



单克隆抗体应用于布鲁氏菌病诊断与鉴别诊断的研究概况

鲁齐发 综述 尚德秋 审校

布鲁氏菌(简称布氏菌)McAb的制备始于1983年,现仅将布氏菌McAb应用于布鲁氏菌病(布病)诊断与鉴别诊断的研究概况作一综述。

一、研究概况:近10余年国内外已制备多种不同

特异性的布氏菌McAb[1~7],已用于布病的诊断、治疗、流行病学调查以及布氏菌抗原分析,现仅将应用于布病诊断与鉴别诊断的研究概况作一归纳(表1)。这里应指出,所制备的McAb就其对布氏菌抗原的特

表1 布氏菌McAb用于布病诊断与鉴别诊断概况

作者	主要McAb	应用概况
Sutherland等	BA(A)	以ELISA竞争法检测S ₁₉ 、45/20免疫牛及其攻毒牛血清抗体,其效果优于CFT。
金根源等	104M-McAb	以Dot-ELISA夹心法检测布氏菌感染豚鼠及慢性期布病患者血清抗体,其检出率高于SAT、Coombs及2-ME。
	M ₅ -McAb	以反向Dot-ELISA检测布氏菌感染小鼠脏器滤液布氏菌抗原,结果阳性率早期优于菌培养,同于用ELISA检测抗体的阳性率
史丕裕等	A544-BG12	以协同凝集试验对一次或多次免疫牛血清中抗原的检测,其阳性率高于用SPT、RBPT及HIT。
Correll等	Br25	用ELISA夹心法能对牛种布氏菌免疫与感染牛血清抗体相鉴别。
Kylutt等	Bruc1~4	用ELISA竞争法能对牛种布氏菌免疫与感染牛血清抗体相鉴别。
石宗筋等	IC-11	以Dot-ELISA竞争法能对布氏菌M ₅ 及M ₅ -90免疫动物与布氏菌感染动物相鉴别
Cloeckaert等	O4FO3	以ELISA能对布氏菌与YeO:9相鉴别
鲁齐发等	M ₅₈	用胶乳凝集能对布氏菌与YeO:9相鉴别

异性可分为:(1)抗布氏菌属McAb,其特点为对各种布氏菌(S型)显示阳性反应,而对类属菌如大肠杆菌(O₁₅₇)、土拉伦菌(T_{15/B})、假结核杆菌和O:9型小肠结肠炎耶氏菌(YeO:9)无交叉反应;(2)对一定种强毒株布氏菌显示阳性反应而对弱毒株(菌苗株)布氏菌无反应或弱反应;(3)对菌苗株布氏菌M₅及M₅-90显示了株系特异性。

二、应用于布病诊断的研究:

1.对布氏菌抗体的检测:1986年Sutherland等[8]用制备的抗牛种布氏菌表面抗原的McAb MA(A),用ELISA竞争法与CFT相比较,对60头S₁₉

及45/20免疫,继后以强毒株544A攻毒的犍牛及成年牛血清抗体动态观察的结果表明,MA(A)ELISA与CFT显示了同样的特异性,即在攻毒后,对于感染的27头牛用两种试验检测抗体的阳性数相同;对于未感染的动物,两种试验均为阴性反应。但对于用45/20免疫的犍牛或成年牛,当其用强毒株攻毒后,其抗体维持的时间,MA(A)ELISA显然长于CFT(表2)。

金根源[6]将制备的104M-McAb以免疫酶斑点试验方法即McAb-Dot-ELISA,对布氏菌感染豚鼠

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

表2 CFT及MA(A)ELISA检测结果

组别	免疫至攻毒的时间(周)	维持阳性周数的%	
		CFT	MA(A)
S ₁₉ 免疫的犍牛	58	24	23
45/20免疫的犍牛	47	2	5
S ₁₉ 免疫的成年牛	22	75	78
45/20免疫的成年牛	22	5	27

及慢性期布病患者血清抗体检查结果表明,本法的敏感性 & 特异性均明显高于SAT、Coomb's及2-MET(表3)。

同样,卢景良[6]在获得布氏菌McAb后,在制备McAb酶结合物基础上,也采用Dot-ELISA对布氏菌感染及免疫的603份牛血清抗体进行了比较研究。结果表明,本法比常规凝集试验及补体结合试验有较高的敏感性,并认为有助于布病的早期诊断和流行病学

表3 4种血清学方法检查结果

方法	布氏菌感染豚鼠			慢性布病患者		
	检查数	阳性数	阳性率(%)	检查数	阳性数	阳性率(%)
SAT	20	16	80.00	150	24	16.00
Coomb's	20	17	85.00	150	37	24.67
2-MET	20	17	85.00	150	29	19.33
McAb-Dot-ELISA	20	19	95.00	150	46	30.67

