

# 两种酶结合物诊断布鲁氏菌病的研究

李之桂<sup>1</sup> 李爱芳<sup>1</sup> 侯林甫<sup>1</sup> 毛富荣<sup>2</sup>

用ELISA法检查各种疾病以及传染病，已有很多报道<sup>[1]</sup>。用ELISA法查动物布病抗体也已证明其特异性及敏感性，认为可用于动物布病诊断的初筛<sup>[2]</sup>。用于检查布氏菌病人亦有报道<sup>[3]</sup>，但尚未广泛用于实际。

本实验应用本单位制备的SPA-HRPO结合物<sup>[4]</sup>及兔抗人IgG-HRPO结合物<sup>[5]</sup>，检查临床诊断为布氏菌病人血清51份，做为初步的研究报道。

SPA是葡萄球菌蛋白A，它与人IgG及某些动物IgG的Fc部分具有非特异结合能力。故将其作为第二抗体加以利用<sup>[6]</sup>，并将其与兔抗人IgG-HRPO加以比较。

## 材料与方 法

1. SPA-HRPO结合物<sup>[4]</sup>。
2. 兔抗人IgG-HRPO结合物<sup>[5]</sup>。
3. 正常人血清32份，北京市输血站提供。
4. 临床诊断为布氏菌病人血清31份，系河北省防疫站惠赠；20份为新疆流研所及本所布病室惠赠。
5. 聚苯乙烯微量反应板(上海塑料三厂制)，经测定其吸附均一性合乎要求。
6. ELISA法见文献<sup>[7]</sup>，所用布氏菌抗原是牛种104M株(光滑型)，经超声波处理。以50微克/毫升浓度吸附于聚苯乙烯反应板孔。
7. 吸收用布氏菌抗原：16M(羊种)与544A(牛种)等量混合菌悬液(100亿/毫升)。
8. 凝集反应，2ME试管凝集反应，补体结合试验，虎红平板抗原玻片凝集反应方法见文献<sup>[8]</sup>；所用抗原：前两种方法为北京生研所惠赠的试凝集抗原；补体法为中鉴所惠赠的81

-1号抗原；后者为本所81年制备。

## 结 果

一、正常人血清32份的平均OD值：

1. 用兔抗人IgG-HRPO结合物测定平均值95%可信限上限OD值是0.60。

2. 用SPA-HRPO结合物测定平均值95%可信限上限OD值是0.28。

二、51例临床诊断为布氏菌病人血清用ELISA法检查结果：如表1。

表1 两种酶结合物检查布病病人血清51例结果

被检血清效价	SPA-HRPO		兔抗人IgG-HRPO	
	例数	%	例数	%
<1:20	1	1.96	1	1.96
1:20	3	5.9	3	5.9
1:40	1	7.8	1	1.96
1:80	9	1.96	3	5.9
1:160	5	9.8	8	15.7
1:320	6	11.8	9	17.6
1:640	6	11.8	4	7.8
1:1280	1	1.96	4	7.8
≥1:2560	19	3.7	7	13.7
≥1:5120			11	21.6
	51	98	51	98

注：同一份血清，用两种结合物检测，被检血清效价相同者共23例，相差1倍者2例，相差2倍者6例，阴性者1例。

表1结果，按顺序测验法统计分析，两结合物检查结果无差别，说明两结合物相似。

三、ELISA法与其它检查法检查布病人血清阳性率比较：如表2、3。

1 中国医学科学院流研所  
2 云南省德宏州(芒市)防疫站

表2 用兔抗人IgG-HRPO结合物(ELISA法)与其它四法的检查结果比较

方法	效 价 (1:)										检 查 数	阳 性 数	%
	<20	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120			
ELISA	1	3	1	3	8	9	4	4	7	11	51	50	98
凝 集	0	0	0	0	1	1	1	2	6	10	51	21	41
2-ME	0	0	0	0	1	0	1	2	5	9	51	18	35
补 结	0	0	0	0	0	0	1	0	3	10	36	14	39
虎红平板	0	0	0	0	1	0	2	1	5	7	51	16	31

