



动物检验检疫技术

专业教学资源库

# 提供鸡群检测鸡新城疫抗体 (新国标)

➡ **检测ND抗体的目的、意义？**

确定免疫日龄、检测免疫效果等

➡ **用什么方法检测ND抗体？**

HA及HI



**工作任务：** 测定某鸡场鸡新城疫抗体

# 完成抗体测定任务的工作思路(实训



## 目标)

- 1 应用方法：HA和HI
- 2 HA和HI的原理？
- 3 需要准备哪些器材？
- 4 需要准备哪些试剂？
- 5 采血制备被检血清
- 6 采血制备1%RBC悬液
- 7 HA—测病毒的血凝价
- 8 配4单位病毒
- 9 HI—测抗体效价
- 10 结果报告及应用



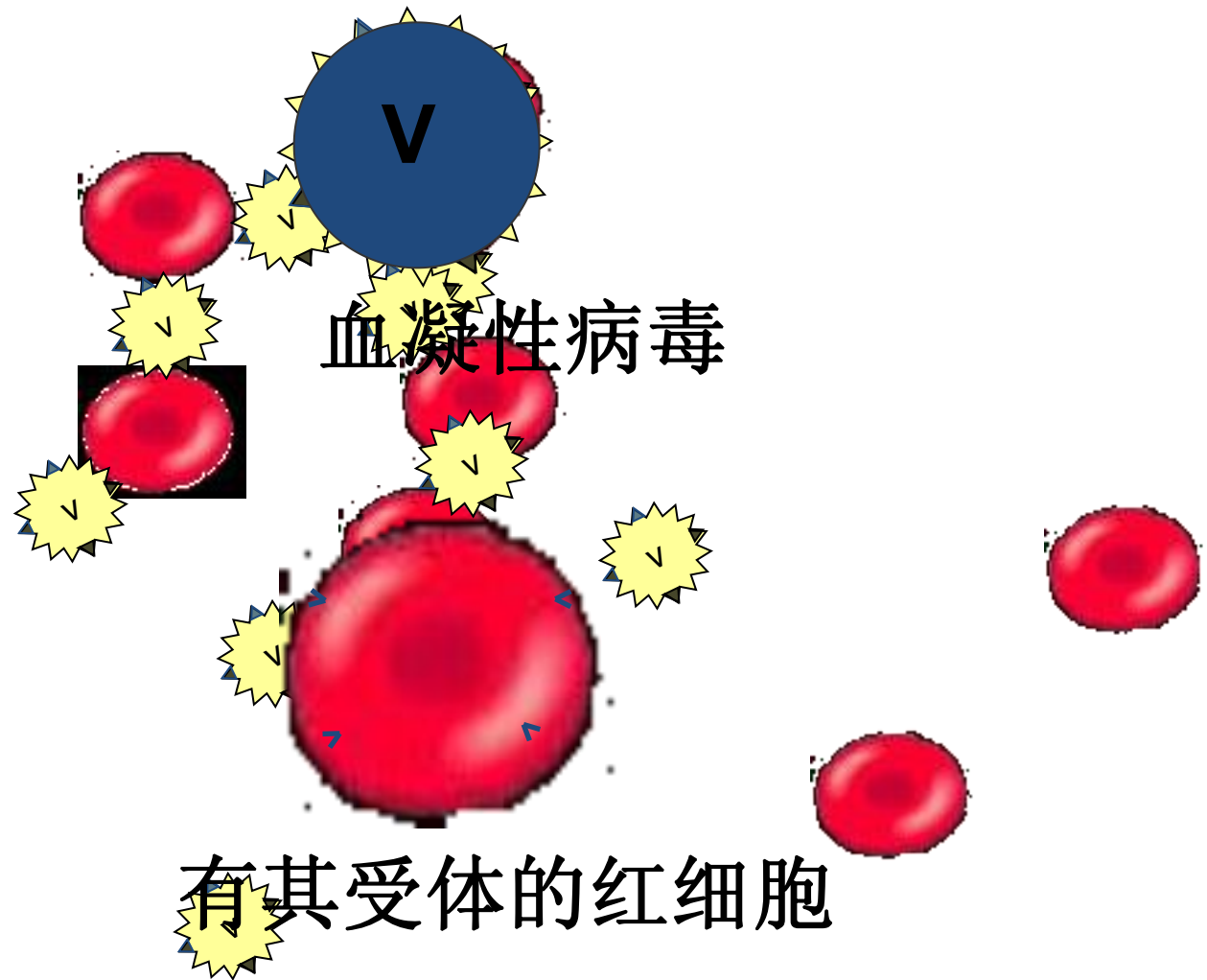
# HA和HI的原理

- **HA的原理**：病毒的血凝现象

- 有些病毒的表面有血凝素，能与某些动物的红细胞表面受体结合，从而出现红细胞凝集现象，称为病毒的血凝现象，简称病毒的血凝。

- **HI的原理**：病毒的血凝抑制现象

- 当病毒与相应的抗病毒抗体结合后，能使红细胞的凝集现象受到抑制，称为病毒血凝抑制现象，简称病毒的血凝抑制。



# HI 原理-血凝抑制现象

## 图示



当病毒遇到特异性抗体时

当病毒遇到非特异性抗体时





# 需要准备的器材

序号	器材或设备名称	数量	规格	序号	器材或设备名称	数量	规格
