



Ebvac
诗华诺倍威

检测技术 血凝及血凝抑制试验



技术依据



Ebvac
诗华诺倍威

- ◆ 《中华人民共和国兽药典》（二〇一五年版 三部）附录27
- ◆ 中国兽医药品监察所的相关培训资料

概念



Ebvac
诗华诺倍威

◆**血凝试验**：某些病毒或病毒的血凝素能选择性地使某种动物的红细胞发生凝集，这种红细胞的凝集现象成为血凝（HA），也称直接血凝反应。

◆**血凝抑制试验**：当病毒悬液中加入特异性抗体，且这种抗体的量足以抑制病毒颗粒或其血凝素时，红细胞表面的受体就不能与病毒颗粒或血凝素直接接触。这时红细胞的凝集现象就被抑制，成为红细胞凝集抑制（HI）反应，也称血凝抑制反应。



Ebvac
诗华诺倍威

试验原理

- 血凝试验:

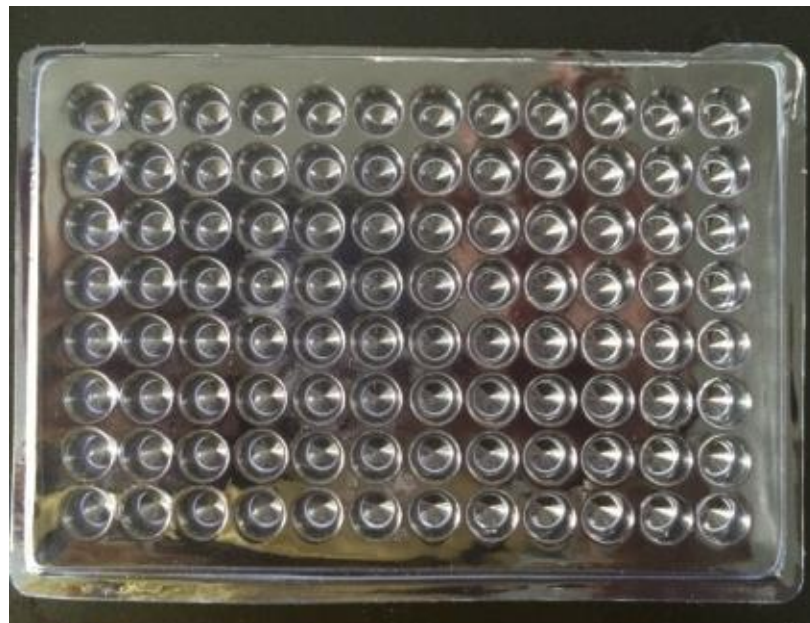
利用病毒选择性凝集动物红细胞及病毒浓度与红细胞凝集程度呈正相关的特性，采集敏感的动物红细胞配制成1%红细胞悬液与待测定的病毒液在微量血凝板上或试管中进行红细胞凝集试验，根据红细胞的凝集程度间接测定病毒液中的病毒浓度。

- 血凝抑制试验:

原理是利用病毒选择性凝集动物红细胞的能力可以被相对应的抗体抑制使其不能再凝集红细胞，而且这种抑制程度与抗体浓度呈正相关的现象来测定与该病毒相对应的抗体的效价。

实验材料

- 微量移液器
- 96孔反应板
- 微量混匀器
- 1%鸡红细胞悬液
- 标准抗原（HI）
- PBS



Ebvac
诗华诺倍威



Ebvac
诗华诺倍威

1%鸡红细胞悬液制备

1 采血

在无菌100ml瓶装入适量阿氏液备用。将2~6月龄SPF鸡保定，用酒精棉对采血部位翅静脉消毒暴露出明显的血管，采血前先用10ml一次性注射器抽取2ml阿氏液，然后再进行采血（避免鸡血在注射器里发生凝集）。采血时保证手法稳定，一次性采出所需的量。采血完成后，一只手对采血部位进行按压止血，另一只手左右轻轻摇动注射器，然后拔掉针头将注射器头贴着瓶口慢慢打入到100ml瓶，鸡血和阿氏液的体积比保持在1:1左右，轻轻摇动瓶子使血液与阿氏液充分混合。



Ebvac
诗华诺倍威

1%鸡红细胞悬液制备

2 洗涤

将混合液转移到15ml离心管中，每管10ml左右，加入适量无菌PBS，用托盘天平进行配平，以2500r/min离心10分钟，用移液器将上层液体吸出，抽取5ml无菌PBS沿离心管壁打入离心管中，用移液器轻轻反复吹打，将沉积在离心管底部的红细胞混匀，手法要轻，不可吹打太重，以防造成鸡红细胞破裂溶血。然后再加5ml无菌PBS在托盘天平上平衡，在离心机中平衡放置进行离心，重复操作四次。前三次各以1500r/min离心10分钟，最后一次以2500r/min离心10分钟，将上层液体用移液器吸出弃掉。



Ebvac
诗华诺倍威

1%鸡红细胞悬液制备

3 配制

将沉积的鸡红细胞用无菌PBS液配制成1%悬液。通过读取离心管中红细胞的量，加入适量的无菌PBS，配制成1%的鸡红细胞悬液（例如红细胞沉淀有1ml，则加99ml的无菌PBS混匀即得）。先在无菌的500ml或250ml瓶中加入适量的无菌PBS，然后用移液器吸取5ml无菌PBS沿管壁打入离心管中，用移液器轻轻反复吹打，再将混匀的红细胞悬液贴着瓶壁口加入到无菌的500ml或250ml瓶中即得。



