

新版国家标准《新城疫诊断技术》血凝和血凝抑制试验的理解与操作实践

陈文华¹, 邱冬², 吕宗德³, 黄思彬¹, 李凤玲³, 陈昌海^{2,*}

(1. 应节(南京)智能科技有限公司, 江苏 南京 210012;

2. 江苏省动物疫病预防控制中心; 3. 南京市动物疫病预防控制中心)

摘要: 血凝(HA)和血凝抑制试验(HI)主要是用于新城疫病原鉴定和抗体效价测定, 新版《新城疫诊断技术》(GB/T16550-2020)对 HA 和 HI 试验判定结果进行了修改和细化, 使其更加标准和规范。为尽快理解新版标准要求, 熟练掌握操作要领, 对新、旧版标准中 HA 和 HI 试验进行了比较, 新版标准增加了对 HA 和 HI 试验 4HAU 抗原配制的标定、静置时间以及结果判定的改变。新版标准在操作步骤上更为精准详细, 4HAU 抗原配置更加准确, 从而使得 HI 试验结果更加科学。本文结合实际检测, 为广大实验室检验人员、大专院校学生及科研人员更好地理解新版标准, 更熟练地操作, 从而提高试验结果准确性提供了参考。

关键词: 《新城疫诊断技术》; 新旧版标准; 血凝和血凝抑制试验; 理解与操作

[中图分类号] S858.31 [文献标识码] A [文章编号] 1004-6704(2023)03-0023-03

Understanding and Practice of Hemagglutination and Hemagglutination Inhibition Test in the New Version of the National Standard "Newcastle Disease Diagnostic Technology"

CHEN Wen-hua¹, QIU Dong², LV Zong-de³, HUANG Si-bin¹,

LI Feng-ling³, CHEN Chang-hai^{2,*}

(1. Yingjie (Nanjing) Intelligent Technology Co., Ltd., Nanjing Jiangsu 210012, China;

2. Jiangsu Provincial Animal Disease Control Center; 3. Nanjing Animal Disease Control Center)

Abstract: Hemagglutination (HA) and hemagglutination inhibition test (HI) are mainly used for Newcastle disease pathogen identification and antibody titer determination. Revised and refined to make it more standard and normative. In order to understand the requirements of the new version of the standard as soon as possible, and master the essentials of operation, the HA and HI tests in the new and old versions of the standard were compared. The new version of the standard adds the calibration of the 4HAU antigen preparation of the HA and HI tests, and changes in the standing time and the judgment of the results. The new version of the standard is more precise and detailed in the operation steps, and the 4HAU antigen configuration is more accurate, which makes the HI test results more scientific. Combined with the actual test, this paper provides a reference for the majority of laboratory inspectors, college students and scientific researchers to better understand the new version of the standard and operate it more proficiently, thereby improving the accuracy of the test results.

Key words: "Newcastle Disease Diagnostic Technology"; new and old standards; hemagglutination and hemagglutination inhibition test; understanding and operation

[收稿日期] 2022-09-23

[基金项目] 安徽省高校重大自然科学研究项目(KJ2019ZD68); 江苏现代农业(蛋鸡)产业技术体系疾病防控创新团队 JATS[2021]002; 江苏现代农业(蛋鸡)产业技术体系南京推广示范基地 JATS[2021]011

[作者简介] 陈文华(1992-), 男, 安徽安庆人, 本科, 助理兽医师, 主要从事动物疫病诊断与检测工作。E-mail: CWH@yingjielab.com

*[通讯作者] 陈昌海(1963-), 男, 安徽安庆人, 硕士, 研究员, 主要从事动物疫病防控与新技术研究推广工作。E-mail: cchai63@126.com

新城疫(Newcastle disease, ND)是严重威胁全球养禽业健康发展的禽病之一, 为此世界动物组织(OIE)将其列为必须通报的动物疫病, 我国农业农村部将其列为二类动物疫病。血凝(HA)和血凝抑制试验(HI)是诊断和检测 ND 最重要的方法之一, 也是国际贸易检疫中规定使用的方法, 我国对 ND 实施全面免疫, 并要求开展免疫效果评估, 也是采用

该标准中的 HA、HI 试验,因而具有广泛的应用。2020 年 12 月 14 日国家市场监督管理总局和国家标准化委员会联合发布了新版《新城疫诊断技术》(GB/T16550-2020)。