表3 用SPA-HRPO结合物(ELISA法)与其它四法的检查结果比较

方 法	效 价 (1:)									检 查 数	阳 性 数	%
	<20	20	40	80	160	320	640	1280	2650			
ELISA	1	3	1	9	5	6	6	1	19	51	50	98
凝 集	0	0	0	0	0	1	3	1	16	51	21	41
2-ME	0	0	0	0	0	0	3	1	14	51	18	35
补 结	0	0	0	0	—	1	1	0	12	36	14	39
虎红平板	0	0	0	0	0	1	1	1	13	51	16	31

据表2、3所列结果,用兔抗人IgG的酶结合物与SPA酶结合物做ELISA检查,阳性率均为98%,其他几种方法检查的阳性率:凝集反应为41%,2-ME反应为35%,补体结合反应为39%,虎红平板抗原凝集反应为31%。说明ELISA法检查布病病人血清的敏感性相当高。从表2、3可见,多数布病血清是在ELISA法得到1:320倍以上效价时其他方法方能有一部分得到阳性结果。为了证明此结果的特异性,选6份血清(阳性)做1:5稀释,用等量压积的布氏菌抗原,混匀后,于37°C中吸收4小时,离心取上清,即为吸收后的血清。吸收后的血清ELISA法效价均<1:20,即呈阴性结果。

### 讨 论

ELISA法可以测定布病病人、病畜均有文献报告[2,3]。本文亦说明ELISA法用于检查布病的可用性。此法优于其他方法,敏感性显著高。河北省卫生防疫站惠赠的31份经临床诊断为布病病人的血清,有30份按ELISA法测定出阳性结果,新疆流研所惠赠的20份布病血清均呈阳性。此法与临床诊断的符合率为98%。

为了解如此敏感的ELISA法测定结果是否属于特异性,用布氏菌抗原吸收布病血清6份,吸收后效价均小于1:20(即呈阴性)。据Carlsson等人(1976)[9]的资料,ELISA法比凝集试验敏感10~100倍,通过直接及抑制试验(即未吸收和吸收)表明,以及布氏菌和耶尔森那D群V的抗原相异性。认为用ELISA法作布氏菌病的诊断不仅敏感而且特异,同时也说明SPA-HRPO与兔抗人IgG-HRPO相似,两种结合物都是可作为诊断用品。

兔抗人IgG-HRPO及SPA-HRPO的制备时间分别是1981年的7月和8月,经过约半年多次测定,其最适浓度一直稳定,说明它具有一定的稳定性。

由于SPA不仅同人血清IgG相结合,而且也同猪、旱獭、家兔、豚鼠等动物血清IgG相结合[4],故SPA-HRPO结合物不仅可用于检查病人抗体时做为第二抗体,还可用于检查某些种病畜病兽,对此应作进一步研究。

### 摘 要

以两种酶结合物(SPA-HRPO及兔抗人IgG-HRPO)做酶联免疫吸附测定(ELISA),对临床诊断

为布鲁氏菌病人的血清51份进行了检查。结果除一例阴性外，其余50份均呈阳性反应。阳性效价为1:20~1:5120。用两种结合物检查结果基本一致，阳性率为98%。同时以凝集反应、2-ME试管凝集反应、补体结合反应、虎红平板抗原凝集试验方法作了对比检查，阳性率分别为41%、35%、39%、31%。为了解ELISA法测定结果的特异性，使用混合布氏菌抗原吸收了被检血清，原来的阳性血清在吸收之后转成阴性。由于实验结果说明ELISA法作为布病诊断方法之一是可用的。

**ABSTRACT**

51 sera of brucellosis patients that have been diagnosed clinically were tested with ELISA using two enzyme conjugates, i. e. SPA-HRPO and rabbit anti-human IgG-HRPO. All the sera were positive except one. The titer was 1:20~1:5120. The results of these two conjugates were similar. Total positive rate was 98%. Meanwhile, we compared it with standard agglutination, 2-ME agglutination, complement fixation and card test (acidified Bengal Red plate agglutination). Their positive rates were 41%, 35%, 39%, 31% respectively. To identify its specificity of our re-

sults by ELISA, examined sera were absorbed with smooth type brucella antigen. Because cross agglutination reaction between brucella and certain type Yersinia exists to some extent, it might be necessary to improve the procedure of the proposed method. It is, however, believed that ELISA is effective for diagnosis of brucellosis if combined with other tests.

