

马传染性贫血研究

(专 辑)

第 二 集

中国人民
解 放 军 兽医大学军马卫生研究所

1977, 12,

毛主席语录

我们不能走世界各国技术发展的老路，跟在别人后面一步一步地爬行。我们必须打破常规，尽量采用先进技术，在一个不太长的历史时期内，把我国建设成为一个社会主义的现代化的强国。

这是一种责任。你有那么多人，你有那么一块大地方，资源那么丰富，又听说搞了社会主义，据说是具有优越性，结果你搞了五、六十年还不能超过美国，你象个什么样子呢？那就要从地球上开除你的球籍！所以，超过美国，不仅有可能，而且完全有必要，完全应该。

我们一定要鼓一把劲，一定要学习并且完成这个历史赋予我们的技术革命。

前 言

马传染性贫血（简称马传贫）是严重危害马属动物的一种病毒性传染病。病马长期带毒，传播快，死亡率高。

国内外几十年的研究，其病毒分离、特异性诊断、免疫等都没有很好解决，疫情不断扩大。

建国以来，特别是无产阶级文化大革命以来，在党的领导下，本所广大科技人员认真学习马列著作和毛主席著作，坚持以阶级斗争为纲，批判刘少奇、林彪、“四人帮”的反革命修正主义路线，坚持科研为无产阶级政治服务，为工农兵服务，与生产劳动相结合的方向，深入部队、马场、农村，大搞科学实验，在马传贫特异性诊断、免疫等方面做了一些工作。为了响应英明领袖华主席为首的党中央“向科学进军”的伟大号召，为了迎接全国科学大会的胜利召开，向大会献礼，特将几年来，我们在马传贫研究方面积累的一些材料整理出十五篇，刊印成这本“马传染性贫血研究专辑”，并借此与有关单位各地兽医同志交流经验，互通工作情况，不断提高与改进我们的工作，为贯彻落实英明领袖华主席“科学要兴旺发达起来，要捷报频传”的重要指示而努力奋斗。

由于我们技术水平有限，审查整理材料时间仓促，错误之处在所难免，殷切希望批评指正。

中国人民解放军 兽医大学军马卫生研究所

一九七七年九月

目 录

一、在马传贫“补反”操作中值得注意的几个问题·····	军马卫生研究所二室 (1)
二、马传贫琼脂扩散试验研究 (附马传贫琼脂 扩散反应操作方法) ·····	军马卫生研究所二室 (6)
三、马传贫病毒对驴胎继代细胞感染的实验研究总结 ·····	军马卫生研究所二室 (24)
四、应用驴胎继代细胞试制马传贫诊断抗原的研究 (附应用驴胎继代细胞制备马传贫“补反”、“琼扩”抗原操作程序) ·····	军马卫生研究所二室 (39)
五、马传贫琼脂扩散放射自显影法的初步试验研究 ·····	军马卫生研究所五室、二室 (51)
六、马传贫的病理形态学观察 (三种类型马传贫自然病例与人工 感染传贫典型发病对照病例的比较观察) ·····	军马卫生研究所五室 (55)
七、十六例驴传贫的病理形态学观察·····	军马卫生研究所五室 (62)
八、马传贫沉淀反应抗原的铁蛋白免疫电泳初步观察 ·····	军马卫生研究所五室 (72)
九、传染性贫血病马的主要免疫球蛋白的研究 ·····	军马卫生研究所五室生化组 (78)
十、驴胎骨髓继代细胞培养的马传染性贫血病病毒的提纯试验和 病毒的形态构造及部分理化性质的研究·····	(86)
十一、马传贫免疫研究工作概况·····	军马卫生研究所二室 (96)
十二、由慢性传贫马分离传贫病毒的方法探索·····	军马卫生研究所二室 (100)
十三、马传贫琼脂扩散脾脏抗原的研究·····	军马卫生研究所二室、五室 (102)
十四、马传贫病毒空斑实验方法的研究·····	军马卫生研究所二室 (107)
十五、牛血清的酸水解试验及其水解液 在组织培养上的初步应用·····	军马卫生研究所五室、二室 (112)

在马传贫“补反”操作中值得注意的几个问题

中国人民解放军兽医大学军马卫生研究所二室

马传贫补体结合反应（简称补反）已证明是一种特异性强、检出率较高的血清学诊断方法之一，几年来，全国许多单位已应用补反配合临床检疫，在控制马传贫疫情及净化疫点马群上都已收到了明显的效果。

随着补反的逐步推广应用，其具体操作方法已为不少基层化验单位掌握，但在实验工作中，亦曾遇到这样或那样的问题。为了更好地推广应用，我们从补反操作方法本身的有关因素进行了一些探讨，提出在操作中应当注意的几个问题，供有关单位参考。

一、补反抗体对温热的抵抗力及受检血清的灭活问题

通常进行补反试验时，应将受检血清置 56~58℃（马血清）或 60~62℃（驴、骡血清）水浴箱处理 30 分钟，以消除补反中的抗补体现象。为了保证试验的准确，需要选择一个既不影响补反抗体而又可以避免发生抗补体现象的血清灭活温度，为此，进行了补反抗体对温热的抵抗力试验。

