

牛贝诺孢子虫抗原制备及间接 血凝试验诊断牛贝诺孢 子虫病的研究

王祥生 | 刘文多 |

(中国人民解放军兽医大学)

摘 要

本文报道了直接用贝氏贝诺孢子虫病牛皮肤制备诊断抗原, 并用所制抗原通过微量间接血凝法(间接血凝)对吉林、内蒙、河北以及黑龙江等省(区)1086头(份)牛血清进行诊断研究的结果。

所制抗原为蛋白类抗原, 其蛋白含量为1.26~1.48毫克/毫升。间接血凝试验表明, 207头(份)带虫牛血清检出阳性反应牛196头(份), 阳性符合率为94.68%, 血凝效价达1:40~5120; 56头健康牛血清均为阴性反应; 67头类症病牛血清除2头肉孢子虫牛血清血凝效价为1:40外, 其余均为阴性; 3头人工感染牛(18份血清)最早于接种后10天出现阳性反应, 比眼巩膜出现虫体包裹早40~50天; 来自上述疫区的738头被检牛, 通过临床、组织学以及眼巩膜包裹等检查, 检出带虫病牛55头(7.45%), 而间接血凝法检出阳性牛150头(20.33%), 两者相差非常显著。血清学诊断进一步证实了上述地区发生的牛“厚皮病”就是牛贝诺孢子虫病。

牛贝诺孢子虫病以前又叫牛球孢子虫病, 由于重剧病牛皮肤奇厚, 类似大象的皮肤, 故又有“象皮病”、“厚皮病”之称, 蒙语“葫芦精”(音译)。据初步调查, 此病在我国东北、华北以及内蒙古等地区的牛群中均有流行。在广大牧区由于对此病缺乏足够的认识, 又无有效的防治措施, 致使此病连年发生, 给养牛业造成严重危害。

据统计, 目前大约有24个国家和地区的牛群发生此病, 除南非、苏联等有限几个国家能够用血清学方法诊断此病外, 其它一些国家和地区主要还是靠临床症状、病理组织学以及眼巩膜包裹检查法诊断此病^[1,2,3,4]。但这些方法对于临床症状不显、眼巩膜无虫体包裹或仅有零星散在包裹的轻度感染病例却很难检出, 有时往往发生误诊。

自Bigalk(1962)^[5]用牛和羔羊肾细胞培养贝氏贝诺孢子虫速殖子获得成功以来, kaggwa等(1979)^[6]、Frank等(1977)^[7]、Weiland等(1976)^[8]和Goldman等(1983)^[9]用组织培养获得的虫体制备抗原, 通过间接荧光抗体技术和酶联免疫吸附试验对人工感染家兔和自然感染牛进行诊断研究, 发现与弓形虫血清有不同程度的交叉反应。最近查悉苏联学者Омаров等(1972)^[10]曾笼统地提到用病牛组织分离虫体包裹制备抗原, 并进行血清诊断研究, 但方法不详。鉴于基层设备有限, 开展组织培养

*胡力生、李德昌、阎仲堂等同志参加了指导和部份工作。

**本文于1984年8月30日收稿。

尚有一定困难,根据贝氏贝诺孢子虫寄生于病牛皮肤形成大量虫体包囊以及病牛皮肤便于冻存的特点,直接用病牛皮肤分离虫体包囊内的慢殖子制备诊断抗原,并用微量正向间接血球凝集法(间接血凝)对来自吉林、内蒙、河北以及黑龙江等省(区)的牛群进行了诊断研究。结果证明,所制抗原和间接血凝法在诊断牛贝诺孢子虫病方面具有很好的特异性和敏感性,现将方法和结果报道如下。

材 料 与 方 法

一、材料

(一)病牛皮肤

从表现为皮肤高度肥厚、皴裂,皮肤活组织检查发现大量贝氏贝诺孢子虫包囊的重剧病牛体表(生前或死后)剃毛、消毒后采集,并保存于 -20°C 低温冰箱3.5~30个月备用。

(二)血清

1. 标准阳性血清:从临床症状明显,组织学以及眼巩膜包囊检查发现大量虫体包囊的病牛体中采集(间接血凝效价为1:640以上)。

2. 带虫牛血清:207头(份),从临床症状不明显,但眼巩膜检查或剖检发现虫体包囊的轻度感染牛体中采集。

3. 被检牛血清:738份,分别采自吉林、内蒙、河北以及黑龙江等疫区的牛群。

4. 健康牛血清:56份,从初生犊牛以及经临床、病理剖检以及眼巩膜包囊检查均为阴性的健康牛体中采集。

5. 类症病牛(猪)血清:67份,从确诊为肉孢子虫、环形泰勒虫、伊氏锥虫、牛囊虫和疥癣的病牛以及部份人工感染弓形虫的病猪(间接荧光抗体效价1:256~2048)体中采集。