1	普通托盘天平	1台		9	微量移液器吸头盒	1个	0.005~0.05mL
2	普通离心机	1台				1个	0.1~1mL
3	微型振荡器	1台		10	板式微量移液器架	1个	
4	DRAGON微量移液器	1支	0.005~0.05mL	11	96孔V型血凝反应板	2块	
		1支	0.1~1mL	12	烧杯	5个	50mL
		1支	2~10mL			2个	100mL
7	微量移液器吸头	30个	0.005~0.05mL	13	禽用采血器	2支	5mL
		10个	0.1~1mL	14	具盖塑料离心管	4支	10mL
		10个	2~10mL	15	试管架	1支	
8	实验工作服	2件		16	细记号笔	1支	



# 需要准备的试剂

- 生理盐水250mL
- 3.8%柠檬酸钠溶液20mL
- 新城疫标准抗原
- 被检血清

- 新城疫标准阳性血清
- 新城疫标准阴性血清
- 75%酒精棉球若干
- 标签纸若干
- 实验报告单一张





# 采血制备被检血清

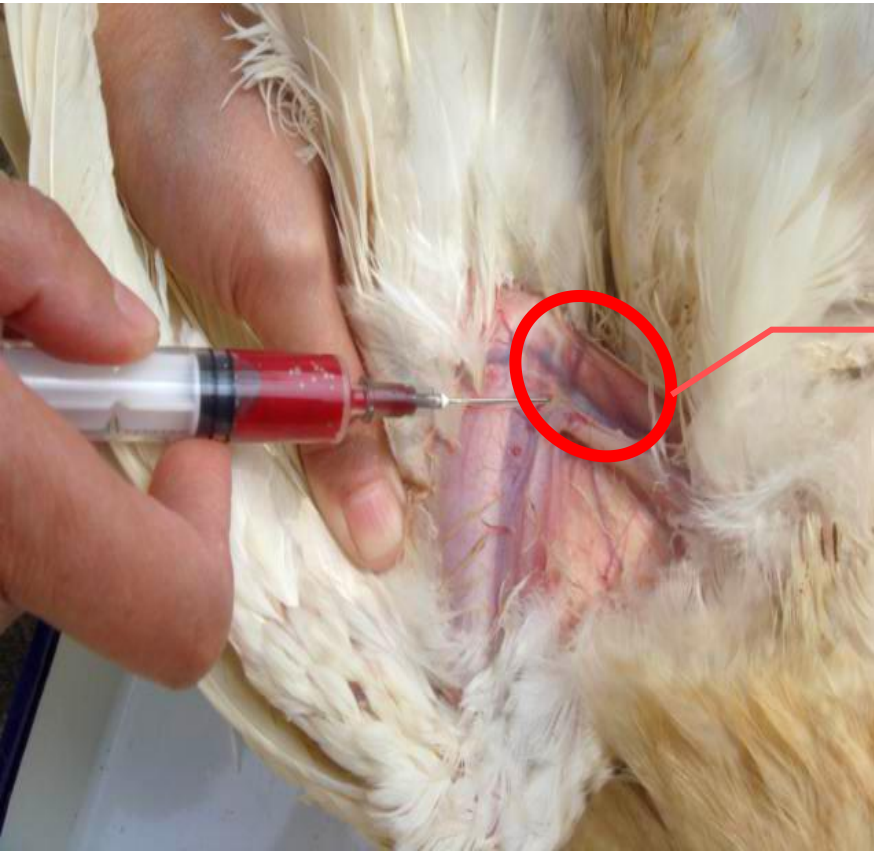
- 在翅静脉处消毒，手持采血针从无血管处向翅静脉丛刺入采血。待血液凝固析出的淡黄色液体即为血清。将血清移至另外一小塑料离心管内，盖盖， $4^{\circ}\text{C}$ 冷藏。需长期保存时，将血清至 $-20^{\circ}\text{C}$ 冷冻。