Ebvac
诗华诺倍威

1%鸡红细胞悬液制备

4 标定

用已知血凝价标准抗原（中监所）通过血凝试验标定红细胞的配制的准确性。标定确认后分装于10ml小青瓶，加塞，在瓶身标识清晰， 2-8℃冰箱冷藏保存。



Ebvac
诗华诺倍威

操作步骤——血凝试验 (HA)

1 加样、稀释

在96孔反应板上，从第1孔至第12孔或所需倍数孔，先用多道移液器吸取PBS，依次加入反应板中，每孔25u1，加入PBS时滴头从孔的中间贴壁打入。用移液器吸取25u1待检样品（若为冻干成品，事先用无菌PBS按对应装量进行稀释）加入每行第一孔，全部加样后，用8通道移液器（25u1）反复吹吸8-10次，吹打最后一次时将移液器悬空，把液体全部排出打进孔内，然后吸取25u1液体打入到第二列孔中，按同样的方法依次倍比稀释，最后一列稀释完成后，吸取25u1弃掉，样品稀释完成。

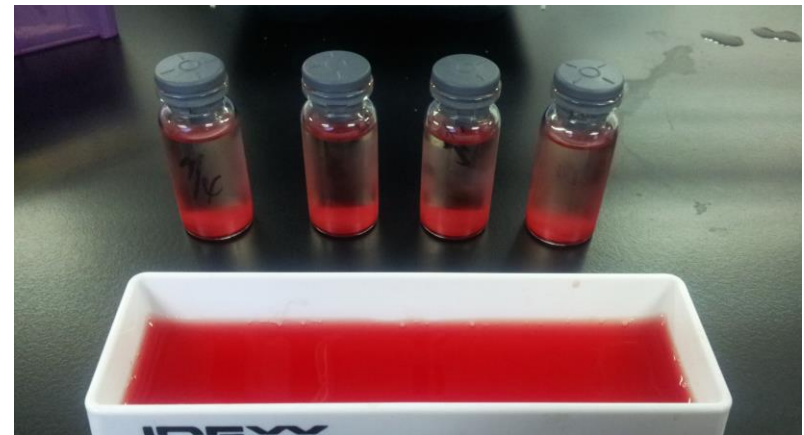


Ebvac
诗华诺倍威

操作步骤——血凝试验 (HA)

2 加1%鸡红细胞悬液

将装有1%红细胞悬液的小青瓶上下颠倒混匀倒入一次性加样槽中，用8通道排枪吸取红细胞悬液依次反向加入到稀释好的96孔板上，每孔25u1，加完后将反应板放在混匀器上震荡混匀，然后放置在25℃恒温恒湿箱中，静置20分钟。

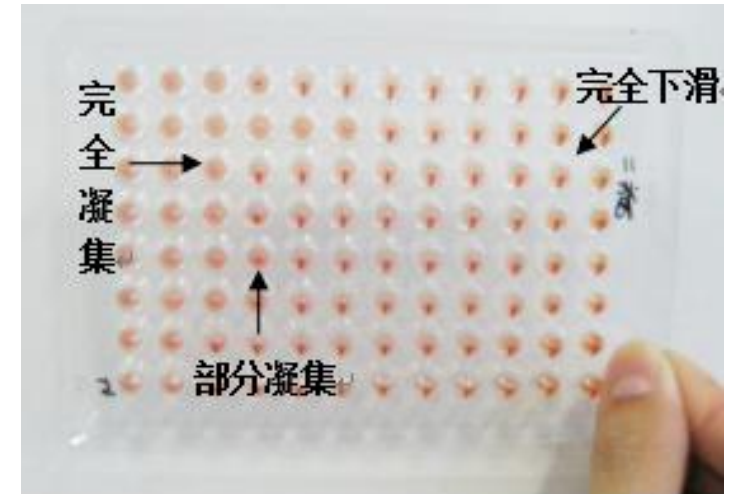


操作步骤——血凝试验 (HA)

3 读数判定

判读时如图看板，将反应板稍微倾斜，不能直立，从反应板背侧进行判读，判读时需在5秒钟左右读完结果。判定结果时，发生完全凝集现象表现为红细胞平铺于管底或试管底面，凝集严重时，红细胞膜片边缘可能出现卷边现象。部分凝集表现为孔底或试管底中心有一红细胞圆斑，周围有膜片状凝集红细胞。不发生凝集时，红细胞沉积在孔的底部呈圆点状，反应板倾斜时，圆点状红细胞下滑呈一条直线。

产生100%完全凝集的样品最高稀释度即为样品的凝集价。





Ebvac
诗华诺倍威

操作步骤——血凝抑制试验 (HI)

2 4HAU血凝素工作液的配制

如果血凝素100%凝集价测定结果为1:1024（举例），4个血凝素单位（即4 HAU）
 $=1024/4=256$ （即1:256）。取PBS9.0ml，加血凝素1.0ml，即成1:10稀释，将1:10稀释液
1.0ml加入到24.6mlPBS中，使最终稀释度为1:256。



Ebvac
诗华诺倍威

操作步骤——血凝抑制试验 (HI)

3 4HAU血凝素工作液的检验

检查4HAU血凝价是否准确，应将配制的1:256稀释液分别以1.0ml的量加入PBS1.0ml、2.0ml、3.0ml、4.0ml、5.0ml、6.0mlPBS中，使最终稀释度为1:2、1:3、1:4、1:5、1:6和1:7。然后从每一稀释度中取0.025ml加入0.025mlPBS，然后加入0.025ml的1%红细胞悬液用混匀器混匀。将血凝板在25℃恒温恒湿箱中静置20分钟，如果配置的抗原液为4 HAU，则1:4稀释度将成为凝集终点；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。应根据检验结果将血凝素稀释度做适当的调整，使工作液确为4 HAU。



Together, beyond animal health



Ebvac
诗华诺倍威