

综述

# 布鲁氏菌病鉴别诊断的研究进展

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所\* 鲁齐发综述 尚德秋校

长期以来，布鲁氏菌病(下称布病)鉴别诊断不仅关系着布病的防治工作，同时对流行病学调查也具有重大的意义。因为在人畜中广泛采用布鲁氏菌(下称布氏菌)活菌苗后在机体中产生的各种血清学反应在很大程度上干扰了布病的诊断；布氏菌与一些菌属细菌具有某些相似的抗原成分，因此，对布病的鉴别诊断除了在临床上需要与临床表现相似疾病鉴别外，在实验室诊断中应主要考虑人工免疫与自然感染的鉴别和布氏菌感染与具有共同抗原的菌属细菌感染的鉴别〔1〕。

自60年代起，各国研究者为解决这一具有战略意义的课题，建立不同种类的检测方法，分析各布氏菌免疫和感染的机体体液中的不同类型免疫球蛋白抗体出现的时间、在数量上的差别和动态上的关系，以及制备和纯化各种布氏菌的抗原、抗体等方面作了大量的工作，并已取得了可喜结果。现归纳为4个方面综述如下。

**一、两类抗体与布氏菌人工免疫和自然感染的关系：**大量的资料表明，机体受到布氏菌感染或免疫后，在不同期间可产生两类不同性质的抗体，即大分子免疫球蛋白类抗体(19S, IgM)和小分子免疫球蛋白类抗体(5S, 7S; IgG, IgA)〔2~4〕。

应用密度梯度超速离心及常规血清学试验，无论对布病患者与菌苗接种者；对用菌苗接种及自然感染的家畜以及用布氏菌强毒株感染与用弱毒株免疫的实验动物，获得的结果有相似的情况。人及动物免疫接种后，大约五六天产生IgM抗体，两周后可达高峰，IgG型抗体在4周左右达高峰，以后逐渐下降；而在人及动物感染后数日出现IgM及IgG抗体，且IgM型抗体很快下降；IgG抗体的高峰期可维持达270天，到一年后检查仍可保持在诊断水平。总之，在布氏菌免疫和感染后机体产生的上述两类抗体的动态、质和量上均存在显著性差别，采用某些血清学方法能进行一定程度的鉴别〔5~9〕，尤其值得重视的是，阎守敦等在布氏菌强毒株感染和菌苗免疫绵羊的鉴别诊断实验研究

中，对一次及两次免疫的(分别用Rev-1, M5皮下及气雾免疫)、总数达2 314只绵羊，于接种后28~336天中，应用改良的ELISA法检查均为阴性反应；相反对用布氏菌强毒株感染的297只绵羊检查，其阳性率可达80.95~94.67%〔10〕。

**二、各类布氏菌抗原在布病鉴别诊断上的意义：**1983年Chin等应用3种布氏菌抗原制剂即按常规方法制备的Br. ovnis菌体抗原、热酚法制备的LPS抗原和外膜蛋白抗原第二峰有效组分，分别进行ELISA反应，以检查两组用Br. ovnis免疫的绵羊血清及自然感染Br. ovnis的一组绵羊血清。据检查结果表明，当用菌体抗原时，在免疫羊与自然感染羊间未见差别，用LPS抗原，可见免疫羊血清抗体OD值明显高于感染羊，相反用外膜蛋白抗原时，则感染羊血清抗体OD值明显高于免疫羊〔11〕。这里不难看出，在用Br. ovnis LPS及外膜蛋白抗原时，能够对Br. ovnis免疫与感染的绵羊进行鉴别。

1989年Klaus等，在提纯布氏菌LPS及多糖(PS)抗原基础上，应用ELISA间接法和竞争法，分别对一定数量的健康羊和牛种布氏菌19号苗免疫牛及自然感染牛血清进行了对比检查。结果表明，上述两种ELISA，只有当用多糖抗原时，才能对布氏菌免疫牛与自然感染牛进行鉴别，而用LPS抗原则无法对两者进行鉴别〔12〕。

