

# 一种改良的布鲁氏菌病抗体微量凝集检测方法的建立与评价

赵鸿雁<sup>1</sup>, 李积权<sup>2</sup>, 路殿英<sup>1</sup>, 朴东日<sup>1</sup>, 姜海<sup>1</sup>

**摘要:**目的 建立一种微量的布鲁氏菌病抗体凝集检测方法,用于布鲁氏菌病高通量检测。方法 依据我国《布鲁氏菌病诊断标准》(WS269-2007)规定的病人诊断标准,用试管凝集试验做诊断标准。通过优化微量凝集试验抗原浓度,对142份疑似病人血清同时做试管凝集和微量凝集试验,进行效果评价。结果 最优的微量凝集抗原浓度为1:10,建立微量凝集法具有较高的敏感度和特异度,分别为98.9%和92.3%;和常规试管凝集法相比,两种方法符合率为96.5%。常规试管凝集检测得到21份阴性样本,22份可疑样本(1:50),99份阳性样本(>1:100)。微量凝集检测得到30份阴性样本、17份可疑样本(1:50)、95份阳性样本(>1:100)。两种试验方法,结果相同的占70.4%(100/142),经统计学检验差异无统计学意义( $\chi^2=0.8, P>0.05$ )。结论 建立一种可显色的布鲁氏菌病抗体微量凝集检测方法,可以在96孔V型板上同时检测24份标本,且结果易判读,更适宜基层防疫人员现场检测,最终为疫情处置提供强有力的技术支持。

**关键词:**布鲁氏菌病;微量凝集试验;显色

中图分类号:R392.7

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2019)02-0149-04

## Establishment and evaluation of the modified microagglutination test for serologic diagnosis of human brucellosis

ZHAO Hong-yan<sup>1</sup>, LI Ji-quan<sup>2</sup>, LU Dian-ying<sup>1</sup>, PIAO Dong-ri<sup>1</sup>, JIANG Hai<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Brucellosis Prevention and Treatment Engineering Technology Research Center of Inner Mongolia Autonomous, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102200, China;  
2. Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xining 810000, China)

**Abstract:** Although the serum tube agglutination test (SAT) is the standardized gold method, it is laborious, time consuming, and requires a number of reagents. A modified microagglutination test (MAT) variant of the SAT is evaluated for serological diagnoses. Ninety SAT-positive sera and 52 SAT-negative sera were used in this study. Antibody titers of 1:100(++) were considered positive readings in both the SAT and MAT. *Brucella abortus* 104 antigens and *Brucella*-positive control anti-serum were used in the SAT and MAT. The titers of the MAT differed according to antigen concentration. The optimal concentration of *B. abortus* 104 antigen (1:10) was determined to compare the sensitivity and specificity between the MAT and SAT. The sensitivity and specificity of the MAT were 98.9% and 92.3% with reference to SAT. The MAT is less time consuming and requires less antigen and serum than the SAT. Results of the MAT showed good agreement with those of SAT by  $\chi^2$  test.

青海省高端创新人才千人计划;辽宁省社发攻关及产业化项目(No.2017225073)

通讯作者:姜海,Email:jianghai@icdc.cn;

ORCID:0000-0002-8886-4385

**作者单位:**1.中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,传染病预防控制国家重点实验室,感染性疾病协同诊治技术创新中心,内蒙古自治区布鲁氏菌病防治工程技术研究中心,北京 102200;

2.青海省地方病预防控制所,西宁 810000

The results of this study suggest that the MAT could be useful for diagnosis of brucellosis. For the simple and rapid diagnosis of brucellosis, the MAT is standardized using samples for the SAT to define positive and negative categories, and compare the sensitivity and specificity of the MAT and SAT.

**Keywords:** human brucellosis; microagglutination; chromogenic

and the Liaoning Social Development and Industrialization Project (No.2017225073)

Corresponding author: Jiang Hai, Email: jianghai@icdc.cn

布鲁氏菌病(Brucellosis)由布鲁菌(*Brucella*)侵入机体引起的一种以发热为特征的人兽共患慢性传染病变态反应性疾病。该病在世界范围内广泛流行,每年新发病例超过50万例<sup>[1]</sup>,在我国近20年持续高发,是对人类健康和畜牧业发展危害最严重的一种传染病<sup>[2]</sup>。布鲁氏菌病的诊断技术包括血清学检测技术和病原学检测技术。细菌学检测虽是诊断布鲁菌病的金标准,但存在培养周期长、检出率低、实验室生物安全等问题。血清学检测布鲁氏菌抗体技术使用广泛、生物风险小、操作简便,是现阶段最常用的技术。目前我国实行的WS269-2007《布鲁氏菌病诊断标准》中适用的血清学检测技术有虎红平板凝集试验(RBPT)、标准试管凝集试验(SAT)、补体结合试验(CFT)等。但血清学检测技术的敏感性和特异性,不同的研究方法有不同的结果<sup>[3-4]</sup>。SAT虽然是确诊布病的标准检测方法,但需要大量的试管凝集抗原和患者血清,尤其在流行病学调查中,对大量标本进行检测时费时费力。微量凝集试验是对试管凝集试验的改良,具有微量、简便、稳定性和特异性好的特点。本研究建立一种可显色的布鲁氏菌病抗体微量凝集检测方法(Microagglutination Test, MAT),可在96孔V型板上同时检测24份标本,且结果易判读,更适宜基层防疫人员现场检测,最终为疫情处置提供强有力的技术支持。

