

绵羊肺炎支原体间接血凝诊断方法的建立

赵 萍, 逯忠新, 储岳峰, 高鹏程, 贺 英, 石 琴
(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 来检测绵羊支原体性肺炎血清抗体. 致敏绵羊红细胞的最佳抗原浓度为 100 Lg/mL, 血清效价 \ 1 B 8 即为阳性, 效价 [1 B 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: 绵羊肺炎支原体; 间接血凝试验; 诊断

中图分类号: S 854. 4⁺ 3 文献标识码: A 文章编号: 10024315(2008) 0120029204

Development of the indirect haemagglutination
test of *M. ovipneumoniae*

ZHAO Ping, LU Zhongxin, CHU Yuefeng, GAO Pengcheng, HE Ying, SHI Qin
(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology,
Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: Sheep red blood cell dealed with glutaraldehyde solution was sensitized by the antigen of *M. ovipneumoniae* to detect the antibody against Mycoplasmal pneumonia of sheep by indirect haemagglutination test. The best antigen concentration was 100 Lg/ mL. The serum is positive if antibody was \ 1 B 8. The serum was negative if antibody was [1 B 4.

Key words: *M. ovipneumoniae*; indirect haemagglutination test; diagnosis

绵羊支原体性肺炎是由绵羊肺炎支原体 (*M. ovipneumoniae*) 引起的一种以咳嗽、喘气、渐进性消瘦以及肺间质增生性炎症为特征的慢性呼吸道传染病^[1], 标准株为 Y₉₈^[2]. 在亚洲、非洲以及其他养羊业发达的地区广泛流行, 在我国本病的流行趋势也日益严重, 对畜牧业的发展构成了严重的威胁. 目前该病的诊断方法还不完善, 鉴于此, 本文用绵羊肺炎支原体抗原致敏经戊二醛处理的绵羊红细胞, 制备间接血凝试验抗原, 旨在通过 IHA 来检测绵羊支原体性肺炎血清抗体.

- 1 材料与方法
1. 1 试验材料
1. 1. 1 菌种 Y₉₈标准株购自中国兽药监察所.
1. 1. 2 血清 阴性血清为选取经血清学证实为绵羊肺炎支原体抗体阴性的健康羊, 用常规方法分离的血清; 阳性血清为本实验室自制; 田间血清为周边羊场送检血清.
1. 2 方法
1. 2. 1 阳性血清的制备 按照逯忠新等^[3, 4]方法制备.
1. 2. 2 支原体的浓缩及纯化 取用 KM₂培养基培养的 Y₉₈ 10⁹/mL 以上菌落的培养物, 在 4 e, 1 000 r/ min 离心 20 min, 取上清液以 8 000 r/ min 离心 1 h, 沉淀物用 0. 15 mol/ L pH6. 4 PBS 再悬浮, 如上洗涤 3 次后配成 20 倍浓缩抗原^[5- 10]

作者简介: 赵 萍(1973-), 女, 汉族, 甘肃会宁人, 助理研究员, 学士, 主要从事细菌分子生物学. E- mail: zhaoping73@126. com

资助基金: 甘肃省农业生物技术专项(GNSW- 2005- 16).

收稿日期: 2007- 04- 26

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 1250 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。经纱布滤过, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 再用 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 洗涤几次, 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 洗涤几次, 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 B20 000 鞣酸溶液混合, 置 37 °C 水浴中 30 min 后, 用 0.15 mol/L pH 6.4 PBS 洗涤几次, 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 °C 水浴中作用 30 min, 离心沉积红细胞, 用 1 % 健兔血清 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 洗涤几次后, 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 孔开始至第 8 孔, 每孔滴加稀释液 25 LL, 用微量移液器吸取被检血清 25 LL 加入第 1 孔, 充分混匀后再吸取 25 LL 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 LL。放在微量震荡器上震荡 1 min, 置 37 °C 2 h, 判定结果。

/+++++0 表示红细胞全部凝集, 形成一层均匀膜, 布满整个孔底。

/+++0 表示红细胞在孔底形成一层薄膜, 面积比前者稍小。

/++0 表示红细胞在孔底形成薄膜凝集, 边缘松散或呈锯齿状。

/+0 表示红细胞在孔底呈稀薄、散在、少量凝集, 孔底有小圆点。

/?0 表示红细胞沉于孔底, 但周围不光滑或中心有空斑。

出现 /++0 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 Lg/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 为确定该 IHA 试验方法的判定标准, 分别用 3 批 IHA 试验抗原检测了 40 份健康羊血清和 60 份感染羊血清^[4,5,7,9], 以确定判定标准。

1.3.4 敏感性试验 用 3 批试验抗原对已知阳性血清 65 份、阴性羊血清 60 份和此 2 种血清无序混合后获得的 125 份血清分别进行了检测, 进行敏感性检测^[4]。

1.3.5 特异性试验 用该诊断试剂分别检测了丝状支原体山羊亚种阳性血清 15 份, 进行特异性试验。

1.3.6 重复性试验 分别检测以下几种类型血清: 60 份感染羊血清; 5 份健康羊血清; 35 份免疫后 30 d 所采血清; 200 份田间羊血清; 60 份临床健康羊血清。以明确诊断试剂的可重复性^[4]。

2 结果

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。

表 1 显示, 抗原浓度从 50 Lg/mL 开始随着浓度升高, 效价也在升高, 在 100 Lg/mL 时效价达到 1 B2048 以上, 但当浓度达到 120 Lg/mL 和 200 Lg/mL 以后效价反而降低, 因此确定抗原的最适浓度为 100 Lg/mL。

