

4HUA 抗原回滴操作在禽流感试验中的重要性

陆品红 王丽娟 (江苏省常熟市虞山动物防疫站 215500)

禽流感微量血凝抑制试验, 因为其微量、快速、可靠, 能够处理大量的样品, 并能在短时间内报告禽类血样的禽流感抗体滴度水平, 因此成为基层兽医实验室常用的方法。禽流感 HI 检测结果的准确与否, 对掌握禽群的禽流感抗体水平, 发现防疫漏洞能否及时补免、制定合理的免疫程序, 以及提高对禽流感疫病的监控, 确保不发生禽流感疫情至关重要。笔者在长期的禽流感 HI 检测中, 积累了如下的经验, 愿与大家进行交流探讨。

不同效价的工作抗原对试验结果的影响。由于禽流感微量血凝抑制试验的结果判定是以完全抑制 4 个 HUA 抗原的血清最高稀释倍数作为 HI 滴度, 因此 4 个 HUA 抗原 (工作抗原) 的配制非常关键。抗原回滴的操作试验如下: 取一块 96 孔 V 型微量反应板, 1~5 孔均加 25ulPBS; 取 25ul 工作抗原从第一孔等量倍比稀释至第 4 孔, 从第 4 孔吸取 25ul 弃去; 然后 1~5 孔均加 25ulPBS; 最后 1~5 孔再加 25ul1%红细胞悬浊液。振荡混匀, 在室温 (20~25℃) 下静止 40min 后观察结果 (如果环境温度过高, 可置 4℃下)。对照孔红细胞将成明显的纽扣状, 沉到孔底, 详见表 1。

如表 1 序号 1 所示, 工作抗原效价为 7log₂ (即 4 个 HUA 单位), 第 1 孔 (即 2HUA 抗原) 及第 2 孔 (1HUA 抗原) 红细胞全部凝集并在孔底凝集成网状, 第 3

孔 (即 1/2HUA 抗原) 及第 4 孔 (即 1/4HUA 抗原) 红细胞不凝集, 在孔底形成一个圆形的红细胞。说明工作抗原的抗原回滴成立, 工作抗原的配制准确。

如表 1 序号 2 所示, 工作抗原的效价为 6log₂ 时, 抗原回滴第 3 孔的红细胞出现了凝集, 这时必须根据红细胞凝集的多少来适量的增加工作抗原中缓冲液的量。

如表 1 序号 3 所示, 工作抗原的效价为 8log₂ 时, 抗原回滴第 2 孔的红细胞不凝集, 这时就必须根据血细胞的大小来适当增加工作抗原中的抗原的量。

笔者曾验证过, 在进行禽流感微量红细胞血凝抑制试验时, 所用的抗原效价为 9log₂, 试验结果应以工作抗原效价 7log₂ 的结果为准。若配制的工作抗原效价为 6log₂ 时, 则血样测得的血清抗体滴度比标准结果低 1 至 2 个滴度; 若配制的工作抗原效价为 8log₂, 则测得的血清抗体滴度比标准结果偏高, 见表 2。

小结: 一定要在工作抗原的抗原回归完全成立的情况下, 才能开始 HI 检测。一般来说, 抗原开启后, 在 4℃冷藏的条件下, 在一个月的时间内, 抗原的变化不大。只要准确测定好抗原效价, 每次检测时根据样品量的多少来配制工作抗原, 这样既可以保证 HI 检测结果的准确, 又可以提高工作效率, 不会因为工作抗原配制的不准确而反复进行抗原回归试验而浪费时间。

表 1 不同效价的工作抗原回滴结果

序号	抗原效价	工作抗原效价	第 1 孔	第 2 孔	第 3 孔	第 4 孔	第 5 孔
1	9log ₂	7log ₂	++++	++++	++	—	—
2	9log ₂	6log ₂	++++	++++	+++	++	—
3	9log ₂	8log ₂	++++	++	—	—	—

表 2 用不同效价的工作抗原测得的 72 份免疫过的鸡血样的 AIV-Ab 结果

工作抗原效价	禽流感 HI 结果					
	8log ₂	7log ₂	6log ₂	5log ₂	4log ₂	3log ₂
6log ₂	22	22	16	4	6	2
7log ₂	52	10	6	2	2	0
8log ₂	62	4	2	4	0	0