

气肿疽梭菌免疫学检测方法概述

张文璇¹ 曲庭伟¹ 方 程¹ 金 鑫^{1,2*} 严昌国³

1. 延边大学农学院动物医学系, 吉林延吉 133000; 2. 东北寒区肉牛科技创新教育部工程研究中心/延边大学, 吉林延吉 133002; 3. 延边大学农学院动物科学系, 吉林延吉 133000

摘要 气肿疽梭菌是一种具有组织毒性、有鞭毛的孢子化革兰氏阳性菌, 可引气肿疽这种反刍动物高致死性急性疾病。常见的典型临床症状为发病动物肌肉丰满部位发炎、肿胀, 触压可听到类似捻发音, 流行呈现一定的季节性, 并有区域性流行的特征。牛气肿疽在养殖场中一旦传播流行, 往往会伴随巨大的经济损失, 所以更加需要加强对该病的防控与诊断。本文整理了气肿疽梭菌的 3 种免疫学检测方法(间接 ELISA、Dot-ELISA、免疫胶体金技术), 以供参考。

关键词 气肿疽梭菌; 免疫学; 检测方法

民间俗称的黑腿病即气肿疽的别名之一, 该病由气肿疽梭菌引起, 常见的典型临床症状为发病动物肌肉丰满部位发炎、肿胀, 触压可听到类似捻发音^[1]。发病急促, 潜伏期短, 病情发展迅速, 许多动物无可见症状即死亡^[2]。该病主要通过患病的牛进行传播, 其具体经过是患病牛在草场采食放牧期间污染土壤或经过集约化养殖的饲料与饮水进行传播。健康的牛采食被污染的食物后, 病菌可以进入消化道, 继而发生感染。另外, 气肿疽梭菌的芽孢能在土壤中存活相当长的一段时间, 成为持久的传染源^[3]。本病一年四季均有可能发生, 在气温高且湿度低的夏季更为多见, 在地方性流行方面也呈现一定的特点, 如在地势相对低洼的地区该病更易发生。

作为梭状芽孢杆菌属的一员, 气肿疽属于专性厌氧菌。其菌体的长度为 1.5~8.5 μm , 菌体两端圆滑, 无荚膜, 因其有周身鞭毛而能够运动, 芽孢通常位于菌体中央, 也有可能偏向其中一端^[4]。一般来说, 37 $^{\circ}\text{C}$ 即接近动物的体温, 对于气肿疽梭菌而言是最适宜生长的温度。在血琼脂培养基上培养, 可见菌落呈现圆形、颜色一般为半透明, 中心略微隆

起, 边缘不整齐, 有 β 溶血环, 但一般情况下现象不明显^[5]。

在对该病进行检测时, 较为常用的手段多是以其流行病学特点、临床症状表现及呈现的病理特征来做出判断。被感染的动物通常发病迅速, 甚至有的病例无可见症状即死亡。临床上患病动物体温升高, 可达 42 $^{\circ}\text{C}$ ^[6]。有伴发败血症的机率, 呈现全身症状, 肌肉丰厚的部位肿胀、发炎。若病变部位位于肩部或后肢, 则常出现行动障碍。患病动物通常会在 1~3 d 内死亡, 尸体腐败速度快, 天然孔可见暗红发黑血液流出, 通常呈现为泡沫样^[7]。取肌肉做切面, 也呈黑红色。

该病主要危害牛羊等反刍动物^[8], 但近几年也有人被感染的病例, 这使得该病又一次成为各国各地相关人员关心的研究热点。在对该病进行诊断时, 需注意该病与炭疽和恶性水肿的临床症状均有一定的相似之处, 应鉴别诊断。

1 间接 ELISA

ELISA 即酶联免疫吸附剂测定, 是指将可溶性

收稿日期: 2020-12-08

基金项目: “高等学校学科创新引智计划资助”(D20034); 东北寒区优质肉牛高效安全养殖技术应用与示范(2018YFD0501702)

* 通讯作者

张文璇, 女, 1997 年生, 硕士研究生在读。

的抗原或抗体吸附到聚苯乙烯等固相载体上,进行免疫反应的定性和定量的检测方法。该方法自建立以来,就以其操作简单、反应迅速、敏感性高等优点被广泛应用于各项实验室检测。间接 ELISA 原理为利用酶标记的抗体以检测与固相抗原结合的受检抗体^[9]。该方法是对多成分进行分析,尤其需要注意对其组成成分进行严格控制,否则将会对结果造成相当大的影响。

