

血凝抑制试验中易出现的问题及其纠正措施

蒋连芬 (山东省招远市畜牧兽医总站 265400)

1 标准阳性对照血清的抗体效价与原结果误差大于1个滴度

4个血凝单位(HAU)抗原配制不准确。4个HAU抗原要现用现配,混悬液要混匀,配好的抗原室温下放置不得超过4个小时,不可反复冻融。为防止4个HAU抗原配制不准确,在作HI试验前必须做回归试验。在微量反应板的1~4排的1~4孔内各加入50微升PBS液。取已配好的4个HAU抗原混匀液50微升加入反应板的第1孔内混匀后吸取50微升加入第2孔,依次倍比稀释至第4孔,从第4孔内吸取50微升混匀液弃掉,每孔内加入50微升1%红细胞混悬液,震荡混匀,20~25℃静置20分钟后观察结果。若1孔、2孔红细胞完全凝集,而3孔、4孔不凝集,则说明4个HAU配制准确,否则,需重新测定抗原效价,重新配制4个HAU抗原,并作回归试验,直至结果准确。

阳性对照血清效价降低。阳性对照血清经反复冻融、长期保存或保存不当,会使抗体效价降低。因此,阳性对照血清不可反复冻融,若要长期保存必须保存在-15℃以下,不得超过保质期,冷藏保存不得超过4天。

2 结果出现慢

在环境温度20~25℃,经过15~30分钟即可读出抗原效价和血清抗体滴度。当温度过低,如低于15℃时,出现结果就要慢,往往需要超过40分钟才能出现清晰的结果。因此,为了在较短的时间内出现结果,应将试验中的环境温度控制在20~25℃。

3 泪滴状流淌(完全血凝抑制)线细

一般是由于环境温度低,或是反应作用时间短,结果还没有完全显示。需静置一段时间,读数。

4 结果出现快,并且整板无凝集现象

试验过程中的环境温度超过30℃时,试验结果出现的要快,往往在15分钟左右就可读数。一旦时间过长,结果就会消失,使整板无凝集现象,给人一种误以为效价为0,或抗体滴度为 $12\log_2$ 。要求试验环境温度不得超过30℃,反应15~30分钟及时读数,不可长时间拖延读数时间。

5 整板无血细胞凝集现象

当试验环境在20~25℃,经15~30分钟读数时,整板无红细胞凝集现象,有如下4种可能。8份血清的抗体滴度为 $12\log_2$;试验过程中全板少了加4个HAU抗原的步骤;4个HAU抗原已经失效;环境温度过高,读数时间拖延。

当整板无红细胞凝集现象时,要先查明原因。可用微量移液器吸取每孔内的混悬液,当每孔内的混悬液容量为50微升 $\times 3$ 时,可能是前3种原因;每孔内的混悬液容量为50微升 $\times 2$ 时,则是第2种原因。无论哪种原因引起的全板无凝集现象,都须进行重新测定。由第3种原因引起的,要重新配制4个HAU抗原。并注意操作过程中要专心,随时检查是否漏掉某些步骤,控制好试验过程中的环境温度,及时看结果。

6 8份被检样品结果全为 \log_2

当8份被检样品全是第1孔完全血凝抑制,而2~12孔无凝集。用移液器吸取第1孔内容量为50微升 $\times 4$,而2~12孔容量为50微升 $\times 3$ 。此种情况一般发生在8道微量移液器操作时,遗漏了将被检样品逐孔倍比稀释,使第1孔内抗体含量高,完全抑制了抗原凝集红细胞的能力,而出现完全血凝抑制;2~12孔内引无抗体,只有抗原,导致2~12孔全部红细胞凝集。也可能是8份被检血清的抗体滴度全为 $1\log_2$,但此种情况极少出现。因此,要分析原因,进行复检。

加入1%红细胞的混悬液始终为暗红色,既无红细胞凝集现象,也无血凝抑制现象,一般是1%红细胞混悬液溶血。要求采血、配制1%红细胞时,尽量减少细菌污染。采集血液时要尽量采集至少3只SPF公鸡或无禽流感、新城疫等抗体的健康公鸡血与等量阿氏液(葡萄糖2.05克、柠檬酸钠0.8克、柠檬酸0.055克、氯化钠0.42克,加纯化水至100毫升,散热溶解后调pH值至6.1,69千帕15分钟高压灭菌,4℃保存备用)混合,或按1/10比例加入灭菌的3.8%~4.0%的柠檬酸钠混匀以防血液凝固。用灭菌的生理盐水或pH值7.2、0.01摩尔/升的PBS液洗3次。若要长时间保存,可将洗涤好的盛有红细胞的试管内加入多量无菌阿氏液压底,4℃保存,至少可保存1星期。