

· 短篇论著 ·

一种新的布鲁菌抗原试剂的制备及其性能评估

廖南山¹, 张莉², 刘强¹, 陈琼娣¹, 努尔夏提·地里夏提², 王 骥¹

1. 珠海朗泰生物科技有限公司, 广东珠海 519080; 2. 新疆乌苏市人民医院检验科, 新疆乌苏 833000

摘要:目的 研制微柱凝胶为载体(内含抗人球蛋白)的布鲁菌抗原试剂, 并对其性能评估。方法 将布鲁菌抗原加入虎红染色后, 用 pH=6.5 的磷酸盐缓冲液稀释, 配制成布鲁菌抗原试剂。将配制好的布鲁菌抗原试剂和待检血清混匀后加入到含有抗人球蛋白血清的微柱凝胶卡中, 离心后肉眼观察胶柱中抗原抗体的凝集反应(凝胶法)结果。用凝胶法与虎红平板凝集试验(RBT)对 570 份血清标本做对比试验。结果 RBT 检测阳性 38 份, 阳性率为 6.67%。凝胶法检测阳性 70 份, 阳性率为 12.28%, 凝胶法敏感性和临床诊断符合率均高于虎红平板凝集试验, 差异有统计学意义($\chi^2=10.47, P<0.01$)。凝胶法批内重复性变异系数(CV)为 2.73%, 批间重复性 CV 为 2.05%, 重复性良好, 配制的布鲁菌抗原稳定期约为 12 个月。结论 凝胶法可以同时检测布鲁菌 IgM、IgG 抗体及不完全抗体, 具有敏感度高、特异性好、操作快速简便, 有利于布鲁菌病流行病学调查及预防控制, 具有较好的推广价值和开发价值。

关键词:布鲁菌; 抗原; 性能评估; 抗人球蛋白凝胶卡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.13.029

中图法分类号:R446.5;R516.7

文章编号:1673-4130(2021)13-1654-03

文献标志码:A

布鲁菌病是布鲁菌侵入机体引起的人畜共患传染性疾。目前国内外血清学检测布鲁菌抗体应用较多的是虎红平板凝集试验(RBT)及试管凝集试验(SAT), 由于这两种方法主要检测 IgM、IgG 抗体, 不能检测不完全抗体, 故易导致漏检现象^[1-5]。本课题组研制了以微柱凝胶为载体(内含抗人球蛋白)的布鲁菌抗原试剂, 用于检测布鲁菌病患者血清抗体的凝胶试验(以下简称凝胶法)。凝胶法可同时检测 IgM、IgG 抗体及不完全抗体, 并具有快速准确、判读结果客观, 有效的提高检测的敏感性和特异性, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2019 年 5—7 月在新疆乌苏市人民医院体检的 570 例牧民的血清标本。

1.2 仪器与试剂 布鲁菌抗原试剂由布鲁菌 S2 株(CVCC70502)配制而成, 该菌株购自唐山怡安生物工程有限公司, 能与 1:1 000 稀释阳性血清(国家标准品)出现 2+ 试管凝集反应。布鲁菌阳性血清和阴性血清购自哈药集团生物疫苗有限公司。虎红(美国)购自上海伊卡生物技术有限公司。抗人球蛋白凝胶卡(简称凝胶卡)购自珠海朗泰生物科技有限公司。仪器包括 LB-3000 血型血清学多用离心机、电子天平、量筒、玻璃棒。

1.3 方法

1.3.1 布鲁菌抗原试剂的制备 将布鲁菌 S2 株(CVCC70502)加入虎红染色后, 用 pH 6.5 的磷酸盐缓冲液按 1:10 稀释配制成布鲁菌抗原试剂, 该试剂 pH 为 6.3~6.9。

