

牛副结核病四种血清学诊断 方法的比较—初步结果

杨晓林 谢 昕 段希武
(中国兽药监察所)

摘 要

本文介绍了用单向辐射溶血试验(SRHT), 微量间接溶血试验(IHLT)、和酶联免疫吸附试验(ELISA)诊断牛副结核病的方法, 并比较了这三种试验和补体结合试验(CFT)对牛副结核病的诊断效力。结果表明: SRHT、IHLT和ELISA均比CFT敏感, 而且操作简便, 快速、适用于大规模的群体检疫。

引 言

国际上诊断牛副结核病常用的血清学方法是补体结合试验。但本试验仅适用于晚期病例, 对早期感染检出率低〔1-3〕, 并存在非特异性反应, 操作复杂, 不利于大规模的检疫等缺点。因此, 有必要寻找一些敏感性和特异性高, 而又简便易行的方法来代替它。

单向辐射溶血试验(SRHT), 已成功地用于一些病毒病的诊断, 对牛副结核病的诊断价值如何, 尚未见报导。国外有人曾用间接溶血试验(IHLT)和酶联免疫吸附试验(ELISA)诊断牛副结核病〔4, 5〕, 据报导比较敏感, 但国内尚未使用。本试验的目的是用这三种方法来诊断牛副结核病, 并以细菌学检查为依据, 以补体结合试验(CFT)作对照, 来估价其各自的诊断价值。

材 料 和 方 法

一、抗原

SRHT和IHLT抗原: 用副结核分枝杆菌P₁₈株, 参照Annau〔6〕介绍的方法制备抗原。

ELISA抗原: 用副结核分枝杆菌P₁₀株, 按Jensen〔7〕介绍的方法制备抗原。

CFT抗原: 由本所提供。

二、血清

受检血清: 151份血清采自经细菌学检查过的牛, 其它血清为动物检疫所送检血清、或由副结核病牛场采集。

假定健康牛群牛血清: 采自杭州市丁桥公社奶牛场。该场历史上未出现过副结核临床病牛, 近两年结核病普查为阴性。

*本项工作得到本所二室副结核病研究小组桂海泉、周齐和支海滨等同志的协助, 特此致谢。

**本文于1985年8月8日收稿。

结核病牛血清:采自北京市南口结核病牛场,经结核菌素比较试验,确定全为结核病牛。

三、SRHT试验方法

用pH7.4磷酸缓冲盐水配制含0.1%迭氮钠的1.5%琼脂(日本进口琼脂粉)。溶化后,冷却到45℃。每26毫升琼脂加入3毫升5%的经SRHT抗原致敏过的绵羊红细胞和1毫升补体原液。混匀,迅速浇成3毫米厚的平板。凝固后,用直径3毫米打孔器打孔备用。以未致敏红细胞代替致敏红细胞,用同样方法制备SRHT对照板。目的是排除牛血清中可能存在的抗绵羊红细胞抗体造成的溶血现象。

将受检血清原液、按每孔15微升,分别加在工作板和对照板上相应的孔中,把平板放于湿盒中,37℃孵育10小时,判定结果。在对照孔不发生溶血的情况下,工作板上的受检血清产生清晰的直径等于或大于5毫米的溶血环时,判为阳性。

四、IHLT试验方法

取25微升受检血清原液加入V型微量血凝板中,从2倍开始作递倍稀释。各孔加入1%经抗原致敏过的绵羊红细胞25微升,再分别加入20倍稀释的补体溶液25微升。将平板放于微量振荡器上37℃振荡30分钟,继之于室温静置2小时,制定结果。同时,对每份受检血清作未致敏红细胞的溶血对照。在对照不发生溶血的条件下,待检血清1:8稀释液出现完全溶血时,判为阳性。

五、ELISA试验方法

用pH9.5,0.1M碳酸盐缓冲液稀释抗原,并按每孔100微升(2.5微克/孔)包被聚苯乙烯塑料板,4℃过夜。用0.5M NaCl 0.1%吐温20冲洗液冲洗5次,每次3分钟。并以此液作稀释液,将牛血清作50倍稀释,每孔加入100微升,37℃于微量振荡器上振荡10分钟。如上冲洗5次后,每孔加入1:200稀释的酶标记兔抗牛IgG(辣根过氧化物酶, Sigma VI型),再于37℃振荡10分钟。重复冲洗步骤。继之每孔内加入100微升新配制的底物(邻苯二胺),37℃暗盒显色15分钟,最后每孔加入25微升2M硫酸终止反应。眼观判定结果。每板设立阳性、阴性血清对照,在阳性对照成立的条件下,受检血清所呈现的颜色反应强度大于阴性对照一倍时,判为阳性。

