



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101957362 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 26

(21) 申请号 201010273228. X

(22) 申请日 2010. 09. 02

(71) 申请人 洛阳普莱柯生物工程有限公司

地址 471000 河南省洛阳市洛龙区政和路
15 号

(72) 发明人 张许科 孙进忠 乔荣岑

(74) 专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理
事务所(普通合伙) 11017

代理人 韩登营 张焕亮

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页

(54) 发明名称

鸡传染性支气管炎疫苗的效力检验方法及其
应用

(57) 摘要

本发明公开了一种鸡传染性支气管炎灭活疫苗
的效力检验方法,同时本发明还可应用于疫苗
的质量控制,具体包括攻毒保护率与产蛋效能的
控制。实验证实该发明使用检测HI 抗体效价的
方法代替本动物攻毒试验,方法简便、快速、结果
准确、重复性强、特异性强等特点,具有普遍推广的
意义。

1. 一种鸡传染性支气管炎灭活疫苗的效力检验方法,其特征在于:包括如下步骤:
 - 1) 用鸡传染性支气管炎疫苗首次免疫鸡,免疫14~28日后采血分离血清,用鸡传染性支气管炎灭活疫苗加强免疫1次,21~35日后采血并分离血清;
 - 2) 分别测定两次血清的血球凝集抑制效价,以两次血球凝集抑制效价之比判断疫苗的效力。
2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述鸡传染性支气管炎活疫苗首次免疫方法为点眼或滴鼻免疫。
3. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述首免的免疫量为1羽份,每羽份病毒含量 $\geq 10^{3.5} \text{EID}_{50}$ 。
4. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述鸡传染性支气管炎灭活疫苗加强免疫方法为皮下注射或肌肉注射。
5. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述加强免疫的免疫量为1羽份,每羽份的量为0.3ml~0.8ml。
6. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,加强免疫在首次免疫后21日。
7. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述血球凝集抑制效价之比为血球凝集抑制效价的几何平均滴度之比。
8. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述血球凝集抑制效价的测定方法,包括如下步骤:
 - 1) 鸡传染性支气管炎血球凝集试验:HA抗原二倍系列稀释。将25 μ l红细胞悬液加入含有25 μ l稀释抗原的反应孔内,充分振荡,在2~8 $^{\circ}$ C静置40min,判定结果时将反应板倾斜与水平呈45 $^{\circ}$ 角,对照孔内和HA阴性孔的红细胞完全沉淀到孔底中心,呈泪珠样流淌;HA阳性孔的红细胞均匀分布在孔底或呈锯齿样凝集,使红细胞凝集的最大稀释倍数为该抗原的HA效价;
 - 2) 血清样品的处理:将血清样品置于56 $^{\circ}$ C水浴中灭活30min,2000r/min离心10min,取上清待检;
 - 3) 鸡传染性支气管炎血球凝集抑制试验:在96孔V型微量反应板,每行第2孔开始,每孔加入25 μ l稀释液至12孔,分别在1、2和12孔加入待检血清25 μ l,从第2孔开始倍比稀释血清至第10孔,弃去25 μ l,向1~11孔加入4HA单位抗原25 μ l,充分振荡,置室温30min,每孔加入1%V/V鸡红细胞悬液25 μ l,轻轻混匀2~8 $^{\circ}$ C静置40min,判定结果时将反应板倾斜45 $^{\circ}$,红细胞完全沉淀到孔底中心呈泪珠样流淌为HI阳性,红细胞均匀分布在孔底不流动者为HI阴性,完全抑制红细胞凝集的最高稀释倍数为待检血清的HI抗体效价。
9. 根据权利要求1所述的鸡传染性支气管炎灭活疫苗的效力检验方法,其特征在于,加强免疫后的血清的HI抗体几何平均滴度较首次免疫的血清HI抗体几何平均滴度高3倍以上时,疫苗判为合格。
10. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述方法在鸡传染性支气管炎疫苗的质量控制中的应用。
11. 根据权利要求10所述方法,其特征在于,所述疫苗的质量控制包括攻毒保护率与产蛋效能的控制。