对长116、长208、018、长208+09混、所7五份传贫马血清，分别经 58℃、62℃、65℃、70℃ 水浴箱 30 分钟处理后，在同一条件下，做了补体结合反应，结果如表 1。

从五份马血清的实验，以 58℃ 经30分钟处理后的补反效价为基础(100%)，随着处理温度的升高，则抗体效价逐渐下降，即补反抗体受到不同程度的破坏。当温度为62℃时，抗体下降 5~39%；温度为 65℃ 时，抗体下降 83~97%；若温度为 70℃ 时，补反抗体全部被破坏，高效价的五份传贫马血清均呈现补反阴性。

表 1 补反抗体对温热的抵抗力

血清号	效价	温度	58℃	62℃	65℃	70℃
长116			7.7	6.7	0.8	0
长208			7.0	5.9	0.4	0.1
018			6.0	4.4	0.4	0
长208×09混			7.6	7.2	1.3	0
所7			7.0	4.3	0.2	0

7404	12	4.4	4.8	5.3	3.6	4.8	5.0	3.5	4.8	4.9
7404	13	4.6	5.5	5.6	3.6	4.7	5.6	3.5	4.7	5.3
7404	14	4.3	5.9	5.7	3.3	4.7	5.3	2.8	4.8	4.8
7404	15	5.2	5.6	6.0	4.8	6.2	6.3	4.9	5.7	4.9
7413	16	6.4	7.0	7.5	5.6	6.4	6.7	6.0	6.7	7.1
7413	17	3.2	3.3	3.0	2.7	2.9	3.3	2.8	3.3	2.8
7413	18	3.7	4.1	3.7	3.1	4.3	4.2	2.8	4.4	4.0
7413	19	3.3	4.2	5.1	2.6	4.1	4.6	3.0	4.2	2.6
7413	20	4.6	4.0	4.3	3.6	4.4	4.5	3.2	4.4	4.2

第二批溶血素效价为 6000 倍

第四批溶血素效价为 3500 倍

第五批溶血素效价为 3000 倍

从试验结果看,无论是高效价(如第2批)还是低效价(第4、5批)溶血素,用其一个单位的浓度在测定血清抗体(或抗原)时,其效价要比两个或三个单位时要低得多,使用高效价溶血素时,两个单位与三个单位的浓度测定血清抗体(或补反抗原),反应出的效价近似;若用低效价溶血素时,三个单位比两个单位出现的效价略高。

因此,我们意见做马传贫补反时,用三个单位的溶血素,可以避免因溶血素用量不足引起的效价偏低的现象。

四、关于红血球的浓度问题

在补反操作中,红血球的浓度对溶血素的效价和补体的用量都发生直接影响。在测定溶血素时,其它条件相同,若红血球的浓度偏低,则测出的溶血素效价偏高,反之亦然。如果用低浓度的红血球测定的溶血素效价计算,在本试验中将会发生由于溶血素量不足而引起的阻止溶血增强的现象,这样,要测定的抗原(或血清抗体)效价便不能充分表示出来。当溶血素和补体相对固定的情况下,红血球的浓度过高,亦同样要影响结果的判定(见表5)。

表 5

红血球浓度过高或过低对补反效价的影响

血清量	血球浓度	抗原	1	2	3	4	5	6	7	效 价
1	过 高	V	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.3
		C	0.2	0.5	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	
	正 常	V	—	0.1	0.4	0.6	0.8	1.0	1.0	1.7
		C	—	—	—	0.1	0.4	0.7	1.0	
	过 低	V	—	—	—	—	0.1	0.2	0.5	0.5
		C	—	—	—	—	—	0.1	0.5	

如表5中所见,同一份马血清,当血球浓度过高时,抗体效价不能充分显示出来;当血球浓度过低时,由于溶血管数过多,而抗体效价不能完全显示出来。

在实际工作中,红血球的浓度可因离心的速度和时间等因素的影响,一般在洗血球

时,要求最后一次的离心速度为 2500~3000 转/分,离心 10 分钟。并充分吸去上清液,力求得到浓度一致的红血球泥。

五、关于补体的浓度问题

补体是补反中抗原抗体结合引起致敏血球溶血的必不可少的因素。马传贫补反操作法采用敏灵敏度高的递减量补体稀释的方法。由于使用的一组补体的浓度呈阶梯式的降低,故在本试验中健康马血清两列管中致敏血球的溶血程度也呈阶梯式的降低,两列管中各对试管溶血一致,为阴性反应。在传贫马血清中有马传贫补反抗体存在,V组(病毒抗原)各管抗原抗体结合而吸着补体,故产生阻止溶血现象,其阻止溶血的程度亦因各管补体含量不同呈现阶梯式的差异,V组各管溶血的程度与C组相应各管溶血程度的差加起来便是这份病马血清的补反效价。

在补反操作中,为了使抗体(或抗原)效价充分显示出来,对补体的基础稀释度(第一管补体稀释度)的确定是十分重要的,在血清检验时要求对照抗原列有前三支试管呈现完全溶血为宜,若七支试管中超过 4~5 支试管完全溶血,那么一些弱阳性的血清则可能因补体浓度过大产生的溶血程度过高而降低效价,甚至判为阴性结果。