# 鸡翅静脉采血

在翅静脉处消毒，手持采血针从无血管处向翅静脉丛刺入采血。





# 采血制备1%RBC悬液

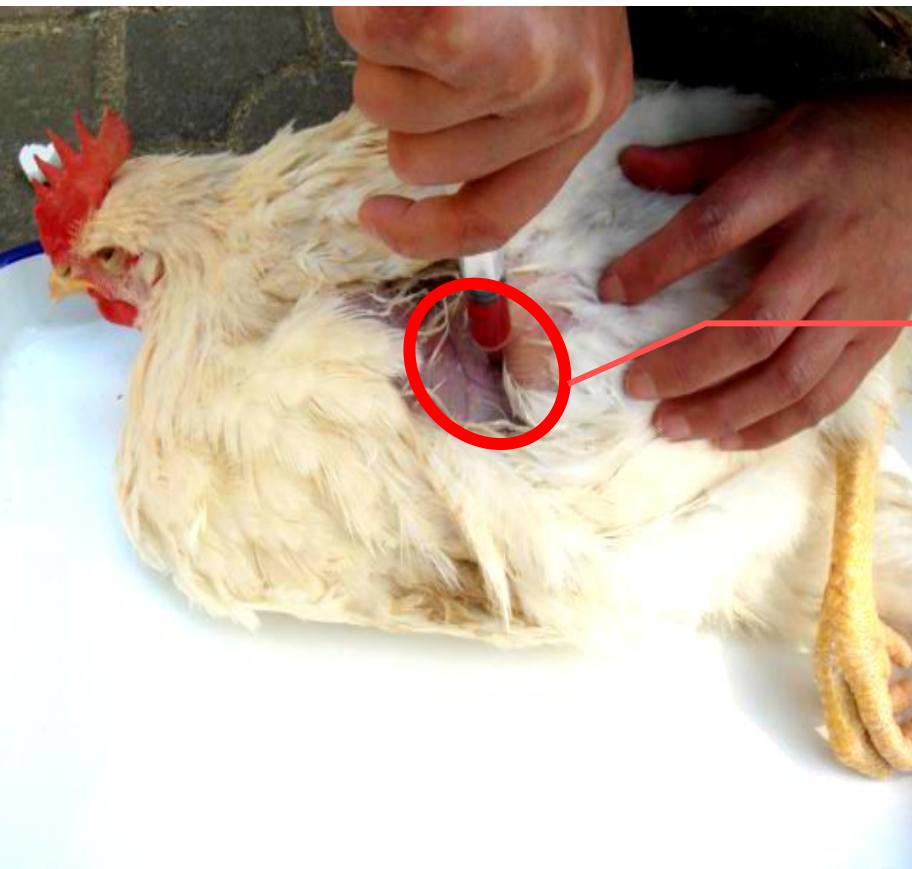
- 制备方法

- 采集至少3只SPF公鸡或无禽流感和新城疫抗体的非免疫鸡的抗凝血，放入离心管中，加入3~4倍体积的PBS混匀，以2000r/min离心5~10min，去掉上清液和白细胞层，重复以上过程，反复洗涤3次（洗净血浆和白细胞），最后吸取压积RBC用PBS配成体积分数为1%的悬液，于4°C保存备用。