鸡传染性支气管炎疫苗的效力检验方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种鸡传染性支气管炎灭活疫苗的效力检验方法及其应用,属于生物技术领域。

背景技术

[0002] 鸡传染性支气管炎 (Infectious bronchitis, IB) 是由鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus, IBV) 引起的鸡的急性、高度接触性传染病,临床主要表现为咳嗽、气管啰音、打喷嚏、肾脏病变、产蛋鸡群产蛋量及蛋品质下降。各种日龄、性别和品种的鸡对该病都有易感性,以 6 周龄以下的雏鸡更易感染。没有获得母源抗体的雏鸡感染 IBV 后可引起永久性的输卵管损伤,到性成熟丧失产蛋能力。产蛋鸡群感染 IBV 后导致产蛋量下降,蛋形不整、畸形和质量低下,受精率降低,IB 还使鸡的增重和饲料报酬降低。多年来 IB 给我国的养鸡业带来极大的经济损失,因此对该病的预防也越来越重要。

[0003] 目前在生产中广泛应用灭活疫苗免疫是控制鸡传染性支气管炎的有效办法。检验疫苗效力的方法有攻毒保护试验、鸡产蛋效能实验、利用鸡胚或者气管环组织培养进行病毒分离试验等。上述实验所需时间较长,可控性差,评价结果时常因使用的动物级别不同,检验结果也常有误差。本发明可用检测 HI (血球凝集抑制) 抗体效价的方法代替本动物攻毒试验,结果准确、重复性强、操作简单、时间短,具有普遍推广的意义。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的主要目的在于提供一种鸡传染性支气管炎灭活疫苗的效力检验方法,包括如下步骤:

[0005] 1) 用鸡传染性支气管炎活疫苗首次免疫鸡,免疫 14~28 日后采血分离血清,用鸡传染性支气管炎灭活疫苗加强免疫 1 次,21~35 日后采血并分离血清。

[0006] 2) 分别测定两次血清的血球凝集抑制效价,以两次血球凝集抑制效价之比判断疫苗的效力。

[0007] 优选地,本发明所述鸡传染性支气管炎活疫苗首次免疫方法为点眼或滴鼻免疫。

[0008] 更优选地,本发明所述鸡传染性支气管炎活疫苗首次免疫方法为点眼免疫。

[0009] 优选地,本发明所述首免的免疫量为 1 羽份,每羽份病毒含量 $\geq 10^{3.5} \text{EID}_{50}$ 。

[0010] 优选地,本发明所述鸡传染性支气管炎灭活疫苗加强免疫方法为皮下注射或肌肉注射。

[0011] 更优选地,本发明所述鸡传染性支气管炎灭活疫苗加强免疫方法为肌肉注射。

[0012] 优选地,本发明所述加强免疫的免疫量为 1 羽份,每羽份的量为 0.3ml~0.8ml。

[0013] 更优选地,本发明所述加强免疫的免疫量为 0.5ml/羽。

[0014] 优选地,本发明所述加强免疫在首次免疫后 14~28 日。

[0015] 更优选地,本发明所述加强免疫在首次免疫后 21 日

[0016] 优选地,本发明所述血球凝集抑制效价之比为血球凝集抑制效价的几何平均滴度

之比。

[0017] 优选地,本发明所述血球凝集抑制效价的测定方法,包括如下步骤:

[0018] 1) 鸡传染性支气管炎血球凝集试验

[0019] HA(血球凝集)抗原二倍系列稀释。将 25 μ l 红细胞悬液加入含有 25 μ l 稀释抗原的反应孔内,充分振荡,在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 静置 40min,判定结果时将反应板倾斜与水平呈 45 $^{\circ}$ 角,对照孔内和 HA 阴性孔的红细胞完全沉淀到孔底中心,呈泪珠样流淌;HA 阳性孔的红细胞均匀分布在孔底或呈锯齿样凝集。使红细胞凝集的最大稀释倍数为该抗原的 HA 效价;