1.3.2 检测方法 (1)取 100 μ L 生理盐水加到稀释板上的适当孔或微管中, 加 5 μ L 受检血清充分混合, 血清稀释度为 1/20。取 50 μ L 血清稀释液, 加入 50 μ L 布鲁菌抗原试剂并充分混匀, 此时血清稀释度为 1/40。(2)在凝胶卡上标记相应的受检血清标本序号, 取 50 μ L 上述混合物, 加入到凝胶卡的相应孔中。将凝胶卡置于离心机中, 3 000 r/min(800 \times g)离心 20 min, 取出并目测观察结果。凝集反应强度:4+ 表示红色抗原颗粒全部在胶柱表面, 3+ 表示大部分红色抗原颗粒在胶柱表面, 2+ 表示大部分红色抗原颗粒在胶柱中部, 1+ 表示大部分红色抗原颗粒在胶柱的中下部, - 表示红色抗原颗粒全部沉降到胶柱孔底。

1.3.3 结果的判定 当凝集反应为 3+ 或 4+ 时, 结果判定为阳性。初筛检测阳性的样品应采用倍比稀释测定效价, 每个患者血清至少稀释 4 个滴度, 效价在 1/160 或以上仍呈现为阳性时, 将被判定为布鲁菌抗体阳性^[1-2, 6-7]。1/40 和 1/80 阳性结果要排除某些肠道杆菌感染性疾病或者接种疫苗所引起的非特异性反应, 并结合临床体征、病史及其他实验室检查综合作出判定。

1.3.4 特异性试验 用凝胶法分别检测健康成年人血清(无布鲁菌病接触史及体检无异常), 霍乱弧菌阳性患者血清、沙门菌阳性患者血清、志贺菌阳性患者血清、布鲁菌阳性和阴性患者血清。

1.3.5 敏感性试验 将布鲁菌阳性血清和阴性血清, 按照 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1 280、1:2 560 稀释度稀释血清, 取 50 μ L 稀释血清与等量布鲁菌抗原试剂混匀, 血清最终稀释

度分别为 1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320、1 : 640、1 : 1 280、1 : 2 560、1 : 5 120。

1.3.6 批内重复性试验 用凝胶法检测布鲁菌阳性血清抗体效价 15 次,计算批内变异系数(CV)。

1.3.7 批间重复性试验 先后配制 3 批布鲁菌抗原试剂(A、B、C),用凝胶法检测布鲁菌阳性血清抗体效价,每一批次重复检测 3 次,连续检测 3 d,检测结果的批间 CV。

1.3.8 稳定性试验 配制的布鲁菌抗原试剂在冰箱 2~8 ℃ 储存第 1、3、6、9、12 个月,分别用于检测布鲁菌阳性血清抗体效价。

1.3.9 临床对比性试验 采用凝胶法与 RBT 对新疆乌鲁木齐市人民医院 570 例体检牧民的血清标本做平行对比试验。

1.4 统计学处理 采用 Graphpad Prism 5 软件进行

数据处理分析,RBT 法与凝胶法阳性人数和阴性人数采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 特异性试验 布鲁菌阳性血清 1 : 640 结果为阳性,其余血清结果 1 : 10 均为阴性。见表 1。

2.2 敏感性试验 用凝胶法检测,布鲁菌阳性血清最低检测限为 1 : 640。阴性血清结果均为阴性。见表 2。

2.3 批内重复性试验 用凝胶法检测布鲁菌阳性血清抗体效价 15 次,14 次结果为 1 : 640,1 次为 1 : 1 280,经计算其批内 CV 为 2.73%,重复性良好。

2.4 批间重复性试验 检测结果:A 批次平均效价为 1 : 700,B 批次平均效价为 1 : 640,C 批次平均效价为 1 : 640,其批间 CV 为 2.05%,批间重复性良好。见表 3。

表 1 特异性试验

血清类型	抗体效价							
	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1 280
健康人	—	—	—	—	—	—	—	—
沙门菌阳性	—	—	—	—	—	—	—	—
志贺菌阳性	—	—	—	—	—	—	—	—
霍乱弧菌阳性	—	—	—	—	—	—	—	—
布鲁菌阴性	—	—	—	—	—	—	—	—
布鲁菌阳性	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+

