

# 鸡新城疫血凝抑制试验用阳性血清国家标准品的研制

李翠, 关孚时, 戴志红, 张秀英, 孙海燕, 蒋卉, 温芳, 陆连寿, 王在时

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2012-04-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2013)01-0010-04 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为制备标定 HI 试验用的鸡新城疫阳性血清国家标准品, 以鸡新城疫 La Sota 株病毒和灭活疫苗免疫 SPF 鸡制备鸡新城疫高免血清。将检验合格的鸡新城疫阳性血清以鸡阴性血清稀释为 HI 效价与国际标准血清完全一致后, 用于标准品制备。对该标准品进行了物理性状、无菌检验、真空度测定、剩余水分检验、均匀性检测和稳定性试验, 检测结果均符合要求。以国际标准品为参比, 测定了该标准品的 HI 效价为 1:60 与协作标定结果基本一致。该标准品以国际标准品溯源的国际单位含量为 320 IU/mL, 为鸡新城疫的相关研究提供了物质基础。

**[关键词]** 鸡新城疫; 阳性血清; 国家标准品; HI 效价测定

## Preparation and Characterization of the National Standard for Newcastle Disease Hemagglutination Inhibition Test Positive Serum, Chicken

LI Cui, GUAN Fu-shi, DAI Zhi-hang, ZHANG Xiu-ying, SUN Hai-yan,

JIANG Hui, WEI Fang, LU Lian-shou, WANG Zai-shi

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In order to prepare the national standard for anti-Newcastle disease serum used for calibrate the HI test, the hyper immunized serum on chicken Newcastle disease were prepared using NDV La Sota strain virus and inactivated vaccine against NDV as antigen to immune twelve SPF chickens. The selected positive serum was diluted by the negative serum to the HI titer samed to the NIBSC international standard. The character, sterility, vaccum degree residual moisture, uniformity and stability of this standard material had been tested and proved to meet the requirement. Referring to the international standard, HI titer of this standard material was measured to be 1:60, which are identical with the collaborative assay results. International unit of the standard material is 320 IU/mL, to provide the foundation of NDV.

**Key words:** Newcastle disease; anti-serum; the national standard; HI potency standardization

鸡新城疫(ND)又称亚洲鸡瘟,是由禽副黏I毒(NDV)引起的一种主要侵害鸡、火鸡、野禽及观赏鸟

类的高度接触传染性、致死性疾病,其感染呈全球趋势,给世界上很多国家和地区带来了严重的经济损

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD06A10)

作者简介:李翠,硕士,助理研究员,从事兽用生物制品标准物质的研制工作。

通讯作者:王在时。E-mail: wangzaishi@ivdc.gov.cn

失<sup>[1]</sup>。世界动物卫生组织(OIE)将其列为A类动物传染病<sup>[2]</sup>,我国将其列为一类动物传染病<sup>[3]</sup>。

目前,红细胞凝集抑制(HI)试验是鸡新城疫诊断、流行病学调查及疫苗免疫效力评价的常用方法<sup>[4]</sup>。为了促进鸡新城疫抗体HI试验的国际一体化和抗原标准化,英国卫桥Veterinary Laboratories Agency(VLA)于1966年研制出国际标准血清<sup>[5]</sup>,可从National Institute for Biological Standards and Control(NIBSC)获得,也称之为基准标准品,各国实验室用国际标准品溯源制备各自的国家标准品,用于标定鸡新城疫抗体HI试验。该国际标准品得到国际上的普遍认可,广泛用于标准化鸡新城疫抗体的HI试验。因此,以该国际标准品为溯源制备国家标准品,对解决我国鸡新城疫血清学诊断中的实际问题具有重要意义。本实验以从NIBSC获得的鸡新城疫阳性血清国际标准品<sup>[6]</sup>为溯源,建立一批国家清标准品,用于标定鸡新城疫抗体检测的HI试验。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 购买于北京实验动物中心的12周龄SPF鸡。