[0020] 2) 血清样品的处理

[0021] 将血清样品置于 56 $^{\circ}$ C 水浴中灭活 30min,2000r/min 离心 10min,取上清待检;

[0022] 3) 鸡传染性支气管炎血球凝集抑制试验

[0023] 在 96 孔 V 型微量反应板,每行第 2 孔开始,每孔加入 25 μ l 稀释液至 12 孔,分别在 1、2 和 12 孔加入待检血清 25 μ l,从第 2 孔开始倍比稀释血清至第 10 孔,弃去 25 μ l。向 1 ~ 11 孔加入 4HA 单位抗原 25 μ l,充分振荡,置室温 30min。每孔加入 1% V/V 鸡红细胞悬液 25 μ l,轻轻混匀 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 静置 40min。判定结果时将反应板倾斜 45 $^{\circ}$,红细胞完全沉淀到孔底中心呈泪珠样流淌为 HI 阳性;红细胞均匀分布在孔底不流动者为 HI 阴性。完全抑制红细胞凝集的最高稀释倍数为待检血清的 HI 抗体效价。

[0024] 优选地,本发明所述加强免疫后的血清的 HI 抗体几何平均滴度较首次免疫的血清 HI 抗体几何平均滴度高 3 倍以上时,疫苗判为合格。

[0025] 本发明的另一方面在于本发明所述鸡传染性支气管炎灭活疫苗的效力检验方法在鸡传染性支气管炎灭活疫苗的质量控制中的应用。

[0026] 优选地,本发明所述疫苗的质量控制包括攻毒保护率与产蛋效能的控制。

[0027] 技术效果

[0028] 首先,本发明采用了测定血清中血球凝集抑制效价的方法来评价疫苗的免疫效力。该方法大大缩短了测定时间,操作误差小,可控性强,批间差异小,同时也减少了用动物攻毒保护试验来检验效力时常常因为实验动物级别不同,检测结果常有的误差。

[0029] 其次,本发明的血球凝集抑制效价的测定方法简便、快速、具有特异性强等特点,可用于疫苗免疫效力检验。IB 抗体检测方法主要包括病毒中和试验、琼脂扩散试验、血球凝集/血球凝集抑制试验和 ELISA 抗体检测试剂盒,国外相关试剂盒价格昂贵,且国内尚无可用于临床检测灭活苗抗体的试剂盒。为快速准确进行疫苗免疫效力检测,本发明建立了鸡传染性支气管炎病毒血球凝集/血球凝集抑制试验方法,该方法具有特异性和敏感性。

[0030] 再次,本发明测定血清中血球凝集抑制效价的方法是通过两次免疫,两次采血两次测定血清中血球凝集抑制效价的方法,通过对两次效价的比较,特别是通过两次血球凝集抑制效价的几何平均滴度之比,来判断疫苗的免疫效力。该方法比现有技术仅免疫一次或测定一次血球凝集抑制效价的方法,误差更小,批间差异更小,试验结果更加准确。

[0031] 最后,本发明检测方法可直接应用于鸡传染性支气管炎灭活疫苗的质量控制中,通过建立血球凝集抑制效价与攻毒保护率和产蛋效能的关系,直接评价疫苗的质量对家鸡养殖的重要指标的影响程度,尤其是对鸡传染性支气管炎的防治率与产蛋率进行了研究,对现实生产有重要的指导意义。

具体实施方式

[0032] 本发明实施例中,检测了鸡传染性支气管炎灭活疫苗,本发明还试验了其他类型的鸡传染性支气管炎灭活疫苗,如亚单位灭活疫苗、基因工程灭活疫苗等,其免疫鸡后均能引起抗原抗体免疫反应,同样可以使用本发明之检测方法判定其疫苗的效力。

[0033] 本发明实施例中,检测了两次免疫两次采血两次血清凝集效价,超过两次以上的免疫,采用前两次的血清凝集效价结果进行评价。

[0034] 本发明实施例中,两次疫苗的血清凝集效价之比是通过计算几何平均滴度之比来确定的,其他常用的效价统计方法也可以做为疫苗效力的评价标准。

[0035] 本发明试验了使用下述步骤的鸡传染性支气管炎灭活疫苗的效力检验方法:

