

25-10

台灣鷄傳染性支氣管炎 (IB) 疫苗 檢定法之改進

蘇 杰 夫

台灣省家畜衛生試驗所

為改進當前台灣鷄傳染性支氣管炎疫苗之檢定法，選取 M₄₁，C₀₄₆ 及 H₁₂₀ 等 IB 病毒株，於宿主增殖，以究明病毒之增殖適當時機，期得較高之病毒力價，供血球凝集抗原製作，結果，以 10 日齡 SPF 孵化鷄胚胎培養 32 ~ 48 小時，即可達 7.5 以上之病毒力價 (log₁₀ EID₅₀/ml)；將所得病毒液，經高速遠心濃縮成原量之 1/100 後，以 pH 6.4 之 HEPES-buffered Saline 配製之 2 單位/ml 之磷脂酵素丙 (phospholipase-C type I) 處理後，三者中，僅 M₁₄ 可得 6 (log 2) 之血球凝集力價；就該抗原對疫苗免疫鷄之 HI 抗體價大於 6 (log 2) 以上者，其中和抗體指數仍大於 2.0 (log 10)，顯示兩者之間關係極為密切，足以該法取代當前之中和抗體法之效力檢定。

試製 IB-HI 抗原經 Formalin 處理後，置於 4 °C 保存，其抗原力價仍可維持 48 週不降，其安定性甚佳。

另以 H₁₂₀，ON 及 Mas II 系之活毒疫苗免疫之 SPF 小鷄，於 0, 1, 2, 4, 8, 12 及 16 週採血，以 IB-HI 抗原及中和抗體法測試血中抗體之消長，顯現免疫後 4, 8 週之 HI 抗體價最高且與中和抗體呈正比例曲線升降，顯示可應用 HI 法對疫苗使用效力檢定之評估。

雞傳染性支氣管炎 (Infectious Bronchitis 以下簡稱 IB) 除對患雞引起呼吸器症狀外，對蛋雞致使急激產蛋率的下降，畸型蛋偏高，影響蛋的品質至鉅，目前台灣對本症疫苗之使用量，有逐年增加的趨勢，於現行本疫苗檢定要項中之血清抗體力價測定項目中，係依傳統之中和抗體法，雖該法俱有高度之準確性，然在操作上費時、煩雜，很難應付當前

日趨增加的檢定量，同時其材料費偏高，又在地方上本病疫學調查及疫苗田間使用效力之評估等實用上也諸多不便，因此未普遍被第一線之防疫執行單位所應用，故較俱簡便且準確之診斷法實有待開發之必要。

當前本病血清學反應，除中和抗體法⁽¹²⁾外，尚有寒天內沈降反應⁽²⁰⁾ (AGP)，紅血球凝集抑制法^(2-3, 5-11, 14-19, 21) (HA) 及酵

素結合免疫吸附法 (ELISA) 等^(20,23)，以後兩者較俱快速，且可應付大的檢定量，然 ELISA 法於抗原之製備上較煩雜，須有極純化，否則非特異性高，致有誤差，故仍以紅血球凝集抑制法最為簡便、快速且可廣泛被應用。雞傳染性支氣管炎病毒原本無凝集效應，近年來已先後由 Bingham 等⁽⁹⁾ (1975)，Alexander 等⁽⁷⁾ (1976)，Alexander & Chettle⁽⁶⁾ (1977)，MacPherson & Freest⁽¹⁹⁾ (1978)，MacPherson⁽¹⁸⁾ (1979)，Newman⁽²²⁾ (1979)，Alexander 等⁽⁸⁾ (1983)，Brown & Bracewell⁽¹⁰⁾ (1985)，Cook 等⁽¹¹⁾ (1987)，King & Hopkins⁽¹⁴⁻¹⁵⁾ (1983, 1984)，Lashgari & Newman⁽¹⁶⁾ (1982)，Monreal 等⁽²⁰⁾ (1985) 及 Munner 等⁽²¹⁾ (1988) 等將 IB 病毒經以藥理學之處理，使其具有凝集效應之報告被發表，且在歐美各國之對於疫苗免疫後之免疫抗體測試上被應用，於日本更由太田及加藤氏⁽²⁾ (1983)，谷地田氏⁽³⁾ 等 (1983) 所證實其具有使用價值，故為因應當前吾國逐年增加之疫苗檢定量及地方診斷之便，乃從事本計畫之研究。