## 1 材料与方法

**1.1 确诊病例定义** 根据我国《布鲁氏菌病诊断标准》(WS269-2007):流行病学接触史、临床症状和RBPT法阳性以及SAT滴度为1:100(十+)及以上,满足以上3项条件者确诊为布病病人。

**1.2 主要试剂** 布鲁氏菌病RBPT抗原和SAT抗原由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供。

**1.3 显色微量凝集抗原制备** 取常规试管法抗原用虎红染料染色,然后用生理盐水分别稀释成1:5、1:10、1:20备用。

**1.4 标准阳性血清效价测定** 采用SAT按我国《布鲁氏菌病诊断标准》(WS269-2007)方法操作,用标准阴性血清对照进行标准阳性血清标定,其结果应为1:400。

**1.5 显色微量凝集抗原最佳浓度的优化** 用33份布病病人阳性血清、1份标准阳性血清和1份阴性

血清按照常规SAT法,每份血清样品分别加入1:5、1:10和1:20抗原,混匀,加盖,放入湿盒,置37℃温箱,20 h取出,室温静置1 h观察结果。

**1.6 结果判读标准** 常规SAT参照国标WS269-2007方法,以凝集程度为“十”为最终效价;微量SAT以V型管底不出现非常明显红点或极小红点为阳性。

**1.7 统计方法** 试验结果使用Excel进行录入,对全部结果应用SPSS 20.0统计软件进行分析。两种方法比较差异应用卡方检验, $P > 0.05$ 表示两种方法差异无统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 微量凝集试验** 显色结果第1~8孔血清浓度分别为1:50,1:100,1:200,1:400,1:800,1:1 600,1:3 200和……1:6 400,MAT以V型管底不出现非常明显红点或极小红点为阳性,部分结果见下图1。20和64为阴性结果;29、4、12、88、89和66为阳性结果(图中用“+”表示),效价分别为1:800、1:400、1:400、1:200、1:800和1:100。

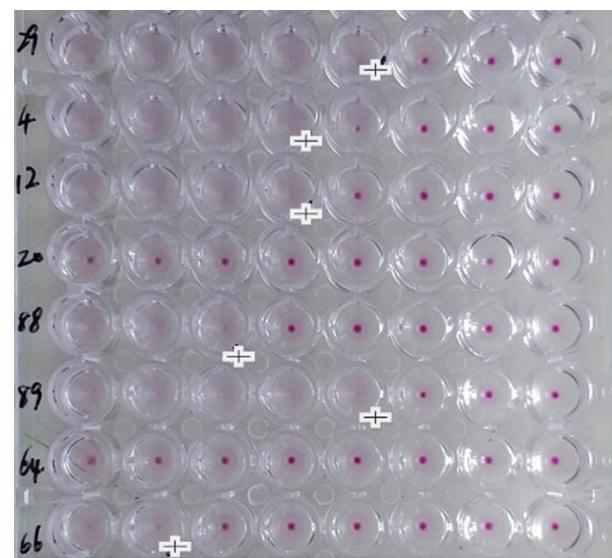


图1 微量凝集试验显色结果

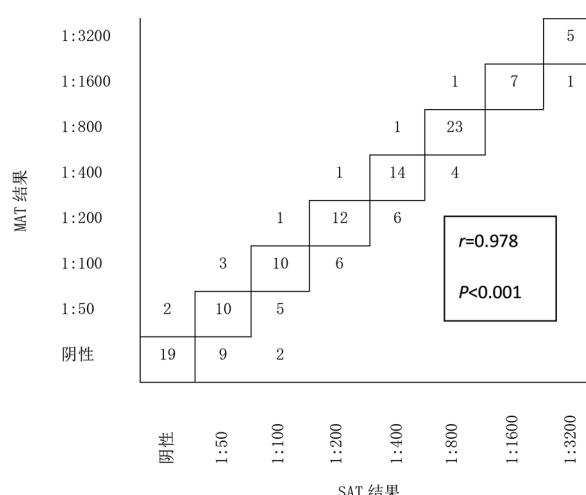
Fig.1 Results of MAT (the part of samples) “+” means antibody positive titers

**2.2 抗原优化结果** 用33份阳性血清和3份阴性血清进行测试,当微量凝集抗原浓度为1:10时,与SAT结果最吻合,见表1。

表 1 MAT 试验抗原优化结果  
Tab.1 Optimization of MAT antigen

SAT 结果 (数目)	不同浓度 微量抗原	MAT 不同浓度与常规 SAT 符合度				
		低 2 个滴度	低 1 个滴度	相同	高 1 个滴度	高 2 个滴度
阴性(3)	1 : 5	—	—	3	—	—
	1 : 10	—	—	3	—	—
	1 : 20	—	—	3	—	—
阳性(33)	1 : 5	12	21	—	—	—
	1 : 10	—	7	26	—	—
	1 : 20	—	—	7	24	2