[0036] 1) 用鸡传染性支气管炎活疫苗首次免疫鸡,免疫 14~28 日后采血分离血清,用鸡传染性支气管炎灭活疫苗加强免疫 1 次,21~35 日后采血并分离血清。

[0037] 2) 分别测定两次血清的血球凝集抑制效价,以两次血球凝集抑制效价之比判断疫苗的效力。

[0038] 本发明鸡传染性支气管炎活疫苗首次免疫方法为点眼或滴鼻免疫。

[0039] 本发明首免的免疫量为 1 羽份,每羽份病毒含量 $\geq 10^{3.5} \text{EID}_{50}$ 。

[0040] 本发明实施例中鸡传染性支气管炎灭活疫苗加强免疫方法为皮下注射或肌肉注射。

[0041] 本发明加强免疫的免疫量为 1 羽份,每羽份的量为 0.3ml~0.8ml。

[0042] 本发明加强免疫在首次免疫后 14~28 日。

[0043] 优选地,本发明实施例中加强免疫在首次免疫后 21 日

[0044] 本发明试验了血球凝集抑制效价的测定方法,包括如下步骤:

[0045] 1) 鸡传染性支气管炎血球凝集 (HA) 试验

[0046] HA 抗原二倍系列稀释。将 25 μ l 红细胞悬液加入含有 25 μ l 稀释抗原的反应孔内,充分振荡,在 2~8 $^{\circ}$ C 静置 40min,使红细胞凝集的最大稀释倍数为该抗原的 HA 效价。

[0047] 2) 血清样品的处理

[0048] 将血清样品置于 56 $^{\circ}$ C 水浴中灭活 30min,2000r/min 离心 10min,取上清待检。

[0049] 3) 鸡传染性支气管炎血球凝集 (HI) 抑制试验

[0050] 待检血清系列倍比稀释,加 4HA 单位凝集抗原 2~8 $^{\circ}$ C 作用 30min,加等体积红细胞悬液 2~8 $^{\circ}$ C 静置 40min,完全抑制红细胞凝集的待检血清最高稀释倍数为其血球凝集抑制效价。结果判定时应注意,必须在抗原对照孔 (第 11 孔) 中红细胞完全凝集而血清对照孔 (第 12 孔) 中的红细胞完全不凝集时才有效。

[0051] 该血球凝集抑制效价的测定方法简便、快速、具有特异性强等特点,可用于疫苗免疫效力检验。IB 抗体检测方法主要包括病毒中和试验、琼脂扩散试验、血球凝集/血球凝集抑制试验和 ELISA 抗体检测试剂盒,国外相关试剂盒价格昂贵,且国内尚无可用于临床检测灭活苗抗体的试剂盒。为快速准确进行疫苗免疫效力检测,我们建立了鸡传染性支气管炎病毒血球凝集/血球凝集抑制试验方法,该方法具有特异性和敏感性。

[0052] 为使本发明更加容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围,下列实施例中未提及的具体实验方法,通常按照常规实验方法进行。

[0053] 实施例 1

[0054] 鸡传染性支气管炎灭活疫苗的效力检验方法

[0055] 一. 疫苗免疫

[0056] 用 3 周龄 SPF 鸡 10 只, 点眼接种鸡传染性支气管炎活疫苗 (H_{120} 毒株) 1 羽份 ($10^{3.5}EID_{50}$), 21 日后分别采血, 分离血清, 各用鸡传染性支气管炎灭活疫苗加强免疫接种 (肌肉注射) 1 羽份 (0.5ml), 28 日后分别采血, 分离血清。将两次血清分别测 HI 抗体效价。

[0057] 二. 鸡传染性支气管炎血球凝集抑制 (HI) 试验

[0058] 1. 鸡传染性支气管炎 HI 抗原血球凝集价测定

[0059] (1) 吸取 25 μ l 浓度为 0.01mol/L pH 为 7.2 的 PBS, 加到 V 型微量反应板各孔;