6. 人工感染牛血清:18头(份),分别定期采自3头人工感染牛。

所有受试血清试验前均经 56°C 30分钟灭活,并用双醛化正常血球作吸收处理。吸收被检血清时,取被检血清0.2毫升,加入0.8毫升2.5%双醛化正常血球于 37°C 下水浴10分钟(或恒温箱内感作30分钟),取出后置 4°C 冰箱过夜(或2000rpm离心10分钟),其上清液即为1:5吸收过的被检血清。

(三) pH6.4和pH7.2PBS(0.15M)。

(四) 1:4000鞣酸

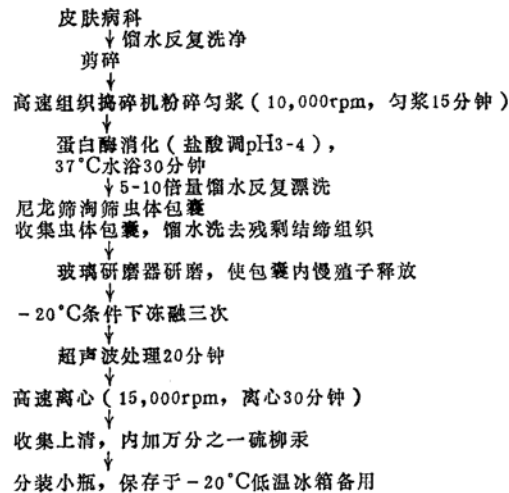
鞣酸(分析纯)1克,溶于100毫升三溜水中, 4°C 保存备用(可保存1个月),临用前以pH7.2PBS配成1:4000浓度。

(五) 96孔(或72孔)“U”或“V”型微量间接血凝反应塑板。

(六) 稀释液(1%兔血清PBS、pH7.2)。

二、方法

(一)抗原制备



(二) 抗原检定

紫外分光光度计测定抗原内蛋白含量, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (圆盘电泳) 测定蛋白成份, 所制抗原分别保存于-20°C、-5°C、4°C和室温下, 用间接血凝抑制法定期检测抗原效价。

(三) 间接血凝试验

1. 按常规法制备双醛化 (甲醛和丙酮醛) 绵羊红血球^[11]。
2. 用1:4000鞣酸鞣化双醛化血球。
3. 制备致敏血球: 以预先经合适致敏抗原量测定的合适浓度抗原致敏鞣化血球, 而后用1%兔血清PBS (pH7.2) 配成1.25%致敏血球; 同时, 另一份鞣化血球用pH6.4PBS代替抗原进行上述程序, 制备1.25%非致敏血球 (对照用)。

测定合适致敏抗原量时, 先用pH6.4PBS将抗原作1:2、1:4……1:1024稀释, 而后分别致敏鞣化的血球; 不同稀释度抗原所致敏的血球再分别与1:10阳性牛血清、1:10阴性牛血清以及稀释液反应。以阳性血清列呈++++完全凝集, 而阴性血清和稀释液完全不凝的抗原稀释倍数作为本试验的合适浓度抗原 (工作效价)。

4. 在血凝反应塑板作好标记, 按被检血清顺序编号登记。
5. 加稀释液: 于血凝反应塑板2~10行各孔内滴加稀释液1滴 (0.025毫升, 用18号注射针头截平后滴加)。
6. 滴加被检血清: 于AB、CD、EF、GH排1、2孔内分别滴加相应1:5稀释之被检血清, 每孔1滴 (0.025毫升)。
7. 稀释被检血清: 用微量稀释棒由第2列各孔按顺序稀释至第10列各孔, 所有被检血清均被稀释为1:5~2560倍。

8. 滴加致敏血球: A、C、E、G排各孔滴加1.25%致敏血球1滴 (0.025毫升); B、D、F、H排各孔滴加1.25%非致敏血球1滴 (0.025毫升)。轻轻振荡3~5分钟, 室温下放置2小时后判定结果, 次日再终判一次。

