

## 乳牛布氏杆菌病的血清琼脂扩散试验\*

北京农业大学兽医系

罗仲愚 甘孟侯

琼脂扩散沉淀试验目前已广泛应用于微生物学研究及疾病的诊断,但应用于布氏杆菌病诊断的资料还不多。为了阐明此种试验的实用价值,我们做了一些初步试验。本文报导我们用于乳牛布氏杆菌病诊断的方法及其结果。

### 一、材料及方法

#### 1. 抗原的制备

将平滑型的牛、羊、猪三型布氏杆菌分别培养于含5%马血清的胰蛋白胨葡萄糖琼脂斜面上,于37°C培育48小时,将菌落用灭菌生理盐水洗下,制成悬液(每毫升含菌约100亿)将悬液离心,用灭菌生理盐水洗涤一次,菌泥按1:4比例加入2.5%石碳酸,分别于65°C加热1小时或置冰箱中24小时或14天,然后取出离心,取上清液应用。

2. 琼脂的制备 试验用的琼脂,共制备下列两种,以作比较,两种不同琼脂均取一部分加入0.01%酚红,以与不加者作比较。

(a)普通琼脂 配制1—1.5%纯净琼脂,每1000毫升加入食盐10克,硫柳汞0.1克,溶化后将酸硷度调整为7.2,即可使用。

(b)低盐缓冲琼脂 配就1%琼脂,每1000毫升加入食盐0.172克,磷酸二氢钠0.353克,磷酸氢二钠0.639克,硫柳汞0.1克,酸硷度调整至7.2。

3. 血清来源 采自某乳牛场布氏杆菌病病牛、健康牛及注射19号菌苗的健康牛。另用羊型布氏杆菌M-28株免疫家兔,取其免疫血清,以供使用。

4. 操作方法 将制备之琼脂加热溶化后,待其冷至40—50°C,倾注直径90毫米透亮无刻纹的玻璃平皿中,先注入约3毫升,使琼脂覆盖底面形成薄膜,待凝固后于平面上,按计划的排列方式和距离竖立直径4毫米塑料圆筒,然后再倾注琼脂约6—7毫升,待凝固后,缓缓取出塑料圆筒,即留下同等数目按预定方式排列的小窝。小窝中分别加入抗原和血清,各约0.15—0.2毫升,置37°C温箱中或室温中,15—24小时后观察结果。

为了确定小窝之间最适宜之距离,能得到最明显的结果,曾用所制备抗原与阳性家兔血清和病牛血清在不同距离的小窝中起反应。结果均表明小窝间距离以4—5毫米为最合适。所以此次试验中,均采用此种距离。

### 二、试验结果

\* 部分试验经曹澍泽、陈德威二同志协助,特此志谢。

1. 抗原方面 牛羊猪三型布氏杆菌石碳酸抽提抗原,以羊型抗原效果较好,此种抗原加热者不如冰箱中抽提者反应明显;而置冰箱 14 天者较 24 小时者更佳,沉淀带较清晰,在一定时间内出现三条带者也较多。

2. 琼脂方面 此次试验所用两种不同制备方法的琼脂,经试用结果,两种均能得出同样结果;但低盐缓冲琼脂所出现的沉淀带较普通琼脂所出现者边界明确,更为清晰。至于琼脂中加入酚红者与不加者没有表现明显差异,有时反不如不加者更易读出,故认为琼脂中加入酚红指示剂,并非必要。

3. 操作方法方面 按照我们的操作方法,小窝间的距离彼此间以 4—5 毫米为合宜。每一平皿可作 21 个小窝,分三组排列,中间小窝用于已知抗原(或血清),周围 6 个小窝用于未知血清(或抗原),如此,一个平皿可以检查 18 份材料,在时间和人力上都很节约。至于反应的温度,37°C 中培育出现结果快(一般 12—24 小时),室温中(15—20°C)出现结果较慢(一般 36—48 小时),但结果相同,而且所形成的沉淀带较 37°C 中者较细而浓厚,附加沉淀带也较清楚,是其优越之处。故在沒有定温箱设备的情况下,此种试验仍可照常进行。

