

猪附红细胞体病诊断方法研究进展*

邓 宇 郝桂英 邓 华

(西昌学院 动物科学系, 四川 西昌 615013)

【摘要】本文主要简要综述了猪附红细胞体病诊断方法,为防治该病提供参考。

【关键词】猪 附红细胞体病 诊断

【中图分类号】S858.289 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2007)02-0042-03

猪附红细胞体病 (Eperythrozoonosis) 是由猪附红细胞体 (Eperythrozoon suis) 感染猪所引起的一种传染性血液病。附红细胞体寄生于人、猪等多种动物的红细胞或血浆中,属人畜共患病,主要侵害动物的红细胞和造血组织,主要表现为黄疸性贫血,发热、呼吸困难、虚弱、流产、腹泻等症状。但是不同动物感染附红细胞体后,其临床表现有很大差异。由于该病广泛分布于世界,严重威胁着畜牧业的发展和人类健康,并呈范围扩大趋势,因此,该病已引起人们的广泛关注。

1 病原学检测

1.1 血涂片染色镜检

附红细胞体血涂片对各类的染色均容易着色^[1]通过姬姆萨染色,红细胞一般呈紫红色,附红细胞体有折光性,外面有白色的环,瑞氏染色时红细胞一般呈淡紫红色,附红细胞体一般呈天蓝色。每个红细胞上附着的附红细胞体的数目各异,中度感染一般为 6~7 个,重度感染的时候可达到 20 个以上,此时红细胞暗视野下如同锯齿状,附红细胞体染色的镜检形状与鲜血悬滴的镜检情况相同,但染色时要注意区分附红细胞体与染料沉淀物的区别。

1.2 电镜观察

电镜下的红细胞表面的附红细胞体多为球状、饼状、卵圆形、短杆状等多种形态。大小为 0.2~2.6nm。单个的附红细胞体则成球状、饼状等多种形态^[2]。其中,球状附红细胞体上常见有一根到数根细长状结构,附着在红细胞表面上,则使红细胞膜产生

一些小而深凹陷的变形。

张雪峰等^[8]通过电镜观察,发现寄生附红细胞体的红细胞表面有一层冷凝素 IgM,并且在红细胞膜完好的地方不存在冷凝素 IgM。当血液加热到 37℃ 30min 后电镜观察,其上面附着的冷凝素 IgM 随即消失,这一现象对于我们研究附红细胞体的致病机理方面提供了有力的支持,也就是附红细胞体病会引起一种经冷凝素介导的或与之相关的自身免疫溶血性贫血。可以认为猪附红细胞体和红细胞相互作用过程中,红细胞膜发生改变,从而导致被遮蔽的抗原暴露出来或者使已有的抗原发生变化,这些抗原被自身免疫系统视为异物,附红细胞体附着在红细胞膜上后,机体产生自身抗体并攻击被感染的红细胞。这些抗体是 IgM,他们是否沉积于红细胞取决于温度,在较高的温度下 (37℃) 脱离红细胞表面,在较低的温度下 (4℃) 时又会紧紧的附在红细胞表面。同时由于急性期间有冷凝素存在,所以,在肢端的毛细血管中会引起微凝血和血栓形成,因此这些区域的温度比身体中心的温度低。

1.3 鲜血悬滴镜检

取静脉血或心血 1 滴加 4~6 滴的生理盐水混匀,用盖玻片覆盖,显微镜下即可见变形的血球、呈淡绿色荧光的附红细胞体。在油镜下可见锯齿状、星芒状红细胞。红细胞内和血浆中可见附红细胞体,大多呈球形、逗号形、条形细小颗粒状^[2]。血浆中游离的附红细胞体有明显的翻滚、伸缩、摆动等运动 and 不同方位的移动。

1.4 动物实验

此方法不用于常规诊断,适用于附红细胞体病

收稿日期 2007-04-02

*基金项目:四川省教育厅青年基金项目 (NO. 2006B016);西昌学院人才引进基金项目 (NO. YJSA0602)

