



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109239342 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811221436.8

(22)申请日 2018.10.19

(71)申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 张国中 赵静 谢德琼 颜世红

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 黄爽

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54)发明名称

QX型IBV血凝抑制试验抗原及其制备方法与
应用

(57)摘要

本发明涉及QX型IBV血凝抑制试验抗原及其制备方法与应用。HI抗原的制备方法如下：将 $10^4 \sim 10^7$ EID₅₀ QX型IBV病毒株接种鸡胚，37℃孵育进行病毒增殖，36～48h取出鸡胚，2～8℃冷却6～16h，收集鸡胚尿囊液，经浓缩后与I型磷酸酯酶C混匀，37℃摇床作用2～2.5h后，于2～8℃放置21～35d即得。本发明提供的HI抗原和检测方法具有高特异性、高稳定性、高灵敏度、高效率的特点，可在2h内对临床血清样本进行快速检测，本发明可广泛应用于IB的检疫、诊断、免疫后抗体的检测，使HI方法检测QX型传染性支气管炎变得可行，为防治IB的发生提供实用的、科学的手段，以更好地指导养禽生产中对该病的防控。

1. 一种制备QX型IBV血凝抑制试验抗原方法,其特征在于,按照 $10^4 \sim 10^7$ EID₅₀的量将QX型IBV病毒株接种9~11日龄鸡胚,于37℃孵育进行病毒增殖,弃去24h内的死亡鸡胚,孵育36~48h后取出鸡胚,于2~8℃冷却6~16h,收集鸡胚尿囊液;鸡胚尿囊液经浓缩后与I型磷酸酯酶C混匀,I型磷酸酯酶C的终浓度为2.5U/mL,37℃摇床作用2~2.5h后,于2~8℃放置21~35d,即得HI抗原。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,鸡胚尿囊液的浓缩方法如下:无菌法收集鸡胚尿囊液,将鸡胚尿囊液8000rpm离心45~60min,取上清液;然后40000rpm离心2h,弃上清,沉淀用第一次离心后所得上清液体积1/200的生理盐水悬浮。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,鸡胚尿囊液经浓缩后与I型磷酸酯酶C混匀,I型磷酸酯酶C的终浓度为2.5U/mL,37℃200r/min摇床作用2~2.5h后,于2~8℃放置21~35d。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于,所述QX型IBV病毒株为SZ株。

5. 根据权利要求1-4任一项所述方法制备的QX型IBV血凝抑制试验抗原。

6. 权利要求6所述抗原在制备QX型IBV的HI检测试剂或试剂盒中的应用。

7. 含有权利要求6所述抗原的QX型IBV血凝抑制试验检测试剂或试剂盒。

QX型IBV血凝抑制试验抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体地说,涉及QX型IBV血凝抑制试验抗原制备方法与应用。

背景技术

[0002] 禽传染性支气管炎(Infectious Bronchitis,简称IB)是由传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus,简称IBV)引起的一种急性、高度接触性的呼吸系统和泌尿生殖系统疾病,典型临床特征为病鸡呼吸困难,气管啰音等呼吸道症状,QX型毒株会导致肾脏肿大苍白,呈“花斑肾”,进而引起鸡只死亡,雏鸡阶段感染该病还会对母鸡生殖系统造成永久性伤害。

[0003] 目前,大量公开报道表明,QX型(肾病变型)已代替Mass型成为国内IBV主要流行毒株类型,给养禽业带来了很大危害,所以QX型IB进行快速准确的监测和诊断对于控制疫情及调整免疫程序至关重要。国际上已经建立很多血清学诊断方法,其中间接血凝试验、病毒中和试验、间接荧光抗体技术等方法由于试验条件要求较高,应用受到了限制;琼脂扩散试验(AGP)、酶联免疫吸附试验(ELISA)等由于各自的局限性,导致重复性差,成本高,检测效果不理想,并不适合在基层实验室推广。

[0004] IBV抗体的HI试验检测是一种快速、敏感、特异、简便、实用的血清学检测方法。虽然目前国内外已成功制备了鸡传染性支气管炎病毒(M41株)血凝抑制试验抗原,但由于该毒株属于Mass型,与目前国内主要流行毒株(QX型)进化关系较远,导致生产实践检测中常表现假阴性,从而M41株血凝抑制试验抗原应用于临床检测中准确率大大下降。因此在养殖场中无法进行QX型IBV的检测,一旦发生疫情,就会造成巨大的损失且容易造成病毒的快速传播,从而引起更大的危害。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术的缺陷,为保证较高的IBV检出率和检测结果的准确性,针对目前国内主要流行毒株QX型IBV,研发出QX型IBV血凝抑制试验抗原,可广泛用于鸡传染性支气管炎疫苗的免疫检测及现场诊断。

[0006] 为了实现本发明目的,本发明提供一种制备QX型IBV血凝抑制试验抗原方法,按照 10^4 ~ 10^7 EID₅₀的量(优选 10^5 EID₃₅)将QX型IBV病毒株接种9~11日龄鸡胚(SPF鸡胚,每胚0.1~0.2mL),于37℃孵育进行病毒增殖,弃去24h内的死亡鸡胚,孵育36~48h后取出鸡胚,于2~8℃冷却6~16h,收集鸡胚尿囊液;鸡胚尿囊液经浓缩后与I型磷酸酯酶C(PLC1)混匀,I型磷酸酯酶C的终浓度为2.5U/mL,37℃摇床作用2~2.5h后,于2~8℃放置21~35d,即得抗原。收集的病毒尿囊液可直接进行浓缩或保存于-80℃冰箱中备用。

[0007] 前述的方法,鸡胚尿囊液的浓缩方法如下:无菌法收集鸡胚尿囊液,将鸡胚尿囊液8000rpm离心45~60min,取上清液;然后40000rpm离心2h,弃上清,沉淀用第一次离心后所得上清液体积1/200的生理盐水悬浮。

[0008] 鸡胚尿囊液经浓缩后与I型磷酸酯酶C混匀,I型磷酸酯酶C的终浓度为2.5U/mL,37℃摇床(优选200r/min)作用2~2.5h后,于2~8℃(优选4℃)放置21~35天。