[0060] (2) 取 25 μ l 鸡传染性支气管炎血球凝集抑制抗原加入反应板第一孔中, 并做 4 个孔重复;

[0061] (3) 将 25 μ l 病毒抗原在反应板上横向作 2 倍倍比稀释;

[0062] (4) 各孔加入 25 μ l 的 1% (V/V) 鸡红细胞;

[0063] (5) 用微量振荡器混匀, 4 $^{\circ}$ C 作用 40min。直到红细胞对照孔完全沉淀为止。以使 100% 红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点, 表示一个血球凝集单位 (1HA 单位)。

[0064] 2. 4HA 单位抗原的配制

[0065] 根据测定的抗原血球凝集 (HA) 效价, 用 PBS 配制 4HA 单位抗原:

[0066] (1) 将配置好的 4HA 单位抗原用 PBS 稀释, 使 4HA 单位抗原的稀释度为 1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6、1 : 7;

[0067] (2) 在每一稀释度的 25 μ l 抗原中加 25 μ l PBS;

[0068] (3) 再加入 1% (V/V) 鸡红细胞悬液 25 μ l, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 静置 40min 后判定结果;

[0069] (4) 结果判定

[0070] 如果 1 : 4 稀释为 100% 红细胞凝集终点, 表明配制的是 4HA 单位抗原; 如果 100% 红细胞凝集终点是 1 : 5 或 1 : 6 则表明配制的 4HA 单位抗原实际上是高于 4 个单位; 如果 100% 红细胞凝集终点是 1 : 2 或 1 : 3 则表明配制的 4HA 单位抗原实际上是低于 4 个单位。应当适当的调整使抗原工作液为 4HA 单位。

[0071] 3. 血球凝集抑制试验

[0072] (1) 取 96 孔 V 型微量反应板, 每孔加入 25 μ l PBS;

[0073] (2) 分别吸取 25 μ l 待检血清, 加至每块板的第一排各相应孔内, 并在每块板上设标准阳性血清和阴性血清对照, 然后 2 倍系列稀释;

[0074] (3) 分别向各孔中加入含 4HA 单位的抗原 25 μ l, 4 $^{\circ}$ C 静置 30min;

[0075] (4) 每孔加入 1% 鸡红细胞悬液 25 μ l, 轻轻混匀, 4 $^{\circ}$ C 静置 40min;

[0076] (5) 结果判定

[0077] 将反应板倾斜, 凡血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以同样速度从孔底流淌者判为血球凝集抑制。当阴性血清 HI 效价 $\leq 3\log_2$ 、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差 $\leq 1\log_2$ 时, 实验方可成立。

[0078] 三. 疫苗评价

[0079] 以完全抑制 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 效价。若二免血清的 HI 抗体几何平均滴度较首免血清 HI 抗体几何平均滴度高 3 倍以上时, 疫苗判为合格。

[0080] 实施例 2

[0081] 鸡传染性支气管炎灭活疫苗免疫实验动物的 HI 抗体价与攻毒保护率之间的平行关系

[0082] 用 3 批疫苗每批将 30 只 21 日龄的 SPF 鸡分为 3 组, 每组 10 只, 各点眼接种传染性支气管炎活疫苗 (H_{120} 毒株) 1 羽份 ($10^{3.5}EID_{50}$), 在正压隔离器里饲养观察 (同时设立不免疫对照组 10 只), 免疫后 21 日分别采血分离血清测 HI 抗体, 同时每只各肌肉注射鸡传染性支气管炎灭活疫苗加强免疫, 第一组 1 羽份 (0.5ml), 第二组 1/2 羽份 (0.25ml), 第三组 1/3 羽份 (0.17ml)。加强免疫 28 日后分别采血分离血清测 HI 抗体, 同时连同不免疫对照组分别用鸡传染性支气管炎 M_{41} 强毒每羽滴鼻攻毒 $10^{3.0}EID_{50}$, 作攻毒实验。

