

影响血凝抑制试验因素的研究进展

杭柏林¹, 胡建和¹, 刘丽艳¹, 李杰²

(1. 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003; 2. 河南省新乡市畜产品质量监测检验中心, 河南 新乡 453003)

[摘要] 血凝抑制试验(HI)在畜牧业生产中应用非常广泛,但是影响其试验结果的因素较多。对红细胞、抗原、血清、稀释液、温度、作用时间及判定时间、试验器材、试验方法、判定方法和操作等因素对 HI 试验的影响进行了概述,以期能对生产应用提供参考。

[关键词] 血凝抑制试验; 影响因素

[中图分类号] S852.5⁺2

[文献标识码] A

Research Progress on Influencing Factors of Hemagglutination Inhibition Test

HANG Bo-lin¹, HU Jian-he¹, LIU Li-yan¹, LI Jie²

(1. College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003; 2. Xinxiang Monitor and Inspection Center for Quality of Livestock Products, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Hemagglutination inhibition test, used generally in animal husbandry practice, are effected by many factors. This paper mainly discussed the influencing factors such as erythrocyte, antigen, serum, dilution, temperature, time, test equipments, test methods, assessment methods and operation in order to provide reference for clinical application.

Key words: hemagglutination inhibition test; influencing factors

血凝抑制试验(HI)是新城疫和禽流感等疾病的诊断和研究工作中普遍应用的一种方法^[1],主要用于检测血清中抗体效价、病毒鉴定、监测病毒抗原的变异、流行病学调查、动物群体疫情的监测等^[2]。做好 HI 试验,确保它的准确性是相当重要的一项工作。然而,影响 HI 试验结果的因素较多,现从红细胞、抗原、血清、稀释液、温度、时间、试验器材、操作、试验方法和判定方法等因素对 HI 试验的影响进行了概述,以期同类研究和生产应用提供参考。

1 红细胞

1.1 红细胞的来源及浓度

1.1.1 红细胞的来源 如果红细胞来源于同一只禽,则可能产生自凝现象^[3]。因此,应选择 3~4 只健康禽的血液混合后制成红细胞悬液,以减少自凝现象的干扰^[1,4]。这些健康禽最好是 SPF(无特定病原)级,但生产中很难做到,可以选择健康非免疫禽,迫不得已使用免疫禽时,要经多次洗涤,充分洗去血清^[3]。最好饲养成年公禽以提供优质红细胞,每半年进行 1 次更替^[5]。做 HI 实验时,用禽类红细胞检测同种禽类血清抗体效价时,基本上不出现非特异性血凝现象^[5-6]。若用鸡红细胞悬液检测水禽禽流感血清抗体时,常存在非特异性凝集现象,有时严重影响结果判定^[7]。

1.1.2 红细胞的浓度 在生产中常用 0.5%~1% 的红细胞^[8]。但不同浓度的红细胞对 HI 效价有一定的影响^[1]。相对来讲,浓度大时,HI 值相对较小,而浓度小时,HI 值相对较高^[3,8-9]。当浓度为 1%

时,沉降的血点过大;浓度为 0.5% 时,沉降的血点太小,不易判断,且沉降速度较慢^[4]。

1.2 红细胞的制备及醛化

1.2.1 制备 为保证悬液中红细胞的稳定性和浓度的准确性,离心时要掌握好离心速度和时间^[1,8,10],同时固定洗涤液,洗涤时要尽量除去表面的白细胞膜^[10],洗涤次数不宜过多,肉眼观察上清液澄清透明即可,若次数过多,红细胞破裂导致上清液呈红色^[5],读取离心管时以下凹线刻度为准^[11]。有的鸡红细胞沉降慢,静置 30 min 仍不能沉淀下来。因此,制备好的红细胞,一定要先观察血沉,不合格的不用^[4]。使用前必须混匀红细胞,并不时摇动^[8,12]。不用的红细胞悬液应保存于 4℃,且不超过 2 d^[9,12],保存时间过长或受细菌污染均可发生自凝,从而影响检测结果^[9]。

1.2.2 醛化 新鲜红细胞质脆易碎,不易保存,应随配随用。而醛化红细胞性质稳定,在蒸馏水中不溶血,不易腐败,可在 4℃ 条件下保存数月至 1 年。使用方便,反应均一、稳定,图像清晰,结果均一和易于判定等优点^[12]。但用醛化红细胞的检测结果比新鲜红细胞低 1~2 个效价^[13]。

