

牛附红细胞体体外药物筛选试验

高光平¹, 毕可东², 陈 萍², 王兆雪², 丁超², 郑立勇², 张 剑²

(1. 河北科技师范学院 动物科学系, 河北 昌黎 066600; 2. 莱阳农学院 动物科技学院, 山东 青岛 266109)

摘要:以 RPMI-1640 为基础培养液, 加入 30% 犊牛血清, 选用贝尼尔、四环素、敌百虫、泰妙菌素、咪唑苯脲、氟苯尼考、依沙吡啶、磷酸伯氨喹等药物原粉, 在 37℃, 5%CO₂ 气体条件下对牛附红细胞体进行了体外药物筛选试验。结果表明, 依沙吡啶效果最好; 敌百虫和磷酸伯氨喹次之, 但敌百虫毒性较大; 贝尼尔、咪唑苯脲、氟苯尼考有效。

关键词: 附红细胞体; 牛; 筛选

中图分类号: S823 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)01-0104-03

附红细胞体病(eperythrozonosis)是由附红细胞体(eperythrozoön)寄生于红细胞表面、血浆及骨髓内而引起的一种以贫血、黄疸、发热等为主要临床症状的人兽共患传染病^[1-5]。据报道, 附红细胞体在骨髓中增殖后释放到血液中, 而一般治疗药物又无法进入骨髓, 达不到彻底杀灭附红细胞体的目的; 一旦停药, 就会复发。因此, 动物体内试验无法正确评价药物的杀灭效果。本试验选择目前报道的对牛附红细胞体敏感的药物, 拟通过体外杀灭试验, 筛选出对牛附红细胞体有较强杀灭作用的有效药物, 从而为该病的临床治疗提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 病原体 选择具有明显贫血症状的牛, 无菌取抗凝血(3.8%柠檬酸钠作抗凝剂), 鲜血压片和血液涂片, 并送分子生物学实验室作 PCR 检测; 确诊附红细胞体阳性牛的血液后再用 PBS 洗涤 3 次, 每次均以 1500 r/min 离心 10 min, 弃去上清。红细胞泥用等量阿氏液保存, 4℃冰箱保存^[3,6]。

1.1.2 药物与培养液

1.1.2.1 药物 贝尼尔原粉、敌百虫原粉、咪唑苯脲原粉、泰妙菌素原粉、磷酸伯氨喹原粉、磺胺嘧啶钠原粉、四环素原粉、依沙吡啶原粉。

依沙吡啶用 15% 葡萄糖溶解; 贝尼尔、敌百虫、咪唑苯脲、泰妙菌素、磷酸伯氨喹原粉、磺胺嘧啶钠、

四环素用生理盐水溶解。粉剂药物的溶解方法是: 精确称取各种药物原粉 100 mg, 分别加入 5 mL 灭菌注射用水溶解, 配成 2% 注射液, 4℃冰箱中避光保存备用^[3]。

1.1.2.2 培养液 基础培养液, RPMI-1640 (Gibco) 按说明书配制而成。犊牛血清 (Gibco) 经 56℃, 30 min 灭活, -20℃冰箱中保存备用。完全培养液, RPMI-1640 基础培养液中加入 30% 犊牛血清配制而成。

1.1.3 仪器设备 CO₂ 培养箱(MCO175, Japan); 低速冷冻离心机(3K-15, Sigma); 超净工作台; 生物显微镜(CH30-213N, OLYMPUS); DL-5000B 微量移液器; 24 孔 U 型培养板; 细菌滤器。

1.2 试验方法

1.2.1 试验步骤 参照 Nonaka 等^[4]和张守发等^[1,2]的附红细胞体体外培养方法, 按 8:1 的比例加入完全培养液与红细胞泥, 每孔 1.5 mL。共设 8 个药物组, 分别是贝尼尔原粉、敌百虫原粉、咪唑苯脲原粉、泰妙菌素原粉、磷酸伯氨喹原粉、磺胺嘧啶钠原粉、四环素原粉、依沙吡啶原粉及 1 个空白对照组; 每种药物分别以 250 μg/mL, 500 μg/mL, 750 μg/mL, 1 000 μg/mL, 1 500 μg/mL 培养液的剂量加入到 1.5 mL 的培养液中, 混匀, 置 5%CO₂ 恒温培养箱中培养。每 3 h 从培养板底部吸取 3 μL 涂片, 姬姆萨染色, 1000× 油镜观察。主要观察以下指标: 药物对附红细胞体的杀灭作用; 红细胞形态是否