[0083] 一免、二免待检血清通过血球凝集抑制试验测定 HI, 以血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以同样速度从孔底流淌者判为血球凝集抑制, 且阴性血清 HI 效价 $\leq 3\log_2$ 、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差 $\leq 1\log_2$, 以完全抑制 4HA 单位抗原的血清为最高稀释度作为 HI 效价。结果如下表 1。

[0084] 攻毒后在负压隔离器中饲养观察, 4 天后采集每只鸡的气管拭子, 置 3ml 含抗生素的肉汤中。每份样品经尿囊腔接种 19 日龄 SPF 鸡胚 5 枚, 每胚接种 0.2ml, 分离病毒。5 个鸡胚中至少有 2 个鸡胚出现鸡传染性支气管炎特异性病变判为病毒分离阳性。结果如下表 1。

[0085] 表 1 鸡传染性支气管炎灭活疫苗不同免疫剂量免疫抗体与攻毒保护率相关性

组别	首免剂量	二免剂量 (ml)	首免抗体价	二免抗体价	二免抗体效价比首免的倍数	攻毒后病毒分离率
0401	每羽点眼接种	0.5	1:30.6	1:110.2	3.6	0/10
	H_{120} 毒株 1 羽份	0.25	1:26.4	1:74.2	2.8	1/10
	($10^{3.5}EID_{50}$)	0.17	1:26.8	1:58.8	2.2	3/10
[0086] 0402	每羽点眼接种	0.5	1:31.2	1:140.4	4.5	0/10
	H_{120} 毒株 1 羽份	0.25	1:30.6	1:91.8	3.0	1/10
	($10^{3.5}EID_{50}$)	0.17	1:28.8	1:69.2	2.4	2/10
0403	每羽点眼接种	0.5	1:32.0	1:105.4	3.3	0/10
	H_{120} 毒株 1 羽份	0.25	1:28.4	1:71.2	2.5	1/10
	($10^{3.5}EID_{50}$)	0.17	1:27.4	1:57.5	2.1	3/10
对照	——	——	——	——	——	10/10

[0087] 注: 攻毒后病毒分离率为病毒阳性数 / 每组总数

[0088] 由以上实验结果可知使用 0.5ml/羽剂量作二免的 SPF 鸡的二免抗体效价的几何平均值是首免抗体效价的几何平均值的 3.3 ~ 4.5 倍, 攻毒后全部 SPF 鸡的气管内未能分离出病毒 (0/10); 使用 0.25ml/只和 0.17ml/只作二免的 SPF 鸡的二免抗体效价的几何平均值是首免抗体效价的几何平均值的 3 倍以下, 攻毒后在气管内均能分离出病毒; 对照组攻毒后全部 SPF 鸡的气管内都分离出病毒 (10/10)。由此可见, 使用 0.5ml/羽的剂量免疫, 攻毒保护率为 100%, 证明疫苗合格; 二免抗体效价的几何平均值是首免抗体效价的几

何平均值的 3.3 ~ 4.5 倍大于 3 倍,也说明疫苗合格。免疫剂量减少时,同样符合这个规律。因此,鸡传染性支气管炎灭活疫苗免疫实验动物的 HI 抗体价与攻毒保护率之间的平行关系。

[0089] 实施例 3

[0090] 鸡传染性支气管炎灭活疫苗免疫实验动物的 HI 抗体价与产蛋效能之间的平行关系

[0091] 用 3 批疫苗,每批分 5 组,每组用 30 只 143 日龄非免疫鸡,按照下列方法进行分组实验。

[0092] A 组 :不免疫接种 ;

[0093] B 组 :164 日龄时每只鸡皮下接种灭活苗 0.8ml ;

[0094] C 组 :先于 143 日龄时各滴鼻接种鸡传染性支气管炎活疫苗 (H_{120})1 羽份 ($10^{3.8}EID_{50}$),21 日龄后采血,分离血清,测 HI 抗体计算 HI 抗体几何平均滴度,然后于 164 日龄时各皮下注射灭活疫苗 0.8ml ;

[0095] D 组 :于 143 日龄时滴鼻接种鸡传染性支气管炎活疫苗 (H_{120})1 羽份 ($10^{3.8}EID_{50}$) ;