在规程中提到补体的基础稀释倍数为 10~15 倍,这个数不是固定的,可以根据使用的补体效价高低而增减,一般在测定抗原时第一管补体的浓度可以高些,稀释的管数也可以多些,其原则要把抗原效价充分反映出来,在检查病马血清时,第一管补体的浓度可以低些,通常新鲜补体或冻结保存补体可以作 40~50^{*} 稀释;冷冻干燥保存的补体则需视出厂标明效价确定,通常第一管可用 20^{*}。

六、其它几个应注意的问题

1. 送检血清要求不腐败、不溶血、勿加抗凝剂及消毒药物;

2. 补反操作中应用的缓冲盐水,要求新鲜,使用液(GVB)最好现用现配,腐败的溶液切勿使用,试验证明陈旧的 GVB 液,在补反操作时出现抗补体增强现象,影响抗体及抗原效价的测定;

3. 马传贫补反结果是按两列试管中各对管溶血程度的差异判定的,故在补反各成分滴加时,必须尽量避免两列试管在滴加量上的差异。因此在操作时必须注意:

(1) 除抗原外,其他各成分都要在两列的七对试管中,一对一对的滴加,吸管的倾斜度要保持一致。

(2) 滴加 V、C 抗原时,要用同一支吸管,避免在滴入量上造成人为的差异。

4. 在大批血清检验时,容易出现某种成分少加或重加现象,这是有的实验室对同一血清一次出现阳性而另一次出现阴性的主要原因。要解决这个问题,要求实验室操作人员必须严格遵守操作规程,操作时思想要集中,同时在判定中要注意两列管的溶液量是否相等。两列管中所有未溶血的红血球沉淀现象是否一致。一般应用大牛血清驴白血球制造的抗原,对绵羊红血球有凝集现象,血球沉淀在试管时,呈边缘不整齐的锯齿状,平铺于管底。若某一列忘加抗原,则红血球集中沉淀于管底呈圆盘状,当试管倾斜时有漏下现象,不难加于区别。

7404	12	4.4	4.8	5.3	3.6	4.8	5.0	3.5	4.8	4.9
7404	13	4.6	5.5	5.6	3.6	4.7	5.6	3.5	4.7	5.3
7404	14	4.3	5.9	5.7	3.3	4.7	5.3	2.8	4.8	4.8
7404	15	5.2	5.6	6.0	4.8	6.2	6.3	4.9	5.7	4.9
7413	16	6.4	7.0	7.5	5.6	6.4	6.7	6.0	6.7	7.1
7413	17	3.2	3.3	3.0	2.7	2.9	3.3	2.8	3.3	2.8
7413	18	3.7	4.1	3.7	3.1	4.3	4.2	2.8	4.4	4.0
7413	19	3.3	4.2	5.1	2.6	4.1	4.6	3.0	4.2	2.6
7413	20	4.6	4.0	4.3	3.6	4.4	4.5	3.2	4.4	4.2

第二批溶血素效价为 6000 倍

第四批溶血素效价为 3500 倍

第五批溶血素效价为 3000 倍

从试验结果看，无论是高效价（如第 2 批）还是低效价（第 4、5 批）溶血素，用其一个单位的浓度在测定血清抗体（或抗原）时，其效价要比两个或三个单位时要低得多，使用高效价溶血素时，两个单位与三个单位的浓度测定血清抗体（或补反抗原），反应出的效价近似；若用低效价溶血素时，三个单位比两个单位出现的效价略高。

因此，我们意见做马传贫补反时，用三个单位的溶血素，可以避免因溶血素用量不足引起的效价偏低的现象。

四、关于红血球的浓度问题

在补反操作中，红血球的浓度对溶血素的效价和补体的用量都发生直接影响。在测定溶血素时，其它条件相同，若红血球的浓度偏低，则测出的溶血素效价偏高，反之亦然。如果用低浓度的红血球测定的溶血素效价计算，在本试验中将会发生由于溶血素量不足而引起的阻止溶血增强的现象，这样，要测定的抗原（或血清抗体）效价便不能充分表示出来。当溶血素和补体相对固定的情况下，红血球的浓度过高，亦同样要影响结果的判定（见表 5）。

表 5

红血球浓度过高或过低对补反效价的影响

血清量	血球浓度	抗原	1	2	3	4	5	6	7	效 价
1	过 高	V	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.3
		C	0.2	0.5	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	
	正 常	V	—	0.1	0.4	0.6	0.8	1.0	1.0	1.7
		C	—	—	—	0.1	0.4	0.7	1.0	
	过 低	V	—	—	—	—	0.1	0.2	0.5	0.5
		C	—	—	—	—	—	0.1	0.5	