其中对 HA 和 HI 试验增加了 4HAU 抗原配制的标定,对静置时间和结果判定进行了修改。为使广大从业人员更好地理解 and 掌握新版标准,作者结合本实验实际检测操作实例,就 4HAU 抗原标定,静置时间及结果判定等几个方面进行分述,以期为准理解新版标准,提高试验结果准确性提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂

鸡新城疫血凝抑制试验抗原 生产日期:2021.05.06,生产批号:10132101,有效期至:2023.05.05;鸡新城疫血凝抑制试验阳性血清 生产日期:2021.06.10,生产批号:10152102,有效期至:2023.06.09;SPF 鸡阴性血清 生产日期:2021.04.25,生产批号:10142101,有效期至:2023.04.24,以上均购自青岛立见诊断技术发展中心。3.8% 枸橼酸钠溶液(自配)。0.01mol/L pH 7.2 PBS(自配)。1% 鸡红细胞悬液(RBC)(自配)。

1.2 主要仪器

微量移液器;微型摇荡器;96 孔 V 型血凝板。

1.3 鸡血清样品

来自 13 个养殖场(户)委托检验样品,每场 60 份,共计 780 份。

1.4 方法

按照《新城疫诊断技术》(GB/T16550-2020)所述方法检测。免疫效果评价,按《农业农村部关于印发国家动物疫病监测与流行病学调查计划(2021-2025)的通知》规定,HI 效价 ≥ 25 ,判为个体免疫合格。个体免疫抗体合格数量占免疫群体总数不低于 70%的,判定为群体免疫合格。

1.4.1 HA 试验及 4HAU 抗原标定 本次测定 HA 效价为 1:256,配制 4HAU 抗原液,4HAU 抗原标定具体操作如下:

本次所测抗原效价为 $8\log_2(1:256)$,则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1:64(256 除以 4),稀释时,将 1 mL 抗原加入 63 mL PBS 中即为 4HAU 抗原。配制时要根据实际用量,如做标定用,抗原液

1~2 mL 就够用。(如本次配制抗原液 1.28 mL,取 0.02 mL 抗原,加入 1.26 mL PBS)。

第一步:在 96 孔 V 型板第一排第 1 孔、第 2 孔、第 3 孔、第 4 孔、第 5 孔、第 6 孔分别加入 25 μ L,25 μ L * 2,25 μ L * 3,25 μ L * 4,25 μ L * 5,25 μ L * 6 PBS 液。

第二步:每孔分别加入 4HAU(1:64 倍稀释)25 μ L,同时吹打 3~5 次,充分混匀。

第三步:分别将第一排相应孔中的液体分别取 25 μ L 置第二排相对应的孔中,此时第二排第 1~6 孔抗原液稀释度依次为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 和 1:7。

第四步:再在第 1~6 孔每孔加入 25 μ L PBS 液,第 7 孔加入 50 μ L PBS。

第五步:再在每孔加入 1% RBC 25 μ L。室温静置 20~30 min,观察结果。

结果判定同 HA 试验。本次是第二孔完全凝集(1:3),则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1:48,即将原抗原按 1:48 倍稀释为 HI 试验工作液。

1.4.2 HI 试验 将样品、标准阳性血清、阴性血清分别在 96 孔 V 型板上倍比稀释,加入标定好的 4HAU 抗原后,振荡 15 s,室温静置至少 20 min。加入 1% RBC,振荡混匀后,室温静置 20 min~40 min,对照孔呈显著纽扣状时判定结果。

2 结果与分析

2.1 检测结果

13 个养殖场个体免疫抗体合格率,群体抗体几何平均滴度(GMT),群体免疫抗体变异系数见表 1。由表 1 可知,13 个养殖场个体免疫抗体合格率均达到国家规定 70.00% 的标准,其中有 2 个场个体免疫抗体合格率达 100.00%,10 个场个体免疫抗体合格率均为 90.00% 以上,说明这些场的新城疫免疫效果优良,有一个场个体免疫抗体合格率为 80.00%,经查该场所采样鸡群为初免后 28 日龄雏鸡,尚未加强免疫。

从 13 个群体免疫抗体几何平均滴度看,有 4 个禽场达到 9 以上,有 8 个场达到了 8 以上,表明群体免疫抗体水平非常高,仅个体免疫抗体合格率为 80.00% 的场,其免疫抗体几何平均滴度为 6.09,这再次提示该鸡群要加强免疫。

对同一个场采集的 60 份样品抗体滴度进行变

异系数计算,可以看出,有 12 个禽群变异系数小于 0.3,进一步说明这些群体免疫抗体整齐度非常高,同样个体免疫抗体合格率为 80.00%的禽群变异系数为 0.89,说明群体免疫抗体整齐度较低,需要加强免疫,提高群体免疫抗体整齐度。