[0096] E 组 :不接种疫苗,作为对照。

[0097] 根据分离血清测定 HI 抗体效价,并计算出各组试验鸡的 HI 抗体几何平均滴度,结果如下表 2。

[0098] 表 2 各实验组产蛋鸡攻毒前 IB HI 抗体效价

[0099]	疫苗 批号	分 组	数 量	免疫方法	首免 HI 抗体	二免 HI 抗 体	二免抗体 效价比首 免倍数
	0401	A	30	不免疫	1:1.7	——	

		B	30	每羽皮下注射 0.8ml 每羽先接种 H ₁₂₀ 毒株 1	1:25.6	—	
		C	30	羽份 (10 ^{3.8} EID ₅₀), 21 日后加强免疫 0.8ml	1:30.6	1:104.2	3.4
		D	30	每羽接种 H ₁₂₀ 毒株 1 羽 份 (10 ^{3.8} EID ₅₀)	1:26.4	—	
		E	30	不免疫	1:2.65	—	
		A	30	不免疫	1:1.2	—	
		B	30	每羽皮下注射 0.8ml 先接种 H ₁₂₀ 毒株 1 羽份	1:26.8	—	
[0100]	0402	C	30	(10 ^{3.8} EID ₅₀), 21 日后 加强免疫 0.8ml	1:32.0	1:147.2	4.6
		D	30	每羽接种 H ₁₂₀ 毒株 1 羽 份 (10 ^{3.8} EID ₅₀)	1:30.6	—	
		E	30	不免疫	1:2.85	—	
		A	30	不免疫	1:1.6	—	
		B	30	每羽皮下注射 0.8ml 每羽先接种 H ₁₂₀ 毒株 1	1:24.2	—	
	0403	C	30	羽份 (10 ^{3.8} EID ₅₀), 21 日后加强免疫 0.8ml	1:28.8	1:92.2	3.2
		D	30	每羽接种 H ₁₂₀ 毒株 1 羽 份 (10 ^{3.8} EID ₅₀)	1:30.2	—	
		E	30	不免疫	1:1.95	—	

[0101] 上述 5 组中 A、B、C、D 组试验鸡于 192 日龄时每羽各滴鼻攻毒鸡传染性支气管炎病毒 M₄₁ 株强毒 10^{3.0}EID₅₀, E 组不接强毒, 作为空白对照。

[0102] 上述各组试验鸡分别隔离饲养, 从产蛋高峰开始, 监控所有鸡的鸡蛋产量和质量, 直至攻毒后 4 周。根据二免 HI 抗体几何平均滴度和产蛋鸡免疫效能的平行关系, 从而判断鸡传染性支气管炎灭活疫苗效力合格的 HI 抗体几何平均滴度的标准。结果如下表 3 所示。

[0103] 表 3 各试验组鸡攻毒前后的产蛋效能

[0104]

疫苗批号	分组	数量	免疫方法	攻毒剂量方法	攻毒前产蛋率	攻毒后 2-4 周内产蛋效能		
						产蛋率(%)	下降率(%)	产蛋品质

[0105]

