

鸚鵡血清非特异性凝集因子消除试验研究^{*}

贾英科¹, 高梅秀¹, 王海利², 王福生², 王雪¹, 周蓉¹, 苏明¹

(1 天津农学院, 天津 300384; 2 天津市蓟县畜牧局, 天津 301900)

[摘要] 我国检验检疫部门在工作中发现鸚鵡血清中存在非特异性凝集因子, 严重影响血凝抑制试验中红细胞被抑制凝集, 从而造成试验结果的误判。为解决这一问题, 本试验采用将待检鸚鵡血清用20%鸡红细胞生理盐水悬液处理15 min, 可消除全部30份被检血清中的非特异性凝集现象。对除去非特异性凝集因子的血清与未处理血清所做的HI试验的准确率进行比较, 差异极显著(t 检验 $P < 0.01$)。表明本研究采用的方法可有效保证鸚鵡血清HI试验的准确性。

[关键词] 鸚鵡; 血凝抑制试验; 非特异性凝集; 灭活试验

[中图分类号] S851.34⁺7.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)09-0066-03

近年来, 在鸚鵡新城疫检疫过程中发现其血清中存在非特异性凝集因子——自然凝集素, 它具有凝集鸡红细胞(RBC)的作用, 在血凝抑制试验(HI)中凝集了抗原作用以外的部分或全部RBC, 且比例较高, 检疫结果错判率高达59.4%^[1~4]。针对以上问题, 为寻求一种简便、快速、有效消除鸚鵡血清中非特异性凝集作用的方法, 从而保证血凝抑制试验(HI)结果的准确性, 特设计了本试验, 现将试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验器材

96孔V形微量反应板(底角 $\leq 90^\circ$)、1和2 mL一次性无菌注射器、ependorf管、ependorf水平转子离心机、微量板振荡器、试管振荡器、50和100 μ L微量加样器等。

1.2 试剂及配制

新城疫血凝抗原由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

新城疫标准阳性血清由北京实验动物中心提供。

1%鸡红细胞生理盐水悬液(1%, RBC)配制: 取3只健康成年鸡心脏采血, 放入Alsever氏液中混匀, 鸡血与Alsever氏液的体积比为1:2.4, 保存。用时将鸡血Alsever氏混合液摇匀, 倒入刻度离心管, 以500 r/min离心5 min, 吸出上层的Alsever氏

液和血球沉淀物表面的白细胞层, 再加入约相当于沉淀物20倍的生理盐水, 用吸管吸打混匀, 再以500 r/min离心, 如此反复3次, 第3次离心10 min, 读取沉淀红细胞的体积刻度, 按体积比1:99加入生理盐水混匀, 制成体积分数1% RBC悬液。

被检血清: 取30只鸚鵡, 各翼下静脉采血2 mL, 分别装入ependorf管中, 待血清析出时用ependorf离心机以10 000 r/min离心10 min, 吸出上层血清备用。

抗原凝集效价的测定 按常规方法测定抗原凝集RBC的效价, 最后用生理盐水分别配制8单位和4单位抗原工作液^[5]。

1.3 预备试验——处理鸚鵡血清方法的筛选

1.3.1 非特异性凝集血清筛选与确定 在微量反应板的每孔加生理盐水和被检血清各50 μ L混匀后, 再于每孔加入1% RBC 50 μ L, 同时设红细胞对照。在微量板振荡器上振荡1 min, 置室温30 min后将微量反应板作45°竖立, 待红细胞对照孔流成塔状时即判定结果。血清孔中红细胞不能流成塔状, 即全部或部分粘附于孔底的为非特异凝集, 该血清即为下一步试验用含非特异性凝集因子的被检血清。

1.3.2 鸡红细胞悬液浓度的筛选与确定 制备1%, 5%, 10%, 15%, 20%不同浓度的鸡红细胞生理盐水悬液。取50 μ L含非特异性凝集因子的被检血清分别与上述不同浓度的鸡红细胞生理盐水悬液等量混合于ependorf管中, 振荡1 min, 室温静置30

^{*} [收稿日期] 2003-08-18

[基金项目] 天津市自然科学研究计划项目(02002)

[作者简介] 贾英科(1955-), 男, 河北无极人, 教授, 主要从事动物医学、检验检疫研究。

m in, 用 eppendorf 离心机 10 000 r/m in 离心 5 m in。吸取上清液 50 μ L, 加到 96 孔微量反应板上, 再加 1% RBC 50 μ L, 振荡 1 m in, 摇匀, 室温静置 30 m in, 观察经过处理的血清(等于 1:2 稀释)对鸡红细胞的凝集情况。选择消除凝集作用效果完全, 且鸡红细胞生理盐水悬液浓度最低者作为试验用鸡红细胞生理盐水悬液的浓度。