材料與方法

1. 供試病毒：

係由本所檢定用之標準毒株為 Massachusetts (M₄₁)，Connecticut (Co₄₆) 及活毒疫苗 H₁₂₀ 等。

2. SPF 種蛋及小雞：

係由西德 Lohmann Tier Zucht 引進之 SPF 種蛋，經本系自行孵化至適當之日齡之胚胎或孵出三週齡之雛雞，供試驗所須。

3. 供試化學藥品：

磷脂酵素丙 (phospholipase - C Type I，為 Clostridium perfringens 抽取之成品，美國 Sigma Chemical Co 所製)；受體破壞酵素 (Receptor destroying enzyme 簡稱 RDE，仍由 Clostridium Perfringens 抽取之成品，同前)。

4. 供試疫苗：

選取美國 Salsbury Lab. 之 Mas II，日生研之 ON 及荷蘭 Intervet 之 H₁₂₀ 株製成之活毒疫苗。

5. 病毒增殖：

將上述供試病毒株以 SPF 雞胚胎或雞腎培養初代單層細胞增殖培養，分別於 24、32、48 及 72 小時收集其尿囊液或細胞培養病毒液，並測定其 EID₅₀ 或 TCID₅₀ 之力價。

6. 病毒之濃縮：

將經增殖後之病毒液，依 28,000 rpm，2 小時之高速遠心所得之沉澱，再以 pH 6.4 之 Tris-buffer 或 HEPES-buffered saline 配成原量之 1/100，置 4℃ 保存備用。

7. 抗原之處理：

依 King & Hopkins⁽¹⁴⁾ (1983)，Lashgari & Newman⁽¹⁶⁾ (1982)，Munner 氏等⁽²¹⁾ (1988) 及 Alexander 氏等⁽⁷⁾ (1976) 方法將經濃縮之病毒液與 2 單位/ml 之磷脂酵素丙 (溶於 pH 6.4 之 Tris-buffer 或 HEPES-buffered saline) 等量混合，並置於 37℃，2 小時之感作。

8. SPF 小雞之免疫：

將 3 週齡 SPF 小雞 70 隻，其中免疫組 60 隻，分別以 Mas II、ON 及 H₁₂₀ 活毒疫苗，依該劑用量及用法各免疫 20 隻，另對照組 10 隻，供試雞於試前、免疫後 1、2、4、8、12 週採血，供血清反應抗體測試用。

9. HA 及 HI 反應：

A. HA 反應：

將經磷脂酵素丙處理過之 IB 抗原，以 2 倍稀釋法於 U 型微量反應盤 (96 孔) 稀釋之，其抗原量為 0.05 ml，加入經以生理食鹽水遠心洗滌三次，再以 pH 7.2 之 PBS 配成 0.5% 雞血球液 0.05 ml，充分振盪，靜置於室溫 40~60 分鐘判讀。

B. HI 反應：

供試血清依水谷氏法⁽⁴⁾，以 RDE

經 37°C，18 小時處理後，再以 56°C，30 分鐘非動化後，依二倍稀釋之，其血清量各為 0.025 ml，再加入上式測定好的 4 單位 IB-HA 抗原 0.025 ml，經充分振盪混合後，置於 4°C，15 分鐘，再加入 0.05 ml 之 0.5% 雞紅血球浮游液，充分振盪混合，置 4°C，60 分鐘靜置感作後判定。其陽性反應例，為血清抑制凝集價大於 16 倍以上，否則陰性。

10. 供試雞血清：

係本所受檢雞傳染性支氣管炎活毒疫苗效力檢定雞（大都為 Mas. 系統之疫苗免疫雞），於免疫後 3~4 週採得，置 -10°C，保存備用。

11. 中和試驗：

依病毒稀釋法，將受測雞血清稀釋成五倍後，經 56°C，30 分鐘非動化後，再與十倍稀釋法稀釋階之病毒液等量混合，置 37°C 1 小時後，再接種至已培養妥之雞腎單層初代細胞上，繼續置於 37°C 培養，每天觀

察 CPE 發生情形，直至一週試驗終了止。
12. 試製 HA 抗原保存、安定性試驗：

製成之 IB-HA 抗原依添加 Formalin，Glycerin 及不添加任何化學藥品後，置於 -20°C 及 4°C 保存，分別於 0，2，4，8，16，32，48 週取出測其 HA 之力價之消長。