9. 判定结果: 血凝模型判定标准同韩澄源介绍的间接血凝法^[11], ++以上凝集判为阳性凝集。凡血凝效价在1:40以上, 而非致敏血球对照未发生凝集者判为阳性反应;

1:20为疑似; 1:10以下为阴性反应。疑似血清, 如第二次血清反应仍为疑似可判为阳性。

每次试验均设标准阳性血清, 标准阴性血清以及稀释液对照, 每份受试血清均设非致敏血球对照。

结 果

一、抗原制备结果

(一) 试验表明, 不同感染程度的皮肤病料, 不同的制备方法, 对抗原效价影响很大。只有选取重症感染牛皮肤, 再经蛋白酶消化(盐酸调 pH 3~4)等方法处理, 才能分离到大量纯净的虫体包裹和滋养体(见图1、2)。以盐酸浸润法虽可分离到纯净的虫体包裹, 但抗原有非特异自凝现象。最初曾用梯度密度离心法、3%明胶分离虫体, 但因混入大量结缔组织, 抗原特异性均不理想。

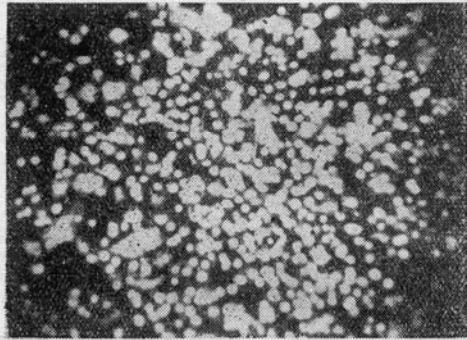


图1 蛋白酶消化法分离的大量纯净的贝诺孢子虫包裹(压滴标本, 10x)

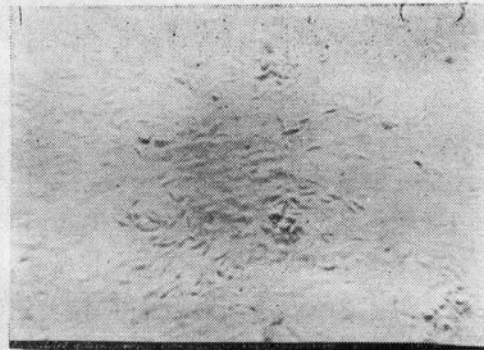


图2 包裹内分离的大量贝诺孢子虫慢殖子(压滴标本, 400x)

(二) 保存于-20°C低温冰箱3.5、6.5、7.0以及30个月的重症感染牛皮肤病料与新鲜皮肤病料制备的抗原无明显差异。经紫外分光光度计测定, 所制抗原蛋白含量为1.26—1.48毫克/毫升; 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 5份受检样品均在相当于血浆白蛋白迁移率的部位出现一条区带; 经间接血凝抑制反应测定, 所制抗原效价为1:64~256; 合适抗原致敏量达1:32~512(详见表1)。

(三) 抗原保存于-20°C冰箱6个月仅下降1个滴度, 到24个月时, 血凝抑制效价仍有1:32倍, 未出现非特异自凝现象; 在-5°C条件下, 抗原10天即下降1个滴度; 在4°C和室温条件下, 10天可下降2个滴度。

二、间接血凝试验结果

(一) 采用改进的合适致敏抗原量测定法确定合适的抗原工作效价, 使本试验有很

表1 不同时期皮肤病料所制抗原结果

抗原号	皮肤病料情况	抗原蛋白含量及效价		
		蛋白含量(毫克/毫升)	血凝抑制效价	合适致敏抗原量
超抗	新鲜	1.32	1:64	1:64
抗I	-20°C, 3.5月	1.26	1:64	1:32
抗II	-20°C, 6.5月	1.29	1:256	1:512
抗III	-20°C, 7月	1.48	1:128	1:256
胰抗	-20°C, 30月	未测	1:128	1:256