4. 血清诊断方面 我们就不同患病情况的牛只进行了共 1076 头次的检查,并以自制家兔免疫血清为对照。兹将试验结果分别叙述于后。

(1) 健康牛只 健康牛只共进行 312 头,除血清琼脂扩散沉淀试验外,同时进行血清试管凝集反应,其结果如表(1):

表 1 健康牛只检验结果

血清凝集滴度(++)	检 验 头 数	琼脂扩散试验阳性	琼脂扩散试验阴性
0	300	0	300
1:25	10	0	10
1:50	2	0	2
1:100 以上	0	0	0
共 计	312	0	312

(2) 注射 19 号菌苗的健康牛只 注射 19 号菌苗的健康牛只共进行 391 头,都是注射菌苗后不出六个月的牛只。第一次进行 275 头,未作补体结合反应,其结果如下(表 2):

表 2 注射 19 号菌苗健康牛检验结果

血清凝集滴度(++)	0	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	共 计
检出头数	8	33	111	86	29	7	1	275
琼脂扩散阳性	0	0	0	0	0	0	0	0
琼脂扩散阴性	8	33	111	86	29	7	1	275

第二次另进行 116 头,同时作了补体结合反应,其结果如下(表 3):

(3) 自然患病牛只 自然患病牛只共检验了 373 头。第一次进行了 205 头,未作补体结合反应,其结果如表(4)。

表 3 注射 19 号菌苗健牛检验结果

血清凝集滴度 (++)	0	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	共 計
检出头数	4	12	33	42	17	7	1	116
琼脂扩散阳性	0	0	0	0	0	0	0	0
琼脂扩散阴性	4	12	33	42	17	7	1	116
补体结合反应阳性	0	2	26	35	17	7	1	88
补体结合反应阴性	4	10	7	7	0	0	0	28

表 4 自然患病牛只的检验结果

血清凝集滴度 (++)	0	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	共 計
检出头数	70	45	39	25	12	10	4	205
琼脂扩散阳性	0	0	0	12	12	10	4	38
琼脂扩散阴性	70	45	39	13	0	0	0	167

第二次另进行了 168 头,同时进行了补体结合反应,其结果如表(5)。

表 5 自然患病牛只的检验结果

血清凝集滴度 (++)	0	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	共 計
检出头数	78	21	31	20	9	5	4	168
琼脂扩散阳性	0	0	3	4	6	5	4	22
琼脂扩散阴性	78	21	28	16	3	0	0	146
补体结合反应阳性	0	8	28	17	9	5	4	71
补体结合反应阴性	78	13	3	3	0	0	0	97

(4)病牛群併群前后的检验 京郊各乳牛场在消除布氏杆菌病的过程中有这样一种经验,即凡两群病牛为了管理便利合并为一群时,原已平熄的临床流产于併群后不久必然爆发一次,说明病情因併群而加重。我们曾有机会对某乳牛场的两群併群的病牛,在併群前后各进行了血清琼脂扩散试验,并配合血清试管凝集反应及阴道粘液凝集反应,以观测其血清学反应的动态。共进行了 76 头怀孕母牛的观察,其结果如表 6。这两群牛在併群后约两周,即开始如预料的那样发生了临床流产。为了减少损失,在发现了流产后,立即普遍注射土霉素(肌肉注射,每牛注射 2 克,隔日一次,共 4 次),流产在发生了三头之后即行停止。这两群牛虽然合并在一个牛场,但栖息场所仍然分开,仅饲喂及挤乳时轮流共用一牛舍,故牛只之间直接接触的机会不算很多。

表 6 病牛群併群前后的检验结果

检验次数	併群前后时间	血清凝集反应				阴道粘液反应			琼脂扩散反应		
		+	±	-	小計	+	-	小計	+	-	小計
1	併群前1—1.5月	18	12	46	76	8	68	76	8	68	76
2	併群后两周	21	13	42	76	13	63	76	12	64	76
3	併群后6周	21	12	43	76	14	62	76	15	61	76