通常鉴于琼脂扩散试验(AD)具有特异性强而敏感性不高的特点，因而人们期望用AD进行布病鉴别诊断的研究。尚德秋等(1973年)用AD技术检查Br. melitensis强毒株感染豚鼠和用菌苗株104M免疫的豚鼠血清。结果在1~28周过程中，对免疫组检查29次只有6次检查为阳性反应，而对用强毒株感染豚鼠共30次检查中，有15次为阳性反应〔13〕。1983年MeManon对用S19菌苗免疫的48头牛，在12个月观察期中，采用AD与常规的3种血清学试验进行了对比检查。结果表明常规的3种血清学试验出现了比AD高得多的阳性

\* 邮政编码 102206



率〔14〕。在这里尚需指出,上述AD试验均是采用布氏菌光滑型抗原进行的。1989年Veronica等采用羊种布氏菌粗糙型菌株B115,以三氯醋酸法提纯Poly-B抗原做AD试验,并与5种常规血清学方法进行对比观察〔15〕。结果发现,对已分离到牛种布氏菌1型菌的56份牛血清及可疑自然感染的212份牛血清,AD检查其阳性率分别为96.6%及87.5%,这略低于常规的5种血清学试验的阳性率;然而对总数达1328份免疫牛血清,其中包括用19号苗常量或减量免疫的幼年牛及成年牛血清,采用常规的5种血清学试验检查均可见很高的阳性率,而AD检查却无一份血清为阳性。从而清楚地说明,采用Poly-B抗原的AD技术能对布氏菌免疫牛与感染牛进行鉴别。

**三、单克隆抗体应用于布病鉴别诊断的研究:**自1983年Gerhardt等应用杂交瘤技术首次成功地制备布氏菌单克隆抗体后〔16〕,Gorrell将此技术应用于胞病的鉴别诊断〔17〕。他们通过对200多株单克隆细胞筛选出B25单克隆株,并将其制备的单克隆抗体采用ELISA竞争试验与常规的ELISA进行了有关鉴别布氏菌感染与免疫的实验研究。从获得的结果表明,只有野外感染的牛或S19菌苗免疫后感染的牛血清,才显示了阳性反应结果,而用常规的ELISA检查,在用S19菌苗免疫的6头牛中,有4头为阳性,而用单克隆抗体的ELISA竞争试验则为阴性反应。这表明本试验有鉴别意义,当然由于检查的标本数过少,因而这项工作的确实意义尚待深入研究。

如上述,布病的鉴别诊断,除人工免疫与自然感染的鉴别外,还有布氏菌感染与其他菌属细菌,尤其是与耶尔森氏菌0:9型菌的鉴别。

1984年Bundie等分别用牛种布氏菌及耶尔森氏菌0:9型死菌悬液免疫BALB/C小鼠,通过杂交瘤技术,分别从布氏菌免疫的小鼠脾细胞筛选出10株分泌高滴度单克隆抗体的细胞株,从耶尔森氏菌免疫的小鼠脾细胞中获得7株分泌IgG型的单克隆抗体细胞株〔18〕。从这些细胞株制备的单克隆抗体的特征如附表所示。从获得的结果不难看出,在7种耶尔森氏菌获得的单克隆抗体中,与两菌凝集试验显示有差别的有YST-5、YST-6和YST-7;与两菌多糖抗原做免疫扩散试验显示有差别的仅为YST-6。而从布氏菌免疫制备的10种单克隆抗体中,无论用免疫扩散试验、

ELISA及凝集试验检查,这些单克隆抗体与两菌均未见差别。这说明应用前者单克隆抗体具有鉴别意义。这也提示人们,试图应用单克隆抗体技术研究布氏菌与耶尔森氏菌0:9型菌感染的鉴别,似乎从制备耶尔森氏菌0:9型菌单克隆抗体较制备布氏菌单克隆抗体更适宜。当然,单克隆抗体在布病鉴别诊断上的确切意义,尚有待深入地研究。事实上,国内外研究者们,已注意应用其他的方法,例如应用间接血凝试验检查牛血清中耶氏菌H凝集素,特别是通过间接血凝试验比较其同源与异源抗体滴度以及应用ELISA技术已获得了较好的结果〔1〕。

#### 四、检测布氏菌抗原用于布病鉴别诊断的研究:

迄今,常规血清学试验通常是以检测人畜体液中抗体为目的,而对检测其布氏菌抗原仅有零星的实验研究资料。但尽管如此,有关这方面的研究,日益受到重视,这对于布病的鉴别诊断,确可以说是值得重视的另一新途径。