调查的追溯诊断。

2.对布氏菌抗原的检测:鲁齐发等将制备的M₅₃-McAb以ELISA夹心法对三种布氏菌抗原进行检测,对104M菌体抗原检测的最低浓度为1000万菌/ml,104M超声波破碎抗原为4μg/ml,16MLPS为1μg/ml,但应用本法检测体液中布氏菌抗原其效果尚欠理想(内部资料)。

金根源[6]应用制备的M₅-McAb以反向Dot-ELISA法,对布氏菌感染小鼠脏器滤液中布氏菌抗原检测的结果表明,在感染后1~3个月,检测抗原的阳性率分别为100.00%、80.00%,明显高于细菌分离阳性率(90.00%及53.50%),但在3~6个月后检测抗原的阳性率,明显低于用ELISA检测其血清抗体的阳性率(表4)。

表4 三种方法检查结果比较

检查时间(月)	动物状况	动物数(只)	分离细菌		反向McAb-Dot-ELISA		SPA-ELISA	
			阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
1	感染	30	27	90.00	30	100.00	30	100.00
	正常	10	0	0.00	0	0.00	0	0.00
3	感染	30	16	53.30	24	80.00	30	100.00
	正常	10	0	0.00	0	0.00	0	0.00
6	感染	30	7	23.30	13	43.30	28	93.30
	正常	10	0	0.00	0	0.00	0	0.00

史丕裕等[5]获得A544-BG12杂交瘤株后,制备McAb-SPA,用协同凝集试验对呼图壁奶牛场的1333份牛血清布氏菌抗原进行检测,并以SPT、RBPT、HIT及CFT进行比较。结果表明,应用本法检测血清中布氏菌可溶性抗原是可行的,而且其阳性率达5.48%~33.10%,平均14.10%,高于SPT、RBPT和HIT的阳性检出率(表5)。

三、应用于布病鉴别诊断的研究:

1.布氏菌免疫与感染的鉴别:关于对布氏菌免疫与感染的鉴别,长期来,国内外均未找到较好的方法。自布氏菌McAb制备获得成功,不少布病工作者就重视制备对布氏菌强毒株或菌苗株特异性McAb,并研究适宜的检测方法进行鉴别[6,8]。

Correll[9]等在获得3株对布氏菌强毒株特异的McAb-Br25、Br46、Br60后,他们选用Br25分泌的McAb以ELISA夹心法鉴别免疫与感染牛血清抗

表5 1333头乳牛检测结果

单 位	血清份数	SAT		SPT		RBPT		HIT		CFT		McAb-SPA	
		阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%	阳性数	%
牧一队	506	167	33.07	35	6.92	42	8.30	75	14.82	166	32.81	60	11.86
牧二队	359	87	24.23	29	8.08	14	3.89	8	2.33	97	27.02	34	9.47
牧四队	196	55	28.06	46	23.47	34	17.35	10	5.10	10	5.10	65	33.10
联合体	81	17	20.99	12	14.81	8	9.83	—	—	—	—	16	13.75
小海子分场	27	6	22.22	—	—	1	3.70	1	3.70	—	—	4	14.80
私人牛	164	5	3.05	5	3.05	2	1.22	2	1.22	—	—	9	5.48
合 计	1333	337	25.28	127	9.53	101	7.58	96	7.20	273	20.48	188	14.10