1.1.2 新城疫(ND)检测用抗原 中国兽医药品监察所生产,血凝价 $HA \geq 1:320$ ,批号为200705。

1.1.3 免疫用鸡新城疫La Sota株病毒(NDV) 乾元浩公司制备的新城疫La Sota株生产用种毒(湿毒)病毒,批号为S2070205。

1.1.4 免疫用鸡新城疫La Sota株灭活疫苗 北京市兽医生物药品厂生产,批号为0704。

1.1.5 鸡新城疫阳性血清国际标准品 购买于National Institute for Biological Standards and Control(NIBSC),代码为NDS,国际单位含量为320 IU/mL。

1.1.6 减蛋综合症(EDS)HI抗原 中国兽医药品监察所,批号为201011,血凝价 $HA \geq 1:160$ 。

1.1.7 禽流感(AI)HI抗原 中国科学院哈尔滨兽医研究所提供的禽流感H5N1亚型Re-1株抗原标准物质候选物,血凝价 $HA \geq 1:80$ 。

1.2 候选物的制备 从北京实验动物中心采购12周龄的SPF鸡(全部为公鸡)20只,以HI试验确定20只鸡确为阴性后,以鸡新城疫La Sota株病毒和灭活疫苗按照表1进行免疫。

每次免疫后每隔一天翅静脉采血1 mL监测免疫后抗体水平的变化情况。当抗体水体满足要求

表1 免疫程序

免疫次数	免疫时间	免疫方法
第一次	首次免疫	每只鸡肌肉注射鸡新城疫La Sota株病毒0.25 mL
第二次	首免后2周	每只鸡肌肉注射鸡新城疫La Sota株活疫苗0.5 mL
第三次	二免后2周	每只鸡肌肉注射鸡新城疫La Sota株灭活疫苗0.5 mL

时采用无菌心脏采血法取血,10000 r/min离心分离血清。每1 mL血清加入各1000个单位的青霉素和链霉素。 $-20^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存,备用<sup>[7]</sup>。

1.3 候选物的筛选<sup>[8]</sup> 提取的20只鸡的血清分别进行物理性状和无菌检验,并以NIBSC国际标准阳性血清为参比进行HI试验<sup>[9-10]</sup>检测抗体效价。

### 1.4 标准品的制备

1.4.1 血清稀释 将检验后符合要求的候选物混合后以鸡阴性血清按照NIBSC鸡新城疫阳性血清国际标准品的国际单位进行稀释,使稀释后的血清与NIBSC鸡新城疫阳性血清国际标准品的效价一致。

1.4.2 分装、冻干、熔封 将稀释后的血清经无菌检验和效价测定合格后用瓶颈分液器(分装精度为 $\pm 0.01$  mL)无菌分装至灭菌长安瓶中,每支装量1 mL,按常规方法冻干后抽真空、熔封。

### 1.5 标准品的检验

1.5.1 物理性状 随机抽取5支样品,观察颜色和状态,再打开安瓿加去离子水(可以低速涡旋或用移液器轻轻吹打),记录溶解情况。

1.5.2 无菌检验、真空度测定、剩余水分测定 随机抽取规定数量的样品,按文献方法<sup>[9]</sup>进行。

1.5.3 特异性检验 随机取1支冻干阳性血清在同一条件下分别与新城疫(ND)、减蛋综合症(EDS)和禽流感(AI)HI抗原进行红细胞凝集抑制试验。

1.5.4 效价测定 随机抽取规定数量的样品以NIBSC鸡新城疫阳性血清国际标准品为参比,按文献方法<sup>[9]</sup>测定HI效价。

1.5.5 均匀性检验 随机抽取规定数量<sup>[12]</sup>的样品,以NIBSC鸡新城疫阳性血清国际标准品为参比按文献方法<sup>[9]</sup>测定HI效价。

1.5.6 稳定性试验<sup>[13]</sup> 本次试验随机选取规定数量的样品分别放 $37^{\circ}\text{C}$ 和 $25^{\circ}\text{C}$ 温箱及 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱在规定时间内取样品进行HI效价测定,以分别进行加速稳定性和长期稳定性试验。

1.5.7 协作标定 组织4家协作标定单位按统一的协作标定方案,以国际标准品为参比测定其HI效价,试验完成后统计数据<sup>[5]</sup>,确定待检国家标准品的国际单位含量。