表 1 13 个鸡场免疫抗体合格率、GMT、CV 情况表

场名	检测数 (份)	合格率 (%)	抗体几何平均滴 (log ₂)GMT	变异系数 CV(%)
F1		96.67	8.54	0.23
F2		98.33	8.76	0.18
F3		91.67	8.15	0.17
F4		80.00	6.09	0.89
F5		91.67	8.35	0.25
F6		93.33	8.76	0.20
F7	60	95.00	9.17	0.22
F8		100.00	9.34	0.25
F9		96.67	8.91	0.15
F10		100	9.26	0.14
F11		98.33	9.04	0.24
F12		90.00	8.03	0.29
F13		93.33	8.47	0.18

2.2 HA 试验结果判定时间

新版标准 HA 试验振荡混匀后室温静置 20 min~30 min 或 2℃~8℃静置 60 min,而原版标准是室温 20℃~25℃下静置 40 min 后或 4℃静置 60 min,相比较我们在实际检测中认为新版标准更准确。

2.3 HAU 抗原标定

旧版标准没有关于 4HAU 抗原标定,过去我们做试验要求做 4HAU 抗原回滴,将配置好的 4HAU 抗原做 1:2、1:4、1:8、1:16 等 4 个稀释度稀释,当稀释度在 1:4 时定全凝集,认为 4HAU 抗原配制准确,如果不是 1:4 定全凝集,往往凭经验酌情增加或减少抗原量,从而缺乏科学性。新版标准规定了 4HAU 抗原标定方法,“即将 4HAU 进行系列稀释,使最终稀释度分别为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 和 1:7,然后按照 HA 试验。如果配制的抗原液为 4 HAU,则 1:4 稀释度将给出凝集终点,如果 4 HAU 高于 4 个单位,可能 1:5 或 1:6 为终点;如果较低,可能 1:2 或 1:3 为终点。应根据

检测结果将抗原稀释度做适当调整,使工作液确为 4 HAU。为便于大家理解,尽管新版国标给出了 4 HAU 抗原配置和标定方法。但对一些实验室特别是初次接触试验的实验室操作人员来说比较抽象,难以理解。为此笔者所在实验室相关人员对该试验进行了实际操作分析,并对操作过程进行了细化。

2.4 HI 试验

新版标准在加入 4 HAU 抗原后,振荡 15 s,室温静置至少 20 min 或 2℃~8℃至少 60 min;旧版标准室温下(约 20℃~25℃)静置不少于 30 min,4℃不少于 60 min。新版时间减少了 10 min,而且 2℃~8℃设定范围比单纯 4℃符合实际。旧版中使用的“轻叩”“轻晃”等字样都被新版中“振荡”所代替,符合大规模检测时的实际情况。

2.5 HI 结果判定

新版标准给出了血清 HI 效价为阴性或阳性的判定标准,而旧版标准仅仅是给出了判定是否是新城疫病毒的标准,新版标准更符合实际应用。

3 讨论

HA 和 HI 试验是 ND 等重要疫病诊断、监测、检测时所使用的最经典方法,也是 OIE 等推荐国际贸易中所使用的经典方法,具有广泛的使用领域。整个试验过程难度不大,不需要使用高档仪器设备,尤其适用于基层单位及养殖场(户)使用,但由于操作步骤较多,如果操作不规范、不熟练等,最终会影响整体试验结果。

HI 试验中,4 HAU 抗原配制和标定是该试验能否成立的关键所在,新版标准中增加了对 4 HAU 抗原进行标定,这提高了抗原配置的精确性,从而确保了最终结果的准确性。本文对新版标准中 4 HAU 抗原配置和标定进行了细化操作,使得整个操作过程更为简单易懂,便于实验人员理解掌握。

为使 HA、HI 试验结果判定更清晰,建议在 HA 结果判定时,在实验桌上放一张白色 A4 纸,并将血凝板倾斜(小于 60°)从正面读结果;HI 试验读板时,对准光源,将 A4 纸放在血凝板上约 4~5 cm 距离从背面读结果,这样判读结果更清晰。

新版与旧版标准相比,少了新城疫病毒鉴定判定标准。建议改版时,增加“用于检测抗体时,HI 效价 $\leq 30 \log_2$,判为 HI 阴性;HI 效价 $\geq 4 \log_2$ 判为