1977年Wilson等首次应用固相放射免疫技术即用放射性碘<sup>125</sup>I标记特异性布氏菌IgG抗体,并在实验条件下,可检测出的可溶性抗原含量为100pg〔19〕;1983年Perera等应用ELISA试验也进行检测布氏菌抗原的实验研究〔20〕;值得提出的是国外有人应用冷补体结合试验检查了布病患者及菌苗接种者体液中特异性抗原。其结果表明,在患者及接种者血清中的布氏菌抗原是有明显区别的〔1〕。1984年Chen等应用ELISA技术从感染布氏菌母牛的阴道分泌物中检测出特异性抗原〔21〕;1988年Limet等应用胶乳凝集抑制试验及ELISA试验从感染牛种布氏菌小鼠的血浆中检测出布氏菌LPS抗原〔22〕。从这些资料可知,虽检测人畜布病体液中抗原的实验方法仍处在实验研究阶段,但建立适用的检测方法是可能的,特别是应用于布病鉴别诊断是很有希望的。

总之,关于布病的鉴别诊断一直是布病防治工作具有重大意义的研究课题,决非采用一种或两种检测方法所能解决的。笔者认为,当前最急迫的是制备和纯化布氏菌抗原及抗体,并在此基础上,改进和建立相应的检测特异性抗体及抗原的检测方法;同时对多种检测结果进行综合判定则可能较好地解决布病鉴别诊断的问题。



附表

两类单克隆抗体的特征

单克隆抗体	免疫球蛋白 类别	免疫扩散试验			ELISA滴度		凝集试验	
		YLPS	YPS	BPS	YLPS	BCPS	Y0:9	牛种布氏菌
从耶尔森氏菌获得的单克隆抗体:								
YST9-1	IgG2b	+	-	-	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	+	+
2	IgG3	+	+	+	5×10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	+	+
3	IgG1	+	-	-	5×10 <sup>4</sup>	5×10 <sup>5</sup>	+	+
4	IgG3	+	+	+	5×10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	+	+
5	IgG1	+	-	-	5×10 <sup>4</sup>		+	-
6	IgG3	+	+	-	5×10 <sup>4</sup>		+	-
7	IgG2a	-	-	-	10 <sup>5</sup>	3.2×10 <sup>8</sup>	-	+
从布氏菌获得的单克隆抗体:								
1	IgM	-	-	-	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	+	+
2	IgG1	-	-	-	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	+	+
3	IgG3	+	-	-	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	+	+
4	IgG3	+	+	+	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	+	+
5	IgG1	-	-	-	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	+	+
6	IgM	+	+	+	5×10 <sup>4</sup>	5×10 <sup>4</sup>	+	+
7	IgG3	+	+	+	5×10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	+	+
8	IgG3	+	+	+	5×10 <sup>4</sup>	5×10 <sup>4</sup>	+	+
9	IgM	+	-	-	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	±	±
10	IgG3	+	+	+	5×10 <sup>4</sup>	5×10 <sup>4</sup>	+	+

参 考 文 献

- 刘秉阳主编. 布鲁氏菌病学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 272~277.
- Joint FAO/WHO exp com, Bru Fifth report Genva, 1970.
- Jones LM, et al. *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* 45/20 viccines in cattle: Serologic Test. *Am J Vet Ves* 1973; 34: 199.
- Knyazeva EM, et al. Physicachemical properties of incomlete of antibodies in expermental Brucellosis. *J HYG Epid Micro Immuno* 1974; 18(1): 106.
- Reddin JL, et al. Significance of 7S and Macroglobulin *Brucella* agglutinings in Human Brucellosis. *New Engl J Med* 1965; 272: 1263.
- Spink WW, et al. Host Parasite Relationship in Brucellosis, *Lancet* 1964;2: 161.
- Kerr WR. Immunolobulin Class of *Brucella* Antibodies in Human Sera. *Immunology* 1967; 13: 223.
- Rose JE. Ultracentrifugation and Heat Inactivation studies on Seroagglutinings of pregnant Heifers artificially infected with virulent *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 1964;25: 329.
- Thoen CO, et al. Detection of Br. antibodies of different immunoglobulin classes in cow milk by ELISA. *Am J Vet Res* 1983;44: 306.
- 阎守敦, 等. 布鲁氏菌强毒感染和菌苗免疫绵羊的鉴别诊断实验研究. *中国人兽共患病杂志* 1989;5(5): 2.
- Chin JC. Comparison of different antigenic preparations for the detection of ovine serum antibodies against *Brucella Ovis* by ELISA. *Aust Vet J* 1983;60(9): 261.
- Klaus N, et al. Enzyme-Linked immunosorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle natrually infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain 19. *Am J Ves Res* 1989;50(1): 5.



