

禽流感血凝和血凝抑制试验的影响因素分析

李 春 张永宁 邢 坤(四川省动物疫病预防控制中心, 四川 成都 610041)

中图分类号:S858.3 文献标识码:A 文章编号:1008-0414(2010)10-0006-02

禽流感对养禽业的危害十分严重, 疫苗免疫是目前预防和控制禽流感发生的最有效途径, 免疫后抗体水平的高低直接关系到实际的免疫效果, 现主要借助于抗体监测来了解或考核免疫效果, 我国各地动物疫控机构也将监测结果作为工作绩效考核的一项重要指标, 以免疫监测促进免疫措施的落实。因而, 免疫抗体监测的准确性、有效性、可靠性和代表性等对禽流感防控工作起着十分重要的作用。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, 已在各地动物卫生防疫机构、出入境检验检疫部门和养殖场广泛使用, 但影响试验结果的因素也很多, 本文将就禽流感血凝和血凝抑制

试验的影响因素浅析如下。

1 样品的采集和处理

1.1 样品的采集

监测样品的采集要按照适时采样、适量采样、无菌采样和安全采样的原则采集活禽全血。血样自然凝同后, 3 000 rpm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, 可能是血内的脂类成分过高所致, 可用针尖挑至EP管中挤压, 短时间内重复离心后即可分离^[1]。被检血清要求新鲜、无杂质、无溶血、不腐败, 盛装容器要清洁无菌, 正常鸡血清为清凉透明或微黄色, 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^[2]。

1.2 样品的保存

(2)调整免疫程序, 因合约饲养场的发病时间高度集中, 为使免疫能力覆盖发病时间, 要求优先考虑加强免疫距发病的日龄延长至14 d以上, 并允许两套免疫方案同时试行, 以甄别取舍。同时改善环境控制与药物的合理筛选与积极使用, 尤其要避免引起胃肠道麻痹的药物, 如H2受体抑制剂等, 以防机体在消化道清泄自净能力的丧失, 进而影响自愈能力或延迟病程。

(3)环境消毒, 如果环境被IBDV严重污染, 由于环境野毒含量大, 毒力强, 与疫苗毒竞争力强, 在疫苗未发生作用前期就已经被野毒感染, 这样疫苗将起不到应有的作用。所以要对环境进行彻底清洗、消毒, 把环境中的IBDV量降到最低程度。尤其注意墙角、死角的消毒。鸡群的饲养管理要有严格的卫生隔离措施, 防止强毒的传入。

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的振荡而引起血清蛋白的变性^[3]。

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的凝集, 这种特性的确定可用待检血清做血凝试验, 如果待检血清也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的鸡红细胞, 轻摇后静置至少30 min, 2 000 rpm离心2~5 min, 收集上清液, 即为处理后的血清。非特异性凝集素的处理耗时且结果不一定很完美, 因此在实践工作中, 应该优先采用被检禽种的红细胞悬液进行试验^[4]。

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), 不建议使用生理盐水。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。因此实验时最好用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 pH7.0~7.2的PBS液洗涤3

收稿日期: 2010-08-26

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

受到显著的抑制。

2 结论分析

经过调查分析, 初步的结论: (1)当地生产区鸡传染性法氏囊病毒的流行株(优势毒株)与制备疫苗所采用毒株的同源性差异距离扩大或疫苗毒株生物学特性表达能力不足; (2)免疫程序不能覆盖发病; (3)简陋的生产系统, 不能屏蔽外界温湿条件的变化。

3 解决方法

关于解决方法, 主要从这三个方面来考虑:

(1)考虑不同疫苗的选择或多价疫苗的临时组合以扩大抗原谱, 如瑞普公司生产的法必妥B87株与KS96株的复合接种, 比例可按1:2或1:1的要求进行。

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4℃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。先对抗原做血凝试验,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,须做抗原回归试验: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加入第一孔,然后依次倍比稀释至第六孔,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。若第一、二、三孔出现完全凝集,第四孔出现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^[9]。

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些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,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℃ 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。若需重复使用的有机反应板,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,放到2%~3%的盐酸溶液中浸泡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,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^[1]。

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、高压灭菌可反复使用,使用一段时间后要淘汰、及时更新。振荡器要求工作时平稳匀速、无异常抖动、震颤,一般匀速震荡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,从4~37℃,HI滴度平均上升2.3 log₂,约每提高5℃,平均上升0.35 log₂。但在37℃时,凝集的红细胞易洗脱;4℃以下时红细胞易产生自凝现象。同时,温度的高低也影响到反应的速度,温度过低反应速度减慢,温度过高会使反应结果洗脱加快^[9],所以检测时实验室温度常控制在室温(20~25℃),也可将反应板放恒温箱控制试验温度。检测时避免处于通风口下或其附近,以免由于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℃)作用30 min后加红细胞悬液。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℃)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^[7,9]。

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和反应板是否存有非特异性因子,以及检验1%的红细胞是否出现

自凝现象。抗原对照是检验抗原与1%的红细胞的特异反应性。只有对照结果全部成立,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试验要以能使红细胞完全凝集(红细胞全部凝集,均匀铺于孔底,即100%红细胞凝集)的抗原最高稀释度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^[8]。

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试验数据,才能科学评价疫苗免疫质量和免疫效果,动态掌控禽群的禽流感免疫抗体水平,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.贵州农业科学,2009(3):111~113
- [2]许连珍.HA、HI微量法检测鸡群抗体的影响因素.中国家禽,2006(18):31~32
- [3]王廷树,张芳.血凝和血凝抑制试验操作要领.中国动物保健,2009(8):75~76
- [4]黄榆森,庄克珩,谢淑敏.不同种禽类红细胞悬液对HI结果的影响.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.畜牧与兽医,2008(6):107~108
- [6]林智,黄玉梅.浅谈影响血凝抑制试验的因素.今日畜牧兽医,2009(8):45~46
- [7]杨新刚,新月生,姚学军,等.禽流感血凝抑制试验(HI)的影响因素分析.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.中国动物检疫,2008(4):43~44