如表 5 中所见，同一份马血清，当血球浓度过高时，抗体效价不能充分显示出来，当血球浓度过低时，由于溶血管数过多，而抗体效价不能完全显示出来。

在实际工作中，红血球的浓度可因离心的速度和时间等因素的影响，一般在洗血球

时,要求最后一次的离心速度为 2500~3000 转/分,离心 10 分钟。并充分吸去上清液,力求得到浓度一致的红血球泥。

五、关于补体的浓度问题

补体是补反中抗原抗体结合引起致敏血球溶血的必不可少的因素。马传贫补反操作法采用敏灵敏度高的递减量补体稀释的方法。由于使用的一组补体的浓度呈阶梯式的降低,故在本试验中健康马血清两列管中致敏血球的溶血程度也呈阶梯式的降低,两列管中各对试管溶血一致,为阴性反应。在传贫马血清中有马传贫补反抗体存在,V组(病毒抗原)各管抗原抗体结合而吸着补体,故产生阻止溶血现象,其阻止溶血的程度亦因各管补体含量不同呈现阶梯式的差异,V组各管溶血的程度与C组相应各管溶血程度的差加起来便是这份病马血清的补反效价。

在补反操作中,为了使抗体(或抗原)效价充分显示出来,对补体的基础稀释度(第一管补体稀释度)的确定是十分重要的,在血清检验时要求对照抗原列有前三支试管呈现完全溶血为宜,若七支试管中超过 4~5 支试管完全溶血,那么一些弱阳性的血清则可能因补体浓度过大产生的溶血程度过高而降低效价,甚至判为阴性结果。

在规程中提到补体的基础稀释倍数为 10~15 倍,这个数不是固定的,可以根据使用的补体效价高低而增减,一般在测定抗原时第一管补体的浓度可以高些,稀释的管数也可以多些,其原则要把抗原效价充分反映出来,在检查病马血清时,第一管补体的浓度可以低些,通常新鲜补体或冻结保存补体可以作 40~50^{*} 稀释;冷冻干燥保存的补体则需视出厂标明效价确定,通常第一管可用 20^{*}。

六、其它几个应注意的问题

1. 送检血清要求不腐败、不溶血、勿加抗凝剂及消毒药物;
2. 补反操作中应用的缓冲盐水,要求新鲜,使用液(GVB)最好现用现配,腐败的溶液切勿使用,试验证明陈旧的 GVB 液,在补反操作时出现抗补体增强现象,影响抗体及抗原效价的测定;

3. 马传贫补反结果是按两列试管中各对管溶血程度的差异判定的,故在补反各成分滴加时,必须尽量避免两列试管在滴加量上的差异。因此在操作时必须注意:

(1) 除抗原外,其他各成分都要在两列的七对试管中,一对一对的滴加,吸管的倾斜度要保持一致。

(2) 滴加 V、C 抗原时,要用同一支吸管,避免在滴入量上造成人为的差异。

4. 在大批血清检验时,容易出现某种成分少加或重加现象,这是有的实验室对同一血清一次出现阳性而另一次出现阴性的主要原因。要解决这个问题,要求实验室操作人员必须严格遵守操作规程,操作时思想要集中,同时在判定中要注意两列管的溶液量是否相等。两列管中所有未溶血的红血球沉淀现象是否一致。一般应用大牛血清驴白血球制造的抗原,对绵羊红血球有凝集现象,血球沉淀在试管时,呈边缘不整齐的锯齿状,平铺于管底。若某一列忘加抗原,则红血球集中沉淀于管底呈圆盘状,当试管倾斜时有漏下现象,不难加于区别。

马传贫琼脂扩散试验研究

中国人民解放军兽医大学军马卫生研究所二室

我们从1972年开始进行马传贫琼脂扩散试验的研究,在各级党组织的领导下,各军区的大力协作和广大工农兵群众的支持下,几年来,我们比较系统地进行了抗原的制备、特异性、检出率、抗体消长规律、反应术式以及在传贫检疫中应用方法等一系列试验研究。由于琼扩反应操作比较简便,很快推广到部队和地方有关单位,并不断得到发展和完善,成为马传贫检疫的主要手段之一。现将我们几年来所得结果综合如下:

一、抗 原

马传贫琼扩抗原,国外是用急性传贫病马脾脏或用马白细胞培养的传贫病毒为基础,经理化学方法处理提纯浓缩制成的。此法虽能制备出较好的抗原,但用马脾脏制造抗原成功的机会较少,用马白细胞制备抗原,其成本较高,加上采用超速离心方法,受到仪器设备的限制,不易推广。为寻找简易的制备抗原方法,我们进行了以下试验。

(一) 抗原的制备方法及其效价的对比试验

1972年我们在用2万转/分高速离心法制成马传贫琼扩反应抗原的基础上,经过反复试验研究,1973年又找到了三种比较简便易行的抗原制备方法,即:(1)3000转/分普通离心法;(2)pH 5.0醋酸缓冲液透析法;(3)精制碳蜡(聚乙二醇)沉淀浓缩法(制备方法详见本文附件)。试验证明,以上三种方法,无论采用那种,都能制出有效抗原,其效果与2万转/分高速离心法制备的抗原基本相同。如表1、2、3。

