

布鲁氏菌和O:9型小肠结肠炎耶氏菌 两种抗体鉴别的实验研究

鲁齐发 武素怀 王晓英 郭宝岚 张伟 李兰玉 马 焯 何利华

摘要 采用SAT、ELISA及DIBA分别对6种布鲁氏菌及耶氏菌O:9型感染的兔血清抗体的检查结果表明,无论用布鲁氏菌104M、耶氏菌O:9型菌凝集抗原做SAT检查或用布鲁氏菌16M超声波破碎抗原做ELISA检查均对布鲁氏菌与耶氏菌O:9型的兔血清抗体无鉴别意义;而用16M可溶性蛋白抗原、外膜蛋白抗原以及用耶氏菌O:3型可溶性蛋白抗原、外膜蛋白抗原做ELISA或DIBA均能对布鲁氏菌与耶氏菌O:9型的兔血清抗体进行鉴别。在实际检测时,以同时用16M及O:3型外膜蛋白抗原做ELISA检查为宜。

关键词 布鲁氏菌 小肠结肠炎耶氏菌 酶连接免疫吸附测定 抗原 抗体

众所周知,在检测人畜布鲁氏菌病(简称布氏菌病)血清中抗体遇到的诸多交叉反应中,以布氏菌与O:9型小肠结肠炎耶氏菌(YO:9)两种抗体的鉴别最难解决^[1,2]。

多年来,国内外为鉴别上述两种抗体做了大量的工作^[3~7]。于恩庶等在提取布氏菌及耶氏菌外膜蛋白(OMP)抗原基础上,采用ELISA对两种抗体的检查,取得了较满意结果^[5]。我们提取了布氏菌16M及O:3型小肠结肠炎耶氏菌(YO:3)OMP及可溶性蛋白抗原(SPA),并采用ELISA及免疫酶斑点试验(DIBA)分别对6种布氏菌及YO:9感染的兔血清抗体进行了比较研究,结果表明对这两种抗体能明确地进行鉴别,为进一步现场应用奠定了基础。现将主要结果概述如下。

材料和方法

一、主要菌株:羊种布氏菌16M、M₅,牛种布氏菌544A、104M,猪种布氏菌1330S、S₂及YO:3、YO:9,均为本所布病室冻干保存。

二、抗原制备:

1.布氏菌16M及YO:3 OMP的制备:基

本按武素怀介绍的方法提取^[8]。但为了更完全的去交叉反应成分,必须在提取OMP之前,用0.5%三氯醋酸充分洗去外套上的LPS成分,并在用去污剂提取后,以超离心(35000r/min,30分钟)方法将外膜蛋白组分中的大、小分子成分分开,并取其大分子成分为抗原。

2.布氏菌16M及YO:3 SPA抗原:将48小时肝琼脂培养物,用灭菌生理盐水洗下,过滤,离心后去上清,按1克湿菌加入一定浓度的氯化钠液10ml,置80℃水浴3小时,取出冷却后放普通冰箱中5~7天,再次离心收集其上清液经透析、浓缩、测蛋白含量后置冰箱中保存。

三、布氏菌及YO:9兔血清的制备:将上述6种布氏菌及YO:9 48小时培养物,分别制成 1×10^9 /ml浓度,除布氏菌强毒株16M、1330S及544A每只家兔皮下注射菌悬液1ml(1×10^9 菌体)外,其余布氏菌及YO:9均每只家兔皮下注射菌悬液2ml(1×10^9 菌体/ml),待用SAT

本文作者单位:中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 102206 北京市

本研究为国家自然科学基金资助项目

检查, 抗体滴度达1:800以上时即放血, 分离血清, 加入防腐剂保存于冰箱中。

四、试验方法:

1. ELISA: 采用间接法。包被用抗原: 16M超声波破碎抗原(UBA) 1:100, 16M SPA 1:200, 16M OMP 1:160; YO:3 SPA 1:100, YO:3 OMP 1:600。待检兔血清均按1:50、1:100……倍比稀释。酶结合物用卫生部北京生物制品研究所生产的羊抗兔IgG辣根过氧化物酶结合物, 其工作浓度1:100。操作按常规程序。

2. DIBA: 试验方法基本同于ELISA, 其操作按常规程序。

3. SAT: 所用布氏菌试管凝集抗原(104M抗原)及耶氏菌试管凝集抗原(YO:9抗原)均为布病室制备, 按常规操作和判定结果。

结果及分析

一、SAT检查结果: 用104M及YO:9两种试管凝集抗原对6种布氏菌及YO:9感染兔血清抗体检查结果见表1所示。检查结果清楚地表明, 用104M抗原检查, 除布氏菌S₂、16M与YO:9兔血清抗体滴度相差1个稀释度外, 其余布氏菌与YO:9兔血清抗体滴度完全一样; 用YO:9抗原检查, 除布氏菌16M、M₅及S₂与YO:9兔血清抗体滴度相差1~2个稀释度外, 其余布氏菌与YO:9兔血清抗体滴度完全一样。说明无论用104M或YO:9抗原检查布氏菌尤其是牛种布氏菌(104M及544A)与YO:9兔血清抗体无法进行鉴别。

二、ELISA检查结果: 分别采用布氏菌

表1 SAT 检查结果

| 抗 原 | 6种布氏菌的兔血清 | | | | | | YO:9 兔血清 | 正 常 兔血清 |
|---------|----------------|----------------|------|-----|------|-------|-------------|------------|
| | S ₂ | M ₅ | 104M | 16M | 544A | 1330S | | |
| 104M 抗原 | 3200 | 1600 | 1600 | 800 | 1600 | 1600 | 1600 | — |
| YO:9抗原 | 3200 | 800 | 1600 | 400 | 1600 | 1600 | 1600 | — |

注: 表中数字为抗体滴度的倒数

16M UBA、SPA 及OMP抗原和耶氏菌YO:3 SPA、OMP 抗原做ELISA对6种布氏菌及

YO:9的兔血清抗体进行检查, 其结果如表2所示。

表2 ELISA 检查结果

| 抗 原 | 各布氏菌的兔血清 | | | | | | YO:9 兔血清 | 正 常 兔血清 |
|----------|----------------|----------------|-------|------|-------|-------|-------------|------------|
| | S ₂ | M ₅ | 104M | 16M | 544A | 1330S | | |
| 16M UBA | 12800 | 12800 | 6400 | 3200 | 12800 | 12800 | 12800 | — |
| 16M SPA | 1600 | 12800 | 1600 | 1600 | 3200 | 3200 | 800 | — |
| 16M OMP | 6400 | 12800 | 12800 | 1600 | 12800 | 12800 | 800 | — |
| YO:3 SPA | 400 | 200 | 200 | 100 | 400 | 200 | 12800 | — |
| YO:3 OMP | 200 | 50 | 50 | 100 | 100 | — | 12800 | — |