收稿日期: 2006-09-26

作者简介: 高光平(1974-), 男, 河北乐亭人, 讲师, 硕士, 主要从事奶牛和小动物病防治工作。

恢复正常;红细胞发生崩解的最小药物浓度^[3,5,7-11]。每12h更换1次培养液,同时补充药量。批内试验3次,批间试验3次,取其平均值。

1.2.2 药效判定方法 在红细胞未受到任何眼观损害的前提下,红细胞附红细胞体感染率和感染强度下降所用的药物剂量即为有效;感染率和感染强度明显下降的药物剂量为显效;附红细胞体完全被杀灭为特效。

2 结果

药物剂量为250μg/mL时,各种药物对牛附红细胞体都有一定的杀灭作用,但效果不明显。在第9小时观察,磷酸伯氨喹和敌百虫剂量为500μg/mL时牛附红细胞体出现萎缩,感染率和感染强度明显下降;培养至第27小时,两者的附红细胞体感染率和感染强度均降到最低,结果见图1。

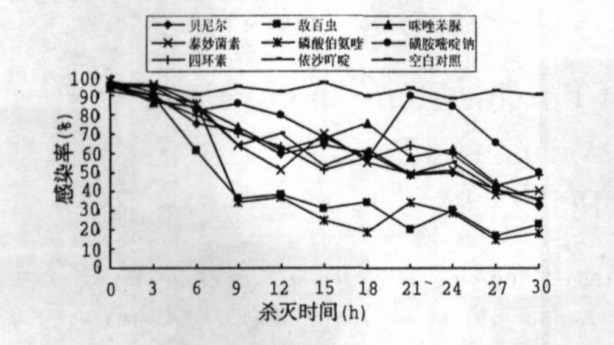


图1 培养液中药物浓度为500μg/mL时对牛附红细胞体的杀灭效果

药物剂量为750μg/mL时,敌百虫组、依沙吡啶组和磷酸伯氨喹组在第6小时观察牛附红细胞体时,其出现萎缩、折光性减弱、甚至变黑等变化。敌百虫培养至第15小时,牛附红细胞体基本上被杀灭,在培养液中消失,红细胞形态基本恢复到正常状态。培养至第27小时,敌百虫组和磷酸伯氨喹药物组的大多数红细胞形态基本恢复到正常。

依沙吡啶组、四环素组、咪唑苯脲组在第12小时,牛附红细胞体出现萎缩等变化,培养至第27小时牛附红细胞体折光性减弱、甚至出现变黑等变化;贝尼尔组和咪唑苯脲组红细胞的染虫率大幅下降。氟苯尼考有效,泰乐菌素和土霉素效果不佳,结果见图2。

药物剂量为1000μg/mL时,依沙吡啶、磷酸伯氨喹、敌百虫特效,但是敌百虫在第12小时红细胞

发生崩解;咪唑苯脲、氟苯尼考、贝尼尔高效,但是贝尼尔和咪唑苯脲在18小时红细胞发生崩解;泰妙菌素和土霉素有效,结果见图3。

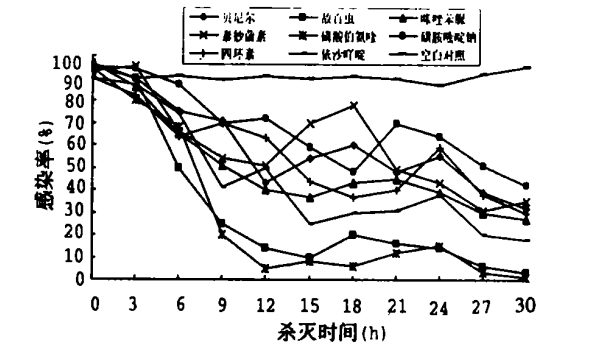


图2 培养液中药物浓度为1000μg/mL时对牛附红细胞体的杀灭效果

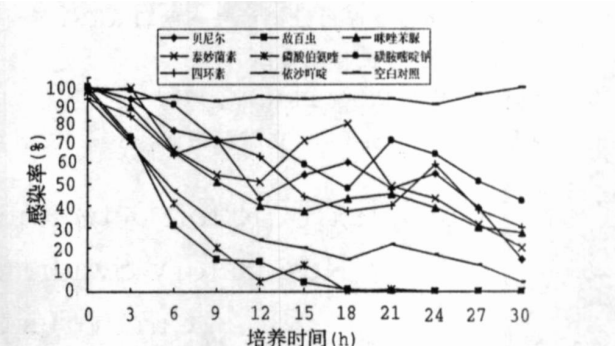


图3 培养液中药物浓度为1500μg/mL时对牛附红细胞体的杀灭结果

药物剂量为1500μg/mL时,在第3小时观察到依沙吡啶药物组牛附红细胞体出现萎缩、折光性减弱、甚至变黑等变化;培养至第6小时牛附红细胞体基本上被杀灭,在培养液中消失,但是红细胞的一部分已发生崩解。其余各种药物在6~12h均发生红细胞崩解现象。