表 1 用驴胎细胞培养物 20000 转/分离心和 3000 转/分
离心抗原的对比结果

结 果 抗 原	-	+	++	+++	计
20000 转/分离心	2	14	7	40	63
3000 转/分离心	2	9	17	35	63

表 2 用驴胎细胞培养物 20000 转/分离心和 pH 5.0
醋酸缓冲液透析抗原的对比结果

结 果 抗 原	-	+	++	+++	计
20000 转/分离心	22	9	6	13	50
醋酸缓冲液透析	22	7	8	13	50

表 3

用驴胎细胞培养物 20000 转/分离心和
碳腊浓缩抗原对比结果

抗 结 果 原	-	+	++	+++	±	计
20000转/分离心	29	8	3	11		51
碳腊浓缩	28	7	3	11	2	51

将上述三种简易方法制备的抗原,进行比较结果,以 pH 5.0 醋酸缓冲液透析法制备的抗原效果最好,它不仅方法简便,而且产量高,每 100 毫升病毒培养物可制成 2 毫升琼扩抗原,比用 3000 转/分离心法制备抗原提高产量一倍。特别是当用驴胎继代细胞培养传贫病毒,采用多次收毒法进行生产时,其培养物只能用 pH 5.0 醋酸缓冲液透析法或用碳腊沉淀浓缩法制备琼扩抗原,用 3000 转/分离心法则效果不好。其原因可能是多次收毒的培养物中,细胞含量少,沉淀下来的固形成分少,大量病毒存在于培养液中,在 3000 转/分的离心速度下,不能沉淀下来。但用一次收毒法获得的培养物做抗原时,三种方法均能制出较好的琼扩抗原(见表 4)。

为了证实传贫病毒组织培养物经 3000 转/分离心后其上清液还存留有大量有效成分,我们将离心后的上清再用 0.01M pH 5.0 醋酸缓冲液透析法制作琼扩抗原,先后共进行了 12 次对比试验(见表 5),结果又都能制出有效的琼扩抗原。从而更进一步证明 pH5.0 醋酸缓冲液透析法,较其他法有着更大的优越性。以后我们将 pH5.0 缓冲液透析法,作为我们生产马传贫琼扩抗原的主要方法,几年来我们用此法处理马传贫病毒组织培养物两万五千余毫升,生产琼扩抗原 540 毫升,除供我校教学、科研及外检外,还支援部队和地方各兄弟单位、马场,进行马传贫检疫。这些抗原在应用中效果良好。

表 4

同一材料用不同方法制备的琼扩抗原效价比较

病毒培养物来源	试验 次数	抗 原 滴 度 范 围 (倍数)		
		醋酸透析抗原	碳腊浓缩抗原	3000 转/分 离心抗原
驴白细胞	4	2 ~ 4	2 ~ 3	1 ~ 3
驴胎脾继代细胞	5	2 ~ 4	2 ~ 4	2 ~ 3
驴胎骨髓继代细胞	3	2 ~ 4	2 ~ 4	2 ~ 3
驴胎胸腺继代细胞	3	3 ~ 4	2 ~ 4	2 ~ 3
驴胎皮肤继代细胞	3	3 ~ 4	2 ~ 4	2 ~ 3

(二) 抗原的安全性及保存期试验

1. 抗原安全性:

为了搞清用乙醚处理的琼扩抗原是否还带有活毒,我们进行了生物学试验,方法是 将 100 倍浓缩的马传贫病毒培养物在未经乙醚处理之前取 0.5 毫升和 1.0 毫升各接种一幼驹做对照。与此同时又将同样材料按琼扩抗原制造要求用乙醚处理后取匹健康 1.0 毫升和 2.0 毫升各接种 1 匹健康幼驹,接种途径是皮下,接种后按一般生物学试验方法定

期作临床、血液学及补反、琼扩检查。

观察结果：对照接种 0.5 毫升的马，临床上缺乏明显改变，但接种后第 21 天补反和琼扩均呈阳性反应，观察期间始终不消失。接种 1.0 毫升的马，接种后第 15 天体温升高，临床、补反、琼扩均呈阳性直至死亡。说明用乙醚处理之前的浓缩物是带毒的。

表 5 马传贫病毒组织培养物 3000 转/分离心后上清
用醋酸缓冲液透析结果

试验 次数	材 料	收毒 方法	抗 原 滴 度	
			3000 转/分离心抗原	离心上清再透析抗原
1	驴白细胞 85 代毒	一次	3 [×]	3 [×]
2	驴白细胞 89 代毒	一次	3 [×]	3 [×]
3	驴白细胞 89 代毒	一次	3 [×]	4 [×]
4	驴白细胞 90 代毒	一次	2 [×]	3 [×]
5	驴白细胞 91 代毒	一次	3 [×]	4 [×]
6	驴白细胞 91 代毒	一次	1 [×]	3 [×]
7	驴白细胞混合毒	一次	2 [×]	2 [×]
8	驴胎脾继代细胞毒	多次	1 [×]	2 [×]
9	驴胎脾继代细胞毒	多次	1 [×]	4 [×]
10	驴胎脾继代细胞毒	多次	1 [×]	4 [×]
11	驴胎脾继代细胞毒	一次	2 [×]	2 [×]
12	驴胎骨髓继代细胞毒	一次	3 [×]	3 [×]