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, 结果见表 2 和表 3。

从表 2 可以看出, 不同批次诊断抗原检测健康羊血清的 IHA 抗体效价全都小于等于 1 B4; 此值即为阴性血清的最高效价(上限)。

从表 3 可以看出, 检测人工感染羊血清的 IHA 抗体效价全都大于等于 1 B8, 此值即为感染血清的最低效价(下限)。

根据表 2 和表 3 结果, 确定本方法的判定标准

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

表 1 IHA 抗原最适浓度

Tab. 1 Suitable concentration of antigen to IHA

抗原浓度 /Lg# mL ⁻¹	血清	血清稀释度											对照
		1 B 2	1 B 4	1 B 8	1 B 16	1 B 32	1 B 64	1 B 128	1 B 256	1 B 512	1 B 1024	1 B 2048	
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羊血清检测结果

Tab. 2 The healthy serum detected by the different antigen

抗原批次	血清份数	检测次数	被检血清抗体水平						
			1 B 2	1 B 4	1 B 8	1 B 16	1 B 32	1 B 64	1 B 128
040601	40	第 1 次	12	2	0	0	0	0	0
		第 2 次	11	1	0	0	0	0	0
		第 3 次	10	1	0	0	0	0	0
050401	40	第 1 次	9	2	0	0	0	0	0
		第 2 次	9	2	0	0	0	0	0
		第 3 次	10	2	0	0	0	0	0
050501	40	第 1 次	9	2	0	0	0	0	0
		第 2 次	9	1	0	0	0	0	0
		第 3 次	9	2	0	0	0	0	0

表 3 不同批次抗原对人工感染羊血清检测结果

Tab. 3 The infected serum detected by the different antigen

抗原批次	血清份数	检测次数	被检血清抗体水平						
			1 B 2	1 B 4	1 B 8	1 B 16	1 B 32	1 B 64	1 B 128
040601	60	第 1 次	60	60	60	33	24	1	0
		第 2 次	60	60	60	34	23	2	0
		第 3 次	60	60	60	34	23	1	0
050401	60	第 1 次	60	60	60	34	23	0	0
		第 2 次	60	60	60	34	23	1	0
		第 3 次	60	60	60	34	23	2	0
050501	60	第 1 次	60	60	60	34	23	1	0
		第 2 次	60	60	60	34	23	1	0
		第 3 次	60	60	60	34	24	1	0

2. 3 敏感性试验结果

由表 4 可知, 3 批试验抗原对 65 份已知阳性血清检出率均达 100 %, 对 60 份阴性血清的阳性检出率为 0 %, 对 125 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.

2. 4 特异性试验结果

用该诊断试剂分别检测了丝状支原体山羊亚种阳性血清 15 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.

表 4 敏感性试验检测结果
Tab.4 The test of sensibility

抗原批次	被检血清阳性数		
	阳性血清	阴性血清	混合血清
040601	65(100 %)	0(0 %)	65(100 %)
050401	65(100 %)	0(0 %)	65(100 %)
050501	65(100 %)	0(0 %)	65(100 %)

注: 阳性血清 65 份; 阴性血清 60 份; 混合血清 125 份.

表 5 重复性试验检测结果
Tab.5 The test of repeat

血清类别	被检血清阳性数			符合率 / %
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	
60 份感染羊血清	60	60	60	100
5 份健康羊血清	0	0	0	100
35 份免疫羊血清	34	34	35	97. 1
200 份田间羊血清	20	19	19	99. 5

由表 5 可知, 该诊断试剂的符合率都在 97 % 以上, 具有很好的重复性.

3 讨论

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太大就会产生免疫抑制, 太小抗体效价较低. 本试验将支原体浓缩到适合浓度用其制备的阳性血清效价可达 1 B2048; 支原体的处理采用先低速离心除去杂蛋白, 然后高速离心沉淀支原体, 这种方法比直接高速离心纯化蛋白效果更好, 而且减少了不必要的浪费; 在红细胞的致敏过程中并非抗原浓度越大效价越高, 而是存在一个最佳浓度, 抗原在这一浓度下抗体的效价才会最高; 在判定标准的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, 这与以往的判定标准的依据相比较更完善; 在敏感性试验中, 3 批试验抗原对 65 份已知阳性血清检出率均达 100 %, 对 60 份阴性血清的阳性检出率为 0 %, 对 125 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丝状支原体山羊亚种阳性血清 15 份, 结果均为阴性, 说明

该诊断方法具有良好的特异性; 在重复性试验中分 3 次分别检测不同血清, 符合率都在 97% 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] 毕丁仁, 王桂枝. 动物霉形体及研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 9291

[2] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 352371

[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): 2527

[4] 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

[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: 352355

[6] 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: 202209

[7] 傅生芳, 陈怀涛, 常惠芸, 等. 羊传染性胸膜肺炎的病理学诊断 [J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(3): 3234

[8] Thiaucourt F. Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmas of sheep and goats [J]. Rev Sci Tech, 1996, 15: 139721414

[9] Wesonga H O, Thiaucourt F. Experimental contagious caprine pleuropneumonia: a long term study on the course of infection and pathology in a flock of goats infected with Mycoplasma capricolum subsp [J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 2004, 45(34): 162179

[10] Mohan K, Hill F W. Mycoplasma ovipneumoniae infection in Zimbabwean goats and sheep [J]. Comp Pathol, 1992, 107: 7279

[11] Todorov D. Mycoplasma carrier state in the respiratory apparatus of sheep and lambs [J]. Vet Med Nauki, 1985, 22: 21226