

一种用于人畜布鲁氏菌病诊断的 羧化胶乳凝集试验

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所* 鲁齐发 王晓英 郭宝岚 张 伟

提要 本文介绍一种用于人畜布鲁氏菌病诊断的羧化聚苯乙烯胶乳凝集试验。所用抗原是以高浓度氯化钠液提取的一种蛋白性抗原。而且不是用传统的物理吸附法而是用化学交联法制备的,具有良好的稳定性。将化学交联胶乳和物理吸附胶乳用于部分人畜布鲁氏菌感染血清的检测结果表明,前者无论在特异性及敏感性上均优于后者。并对本试验的一些影响因素进行了讨论。

关键词 布鲁氏菌病 羧化胶乳凝集试验 抗原 抗体

在前报中^[1],我们应用胶乳凝集试验(LAT)与常规血清学试验对人畜布鲁氏菌(简称布氏菌)感染血清的检查结果表明,LAT是一种比较特异、敏感、快速和简便的检测方法。但所用的布氏菌抗原胶乳制剂,仍按传统的物理吸附法制备,布氏菌抗原只能用LPS。这样所吸附的抗原易于脱落,稳定性较差,假阳性率较高。为了克服这些缺点,我们建立以化学交联法制备的布氏菌抗原胶乳制剂不仅稳定性好,而且特异性及敏感性均优于物理吸附法制备的布氏菌抗原胶乳制剂。现将制备方法及应用情况报道如下。

材料及方法

一、布氏菌抗原的制备:

- 1.布氏菌脂多糖(LPS)按常规制备^[2];
- 2.布氏菌蛋白性抗原:取羊种布氏菌16M 48小时培养物悬液,经离心后按1克湿菌加入10ml 5%氯化钠液,置80℃水浴3小时,取出凉后放4℃冰箱中2~3天,6000r/min离心30分钟,所得上清以蒸馏水透析2天,吹风浓缩,测蛋白含量后加1%NaN₃防腐置4℃冰箱中备用。

二、主要试剂:

- 1.羧化聚苯乙烯胶乳:由军事医学科学院实验动物中心惠赠,胶乳浓度10%,直径为

0.8μm。

2.1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC),由军事医学科学院提供。

3.ε-氨基己酸,中国医药公司北京采购供应站供应,批号:660320。

三、布氏菌抗原胶乳制剂的制备:

1.化学交联法:第一步加入一定量0.2mol/L pH8.2的硼酸盐缓冲液(BBS)、ε-氨基己酸、EDC及胶乳,混匀后置磁力搅拌器上搅拌2小时,13000r/min 10分钟;第二步于沉淀物中加一定量的BBS、布氏菌蛋白抗原及EDC,再置磁力搅拌器上搅拌6小时,加入一定量0.1mol/L pH8.0的甘氨酸液,继续搅拌30分钟。13000r/min 10分钟,于沉淀物中加入一定量的BBS及1%NaN₃即可。

2.物理吸附法,其制备方法见上报所述^[1]。

四、其他血清学试验:虎红平板凝集试验(RBPT)、试管凝集试验(SAT)及酶联免疫吸附试验(ELISA)均按常规操作及判定结果^[3]。

结 果

一、两种胶乳试验特异性及敏感性比较:经过一段时间的摸索,我们采用5%氯化钠液提取的羊种布氏菌16M抗原,并以化学交联法

* 北京市,邮政编码 102206

制备了布氏菌抗原胶乳制剂，而且在实验条件下获得稳定后，与早先以物理吸附法制备的布氏菌抗原胶乳制剂进行了比较观察，此见表1所示。从对比结果不难看出，无论对慢性期布鲁氏菌病（简称布病）患者的血清或布氏菌感染牛只血清，SAT检查为阴性的血清，用化学交联胶乳试验均为阴性，而用物理吸附胶乳试验则分别出现2/7及3/17的阳性结果。对于此不相符的5份血清，进一步用RBPT及 ELISA

检查，其结果均为阴性。很明显，对于 SAT 达1:100或以上滴度的血清，两种胶乳试验结果是一致的。为了进一步比较两种胶乳试验对检测布氏菌抗体的敏感性，我们用分离出布氏菌的9份奶牛血清及已知布氏菌感染的实验动物血清做了对比观察（表2）。不难看出，用化学交联胶乳试验检测较高滴度的布氏菌抗体，其敏感性明显高于用物理吸附胶乳试验。

表1 两种胶乳试验结果比较观察

待检血清	SAT滴度	例数	化学交联胶乳		物理吸附胶乳	
			+	-	+	-
慢性期布病患者	—	7	0	7	2	5
	1:50	5	4	1	5	0
	100	4	4	0	4	0
	200	1	1	0	1	0
	400	2	2	0	2	0
	800	1	1	0	1	0
	—	17	0	17	3	14
布氏菌感染牛只	1:100	1	1	0	1	0
	200	9	9	0	9	0
	400	6	6	0	6	0
	800	4	4	0	4	0
	1600	6	6	0	6	0