试验组两匹，在接种后 4 个月的观察中，除每日测温外，每隔 10 天做一次临床血液学检查，并同时采血分离血清，进行琼脂扩散反应和补反检查，结果临床上均未发现有传贫的改变，琼脂扩散反应始终为阴性。只是补反检查中接种 1.0 毫升琼扩抗原的马在接种后第 21 天和 31 天出现过两次弱阳性反应（0.6~0.7）；接种 2.0 毫升的马在接种后第 21 天出现过一次弱阳性反应（0.6）。两匹马补反抗体消失后始终没有重复出现。这种反应我们分析可能由于灭活抗原进入机体后刺激引起的暂时性抗体。如果存在活毒，根据过去的试验观察，血清抗体反应维持时间很长，即使有波动也能反复出现。因此我们认为，用乙醚处理的马传贫琼扩抗原是不带有活毒的。

2. 马传贫琼扩抗原的保存期

（1）将琼扩抗原保存于 -20℃ 以下低温冰箱或普通冰箱冰盒中，冻结状态下保存一年以内效价无大影响。

（2）将琼脂扩散抗原冻干后放普通冰箱保存，有效期可达二年。

二、特 异 性

为了验证我们制备的抗原的特异性，做了四个方面的试验。

1. 健康马的观察：从西北、内蒙等非传贫疫区采取健马血清 631 份做琼脂扩散反

应。观察健马血清是否出现琼脂扩散阳性反应，结果全部阴性。

2. 类症病马观察：从西北、内蒙、南京等非传贫疫区采取焦虫、血锥虫、媾疫、钩端、腺疫、鼻疽、脑炎、疱疹等病马血清 341 份，观察这些类症马血清是否出现琼脂扩散阳性反应，结果全部阴性。

3. 应用人工感染传贫病马 64 匹，经琼脂扩散检查全部呈阳性反应。

4. 生物学试验：以上结果基本肯定特异性，但还不能回答琼脂扩散阳性马是否都是带毒的传贫病马，为了证实这一点，我们根据马传贫补反阳性马带毒问题，已经生物学试验证实情况下开始设想，利用临床无症状，补反阴性，而琼脂扩散阳性的马扑杀取脏器和全血接种幼驹做生物学试验。为了找出这类马，首先选用琼扩单阳性马，以后系统观察临床和补反经半年以上确定临床不出症状，补反仍是阴性才能利用，结果几个不同的疫点中选出的马匹，在半年观察过程中，都先后变为补反阳性或临床出现症状，此结果在不同的侧面验证琼扩单阳性马仍然是传贫病马。但没有找出我们开始设想的可供试验的马。

通过长期观察，我们找了一匹临床无症状，在一年以前补反阳性，以后不再出现补反抗体而琼脂扩散始终为阳性的马，这一匹马扑杀以后取脏器和全血接种一匹幼驹，结果该幼驹接种后 100 天开始体温升高，相继出现补反琼扩抗体，证明这一匹马是带毒的传贫病马。生物学试验虽然只做了一匹，但不少琼扩单阳性马长期观察时，逐渐变为补反或者临床阳性马。因此，可以肯定琼扩单阳性马是带毒的传贫病马。

经上述四个方面的试验，证实我们制备的马传贫琼脂扩散抗原是特异性抗原。

三、检 出 率

目前国内外材料一致认为，琼脂扩散的检出率比较高。为了验证用我们的抗原和操作术式所做的琼脂扩散反应，对国内传贫病马的检出率，我们利用人工接种和自然感染等病马，调查了血清中抗体出现的时间和消长情况，同时从疫区采取的马骡血清，用琼扩和补反同时检查的方法，把两种特异性诊断的检出率做了比较，其结果如下：

1. 抗体出现的时间

用接种已知马传贫病毒的 8 匹马和 2 匹驴系统观察临床症状的同时，定期采血做琼脂扩散观察抗体出现时间。结果 8 匹马均出现临床症状，2 头驴没有出现临床症状，但这 10 匹均出现琼脂扩散阳性。琼脂扩散抗体出现时间，最短者接种后 15 天；最长者 54 天；多数在 20~30 天内出现。抗体出现和临床症状出现时间比较：1 匹马临床出现前 18 天出现抗体，1 匹马临床出现后 20 天出现抗体，一般在第一次发热后 3~5 天出现抗体。

另外，我们在一个急性暴发传贫的马场观察 19 匹马的结果，第一次发热前 2 天内出现抗体的 2 匹，第一次发热后 7 天内出现抗体的 14 匹，8~15 天内出现抗体的 3 匹，这与人工接种马的观察结果基本一致。从观察抗体出现的时间结果看，应用琼脂扩散反应早期诊断马传贫完全是可能的。

2. 抗体维持时间和消长情况

① 对人工感染传贫马的观察

5 匹人工感染马在抗体出现后每半月采血一次，做琼脂扩散跟踪观察 6~12 个月至自然死亡或扑杀为止。结果 5 匹马出现抗体后，在全部观察期间虽然有反应强度不同，但始终出现阳性反应。