1.3.3 被检血清处理时间的确定 将含非特异性凝集因子的被检血清于 56 $^{\circ}$ C 水浴锅中加热 30 m in, 然后取 50 μ L 与 20% RBC 等量置于同一个 eppendorf 管中, 依次制备若干个 eppendorf 管, 振荡 1 m in, 分别在室温静置 5, 10, 15, 20, 25, 30 m in 时以 10 000 r/m in 离心 5 m in, 吸取上清液 50 μ L 加到 96 孔微量反应板上, 再加 1% RBC 50 μ L, 振荡 1 m in, 室温静置 30 m in, 检测被检血清的血凝性。以完全不凝集且处理时间较短者作为被检血清的处理时间^[5~8]。

1.4 正式试验

将被检鸚鵡血清于 56 $^{\circ}$ C 水浴锅中加热 30 m in, 然后与 20% RBC 等量混合于 eppendorf 管中, 振荡 1 m in, 静置 15 m in 后用 eppendorf 离心机 10 000 r/m in 离心 5 m in, 取上清液备检。

1.4.1 血凝抑制试验(HI) 在 96 孔微量反应板的第 1 排第 1 孔加入经过处理的被检血清 100 μ L, 第 2 孔加入 8 单位抗原 50 μ L, 第 3~12 孔加入 4 单位抗原 50 μ L, 然后从第 1 孔吸出 50 μ L 至第 2 孔混匀后依次倍比稀释至第 12 孔, 从第 12 孔吸出 50 μ L 弃去。第 2 排的第 1 孔加入 50 μ L 生理盐水溶液和未经处理的灭能被检血清 50 μ L, 第 2 孔加入 8 单位抗原 50 μ L, 第 3~12 孔加入 4 单位抗原 50 μ L, 将第 1 孔混匀后吸出 50 μ L 至第 2 孔混匀并依次倍比稀释至第 12 孔, 从第 12 孔吸出 50 μ L 弃去。第 3~6 排操作同上。每 2 排为 1 组, 检测同 1 只鸚鵡的血清, 其中一排为经过非特异性凝集因子处理的被检血清, 另一排为未经处理的被检血清。

1.4.2 对照试验 (1) 阳性血清对照。在微量反应板的第 7 排第 1 孔加阳性血清和生理盐水各 50 μ L, 第 2 孔加 8 单位抗原 50 μ L, 第 3~12 孔各加入 4 单位抗原 50 μ L。第 1 孔混匀后吸出 50 μ L 至第 2 孔, 依次倍比稀释至第 12 孔, 从第 12 孔吸出 50 μ L 弃去。(2) 抗原对照。在微量反应板的第 8 排第 2~6 孔, 每孔加入 50 μ L 生理盐水, 第 1 孔和第 2 孔各加 4 单位抗原 50 μ L, 从第 2 孔起依次倍比稀释至第 6 孔, 最后弃去 50 μ L, 这样, 抗原对照孔的抗原含量依次为 4,

2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 单位。(3) 红细胞对照。在微量反应板的第 8 排第 7~12 孔, 每孔加入生理盐水各 50 μ L。(4) 被检血清对照。1~6 排第 1 孔均为被检血清对照。

全部操作完成后置室温静置 15 m in, 然后每孔分别加 1% RBC 50 μ L, 振荡 1 m in, 置室温 30 m in 观察结果。

1.4.3 试验结果判定 对照出现下列结果时进行判定。

(1) 阳性血清对照。阳性血清孔血凝被抑制, 其血清滴度与已知滴度相符, 若有差异, 不应超过 1 个滴度。阴性血清孔完全凝集红细胞。

(2) 抗原对照。第 1, 2 孔红细胞完全凝集, 第 3 孔完全凝集或 75% 凝集, 第 4~6 孔不完全凝集或渐至不凝集。

(3) 红细胞对照。完全不凝集。

(4) 被检血清对照。经消除非特异性凝集因子处理的被检血清对照完全不凝集。以完全抑制红细胞凝集的最大稀释度为被检血清的新城疫血凝抑制抗体滴度。

判定时将微量板作 45 $^{\circ}$ 竖立, 当红细胞对照孔和被检血清对照孔红细胞流成塔状时, 立即判定被检血清滴度。记录经过消除非特异性凝集因子处理的和未经处理的被检血清的滴度, 并进行比较。