注: 表中数字为抗体滴度的倒数

从表2不难看出, 用16M UBA 抗原检查, 除布氏菌104M、16M与YO:9兔血清抗体滴度相差1或2个稀释度外, 其余布氏菌与YO:9血

清抗体滴度完全一样, 无鉴别意义; 用16M SPA抗原检查, 可见各布氏菌的抗体滴度均比YO:9的血清抗体滴度高, 其中S₂、104M

和16M高2倍, 544A、1330S高4倍, 而M₅高16倍; 用16M OMP抗原检查, 16M的兔血清抗体滴度比Y O:9的血清抗体滴度高2倍, S₂比Y O:9兔血清抗体滴度高8倍, M₅、104M、544A及1330S比Y O:9兔血清抗体滴度高16倍; 用Y O:3 SPA抗原检查, 其结果正相反, Y O:9的兔血清抗体滴度均比各布氏菌的血清抗体滴度高, 其中比S₂、544A高32倍, 比M₅、104M、1330S高64倍, 比16M高128倍; 用Y O:3 OMP抗原检查, 也是Y O:9的兔血清抗体滴度高于各布氏菌的兔血清抗体滴度, 其中比S₂高64倍, 比16M、544A高128倍, 比M₅、104M高256倍, 尤对1330S的血清抗体检查为阴性反应。说明用16M SPA、16M OMP、Y O:3 SPA、Y O:3 OMP抗原检查, 均能对布氏菌的兔血清抗体与Y O:9的兔血清抗体进行鉴别, 而且鉴别的意义从总体上说, Y O:3抗原优于16M抗原; OMP抗原优于SPA抗原。自然, 在实际检测时, 以16M与Y O:3 OMP同时应用为宜。

三、DIBA检查结果: 本次仅用16M及Y O:3 SPA抗原对104M及Y O:9的兔血清抗体进行了检查(表3), 其结果基本上同于ELISA, 即用16M SPA检查, 虽对两种抗体能进行鉴别(两者相差8倍), 但用Y O:3 SPA抗原检查其效果显然比用16M SPA为佳。

表3 DIBA的检查结果

| 抗 原 | 104M兔血清 | YO:9兔血清 | 正常兔血清 |
|----------|---------|---------|-------|
| 16M SPA | 1:1600 | 1:200 | — |
| YO:3 SPA | — | 1:800 | — |

讨 论

1. 近些年来, 国内外为鉴别布氏菌与耶氏菌O:9型的两种抗体, 采用了多种方法^[9, 10]。比较好的方法是用布氏菌及Y O:3 OMP为抗原的ELISA或DIBA。采用这种方法的根据在于: 检测这两种抗体是同型抗原明显高于异性

抗原。本次检查结果也表明, 用Y O:3 OMP抗原检查时, Y O:9的兔血清抗体滴度高于布氏菌的兔血清抗体滴度达64~256倍, 因而对这两种抗体的鉴别是十分明显的。

2. 由于本次仅是布氏菌与Y O:9感染的兔血清抗体的鉴别结果, 因此, 还必须对两菌感染的人畜体液标本作进一步比较研究, 才能对两菌抗体的鉴别作出全面、确切的评价。

3. 本次仅对单纯布氏菌及Y O:9感染兔血清标本进行了对比研究, 尚未进一步对布氏菌与Y O:9混合感染的血清标本进行检测; 另外, 检测所用的酶结合物仅是抗IgG型酶结合物, 这样只能检测待检血清中IgG型抗体, 关于检测其他型Ig抗体在鉴别诊断上的意义尚不清楚。所有这些问题均有待进一步深入研究。

A Preliminary Study on Serological Differentiation between Antibody against *Brucella* and that against *Yersinia enterocolitica* Serotype O:9 Lu Qifa, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

Standard agglutination test (SAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot immunobinding assay (DIBA) have been developed for the detection of antibodies against 6 strains of *Brucella* and that against *Yersinia enterocolitica* Serotype O:9. The results showed that differentiation could be made between *Brucella* and *Yersinia* O:9 when 16M SPA, OMP and Y O:3 SPA, OMP were used by ELISA, but not when 104M and Y O:9 antigens were used by SAT. So, 16M and Y O:3 OMP antigens were better for detection of antibodies against *Brucella* and *Yersinia* O:9 by ELISA.

Key words *Brucella* *Yersinia enterocolitica* ELISA Antigen Antibody

参 考 文 献

- 1 朱龙基. 布氏菌病血清学鉴别诊断意义及其研究进展.

中国地方病防治杂志, 1988, 3(5) : 282.

2 鲁齐发. 布鲁氏菌病鉴别诊断的研究进展. 中华流行病学杂志, 1991, 12(5) : 306.