作者简介:邓宇 (1978-),男,硕士,助教,主要从事动物医学科研与教学。

研究。以含附红细胞体的红细胞经兔静脉人工感染, 4~8 天为附红细胞体的高峰期, 15 天后消失。目前, 也有人采用鸡、小白鼠^[2, 3]来做动物试验。

2 补体结合试验

Sputter (1958 年) 首次采用补体结合试验用于诊断猪的附红细胞体病。此方法用于诊断急性病猪效果较好, 病猪出现症状后的 7 天采用此方法进行检测, 其结果呈阳性, 但 2~3 周后检测结果为阴性。但慢性猪附红细胞体病均呈阴性反应^[4]。

3 间接血凝试验

该方法是 1975 年由 Smith 研究成功, 并将间接血凝试验滴度 1: 40 定为阳性。该法灵敏度较高, 能检出补体结合反应转阴后的耐过猪^[4]。

4 荧光抗体技术

此方法是 1970 年由华松最早用来诊断牛附红细胞体病, 抗体在感染后的第 4 天出现, 并随着感染率的上升而上升, 第 28 天达到高峰^[4]。

5 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

1976 年, Lang 等采用 ELISA 方法, 用去掉绵羊红细胞的绵羊附红细胞体抗原进行试验, 认为此法的敏感性比间接血凝试验高 8 倍。HusFrankHill (1992 年) 等同时采用 ELISA 与间接血凝试验对猪的附红细胞体进行检测, 两种方法的检测结果差异显著, 证实 ELISA 是一种敏感、快速和特异的检测方法^[5]。用 ELISA 方法诊断附红细胞体病是近几年才发展起来的。用纯化抗原免疫制备超免疫血清, 以辣根过氧化物酶标记葡萄球菌 A 蛋白作为二抗, 建立了辣根过氧化物酶标记葡萄球菌 A 蛋白的酶联免疫吸附试验 (PPA-ELISA) 检测方法^[10]来检测猪血液, 结果显示, PPA-ELISA 方法适合检测猪附红细胞体。张守发等建立了一种检测猪附红细胞体抗体的 Dot-ELISA 方法, 经试验证实, 所建立的方法是一种比较敏感、特异和稳定的血清学检测方法, 能用于猪附红细胞体的抗体检测和疾病诊断。

6 分子生物学诊断

Oberst^[7]在噬菌体构建了猪附红细胞体 DNA 文库, 并筛选出 KSU-2 克隆作为诊断探针, 与感染猪附红细胞体的猪血抽提的 DNA 杂交反应较好, 且不与未感染猪附红细胞体的血所抽提的 DNA 反应。随后^[7]又利用 PCR-DNA 杂交技术分别检测出感染猪附红细胞体病猪血液中的病原体。

Gwaltney^[5]用组织原位杂交和电镜相结合对血液样品中的附红细胞体进行了检测, 并且建立了利用 PCR 技术检测猪附红细胞体的技术, 对脾脏切除猪人工感染后 24h 即可检测出。1994 年他又对猪试验性感染猪附红细胞体血液样品进行了 PCR 检测和间接血凝试验抗体检测比较, 证实 PCR 方法优于间接血凝试验, 且青年猪感染后抗体产生少。Vandervoort C (2001) 也用 PCR 技术对牛群中牛附红细胞体的感染进行了检测, 结果发现 PCR 技术比血液涂片敏感性要高得多, 甚至可以检测出涂片为阴性的病例。对猪的附红细胞体的分子生物学检测和诊断, 不仅为临床上更好的控制该病提供了很好的保障, 也为进一步研究该病的发病机制提供了很好的手段, 对其他动物的附红细胞体病的研究也是很好的借鉴。根据 16S rRNA 基因设计引物^[9] Brinson 等 (2001) 用于狗附红细胞体诊断, Berent 等 (1998) 用于猫的附红细胞体检测, 目前我国一些学者也用于猪的附红细胞体的检测。这种分子生物学诊断技术特异性和敏感性高, 可用于流行病学调查和临床检查。张浩吉等^[12]根据猪附红细胞体广东株 16S rRNA 基因的序列特点, 设计合成种特异性引物, 建立了猪附红细胞体 PCR 检测方法, 结果表明, 建立的 PCR 检测方法具有极高的敏感性和特异性, 可用于急性猪附红细胞体病和临床健康带菌猪的诊断。袁聪俐^[13]建立起半套式 PCR 方法检测猪附红细胞体病, 并与镜检方法比较, 结果证实, 所建立的检测比镜检方法高效准确, 适合猪附红细胞体病的早期诊断。