試驗結果

一雞傳染性支氣管炎病毒於雞胚胎或雞腎細胞之病毒力價比較：

為求得 IB 病毒於宿主培養時所能獲得較高病毒力價，以利凝集抗原之製作上能得較高效果，故於 24，32，48 及 72 小時培養所測得之病毒力價，如表一所示，除 Co₄₆ 之於 CK 細胞所得病毒力價較高外，其餘 M₄₁ 及 H₁₂₀ 仍以十日齡之孵化雞胚胎培養所得病毒力價效果較好；而培養時間以 32~48 小時之力價較高。

表一 IB 病毒就雞胚胎或雞腎細胞培養不同時間內之病毒力價消長

毒株別	宿 主	培 養 時 間 (小 時) *			
		24	32	48	72
M ₄₁	CE	7.2	7.8	7.6	6.9
	CK	5.4	6.5	5.9	5.4
Co ₄₆	CE	6.7	7.3	7.1	7.0
	CK	5.6	6.3	6.7	6.1
H ₁₂₀	CE	6.8	7.6	7.5	6.8
	CK	5.1	5.8	5.5	4.9

註：病毒力價 $\log_{10} \text{EID}_{50} \text{ \& \ } \text{TCID}_{50} / \text{ml}$

三雞傳染性支氣管炎病毒經磷脂酵素丙處理後之凝集力價：

將濃縮之 IB 病毒以 Tris - HCl 或 HEPES buffered saline 配製成 2 單位之磷脂酵素丙處理後所測得之血球凝集力價如表二所示，除 Co₄₆ 未見凝集效力產生外，其餘 M₄₁ 及 H₁₂₀ 皆有凝集效應，而以 M₄₁ 之力價較高為 32~64 倍，而磷脂酵素丙以 HEPES buffered saline 做溶劑製成之感作液較 Tris - HCl 為佳。

表二 IB 病毒經磷脂酵素丙處理後之凝集力價

毒株別	磷脂酵素丙感作液 (2 單位 / ml) Tris - Hcl & HEPES buffered saline		HA 力價
	Tris - Hcl	HEPES	
M ₄₁	Tris - Hcl		32
	HEPES		64
Co ₄₆	Tris - Hcl		<2
	HEPES		<2
H ₁₂₀	Tris - Hcl		8
	HEPES		8

三雞傳染性支氣管炎 Mas. 系活毒疫苗免疫雞對同原抗原之雞血球凝集抑制與中和抗體之關係：

選取本所受檢之雞傳染性支氣管炎 Mas. 系活毒疫苗免疫雞，於免疫 3~4 週後，採取血清，每隻 0.5 ml，十隻混合成一例血清，共 40 例，以 M₄₁ 株製成之抗原施以 HI 測定抗體，並以組織培養之病毒稀釋法測定其中和抗體（以 Massachusetts 株，CK 細胞馴化毒株測定），以檢討 HI 與 NT 之關係，如表三所示，即以中和指數 ≥ 2.0 以上為陽性指標，則 HI 價 8 倍以下之 14 例血清之 NT 抗體全例低於 2.0，HI 價 16 倍則有 75% (9 / 12) 呈中和試驗陽性，32 倍則有 87.5% (7 / 8)，64 倍以上呈 100% 陽性，

由此結果顯示 HI 與 NT 抗體價間有極密切之關係。

表三 IB 病毒 M₄₁ 株抗原之對同原疫苗免疫雞 HI 與 NT 抗體之關係

血清例數	HI 價 (log 2)	中和指數 (log 10)			陽性率 (%)
		≤ 1.0	1.1~1.9	≥ 2.0	
14	≤ 2 ³	11	3	0	0
12	2 ⁴	0	3	9	75
8	2 ⁵	0	1	7	87.5
6	≥ 2 ⁶	0	0	6	100

四試製 IB-HA 抗原之保存安定性試驗：

抗原長期間保存之安定性，對於本病野外抗體調查可否廣泛被應用有所影響，故選取 M₄₁ 製成之 IB-HA 抗原就其化學藥品之添加，置於不同溫度與不同時間測試其 HA 力價，如表四所示，以添加 Formalin 4°C 保存者力價較安定，加 Glycerin - 20 °C 保存者次之，未添加者其安定性較差。