[0009] PLC1感作的浓度过低,会导致处理不完全,PLC1浓度过高不会提升抗原HA效价,反而会增加成本。因此将使用浓度定为2.5U/mL。还应控制37℃恒温振荡器感作时间在2h,感作时间过长病毒粒子很容易处理过度,感作时间过短,则导致处理不完全。以上各种因素均会影响IBV-HI抗原的效价,因此需要对HI抗原的制备方法进行优化。PLC1感作2~2.5h后于2~8℃放置21~35天,即制得HI抗原。经过试验,抗原的HA效价会随放置时间的延长而逐渐升高,21天后达到效价最高并保持稳定,随后抗原储存在2~8℃备用。悬浮液一般采用生理盐水,加入量过大会造成抗原效价降低,因此将悬浮液的加入量定为第一次离心后所得上清液体积的1/200,保证抗原的效价较高。

[0010] 本发明中,用于制备所述QX型IBV血凝抑制试验抗原的病毒株优选为SZ株。有关SZ株可参见Yan S H,Chen Y,Zhao J,et al.Pathogenicity of a TW-Like Strain of Infectious Bronchitis Virus and Evaluation of the Protection Induced against It by a QX-Like Strain.Front Microbiol 2016;7:1653;或,Yan S,Liu X,Zhao J,et al.Analysis of antigenicity and pathogenicity reveals major differences among QX-like infectious bronchitis viruses and other serotypes.Vet Microbiol 2017;203:167-173;或者,Yan S,Zhao J,Xie D,et al.Attenuation,safety,and efficacy of a QX-like infectious bronchitisvirus serotype vaccine[J].Vaccine,2018.

[0011] 本发明提供按照所述方法制备的QX型IBV血凝抑制试验抗原。

[0012] 本发明提供利用所述QX型IBV血凝抑制试验抗原进行血凝实验(HA)的方法。

[0013] 本发明还提供所述QX型IBV的HI抗原在血凝抑制实验中的应用。

[0014] 本发明还提供含有所述QX型IBV抗原的血凝抑制试验检测试剂或试剂盒。

[0015] 本发明进一步提供上述血凝抑制抗原在检测IBV血清抗体效价中的应用。

[0016] 包括以下步骤:

[0017] (1) IBV-HI抗原HA试验操作方法:

[0018] ①在96孔微量反应板上进行,从第1孔至第12孔,各孔加25μL生理盐水。

[0019] ②于左侧第1孔加25μL HI抗原,混合均匀后,吸25μL至第2孔,依次倍比稀释至第12孔,吸弃25μL。

[0020] ③自右至左依次向各孔加入0.5%新鲜鸡红细胞悬液25μL,在振荡器上振荡30s,置2~8℃作用45分钟,观察结果。

[0021] ④结果判定:微量板倾斜45度,待对照孔红细胞已沉淀即可进行结果观察。红细胞全部凝集,沉于孔底,平铺呈网状,记为完全凝集,不凝集者红细胞沉于孔底,倾斜流淌呈泪状。以完全凝集的病毒最大稀释度为该抗原的HA效价。

[0022] (2) IBV-HI工作抗原的配制:

[0023] 根据测定的自制HI抗原的HA效价,用生理盐水配制4HA单位抗原。例如,若HA抗原凝集价测定结果为1:64,则4个HA单位为1:16,这时可将抗原用生理盐水稀释16倍,即成4HA单位的工作抗原液。

[0024] 4HA抗原的验证:

[0025] 在96孔微量反应板上进行,从第1孔至第4孔,各孔加25μL生理盐水。于左侧第1孔

加25μL 4单位抗原,混合均匀后,吸25μL至第2孔,依次倍比稀释至第4孔,吸弃25μL。将配制好的4单位抗原稀释成1:2,1:4,1:8,1:16,再加入0.5%新鲜鸡红细胞悬液25μL,混匀,置2~8℃作用45分钟,观察结果。如果1:4稀释为红细胞完全凝集终点,则表示4HA单位抗原配制成功。

[0026] (3) IBV-HI试验血清处理方法:

[0027] 将标准阳性血清、标准阴性血清及待检血清用生理盐水稀释成1:10待检。

[0028] (4) IBV-HI试验操作方法:

[0029] ①在96孔微量反应板上进行,从第1孔至第12孔,各孔加25μL生理盐水。

[0030] ②分别吸取25μL待检血清,加至每块板的第一排的第1孔,并在每块板上设立标准阳性血清和阴性血清对照,然后做2倍系列稀释。

[0031] ③分别向各孔加入25μL 4HA单位抗原,在微量振荡器上震荡30秒,室温下反应30分钟。

[0032] ④自右至左依次向各孔加入0.5%新鲜鸡红细胞悬液25μL,在振荡器上振荡30秒,置作用45分钟,观察结果。

[0033] ⑤结果判定:微量板倾斜45度,凡血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以相同速度从孔底流淌呈泪状判为血凝抑制。当阴性血清HI抗体效价不高于1:4、阳性与阴性血清HI抗体效价与已知效价相比误差不高于1个滴度时,试验方可成立。以抑制凝集(完全不凝集)的被检血清最大稀释度为该血清的血凝抑制效价,即HI效价。

[0034] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0035] (一)制备HI试验抗原优选采用毒株IBV SZ株,属于QX型,与国内流行毒株序列同源性较高,更符合目前国内市场及生产需求。

[0036] (二)制备的HI抗原保存于2℃~8℃,待效价上升后至少维持6个月,表明该抗原具有较好的稳定性。

[0037] (三)该HI试验抗原对SPF鸡血清、H5、H7和H9亚型禽流感阳性血清,NDV、EDS-76、Yucaipa阳性血清均呈阴性反应,表明该方法具有良好的特异性。

[0038] (四)该HI试验抗原与其他7株[YN株(YN-like)、GD(TW-like)、M41株(M41-like)、4/91株(4/91-like)、Hotal株、Gray株、Conn株]IBV特异性阳性血清进行HI试验,HI效价各不相同,表明据此可分辨各毒株不同血清型。

