

# 血凝和血凝抑制试验操作要领

王延树<sup>1</sup> 张芳<sup>2</sup>

(1,瑞普(保定)生物技术有限公司 河北保定 071001;2,保定市畜牧水产局 河北保定 071051)

**摘要:**血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验是目前我国各地对新城疫、禽流感等疾病进行流行病学调查、防疫监测等工作的主要依据,具有经济、快速、可靠等多种优点,但在实际操作中有很多问题致使实验结果不准确,本文就该实验的操作要领做简单汇总,为指导实验操作提供参考依据。

**关键词:**血凝血抑,注意事项

血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验是目前我国各地对新城疫、禽流感等疾病进行流行病学调查、疫病诊断、防疫监测、免疫程序制定等工作的主要依据,各大型养殖场、兽医门市、畜牧局、兽药疫苗生产厂家均可以进行操作。该试验方法具有经济、快速、可靠、操作简便和对抗体水平进行量化的优点,能够处理大量的样品,并能在短时间内报告禽类血样的抗体滴度水平。但是实验用材料不标准、操作不规范等因素也会影响到试验结果的准确性,导致试验的失败。笔者就血凝-血凝抑制试验中关键步骤介绍如下,供同行参考。

## 1 原理说明

某些病毒具有凝聚某些动物红细胞的能力,称为病毒的血凝,利用这种特性设计的试验称为血球凝集试验,以此来推测被检材料中有无病毒存在,是非特异性的,但是病毒的血凝可为相应的特异性抗体所抑制,即血球凝集抑制实验,具有特异性,通过 HA-HI 实验,可用已知的血清来鉴定未知的病毒。

## 2 试验前准备

**2.1 96 孔 V 型微量反应板** 选用规则标准的 96 孔 V 型微量反应板,V 型孔底需光滑明亮,对底部磨损严重的反应板要及时淘汰。使用前先用酒精棉擦拭干净,再用蒸馏水反复冲洗多次,在温箱中烘干备用;使用后及时将反应板

用自来水反复冲洗(以孔底不留沉积的红血球为准),再将沾有洗涤剂溶液的棉拭刷洗凹孔及板面,然后再用自来水反复冲净每个凹孔及板面,待反应板干燥后,放到 2%~3% 浓度的盐酸中浸泡 24 h 以上。

**2.2 待检血清** 用于分离血清的血液必须是新鲜无污染的,采集血样后置于硅化管或一次性塑料离心管内,水平放置,保证血样与空气最大限度的接触,先置于 37℃ 环境下半小时,再置于 4℃ 环境下数小时,8000~10000r/min 离心 3~5 min,将析出的血清移入清洁的包装内备用。4℃ 的冰箱中冷藏可保存 5d,长时间保存可冷冻存放,冷冻后会出现蛋白质局部浓缩、分布不均的现象,在检测前应充分混匀。

**2.3 1% 红细胞** 最好选用健康、未经过疫苗免疫的成年 SPF 公鸡,如若没有 SPF 公鸡也可以使用低抗体鸡提供的红细胞但需要更多次的洗涤(5 遍以上),建议用 3 只以上鸡的血液混合制备红细胞悬液。采血时先将注射器内吸入 3.8%~4% 枸橼酸钠(1 份抗凝液可抗凝 4 份血液),或阿氏液(抗凝剂和血液等体积)再采血。采完后将抗凝剂和血液轻轻摇匀,再注入大离心管内加生理盐水洗涤,洗涤按 2500 r/min~3000 r/min 离心 3 次~5 次,每次离心后去掉上清液和白细胞层,保留红细胞层。洗涤完毕,用生理盐水稀释成 0.5%~1% 红细胞悬液。配好的红细胞悬液要做血细胞沉淀检查:取 96 孔 V 板一块,滴一滴红细胞悬液到任意孔内,室温静置

20min~40min,查看血细胞沉淀情况,决定是否能用。较长时间保存红细胞可用大量的阿氏液,阿氏液与全血的比例是4:1,使用时吸取血液沉淀,反复洗涤(洗涤方法如上),此法可保存红细胞2周~3周。要想长期保存可使用红细胞醛化法,具体操作如下:将新鲜红细胞用0.1mol/L PBS液充分洗涤5次,每次以3000r/min离心4分钟,最后1次用红细胞压缩体积的10倍PBS液洗涤,3000r/min离心10min,去上清。按沉积红细胞的8倍量加入冷至4℃的36%甲醛溶液混合均匀,放置4℃作用24小时,期间不断轻摇震荡;取出后再按沉积红细胞1份加2份冷至4℃的30%甲醛溶液混匀,4℃作用24小时,然后用PBS液洗涤5次,最后配成0.75%醛化红细胞液,加入终浓度0.1%叠氮钠4℃备用。此法可保存红细胞2月以上。