## 2 结果

2.1 候选物制备与筛选 20只SPF鸡经HI试验检测后均为新城疫阴性,按免疫程序免疫后试验鸡均未出现局部和全身不良反应,血清中新城疫HI抗体效价随着免疫次数增加都呈递增的趋势,三次免疫后效价均达到14log<sub>2</sub>以上(试验结果见表2)。

表2 鸡新城疫抗体水平监测结果(血清滴度 log<sub>2</sub>)

免疫后 采血时间	第2天	第4天	第6天	第8天	第10天	第12天
首次免疫	1-2	4-5	7-8	8-9	9-10	9-10
第二次免疫	8-9	7-8	7-8	8-9	9-10	10-11
第三次免疫	12-13	12-13	12-13	13-14	13-14	14-15

提取的20只鸡的血清均为橙黄色或略带棕红色的澄明液体,无菌检验结果为无菌生长,以NIBSC国际标准阳性血清为参比测定HI效价均达到14log<sub>2</sub>以上,可用于制备鸡新城疫血凝抑制试验用阳性血清国家标准品。

2.2 标准品的制备 混合均匀的20只鸡的血清取小样以鸡新城疫阴性血清分别进行1:250、1:300、1:350倍稀释,再以NIBSC鸡新城疫阳性血清国际标准品为参比,测定HI效价结果见表3。

表3 稀释后阳性血清效价测定

血清稀释	1:20	1:30	1:40	1:60	1:80	1:120	1:160	1:240
1:250倍血清	-	-	-	-	-	+	++	+++
1:300倍血清	-	-	-	-	++	++	+++	+++
1:350倍血清	-	-	-	+	++	+++	+++	#
国际标准品	-	-	-	-	++	++	+++	+++

试验结果表明,1:300倍稀释的阳性血清与NIBSC国际标准品的HI效价一致,所以将混合均匀的候选物以鸡阴性血清稀释300倍用于制备国家标准品。

### 2.3 标准品的检验

2.3.1 物理性状 所有冻干阳性血清为淡黄色疏松团块,易与瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解,溶解

后为淡黄色澄明液体。

2.3.2 无菌检验、真空度测定和剩余水分测定 无菌检验和真空度测定结果均符合规定,剩余水分测定结果分别为1.6%、1.4%、1.2%和2.6%,均低于4%,符合要求。

2.3.3 特异性检验 随机取1支冻干阳性血清在同一条件下分别与新城疫(ND)、减蛋综合症(EDS)和禽流感(AI)HI抗原进行红细胞凝集抑制试验,ND HI抗体效价应为阳性,EDS和AI HI抗体应为阴性,说明该血清的特异性检验合格。

2.3.4 效价测定 随机选取5支冻干血清以NIBSC鸡新城疫国际标准血清为参比测定其HI效价为1:60,说明冻干血清与冻干前效价一致。

2.3.5 均匀性检验 随机选取15支冻干血清以NIBSC鸡新城疫国际标准血清为参比测定其HI效价均为1:60,说明该冻干血清的均匀性良好。

2.3.6 稳定性试验 加速稳定性试验结果表明,4支冻干血清37℃温箱保存,每周取1支测定HI效价,保存4周时效价未发生变化;4支冻干血清25℃温箱保存,每隔一周取1支测定HI效价,保存9周时效价未发生变化。在-20℃冷冻储藏的冻干阳性血清按照第1年每3个月一次,第二年每6个月一次,以后每年一次的检测频率进行HI试验测定其效价,结果表明,保存至4年时HI效价均为1:60,说明冻干血清-20℃条件下保存4年HI效价未发生变化。该稳定性试验结果表明,以致密性很好的安瓿为分装容器冷冻干燥并抽真空的冻干血清稳定性很高,保存时间较长,仅为使用者提供参考,该标准血清的保存期需要以长期稳定性试验进行考察。

2.3.7 协作标定 汇总四家协作标定单位的试验结果表明,其中三家单位测定该标准血清的HI效价为1:60,一家单位测定的HI效价为1:40。该标定结果与研制该国家标准品时标定的结果基本一致。

