

猪源支气管败血波氏杆菌间接血凝诊断方法的建立

贺 英, 赵 萍, 储岳峰, 高鹏程, 赵海燕, 逯忠新

(中国农业科学院 兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 甘肃 兰州 730046)

摘要: 用引起猪传染性萎缩性鼻炎的支气管败血波氏杆菌全菌抗原致敏经戊二醛处理的绵羊红细胞, 制备成间接血凝试验抗原, 通过 IHA 来检测由支气管败血杆菌引起的猪传染性萎缩性鼻炎血清抗体。致敏绵羊红细胞的最佳抗原浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 血清效价 $\geq 1:8$ 即为阳性, 效价 $\leq 1:4$ 者判为阴性, 该方法具有很好的敏感性、特异性和可重复性, 而且操作简单, 适合大范围推广应用。

关键词: 波氏杆菌; 萎缩性鼻炎; 间接血凝试验

中图分类号: S828 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0263-04

Establishment of The Indirect Haemagglutination Test of *Swine Bordetella bronchiseptica*

HE Ying, ZHAO Ping, CHU Yue-feng, GAO Peng-cheng, ZHAO Hai-yan, LU Zhong-xin

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory
of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy
of Agriculture Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: Sheep red cell dealt with Glutaraldehyde solution is sensitized by the antigen of swine infectious atrophic rhinitis to detect the antibody against swine infectious atrophic rhinitis pneumonia by indirect haemagglutination test, showing sensitivity, specificity and repetition. The best antigen concentration is 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The serum is positive if antibody $\geq 1:8$. The serum is negative if antibody $\leq 1:4$. The method is brief and fit for use extensively.

Key words: *Bordetella bronchiseptica*; Swine infectious atrophic rhinitis; Indirect haemagglutination test

支气管败血波氏杆菌能够引起猪传染性萎缩性鼻炎(简写 AR), 此病是猪的一种慢性呼吸道传染病, 其特征为鼻炎、鼻梁变形、鼻甲骨萎缩, 以鼻甲骨下卷曲部最常见。临床症状表现为打喷嚏、鼻塞、颜面部变形或歪斜, 病猪生长缓慢, 常见于 2~5 月龄猪^[1]。

本病 1830 年在德国发现, 此后在英、法、美、加拿大、前苏联发生。现遍布养猪发达国家, 据报道世界猪群约有 25%~50% 受感染。我国 1964 年浙江余姚从英国进口的“约克”种猪发现本病, 20 世纪 70 年代我国一些省、市从欧、美等国家大批引进瘦肉型种猪使本病多渠道传入我国, 1984 年云南省兽医防疫站对省内 12 个县进行血清学调查, 猪的血清阳性率达 71.2%^[2]。

本菌不论在动物的鼻腔内或人工培养上均极易发生变异, 有三个菌相。其中病原性的是有荚膜的 I 相菌, 具有 K 抗原和强坏死毒素, II 相菌和 III 相菌则毒力弱。研究表明, I 相支气管败血波氏杆菌是原发性感染因子^[3]。

猪传染性萎缩性鼻炎已经存在于我国并呈流行趋势, 对养猪业构成严重的威胁, 所以建立快速的诊断方法, 加强进口及各省市猪流通环节的检验对控制本病的流行将起到重要作用。鉴于此, 用绵羊肺炎支原体抗原致敏经戊二醛处理的绵羊红细胞, 制备成间接血凝试验抗原, 通过 IHA 来检测 Bb 血清抗体。这一方法的建立对本病的预防与控制具有重要的意义。而且该方法具有快速、敏感、特异的特点, 并且操作简单, 实用性强, 费用低, 适合大范围推

收稿日期: 2008-08-12

基金项目: 国家科技支撑计划子课题(2006BAD06A12); 国家科技支撑计划子课题(2006BAD06A01)