[0039] (五)本方法制得的QX型传染性支气管炎HI抗原,使得用HI试验方法检测QX型IBV变得可行,提高了其检测的可信度和可操作性。

[0040] (六)本方法采取的血清处理方法,提高了用HI试验方法检测QX型IBV的准确性和可信度。

[0041] (七)本发明制备的HI抗原及建立的HI方法主要用于IB的诊断和疫苗免疫后抗体的监测,具有高特异性、高灵敏度、高效率、低成本的特点,可在2小时内对临床血清样本进行快速检测,克服了传统检测方法耗时较长的缺点,便于在基层推广,为IBV的早期快速诊断以及分子流行病学调查研究提供了可靠的技术手段。

附图说明

[0042] 图1为本发明实施例2中制备传染性支气管炎病毒(SZ株)血凝抑制试验抗原的2~

8℃最佳放置时间结果。

[0043] 图2为本发明实施例5中HI抗原HA效价稳定性测定结果曲线图。

[0044] 图3为本发明实施例11中SZ株与IBV目前国内流行株和常用疫苗株的遗传进化树(根据S1基因序列绘制),图中●显示不同基因型的IBV代表性毒株,用于对不同型IBV阳性血清的检测。

[0045] 图4为本发明实施例11中攻毒后鸡体剖检照片。

[0046] 图5为本发明实施例11中攻毒后鸡体病理组织学损伤情况。

具体实施方式

[0047] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0048] 以下实施例中选用的生物材料如下:禽流感病毒(H5、H7和H9)阳性血清、新城疫病毒(Lasota和Yucaipa)阳性血清、减蛋综合征病毒阳性血清,IBV SZ株(QX-like)、YN株(YN-like)、GD(TW-like)、M41株(M41-like)、4/91株(4/91-like)、Hotal株、Gray株、Conn株等阳性血清,均由中国农业大学动物医学院保藏和提供。

[0049] 实施例1 IBV SZ株病毒液的制备和浓缩

[0050] (1) IBV SZ株的繁殖:将-80℃保存的IBV SZ株尿囊通过尿囊腔途径,按照 10^5 EID₅₀的量接种9~11日龄SPF鸡胚,0.2mL/胚。置37℃恒温孵化箱中孵育,每6小时观察一次,弃去24小时内的死亡胚,孵育36小时后取出鸡胚,于4℃冷却10小时,无菌收集鸡胚尿囊液,收集的病毒尿囊液使用或保存于-80℃冰箱中备用。

[0051] (2) IBV SZ株的浓缩:将IBV病毒尿囊液8000rpm离心45min,取上清;用高速离心机40000rpm离心2小时,弃上清,沉淀用第一次离心后IBV病毒液(上清液)体积1/200的缓冲液(生理盐水)悬浮,即对病毒进行200倍浓缩。

[0052] 实施例2 I型磷酸酯酶C(PLC1)作用时间的摸索

[0053] IBV SZ株血凝抑制抗原的制备:将200倍浓缩的IBV病毒液加入I型磷酸酯酶C(PLC1),使PLC1的终浓度为2.5U/mL,并充分混匀,再将病毒液置37℃恒温振荡200r/min感作2小时,取出4℃放置数天处理,每隔3天,测定抗原的血凝效价,检测结果发现PLC1处理后的IBV QX型SZ株浓缩抗原HA效价随4℃放置时间的不同有所升高(图1),21~35天后HA效价最高且保持稳定,即得IBV-HI抗原。血凝效价测定结果如表1所示(21天~35天效价达1:256):

[0054] 表1不同处理时间IBV SZ株血凝抑制抗原血凝效价

[0055]

4℃处理时间 (天)	1d	3d	6d	9d	12d	15d	18d	21d	24d	27d	30d	35d
HA 效价	1:2	1:8	1:16	1:32	1:32	1:64	1:128	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256

[0056] 实施例3 IBV SZ株HI抗原HA试验最佳反应温度和时间优化

[0057] 利用实施例1和2制备的抗原,参照实施例确定的条件对IBV SZ株HI抗原HA试验最

佳反应温度和时间的优化操作方法如下：

[0058] IBV-HI抗原HA试验操作：

[0059] ①在96孔微量反应板上进行，从第1孔至第12孔，各孔加25μL生理盐水。

[0060] ②于左侧第1孔加25μL实施例1制得的HI抗原，混合均匀后，吸25μL至第2孔，依次倍比稀释至第12孔，吸弃25μL。

[0061] ③自右至左依次向各孔加入0.5%新鲜鸡红细胞悬液25μL，在振荡器上振荡30s。

[0062] 然后将血凝板分别放置在不同条件下，置2~8℃作用30分钟；置2~8℃作用45分钟；置室温作用30分钟；置室温作用45分钟；置37℃作用30分钟；置37℃作用45分钟；观察结果。

[0063] ④结果判定：微量板倾斜45度，待对照孔红细胞已沉淀即可进行结果观察。红细胞全部凝集，沉于孔底，平铺呈网状，记为完全凝集，不凝集者红细胞沉于孔底，倾斜流淌呈泪状。以完全凝集的抗原最大稀释度为该抗原的HA效价。

[0064] 结果显示在2~8℃作用45分钟条件下，HA效价最高为1:256，其他条件下HA效价为1:128。因此确定HA试验的最佳反应温度为2~8℃，反应时间为45分钟。

[0065] 实施例4 IBV SZ株HI抗原HA试验及HI试验最佳反应红细胞浓度的优化

[0066] 利用实施例1和2制备的抗原，参照实施例3的条件对IBV SZ株HI抗原HA试验及HI试验最佳反应红细胞浓度的优化具体方法如下：

[0067] ①在96孔微量反应板上进行，从第1孔至第12孔，各孔加25μL生理盐水。

[0068] ②于左侧第1孔加25μL实施例1制得的HI抗原，混合均匀后，吸25μL至第2孔，依次倍比稀释至第11孔，吸弃25μL，每行的第12孔均做对照。

[0069] ③自右至左加入新鲜鸡红细胞悬液25μL，每块96孔板第1、2行加入0.3%、第3、4行加入0.5%、第5、6行加入0.8%、第7、8行加入1%，在振荡器上振荡30s，重复3块96孔板。

