

双抗原夹心酶免疫试验对人畜布鲁氏菌抗体检测的研究

鲁齐发¹ 张伟¹ 郝宗宇²

【摘要】 目的 为人畜布鲁氏菌病(布病)血清学诊断、监测及流行病学调查提供实用和简便的方法。方法 在首次制备布鲁氏菌(布氏菌)抗原-辣根过氧化物酶结合物的基础上,建立了检测人畜布鲁氏菌抗体的双抗原夹心酶免疫试验(DAgS-EIA,包括 DAgS-ELISA 及 DAgS-DIEA)。用本法及间接 ELISA(I-ELISA)、试管凝集试验(SAT)及虎红平板凝集试验(RBPT)等常规血清学方法对从河南省及河北省收集的部分布病患者、可疑患者,布氏菌感染羊只以及布氏菌感染的实验动物血清标本进行了检测。结果 对布病患者及可疑者的检查结果表明,阳性率以 DAgS-ELISA 最高(60.0%~62.9%),余依次为 RBPT(48.6%~58.1%)、I-ELISA(55.6%)、DAgS-DIEA(53.7%)及 SAT(44.2%);对布氏菌感染羊的阳性率均为 81.8%。结论 上述结果表明,双抗原夹心酶免疫试验检测人畜布鲁氏菌抗体,不仅特异、简便而且仅制备一种布氏菌抗原-酶结合物就可对人及多种动物进行检测。

【关键词】 布鲁氏菌病 酶免疫试验 抗原 抗体

Study on double antigens sandwich Enzyme Immunoassay for detection of brucella specific antibodies in human and animals LU Qifa*, ZHANG Wei, HAO Zongyu. *Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

【Abstract】 Objective In order to develop practicable methods for serodiagnosis surveillance and epidemiological surveys in human and animals Brucellosis. **Methods** A double antigens sandwich Enzyme Immunoassay (DAgS-EIA include DAgS-ELISA and DAgS-DIEA) have been developed under the basis of first production conjugate of Brucella antigen with horseradish peroxidase. Serum samples from diagnosed patients suspected patients of Brucellosis and sheep infected with Brucella in Henan and Hebei provinces as well as from experimental animals of infected with Brucella in laboratory detected through DAgS-EIA, I-ELISA, RBPT and SAT tests. **Results** Of the diagnosed and suspected Brucellosis patients positive rates of DAgS-ELISA, RBPT, I-ELISA, DAgS-DIEA and SAT were 60.0%—62.9%, 48.6%—58.1%, 55.6%, 53.7% and 44.2% respectively; as for sheep with Brucella infection, positive rate of the above mentioned 5 tests were 81.8%. **Conclusion** Results showed that DAgS-EIA were not only specific and practicable but may use for Brucella specific antibodies detection in humans and various animals with only one conjugate of Brucella antigen with horseradish peroxidase.

【Key words】 Brucellosis Enzyme immunoassay Antigen Antibody

自 70 年代酶免疫试验问世以来^[1], 已建

立了多种新的方法^[2,3], 但在布鲁氏菌病(布病)血清学方法中广泛采用的是间接酶联免疫吸附试验(I-ELISA)。这种方法虽有多种优点, 但存在的问题是特异性欠佳, 尤其是

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
北京 102206

2 河南省地方病防治研究所

检测人及不同种动物,需制备抗相应种的免疫球蛋白-酶结合物。近些年来虽应用 SpA-酶结合物情况有所改善,但这只能检测 IgG 类抗体,而且在检测如牛、鹿、羊等动物时其效果很差。为此,我们在首次制备布鲁氏菌(布氏菌)抗原-酶结合物基础上,建立了双抗原夹心酶免疫试验,用于人畜血清中布氏菌抗体的检测,现将主要结果分述如下。

材料与方法

一、待检血清:

1. 布病患者及疑似布病患者血清:分别来源于河南省及河北省布病疫区。

2. 布氏菌感染羊血清:来源于河南省布病爆发点羊群。

3. 实验动物血清:用布氏菌 16M、544A、104M 及 1330S 感染家兔、小鼠后的血清;另外尚包括一定数量健康的家兔、豚鼠及小白鼠的血清。

二、布氏菌抗原:

1. 用于 ELISA 包被及酶标记的抗原制备:48 小时布氏菌培养物用灭菌的 5% NaCl 液洗下,并将菌悬液制成约 1 000 亿/ml,置 80℃水浴 2~3 小时,冷却后放 4℃冰箱中 5 天以上,以 6 000r/min 离心 30 分钟,所得上清再用 50%饱和硫酸铵液处理,透析,浓缩即可,置 4℃冰箱中备用。

2. 其他试验用抗原:按本室常规方法制备。

三、布氏菌抗原-酶结合物的制备:采用过碘酸钠法,其主要程序为:将 5mg 辣根过氧化物酶(HRP)(纯度 RZ>3,活性在 250U/mg 以上)溶于 1.25ml 蒸馏水中,加入 0.1 mol/L NaIO₄ 液 0.25ml,室温条件下作用 30 分钟后,用 pH 4.4 1⁻⁶mol/L 醋酸盐缓冲液,在 4℃条件下透析一昼夜,其中至少换液 3 次。经透析后的 HRP 液加 pH 9.5 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 25⁻⁴l,加上上述制备的布氏菌抗原(蛋白含量 40mg/ml) 1ml,置电磁搅拌

上搅拌 1 小时后放 4℃冰箱中 3 天,然后加 NaBH₄ 液(4mg/ml) 0.125ml,4℃冰箱中 2 小时后即可用 50%饱和硫酸铵液进行纯化、透析,加入 40%灭菌甘油后滴定出工作浓度,置 4℃冰箱中备用。

试验中所用 SpA-酶结合物为我室按常规法制备。羊抗人 IgG 酶结合物及羊抗兔 IgG 酶结合物均购自卫生部北京生物制品研究所。

四、试验方法及其结果判定:

1. 双抗原夹心 ELISA(DAgS-ELISA):用工作浓度的布氏菌抗原包板,0.1ml/孔,置 4℃冰箱中过夜,取出洗涤后加不同稀释度待检血清 0.1ml/孔,置 37℃温箱中 2 小时,取出洗涤后,加工作浓度的布氏菌抗原-酶结合物 0.1ml/孔,放 37℃温箱 2 小时后按常规洗涤,加底物液,肉眼观察反应及用酶标检测仪测 OD 值。凡出现明显颜色或 OD 值 ≥0.3(阴性对照血清基本无色或 OD 值 ≤0.15)可判为阳性。

2. 双抗原夹心酶斑点法(DAgS-DIEA):操作程序基本同于 DAgS-ELISA。不同的是本试验是在室温条件下,在孔径为 0.2⁻⁶m 的硝酸纤维膜上进行,所用底物为硒试剂(3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐),以出现棕黄色斑点为阳性。

3. 间接 ELISA(I-ELISA):按常规操作,但要依据检测人及不同种动物的血清,用相应的抗人及同种动物免疫球蛋白的酶结合物或用 SpA-酶结合物,以 ≥1:400 为阳性。

4. 试管凝集试验(SAT):按常规操作,以 ≥1:100 为阳性。

5. 虎红平板凝集试验(RBPT):以出现明显凝集为阳性。

结 果

一、对实验动物血清检测结果:为了解所建立的 DAgS-ELISA 的特异性及敏感性,特用本试验及 3 种常规血清学试验,分别对布氏菌感染的及正常的 3 种实验动物血清进

行了检测(表 1)。从检测的结果不难看出, 4 种血清学试验对布氏菌感染的动物均为阳性; 对所有正常动物的血清均为阴性。在除 RBPT 外的 3 种血清学试验中, DA_gS-ELISA 所测血清滴度接近于 SAT 而低于 I-ELISA。

表 1 4 种血清学试验对不同种实验动物血清检查结果

检测动物血清来源	RBPT	SAT (1:2)	DA _g S-ELISA (1:1)	I-ELISA (1:1)
布氏菌感染兔				
16M (2 只)	+	800	800	1600
1330S (2 只)	+	1600	800	3200
544A (2 只)	+	1600	1600	3200
104M (2 只)	+	1600	400	800
布氏菌 104M 感染小鼠 (5 只)	+	200	40	400
正常家兔 (5 只)	-	-	-	-
正常豚鼠 (30 只)	-	-	-	-
正常小鼠 (5 只)	-	-	-	-