7 结语

猪附红细胞体病发生以来, 在世界范围内广泛流行, 已严重危害着养猪业, 给包括中国在内的世界养猪业造成了巨大经济损失。加大对附红细胞体的

分子生物学特性、生活史、发病机制的研究力度,建立更加快速、敏感、准确的诊断方法,定期检测,不断推广新方法和新技术,在一定程度上控制猪附红细胞体对我国养猪业及公共卫生构成的巨大威胁。

致谢:感谢何学谦副教授对本文的悉心指导!

参考文献:

- [1]郭注,李治悦.阜阳市附红细胞体病研究[J].安徽预防医学杂志,1999,5(1):5-6.
- [2]华修国,李宏全.附红细胞体病患畜病理组织学及血液学变化的研究[J].上海农学院学报,1998,16(2):116-120.
- [3]李秀敏.人兽共患附红细胞体病的研究现状[J].当代畜牧,1998(1):3-4.
- [4]方武,郝士庆,刘辉,周晓利.附红细胞体研究概况[C].中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第十次研讨会论文集,2002:721-724.
- [5]Gwaltney S, Hays M P, Obersit R D. Detection of Eperythrozoon suis using the polymerase chain reaction[J]. Yet Diagn Invest, 1993, 5(1): 40-46.
- [6]Oberest R D, Gwaltney S M, Hays M P. Experimental infections and natural outbreaks of eperythrozoonosis in pig identified by PCR-DNA hybridization[J]. J vet Diagn Invest, 1993, 5: 51.
- [7]Oberest R D, Hall S M, Schoneweis D A. Petition of Eperythrozoon suis, DNA from blood by whole organism DNA hybridizations. Vet micrkb, 1990, 24: 127.
- [8]张雪峰,曹三杰,杨利.猪附红细胞体电镜特点及药物治疗效果的电镜观察[J].中国预防兽医学报,2005,27(4):295-303.
- [9]Messick J B, copper S K, Huntley M. Development and evaluation of polymerase chain reaction assay using the 16SrRNA gene for detection of Eperythrozoon suis infection[J]. Yet Invest, 1991, 11(3): 229.
- [10]韩惠瑛,孟日增,贾鸿莲.猪附红细胞体 PPA-ELISA 检测方法的建立[J].中国兽医科技,2005,35(1):49-51.
- [11]张守发,张国宏.猪附红细胞体 Dot-ELISA 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2006,28(1):96-97.
- [12]张浩吉,谢明权,张健马等.猪附红细胞体 PCR 检测方法的建立和初步应用[J].中国兽医学报,2005,25(6):480-481.
- [13]袁聪俐,杨志彪,朱建国等.半套式 PCR 方法检测猪附红细胞体病的建立[J].上海交通大学学报(农业科学版),2006,24(1):58-59.

Research Developments on the Diagnostic Method of Eperythrozoonosis

DENG Yu ,HAO Gui - ying ,DENG Hua

(Department of Animal Science, Xichang College, Xichang, Sichuan 615013)

Abstract: We briefly reviewed the diagnostic method of Eperythrozoon suis, and want to provide some suggestions for the prevention and cure of the disease.

Key words: Pig; Eperythrozoonosis; Dianogosis

(责任编辑:张荣萍)