好的重复性和稳定性。

(二)带虫牛血清：207头(份)血清有196头(份)呈阳性反应，血凝效价为1：40~5120(图3、4)，阳性符合率达94.68%。

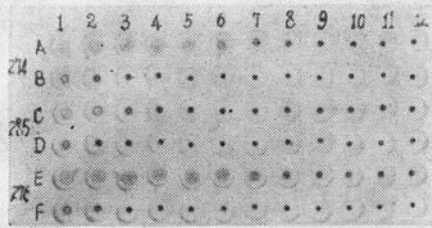


图3 274、276号血清为阳性反应血清

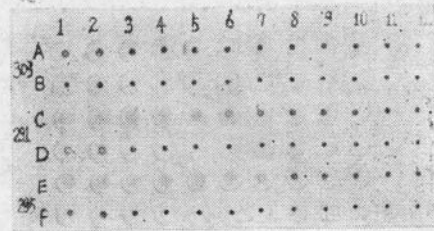


图4 291、295号血清为阳性反应血清

(三)类症病牛(猪)血清：67例类症血清除2头肉孢子虫病牛血清(来自贝诺孢子虫病疫区)效价为1：40外，其余均为阴性(见表2)。

(四)健康牛血清：56头健康牛血清均为阴性反应，血凝效价均<1：10。

(五)人工感染牛血清：3头人工感染牛最早于接种后10天出现阳性反应。血凝抗体比眼巩膜出现虫体包裹早40~50天。后期，个别牛尽管眼巩膜包裹消失，但血凝抗体仍为阳性。

(六)被检牛血清：来自上述疫区的738头被检牛，通过临床、组织学以及眼巩膜包裹检查，检出阳性病牛55头(7.45%)，通过间接血凝试验检出阳性牛150头(20.33%)。对部分临床上无症状、眼巩膜未查到虫体包裹而血凝反应阳性的病牛，经剖检检查，在其皮下和结缔组织中(尤其是前臂部和小腿部肌膜以及睾丸总鞘膜)发现贝诺孢子虫包裹。血清学试验进一步查证了上述地区发生的“厚皮病”就是牛贝诺孢子虫病，其自然感染率平均为20.33%(见表3)。

表2 类症病牛(猪)血清交叉反应结果

血清类别	血清数	不同血凝效价数		
		≤1:10	1:20	1:40
牛泰勒虫	5	5	—	—
牛伊氏锥虫	14	14	—	—
牛肉孢子虫	32	26	4	2
牛囊虫	2	2	—	—
牛疥癣	2	2	—	—
猪弓形虫	12	11	1	—
总计	67	60	5	2

表3 临床、组织学以及眼巩膜包裹检查法与间接血凝试验检出率的比较

被检牛血清来源	被检数(头)	临床、组织学及眼巩膜包裹检查检出阳性牛数	间接血凝检出阳性牛数(血凝效价1:40—5120)
河北(丰宁县)	184	5	20
内蒙古(哲盟)	138	9	36
吉林(白城)	71	10	21
吉林(通榆县)	304	27	59
吉林(辉南县)	14	2	4
长春地区	19	1	5
黑龙江(泰来县)	8	1	5
总计	738	55(7.45%)	150(20.33%)

讨 论

一、贝氏贝诺孢子虫在病牛皮肤和结缔组织内形成大量虫体包裹，每个包裹内寄生数千个贝诺孢子虫慢殖子(见图5)。因此，能否分离到大量纯净、完整的虫体包裹是制备高效、特异抗原的关键。病理组织学检查发现，虫体包裹由三层结构组成，壁囊厚而致密，反复冻融、馏水处理、长期低温冰冻保存病皮，虫体包裹均不受破坏。蛋白酶消化法就是根据这种特性消化皮肤组织内的蛋白成份，酸性环境加速皮肤组织内胶原纤维和弹性纤维水解，从而分离到大量纯净的虫体包裹。



图5 皮肤组织内寄生大量贝诺孢子虫包裹，囊内寄生大量慢殖子(皮肤切片标本，H.E染色，100x)。

二、微量间接血凝试验是简便、快速、准确的血清学诊断方法之一。但是，本试验常受pH、离子强度、鞣酸浓度、温度以及抗原浓度等多种因素的影响^[12]。根据作者的体会，在pH、离子强度等因素固定的情况下，特异抗原的浓度是十分重要的。抗原浓度过大，将出现非特异性自凝；抗原浓度过低，将不能最大限度地揭示宿主体内血凝抗体的水平，从而降低检出率。目前，多采用按每毫升含抗原(或抗体)毫克量致敏鞣化血球，但这往往导致血凝结果不稳定。因为抗原(或抗体)在保存过程中，活性不断衰变；每次试验时，各种试剂、条件都有或多或少的变化。如仍沿用最初确定的合适致敏抗原量，必然影响血凝结果。因此，每次试验前最好测一次合适致敏抗原量(尤其是前、后试验间隔1~2个月的情况下)，在大批检测时，显得更为重要。这样做虽然稍麻烦些，但保证了试验有较好的稳定性和重复性。本文所介绍的合适致敏抗原量测定法略不用于韩澄源介绍的以2~3单位抗原量为合适致敏抗原量的方法，增设了阴性血清和稀释液两排对照，从而排除了抗原浓度过高、过低的情况，并保证了血凝模型有良好的对比度。