表 2 敏感性试验

血清类型	抗体效价							
	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1 280	1 : 2 560	1 : 5 120
布鲁菌阳性	4+	4+	4+	4+	3+	2+	+	—
布鲁菌阴性	—	—	—	—	—	—	—	—

表 3 批间重复性试验

批次	抗体效价									平均效价	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
A	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 1280	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 700
B	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640
C	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640	1 : 640

2.5 稳定性试验 配制的布鲁菌抗原在冰箱 2~8 ℃ 储存第 1、3、6、9、12 个月,布鲁菌阳性血清抗体效价结果都是 1 : 640 阳性。布鲁菌抗原稳定期约为 12 个月。

2.6 临床对比性试验 RBT 法检测阳性 38 例,阳性率为 6.67%,凝胶法检测阳性 70 例,阳性率为 12.28%。38 例 RBT 法检测阳性患者,凝胶法均为阳性,尚有 32 例 RBT 法检测为阴性,但凝胶法检测为阳性。凝胶法敏感性和临床诊断符合率均高于 RBT 法,差异有统计学意义($\chi^2 = 10.47, P < 0.01$)。

3 讨 论

布鲁菌病是一种人畜共患的传染性疾病,在布鲁菌病发病的过程中,血清中 IgM、IgG 和 IgA 抗体先后出现。1967 年 COGHLAN 等^[8] 通过蔗糖密度梯度分离的方法检测了一系列不同疾病周期内患者的血清,发现在布鲁菌病急性期,患者的血清中有 IgM 和 IgG 完全抗体,在慢性期,患者的血清中主要是 IgG 不完全抗体。1967 年 KERRT 等^[9] 确认在布鲁菌病慢性期内,血清中还含有 IgA 不完全抗体。IgM 抗体是完全抗体,很容易和抗原结合形成可见凝集

物。IgG、IgA 不完全抗体与抗原结合不能形成可见的凝集物,但是加入抗人球蛋白(AHG)后,通过 AHG 的“桥连”作用,可以形成可见的凝集块^[2,10]。

2019 年 1 月,国家卫生健康委员会发布的布鲁菌病诊断卫生行业标准规定:实验室初筛试验有 RBT、胶体金免疫层析试验(GICA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)。实验室确诊试验有 SAT、补体结合试验(CFT)、抗人球蛋白试验(Coomb's)。目前大多数实验室采用 RBT 初筛,SAT 确诊的模式^[2-3,11]。在慢性患者中,当 IgG 不完全抗体在人体内占优势时,在测试中不能直接看到抗原抗体凝集反应发生,易出现假阴性,造成漏检结果。

近 20 年来,微柱凝集(MCA)技术广泛用于血型、血清学检测,该技术原理是用符合血清学试验条件的稀释液配制的一定浓度的凝胶,灌注在微柱管中,凝胶颗粒间的空隙可起到分子筛作用。适当的离心条件和适当的孔径只允许单个红细胞通过,而凝集红细胞则不能通过,从而获得区分不同凝集结果的指标。传统的抗人球蛋白试验(IAT)是检测血清中不完全抗体最可靠的方法,但需要多次洗涤,操作繁琐、时间长。而微柱凝胶抗人球蛋白试验无需洗涤,有操作更简单、更规范,结果容易判定等优点^[10,12-13]。李凌波等^[12-13]及 NOVARETTI 等^[14]认为微柱凝胶法比传统的抗人球蛋白试验更灵敏。目前在临床实验室,微柱凝胶法已逐步取代了传统的 IAT。

根据分子筛原理,将 RBT 和抗人球蛋白试验有机组合的布鲁菌抗原凝胶法,可同时检测布鲁菌 IgM、IgG 抗体及 IgG、IgA 不完全抗体,解决了 SAT 和 RBT 不能检出不完全抗体的不足,同时又避免了抗人球蛋白试验多次洗涤和离心的繁琐。凝胶法具有快速准确、判读结果简单客观,以及有效的提高检测的敏感性和特异性的优点。