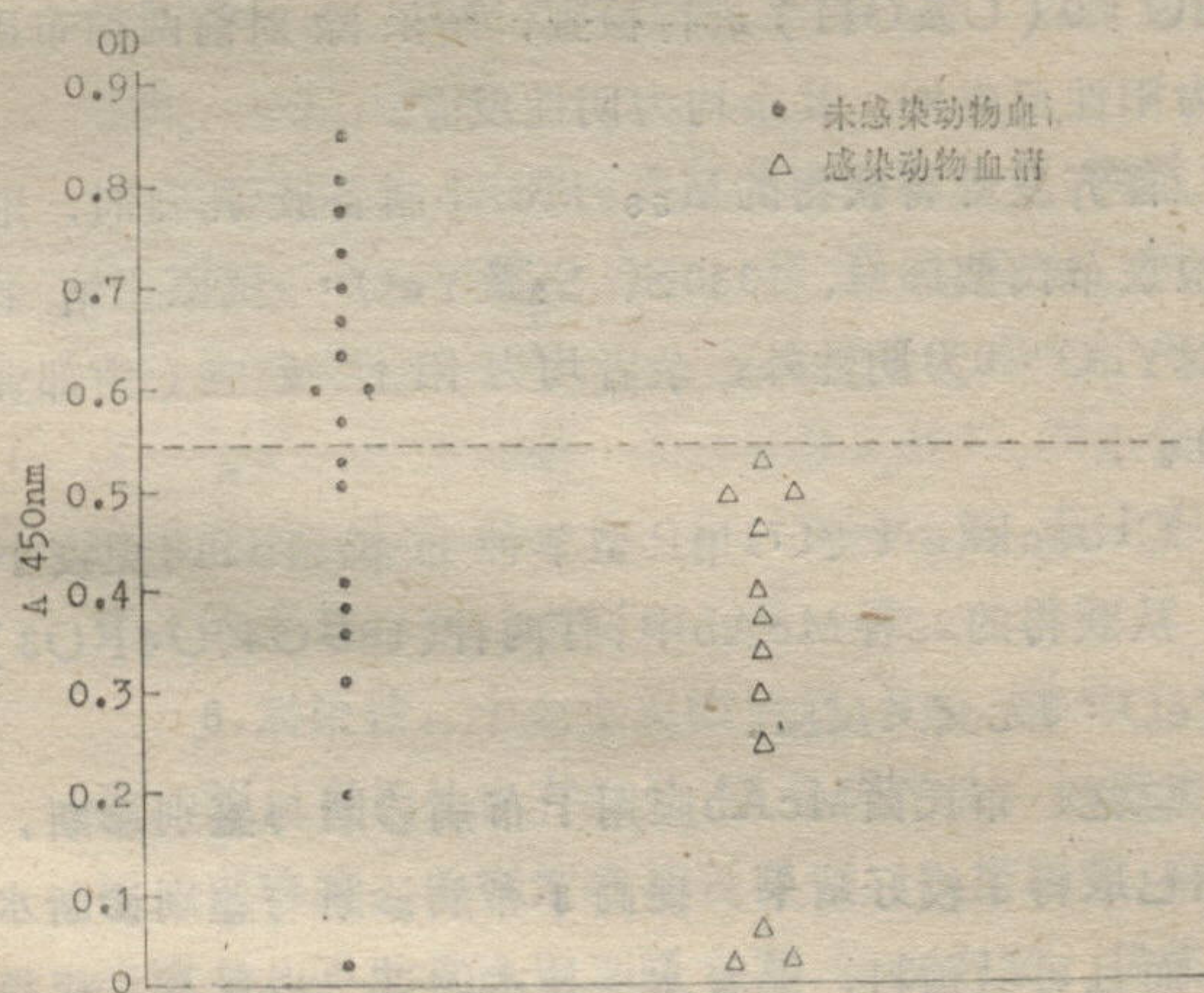
体, 获得了较好结果(表6)。很明显, McAb-ELISA对S₁₉或45/20免疫牛血清均为阴性而对自然感染牛血清均为阳性, 此优于常规ELISA及RBPT。

表6 三种血清学方法检查结果

血 清	份数	McAb-ELISA		间 接 ELISA	RBPT
		12/83	3/83		
正常牛血清	5	0	0	0	0
S ₁₉ 免疫牛血清	6	0	0	4	6
45/20免疫牛血清	4	0	0	0	0
免疫牛攻毒后血清	6	2	4	6	6
自然感染牛血清	4	4	4	4	4

Rylutt等[10]采用4种布氏菌McAb ELISA竞争法, 对已知感染状态的30头牛血清抗体进行检测, 检测结果见附图。

这里需说明, 用此McAb所作ELISA竞争法检查结果, 是以OD值0.55作为感染动物界线。在本法为阳性反应的12头感染牛, 经细菌分离均培养出强毒株布氏菌, 而其18头非感染牛大部分为S₁₉或45/20免疫牛, 或为强毒布氏菌攻毒牛但经检菌为阴性。因此, 应用



附图 McAb-ELISA竞争法检查结果

本法可区别体内分离出强毒株动物和大多数免疫、非感染动物。

石宗舫等[6]在提取出M₅菌株特异的P₂抗原成分, 并制备具有M₅或M₅₋₉₀株系特异McAb后, 应用McAb-Dot-ELISA (DB) 与凝集试验 (AR) 相结合的检查方法, 成功地鉴别M₅或M₅₋₉₀免疫与布氏菌感染动物 (表7)。

表7 两种方法(DB、AR)检查结果

方法	血 清					血 清					
	M ₂₈	青毒	337	牛	羊	M ₅	M ₅₋₉₀	S ₂	S ₁₉	M ₅₋₉₀ 免疫 后再攻毒	健康 动物
DB	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
AR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