3 小结

临床治疗牛附红细胞体病可首选依沙吡啶和磷酸伯氨喹,敌百虫虽然对牛附红细胞体病也有特效,但其毒性较大,应慎重选用。其次,可选用贝尼尔、咪唑苯脲、氟苯尼考等药物。

参考文献:

[1] 张守发,张国宏,宋建臣.牛附红细胞体体外培养方法的初探[J].中国兽医科技,2002,32(8):27-29.

(下转第115页)

所描述的类似。根据粪检结果,每头野猪均为艾美尔属的几种球虫混合感染,至少为2种艾美尔球虫混合感染。

参考文献:

[1] 王京仁,李淑红,夏维福,等.野猪特性及驯养方法 [M].北京:农业出版社,1990: 33.

[2] 张瑛.特种野猪继续走俏 [J].农村养殖技术,2006(3): 38.

[3] 孔繁瑶,索勋.寄生虫学[M].北京:中国农业大学出版社,1998: 1-15.

[4] E J L. Soulsby Helminths Arthrods and Prozoza of Domesticated Animals(7TH Edition) [M]. Bailliere Tindall press 1982: 615-619.

[5] 施宝坤,邱汉辉.家畜寄生虫的鉴别和防制[M].南京:江苏科学技术出版社,1989: 246-262.

[6] 左仰贤.球虫学——畜禽和人体球虫与球虫病[M].天

津:天津科学技术出版社,1992: 122-130.

[7] Levine N D. Veterinary Protozoology[M]. Ames, Iowa: Iowa University Press 1985.

[8] Donald W. Duszynski, Steve J. Upton, and Lee Couch. The Coccidia of Suidae(swine)[EB/OL]. <http://biology.unm.edu/biology/coccidia/>

[9] 汪明.兽医寄生虫学(第3版)[M].北京:中国农业出版社,2003.

[10] S. Solaymani Mohammad, M Rezaian, H Hooshyar G R *et al.* Intestinal Protozoa in Wild Boars (*Sus scrofa*) in Western Iran[J]. Journal of Wildlife Diseases 2004, 40(4): 801-803.

[11] N de la Muela, S Hernandez de Lujan, I Ferre. Helminths of wild boar in Spain[J]. Journal of Wild life Diseases, 2001, 37(4): 840-843.

[12] 蒋金书,李朝君.北京地区家猪和野猪球虫种类的初步调查[J].中国兽医杂志,1986,12(9): 8-11.

(上接第105页)

[2] 张守发,玄学男,董君艳.吉氏巴贝虫的体外培养试验 [J].中国兽医科技,2001,31(10): 10-12.

[3] 郑海虹,姚宝安,赵俊龙,等.抗附红细胞体有效药物的筛选 [J].//中国畜牧兽医学会家畜寄生虫分会第五次代表大会暨第八次学术研讨会论文集,2005: 158-162.

[4] Nonaka, B J Thacker, T W Schillhorn, *et al.* In vitro maintenance of Eperythrozoon suis[J]. Veterinary Parasitology, 1996, 61(324): 181-199.

[5] 房春林,杨光友.猪和兔附红细胞体的体外培养 [J].中国兽医科技,2005,35(3): 190-193.

[6] 华修国.附红细胞体及附红细胞体病的研究现状和展望 [J].上海农学院学报 1992, 10(2): 171-178.

[7] 颜耀菊.国内附红细胞体病的研究动态 [J].中国兽医科技, 1994, 24(11): 18-19.

[8] Ludwig E, Dagmar A. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood[J]. Veterinary Microbiology, 2003, 93: 185-196.

[9] Oberest R D, Hall S M, Schoneweis D A. Isolation of Eperythrozoon suis, DNA from swine blood by Whole organism DNA hybridizations [J]. Veterinary Microbiology, 1990, 24: 127-130.

[10] Akinboade O A, Dipeolu O. Comparison of blood smear and indirect antibody in detection of haemopara infections in trade cattle in Nigeria[J]. Vet Parasitology, 1984, 14(2): 95-104.

[11] 侯顺利,刘兴发,田红,等.奶牛附红细胞体病的流行病学调查 [J].中国奶牛,1997(6): 35-36.