0401	A	30	不免疫	每羽滴鼻攻 毒 IBV M ₄₁ 10 ^{3.0} EID ₅₀	84	47	37	有畸形蛋、 软壳蛋
	B	30	每羽皮下注射 0.8ml		82	72	10	有畸形蛋
	C	30	每羽先接种 H ₁₂₀ 毒株 1 羽份 (10 ^{3.8} EID ₅₀), 21 日后加强免 疫 0.8ml		83	82	1	正常
	D	30	每羽接种 H ₁₂₀ 毒株 1 羽份 (10 ^{3.8} EID ₅₀)		84	77	7	有畸形蛋
	E	30	不免疫	不攻毒	84	84	0	正常
0402	A	30	不免疫	每羽滴鼻攻 毒 IBV M ₄₁ 10 ^{3.0} EID ₅₀	83	48	35	有畸形蛋、 软壳蛋
	B	30	每羽皮下注射 0.8ml		83	74	9	有畸形蛋
	C	30	先接种 H ₁₂₀ 毒 株 1 羽份 (10 ^{3.8} EID ₅₀), 21 日后加强免 疫 0.8ml		84	83.5	0.5	正常
	D	30	每羽接种 H ₁₂₀ 毒株 1 羽份 (10 ^{3.8} EID ₅₀)		83	77	6	有畸形蛋
	E	30	不免疫	不攻毒	82	82	0	正常
0403	A	30	不免疫	每羽滴鼻攻 毒 IBV M ₄₁ 10 ^{3.0} EID ₅₀	84	44	40	有畸形蛋、 软壳蛋
	B	30	每羽皮下注射 0.8ml		83	70	13	有畸形蛋
	C	30	每羽先接种 H ₁₂₀ 毒株 1 羽份 (10 ^{3.8} EID ₅₀), 21 日后加强免 疫 0.8ml		83	83	0	正常
	D	30	每羽接种 H ₁₂₀ 毒株 1 羽份 (10 ^{3.8} EID ₅₀)		82	76	6	有畸形蛋
	E	30	不免疫	不攻毒	83	83	0	正常

[0106] 实验结果表明:3 批疫苗的 C 组试验鸡,二免血清 HI 抗体效价几何平均值是首免血清 HI 抗体效价的几何平均值的 3.2 ~ 4.6 倍。3 批疫苗试验鸡 C 组攻毒后的产蛋效能

(产蛋率和产蛋质量),均明显高于D组。其中就产蛋率比较,0401批C组比D组高5%;0402批C组比D组高6.5%;0403批C组比D组高7.0%。B组鸡的产蛋量和质量显著高于A组,A组鸡的产蛋量与攻毒前的正常水平相比,下降35%~40%。由此可见,二免血清的HI抗体效价的几何平均值是首免血清HI几何平均值的3倍以上时,鸡只的产蛋下降率很低;一次免疫鸡只的产蛋有所下降并有畸形蛋出现;不免疫组攻毒后有畸形蛋和软壳蛋,产蛋下降率达到30%~40%。说明鸡传染性支气管炎灭活疫苗免疫实验动物的HI抗体价与产蛋效能之间的平行关系。

[0107] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	鸡传染性支气管炎疫苗的效力检验方法及其应用		
公开(公告)号	CN101957362A	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	CN201010273228.X	申请日	2010-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯生物工程有限公司		
[标]发明人	张许科 孙进忠 乔荣岑		
发明人	张许科 孙进忠 乔荣岑		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种鸡传染性支气管炎灭活疫苗的效力检验方法，同时本发明还可应用于疫苗的质量控制，具体包括攻毒保护率与产蛋效能的控制。实验证实该发明使用检测HI抗体效价的方法代替本动物攻毒试验，方法简便、快速、结果准确、重复性强、特异性强等特点，具有普遍推广的意义。

组别	首免剂量	二免剂量 (ml)	首免抗体价	二免抗体价	二免抗体效价比首免的倍数	攻毒后病毒分离率
0401	每羽点眼接种	0.5	1:30.6	1:110.2	3.6	0/10
	H ₁₂₀ 毒株 1 羽份	0.25	1:26.4	1:74.2	2.8	1/10
	(10 ^{3.5} EID ₅₀)	0.17	1:26.8	1:58.8	2.2	3/10
0402	每羽点眼接种	0.5	1:31.2	1:140.4	4.5	0/10
	H ₁₂₀ 毒株 1 羽份	0.25	1:30.6	1:91.8	3.0	1/10
	(10 ^{3.5} EID ₅₀)	0.17	1:28.8	1:69.2	2.4	2/10
0403	每羽点眼接种	0.5	1:32.0	1:105.4	3.3	0/10
	H ₁₂₀ 毒株 1 羽份	0.25	1:28.4	1:71.2	2.5	1/10
	(10 ^{3.5} EID ₅₀)	0.17	1:27.4	1:57.5	2.1	3/10
对照	—	—	—	—	—	10/10