作者简介: 贺英(1980-), 女, 内蒙古乌兰察布人, 硕士, 主要从事细菌分子生物学研究。

通讯作者: 逯忠新(1955-), 男, 甘肃秦安人, 研究员, 主要从事细菌分子生物学研究。

广应用。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 支气管败血波氏杆菌标准株购自中国兽药监察所。

1.1.2 血清 阴性血清选取经血清学证实为支气管败血波氏杆菌抗体阴性的健康猪,用常规方法分离血清;阳性血清为本实验室自制高免血清;田间血清为周边猪厂送检血清。

1.2 方法

1.2.1 阳性血清的制备 按照逯忠新等^[3]方法制备。

1.2.2 支气管败血波氏杆菌的浓缩及纯化 取用 KM₂ 培养基培养的 Bb 10⁹/mL^[4] 以上菌落的培养物,在 4℃ 下 4 000 r/min 离心 30 min,沉淀物用 0.15 mol/L pH 6.4 PBS 悬浮,如上洗涤 3 次后配成 20 倍浓缩抗原^[5]。

1.2.3 抗原的制备 将浓缩的菌体悬液在冰浴条件下用低频率超声波间歇裂解 30 min,裂解物以 3 500 r/min 离心 30 min 以除去全部残屑,收集上清液即为 IHA 致敏用抗原,经紫外分光光度计法计算所得菌体蛋白浓度。

1.2.4 绵羊红细胞的制备 颈静脉无菌采取绵羊血液与等量阿氏液混合,置冰箱稳定 3~5 d。经纱布过滤,以 3 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,再用 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 洗涤 3 次,配成红细胞悬液。

1.2.5 红细胞的醛化 取红细胞悬液与 2.5% 戊二醛按适量混合,搅拌醛化 2 h,用 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 洗涤 3~4 次,配成醛化红细胞悬液。

1.2.6 鞣酸化 将醛化红细胞悬液与等量的新配 1:20 000 鞣酸溶液混合,置 37℃ 水浴中 30 min 后,用 0.15 mol/L pH 6.4 PBS 洗涤 3~4 次,配成醛化—鞣酸化红细胞悬液。

1.2.7 醛化鞣酸化红细胞的致敏 分别取 1 份 5% 醛化—鞣酸化红细胞与 1 份抗原,在 37℃ 水浴中作用 40 min,离心沉积红细胞,用 1% 健兔血清 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 洗涤 3 次后,配成 1% 致敏红细胞悬液。

1.3 IHA 试验

1.3.1 抗体效价的测定 96 孔 V 型反应板从第 1 孔,至第 8 孔,每孔滴加稀释液 25 μ L,用微量移液器吸取被检血清 25 μ L 加入第 1 孔,充分混匀后再吸取 25 μ L 加入第 2 孔……依次做倍比稀释至第 8 孔,每孔滴加 1% 敏化红细胞 25 μ L。放在微量震荡

器上震荡 1 min,置 37℃ 2 h,判定结果。

“++++”红细胞全部凝集,形成一层均匀膜,布满整个孔底。

“+++”红细胞在孔底形成一层薄膜,面积比前者稍小。

“++”红细胞在孔底形成薄膜凝集,边缘松散或呈锯齿状。

“+”红细胞在孔底呈稀薄、散在、少量凝集,孔底有小圆点。

“±”红细胞沉于孔底,但周围不光滑或中心有空斑。

“-”红细胞完全沉于孔底,呈光滑的圆点。

出现“++”的血清最高稀释倍数即为该血清的血凝效价。

1.3.2 抗原最佳浓度测定 将抗原分别稀释成 200, 150, 120, 100, 80, 50 μ g/mL 致敏红细胞,根据凝集程度来判断最佳抗原浓度。

1.3.3 判定标准试验^[6] 为确定该 IHA 试验方法的判定标准,分别用三批 IHA 试验抗原检测了 40 份健康猪血清和 20 份感染猪血清,以确定判定标准。

1.3.4 敏感性试验^[6] 用三批试验抗原对已知阳性血清 45 份、阴性血清 40 份和此两种血清无序混合后获得的 85 份血清分别进行了检测,进行敏感性检测。

1.3.5 特异性试验 用该诊断试剂分别检测了巴氏杆菌、猪传染性胸膜肺炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌阳性血清共 30 份,进行特异性试验。

