

禽流感免疫抗体监测的质量控制

李 春, 邢 坤, 吴 宣, 郭莉,

(四川省动物疫病预防控制中心, 四川 成都 610041)

中图分类号: S858.355.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-8964(2010)11-0029-02

摘要: 禽流感免疫抗体监测结果的准确性、有效性、可靠性和代表性对禽流感防控工作起着十分重要的作用, 本文从样品处理、试剂配制、器材选用、温度和时间控制以及结果判定等方面对禽流感免疫抗体监测试验过程中的质量控制作一简要概述。

关键词: 禽流感; 监测; 质量控制

The quality control of avian influenza immune antibody test

LI Chun, XIN Kun, WU Xuan, *et al.*

(Animal Disease Prevention and Control Center of Sichuan Province, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: The accuracy, validity, reliability and representativeness of avian influenza's immune antibody result are very important for its control work. This paper mainly discussed the quality control points such as sample and reagent solution preparation, equipments using, temperature and time control, assessment methods and so on, in order to provide reference for monitoring avian influenza immune antibody.

Key words: Avian influenza; Monitoring; Quality control

对禽流感免疫抗体的监测一般采用血凝和血凝抑制试验(HA-HI 试验), 该试验方法具有经济、操作简便和容易量化等优点, 但影响试验结果的因素也很多, 本文就禽流感免疫抗体监测试验过程中的质量控制作简要概述。

1 样品的采集和处理

1.1 样品的采集 检测样品(活禽全血)要按照适时采样、适量采样、无菌采样和安全采样的原则采集。血样自然凝固后, 3 000 r/min 离心 5~10 min 即可获得清亮的血清。有时分离出的血清呈果冻状, 可能是因为血内的脂类成分过高所致, 可用针尖挑至 EP 管中挤压, 短时内重复离心即可分离。被检血清要求新鲜、无

收稿日期: 2010-09-26

作者简介: 李春(1975-), 男, 硕士, 主要从事动物疫病的监测诊断工作。

杂质、无溶血、不腐败, 盛装容器要清洁无菌, 正常鸡血清为清亮透明或呈微黄色, 当血清被细菌严重污染或长时间置于高温环境中时, 会变成浑浊的黄色, 变质的血清会发生凝集反应。

1.2 样品的保存 一般情况下, 在 5 d 内检测的血清样品可置于冰箱中 4℃ 冷藏, 待检时间超过 1 周的, 需低温冷冻保存; 对确实需要多次分批检测的, 可将血清样品分装冷冻保存, 以避免过多的冻融周期, 建议不超过 3~5 个周期, 因为血清反复冻融后免疫抗体效价会比正常情况下低 1 个滴度。冻结血清融化后, 会出现蛋白质局部浓缩、分布不均的现象, 因此在检测前应轻轻混匀, 避免产生气泡以及因剧烈振荡引起的血清蛋白变性。

1.3 非特异性凝集素的处理 有些禽(如水禽、鸽子)的血清可能对鸡红细胞产生非特异性凝集, 这种特性

的确定可用待检血清做血凝试验。如果待检血清出现凝集红细胞的现象,则说明有非特异凝集素存在,需用鸡红细胞对待检血清进行吸附,以除去非特异凝集素。方法:每 0.5 mL 的血清中加入 25 μ L 鸡红细胞,轻摇后静置至少 30 min,2000 r/min 离心 2~5 min,收集上清液,即为处理后的血清。由于非特异性凝集素的处理耗时且结果不一定完美,因此在实际工作中优先采用被检禽种的红细胞悬液进行试验。