车达等^[10]于 2011 年首次成功构建了气肿疽间接 ELISA 检测方法,通过超声波对菌体进行破碎,将裂解后的气肿疽梭菌菌体作为抗原,设立梯度稀释度,并最终确定在质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、酶标二抗稀释度为 1:2 000 的条件下效果最佳,成功建立了病原菌的酶联免疫吸附试验。该方法简便快捷,不但针对性强,而且在重复试验中也有较好的表现。

2 Dot-ELISA

斑点酶联免疫吸附试验是一种用纤维素膜代替酶固载体法的反应板的免疫分析方法,该方法弥补了涂层薄弱、易失效、样品少、节省材料等缺点^[11],原理和 ELISA 很相似。抗原吸附在纤维素膜上,与抗原-抗体酶标反应,形成抗原-抗体复合物,同时保持其免疫活性。该配合物能够在酶的参与下显示染色结果,检测结果可以通过染色的色深来判断。

姜永越^[12]成功从气肿疽梭菌 C54-1 标准株中提取有效抗原,纯化后用特异性最强的抗原免疫豚鼠。免疫 4 次后,血清稀释 1 000 倍,用 ELISA 检测其 OD 150 nm 值达 1.6 以上。Dot-ELISA 的重复性试验表明,血清具有特异性和稳定性,可作为气肿疽梭菌的双抗体夹心 Dot-ELISA 检测方法。当以 1:1 024 稀释抗体时,抗原最小含量为 3.15 μg ,分泌抗原最小含量为 1.89 μg ,酶标二抗的最佳浓度为 1:4 000,可以检测到微量气肿疽梭菌毒素。

3 免疫胶体金技术

免疫胶体金技术是以胶体金作为示踪标志物,应用于抗原抗体的一种新型免疫标记技术^[13]。该技术具有制备简便、标记简单、特异性强、敏感性高、定位准确、适应性广等特点,且胶体金试纸保存方便,无需任何复杂的仪器设备,可凭肉眼判断结果。该技术的进步能够极大地方便各种疾病在现场的快速检测,因此在近些年得到了飞速的发展。

任春宇等^[14]参考了免疫层析法的技术,选取气肿疽梭菌标准株,制备气肿疽梭菌单克隆抗体,并根据抗原-抗体的特性将单克隆抗体与胶体金标记结合,建立了不需要再加入任何检测试剂且快速简便的检测方法,成功研制出了胶体金免疫层析试纸条,可在短时间内对气肿疽做出准确诊断。该方法与 ELISA 检测相比,反应更为快捷,也呈现出了更强的特异性,当抗原量 $\geq 1 \times 10^5$ CFU/mL 时,即可检测成功,且有较好的稳定性。

4 小结

自 20 世纪以来,气肿疽在国内 20 多个地区的暴发给我国畜牧业发展带来了严重的经济损失^[15]。对于气肿疽这种病程短、发病急、危害严重的传染性疾病而言,及时鉴别和快速诊断是极为重要的控制手段。因此,需要加强对该病的研究,采用分子生物学和免疫学的手段,一方面加快对新型疫苗的研制,另一方面要建立更加简便有效的检测方法。只有这样才能更好地控制气肿疽的传播和蔓延,将该病带来的损失降到最小。

以上列出的 3 种免疫学检测方法各有优势与局限性,需要针对实际需求、临床操作条件以及试验环境^[16]选择符合条件的病原体检测方法进行疾病诊断。另外,也有相当多的分子生物学检测手段可以加以利用,因此,必要时也可以同时采用免疫学和分子生物学检测方法进行判断,以确保诊断无误。

参考文献

- [1] 郭洪友,郑聘.牛气肿疽病的诊治[J].现代农业科技,2010(7):367,369.
- [2] 刘志伟.家畜黑腿病的临床诊治[J].饲料博览,2020(10):76.
- [3] NAGANO N, ISOMINE S, KATO H, et al. Human fulminant gas gangrene caused by *Clostridium chauvoei* [J]. Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1545-1547.
- [4] 苏来卡·吐尔都.羊气肿疽的诊断及防制[J].兽医导刊,2020(13):40.
- [5] 段雪岩,金东春,金鑫,等.吉林延边地区牛气肿疽病的诊断报告[J].中国畜牧兽医,2015,42(10):2800-2805.
- [6] 郭四保,李龙华,钟美付,等.牛气肿疽的诊治与体会[J].中国动物保健,2013(12):43-45.
- [7] GROSETH P K, ERSDAL C, BJELLAND A M, et al. Large outbreak of blackleg in housed cattle [J]. Vet Rec, 2011, 169(13): 339.
- [8] 张恒,赵亚军,邢新镇,等.一例黄牛发生气肿疽病疫情的调查与