表四 IB 病毒 M₄₁ 株 HA 抗原安定性試驗

抗原處理	保存溫度	HA 力價 (週)						
		0	2	4	8	16	32	48
Formalin 添加	-20°C	64	64	64	64	64	32	32
	4°C	64	64	64	64	64	64	64
Glycerin 添加	-20°C	64	64	64	64	64	32	32
	4°C	64	64	64	64	32	32	16
未添加劑	-20°C	64	32	16	8	2	<2	<2
	4°C	64	32	8	2	<2	<2	<2

五活毒疫苗免疫之 SPF 雞隻之 HI 及 NT 抗體消長之比較：

就試製之 IB-HA (Mas) 抗原對 H₁₂₀、ON 及 Mas II 不同病毒株之活毒疫苗免

疫雞隻於不同時間採血測試抗體，如表五所示，其中除ON株免疫雞外，其餘皆呈相似之變化升降。

表五 雞傳染性支氣管炎活毒疫苗免疫之SPF雞的HI及NT抗體消長比較

疫苗別	免疫後 週數	*HI 抗體價 (幾何平均值)	**中和抗 體指數
H ₁₂₀	0	< 2	< 1.0
	1	3.98	1.3
	2	31.62	2.3
	4	41.68	3.1
	8	63.09	3.7
	12	47.86	3.1
	16	33.88	2.2
ON	0	< 2	< 1.0
	1	2.63	1.3
	2	13.18	2.1
	4	15.84	2.9
	8	36.30	3.1
	12	27.54	2.8
	16	15.84	2.1
Mas. II	0	< 2	< 1.0
	1	4.89	1.4
	2	33.88	2.2
	4	47.86	3.2
	8	83.17	3.8
	12	67.60	3.4
	16	41.68	2.4
對 照	0	< 2	< 1.0
	1	< 2	< 1.0
	2	< 2	< 1.0
	4	< 2	< 1.0
	8	< 2	< 1.0
	12	< 2	< 1.0
	16	< 2	< 1.0

註：* 係對M₄₁之IB-HA抗原之抗體價。

** 係對同原病毒之中和抗體指數。

討 論

為尋求更高之病毒力價，以利於雞傳染性支氣管炎病毒之HA抗原製作，就本所繼代保存之IB病毒M₄₁、Co₄₆株及活毒疫苗H₁₂₀株，經以雞胚胎及雞腎單層細胞增殖之，顯示各株病毒仍以雞胚胎培養者之病毒力價較高，且以32~48小時為最適當之培養時間，據Hitchner等⁽¹²⁾(1964)，Jordan & Nasser⁽¹³⁾(1973)及Lashgari & Newman⁽¹⁴⁾(1982)之試驗指出，以10日齡之雞胚胎培養的IB病毒，以30小時之培養可達較高的病毒力價，本次之試驗，除Co₄₆之於雞腎單層細胞外，大致仍以雞胚胎培養者較能得高力價。因此選取10日齡孵化雞胚胎做為IB病毒之增殖培養材料，供為凝集抗原製作所需。

IB病毒原對雞血球無凝集能力，但經以磷脂醇素丙處理後，即可使其呈有凝集效應，惟配製磷脂醇素丙的緩衝液往往會影響HA力價的效果，諸如Lashgari & Newman⁽¹⁴⁾(1982), Monreal等⁽²⁰⁾(1985)係以Tris-HCl為溶劑，而King & Hopkin⁽¹⁵⁾(1984)則以HEPES buffered saline做溶劑，咸認有待究明之必要，故仍以兩者比較，結果M₄₁株製成之HA抗原，其凝集能力上，前者處理尚低一稀釋階，但對H₁₂₀株則無顯着差異，此或許其HA能力低較不易顯現。又據太田及加藤氏⁽²⁾(1983)就IB病毒經磷脂醇素丙處理後，再與雞血球反應，並於電顯觀察，病毒附着於紅血球表面上，致血球間之聚集形成凝集現象，彼等指出IB病毒表示構成被膜的糖蛋白及糖脂質之生物活性與磷脂醇素丙的作用機序有關，但實際原理迄今仍未有詳細報導。

為確實瞭解NT與HI抗體產生的關係，供為將來改進檢定方法之依據，就Mas.系活毒疫苗免疫雞之血清，以NT及HI測試，由本次試驗綜合得知，HI價8倍以下的血清，其中和抗體指數全例未達2.0(log 10)，而HI價16倍的血清，則有75%血清之中和抗體價達陽性界限2.0(log 10)，故HI價16倍以上者認定為陽性反應例為妥當的，此與太