13. 尚德秋, 姜顺求. 布鲁氏菌病国外研究进展. 流行病防治研究 1973; 2: 133.
14. McManon KJ. Comparison of an Agar-gel immunodiffusion test with other serological methods for differentiating Brucella infected from vaccinated cattle. Canad J Camp Med 1983; 47 (1): 86.
15. Veronica RJ, et al. Evaluation of humoral immunity to Brucella Sp in cattle by use of an agar-gel immunodiffusion test containing a polysaccharide antigen. Am J Vet Res 1989; 50 (11): 1813.
16. 尚德秋. 布氏菌病国外研究进展. 地方病译丛 1984; 2: 1.
17. Gorrell MD, et al. An Enzyme Immunoassay for bovine Brucellosis using a Monoclonal antibody specific for field strains of Br.abortus. 3rd international symposium on Brucellosis 1983: 491~494.
18. Bundie DK, et al. Serological confirmation of Br. abortus and Yersinia enterocolitica 0:9 O-Antigens by monoclonal antibodies. Infect and Immunity 1984; 46 (2) 389.
19. Wilson DV, et al. A solid phase Assay with Radio-actively-Labbed Antibody for the Detection of Brucella Abortus. J Med Micro 1977; 10: 281.
20. Perera VY, et al. Nylon bead of ELISA for detection of sub-picogram quantities of Brucella antigen J Clin Micro 1983; 18 (3) 601.
21. Chen IM, et al. Application of an enzymelinked immunosorbent assay for detection of Brucella antigens in vaginal discharges of cows. Am J Vet Res 1984; 45: 32.
22. Limet JN, et al. Longitudinal study of Brucellosis in mice by immunoassay of lipopolysaccharid-related antigens in blood and urine. J Med Micro 1988; 26: 37.

## 全国疾病监测专家咨询会在京召开

1990年是第二阶段疾病监测工作开展的第一年, 各级监测人员作了大量艰苦的工作, 取得了可喜成绩。在前不久结束的全国疫情工作会议上, 126个疾病监测点的疫情分析受到很大重视, 得到卫生部卫生防疫司、中国预防医学科学院领导的好评。为使今后疾病监测工作尽快走向系统化和正规化, 使得监测点的监测数据基本上反映真实情况, 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所于5月8~10日在北京组织召开了全国疾病监测专家咨询会, 对以下问题进行了讨论。

1. 目前疾病监测工作状况, 第二阶段监测工作的方向与任务。
2. 争取中国2000年预防保健战略目标部分项目在监测点上实施。
3. 有关传染病疑似病例诊断标准的敏感度和特异度设计方案。
4. 对监测点人群实施健康户口卡可行性研究。
5. 进一步完善传染病漏报调查和出生、死亡漏报调查。
6. 《疾病监测工作手册》第二版的编写。

### 7. 疾病监测数据质量控制专题设计方案。

会议认为第二阶段监测工作仍然是以传染病监测为主的综合疾病监测, 目前的中心任务是提高数据质量。代表们一致认为应积极申请监测点作为实施中国2000年预防保健战略目标的试点。大家认为在监测点人群中建立健康户口卡是必要的, 健康户口卡的基本项目应包括与传染病发病有关的主要因素, 各点可根据当地条件增加一些有关慢性病监测的内容。确定暂以肝炎、麻疹为对象研究其疑似病例诊断标准的敏感度和特异度。对传染病漏报调查和出生、死亡漏报调查方案进行讨论, 修改了一些内容。一致认为有必要重新编写《疾病监测工作手册》, 讨论并确定了编写内容。对数据质量控制专题设计方案进行讨论, 完善了调查提纲, 基本上确定了进行数据质量控制典型调查的监测点和调查人员。

通过3天认真、细致的讨论, 对多数问题形成了统一看法, 达到了预期目标, 这将为今后的疾病监测工作起到很大的指导作用。

(流研所疾病监测组杨功焕)