3 David RB, Margaret AJ, Malcolm BP, et al. Serological Confirmation of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 O-antigens by monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 1984, 46 : 389.

4 Caroff, M Structure of the O-chain of the phenolphase soluble cellular LPS of *Yersinia enterocolitica* O:9 *Eur J Biochem*, 1984, 139 : 195.

5 于恩庶, 等. O:3型小肠结肠炎耶氏菌外膜蛋白用于布氏菌与O:9型耶氏菌感染的鉴别诊断. 中国人兽共患病杂志, 1991, 7(3) : 2.

6 Mittal KR, Tizard. Serologic Response of pigs to experimental infection with *Yersinia*

enterocolitica O:9 and *Brucella abortus*. *Am J Vet Res*, 1981, 42(3) : 443.

7 Caroff M, Bundle DR, Perry MB. Structure of the O-chain of the phenol-phase Soluble Cellular lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* Serotype. *Eur J Biochem*, 1984, 139 : 195.

8 武素怀, 姜淑娴, 尚德秋, 等. 布鲁氏菌外膜蛋白的研究. 中华流行病学杂志, 1989, 10(特刊6号) : 8.

9 卢德威, 王大勇, 辛敏岩, 等. 布氏菌和O:9型小肠结肠炎耶氏菌两种抗体鉴别的研究. 中国人兽共患病杂志, 1989, 5(3) : 8.

10 王伟导, 卿燕, 木合塔尔, 等. 布氏菌和结肠炎耶氏菌O:9型感染的血清学鉴别研究——用于鉴别试验的布鲁氏菌特异性抗原提取成功. 地方病通报, 1960, 15(1) : 51.

(收稿: 1993年-01-30)

近11年间住院包虫病人的回顾性调查

朱兵 谭家忠 杨建新 于志红 徐明谦 哈德尔 王彦海 周树楠 吴幸 外力

为了解和评价住院包虫病人的基本情况, 并为防治提供监测资料, 笔者对近11年间住于我院的包虫病人进行了回顾性调查。

1980~1991年的168 091例住院病人中, 包虫手术病人829例, 占0.49%, 年平均数为75.36例, 与1953~1979年781例包虫病人相比(年均28.93例), 增长了46.44例, 其中女性患者百分率高于男性, 且各族别所占比率均出现了不同程度的增长。

住院包虫病人不同年龄组与职业调查结果显示, 年龄组所占比率从31岁开始出现降低趋势, 11~30岁为包虫病多发年龄高峰期。

临床症状及体征中, 腹腔包虫病以肝大、包块(58.62%)和不同程度疼痛(57.06%)所占百分率为高; 肺包虫病以咳嗽、胸闷(16.28%)和发热(7.72%)所占百分率为高。值得注意的是有7.72%的患者无临床症状, 这是包虫病流行率不能精确估量

的原因。另外本组治愈率97.11%, 死亡率0.6%。

随着B超和CT技术逐步普及应用, 为本病提供了更优越的诊断手段, 符合率分别为98.5%和99.1%。结合临床对免疫试验评价表明, ID的阳性率为91.6%, IHA为83.8%, ELISA为80.2%, LA为75.5%, 作为常规检查, 多项试验并用可提高免疫诊断的敏感性和特异性。

在治疗上术前常规口服丙硫咪唑, 20mg/kg/d, 术后化疗1~3个疗程, 以降低复发率。另外常规对包虫内囊摘除后采用残腔直接向腹腔敞开术式, 此法简便迅速不置管引流, 术后体温恢复快, 疗程短且肝内无残腔积液。我们施行的电视腹腔镜摘除包虫, 为今后包虫病的治疗开辟了新途径。

(收稿: 1992-10-27 修回: 1992-12-16)

本文作者单位: 卫生部包虫病防治培训基地临床部 新疆维吾尔自治区人民医院包虫病研究室 830001 乌鲁木齐市