二、对河北、河南两省布病疫区部分人畜血清的检测结果: 采用 5 种血清学试验, 对从

两省疫区收集的部分布病患者、疑似布病患者的血清以及部分布氏菌感染羊血清进行了对比观察(表 2)。从表 2 可知, 检测的阳性率以 DA_gS-ELISA 为最高 (60.0% ~ 62.9%), 余下依次为 RBPT (48.6% ~ 58.1%)、I-ELISA (55.6%)、DA_gS-DIEA (53.7%) 及 SAT (44.2%)。而对布氏菌感染羊血清, 其阳性率均为 81.8%。

三、关于 DA_gS-ELISA 与 4 种血清学试验相关性比较: 从表 3 很明显看出, DA_gS-ELISA 与 4 种试验的阳性符合率以与 I-ELISA 为最高 (94.4%), 余下依次是与 RBPT (85.7%)、DA_gS-DIEA (83.3%) 及 SAT (77.1%); 阴性符合率按从高至低顺序则是与 I-ELISA (100.0%)、SAT (100.0%)、RBPT (97.9%) 及 DA_gS-DIEA (86.7%); 总符合率按高低顺序则是与 I-ELISA (96.3%)、RBPT (90.3%)、SAT (85.2%) 及 DA_gS-DIEA (84.4%)。

表 2 对河北、河南省部分人畜血清检查结果

省份	血清来源	DA _g S-ELISA			DA _g S-DIEA			I-ELISA			SAT			RBPT		
		检查数	阳性数	%	检查数	阳性数	%	检查数	阳性数	%	检查数	阳性数	%	检查数	阳性数	%
河北	布病患者及疑似布病患者	45	27	60.0	-	-	-	45	25	55.6	43	19	44.2	43	25	58.1
河南	布病患者及疑似布病患者	70	44	62.9	54	29	53.7	-	-	-	-	-	70	34	48.6	
	布氏菌感染羊	11	9	81.8	-	-	-	11	9	81.8	11	9	81.8	11	9	81.8

注: - 表示未进行检查

表 3 DA_gS-ELISA 与 4 种血清学试验相关性比较

	DA _g S-DIEA		I-ELISA		SAT		RBPT	
	+	-	+	-	+	-	+	-
DA _g S-ELISA	25	5	34	2	27	8	66	11
	2	13	0	18	0	19	1	46
阳性符合率 (%)	83.3		94.4		77.1		85.7	
阴性符合率 (%)	86.7		100.0		100.0		97.9	
总符合率 (%)	84.4		96.3		85.2		90.3	

讨 论

一、关于建立 DA_gS-EIA 的意义: 自 EIA 引入布病血清学试验后, 广泛采用的一直是 I-EIA^[4,5], 但 I-ELISA 存在的主要

问题是特异性欠佳, 尤其是在对人及不同种动物检测时, 必须制备抗人及抗相应种动物的免疫球蛋白-酶结合物, 近些年来, 采用 SpA-酶结合物, 虽能对人及多种动物进行检测, 但这只能检测 IgG 类抗体, 而且在对鹿、牛、羊等动物的检测其效果甚差 (内部刊物)。采用建立的 DA_gS-EIA, 从本质上说, 完全是特异性抗原与抗体间的反应, 能够对布氏菌感染的人及各种动物进行检测。本次应用 DA_gS-EIA 对各种实验动物及现场人畜血清进行了检查, 获得了较好的效果, 可以说正好是对 I-ELISA 的补充和改进。虽然