2 试剂的配制和保存

2.1 缓冲液的配制 试验使用的稀释液应为 0.01 mol/L、pH 值 7.0~7.2 的等渗磷酸缓冲液(PBS),建议不使用生理盐水。因为稀释液的 pH 值在 6.8 以下,红细胞易自凝,pH 值在 7.4 以上时凝集的红细胞洗脱加快,而 pH 值为 7.0~7.2 时红细胞沉淀最充分,图形最清晰。此外,缓冲液对其他酸碱物质具有一定的缓冲能力,有维持反应体系 pH 值的作用,而生理盐水不具备缓冲功能。PBS 配制时间过长,pH 值会发生变化,使凝集和沉淀不明显,因此 PBS 尽可能现配现用,浓缩液不要保存太久。

2.2 1%红细胞悬液的配制 来源于不同个体鸡的红细胞对抗原的敏感性不尽相同。因此试验时最好用 3~4 只以上成年 SPF 公鸡或未进行禽流感和新城疫等疫苗免疫的健康公鸡的血。采血时将血液与等体积阿氏液混合,以防血液凝固。用灭菌的 0.01 mol/L pH 值 7.0~7.2 的 PBS 液洗涤 3 次,每次离心后都要将残留的白细胞吸除。配制 1%红细胞悬液时,要将吸头放入离心管的最底部吸取红细胞进行稀释配制。使用前必须混匀红细胞,并不时摇动,不用的红细胞悬液应置 4 $^{\circ}$ C 冷藏,且不超过 2 d,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。

2.3 4 个血凝单位抗原的配制 4 个血凝单位抗原需现配现用。先对抗原作血凝试验,以抗原与红细胞完全凝集的孔作为抗原效价,再根据抗原效价,配成 4 个血凝单位抗原。为保证 4 个血凝单位抗原的配制准确无误,需作抗原回归试验:在微量反应板的 1~4 排的 2~6 孔内各加入 PBS 25 μ L;将配制的 4 个血凝单位抗原 50 μ L 加入第 1 孔,然后依次倍比稀释至第 6 孔,最后弃去 25 μ L;各孔再加 PBS 25 μ L,最后加 1%红细胞悬液 25 μ L 混匀,室温静置 30 min 观察结果。若第 1、2、3 孔出现完全凝集,第 4 孔出现 50%的凝集,则表明该 4 个血凝单位抗原配制准确,可用于 HI 试验。否则,需重新测定抗原效价,重新配制 4 个血凝单位抗原。

3 器材的选择和使用

3.1 微量移液器 微量移液器在使用前或使用一段时间后均应进行校正或鉴定。在使用微量移液器时,每个吸头要安装牢固,防止漏气,手压下的力度要均匀,

否则移液量就不准。吸取液体时,吸头需碰触管壁以除去多余的液体。倍比稀释血清时,在吸取第一孔时要先按下移液器,再插入凝集板孔,吸取后加入第二孔,在反复抽取过程中,移液器吸头不要离开液面,防止产生气泡,以免造成移液量不准,混合不均。同一批 HA-HI 试验最好使用同一把单道(多道)微量移液器。

3.2 微量反应板 一般使用 96 孔 90 $^{\circ}$ C V 型微量反应板,建议使用一次性优质塑料反应板,可避免使用有机反应板因清洗不净和过度磨损而影响试验结果。若需重复使用有机反应板,其清洗程序是:试验完毕后,立即将反应板用自来水反复冲洗干净,甩净孔中残存的自来水,然后放到 2%~3%盐酸溶液中浸泡 24 h 以上,捞出后用自来水冲洗多次,最后以蒸馏水冲洗 2~3 次,在温箱中烘干备用。反应板使用时间过长,洗刷不及时或洗刷不彻底,可能会使反应前后跳孔,无法正确判定试验结果。

3.3 吸头、振荡器与恒温箱 吸头质量要好,使用后经超声波清洗、高压灭菌后可反复使用,但要定期淘汰、及时更新。振荡器要求工作时平稳匀速、无异常抖动、振荡,一般匀速振荡 1 min 即可。恒温箱温度能精确保持设定温度。