六、CFT试验方法 按常规方法进行。

七、变态反应试验 按常规方法进行。

八、细菌学检查

作粪便涂片或组织病料涂片及触片,经萋尼氏染色后,直接用显微镜检查副结核菌。此外,对剖检牛采取回盲瓣及其附属淋巴结、对活检牛采取粪便,作细菌分离。从组织病料中分离副结核菌按谢昕等^[8]介绍的方法进行。粪便培养的方法为:先将牛粪用适量水混匀,用纱布过滤或作1500rpm离心,取滤液或离心上清用0.02%孔雀绿和10%草酸溶液处理,然后5000rpm离心,将沉淀物接种于小川培养基和改良Dubos培养基上,37℃培养。

结 果

一、各种试验结果与细菌学检查结果的符合率

用四种方法检查了47头细菌学检查阳性牛和94头细菌学检查阴性牛, 结果见表1。

二、三种试验与CFT的比较

对631份受检牛血清作了SRHT和CFT的比较, 结果见表2。对331份受检牛血清作了IHLT和CFT的比较, 结果见表3。对196份受检牛血清作了ELISA和CFT的比较, 结果见表4。

由表2, 3, 4可见, 几乎所有CFT阳性的牛, 对SRHT, IHLT和ELISA均为阳性; 还不止此, 在CFT阴性牛中也有不少牛对这三种试验呈阳性反应。差异最显著的主要出现在CFT阴性牛中。对CFT阴性而其它三种试验阳性的牛作了部分剖检, 从其中一些牛分离出了副结核菌, 其余的牛虽未作剖检, 但有许多呈现阳性变态反应。结果见表5。

表1 47头细菌学检查阳性牛和94头细菌学检查阴性牛用四种血清学方法检查结果的比较

血清学方法	细菌学阳性牛47头		细菌学阴性牛94头		变态反应阳性牛
	阳性数	百分比	阳性数	百分比	
SRHT	29	61.7%	1	1.1%	1/1*
IHLT	33	70.2%	8	3.2%	1/3
ELISA	32	68.1%	4	4.3%	4/4
CFT	27	57.4%	0	0	0

表2. 在631份牛血清中SRHT与CFT结果比较

	头份	SRHT结果	
		+	-
CFT+	44	42	2
CFT-	587	20	567
合计	631	62	569

表3. 在331份牛血清中IHLT与CFT结果比较

	头份	IHLT结果	
		+	-
CFT+	35	35	0
CFT-	296	12	284
合计	331	47	284

四、四种试验对假定健康牛的检查结果

对150份假定健康牛血清, SRHT检测到3份阳性(2%), IHLT检测到2份阳性(1.3%), ELISA检测到5份阳性(3.3%), CFT检查全为阴性。

讨论及结论

文献普遍认为[1~3, 9]副结核菌感染中, 血清抗体通常出现较迟, 一般在临床症

表4. 176份血清ELISA和CFT结果比较

	头份	ELISA结果	
		+	-
CFT+	36	36	0
CFT-	160	14	146
合计	196	50	146

表5 SRHT, IHLT, 和ELISA三种试验分别为阳性而CFT为阴性的牛的细菌学和变态反应试验检查结果

菌检及变态反应结果	CFT阴性牛		
	SRHT+ (头数)	IHLT+ (头数)	ELISA+ (头数)
菌检(阳性数/受检数)	3/4	4/7	5/9
变态反应(阳性数/受检数)	8/15	4/5	5/5
未作变态反应试验	1	0	0

注: 菌检结果为剖检牛细菌培养结果, 变态反应结果为未剖检牛的试验结果。

三、四种试验对结核病牛的检查结果

对7头结核病牛作了检查, 有1头牛对四种试验均为阳性, 其余6头牛均为阴性。

状出现前后,才出现抗体;亚临床感染牛绝大多数为血清学阴性。因此,血清学试验对本病的检出率很大程度上取决于受检群体中临床型和亚临床型病牛的比例。如果亚临床型病牛比例偏大,检出率必然是低的。本试验所检测的副结核菌感染牛中,临床病牛和亚临床病牛的比例大约各为50%,在此基础上,SRHT、IHLT、ELISA和CFT四种试验分别检出了61.7%,70.2%,68.1%,57.4%的感染牛,检出率是可观的。与Chiodini等在综述中提到的数字基本接近。