由上表可以看出 76 头病牛的检验结果, 在併群后一短时期内, 只有一小部分牛只表现阳性, 阴道粘液凝集反应与琼脂扩散反应的阳性头数在併群后有些增加, 但头数并不多; 可是从个体牛只来看, 三种试验的阳性反应都集中表现在 76 头牛中的 25 头, 其余 51 头前后三次全为阴性。而此 25 头中, 在併群前后血清学反应发生明显变化者只有 18 头。可见此次的併群, 真正使病情发生变化的牛只只是很小部分, 这可能是由于牛只接触机会不多之故。这 18 头牛的血清学反应情况如表(7)。

表 7 血清学反应发生变化 18 头牛的检验结果

牛 号	小49	大3	509	6169	京33	5075	145	5048	14	069	1686	5029	530	54	6002	4113	6013	505	
第一次	血凝	200	100	200	200	100	200	100	50	200	50	50	200	-	-	-	100	200	200
	阴粘	25	-	25	-	-	25	50	-	25	-	-	-	-	-	25	-	100	
	琼扩	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
第二次	血凝	400	100	100	400	100	200	100	50	400	100	100	200	100	100	200	800	400	
	阴粘	25	-	50	12.5	25	12.5	12.5	-	50	12.5	-	-	-	50	12.5	25	100	
	琼扩	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
第三次	血凝	400	200	400	400	200	100	200	100	100	100	100	100	50	100	100	800	200	
	阴粘	12.5	25	50	12.5	25	12.5	12.5	-	50	12.5	-	-	-	25	25	25	50	
	琼扩	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	

附注: 表中数字代表凝集反应的滴度

上表表明牛只在併群后, 凡血清凝集反应上升者, 大多数都表现琼脂扩散试验的阳性反应(滴度达 100 者大部阳性, 200 以上者全部阳性)。我们考虑到琼脂扩散试验很有可能成为牛只病情活化的有代表意义的指标之一, 值得进一步研究。

### 三、讨论

本试验中所用之石碳酸抗原, 以低温抽提抗原的结果较为满意。三种布氏杆菌以羊型布氏杆菌所制备之抗原效果最好, 它遇牛和家兔的阳性血清均能出现 1—3 条沉淀带, 其中以靠近抗原一边的沉淀带粗大而浓厚, 若用牛型或猪型布氏杆菌制备抗原, 则没有此一条带出现。这一点与他人的报导<sup>[1,2,8]</sup>是一致的。故进一步证明应用琼脂扩散沉淀反应对于羊型布氏杆菌菌种的鉴定有一定的帮助。同时表明在应用此种反应作布氏杆菌病的诊断时, 宜选用羊型布氏杆菌来制备抗原, 方可得到较好效果。

在所作的注射 19 号菌苗的健牛中, 虽然试管凝集反应大部分为阳性, 补体结合反应一部分也为阳性, 而琼脂扩散沉淀反应则全部为阴性。这一点与 Bruce 氏所报告的结果相符, 不过 Bruce 氏的报告中没有说明所作牛只的总头数及注苗日期, 而所用的抗原也不相同。这一现象我们认为有相当实践意义, 因为它表明了机体对 19 号菌苗注射与自然感染的反应不同。琼脂扩散沉淀反应可能对区别乳牛注射 19 号菌苗后的血清凝集反应与自然患病后的血清凝集反应有一定帮助, 特别是在血清凝集滴度在 1:200 以上的时候, 因为在我们对自然患病牛只检验的结果, 血清滴度在 1:200 以上的, 琼脂扩散沉淀反应大部为阳性, 而在 1:400 以上的全部为阳性。

乳牛注射 19 号菌苗后不出现沉淀反应的原因,可能是由于弱毒活菌进入机体后增殖的数量较少,在机体内停留的时间较短,由菌体裂解后释出抗原物质刺激沉淀素形成的机会也较少,结果牛的血清在琼脂中不能与相应抗原出现明显的沉淀反应。此种现象可能与机体注射 19 号菌苗后不出现变态反应<sup>[4]</sup>和补体结合反应消失特快<sup>[6]</sup>等情况是属于同一性质的。