4 试验温度与时间的控制

4.1 温度 温度对 HI 滴度的影响较大,呈正相关。温度从 4 $^{\circ}$ C 上升到 37 $^{\circ}$ C,HI 滴度平均上升 2.3 \log_2 ,约每提高 5 $^{\circ}$ C 平均上升 0.35 \log_2 。但在 37 $^{\circ}$ C 时,凝集的红细胞易洗脱,4 $^{\circ}$ C 以下红细胞易产生自凝现象。同时,温度高低也会影响反应速度,温度过低反应速度减慢,温度过高会使反应结果洗脱加快,所以检测时实验室温度要控制在室温 20~25 $^{\circ}$ C,也可将反应板放恒温箱中控制试验温度。检测时避免处于通风口下或其附近,以免过冷或过热引起蒸发。

4.2 时间 HI 滴度随抗原抗体作用时间的延长而升高,温度低,递增慢,达 HI 最高值所需时间长;温度高,递增快,达到最高值所需时间短。一般选择抗原抗体在室温 20~25 $^{\circ}$ C 作用 30 min 后,再加红细胞悬液。结果判定时间与抗原的洗脱快慢及反应温度有关,一般在室温 20~25 $^{\circ}$ C 条件下 20~45 min 后判定结果。HA 试验以红细胞对照完全沉淀为标准,HI 试验以抗原对照孔出现完全凝集,PBS 液对照孔出现完全沉淀为标准。

5 结果的判定

5.1 对照结果 每次进行血凝和血凝抑制试验时要设置阴、阳性对照,红细胞对照和抗原对照。阴、阳性对照试验的目的是检验试验用的抗原与阴、阳性血清的特异反应性;红细胞对照是检验反应体系中 PBS 和反应板是否存在非特异性因子,以及检验 1%红细胞是否出现自凝现象;抗原对照是检验抗原与 1%红细胞的特异反应性。只有对照结果全部成立,(下转第 33 页)

3.2.2 氨处理 利用氨气或氨水处理被黄曲霉毒素污染的玉米、豆粕、花生粕等,能使毒素内酯环裂解,达到去毒的目的。

3.2.3 氧化剂 氧化剂能破坏所有黄曲霉毒素,是黄曲霉毒素有效的钝化剂。过氧化氢对污染饲料的毒素能有效抑制。

3.2.4 酿酒酵母 当 0.1%酿酒酵母添加到被黄曲霉毒素污染的日粮中后,中毒的程度受到抑制,提高了营养物的生物利用率,使丙氨酸转氨酶、天门冬氨酸转氨酶、乳酸脱氢酶和肌酸磷酸激酶的检出量增加。酿酒酵母不吸附黄曲霉毒素,其作用在于中和毒素或降低毒性,可能是酶的增加促进了饲料利用率。众所周知,真菌可产生大量减轻黄曲霉毒素毒性的生物酶;另一种可能性是,酿酒酵母通过与黄曲霉毒素结合产生螯合作用,抑制了毒性。

3.2.5 有机溶剂去毒 用有机溶剂可提取黄曲霉毒素。可用的溶剂包括 95%乙醇、90%乙醚、80%异丙酮、乙烷乙醇、乙烷乙醚等,利用这些溶剂,可将油中几乎所有的黄曲霉毒素除去。此外,氨甲烷和福尔马林也可作为黄曲霉毒素的脱毒剂。

3.2.6 石灰水去毒 用 0.9%的石灰水浸泡霉变玉米 8h,去毒效果可达 97.3%~99.0%。

3.2.7 解毒添加剂 谷胱甘肽和它的前体可减轻黄曲霉毒素的毒性作用,诱导肝脏微粒体酶的代谢作用,使黄曲霉毒素尤其是黄曲霉毒素 B1 发生变化,从而减少毒性产物。