1.4.4 对结果数据进行生物统计学处理 以 $-\log_2$ 值表示, 血清 HI 抗体滴度为 1:4, 换算为 2; 血清 HI 抗体滴度为 1:8, 换算为 3; 血清 HI 抗体滴度为 1:16, 换算为 4; 余下类推; < 1:4 为无滴度。将换算值代入 t 检验公式, 计算 P 值^[5~8]。

2 结果与分析

2.1 预备试验结果

用 20% RBC 处理被检鸚鵡血清 15 m in, 可以完全消除其非特异性凝集现象。

2.2 HI 试验结果

经过处理的 30 份鸚鵡血清中均没有非特异性凝集反应, 未经处理的 30 份鸚鵡血清中 16 份有非特异性凝集反应, HI 试验结果错判率 53.3%。对此结果进行 t 检验, $P < 0.01$, 差异极显著。

经过处理的血清抗体滴度较未处理的无明显差异(t 检验, $P > 0.05$), 其中有 1 份经过处理的鸚鵡血清的抗体滴度由处理前的 < 1:4 提高到处理后的 1:4, 其余无明显变化。

3 结 论

HI 试验是根据试验中鸡红细胞凝集作用被其血清中血凝抑制试验(HI)抗体所抑制,来判定被检血清中抗体滴度的,因此被检动物血清自然凝集素的存在,影响红细胞被特异性抑制凝集,从而使试验出现假阴性或降低血清的抗体滴度,造成阳性动物的漏检或误检,直接影响动物检验检疫的准确性和权威性,给国内外动物贸易带来不良影响。本研究采用新的试验方法,用20% RBC 处理被检鸚鵡血清15 min,简便、快速、有效地消除了血清中非特异性凝集现象,保证了血凝抑制试验(HI)结果的准确性。

经检索国内外有关文献资料,未见有消除鸚鵡血清中非特异性凝集因素的有关报道。因此,本试验结果对鸚鵡新城疫HI 检疫的准确性提供了新的途径和试验数据^[9,10]。

新城疫是OIE 公布的A 类疫病,也是我国农业部公布的重要传染病。新城疫血凝抑制试验,是我国出入境和国内动物检验检疫的重要检验项目。本研究以新城疫血凝与血凝抑制试验为基础,并采用新的试验方法有效地解决了被检鸚鵡血清中的非特异性凝集现象,不仅对鸚鵡,而且对禽类和观赏鸟类新城疫检疫结果的准确率都具有重要的实践意义和实用价值。

[参考文献]

- [1] 费恩阁 动物传染病[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1995 551- 552
- [2] 于 船 动物疾病防治[M]. 北京:北京农业大学出版社,1995 1- 5
- [3] Graham Purchase H. 禽病原分离鉴定实验手册[M]. 第3版 唐桂运,武 华,译 北京:北京农业大学出版社,1993 10- 15
- [4] 颜思通 去除血清中非特异凝集现象的方法[J]. 动植物检疫,1999, (6): 45- 46
- [5] 王正平 用微量及平板HA、HI试验诊断鸡新城疫的研究[J]. 中国预防兽医学报,1998, (1): 6- 9
- [6] 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, (5): 1- 5
- [7] 张敬礼 鸽新城疫病毒分离鉴定[J]. 河南农业大学学报,2000, 34(3): 295- 297.
- [8] 陈铁霞 鸽新城疫病原分离与鉴定[J]. 中国兽医科技,2001, 31(2): 31- 32
- [9] 王林川 鸽I 型副粘病毒病诊断和防治[J]. 中国动物检疫,1997, 14(4): 19- 20
- [10] 胡 光 信鸽新城疫的诊断及防治[J]. 中国兽医杂志,1997, 23(8): 42

Removing nonspecific agglutinating factor activity of parrot serum in HI tests

JIA Ying-ke¹, GAO Mei-xu¹, WANG Hai-li², WANG Fu-sheng², WANG Xue¹, ZHOU Rong¹, SU Ming¹

(1 Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China;

2 Husbandry Bureau of Jixian County, Tianjin 301900, China)

Abstract: CQ section found that parrot sera had nonspecific agglutinating factor. It can affect red blood cell being inhibition agglutinating, thereby affect judging test's result. To solve this problem, this experiment used 20% chicken RBC saline solution to process 30 parrot sera for 15 minutes, it could remove all of nonspecific agglutinating factor activity in parrot sera. The accuracy of HI tests differs significantly between parrot sera when being removed the nonspecific agglutinating factors and the untreated sera (t examination, $P < 0.01$). This indicates that the method used in the experiment could prove to be effective to guarantee the accuracy of parrot sera HI tests.

Key words: parrot; HI tests; nonspecific agglutination; activity removing experiment