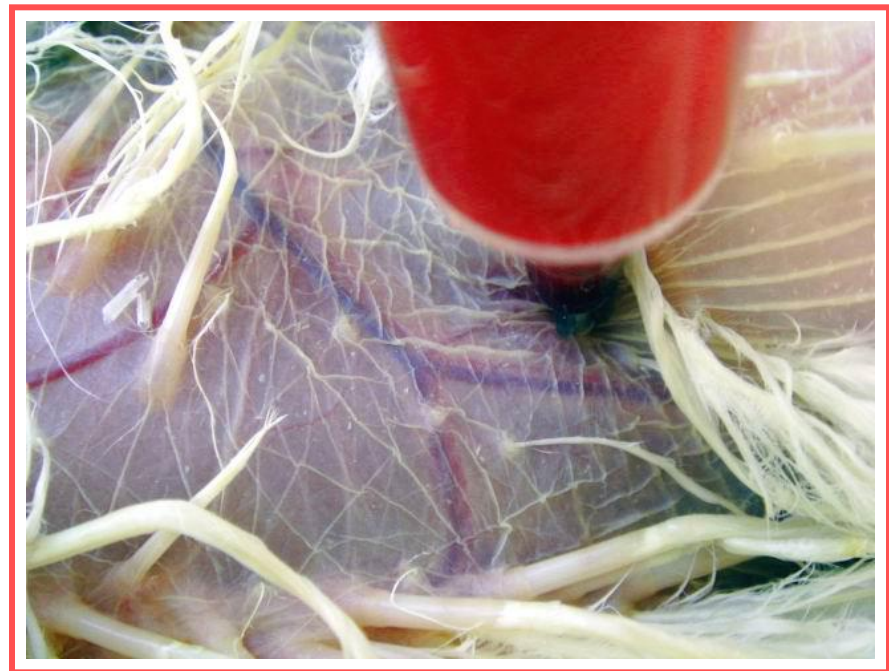
- 采血部位：鸡心脏采血



# 鸡心脏采血



鸡自然右侧卧，依三点定位，消毒，从左胸一大静脉分叉和膝关节角顶之间的凹窝内垂直进针采血。





# 今天上午同学要完成的任务如下

- 练习采血（心脏采血、翅静脉采血）
- 采血制备被检血清
- 采血制备1%RBC悬液
- 学会离心机的使用



# HA——测NDV抗原血凝价（单位： $\mu\text{L}$ ）

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>PBS</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
<b>NDV</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	— 弃25
<b>PBS</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
<b>病毒稀释倍数</b>	$2^1$	$2^2$	$2^3$	$2^4$	$2^5$	$2^6$	$2^7$	$2^8$	$2^9$	$2^{10}$	$2^{11}$	PBS 对照
<b>1%RBC悬液</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
振荡混匀后，室温（ $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）下静置40min后观察结果，若环境温度太高，放 $4^{\circ}\text{C}$ 静置60min。当PBS对照孔红细胞呈明显纽扣状沉到孔底时判定结果。												



# 病毒的血凝价

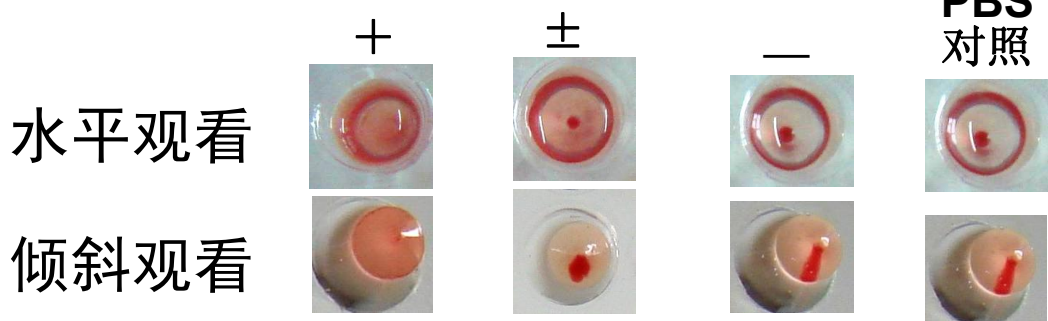
- 血凝价（血凝滴度）：能使一定量红细胞完全凝集的病毒最大稀释倍数为该病毒的血凝滴度或称血凝价。（一个血凝单位——HAU）