[0070] 然后将血凝板放置在血凝板置2~8℃作用45分钟；观察结果。

[0071] 结果显示在2~8℃作用45分钟条件下，选择0.5%新鲜红细胞在判定结果时更容易准确地观察结果，故本发明HA与HI的红细胞浓度为0.5%。

[0072] 实施例5 IBV SZ株HI抗原稳定性的测定

[0073] 利用实施例1和2制备的抗原，参照实施例3和4确定的条件IBV-HI抗原稳定测定不同的时间段测定抗原的HA滴度检测SZ株抗原的稳定性。

[0074] 利用实施例3和4确定的条件，在2~8℃保存的抗原21-35天达到最高效价后每隔一星期测定HI抗原的HA效价。

[0075] IBV-HI抗原稳定性试验操作：

[0076] ①在96孔微量反应板上进行，从第1孔至第12孔，各孔加25μL生理盐水。

[0077] ②于左侧第1孔加25μL实施例1制得的HI抗原，混合均匀后，吸25μL至第2孔，依次倍比稀释至第12孔，吸弃25μL。

[0078] ③自右至左依次向各孔加入0.5%新鲜鸡红细胞悬液25μL，在振荡器上振荡30s。然后将血凝板置2~8℃作用45分钟；观察结果。

[0079] ④结果判定：微量板倾斜45度，待对照孔红细胞已沉淀即可进行结果观察。红细胞全部凝集，沉于孔底，平铺呈网状，记为完全凝集，不凝集者红细胞沉于孔底，倾斜流淌呈泪状。以完全凝集的抗原最大稀释度为该抗原的HA效价。

[0080] 结果显示在2~8℃保存的抗原21~35天达到最高效价后每隔一星期测定HI抗原HA效价,连续测定6个月抗原效价稳定,HA效价未降低,抗原保存期至少6个月。

[0081] HI抗原HA效价稳定测定结果见图2。

[0082] 实施例6 IBV SZ株HI试验抗原抗体最佳结合温度和时间的优化

[0083] IBV-HI工作抗原的配制:

[0084] 利用实施例1和2制备的抗原,参照实施例3和4确定的条件,测定HI抗原的HA效价,用生理盐水配制4HA单位抗原。例如HA抗原凝集价测定结果为1:64,则4个HA单位为1:16,这时可将抗原用生理盐水稀释16倍,即成4HA单位的工作抗原液。

[0085] 4HA抗原的验证:

[0086] 在96孔微量反应板上进行,从第1孔至第4孔,各孔加25μL生理盐水。于左侧第1孔加4单位抗原25μL,混合均匀后,吸25μL至第2孔,依次倍比稀释至第4孔,吸弃25μL。将配制好的4单位抗原稀释成1:2,1:4,1:8,1:16,再加入0.5%新鲜鸡红细胞悬液25μL,混匀,置2~8℃作用45分钟,观察结果。如果1:4稀释为红细胞完全凝集终点,则表示4HA单位抗原配制成功。

[0087] IBV血凝抑制试验操作:

[0088] ①在96孔微量反应板上进行,从第1孔至第12孔,各孔加25μL生理盐水。

[0089] ②吸取25μL待检血清,加至第一排的第1孔,并在板上设立标准阳性血清和阴性血清对照,然后做2倍系列稀释。

[0090] ③分别向各孔加入25μL 4HA单位抗原,在微量振荡器上震荡30秒。

[0091] 然后将抗原抗体血凝板分别放置在不同条件下,置4℃作用30分钟;置4℃作用45分钟;置室温作用30分钟;置室温作用45分钟;置37℃作用30分钟;置37℃作用45分钟。

[0092] ④自右至左依次向各孔加入0.5%新鲜鸡红细胞悬液25L,在振荡器上振荡30秒置2~8℃作用45分钟,观察结果。

[0093] ⑤结果判定:微量板倾斜45度,凡血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以相同速度从孔底流淌呈泪状判为血凝抑制。当阴性血清HI抗体效价不高于1:4、阳性、阴性血清HI抗体效价与已知效价相比误差不高于1个滴度时,试验方可成立。以抑制凝集(完全不凝集)的被检血清最大稀释度为该血清的血凝抑制效价,即HI效价。

[0094] 结果显示,不同作用温度和时间,对于同一份阳性血清的HI抗体效价影响不大,抗原抗体在室温下作用30分钟与其他条件下得出的血清样品HI效价结果一致,室温下作用30分钟,能节省时间、操作更为简便,提高检测效率,因此选择室温下作用30分钟为最佳抗原抗体反应条件。

[0095] 实施例7 IBV SZ株HI试验中IBV血清样品前处理条件优化

[0096] 利用实施例1和2制备的抗原,参照实施例3、4和6的优化条件。分别对IBV阳性血清、IBV阴性血清进行不同方法处理检测,结果如表2所示。

[0097] 表2 QX型IBV血清中样品前处理条件优化方法(单位:log2)

[0098]

血清 条件	阳性血清1	阴性血清1	阳性血清2	阴性血清2
56℃	1: 2048	1:32	1: 1024	1:16
10%红细胞 (1:1)	1: 2048	1:16	1: 1024	1:8
30%红细胞 (1:1)	1: 1024	1:16	1: 1024	1:8
10%红细胞+56℃ (1:1)	1: 2048	1:16	1: 512	1:8
30%红细胞+56℃ (1:1)	1: 1024	1:8	1:128	1:8
5%高岭土悬液 +56℃ (1:10)	1:256	1:2	1:128	1:2
5%高岭土悬液 +10%红细胞+56℃ (1:10)	1: 256	1:2	1:128	1:2
生理盐水 (1:10)	1:512	1:2	1:256	1:2
生理盐水+56℃ (1:10)	1:256	1:2	1:256	1:2

[0099] 结果显示,56℃与红细胞处理血清后效果不佳,相比之下高岭土处理和生理盐水处理血清后得到较好试验结果,在试验结果一致的情况下能节省时间、操作更为简便,提高检测效率,选择生理盐水10倍稀释血清作为IBV SZ株HI试验中IBV血清样品前处理血清的最佳条件。

