

陕西省猪冬季拉稀病的诊断 和荧光抗体的研制

李东成 肖俊杰 赵余放 寇改霞

(西北农学院畜牧兽医系)

摘 要

从西北农学院附近付家庄生产队患拉稀病的小猪肠道粘膜刮取物分得病毒2株(简称付Ⅰ株和付Ⅱ株),并在猪体内传了7代,均可规律地引起同样症状。以华Ⅰ株和第7代付Ⅰ株(均为小肠粘膜刮取物)分别各免疫健猪3头,采取血液分离血清,制成荧光抗体。另以上海市畜牧兽医研究所赠予的猪传染性胃肠炎荧光抗体(冻干制品)作为对照,分别对付Ⅰ株、付Ⅱ株 and 上海市畜牧兽医研究所赠予的华Ⅰ株的人工感染猪肠粘膜刮取物涂片和扁桃体、肠壁切片进行交叉染色,均可发现明亮的黄绿色荧光细胞,从而证明付Ⅰ株、付Ⅱ株和华Ⅰ株为同一病毒,并证明陕西武功一带所流行的猪冬季拉稀病与上海地区所流行的“猪传染性胃肠炎”为同一种疾病。

陕西省关中和陕南许多地区历年来每到初冬,即开始在猪群中爆发一种以腹泻为主要症状的疾病,一般到十二月上、中旬(有时在农历春节前后)进入流行盛期,至三月以后,随着气候转暖,流行逐渐停息。病猪主要症状为拉灰黄色(有时为灰色或灰绿色)稀水,体温正常或有一过性发热,个别猪有呕吐现象,一般经5~7天痊愈,但哺乳仔猪和产后不久的带仔母猪症状重笃,如不迅速采取对症治疗,常因脱水而死,由于发病率很高(一般为60%左右,有时超过80%),因而造成的损失很大。

关于本病的病因,多年来有不同的看法,有的认为是过食青菜、红薯等所引起,有的认为与发霉饲料有关,但有些地区并没有饲料配合上的错误,仍不免于发病,因而怀疑为一种传染性疾病。为了确定病性,研究诊断方法,我们从1978年冬季开始,进行了这一研究。

一、动物感染试验

1. 接种材料的准备

从西北农学院附近付家庄生产队一社员家购买发病不久的幼猪2头(代号:付Ⅰ、付Ⅱ),扑杀后,采取小肠,倒掉内容物,用灭菌手术剪将其纵向剪开,摊平,以灭菌载玻片刮取肠粘膜层。分别将粘膜团块置玻质匀浆器中,加入少量灭菌生理盐水进行匀浆,继续加生理盐水,作成1:10(克/毫升)乳浊液,置-20℃冰箱冻结,冻融3次后,经3000转/分离心20分钟,取上清液,加入青、链霉素各1,000单位/ml,置37℃温箱作用60分钟后,接种普通琼脂和肉汤,无细菌生长,以其作为感染材料,简称付Ⅰ和Ⅱ。

2. 试验动物

从西北农学院教学试验农场农作一站购买2~4日龄健康的而且未接种过任何疫苗的仔猪6头,置温暖房间,隔离观察2天,确认健康后,将其分为3组,每组2头,第一、二两组为试验组,第三组为对照组。在整个试验期间,以消毒牛奶进行人工哺乳。

3. 感染方法

将制备好的付Ⅰ和付Ⅱ接种材料各10ml分别用口服、滴鼻两种方法感染第一、二两组试验动物;第三组以灭菌生理盐水代替接种材料,余均与试验组相同。

感染后随时观察试验猪的临床表现,俟试验仔猪出现灰黄或灰白色水样腹泻后(对照仔猪无此症状),宰杀,采取小肠,按上述方法进行继代,现在已继代至7代。

4. 试验结果

付Ⅰ和付Ⅱ两份病料接种试验动物后,每代均经20~28小时,规律地出现水样腹泻症状。其小肠肠壁苍白、菲薄,用空肠粘膜刮取物涂片,冷丙酮固定20分钟,以上海市畜牧兽医研究所赠送的猪传染性胃肠炎荧光抗体染色,均出现明亮的黄绿色荧光细胞,从而证明陕西省猪的冬季拉稀病的病原,为一种与上海地区的华毒相类似的病毒。用同样方法制备的对照组动物的肠粘膜刮取物涂片,未发现上述荧光细胞。

