订阅。

订阅电话: 010 - 87765385 - 17 传真: 010 - 87765385 - 11

联系人: 李卫 手机: 13146224491

通讯地址: 北京市朝阳区百子湾路 16 号后现代城 5 号楼 A 座 208 室

邮编: 100022 电子信箱: dwbj@263.net