

兽医科研资料
(牛锥虫免疫诊断法)
间接血凝法

广东省农科院兽医研究所寄生虫研究组稿
南海逸仙业余学校印

锥虫免疫诊断法

(间接血凝法)

一、抗原制备

1、繁殖虫体：将增强毒力的虫种，取纯毒血 8~15 ml (一般 10 毫升)，接种于摘除脾脏狗的腹腔内，接种后 24 小时开始自尾尖采血作压滴标本检查。

2、提取虫体：当虫体每视野 (400X) 达 100~200 条以上，或在狗濒死期时即由颈 (股) 动脉放血。血液移入装有 2% 枸橼酸钠生理盐水的容器中，(血：2% 枸橼酸钠生理盐水 = 2:1) 充分混合，用二层纱布将血液过滤，3000 转/分离心 20 分钟，将上清液吸出放于另一容器中，用大胶吸管吸出白色虫膜，装于盛有抗凝剂 (1 毫升虫膜，加 2 ml 2% 枸橼酸钠生理盐水) 的离心管中。再将吸出的上清液与血球混合，用 3000 转/分离心 20 分钟一次，收集虫体，并

去上清液及血球。将收集的虫体按上述反复离心2~3次，直至虫体与血球完全分离，再用生理盐水洗虫2~3次，收集纯白色虫体，计算虫体的压积，用含有0.05% NaN_3 PH7.2的PBS液做1:9稀释后分装，放 -20°C 冰箱保存备用。

上述工作，在 $10\sim 15^{\circ}\text{C}$ 环境下继续进行。

3、抗原提取：低温中取出虫体，反复冻融五次，用3000转/分离心20分钟，吸取上清液，沉淀用玛瑙乳钵磨2小时，后再冻融3~4次，再用3000转/分离心20分钟，取上清液。二次离心上清液，按虫体压积计，加PH7.2 PBS液，将其稀释或 $1/400$ 的浓度，即为抗原液。

二、敏化血球制备

1. 血球准备：

(1) 采血：采公绵羊血40CC，用2%枸橼酸钠生理盐水稀释(1:1~2)置 4°C 存放3~4天。

(2) 洗涤：用生理盐水洗五次。每次生理盐水的用量约为血球体积的10倍，

用 1000~1500 转/分离心 5~10 分钟，弃上清液。一半为非醛化血球另一半作醛化处理。

2. 血球醛化。

(1) 丙酮醛处理：将洗好的血球用 PBS 液配成 8% 悬液，加入等量的 3% 丙酮醛，室温搅拌 30 分钟后，置普通冰箱（4℃）醛化固定 17 小时，经常摇动，后 2000 转/分离心 10 分钟，弃去上清液，再用 PBS 液离心洗涤 3~5 次，最后用 PBS 液配成 5% 的血球悬液。

(2) 戊二醛处理：将洗好的血球用 PBS 液配成 5% 的血球悬液，每 100CC 加入 2.5% 戊二醛 20CC，在室温下搅拌 40~60 分钟，后以生理盐水洗五次。

(3) 甲醛处理：在常温（24~25℃）下固定，方法是一份 8% 戊二醛固定的血球加 1 份 3% 甲醛液，在室温摇动 17~18 小时，固定后用 PBS 液洗五次，用 0.1% NaN_3 的 PBS 液配成 10% 浓度的血球液，放入 4℃ 冰箱。

3. 血球鞣化。

将洗后血球以生理盐水配成 5% 悬液，加入等量 2 万倍稀释的鞣酸液，混

匀，置于37℃水浴，轻微搅拌，30分钟后离心弃去上清液，再以PBS液洗2次，以PBS液把血球配成10%悬液，保存在4℃冰箱内备用。

4. 血球致敏：

用上述新配的 $1/400$ 抗原液直接稀释血球压积成5%血球悬液，放入37℃水浴箱中热致敏40~60分钟，或放4℃冷致敏7天。后离心弃去上清液，用PBS液洗3次，再用含1%灭活健兔血清PBS液配成2%的血球悬液，并按0.1%计加入叠氮钠防腐，放入4℃冰箱保存。（4℃存放有效期6个月，室温保存有效期为56天。）

三、灭活兔血清制备

健康兔血清置56℃冰箱中，灭活30分钟。

四、凝集试验及结果判定

1. 凝集试验：用U型或V型微量血凝板，将被检血清用PH7.2 PBS液作倍比稀释（即1:2, 1:4, 1:8, 1:16……），每孔0.025CC（16号平头针1滴）。用作

二排，一排加致敏血球悬液为测定排，另一排加非致敏血球悬液为对照排，每孔滴一滴（4号针头滴约为0.007CC）。同时两排最后一孔做仅加PBS液与血球悬液的空白对照。

测定排：(加致敏血球及血清) ○○○○○○○○○○

对照排：(加非致敏血球及血清) ○○○○○○○○○○ / 此二孔为空白对照孔

摇均匀放室温（25°~30°C）1~2小时，待空白对照孔的血球全部沉于孔底，呈光滑圆点状时，即可判定结果。

2. 结果判定：

图 象： ○ ⊙ ⊗ ⊕ ⊙

判断强弱： 阴性 少许凝集 半凝集 多量凝集 全凝
记录符号： - + ++ +++ ++++

暂定以测定排比对照排的凝集滴度高出2个以上，凝集价达80倍以上者，判为阳性。

附:

(1) PBS PH7.2 (磷酸盐缓冲液)

甲液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 53.73克 加蒸馏水至1000毫升。

乙液: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 23.40克 加蒸馏水至1000毫升。

PH7.2: 甲液73% 乙液27%

(2) 3% 丙酮醛:

取丙酮醛(含量20%)15CC, 加PBS液至100CC混合, 以10% NaOH调PH至7.2。

(3) 10% NaOH液:

10克NaOH, 加蒸馏水90毫升。

(4) 2.5% 戊二醛:

取戊二醛(含量25%)10CC, 加PBS液90CC。

(5) $1/2$ 万鞣酸液:

先配1%母液(1克分析纯鞣酸加双蒸水100CC), 后稀释成 $1/2$ 万。

(6) 6% 甲醛:

甲醛(含量36~38)20ml, 加PBS 100CC配成6%甲醛液。

(7) 0.1% NaN_3 (叠氮钠):

0.1克NaN₃加生理盐水100CC即成。