1.3.6 重复性试验^[6] 分别检测以下几种类型血清:①30 份感染猪血清;②5 份健康猪血清;③35 份免疫后 30 d 所采血清;④100 份田间猪血清;⑤60 份临床健康猪血清。以明确诊断试剂的可重复性。符合率(%)的计算公式为符合率(%)=(a+d/a+b+c+d)×100%,其中 a 为待检试剂盒结果阳性检测结果为阳性结果的样品数, b 为待检试剂盒结果阳性检测结果为阴性结果的样品数, c 为待检试剂盒结果阴性检测结果为阳性结果的样品数, d 为待检试剂盒结果阴性检测结果为阴性结果的样品数。

2 结果与分析

2.1 IHA 抗原最适浓度选择

用不同浓度抗原致敏红细胞,进行 IHA 检测,根据凝集程度判定其最佳浓度,结果见表 1。

以上结果显示,抗原浓度从 50 μ g/mL 开始随着浓度升高,效价也在升高,在 100 μ g/mL 时效价达到 1:2 048 以上,但当浓度达到 120 和 200 μ g/mL 以后

效价反而降低, 因此确定抗原的最适浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。从表 2 可以看出, 不同批次诊断抗原检测健康猪血清的 IHA 抗体效价全都小于等于 1: 4; 此值即为阴性血清的最高效价(上限)。

2.2 判定标准试验

用 IHA 检测健康血清和感染血清确定判定标准

表 1 IHA 抗原最适浓度

Tab. 1 Suitable concentration of antigen to IHA

抗原浓度 ($\mu\text{g/mL}$) Concentration of antigen	血清 Serum	血清稀释度 Dilution of serum											对照
		1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64	1: 128	1: 256	1: 512	1: 1 024	1: 2 048	
200	阴性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	阳性	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	-	-
150	阴性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	阳性	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
120	阴性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	阳性	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	-	-
100	阴性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	阳性	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	-
80	阴性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	阳性	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
50	阴性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	阳性	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	-	-

表 2 不同批次抗原对健康猪血清检测结果

Tab. 2 The healthy serum detected by the different antigen

抗原批次 Different antigen	血清份数 Number of serum	检测次数 Times of detection	被检血清抗体水平 The antibody of the detected serum						
			1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64	1: 128
070701	40	第一次	12	2	0	0	0	0	0
		第二次	11	1	0	0	0	0	0
		第三次	10	1	0	0	0	0	0
070801	40	第一次	9	2	0	0	0	0	0
		第二次	9	2	0	0	0	0	0
		第三次	10	2	0	0	0	0	0
070901	40	第一次	9	2	0	0	0	0	0
		第二次	9	1	0	0	0	0	0
		第三次	9	2	0	0	0	0	0

表 3 不同批次抗原对人工感染猪血清检测结果

Tab. 3 The infected serum detected by the different antigen

抗原批次 Different antigen	血清份数 Number of serum	检测次数 Times of detection	被检血清抗体水平 The antibody of the detected serum						
			1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64	1: 128
070701	20	第一次	30	30	30	23	14	1	0
		第二次	30	30	30	24	13	2	0
		第三次	30	30	30	24	13	1	0
070801	20	第一次	30	30	30	24	13	0	0
		第二次	30	30	30	24	13	1	0
		第三次	30	30	30	24	13	2	0
070901	20	第一次	30	30	30	24	13	1	0
		第二次	30	30	30	24	13	1	0
		第三次	30	30	30	24	14	1	0

从表 3 可以看出, 检测人工感染猪血清的 IHA 抗体效价全都大于等于 1: 8, 此值即为感染血清的最低效价(下限)。

2.3 敏感性试验

根据表 2 和表 3 结果, 确定本方法的判定标准

为: 血清效价 $\geq 1: 8$ (++) 或以上者判为阳性, 效价 $\leq 1: 4$ 者判为阴性, 介于二者之间判为可疑。

由表 4 可知, 三批试验抗原对 45 份已知阳性血清检出率均达 100%, 对 40 份阴性血清的阳性检出率为 0, 对 85 份混合血清阳性检出率同样达到

100%, 由此表明该诊断方法对不同类型的血清均具有较好的敏感性。

表 4 敏感性试验检测结果

Tab. 4 The test of sensibility

抗原批次 Different antigen	被检血清及阳性数 The detected serum and the positive number		
	阳性血清 45 份 Positive (45)	阴性血清 40 份 Negative (40)	混合血清 85 份 Mixture (85)
070701	45(100%)	0(0%)	45(100%)
070801	45(100%)	0(0%)	45(100%)
070901	45(100%)	0(0%)	45(100%)