2 抗原与血清

2.1 抗原

2.1.1 抗原性^[8] 一般采用凝集价高、凝集时间长的抗原。当抗原性较差或抗原比较陈旧时,抗原对红细胞的凝集能力下降,凝集后解凝时间变短。因此,一般使用新的抗原。

[收稿日期] 2008-09-06; 2009-02-14 修回

[基金项目] 河南科技学院青年科学基金(20040912)

[作者简介] 杭柏林(1978—),男,硕士,讲师,从事动物微生物学与兽医卫生检验学的教学与科研工作。E-mail: yzhbl001@yahoo.com.cn

2.1.2 浓度 抗原浓度降低, HI 值增大; 抗原浓度升高, HI 值减小, 每增加 1 倍浓度, 下降 $0.9 \sim 1.1 \log 2^{[3]}$ 。抗原浓度太高或太低都不能准确反映所检测抗体的效价^[9]。做 HI 试验前, 对配好的 4 单位抗原液进行滴定检验^[1]。若 2 单位抗原、1 单位抗原完全凝集, 1/2 单位抗原完全抑制, 则抗原配制准确, 如果不合要求, 则对所配溶液进行校正至合格为止^[4]。如果用冻干抗原, 监测前用红细胞凝集 (HA) 试验滴定抗原效价; 如果用稳定抗原, 启用时每瓶都应重新滴定效价, 若测得效价与瓶签标明效价不符, 应按实测效价稀释使用^[10]。如果用指定单位的抗原, 试验前也应做抗原效价测定, 若效价很高, 可适当稀释后重新测定^[5]。抗原效价每 3~4 周测定 1 次; 4 单位和 8 单位抗原应现配现用, 剩余丢弃报废; 抗原尽量避免反复冻溶, 否则引起效价下降^[11]。

2.1.3 纯化^[9] 未纯化抗原在使用过程中效价下降很快, 且可能含有与红细胞发生凝集的物质, 导致 4 单位抗原不准, 从而影响试验结果。试验前对抗原采用已知效价的标准阳性血清进行标定, 以确保抗原的纯度。

2.1.4 亲和力^[9] 主要针对禽流感病毒而言, 因禽流感病毒变异性高, 在 HI 试验中经常会出现不同厂家相同亚型禽流感抗原检测的同一血清血凝抑制效价不同。因此, 应挑选高亲和力毒株来制备检测抗原, 提高诊断的准确性。

2.2 血清

2.2.1 样本 随机抽样时, 样本要能代表整个鸡群, 分布要均匀, 且数量要足够^[1]。在鸡舍内不同位置随机抓取, 使抽样结果能反映整群鸡的情况; 雏鸡可用心脏采血, 以保证足够的待检血量^[10]。

2.2.2 质量 被检血清要求新鲜、无杂质、无红细胞、不腐败, 盛装容器要清洁无菌^[4, 5, 11-12]。正常鸡血清为清亮透明或微黄色。当血清被细菌严重污染或长时间置于高温环境中时, 血清变成浑浊的黄色; 变质的血清会发生凝集反应, 使含较高抗体的血清在 HI 试验中出现前几孔凝集而后几孔凝集被抑制的现象^[9]。在采血时, 如果快速推动血样到离心管, 则易使红细胞发生溶解, 溶解的红细胞稀释了血清, 进而影响 HI 的结果^[9]。血清在加温或保存过程中一旦出现沉淀, 也容易引起非特异性凝集, 这可用红细胞吸收或通过离心除去^[2, 14]。

2.2.3 非特异性因子 大多数动物体内都含有非特异性凝集因子, 如血清中的唾液酸残基会模拟红细胞受体, 同红细胞受体竞争与血凝素的结合, 从而导致非特异性抑制和假阳性结果^[7]。被检动物血清自然凝集素也会影响红细胞被抑制凝集, 出现假阴性或降低血清抗体效价, 造成阳性动物漏检或误检^[15]。不同动物血清与不同动物红细胞之间也有非特异凝集作用, 有时会掩盖特异性抗体的血凝抑制作用, 以致出现假阴性^[6]。对于鸡血清来说, 常用鸡红细胞来检测, 对结果的影响不大; 而用鸡红细胞

来检测其他动物的血清抗体时, 常存在非特异性凝集现象, 严重时影响结果判定, 如果用鸡红细胞检测水禽禽流感血清抗体时即有这种情况。而鸭禽流感血清用鸭红细胞悬液, 鹅禽流感血清用鹅红细胞悬液, 则几乎可完全消除非特异性凝集因子对检测结果的影响^[7]。