**参 考 文 献**

1. Engvall E et al: J Immunol, 109: 129, 1972.
2. Stem Shorn B W et al: Am J Vet Res 41(11): 1779, 1980.
3. 郭章溉: 流行病学杂志, I(3): 179, 1980.
4. 李爱芳等: 葡萄球菌甲蛋白与几种不同血清反应性的实验观察, 内部资料, 1981.
5. 李之桂等: 用SPA提纯人IgG及制备抗人IgG抗体, 中华流行病学杂志, 4(1): 28, 1983.
6. 李爱芳等: 中华流行病学杂志, 3(6): 382, 1982.
7. Voller A et al: Bull World Health Organ, 53(1): 55, 1976.
8. 中国医学科学院流研所布病室: 布鲁氏菌病内部资料, 第105~164页, 1976.
9. Carlsson HE et al: Acta path Microb Scand, sect C, 84:177~184, 1976.

(本文蒙刘秉阳教授、姜顺求副教授审阅, 仅致谢意! 参加技术操作的尚有禹慧兰、蒋励澜、詹洪、徐昌等同志)。

## 用SPA提纯人IgG及制备抗人IgG抗体

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

李之桂 李爱芳 禹慧兰 徐 昌

SPA(葡萄球菌甲蛋白)能与多种哺乳动物及人IgG结合,与IgM、IgA也有一定的结合能力。故用SPA琼脂糖亲和层析法从人血清中提取IgG是不纯的。我们根据人脐带血中不含有IgM、IgA的特点,使用SPA亲和层析柱提取IgG,经过下列测定,证明是纯品IgG。

首先以琼脂扩散法检查亲和层析柱洗脱物和解析物。将其分别滴入中间一列孔中,然后在其两侧孔中分别各加马抗人IgG抗体和兔抗人全血清抗体(此抗体与人全血清之间能形成十四条以上沉淀线)。结果,解析物与两侧孔间的沉淀线形状相似,说明属于IgG纯品。而洗脱物与兔抗人全血清抗体间出现多条沉淀线,与马抗人IgG抗体之间则仅有模糊不清的一条细沉淀线;它可能是不与SPA结合的IgG。

然后又以免疫电泳检查了洗脱物及解析物,将它们分别放入板孔电泳两小时之后,于孔间沟中加入兔抗人全血清抗体。结果与解析物间出现的沉淀线属IgG,与洗脱物间出现了多条沉淀线。

用此法获得的人IgG纯品,适于作为抗原来制备抗IgG抗体等用。且具有收量较高的优点,从每毫升脐带血清中获得10毫克左右的IgG,接近于血清中IgG的总量。

我们还用结合人IgG的具有A蛋白的葡萄球菌(cown 1株)悬液免疫家兔,制备兔抗人IgG抗体。方法是提纯的人IgG 1毫升(10毫克/毫升),和人脐带血清 1毫升,分别与4毫升(100亿/毫升)菌悬液相结合;以生理盐水洗数次,作为免疫原,免疫家兔。其程序是首次0.5毫升,三天后1毫升,以后隔七天免疫一次,每次递增0.5毫升,直到一次注射量为2.5毫升(均为静脉免疫),约需40~50天,抗体效价可达1:32,两种免疫原结果相似。免疫电泳检查两种抗体,同人全血清之间出现一条相同的沉淀线。结果说明上法制备的抗IgG抗体的特异性较好。其中应指出的是,用脐带血清加菌悬液作为免疫原的方法很简便,而且效果相同,是值得注意应用的又一个制备抗IgG抗体的新方法。