② 对自然病马的观察

选长岭种马场的 23 匹传贫马，扎兰屯军马场传贫马 34 匹，共 57 匹病马，每个月采血一次，跟踪观察 8~10 个月，结果 57 匹中有 55 匹 (96.5%) 始终检出琼扩抗体，1 匹中间消失 1 个月后再出现，只有 1 匹在 10 个月期间一直没有出现抗体。

从人工感染马和自然病马的观察结果可看出，琼扩抗体在病马体内 (血清中)，维持时间较长，绝大多数马匹，维持 6~10 个月，而且抗体含量波动也少，由于有了这个客观条件，只要所用抗原效价合适，操作方法适应时，检出率必然是相当高的，而且由于抗体波动不大，应用时适宜减少采血次数也是可能的。

3. 琼脂扩散对自然感染传贫病马的检出率

我们采集了部队、军马场及地方马场、站等 7 个老疫点经综合诊断隔离的传贫病马血清 129 份和 ×× 军马场急性暴发点经临床诊断为传贫病马血清 70 份，进行琼脂扩散反应，检查结果如表 6。

试验结果表明马传贫琼扩反应对慢性及隐性型病马的检出率为 96.88%，而对急性及亚急性型病马为 88.57%。急性病马检出率较慢性病马低的原因可能与抗体出现时间有关。

表 6 琼脂扩散反应对传贫病马的检出率

区	分	病马数	检出阳性匹数	检 出 率 %
老疫点	慢性及隐性型病马	129	125	96.88
新疫点	急性或亚急性型病马	70	62	88.57

4. 琼脂扩散反应与补反在传贫诊断上检出率的比较

我们在过去已研究证明马传贫补反是特异性强检出率较高的诊断方法，并查明补反检出率比临床血液等综合诊断的检出率高，根据以上情况，我们研究琼脂扩散检出率时，着重和补反检出率进行了比较。

1973 年~1974 年，我们从吉林、辽宁、黑龙江、河南、新疆等省有传贫疫情的 34 个单位收集了马骡血清共 10901 份用琼脂扩散和补反同时进行了检查，结果如下表 (7)、(8)。

表 7 琼扩反应与补反检出率比较

时 间	检查马数	琼 扩 检 出		补 反 检 出		两项共同检出	
		匹 数	%	匹 数	%	匹 数	%
74 年	3789	603	15.91	546	14.59	642	16.92
73 年	7112	373	5.24	350	4.92	393	5.52
合计	10901	976	8.95	896	8.21	1035	9.49

两年来的试验情况表明，琼扩的检出率略高于补反检出率。但两者都低于共同检出的匹数（见表7）

表 8 两种反应的交叉情况

		琼 扩 反 应	计
		+	-
补	+	837 (80.87)	59 (5.7)
反	-	139 (13.43)	139
合	计	976 (94.3)	59
			1035

注：括号内数字为百分比。

在检出的 1035 匹阳性马骡中（见表 8），琼扩阳性有 976 匹，占 94.3%，补反阳性有 896 匹，占 86.5%，两者阳性符合率为 80.87%，有 13.53% 的马骡琼扩阳性，而补反呈阴性反应，有 5.7% 的马骡补反阳性，而琼扩呈阴性反应，对这种交叉现象，我们曾进行了观察和分析，发现有如下几种情况是使两种反应检出率出现不一致的因素：

① 与抗体在病马体内消长规律有关；补反抗体在病马体内波动幅度较大，而琼扩抗体比较稳定。因此，琼扩检出率高于补反。我们从长岭和扎兰屯马场隔离的 57 匹补反阳性马，逐月采血作补反和琼扩检查，统计两种试验的检出率，可以看出琼扩反应检出率比较稳定，而补反检出率波动幅度较大，几乎每月都有差别，而且每月都低于琼脂扩散检出率（见表 9）。

② 有极少数病马琼扩抗体出现时间比补反抗体晚 1～2 周，当补反抗体已产生，而琼扩抗体尚未产生前，用两种反应检查时，就会出现补反单阳性反应。

表 9 57 匹马不同月份琼扩与补反检出率比较

月 份	病马数	琼 扩 阳 性		补 反 阳 性	
		匹 数	%	匹 数	%
1	57	55	96.49	54	94.73
2	57	56	98.24	53	92.98
3	57	56	98.24	53	92.98
4	57	56	98.24	53	92.98
5	57	56	98.24	48	84.21
6	57	56	96.36	48	84.21
7	57	56	98.24	41	71.92
8	27	26	96.29	23	85.18
9	23	22	95.65	21	91.30

③ 抗原效价的高低，直接影响两种反应的检出率，我们曾经将 32 匹琼扩反应阳

性马血清同时用两种不同效价的补反抗原进行补反检查，结果用 7.0 效价的抗原检出阳性 30 匹，而用 5.0 效价的抗原检出阳性 25 匹，与琼扩反应阳性符合率前者为 93.75%，后者为 78.12%。