[0100] 实施例8利用IBV SZ株HI抗原对不同基因型IBV血清样品进行检测

[0101] 利用实施例1和2制备的抗原,参照实施例3、4、6和7的优化条件,建立的方法分别对不同基因型IBV阳性血清进行检测,结果如表3所示,表明本方法对QX基因型IBV检测具有较好的特异性。

[0102] 表3 QX型IBV HI抗原与其他基因型IBV血清HI反应结果

[0103]

毒株血清	SZ	YN	GD	M41	4/91	Conn	Hotal	Gray	阴性血清
HI效价	1:512	1:64	1:64	1:32	1:32	1:32	1:16	1:16	1:2

[0104] 注:表3中的符号分别代表以下IBV毒株SZ株(QX-like)、YN株(YN-like)、GD(TW-like)、M41株(M41-like)、4/91株(4/91-like)、Hotal株、Gray株、Conn株。

[0105] 实施例9 IBV SZ株HI抗原特异性检测

[0106] 利用实施例1和2制备的抗原,参照实施例3、4、6和7的优化条件,建立的方法对其它常见的具有血凝性禽病病原:H5、H7和H9亚型禽流感病毒阳性血清,NDV,EDS-76、Yucaipa阳性血清进行检测,结果如表4所示,结果显示,除IBV SZ株阳性血清外,与其他病毒均呈阴性反应,表明制备的HI抗原与其他具有血凝活性的病毒(禽流感H5、H7和H9亚型、新城疫病毒)

毒、减蛋综合征病毒)无交叉,仅与QX基因型IBV阳性血清反应,具有良好的特异性。

[0107] 表4 QX型IBV HI抗原与其他常见禽病病原HI反应结果

[0108]

毒株血清	SZ	H5-AIV	H7-AIV	H9-AIV	NDV-Lasota	NDV-Yucaipa	EDS-76	阴性血清
HI 效价	1:512	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2

[0109] 注:表4中的符号分别代表禽流感病毒AIV-(H5、H7和H9)阳性血清、新城疫病毒NDV-(Lasota和Yucaipa)阳性血清、减蛋综合征病毒阳性血清EDS-76,IBV SZ株(QX-like)。

[0110] 实施例10 IBV活疫苗和灭活苗免疫后血清样品HI抗体检测

[0111] IBV QX型活疫苗及QX型灭活疫苗免疫SPF鸡后,分别在免疫后21天及免疫后28天采血,收集血清,利用实施例1和2制备的抗原,参照实施例3、4、6和7的优化条件,建立的方法对收集的血清样品进行检测,结果如表5所示。使用本发明方法进行IBV疫苗免疫鸡群抗体检测,结果表明,免疫组鸡群能与制备的HI抗原发生阳性反应,而非免疫鸡群发生阴性反应,表明建立的检测方法可以用来评价疫苗的免疫效果,并且可以根据HI抗体效价的高低来评价疫苗的免疫效力。此方法操作简便,结果清晰、准确易于判定。

[0112] 表5 QX型IBV HI抗原与其他常见禽病病原HI反应结果

[0113]

组别	编号	HI 抗体效价	
		IBV 活疫苗 (免疫后 21 天)	IBV 灭活疫苗 (免疫后 28 天)

[0114]

免 疫 组	1	1:256	1:32
	2	1:256	1:64
	3	1:512	1:16
	4	1:128	1:32
	5	1:64	1:64
	6	1:128	1:128
	7	1:512	1:256
	8	1:256	1:32
	9	1:64	1:64
	10	1:128	1:16
空 白 对 照	1	1:2	1:2
	2	1:2	1:2
	3	1:2	1:2
	4	1:2	1:2
	5	1:2	1:2

[0115] 实施例11用于制备HI抗原的QX型IBV病毒株的优化

[0116] 1、用于制备HI抗原的毒株分型

[0117] 根据SZ株与IBV目前国内流行株和常用疫苗株的S1基因序列,绘制系统进化树(图3),结果显示SZ株属于目前的IBV流行毒株QX-like型,与目前国内流行毒株具有较近的遗传进化关系,而与M41毒株遗传关系较远。并根据基因遗传进化分析结果,选择M41株、4/91株、YN株、GD株和SD株用于IBV SZ株的交叉中和试验。两个毒株间的交叉反应程度通常以相关系数(R)表示并以R值大小判定型和亚型,R>80%时为同一亚型;R在25%和80%之间为同型的不同亚型;R<25%时为不同的型。

[0118] 交叉中和试验结果如表6所示。SZ株与SD、YN、GD、M41和4/91株表现为不同程度双向交叉中和反应。SZ株与SD株的抗原相关系数为91.1%,表明SZ株和SD株属于QX血清型的相同亚型。SZ株与GD、4/91、M41和YN之间的抗原相关系数(R值)分别为16.7%、14.6%、8.1%和6.9%,表明SZ株与GD、4/91、M41和YN株属于不同的血清型。

[0119] 其中, $R = \sqrt{\frac{r_1}{r_2}} \times 100\%$ (其中 r_1 =B血清中和A病毒中和效价/A血清中和A病毒中和效价, r_2 =A血清中和B病毒中和效价/B血清中和B病毒中和效价)

[0120] 表6 IBV SZ株与其他毒株的交叉中和试验结果

[0121]

毒株	国内分离株				常用疫苗株	
	SZ	SD	YN	GD	M41	4/91
SZ	407.4	144.5	6.17	15.8	12.3	47.8
SD	331.1	141.3	/	/	/	/
YN	70.8	/	223.9	/	/	/
GD	11.2	/	/	15.5	/	/
M41	13.8	/	/	/	63.1	/
4/91	11.2	/	/	/	/	61.7
R (%) to SZ	/	91.1	6.9	16.7	8.1	14.6

[0122] 注：表中符号分别代表以下IBV毒株SZ株(QX-like)、SD株(QX-like)、YN株(YN-like)、GD(TW-like)、M41株(M41-like)、4/91株(4/91-like)，“/”表示未测，R(%) to SZ表示表中各IBV毒株与SZ株抗原相关系数。