2.3.8 定值与国际单位计算 根据研制结果和协作标定结果,该鸡新城疫血凝抑制试验用阳性血清国家标准品HI效价定值为1:60,使用时所得滴度必须与预测滴度相当,允许误差在一个稀释滴度内。鸡新城疫阳性血清国际标准品国际单位含量为320 IU/安瓿,该国际标准品与本次试验研制的

鸡新城疫血凝抑制试验用阳性血清国家标准品的 HI 效价相当,均为 1:60,所以以 NIBSC 鸡新城疫阳性血清国际标准品溯源该国家标准品的国际单位含量也为 320 IU/安瓿。

### 3 讨论

本试验参照 WHO 的要求<sup>[14]</sup>和国家一级标准物质技术规范<sup>[15]</sup>中标准物质的制备程序,从候选物制备和检验、标准品制备和检验、稳定性试验、均匀性检验、协作标定和定值等程序以国际标准血清为参比研制国家标准品。为提高产品质量,本试验采取了以下措施:一是对国家标准品的候选物进行筛选,尽量保证候选物的质量;二是以国际标准血清为参比测定冻干血清的 HI 效价,尽量准确测定血清的效价;三是对冻干血清进行了均匀性检验,保证了冻干血清的均匀性;四是对冻干血清进行稳定性试验,提供了其保存期监测数据;五是组织协作标定,对不同协作标定单位的试验结果进行统计,最终以国际标准品为溯源确定了国家标准品的国际单位含量为 320 IU/mL,HI 效价为 1:60,最小反应国际单位含量为 5.3 IU,保证了其实际使用中的国际统一性。

该国家标准血清的 HI 效价和国际单位已经确定,可用于以下方式来标化鸡新城疫凝集试验,即标化抗原:由于该标准血清在当地试验条件下 HI 凝集效价已明确,随后批次的鸡新城疫诊断用抗原的最终滴度应当以该国家标准阳性血清来检测;常规试验的对照:为了检测结果可信,试验条件保持不变,每批鸡新城疫红细胞凝集抑制试验都应以该标准品为参比进行滴度测定;结果表达:由于试验时试验体系中各种变量同时影响标准血清和被检血清的效价,所以以国际单位表达结果不依赖于所采用的特殊试验体系,因此在每个不同实验室进行鸡新城疫红细胞凝集抑制试验获得的结果可以以一种有效的方式进行比较。

### 参考文献:

- [1] 傅先强. 鸡新城疫的防治[J]. 当代畜禽养殖业, 2002, 12: 16-17.
- [2] 世界动物卫生组织. 陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)[M]. 第五版. 2004.
- [3] 中华人民共和国农业部 1125 号公告. 一、二、三类动物疫病病种名录[S].
- [4] 黄小波,文心田. 新城疫实验室诊断技术研究进展[J]. 畜禽业, 2002, 12: 12-13.
- [5] Doreenl Stewart, Nancy Hbert C, Davidsont IAN. International reference preparation of anti - Newcastle disease serum[Z]. Wld Hlth Org. 1968, 38: 925-934.
- [6] The 1st international reference preparation for anti - Newcastle disease serum, Code: NDS (Version 02) [EB/OL]. (2003-2-18). <http://www.nibsc.ac.uk>.
- [7] 李翠,王在时,关孚时,等. 鸡新城疫高免血清的制备[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(2): 30-31.
- [8] 李翠,王在时. 兽药标准物质原材料的筛选条件[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(12): 54-55.
- [9] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2005 年版三部[S].
- [10] 农业部第四届兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程(2000 年版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [11] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品质量标准[S].
- [12] 胡晓燕. 标准样品的均匀性检验及判断[J]. 化学分析计量, 1999, 8(1): 5-7.
- [13] World Health Organization. Recommendations for the preparation characterization and establishment of international and other biological standards[C]. The 55th meeting of the WHO Expert Committee on Biological Standardization, 2004, 11: 15-18.
- [14] World Health Organization. Recommendations for the preparation characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004) [Z]. WHO Technical Report Series, No. 932, 2006.
- [15] 全国标准物质管理委员会. 一级标准物质技术规范 (JJG 1006-94) [S].

(责任编辑:陈希)