3 稀释液

3.1 类型

用生理盐水作稀释液时要注意盐浓度不能太高, 在一定浓度时会发生盐类凝集现象^[9]。生理盐水应无菌、新鲜、无杂质, 如果采用自制盐水, 应采用活性炭吸附、滤纸过滤、高压灭菌后测定 pH 值, 如有偏差, 加入磷酸二氢钾调至 pH 值 7.0 时即不会发生溶血现象^[11-12]。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 作稀释液比生理盐水测定的抗体效价要高, 可提高检出率^[16]。所有稀释液都要高压灭菌, 避免细菌污染而影响试验结果^[9]。

3.2 pH 值

采用 PBS 作稀释液, pH < 5.8 时红细胞易自凝, pH > 7.8 时凝集的红细胞解凝加快, pH 为 7.0 时红细胞沉淀最充分, 图形最清晰^[1, 3]。采用生理盐水作稀释液, pH < 6.5 或 pH > 7.4, 红细胞发生溶血现象, pH 为 7.0 时不发生溶血^[12]。因此, 最佳 pH 值为 6.5~7.4, 通常用 pH 值为 7.0 左右的稀释液, 最适宜于鸡红细胞, 效价高且图像清晰^[12]。

4 时间与温度

4.1 时间

4.1.1 作用时间 HI 效价随作用时间延长而升高, 37℃ 下作用 30 min 已接近最高值, 再延长时间, HI 值上升甚微^[3, 12]。温度低, 递增慢, 达最高值所需时间长; 温度高时则相反。作用时间一般为 25~30 min。时间太短, 抗原和血清反应不完全, 加入红细胞后红细胞与抗体争夺抗原; 时间太长, 因病毒抗原神经氨酸酶的作用使已凝集的红细胞缓慢释放出来, 从而影响试验结果^[9]。

4.1.2 判定时间 用浓缩抗原作 HI 试验, 室温在 15~37℃ 时, 判定时间对 HI 效价的影响很小, 以 LaSota 浓缩抗原最好。用疫苗作为抗原, 则影响较大, 时间长短都不行^[3]。判定时间以 30~40 min 为宜。红细胞对照孔达到完全凝集时, 开始判定^[11]。观察要及时, 最好每 5 min 观察 1 次^[4, 5]。

4.2 温度

试验要求感作室温在 20℃, 若室温高时, HA、HI 试验反应加快, 红细胞解凝时间变短; 当室温低时则相反^[4, 8]。从 4~37℃, 随温度升高, HI 效价会上升, 每提高约 5℃, 平均上升 $0.35 \log 2^{[3]}$ 。如果室温低于 4℃, 红细胞发生自凝, 在 37℃ 时, 凝集的红细胞易洗脱^[9]。常把 18~22℃ 作为试验最适宜温度范围^[1]。温度对 HI 的影响主要发生在加红细胞前, 在最初 30 min 内使 HI 效价递增显著, 随作用时

间延长而变缓^[1]。当室温过高时,会蒸发部分液体反应物,且影响抗原活性^[9],同时因反应速度加快,因此,判定时间要相应提前,不可在接近解凝时才判定,否则测出的 HI 抗体水平会升高^[8]。夏天最好在 4℃ 观察试验结果^[14]。环境温度太低,反应速度减慢,红细胞凝集时间延长。当温度低时延长 HA 和 HI 的反应时间,或把反应板置 37℃ 培养箱中,可解决此类问题^[8]。

5 试验器材

5.1 微量血凝板及移液器

5.1.1 微量血凝板 使用的微量板有 U 和 V 型, V 型板测得的 HA 效价略高于 U 型板,且图像清晰、典型,易于判定;新 V 型板底部光滑、图像清晰,而旧 V 型板底部因长期接触滴头,且每次稀释数次以上,磨损大,造成图像不清,判断失误,进而影响 HI 试验结果^[11]。反应板用时间过长,因洗刷不及时或洗刷不彻底,有时会使反应前后跳孔,无法正确判定试验结果^[8]。

5.1.2 移液器 移液器常常产生移液量不准确、吸取量不够或排液量不充分,这些因素均会影响检测结果。排液时,若吸头内有液体滞留,则移液器不准。若吸头没排空就使用移液器移稀释血清,所测 HI 效价变高^[8];使用多头微量移液器时,要把每个吸头安装牢固密封,手压力度均匀,否则由于移液量偏差造成试验结果不准确^[10]。

