

禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原 国家参考品的研制

孙建宏¹, 刘景利¹, 胡井雷¹, 张从禄¹, 韩正博¹, 戴志红², 杨帆¹, 徐姗姗¹

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 哈尔滨维科生物技术开发公司, 哈尔滨 150001; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2012-09-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0017-03 [中图分类号] S854.4

[摘要] 按照国家一级标准物质要求, 研制了一批禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原国家参考品, 批号为 200901。对其物理性状、无菌、效价、特异性、水分、真空度、均一性、稳定性等进行了测定, 各项指标均符合要求。经过 8 家单位对其协作标定, 并经统计学分析, 该批抗原血凝效价为 $1:(460 \pm 80)$, 最终定值为 $1:400$ 。该禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原可以作为国家参考品。

[关键词] 禽流感病毒; H9 亚型; 抗原; 参考品

Preparation of National Reference Material for Avian Influenza Virus (H9 subtype) Hemagglutination Inhibition Test Antigen

SUN Jian-hong¹, LIU Jing-li¹, HU Jing-lei¹, ZHANG Cong-lu¹,
HAN Zheng-bo¹, 2YANG Fan¹, XU Shan-shan¹

(1. Harbin Weike Biotechnology Development Company, Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001, China;

2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: According to requirements, national reference material (batch number: 200901) for avian influenza virus (H9 subtype) hemagglutination inhibition test antigen was prepared. Appearance, sterility, specificity, residual moisture, vacuum degree, uniformity and stability were detected. The HA titer of the preparation was studied collaboratively by 8 laboratories and the result was estimated by the statistical methods. The result is $1:(460 \pm 80)$, and the HA titer is defined as $1:400$. The preparation can be used as national reference material.

Key words: avian influenza virus; H9 subtype; antigen; reference material

国家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。禽流感是我国重点防控的重大动物疫病, H9 亚型流行很广泛^[1-2]。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, 但是我国尚无 H9 亚型诊断试剂的标准物质, 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, 因此研制禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原参考品尤为迫切。我单位在国家现行的禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制方法基础上^[3], 研制出了禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制抗原国家参考品。

1 材料与方法

1.1 材料 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Shanghai/

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD06A10)

作者简介: 孙建宏, 研究员, 博士, 从事兽用生物制品学研究。E-mail: sunjianhong0218@sina.com

10/01 株(简称 CKSH01 株,H9N2),由国家禽流感参考实验室鉴定、保管和供应。SPF 鸡及 SPF 鸡胚均由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

1.2 禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制抗原标准品的制备 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 H9 亚型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 1 mL 分装冻干,批号为 200901。保护剂采用本课题研制的配方和配制方法。

1.3 抗原检验

1.3.1 物理性状、无菌检验、剩余水分测定和真空度测定 按文献方法^[4]进行。

1.3.2 特异性检验 采用血凝抑制试验的方法^[4],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。

1.3.3 抗原效价的定值 按照红细胞凝集试验 96 孔微量板法进行测定。抗原先进行 10 倍、20 倍、80 倍稀释,然后依次进行 320、400、480、560、640、720、800 倍...依次递增 80 倍进行稀释。先由本实验室测定 HA 效价,再由 7 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^[5]。对该批参考品任抽 2 个样品,每个样品在不同时间段分别作 3 次独立测定,每个样品测定间隔不少于 3 d。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。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^[2]。汇总全部原始数据,考察测量数据分布的正态性。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。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^[5]。

1.3.4 均一性检验 因冻干数量在 500 支以上,所以随机取样 15 支^[5]。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。

1.3.5 稳定性检验 抗原在 -20 ℃、4 ℃、37 ℃ 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。