很显然, 用两法检查能对M₅及M₅₋₉₀免疫与患布病动物相鉴别, 但对非M₅或M₅₋₉₀的其他布氏菌菌苗免疫动物则尚难正确鉴别。

2. 布氏菌与YeO: 9两种抗体的鉴别: 布氏菌与多种细菌, 因具有共同的抗原成分, 因此在血清学上存在不同程度的交叉反应, 其中尤以布氏菌与Ye: O6

的两种抗体最难于鉴别。迄今, 虽然鉴别此两菌抗体已有不少方法, 但尚欠理想[11~13]。自布氏菌 McAb 问世, 不少同行致力于制备布氏菌与 YeO: 9 特异的 McAb, 以便进一步应用于两菌抗体的鉴别。这里仅将有限的资料作一简述。

Quinn等[14]以牛种布氏菌为免疫原, 获得了两个特异性 McAb, 他们应用间接免疫荧光试验检测各种型布氏菌及 YeO: 9 抗原。结果表明, 其一 2C₁ McAb 无论是克隆株上清液或小鼠腹水, 对 YeO: 9 均为阴性反应。

史丕裕等[5]应用制备的 BG₁₂-McAb, 以 ELISA 间接法对布氏菌 104M、544A 及土拉伦菌 (T15/B)、YeO: 9 (O 及 OH) 进行检查, 结果除对前两种布氏菌为阳性反应外, 其余均为阴性反应。

鲁齐发等将获得的 M₅₈-McAb 制备胶乳制剂, 用于检查布氏菌 16M、1330S、S₂ 及 YeO: 9 抗原, 结果除对 YeO: 9 为阴性外, 余者均为阳性反应 (内部资料)。

Cloeckaert 等[7]用 R 型羊种布氏菌 B115 免疫小鼠, 从获得的 22 种 McAb 中, 有两种 (18BO4、O4FO3) 与 YeO: 9 无交叉反应。

总之, 布氏菌 McAb 应用于布病诊断与鉴别诊断, 虽然已取得了较好结果, 提高了布病诊断与鉴别诊断水平, 而且可以预料, 随着本项技术的进一步普及, 获得高特异性布氏菌 McAb 的应用, 对现布病诊断与鉴别诊断存在的问题将会获得圆满解决。然而也必须看到, 现阶段应用 McAb 解决布病鉴别诊断的一些难题, 其进展不快, 并未获得明显的突破。这可能与本项技术在布病尤其在国内外尚欠普及, 获得的针对菌株或株系高特异的 McAb 不多等有关。

参 考 文 献

- 1 Douglas JT, Palmer DA. Antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on Smooth Brucella Species. *J Clinical Microbiology* 1988, 26 (7) : 1353.
- 2 Sutherland SS. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Brucella abortus, in cattle using monoclonal antibodies. *Aust Vet J*, 1985, 62 : 264.
- 3 Bundle DR, cherwongrodzky JW, Gidney MA, et al. Definition of Brucella A and M epitopes by monoclonal antibodies typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infection and Immunity*, 1989, 57 : 2829.
- 4 尚德秋, 鲁齐发, 武素怀, 等. 布鲁氏菌非典型菌株及 R 型菌株鉴定分类的研究. *中华流行病学杂志*, 1990, 11 (3) : 160.
- 5 史丕裕主编. 单克隆抗体和布氏杆菌病. 第 1 版. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1988. 61~155.
- 6 尚德秋主编. 中国八十年代布鲁氏菌病防治研究进展. 第 1 版. 北京: 中国科学技术出版社, 1991. 225~273.
- 7 Cloeckaert A, Zygmunt SZ, Dubray G, et al. Characterization of O-polysaccharide Specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough Brucella melitensis strain B115. *J General Microbiology*, 1993, 139: 1551.
- 8 Sutherland SS, Hollander LD. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies and a Complement fixation test for cattle vaccinated and infected with Brucella abortus. *Vet Microbiology*, 1986, 12: 55.
- 9 Gorrell MD, Milliken GL, Anderson BJ, et al. An Enzyme Immunoassay for bovine Brucellosis using a monoclonal antibody specific for field strains of Brucella abortus. *Develop Biol Standard*, 1983, 56 : 491.
- 10 Rylutt DB, Wyatt DM, Bundesen PG. A competitive enzyme immunosorbent assay for the detection of bovine antibodies to Brucella abortus using monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*, 1985, 8 : 261.
- 11 朱龙基. 布鲁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.
- 12 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.
- 13 鲁齐发, 武素怀, 王晓英, 等. 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. *中华流行病学杂志*, 1993, 14 (5) : 283.
- 14 Quinn R, Campbell AM, Phillips. A monoclonal antibody specific for the A antigen of Brucella Spp. *J General Microbiology*, 130 (9) : 2285.

(收稿: 1994-01-22)