与常规使用的CFT比较,SRHT、IHLT和ELISA均较为敏感。对几乎所有CFT阳性牛,用SRHT、IHLT和ELISA三种试验检查均为阳性;在CFT阴性牛中,这三种试验还依次多检出20头、12头和14头阳性牛,比CFT分别多检出40.9%,34.3%和38.9%,而且这些牛经部分菌检,发现不少受到副结核菌感染。另一些牛虽未作细菌学检查,但出现阳性变态反应,说明它们也可能受到副结核菌的感染。

对94头未分离出副结核菌的牛,SRHT、IHLT和ELISA分别检到了1.1%,3.2%和4.3%的阳性。由于这些血清学阳性牛生前大多数呈阳性变态反应,因此,它们可能曾受过副结核菌的感染。Taylor^[10]指出任何一种细菌分离技术都不可能检出所有副结核病牛。Merkal^[11]认为有一些牛受到副结核菌感染后,可自行康复。从这些牛虽分离不到副结核菌,但它们体内存在对副结核菌的抗体水平,并对副结核菌素产生过敏反应。当然并不能完全排出非特异因素的可能性。在150头假定健康牛中,SRHT、IHLT和ELISA分别检到一些阳性,其原因可能属非特异性,也可能是因为假定健康牛群并不真正健康。本试验中假定健康的依据是牛群过去没有副结核病史,但这个牛群近几年间从场外引进过一些牛,这些牛的安全性得不到保证。

据报道,^[2,9]副结核菌感染经常与禽型结核菌、牛型结核菌和棒状杆菌等感染发生交叉反应。由于材料来源限制,本试验仅对7头结核病牛检查了交叉反应,数据较少。但有限的结果提示:所用的四种副结核病血清学诊断方法与牛结核病的交叉反应程度相同。

初步试验结果肯定了这四种血清学试验对牛副结核病的诊断价值。CFT对牛副结核病检出率较高,本试验条件下未发现非特异性反应,但操作较为复杂,不适于大规模的群体检疫使用。SRHT、IHLT和ELISA诊断牛副结核病均比CFT敏感性高,而且操作简便,快速、容易推广,适用于大规模的群体检疫。对它们的非特异性还需作进一步调查来估计。

参 考 文 献

- [1] Hole, N. H. et al., 1959. The diagnosis of Johne's disease in cattle and the identification of *M. Johnei* infection. *Vet. Rec.*, 71: 1145.
- [2] Pearson, J. K. L., 1962. Studies on Johne's disease in cattle in Northern Ireland. III. Diagnosis of non-clinical infections. Review of literature. *Brit. Vet. J.*, 118: 86.
- [3] Julian, R. J., 1975. A short review and some observations on Johne's disease with recommendations for control. *Can. Vet. J.*, 16: 33.
- [4] Goudswaard, J. et al., 1976. Diagnosis of Johne's disease in cattle: a comparison of five serological tests under field condition. *Vet. Rec.*, 98: 467.
- [5] Jørgensen, J. B. et al., 1978. ELISA for the detection of antibodies to *M. paratuberculosis* in cattle. *Act. Vet. Scand.*, 19: 310.
- [6] Annau, E., 1958. A Purified complement-fixing antigen from *M. Johnei*. *Nature*, 181: 1206.
- [7] Jensen, M. H., 1956. A complement-fixation test for Johne's disease in cattle. *Nord. Vet. Med.*, 8: 357.
- [8] 谢昕等, 1982, 副结核菌的初次分离与培养. *中国兽医杂志*, 8: 2.
- [9] Chiodini, R. J. et al., 1984. Ruminant paratuberculosis: The current status and future prospects. *Cornell Vet.*, 74: 218.
- [10] Taylor, A. W., 1951. Johne's disease: its diagnosis and control. *Vet. Rec.*, 63: 776.
- [11] Merkal, R. S., 1973. Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Am. vet. Med. Associ.*, 163: 1100.

THE COMPARISON OF FOUR SEROLOGICAL TESTS
FOR DIAGNOSIS OF JOHNE'S DISEASE IN CATTLE

—A PRIMARY STUDY

Yang Xiaolin, Xie Xin, Duan Xiwu

(*The Control Institute of Veterinary Bioproducts
and Pharmaceuticals, Beijing, China*)

Summary

The methods for diagnosis of Johne's disease in cattle, i. e. Single Radial Haemolysis test (SRHT), Indirect Haemolysis test (IHLT) and Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) were described and the diagnostic value of these tests was compared with that of Complement Fixation test (CFT). The experiment showed that SRHT, IHLT and ELISA were more sensitive than CFT for detection of Johne's disease in cattle. Furthermore, all of three tests have advantages of simplicity and rapidity and were suitable for large scale detection of Johne's disease.