三、在与类症病牛(猪)血清作交叉反应时，有2头肉孢子虫病牛血清血凝效价为1:40。据作者现地调查，曾发现数例牛贝诺孢子虫与肉孢子虫混活感染。由于牛肉孢子虫血清均来自牛贝诺孢子虫病疫区，此例是否属于这类现象尚值得考虑。

结 论

一、直接用贝氏贝诺孢子虫病牛皮肤通过蛋白酶消化法制备诊断抗原获得成功。所制抗原为蛋白类可溶性抗原，保存于-20℃冰箱6~24个月仍有良好的特异性和敏感性。保存于-20℃冰箱3.5~30个月的皮肤病料同样可制得高效、特异的抗原。

二、间接血凝试验诊断牛贝诺孢子虫病有很好的重复性和稳定性。通过对1086头(份)牛血清检测，证明特异性好，检出率高并有早期诊断价值。对阳性牛的检出率达94.68%，健康牛及类症病畜血清均为阴性反应，人工感染牛最早于10天出现阳性反应。

进一步查证了上述地区发生的牛“厚皮病”就是牛贝诺孢子虫病。本试验可用于临床诊断、疫区普查以及进、出口牛的检疫。

参 考 文 献

- [1] Pols, J. W. et al., 1960. Onderstepoort J. Vet. Res. 28 (3) : 265~356.
 [2] Levine, Ph. D., 1973. Protozoan parasites of domestic animals and of man. Second edition, 308~311, Burgess Publish company.
 [3] Bigalk, R. D. et al., 1962. J. S. Afr. Vet. Med. Ass. 33 (1) : 21~27.
 [4] |刘文多|、王祥生, 1982, 中国兽医杂志, 8 (9) : 10~12.
 [5] Bigalk, R. D., 1962. J. S. Afr. vet. Med. Ass. 33 (4) : 523~532.
 [6] Kagwa, E. at al., 1979. Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr. 27 (2) : 127~137.
 [7] Frank, M. et al., 1977. Ref. Vet. 34 (8) : 83~86.
 [8] Weiland, G. et al., 1977. Index veterinarius 45 (1) : 11.
 [9] Goldman, M. et al., 1983. Trop. Anim. Hlth. Prod. 15 (1) : 32~38.
 [10] Омаров, Ж. К. et al., Способ очистки цистов Крупного рогатого скота. (Казахск. Н-н Вет. Ин-т) Авт. Св. СССР. Кл. Анк 23/00. 0 343696, Заявл. 01. 71. Опубл. 11. 08. 72.
 [11] 韩澄源, 1979, 间接血凝技术, 科学出版社。
 [12] 梁焕春, 1980, 兽医参考资料, (1) : 31~32.

PREPARATION OF ANTIGEN FROM BESNOITIA BESNOITI (BOVINE) AND STUDY ON DIAGNOSIS OF BOVINE BESNOITIOSIS USING INDIRECT HAEMAGGLU- TINATION TEST

Wang Xiangsheng, |Liu Wenduo|
 (Veterinary College Of Chinese PLA)

Abstract

Diagnostic antigen was prepared directly from skin of cattle infected with *Besnoitia besnoiti* and 1,086 sera of cattle from Jilin Province, Inner Mongolian Autonomous Region, Hebei Province and Heilongjian Province were tested with indirect microhaemagglutination test (IHAT). The antigen is a protein, its content varies from 1.26 to 1.48mg/ml. Result of IHAT showed that 196 (94.68%) sera of 207 cattle infected with *Besnoitia besnoiti* were positive. The serum titres were 1 : 40--5120. The 56 sera from healthy cattle were negative. No cross reaction occurred in sera of cattle infected with other parasites (67 sera). 3 cattle infected experimentally (sera of 18 samples) were positive as early as on the 10th day after infection. Of 738 cattle from the four provinces, 55 (7.45%) were diagnosed as bovine besnoitiosis by clinical symptoms and scleral-conjunctival cysts, while 150 (21.3%) were found to be positive by IHAT. Significant difference was present between this two rates. Serodiagnosis proved further that "thick-skin disease" in the above-mentioned regions was bovine besnoitiosis. The technique may be applied for survey and clinical diagnosis.