[0123] 2、QX型SZ株安全性及免疫原性研究

[0124] 选择QX型SZ和SD株，进行致病性试验及免疫原性鉴定。将21日龄SPF鸡随机分为3组，每组10只。第1组通过点眼接种纯化后的SZ株0.1ml ($10^{6.0}$ EID₅₀)。第2组通过点眼接种纯化后的SD株0.1ml ($10^{6.0}$ EID₅₀)。第3组点眼0.1ml灭菌生理盐水作为对照。观察期为14日，每日观察和记录鸡只的发病情况和死亡情况，观察期结束后，检测其抗体水平，并通过临床表现和剖检变化综合评价分离株的致病性。

[0125] IBV SZ株攻毒组在感染后未表现出临床症状，鸡群在观察期内全部健活，鸡群剖检显示无异常。IBV SD株攻毒组在感染后表现出100%临床症状(咳嗽、喷嚏和精神沉郁)，鸡群在观察期内死亡率高达67%，剖检结果见图4，显示肾脏肿大，呈花斑肾，法氏囊有少量粘液渗出。病理组织学检查结果见图5，SD组鸡的病变如下：气管中纤毛严重脱落和坏死；肺支气管和毛细血管内检测到出血，充血和淋巴细胞浸润；肾脏上皮细胞坏死并伴有淋巴细胞浸润；法氏囊中检测到大量淋巴细胞坏死；腺胃可见上皮细胞坏死和脱落；脾中观察到严重的淋巴细胞坏死。SZ组鸡的病变如下：气管中淋巴细胞和气管粘膜固有层增厚；肺的支气管中检测到充血和红细胞；肾小管间质有少量淤血；法氏囊检测到淋巴细胞浸润和坏死；腺胃粘膜表面粘附淋巴细胞；脾中观察到少量淋巴细胞坏死和充血气管黏膜上皮细胞脱落。抗体检测显示感染后14天SZ株较SD株抗体水平更高，综合评价，IBV SZ株是一株弱毒株，致病性较低，免疫原性更优，安全性好。因此，本发明优选利用SZ株进行QX型IBV血凝抑制试验抗原的制备。若将其替换成其它QX型IBV病毒株，未必会成功制备出HI抗原，或者即使能够制备出HI抗原，其检测效果也远不及以SZ株制备的HI抗原。

[0126] 虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之做一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