田及加藤氏⁽²⁾(1983)試驗有67%相較,本次的試驗仍高出8個百分點,但彼等仍以HI之16倍為陽性界限。而Lashgari & Newman⁽¹⁷⁾(1984)係以HI之32倍為陽性界限,與筆者等之NT相較則有87.5%(7/8)中和指數超過2.0(log 10)。但依Manreal等⁽²⁰⁾(1985), King & Hopkins⁽¹⁵⁾(1984), Alexander等⁽⁶⁾(1983)及Brown & Bracewell⁽¹⁰⁾(1985)之試驗皆以HI的16倍為陽性界限。

由於抗原的安定,即可使抗原取得容易,因此抗體調查上始可廣泛被應用,故就試製之IB-HI抗原以添加化學藥品,藉此保護抗原的安定性,結果以Formalin添加後置於4°C,其HA力價仍可維持48週之久,此與太田氏⁽¹⁾(1985)所得結果相似,故此後仍以Formalin做為本劑之保護劑。

為進一步瞭解本法對田間疫苗使用後效力的評估,特選取Mas. II、H₁₂₀及ON等不同病毒株之疫苗免疫雞之HI及NT抗體消長之比較,各受試雞之中和抗體於疫苗免疫後2週起逐漸上升,至4、8週達高點,而HI則於第4週後有上升的傾向,但仍以第8週為高峯,惟HI價ON的免疫雞不高,此或許其非為同屬抗原所致,但就HI或NT上升情形,兩者仍呈正比例之曲線升降,依Brown & Bracewell⁽¹⁰⁾(1985), King & Hopkins⁽¹⁴⁾(1983), Cook等⁽¹¹⁾(1987)所主張,不同系之抗原間之HI仍有交叉反應現象,故有其應用於診斷之價值。雖IB在分類學上血清型十分複雜,而目前預防所使用之疫苗,大致以Mas.型製劑為主,故本次試驗仍以Mas.為主,至於吾國當前本病有多少血清型,尚無資料可查,故將來仍有應用本法繼續探討型別之必要,做本法再進一步發展之依據。又病毒抗原性容易引起變異,及對於野外流行病株的實際疫情又未能有十分明確的把握,雞隻經疫苗免疫後能否對應野外株侵襲之防禦,是一大問題?故近年來於野外流行株發生的雞場,若僅於現行疫苗防禦,實未能達十分理想的效果,故就當前台灣雞場本病之實際流行本病之型態仍有待探討,因此本法仍為最俱

實用迅速、省力的、經濟的診斷法。

誌 謝

本試驗承蒙本所邱所長仕炎博士、陳前主任忠松先生之殷切指導與鼓勵,本生物藥品檢定系諸同仁之協助、及日本農林水產省動物醫藥品檢查所室長太田修一博士提供寶貴研究資料,使本試驗得以順利完成,謹併誌萬分之謝忱。

參 考 文 獻

1. 太田修一。1985: 雞傳染性支氣管炎の血清反應および免疫に関する研究。日本東北大學獸醫學博士學位論文。
2. 太田修一、加藤和好。1983: 雞傳染性支氣管炎における赤血球凝集反應および赤血球凝集抑制反應。家畜衛試研究報告, 85: 9~14。
3. 谷地田俊介、沢口和成、青山茂美、高橋直治、八谷好一、林幸子。1983: 雞傳染性支氣管炎の赤血球凝集抑制テスト, 雞病研報, 19(4): 185~192。
4. 水谷裕迪。1967: インフルエンザ・ウイルス。ウイルス實驗學各論(國立予防衛生研究所學友會編) 31~53, 丸善, 東京。
5. Alexander, D.J. 1977: Experimental evaluation of the hemagglutination inhibition test for avian infectious bronchitis virus. Proc. Conf. on Avian Adenovirus and Infectious Bronchitis. Central Veterinary Laboratory. Weybridge. P5-12.
6. Alexander, D.J. & N.J. Chettle. 1977: Procedures for the hemagglutination and hemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 6: 9-17.
7. Alexander, D.J., C.D. Bracewell & R.E. Gough. 1976: Preliminary