## 3 试验中操作

**3.1 4单位抗原的制备** 以使红细胞全部凝集的病毒最高稀释倍数为该病毒的凝集效价。4单位病毒的确定,以上述血凝价除以4即为4单位病毒,如血凝价为1:128,则4单位病毒为128/4=32,即1:32为4个凝集单位,为保证4单位抗原配制准确,须作回归试验检测。方法是在微量反应板的1~5孔均加入25μL PBS液,取配制好的4单位抗原液25μL加入第1孔中,混匀后吸取25μL加入第2孔,依次倍比稀释至第4孔,混匀后弃去25μL,第5孔为红细胞对照,至此前4孔的抗原含量分别是2单位、1单位、1/2单位和1/4单位。然后每孔均加入1%鸡红细胞悬液,于振荡器上振荡混匀,20~25℃下静置20min后观察结果,若前两孔凝集,第3孔50%凝集,最后两孔不凝集,则为4单位抗原配制准确;若全部凝集说明4单位抗原配制浓度过高;若全部不凝集说明4单位抗原配制浓度过低。配置的4单位抗原要尽量在一天内用完,如若隔夜则需再次配置4单位抗原。

**3.2 加样** 稀释血清时,如果混合不均匀,会使结果出现差异。用微量移液器吹打时,V型孔内和吸头内都易产生气泡,使得稀释不充分。而且稍不小心,孔内的液体就会溅出,影响检测结果的准确性。加入4个血凝单位的病毒抗原和1%红细胞悬液时要避免移液器吸

头与孔内的液体接触,减少交叉污染。为防治污染加样时按照从低倍往高倍的顺序。在加红细胞和4单位抗原时一定要边加边摇匀,保证每孔所加的样品量和浓度准确一致。

**3.3 感作温度** 温度对试验的影响较大,如温度过低,反应速度减慢,温度过高会使凝集速度加快,但同时解脱速度也加快。一般室温(20~25℃)放置30min,37℃放置20~25min,实验温度低于4℃时红细胞有时会发生自凝现象。为控制好时间最好及时观察结果,一般可每5min观察一次。

## 3.4 结果判定

以完全抑制4个HAU抗原的血清最高稀释倍数作为HI滴度。只有阴性对照孔血清滴度不大于2log<sub>2</sub>,阳性对照孔血清误差不超过1个滴度,实验结果才有效。HI价小于或是等于3log<sub>2</sub>判定HI试验阴性;HI价等于4log<sub>2</sub>为可疑,需重复试验;HI价大于或等于5log<sub>2</sub>为阳性。

## 4 试验后总结

试验后不管试验成功还是失败,都要认真分析试验过程中的每一个步骤,做好试验总结,为以后的试验存储数据与经验。

总之,在进行微量血凝抑制试验中,一定要细致耐心,操作程序要规范,同时综合考虑各方面的因素,发现问题及时纠正处理,这样才会获得满意的实验结果以正确评价鸡群免疫的效果。■

## 新书推荐

### 《猪病混合感染鉴别诊断彩色图谱与防治》

为了亟待解决猪病混合感染中的临床症状与病理变化鉴别诊断中出现新的问题,而编写《猪病混合感染鉴别诊断彩色图谱与防治》,其中文字10万,图片将近1100幅。首先介绍我国当代常见多发猪的病毒性、细菌性、16种传染病的典型临床症状与病理变化及防治要点,彩色照片366副。其次介绍了19例猪病混合感染如何做出各自疾病的鉴别诊断,彩色照片894副。本书文字简明,图文并茂,通俗易懂,并对猪病的鉴别诊断与防治做了概述,对鉴别诊断技巧依科学发展观为指导思想做了精辟阐述。本书可供养猪专业户、兽医临床工作者、养猪专业技术人员、饲料兽药营销售后服务人员使用、还可作为大、中专兽医专业的教师和学生参考用书。定价:198元/本,另加10%邮资。

### 《执业兽医资格考试应试指南》上下册

根据《中华人民共和国动物防疫法》和《国务院关于推进兽医管理体制改革的若干意见》的规定,我国将实行执业兽医制度。执业兽医资格考试是执业兽医制度的重要组成部分。为配合和服务执业兽医资格考试试点工作,中国农业出版社组织兽医专家,根据执业兽医资格考试大纲要求,编写了《执业兽医资格考试应试指南》一书,为参加执业兽医资格考试的考生高效复习、备考,提高考试能力提供帮助。执业兽医资格考试分兽医综合知识考试和临床技能考试两部分,内容包括兽医基础理论、动物疫病预防、临床理论、临床技能和兽医法律法规等。本书紧紧围绕考试大纲要求的知识点编写,不遗漏、不超纲,突出重点,注重结构的合理性和逻辑性,为考生复习备考应试提供指南。定价:180元/上下册,另加10%邮资。

图书订购热线:010-62899836转236 联系人:张小姐 以上书籍如需快递另加30元邮资  
汇款地址:(100081)北京海淀区中关村南大街乙八号《中国动物保健》杂志社有限公司