3.3 生物学方法 利用微生物的生物转化作用,可将霉菌毒素转变为毒性低或无毒的物质。将被黄曲霉毒

素污染的高水分玉米进行乳酸发酵,在酸的催化下,黄曲霉毒素 B1 转变为毒性较小的黄曲霉毒素 B2。不仅降低了毒性,而且改善了饲料的适口性。能作为微生物去毒的菌种有葡萄犁头菌、灰蓝毛菌、黑曲霉、米根霉、橙色黄杆菌等,这些微生物的转化可减轻黄曲霉毒素的毒性。虽然黄曲霉毒素的生物降解研究已经有了很大进展,但是由于酶作用条件苛刻等原因,离实际生产应用还有很长一段距离。目前,国内外用生物学方法降解黄曲霉毒素在饲料工业中的应用还很少。

参考文献:

- [1] 卿中全,于炎湖.黄曲霉毒素对家禽生产性能和健康的影响[J].中国饲料,2000,(3):35-37.
- [2] 倪耀娣,宋春丽,卫数鹏,等.黄曲霉菌毒素中毒及减毒处理[J].养禽与禽病防治,2005,(3):31.
- [3] 秦裕荣,陈少光,庄秋文.霉变饲料引起仔鸭黄曲霉毒素中毒报告[J].中国禽业导刊,2005,22(15):25.
- [4] 谷长勤,胡薛英,张万坡,等.实验性雏鸭黄曲霉毒素中毒肝损伤的动态变化[J].中国兽医学报,2008,28(5):566-568.
- [5] 赵飞,焦彦朝,连宾,等.黄曲霉毒素检测方法的研究进展[J].贵州农业科学,2006,(5):123-126.
- [6] 付建福.玉米黄曲霉毒素的检验与预防措施[J].猪业科学,2008,(3):32.
- [7] 王宁,马秋刚,张建云,等.黄曲霉毒素的传统去毒方法和生物降解研究进展[J].新饲料,2008,(7):17-19.
- [8] 史莹华,许梓荣,冯建蕾,等.新型吸附剂 AAN 对黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的体外吸附研究[J].中国农业科学,2005,38(5):1069-1072.

(上接第 30 页) 试验结果才有效,否则应重新进行试验检测。

5.2 试验结果 HA 试验以能使红细胞完全凝集(红细胞全部凝集,均匀铺于孔底,即为 100%红细胞凝集)的抗原最高稀释度作为该抗原的血凝效价,此效价为 1 个血凝单位(HAU)。HI 试验结果判读时,将微量反应板倾斜 45℃,孔底沉淀的红细胞流动性好,呈泪珠样流淌,边缘无凝集颗粒的为凝集完全抑制,以能完全抑制 4 个血凝单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 滴度。另外,要及时观察结果,时间过久会出现结合的红细胞发生自动脱落现象,与抑制结果产生混淆,影响结果判定。

6 结语

影响血凝和血凝抑制试验的因素很多,因此在进行禽流感免疫抗体监测过程中一定要注意质量控制,规范操作程序,发现问题及时纠正处理。只有获得真实可靠的实验数据,才能科学评价疫苗免疫质量和免疫效果为

各地禽流感防控措施提供有力的技术支撑。

参考文献:

- [1] 杭柏林,胡建和,刘丽艳,等.影响血凝抑制试验因素的研究进展[J].贵州农业科学,2009,37(3):111-113.
- [2] 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.
- [3] 王延树,张芳.血凝和血凝抑制试验操作要领[J].中国动物保健,2009,(8):75-76.
- [4] 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.
- [5] 王进香,金秀萍.血凝抑制(HI)抗体水平监测准确性的体会[J].畜牧与兽医,2008,40(6):107-108.
- [6] 林智,黄玉梅.浅谈影响血凝抑制试验的因素[J].今日畜牧兽医,2009,(8):45-46.
- [7] 杨新刚,靳月生,姚学军,等.禽流感血凝抑制试验(HI)的影响因素分析[J].北京农业,2009,(2):40-41.
- [8] 楚电峰,刘相娥,王红,等.微量血凝和血凝抑制试验常见问题探究[J].中国动物检疫,2008,25(4):43-44.