二、荧光抗体的制备和测定

1. 试验猪——从西北农学院教学试验农场畜牧站购买58~60日龄巴克夏幼猪6头(这些猪在离场前一周作过猪瘟兔化弱毒疫苗注射),分为2组,分别供作下述2种抗原免疫。

2. 病毒抗原

(1)华Ⅰ毒株:系上海市农业科学院畜牧兽医研究所赠送。

(2)付Ⅰ毒株:系我们分离的毒株(见上)

将2个毒株在2~4日龄健康仔猪体内传代复壮,以其小肠粘膜匀浆经适当稀释,除菌后作为抗原(方法同上述“动物感染试验”)。

3. 高免血清的制备:免疫程序见下表:

毒株名称	华 I 株	付 I 株
稀释倍数	1 : 5	1 : 5
第 1 次免疫(4月 8 日)	皮下注射10ml 滴鼻10ml 喂服(沉渣)100ml	同左
第 2 次免疫(4月22日)	滴鼻7ml 皮下注射8ml	同左
第 3 次免疫(5月 6 日)	同 上	同 左
第 4 次免疫(5月20日)	腹腔注射25ml 鼻滴10ml	耳静脉注射25ml 滴鼻 5 ~ 10ml
(6月 2 日)		取一头猪断尾采血20ml, 分离血清 制备荧光抗体, 初测荧光抗体效价
(6月 6 日)		初测荧光抗体效价符合要求, 将该 猪颈动脉放血, 收集血清
第 5 次免疫(6月 7 日)	耳静脉注射20ml 腹腔注射10ml	同 左
(6月20日)	全部颈动脉放血, 分离血清	

4. 免疫球蛋白提取及标记方法: 均按《猪瘟荧光抗体的制造和在人工感染猪瘟病例的应用》(见《西北农学院学报》1980年第2期)所述的方法进行。

5. 荧光抗体的测定

用两种猪传染性胃肠炎荧光抗体, 对付毒株和华 I 毒株人工感染猪的肠粘膜及扁桃体的涂片、切片进行染色。并以上海市农科院畜牧兽医研究所赠送的华毒荧光抗体染色作为对照。染色方法及判定标准亦与《猪瘟荧光抗体的制造和在人工感染猪瘟病例的应用》所描述的方法相同。

经测定, 自制的两种荧光抗体的1:32稀释液除可使本毒株人工感染猪脏器涂片、切片的胞浆染上明亮的黄绿色荧光外, 交叉染色亦可出现明亮的黄绿色荧光。上海市畜牧兽医研究所制造的华毒荧光抗体, 也得到同样的染色结果。用这些猪传染性胃肠炎荧光抗体对猪瘟病猪和健康猪的脏器涂片和切片染色, 均不出现上述荧光。

6. 结果

(1) 用付毒和华毒自制的荧光抗体为一种特异性制品, 可以在生产中使用。

(2) 进一步证明了陕西省猪的冬季拉稀病和上海地区流行、被称为猪传染性胃肠炎的疾病为同一种疾病。

主要参考资料

1. 安徽农学院编：《荧光抗体技术及其在兽医上的应用》，上海人民出版社，1975年版。
2. 第四军医大学编：《荧光免疫组织化学（荧光抗体）方法和荧光组织化学方法》，（科技资料），2，1974。
3. 川村明义：《荧光抗体法》，（新病毒学），2，朝仓书店。
4. Akiyoshi Kawamura, Jr.: Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications, Second Edition, 1977.
5. Curlis A. Williams and Merrill W. Chase: Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. 5, 1976.
6. 上海市畜牧兽医研究所：（1973）疑似猪传染性胃肠炎的调查，疑似猪传染性胃肠炎病理材料猪体感染试验，（农业科学研究资料报告汇编）。
7. 高德荣等：（1979），用小肠粘膜涂片直接荧光抗体染色检出猪传染性胃肠炎，《兽医科技资料》，第2期。
8. 马思奇等：（1979），猪传染性胃肠炎免疫荧光诊断法的研究，Ⅰ。用直接免疫荧光法检查猪传染性胃肠炎病毒，《家畜传染病》，第1期。
9. 马思奇等：（1980），猪传染性胃肠炎免疫荧光诊断法的研究，Ⅱ。直接免疫荧光法检查扁桃体诊断猪传染性胃肠炎，《家畜传染病》，第2期。