表 5 重复性试验检测结果

Tab. 5 The test of repeat

血清类别 The type of serum	检测次数及阳性数 The detected times and the positive number			符合率/ % Congruous
	第一次 The first time	第二次 The second time	第三次 The third time	
30 份感染血清 The infected senum (30)	30	30	30	100
5 份健康血清 The healthy serum (5)	0	0	0	100
30 份免疫血清 The immune senum (30)	29	28	30	93. 3
100 份田间血清 The field serum (100)	20	19	19	99

3 讨论

猪感染支气管败血波氏杆菌 2~ 4 周, 血清中即出现凝集抗体, 有些国家采用的是试管凝集的方法诊断本病^[7- 9], 国内没有建立一种稳定的检测方法。固我们建立间接血凝诊断方法为检测这一病原的感染情况提供了及时、简便的方法。

建立间接血凝诊断方法其阳性血清的效价至关重要, 阳性血清的制备过程中若抗原浓度起到了决定性作用, 浓度太大就会产生免疫抑制, 太小抗体效价较低, 本试验将支气管败血波氏杆菌浓缩到适合浓度用其制备的阳性血清效价可达 1: 2 048; 支气管败血波氏杆菌的处理采用反复冻融和超声破碎的方法, 以提高抗原蛋白的纯度。

在红细胞的致敏过程中需要选择一个最佳浓度, 只有达到最佳浓度效价才会最高; 与以往判定标准的依据相比较而言, 本判定标准试验中采取以健康血清为上限, 感染血清为下限确定了合理的判定依据, 这样更加完善; 在敏感性试验中, 三批试验抗原对 45 份已知阳性血清检出率均达 100%, 对 40 份阴性血清的阳性检出率为 0, 对 85 份混合血清阳性检出率同样达到 100%, 由此表明该诊断方法对不同类型的血清均具有较好的敏感性; 在特异性试验中分别检测了巴氏杆菌、猪传染性胸膜肺炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌阳性血清共 30 份, 结果均为阴性, 说明该诊断方法具有良好的特异性; 在重复性试验

2. 4 特异性试验结果

用该诊断试剂分别检测了巴氏杆菌、猪传染性胸膜肺炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌阳性血清 30 份, 结果均为阴性, 说明该诊断方法具有良好的特异性。

2. 5 重复性试验

分 3 次检测不同类型的血清结果见表 5, 结果表明, 该诊断试剂的符合率都在 93% 以上, 具有很好的重复性。

中分三次分别检测不同血清其符合率都在 93% 以上, 说明该诊断方法具有很好的重复性; 而且该方法操作简单, 费用低, 适合大范围的推广应用。

参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 359- 371.
- [2] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 198- 201.
- [3] 逯忠新. 用间接血凝试验检测猪传染性胸膜肺炎[J]. 中国兽医科技, 1999, 29(10): 25- 27.
- [4] 吴 斌, 陈焕春, 何启盖, 等. 应用乳胶凝集试验对猪萎缩性鼻炎进行血清学流行病学的调查[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(6): 21- 22.
- [5] 朱立平, 陈血清. 免疫学常用试验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 352- 355.
- [6] 逯忠新, 赵 萍. 猪传染性胸膜肺炎间接血凝试验抗原与阴、阳性血清制造与检验试行规程(2006) 新兽药证字 63 号.
- [7] 齐铁英, 苑士祥. 我国部分地区猪传染性萎缩性鼻炎病原的调查[J]. 中国兽医科技, 1995, 25(4): 15- 16.
- [8] Register K B, Brockmeier S L. Reduced virulence of a Bordetella bronchiseptica siderophore mutant in neonatal swine[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(4): 2137- 2143.
- [9] Cimolai N Cheong A. An assessment of a new diagnostic indirect enzyme immunoassay for the detection of anti Mycoplasma pneumoniae IgM[J]. Am J Clinical Pathol, 1996, 105: 205- 209.