本研究中,对新疆乌苏市人民医院 570 例体检牧民的血清标本的平行对比试验显示,RBT 检测阳性 38 例,凝胶法检测阳性 70 例,38 例 RBT 法检测阳性病例,凝胶法均为阳性,尚有 32 例 RBT 法检测为阴性,但凝胶法检测为阳性。经临床调查,这部分阳性病例长期与羊群密切接触,曾有布鲁菌病史。有的病例尚有低热及乏力等症状,他们可能是布鲁菌慢性感染者或复发者,其布鲁菌不完全抗体在体内长期存在,从而被凝胶法检出阳性^[6,15]。

综上所述,本文报道的凝胶法可同时检测布鲁菌 IgM、IgG 抗体及 IgG、IgA 不完全抗体,具有敏感度高、特异性好、操作快速简便,并为布鲁菌病血清免疫学研究提供了新型的检测手段,尤其是有利于布鲁菌病流行病学调查及预防控制,具有较好的推广和应用

开发价值。

参考文献

- [1] KOROGLU M, AYDEMIR O A, DEMIRAY T, et al. Comparative evaluation of the Brucella Coombs gel test in laboratory diagnosis of human brucellosis[J]. *Biotechnol Biotech Eq*, 2016, 30(5):970-975.
- [2] EMEL K E, SELDA E M, MELTEM T, et al. Comparison of standard agglutination tests, enzyme immunoassay, and Coombs gel test used in laboratory diagnosis of human brucellosis[J]. *Turk J Med Sci*, 2018, 48:62-67.
- [3] 李树军. 布鲁氏杆菌病多种实验室检测方法比较[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(68):105.
- [4] 张国庆, 韩敏, 韩来红, 等. 三种布鲁氏菌血清学方法的评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(13):1842-1844.
- [5] 尉瑞平, 王美霞, 宋利桃, 等. 布鲁氏菌病 3 种检测方法的比较分析[J]. *医学动物防制*, 2019, 35(7):103-105.
- [6] HANCI H, IGAN H, UYANIK M H, et al. Evaluation of a new and rapid serologic test for detecting brucellosis: brucella coombs gel test[J]. *Pak J Biol Sci*, 2017, 20(2):108-112.
- [7] KUYUMCU Ç A, EROL S, ADALETI R, et al. Comparison of Coombs gel test with ELISA and standard tube agglutination tests used in serological diagnosis of brucellosis[J]. *Infect Dis Clin Microbiol*, 2020, 2(1):1-7.
- [8] COGHLAN J D, WEIR D M. Antibodies in human brucellosis[J]. *Brit Med J*, 1967, 2(5547):269-271.
- [9] KERR W R, PAYNE D J, ROBERTSON L, et al. Immunoglobulin class of Brucella antibodies in human sera[J]. *Immunology*, 1967, 13(2):223-225.
- [10] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015:127-139.
- [11] 朱珠, 陈安林, 彭丹, 等. 布鲁氏菌病的诊断及治疗方法研究进展[J]. *山东医药*, 2017, 57(7):104-107.
- [12] 李凌波, 王迪, 王冬倩, 等. 微柱凝胶法在直抗试验及交叉配血试验中的应用[J]. *中国煤炭医学杂志*, 2015, 18(6):936-939.
- [13] 李凌波, 王冬倩, 陈云生, 等. 国产微柱凝胶免疫检测试剂卡检测孕妇 IgG 血型抗体效价的实验研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2008, 24(12):1138-1141.
- [14] NOVARETTI M C, JENS E, PAGLIARINI T, et al. Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study[J]. *J Clin Lab Anal*, 2004, 18(5):255-258.
- [15] KALEM F, ERGÜN A G, DURMAZ S, et al. Comparison of a new and rapid method: brucella coombs gel test with other diagnostic tests[J]. *J Clin Lab Anal*, 2016, 30(5):756-759.