本法, 尤其 DAgS-DIEA 的敏感性尚不及 I-ELISA, 但操作简便, 特异性较好, 适宜于人畜布病诊断、监测及流行病学调查。

二、关于 DAgS-EIA 的应用前景: 建立 DAgS-EIA 的前提, 关键在于制备特异性抗原的酶结合物。对此, 我们进行了较长时间的摸索。我们体会重要的是制备较纯的高滴度的布氏菌抗原, 在标记中需延长酶与抗原间作用的时间。但即便如此, 现制备的布氏菌抗原-酶结合物其工作浓度尚较低, 有待进一步改进、提高。另外, 虽仅制备布氏菌抗原-酶结合物可用于人及各种动物体液中布氏菌抗体的检测, 但仅用本法尚难明确检测出的抗体属于何种免疫球蛋白或亚型抗体。因此, 有必要在制备特异性抗原-酶结合物的基础上, 建立捕获抗体酶免疫试验及竞争酶免疫试验, 以用于检测人畜体液中各种免疫球蛋白及其亚型抗体和布氏菌抗原。无

疑, 这对于完善酶免疫试验及其丰富检测内容是十分重要的。

参 考 文 献

- 1 徐震州, 尚德秋. 酶联免疫吸附试验诊断布氏菌病的研究进展. 中国地方病防治杂志, 1988, 3:222-224.
- 2 Nielsen KH, Kelly L, Gall D, et al. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine Brucellosis. Vet Immunol Immunopathol, 1995, 46: 285-291.
- 3 Barbuddhe SB, Yadava VK, Singh DK. Detection of IgM and IgG antibodies against Brucella by dot-ELISA in humans. J Commun Dis, 1994, 26:1-5.
- 4 Vigliocco AM, Silva - Paulo PS, Mestre J, et al. Development and Validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to Brucella Ovis. Vet Microbiol, 1997, 54:357-368.
- 5 鲁齐发, 王晓英, 郝宗宇, 等. 鉴别布氏菌与 O:9 型小肠结肠炎耶氏菌两种抗体的研究. 中国地方病防治杂志, 1995, 10:72-74.

(收稿 1998-12-15 修回: 1998-12-29)

大连市 353 名 7 月龄~15 岁健康儿童流行性腮腺炎流行率调查

李德钧 王 稳 刘 丹 王秀萍

为了解儿童对腮腺炎病毒的自然感染状况, 为推广使用腮腺炎疫苗提供科学依据, 现将大连市 353 名 7 月龄~15 岁健康儿童流行性腮腺炎流行率调查结果报告如下。

一、材料与方法: 1997 年 5~6 月采自市内 7 月龄~15 岁未接种过腮腺炎疫苗的健康儿童血清 353 份, 试剂采用美国 CLI 生产的腮腺炎 IgG ELISA 试剂盒, 严格按说明书操作。

二、结果: 将 353 名健康儿童, 按年龄分 7 月龄~3、~6、~12、~15 岁 4 组, 其腮腺炎 IgG 阳性率分别为 21.84% (19/87)、36.17% (34/94)、69.41% (59/85)、77.01% (67/87), 各年龄组阳性率差异有非常显著性 ($\chi^2=72.72, P<0.01$), 且有随年龄增长而明显升高的趋势。各年龄组总阳性率为 50.71%。

按性别计算, 男性阳性率为 56.48% (109/193), 女性阳性率为 43.75% (70/160), 男女总阳性率差异

有显著性 ($\chi^2=5.68, P<0.05$)。各年龄组按性别比较, 7 月龄~3 岁组男女阳性率分别为 31.71% (13/41)、13.04% (6/46), 男性高于女性, 有显著意义 ($\chi^2=4.42, P<0.05$), 而其他年龄组差异均无显著性。

三、讨论: 本文用 ELISA 方法调查了 7 月龄~15 岁儿童腮腺炎 IgG 抗体的阳性率, 即儿童时期腮腺炎的流行率, 这在国内很少见报道。由于选择了未接种腮腺炎疫苗的 7 月龄以上儿童, 所以排除了从母体被动获得 IgG 抗体的可能。在 7 月龄~15 岁人群中, 其腮腺炎抗体阳性率随年龄增加而升高, 这是腮腺炎病毒自然感染累加的结果, 符合腮腺炎 2~3 年流行一次的规律。本调查结果表明, 7 月龄~3 岁组自然感染率最低, 是腮腺炎病毒的易感年龄。因此, 可选择 1~3 岁为儿童接种腮腺炎疫苗的最佳年龄。本次结果还显示, 大连地区腮腺炎自然感染率在 7 月龄~3 岁时, 男性高于女性, 其原因有待于进一步探讨。