（以完全凝集的病毒最大稀释倍数为该抗原的血凝滴度）



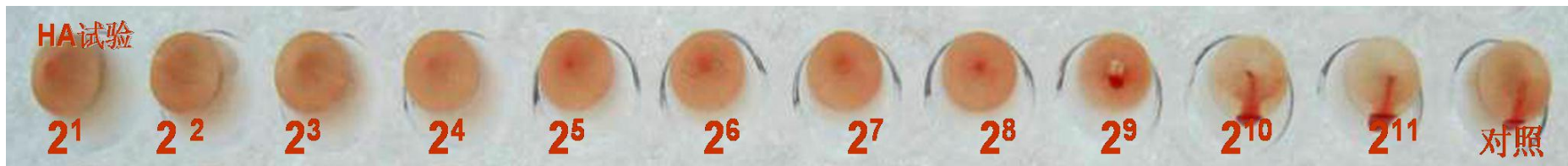
# HA结果判定

## HA各孔凝集情况及判定标准



在对照孔出现正确结果的情况下，将反应板倾斜，观察红细胞是否完全凝集。以完全凝集的疾病最大稀释倍数为该抗原的**血凝价**（一个血凝单位，HAU）。用  $n\log_2$  表示。

## HA结果示例：血凝价 $8\log_2$







20℃~25℃ 作用40分钟后



# 根据血凝价配制4单位病毒

$$4\text{单位病毒的稀释倍数} = \frac{\text{血凝价}}{4}$$

## 4单位病毒的配制方法:

如果抗原的血凝价为 $81\log_2$ ，其4个血凝单位为 $61\log_2$ ，则将病毒稀释64倍即可。稀释时将1mL病毒抗原加入63mLPBS中即为4单位病毒。



# HI—测抗体效价（单位： $\mu\text{L}$ ）

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>PBS</b>	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	50
待检血清	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	—	—
待检血清稀释倍数	$2^1$	$2^2$	$2^3$	$2^4$	$2^5$	$2^6$	$2^7$	$2^8$	$2^9$	$2^{10}$	弃25 阳性对照	PBS 对照
4血凝单位的病毒	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	—
轻扣反应板，室温（ $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）下静置不少于30min， $4^{\circ}\text{C}$ 不少于60min												
1%RBC悬液	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
轻晃混匀后，室温（ $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）下静置约40min，若环境温度太高，放 $4^{\circ}\text{C}$ 静置60min。当PBS对照孔红细胞呈明显纽扣状沉到孔底时判定结果。												



# 血凝抑制效价（抗体效价）

- 血凝抑制效价（血凝抑制滴度）：以完全抑制4个HAU抗原的血清最大稀释倍数作为该血清的血凝抑制滴度或血清的血凝抑制效价。以 $n\text{Log}_2$ 方式表示血清的血凝抑制滴度。

滴度是指产生完全不凝集（红细胞完全流下）的最高稀释度。

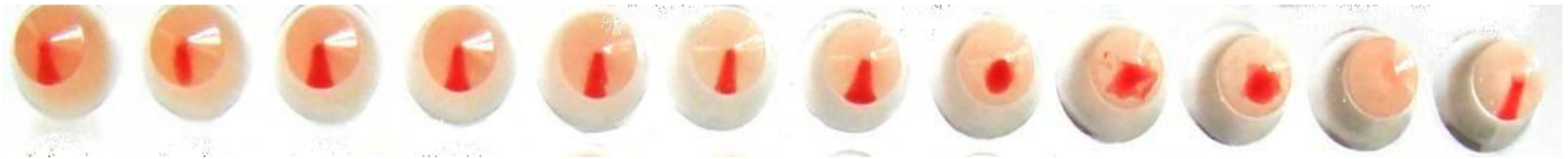


# HI结果判定

## HI结果判定

在对照孔出现正确结果的情况下，将反应板倾斜，从背侧看，看红细胞是否呈泪珠状流下。血凝抑制价（即抗体效价）是指产生完全不凝集（红细胞完全流下）的最高稀释倍数，表示为 $n\log_2$ 。

## HI结果示例：抗体效价 $7\log_2$





20°C ~ 25°C 作用40分钟后



# 结果报告及应用

- 结果报告方式为：**nlog2**
- 确定首免日龄
- 确定再次免疫的时间
- 确定鸡群地免疫效果
- 疑似新城疫时的初步诊断



# 作业

- 现有**50**个血清检样，需要检测鸡新城疫抗体，请您设计工作（检测）方案。

提示：

方法、原理、器材（几块血凝板？） 、试剂、

血清（已提供） **1%RBC**悬液（制备多少？） 、

**HA**测病毒的血凝价、配制**4**单位病毒（？）

**HI**测抗体效价（结果报告）





动物检验检疫技术

专业教学资源库

Thank You!