5.2 吸头、振荡器与恒温箱

5.2.1 吸头 操作时,吸头接触微量反应板底部,且每次稀释数次以上,对吸头和反应板底部磨损较大,致使反应时图像不清,判断失误^[4]。

5.2.2 振荡器与恒温箱 振荡器工作平稳匀速、无异常抖动、振颤。恒温箱温度能精确保持设定温度^[11]。

6 操作、试验方法及判定方法

6.1 操作

血清稀释后加红细胞,应从最后 1 个孔加起,吸头避免接触孔内的液体,以免影响结果,造成人为干扰^[11]。稀释血清时,如果混合不均匀,会使结果出现差异,如果用微量移液器吹打时,孔内和吸头内都易产生气泡,稀释不充分,而且稍不小心,孔内的液体就会溅出,影响试验结果的准确性^[4]。

6.2 试验方法

全量法和 β -微量法的原理是一致的。全量法误差小,但操作慢、耗抗原及器材多;微量法节省抗原、测样多。如果用多头移液器可同时检测 4~8 个血样,但要求操作者认真、熟练,否则即会产生误差^[10]。在全量法和微量法中以生理盐水为稀释液,以 1% 红细胞悬液作反应指示剂和完全凝集抑制为

判定终点的方法效果较好;全量法测得的 HI 效价较微量法约高 0.5~1 个效价,其灵敏度和准确性较高^[17]。

6.3 判定方法

不同的人在判断 75%、50%、25% 的凝集或凝集抑制时,判断结果差异较大,而对 100% 的凝集或凝集抑制基本上无差异。实际应用时一般以 100% 抑制为判断终点^[10]。

7 结语

影响 HI 试验的因素有很多,在进行试验前应综合考虑各方面的影响因素,选定一个适合自身实验室条件的试验标准,及时清洗、更换反应板和吸头,并固定试验条件和判定标准,可降低试验误差。

[参 考 文 献]

- [1] 杨文,孙文梅,江燕萍. HI 试验中应注意的问题[J]. 上海畜牧兽医通讯,2002(3):31.
- [2] 白文彬,于康震. 动物传染病诊断学[M]. 北京:中国农业出版社,2002:128-132.
- [3] 黄文忠. 鸡新城疫血凝抑制试验(HI)的影响因素[J]. 中国家禽,2000,22(5):9.
- [4] 伍朝晖,王云华,林娜,等. 如何提高禽流感抗体 HI 试验的准确性[J]. 中国动物检疫,2001,18(11):35.
- [5] 兰玲,王涛,刘英豪. 做好高致病性禽流感 HI 试验的几点建议[J]. 新疆畜牧业,2006(6):44-45.
- [6] 黄愉森,庄克珩,谢淑敏. 不同种禽类红细胞悬液对 HI 结果的影响[J]. 养禽与禽病防治,2005(1):8-9.
- [7] 张评浒,唐应华,仇旭升,等. 不同家禽红细胞悬液对禽流感血清抗体检测的影响[J]. 中国兽医科技,2005,35(4):267-271.
- [8] 贾秀公,张丽娟,祝永华,等. 鸡新城疫 HI 抗体监测的注意事项[J]. 山东家禽,2002(10):32-33.
- [9] 许连珍. HA、HI 微量法检测鸡群抗体的影响因素[J]. 中国家禽,2006,28(18):31-32.
- [10] 秦卫红,徐树强. 鸡新城疫 HI 试验及应用中若干问题的探讨[J]. 中国禽业导刊,2004,21(14):28.
- [11] 金海市. 提高测定鸡新城疫 HI 抗体准确性的几点体会[J]. 畜牧与兽医,2002,34(19):24.
- [12] 王爱琴. 提高鸡新城疫 HI 抗体测定准确性的体会[J]. 上海畜牧兽医通讯,1999(6):35.
- [13] 黄兰香,李建新,尹振海,等. 新城疫 HA-HI 试验中可用豚鼠醛化红细胞代替鸡新鲜红细胞[J]. 家禽科学,2005(12):18-19.
- [14] 叶玮,吴峻华,林晴. 浅谈如何消除水禽的禽流感血凝抑制试验(HI)中非特异现象[J]. 养禽与禽病防治,2006(7):42.
- [15] 贾英科,周蓉,王雪,等. 鸽子血清非特异性凝集因子消除试验的研究[J]. 天津农学院学报,2003,10(4):21-24.
- [16] 孙淑清,李全录,刘钧,等. 稀释液对禽流感 HA 和 HI 试验影响的分析[J]. 中国家禽,2003,25(21):10-11.
- [17] 卢玉葵,刘伟云,吴霞芳. 几种常用 ND HI 试验方法的比较与分析[J]. 佛山科学技术学院学报:自然科学版,2001,19(2):75-77.

(责任编辑:杨林)