从所作的自然患病牛群及两个病牛群併群前后的结果看来,琼脂扩散沉淀反应与血清凝集反应和补体结合反应的出现不是完全一致的;按照Glenchur氏等(1962)<sup>[6]</sup>的说法,布氏杆菌病的各种血清学反应中,沉淀反应需要较强的抗原刺激作用方始出现,而消失也较快;因此,上面所列许多病牛血清凝集反应和补体结合反应阳性而沉淀反应仍为阴性的情况,似乎可以得到这样的解释。Glenchur氏等还认为沉淀反应是由于菌体在动物体内裂解,释出各种抗原物质,因而使机体形成沉淀素而来,它可能更真实的表现了病菌在机体内的活动和疾病的发展。他曾用自己对于布氏杆菌病人和实验感染的家兔所作的实验资料来说明这一论点。Bruce氏(1958)<sup>[4]</sup>对于牛的反应情况也曾认为有同样的现象。在我们所检查的併群的两群病牛中看来也似乎存在着这样的情况,例如在併群两周后即发生了临床流产,说明病情是有了发展,而在血清学反应有变动的牛只中,大部分也都表现了琼脂扩散试验的阳性结果。不过在牛只总的数目中只是少数,这可能是与牛群接触的频度有一定关系。

#### 四、结 语

1. 布氏杆菌病病牛及人工免疫家兔的血清琼脂扩散沉淀反应试验表明,用羊型布氏杆菌 2.5%石碳酸溶液抽提液作为抗原,可以得出比较满意的结果。培养基以含 0.172%氯化钠及缓冲磷酸盐的 1%琼脂效果较好。

2. 注射 19 号菌苗的乳牛,凝集反应大部分阳性,补体结合反应部分阳性,而琼脂扩散沉淀反应全部为阴性。这一现象表明了乳牛机体对菌苗注射与天然感染的反应的不同。它对于区别注苗后凝集反应与天然感染布氏杆菌后的凝集反应有一定帮助。

3. 自然感染布氏杆菌病乳牛的琼脂扩散沉淀反应的出现与血清试管凝集反应和补体结合反应的出现是不完全一致的。沉淀反应可能更确实的代表牛只患病的情况。

#### 参 考 文 献

- [1] Bruce, W. et al. (1958): Bull. WHO, 19: 187.
- [2] Redfearn, M. S. et al. (1960): Ditto, 23: 133.
- [3] 恽肇权等(1963): 未发表资料。
- [4] Gulyaev, A. I. (1961): Trudy Alma-Atinsk Zoo-Vet. Inst., 12: 243. Cited in Vet. Bull., 33(6): 1870.
- [5] Wisniewski, J. (1964): British Vet. J., 120: 15.
- [6] Glenchur, H. et al. (1962): J. Lab. Clin. Med., 59: 220.

## A STUDY ON AGAR GEL DIFFUSION PRECIPITATION TEST IN BOVINE BRUCELLOSIS

Chung-yu Lo and Mong-hou Kan  
(*Peking Agricultural University*)

This communication presents data of agar gel diffusion precipitation test for brucellosis of 1076 dairy cows' sera from 3 farms of different infective status. A 2.5% phenol extraction of *Br. melitensis* was used as antigen. The results of the test indicated that a part of sera from cows whose serum contained brucella agglutinin in titers of 1:50—1:100, and most of the sera from cows whose serum contained agglutinin in titers of 1:200 and above were positive to the test; while those from cows vaccinated with the strain 19 within 6 months were all negative in spite of high serum brucella agglutinin titers. All sera from healthy cows tested were negative.

In one farm, two formerly separately isolated groups of past reactors were gathered together in one isolation unit, showing indications of flaring up of the infection. This herd was tested in three times with intervals of 2-6 weeks: once before the two groups were brought together and twice after they were intermingled. Results of these tests showed that positive agar gel diffusion precipitation would occur in sera of cows when their serum agglutinin titers were increasing, even when the titers were still in a low level stage.

In view of the negative results of all strain 19 vaccinated cows tested and positive reactions among the sera of cows when the infection became progressive, the authors consider that the agar gel diffusion precipitation test may be used as an aid in differentiation of vaccinated animals from naturally infected ones, and it may also serve as a token of presence of an active brucellar infection in a dairy herd.