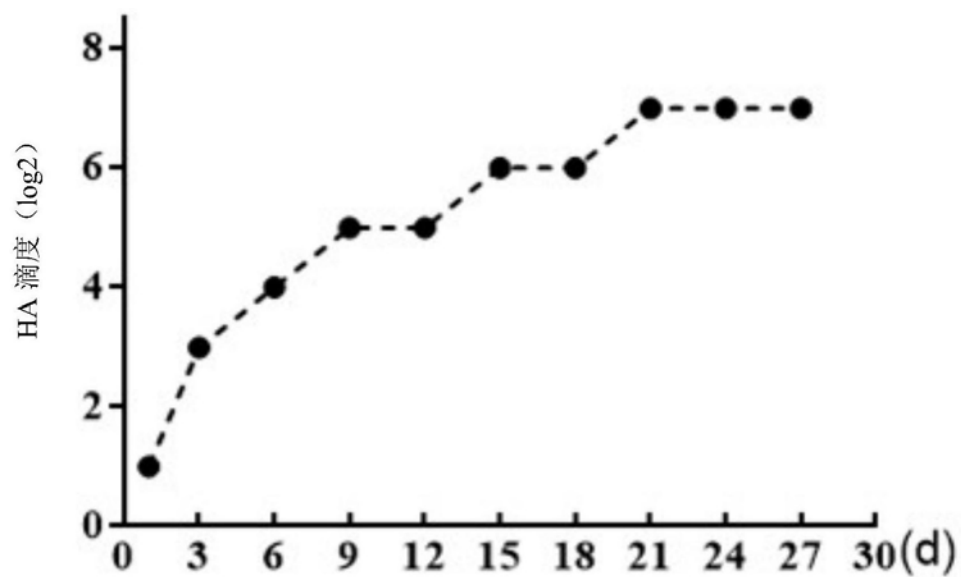


图1

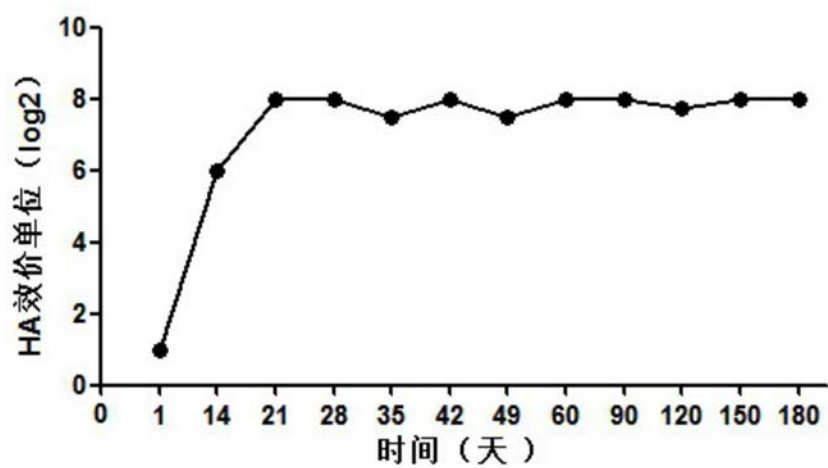
SZ抗原稳定性图

图2

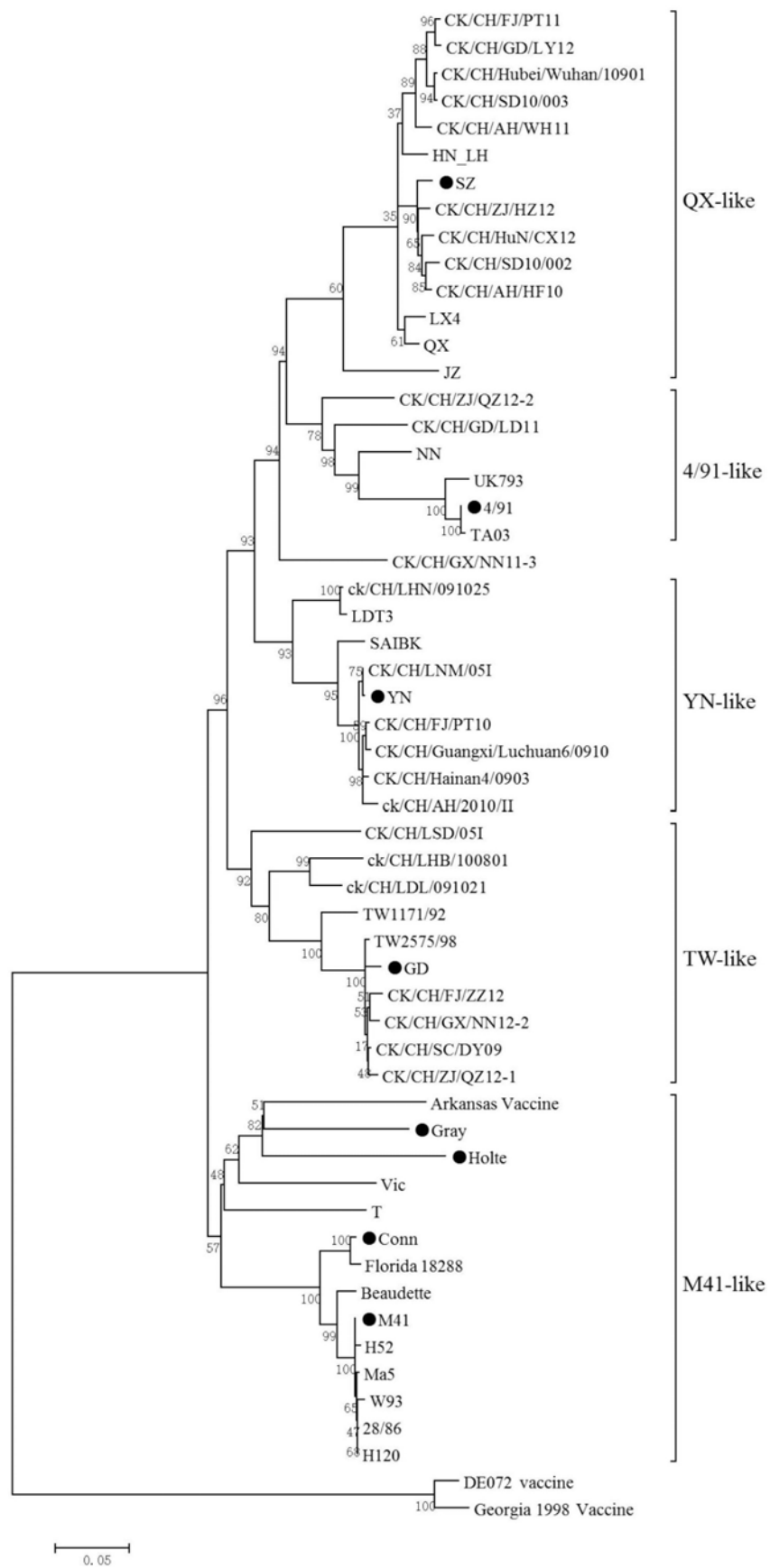


图3

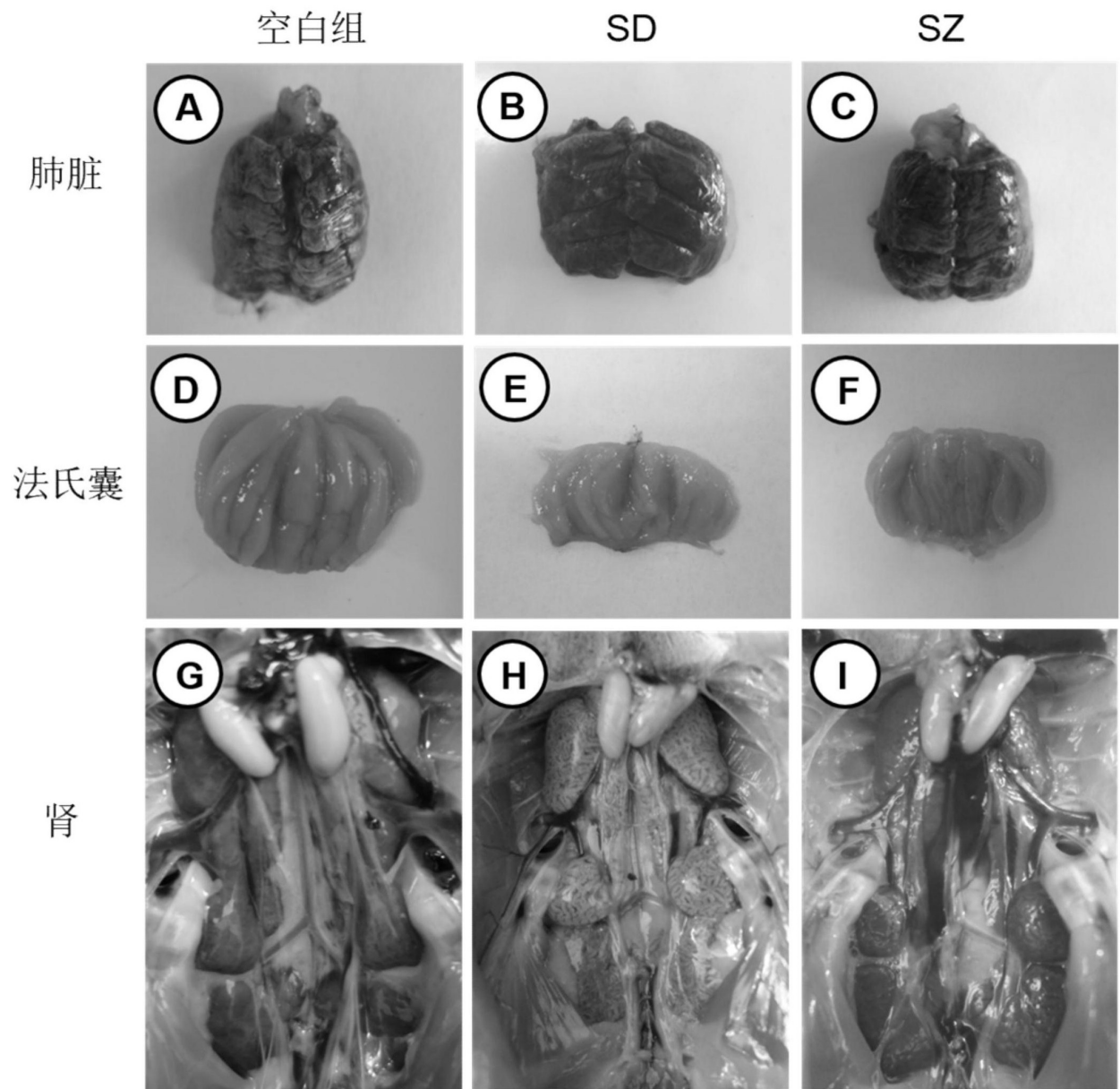


图4

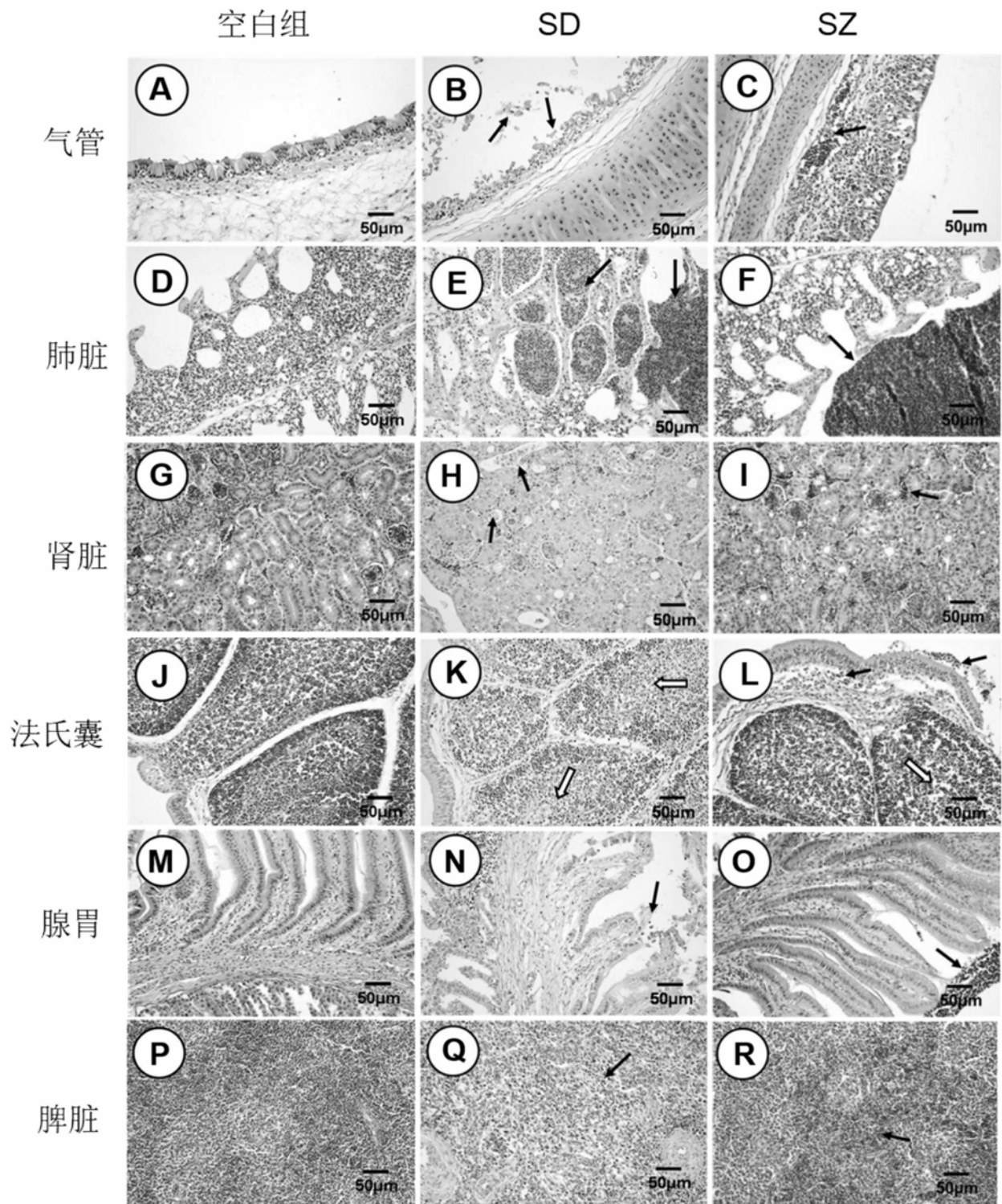


图5

专利名称(译)	QX型IBV血凝抑制试验抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN109239342A	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201811221436.8	申请日	2018-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	张国中 赵静 谢德琼 颜世红		
发明人	张国中 赵静 谢德琼 颜世红		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983		
代理人(译)	王文君 黄爽		
其他公开文献	CN109239342B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及QX型IBV血凝抑制试验抗原及其制备方法与应用。HI抗原的制备方法如下：将104～107EID₅₀QX型IBV病毒株接种鸡胚，37℃孵育进行病毒增殖，36～48h取出鸡胚，2～8℃冷却6～16h，收集鸡胚尿囊液，经浓缩后与I型磷酸酯酶C混匀，37℃摇床作用2～2.5h后，于2～8℃放置21～35d即得。本发明提供的HI抗原和检测方法具有高特异性、高稳定性、高灵敏度、高效率的特点，可在2h内对临床血清样本进行快速检测，本发明可广泛应用于IB的检疫、诊断、免疫后抗体的检测，使HI方法检测QX型传染性支气管炎变得可行，为防治IB的发生提供实用的、科学的手段，以更好地指导养禽生产中对该病的防控。