④ 在工作中我们还发现腐败的血清（在运输中保存不当）对补反抗体影响比对琼扩抗体的影响为大，这样的血清，补反检出率大大低于琼扩检出率。如 73 年 7 月我们所收到一批在运输中腐败的血清，两种反应检查结果，琼扩阳性率为 95.65%，而补反阳性率为 47.8%，两者检出率竟相差一倍之多。

四、关于马传贫琼脂扩散反应术式的探讨

马传贫琼脂扩散反应术式有单相扩散和双相扩散两种。在试验中我们深刻体会到，反应术式的选择和定型，以及抗原、抗体的标化等是正确应用这一反应的重要环节。它不仅关系到反应的效果，而且直接影响到病马的检出率，为此，我们对有关的问题进行了研究，结果如下：

1. 关于抗原测定方法

我们试用单相扩散和双相扩散两种方法（操作方法见附件）同时测定了八份抗原，结果见表（10）。

表 10 两种测定抗原方法测定结果比较

抗原批号	单相扩散效价（毫米）			双相扩散效价（稀释倍数）	
	30%血清	20%血清	10%血清	抗原滴度	标阳血清滴度
35	6.0	7.0	9.0	3 ^x	1~6 ^x 卅
38	6.5	7.5	10.1	4 ^x	1~6 ^x 卅
39	6.0	7.4	8.4	3 ^x	1~6 ^x 卅
40	0	0	0	—	—
48	0	0	4.0	1 ^x	1~3 ^x 卅
49	6.0	7.0	8.5	3 ^x	1~6 ^x 卅
50	6.0	7.1	9.0	3 ^x	1~6 ^x 卅
51	5.5	6.5	8.0	2 ^x	1~5 ^x 卅

测定结果，八份抗原中有 1 份抗原两法测定均无效价。1 份抗原两法测定均表现有低效价，这种低效价抗原在单相免疫扩散中只有在 10% 的血清中表现出来，而在 20~30% 的血清琼脂中呈阴性反应。其余 6 份抗原两法测定结果都达到合格标准。当用 10% 的标阳血清作单相扩散时，其反应圈都在 8.0 毫米以上。双相扩散测定结果抗原都在 2 倍以上，同时原倍抗原与 1~5 倍以上稀释的标准阳性血清都呈现明显的反应（卅）。这 6 份抗原，我们在实际应用时都表现出良好效果。上述结果说明两种方法在测定抗原上，其效果基本是一致的。

2. 不同效价的传贫阳性血清对抗原测定的影响

用两种不同效价的传贫阳性血清，用单相扩散和双相扩散两法同时测定了五批抗原，

结果如表11。

表11 不同效价阳性血清对抗原测定的影响

抗原 批号	阳性血 清批号	单相扩散效价(毫米)			双相扩散效价(稀释倍数)	
		10%血清	20%血清	30%血清	抗原滴度	阳性血清滴度
49	123	8.5	7.0	6.0	3 [*]	1~6 [*] 卅
	5	—	8.1	7.3	2 [*]	1~2 [*] 卅
54	123	8.0	6.0	4.1	2 [*]	1~6 [*] 卅
	5	—	9.2	8.3	2 [*]	1~2 [*] 卅
58	123	8.5	6.3	4.3	2 [*]	1~6 [*] 卅
	5	—	9.2	8.3	2 [*]	1 [*] 卅
59	123	11.0	8.0	6.5	4 [*]	1~6 [*] 卅
	5	—	11.0	9.2	3 [*]	1~2 [*] 卅
61	123	9.2	7.0	6.0	3 [*]	1~6 [*] 卅
	5	—	12.0	10.2	4 [*]	1~2 [*] 卅

注：123号阳性血清效价为8倍。5号阳性血清效价为3倍。

在单相扩散中，用高价阳性血清（123号）测抗原时，其反应圈的大小是10%稀释度血清比20~30%稀释度血清要大；而用低效阳性血清抗原时，则必须采用20%以上的血清浓度，才能呈现反应圈。

在双相扩散中，抗原2~3倍稀释后与1~6倍稀释的高价阳性血清仍然能呈强阳性反应，而与低效价阳性血清则除能与原倍阳性血清呈阳性反应外，作2倍以上的稀释就不再出现明显反应。上述结果表明，阳性血清的标化和选择正确的稀释度在测定抗原中是十分重要的。

3. 关于阳性血清的标化

我们用同一份合格的马传贫琼脂扩散抗原，采用双相扩散的方法，同时测定了八份马传贫阳性血清，结果如下表（12）。

用同一抗原测定的八份血清中，可以看出阳性血清的抗体滴度是不同的，低的有3倍，最高可达64倍，一般都在6倍以上。

从这一结果可以看出，用已标定的合格抗原进行阳性血清测定，用以选择和标化阳性血清是可行的。结合前项试验结果来看，选用8倍以上的效价作为标准阳性血清在琼扩反应中能取得满意效果。

4. 关于琼扩反应术式

在实践中，我们发现在孔径大小相同的条件下，孔间距离对反应强度及检出率都有一定的影响。我们曾以相同的孔径（抗原孔为4毫米、血清孔为6毫米）和三种不同的