- evaluation of the hemagglutination and hemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 5: 125-134.
8. Alexander, D.J., W.H. Allan, P.M. Biggs, C.D. Bracewell, J.H. Darbyshire, P.S. Dawson, A.H. Harris, F.T.W. Jordan, I. MacPherson, J.B. McFerran, C.J. Randall, J.C. Stuart, O. Swarbrick & G.P. Wilding 1983: Standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Record.* 113: 64.
 9. Bingham, R.W., M.H. Madge & D.A.J. Tyrell. 1975: Hemagglutination by avian infectious bronchitis virus - a coronarirus. *J. Gen. Virol.* 28: 381-390.
 10. Brown, A.J. & C.D. Bracewell 1985: Application of the haemagglutination inhibition test to typing of infectious bronchitis virus. *Veterinary Record.* 116:47-48.
 11. Cook, J.K.A., A.J. Brown & C.D. Bracewell 1987: Comparison of the haemagglutination inhibition test and the serum neutralisation test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains. *Avian Pathol.* 16: 505-511.
 12. Hitchner, S.B., G.S. Appleton & R.W. Winterfield 1964: Evaluation of the immunity response to infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* 8: 153-162.
 13. Jordan, F.T.W. & T.J. Nasser 1973: The combined influence of age of embryo and temperature and duration of incubation on the replication and yield of avian infectious bronchitis virus in the developing chick embryo. *Avian Pathol.* 2: 279-294.
 14. King, D.J. & S.R. Hopkins 1983: Evaluation of the haemagglutination-inhibition test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination. *Avian Diseases* 27: 100-112.
 15. King, D.J. & S.R. Hopkins 1984: Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the hemagglutination inhibition test. *Avian Diseases.* 28: 727-733.
 16. Lashgari, M.S. & J.A. Newman 1982: Preparing haemagglutinating antigen from isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases.* 26: 508-519.
 17. Lashgari, M.S. & J.A. Newman 1984: Serological comparison and antigenic relationships of seven serotypes of infectious bronchitis virus using the haemagglutination-inhibition test. *Avian Diseases.* 28: 435-443.
 18. MacPherson, I. 1979: Infectious bronchitis haemagglutination test. *Proc. 28th Western poultry Cong. Davis Calif.* 6-7.
 19. MacPherson, I. & A. Feest 1978: Some observations on the value of the infectious bronchitis haemagglutination inhibition test in the field. *Avian Pathol.* 7: 337-347.
 20. Monreal, G., H.J. Bauer & J.

- Wiegmann 1985: Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), hemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 14: 421-434.
21. Munner, M.A., J.A. Newman, V. Sivanandan & S.A. Goyal 1988: Growth, morphology and hemagglutination activity of infectious bronchitis virus. *Vet. Sci. Zootecnica International* 1988: 55-58.
22. Newman, J.A. 1979: Field observation on infectious bronchitis using the HI test. *Proc. 28th Western Poultry Disease Cong. Davis Calif.* 7-8.
23. Yagyn K. & S. Ohta 1987: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bronchitis virus antigens. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49: 757-763.

Improvement in the Method of Inspection for Infectious Bronchitis Vaccines in Taiwan

Su Jei-fu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

In order to improve the present method of inspection for infectious bronchitis (IB) vaccines, three strains of infectious bronchitis virus (IBV) (M41, Co46, H120) were selected and propagated in the embryo to obtain the optimum time for production of higher hemagglutinating (HA) antigen. As a result, incubation of 10-day-old specific-pathogen-free (SPF) embryonated eggs for 32-48 hours at 37°C revealed the virus titer could reach the level higher than 7.5 ($\text{Log}_{10} \text{EID}_{50}/\text{ml}$).

The above allantoic fluid was concentrated 100-fold by centrifugation. Virus pellets were resuspended in HEPES-buffered saline (pH 6.4) containing 2 units of phospholipase-C/ml. Following the treatment, only one out of three strains of IBV (M41) showed 6 (Log_2) HA titer. While there existed HA titer greater than 6 (Log_2) using the prepared antigen in the vaccine-immunized chickens, the neutralizing (NT) antibody of sera still revealed higher index than 2.0 (Log_{10}). A significant relation was observed between both results obtained from HA and NT method. After the treatment of formalin, the prepared hemagglutination-inhibition (HI) antigen of IBV can store at 4°C for 48 weeks stably, and still maintains its titer.

The SPF chickens were vaccinated with three strains of live attenuated IBV (H120, ON, Mas. II), and bled at 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16 week. The level of antibody was detected by HI test and NT method. It showed the greatest HI titer at 4, 8 week, and these results are in agreement with the increasing curve of NT antibody. This demonstrates that HI test can apply to evaluate the efficacy of IBV vaccines.