动物疫病防控体系建设的现状与对策

庞博 陈虎 郭文洁*

沈阳工学院生命工程学院, 辽宁抚顺 113000

摘要 近年来,国内、国外的动物疫病发生率在不断增加,动物疫病防控工作迎来了巨大的挑战。为此,本文介绍了目前我国动物疫病防控体系建设的现状:不能使动物疫病防控工作达到预期效果,无法对养殖业的发展提供有力保障;提出了动物疫病防控体系建设的对策:提高防疫工作人员的工作能力,提高养殖人员的防疫重视度,改善养殖场建设、提高卫生标准,正确选取接种疫苗、遵循接种流程。

关键词 动物疫情;防控体系;现状与对策

随着经济的发展,畜牧业的养殖规模和品种也在逐渐增加。畜牧业的发展要靠动物疫病防控体系来保障,因此,在进行防控前,要对动物疫情防控体系建设的现状进行分析,要制定科学、全面的工作计划,要根据实际情况寻找解决问题的办法。

1 动物疫病防控体系建设的现状

防疫部门不能全面落实动物疫病防疫工作的要求,对一些偏远地区、养殖规模较小的地区做不到切实的监管,并且动物疫病防控工作的工程巨大、时间周期长,在进行监管时需要耗费大量的人力、财力,因此,防疫监管工作进行起来十分困难。再加之,一些偏远地区和规模较小的养殖场对动物疫病防控的意识比较薄弱,认为防疫工作可有可

无,对疫情造成的重大损失缺乏重视度。并且在建设养殖场时,没有进行合理的设计和完善,导致养殖场的通风条件差、排水设施不健全等,这些因素会导致细菌的增生,提高动物疫病的发生率。养殖人员在动物生病时,没有足够的重视,未给动物进行及时治疗,导致死亡,并且在死亡后,不对尸体进行任何消毒处理,随便抛尸荒野,这也会导致细菌和疾病的扩散。还有许多养殖人员对动物进行接种疫苗时,选择一些便宜的疫苗,对动物起不到有效的防护作用^[1]。

2 动物疫病防控体系建设的对策

2.1 提高防疫工作人员的工作能力

动物疫病防控工作兹事体大,对我国乃至全球

收稿日期:2020-11-25

* 通讯作者

庞博,男,1998年生。

- 防控[J].畜牧兽医杂志,2016,35(6):148-149.
- [9] USHARANI J,NAGALEEKAR V K,THOMAS P.Development of a recombinant flagellin based ELISA for the detection of *Clostridium chauvoei*[J].Anaerobe,2015,7(33):48-54..
- [10] 车达,金鑫,陈莹莹,等.延边黄牛气肿疽间接 ELISA 诊断方法的建立[J].安徽农业科学,2011,39(2):1042-1044.
- [11] 张皓,姜永越,陈亮,等.气肿疽梭菌多克隆抗体的制备及 Dot-ELISA 检测方法的建立[J].延边大学农学学报,2018,40(2):66-71.
- [12] 姜永越.气肿疽梭菌 Dot-ELISA 方法的建立及初步应用 [D].延吉:延边大学,2016.
- [13] 张皓,任春宇,车达,等.气肿疽梭菌检测方法概述[J].动物医学进展,2017,38(9):119-121.
- [14] 任春宇,姜丹丹,车达,等.气肿疽梭菌胶体金诊断试纸条的研制[J].江苏农业科学,2016,44(11):283-286.
- [15] 鞠庆斌,李德臣.家畜黑腿病的流行病学及防治方法[J].饲料博览,2020(9):79.
- [16] 张永佳,张皓,李成辉,等.延边株气肿疽梭菌鞭毛蛋白 FlaA 基因克隆及生物信息学分析[J].延边大学农学学报,2017,39(2):35-40,59.

【责任编辑:胡敏】