2 结果

2.1 物理性状、无菌检验、真空度测定结果 均符合规定。

2.2 剩余水分测定结果 4 份样品的剩余水分含量分别为 1.89%、2.35%、2.56% 和 1.69%,均小于 3%,符合规定。

2.3 特异性检验结果 表 1 结果表明,制备的抗原只能被 H9 亚型阳性血清所抑制,而对其他阳性血清均呈阴性反应。

表 1 抗原特异性检验统计表

血清	凝集结果
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	#
鸡减蛋综合征阳性血清	#

注:“#”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。

2.4 抗原效价的定值结果 协作标定结果见表 2。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 1:(460±80),由于数据是非连续的,变异较大,适合看众数和中位数。众数和中位数都是 1:400,因此将 HA 效价定值为 1:400,即 400 HAU/支。

表 2 协作标定结果

协作标定单位	抗原血凝效价					
	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

注:表中数值为抗原全部凝集的最高稀释倍数。

2.5 均一性检验结果 随机抽取样品 15 支,用电子分析天平分别称量其净重量。描述性生物统计分析得出:样品重量均在 0.112~0.13 g 之间,平均数为 0.123 g;CV 为 4.2%,均在 95% 正常值范围内,表明该批标准品装量均一。

2.6 稳定性检验结果 结果表明,该抗原在 37 ℃ 条件下保存 3、7、14、21、28 d HA 价保持 1:400 未下降,35 d 略降低到 1:256;4 ℃ 保存 10 d、1 个月、

稳健统计方法及 t 检验法在活菌计数能力比对中的应用

张媛,张磊*,李建,丁家波,李旭妮,刘轶秋,王楠,徐磊

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2012-07-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0019-04 [中图分类号] S854.43

[摘要] 为比较检验员活菌计数能力及常量法和微量法在活菌计数应用中是否存在差异,8名检验员于同时、同环境中对同一细菌培养物采用常量法和微量法进行活菌计数,采用稳健统计方法对不同人员相同方法的计数结果进行统计,将检验结果分为“满意”、“可疑”和“不满意”;采用 t 检验法对使用不同方法对同一样品的计数结果进行统计,将结果分为“差异显著”和“差异不显著”。稳健统计方法表明,用常量法进行检测,有6名检验员的检验结果全部满意,而微量法的结果中只有2名检验员获得了全部满意的结果; t 检验法表明常量法和微量法之间存在显著差异。稳健统计方法及 t 检验法统计结果显示,不能用微量法代替常量法进行检验,个别检验员的活菌计数能力有待进一步提高。

[关键词] 活菌计数;能力比对;稳健统计方法; t 检验法

Application of Robust Statistic Method and t Test of Proficiency Testing for Live Bacteria Counting

ZHANG Yuan, ZHANG Lei*, LI Jian, DING Jia-bo, LI Xu-ni, LIU Yi-qiu, WANG Nan, XU Lei

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

Abstract: The test was aim to comprehensively grasp inspectors' ability of live bacteria counting and the differences among constant method and trace method in live bacteria. Each inspector counted bacteria in the same culture using two

作者简介: 张媛,助理研究员,从事兽用生物制品检验工作。

通讯作者: 张磊。E-mail: kflame@163.com

3个月、4个月、5个月、6个月和-20℃保存1个月、2个月、6个月、12个月、18个月时HA价均未降低,保持在1:400。

3 小结

本试验室研制的禽流感抗原各项指标经检测均合格,无菌、特异、均一、稳定,可以作为国家参考品。但根据标准物质的特殊要求,-20℃条件下的保存时间还需每年定期检测确定。

致谢:对参加该国家参考品协作标定的单位和实验室,一并表示感谢。

参考文献:

- [1] 李建丽,刘国英,张金花. H9 亚型禽流感的流行特点及其疫苗市场分析[J]. 兽医导刊,2010,(3):69-71.
- [2] 景小冬,章振华,李林,等. H9 亚型禽流感病毒流行毒株交叉免疫攻毒保护试验[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(6):134-137.
- [3] 禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原与阴、阳性血清制造及检验试行规程[EB/OL]. [2008-03-04]. [http://2010jiuban. agri. gov. cn/xxgkxzsp/t20080304_1028224. htm](http://2010jiuban.agri.gov.cn/xxgkxzsp/t20080304_1028224.htm)
- [4] 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版三部[S].
- [5] 国家标准物质中心. 一级标准物质技术规范(JJG1006-94)[S]. 1994.