表2 两种胶乳对分离到布氏菌的部分牛只及羊种布氏菌16M感染实验动物血清滴度比较

待检血清	化学交联胶乳试验滴度						物理吸附胶乳试验滴度					
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
布氏菌感染牛:												
646	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
726	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
724	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
509	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
687	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
625	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
688	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
612	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
567	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
羊种布氏菌16M感染试验动物:												
小鼠	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
豚鼠	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
家兔	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-

二、化学交联胶乳试验与几种血清学试验比较观察：为了获得实际应用，对部分慢性期布病患者及布氏菌感染牛只血清，分别用化学交联胶乳试验与SAT、RBPT及ELISA三项试验进行了对比观察，检查结果如表3所示。对比结果可知，对布病患者的血清，LAT的结

果与RBPT、ELISA基本上是一致的，LAT的阳性检出率高于SAT，显然主要是对1:50滴度的血清也呈阳性的结果。因此，对布氏菌感染牛只的血清两者的检查完全一致，这表明应用化学交联胶乳试验适宜于人畜布病血清标本的检测。

表3

化学交联胶乳试验和三项血清学试验结果比较

待检血清	检查数	LAT		SAT*		RBPT		ELISA	
		+	-	+	-	+	-	+	-
慢性期布病患者	20	12	8	8	12	12	8	11	9
布氏菌感染牛只	43	26	17	26	17	26	17	26	17

* SAT检查为(-)中，包括有5份滴度为1:50的布病患者血清

讨 论

一、用以制备布氏菌抗原胶乳其抗原试剂的选择：在制备过程中，我们曾分别用布氏菌脂多糖抗原及超声波破碎抗原与羧化胶乳进行致敏及化学交联。据多次试验结果表明，对超声波破碎抗原，无论采用物理吸附或化学交联均不理想，极易出现自凝，对布氏菌LPS虽用物理吸附可获得成功，但经应用于现场人畜布病标本进一步检测，其稳定性较差，假阳性率较高。本次采用5%氯化钠液提取的羊种布氏菌16M抗原，以化学交联法制备的胶乳制剂，如上述无论其特异性及敏感性均优于用物理吸附法制备的布氏菌LPS胶乳制剂。关于化学交联胶乳所用最适抗原含量，据我们多次摸索，采用上述抗原的蛋白含量在5~20mg/ml均较好，若用4mg/ml以下含量的抗原，其效果不好；若用25mg/ml以上抗原则可见自凝。

二、关于化学交联胶乳的稳定性：据吕绳凯介绍^[4]，物理吸附胶乳常受待检标本蛋白质的干扰，如蛋白尿常引起物理吸附的胶乳妊娠试验出现假阳性结果，在尿蛋白超过4mg/ml时，假阳性可达75%。而化学交联胶乳，抗原是用共价交联的方法连接到羧化胶乳上，具有良好的稳定性，可以克服待检标本蛋白质的干扰。因此，对于物理吸附胶乳试验，为防止出

现假阳性，必须将待检血清做1:8稀释，而对化学交联胶乳试验，则不必将待检血清稀释而可直接进行检测。这在实际检测中具有较大的实用价值。

A Carboxylated Latex Agglutination Test for the Serological Diagnosis of Human and Animal Brucellosis Lu Qifa, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

A carboxylated latex agglutination test was developed for detecting antibodies in sera of human and animals with Brucellosis. The latex was chemico-linked with *B. melitensis* 16M extracted with 5% NaCl. Comparing with physico-sorbent latex antigens in detecting antibodies in sera of human and animals with Brucellosis, the chemico-linked latex is more stable, more specific and more sensitive. In addition, preparation of chemico-linked latex and some factors affecting the result of the test were also described in the paper.

Key words Brucellosis Carboxylated latex agglutination test Antigen Antibody

参 考 文 献

1. 鲁齐发, 等. 胶乳凝集试验应用于布鲁氏菌病诊断的研究. 中华流行病学杂志 1989; 10(5): 295.
2. 姜顺求主编. 布鲁氏菌病防治手册. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 33~35.
3. 鲁齐发, 等. 以布氏菌免疫及感染豚鼠其血清抗体研究. 中国地方病学杂志 1987; 6(5): 278.
4. 吕绳凯, 等. 一种敏感的羧化胶乳妊娠凝集抑制试验. 中华医学检验杂志 1981, 4(1): 9.

(1991年7月1日收稿, 1991年9月10日修回)