2.3 SAT 和 MAT 结果一致性比较结果 对 142 个血清样本同时做 SAT 和 MAT, 结果 SAT 检测得到 21 份阴性样本, 22 份可疑样本(1 : 50), 99 份阳性样本( $>1 : 100$ )。MAT 检测得到 30 份阴性样本、17 份可疑样本(1 : 50)、95 份阳性样本( $>1 : 100$ )。如图 2 所示, 图中数字对应横纵坐标即为试验结果(例如 MAT 结果与 SAT 结果均为 1 : 200 阳性的样品个数为 12)这两种试验方法结果相同的占 70.4%(100/142), 位于对角线方格内, 结果相差 1 个滴度的占 28.6%(40/142), 相差 2 个滴度的占 1.4%(1/142)。两种试验方法相关系数为 0.978。



无统计学意义,不符合的检验结果可能与操作误差及肉眼判读有关,还需大样本量的验证。此外,笔者还验证了不同血清量对结果的影响,10 μL 血清可以保证结果准确可靠,节省了样本量。ELISA 也可以对大样本量检测<sup>[6, 9-11]</sup>,笔者实验室目前也在对 ELISA、SAT 和 MAT 进行评价。

试验结果真实性的评价指标为灵敏度和特异度,灵敏度越高反映该试验发现病人的能力越强;特异度越高反映该试验确定非病人的能力越强。可靠性评价指标是符合率和 *Kappa* 值,这两个指标可以反映试验判定的结果与标准诊断结果的一致性<sup>[12]</sup>。ROC 曲线是评价检验试验的一种全面、准确、有效的方法,曲线下面积反映了诊断试验价值的大小,面积越大,越接近 1.0,诊断的真实度越高。由表 2 可以看出,本实验具有较高的灵敏度特异度符合率(接近 100%),*Kappa* 值与 ROC 曲线下面积接近 1,真实性可靠性较好。目前部分国外学者对该方法的研究结果与本实验室的研究结果相同,说明 MAT 可以替代现有的 SAT。与 SAT 相比,MAT 的优点在于:1)省时省力:在进行大量标本检测时,国家规定的试管凝集法显得费时费力,操作时需要反复刷洗试管和吸管,占用大量的试管架和温箱空间,且判定结果时需要一一对比,操作起来很不方便;2)准确性高:微量凝集试验使用精密的微量移液器,避免了使用吸管所产生的误差,使用一次性 96 孔 V 型板和吸头,避免了由于试管和吸管洗刷不干净产生的影响;3)成本低,结果易于判读:由于使用的抗原(50 μL)和待检血清(10 μL)都是微量,节省了标本和试剂,由于采用显色的抗原,结果判读一目了然;4)易于推广:微量凝集法检测所需的待检血清样品的量是试管法的 1/10,因此采血量明显减少,工作量也会减少;一次可以同时检测 24 份标本,十分有利于兽医和人医在生产实践中的推广。

综上所述,本研究建立了较为准确、可靠的布鲁氏菌病微量凝集检测方法,发展了布病的快速检测技术,但因样本量较少,仍需后续研究重复验证,以期尽快应用于布病现场的快速检测。

**利益冲突:**无

**引用本文格式:**赵鸿雁,李积权,路殿英,等.一

种改良的布鲁氏菌病抗体微量凝集检测方法的建立与评价[J].中国人兽共患病学报,2019,35(2):149-152. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.236

## 参考文献:

- [1] 尚德秋.布氏菌病研究进展[J].中国地方病防治杂志,2004,19(04):204-212.
- [2] 尚德秋.布鲁氏菌病再度肆虐及其原因[J].中国地方病防治杂志,2001,16(01):29-34.
- [3] 栾旭波.布鲁氏菌病血清学诊断方法及评价[J].中国畜牧兽医文摘,2017,(8):63.
- [4] 王淑云,刘熹,荣蓉,等.五种布鲁菌血清学检测方法对比分析[J].中华预防医学杂志,2016,(2):175-178.
- [5] Park, SH, Lee YH, Chu H et al. Application of the microagglutination test for serologic diagnosis of human brucellosis[J]. Osong Public Health Res Perspect, 2012, 3(1):19-23. DOI: 10.1016/j.phrp.2012.01.003
- [6] Gomez, MC, Nieto JA, Rosa C et al. Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic[J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(6):1031-1033. DOI: 10.1128/CVI.00424-07
- [7] Galinska EM, Zagorski J. Brucellosis in humans—etiology, diagnostics, clinical forms[J]. Ann Agric Environ Med, 2013, 20(2):233-238.
- [8] Konrad JL, Campero LM, Caspe GS, et al. Detection of antibodies against *Brucella abortus*, *Leptospira* spp. and *Apicomplexa* protozoa in water buffaloes in the Northeast of Argentina [J]. Trop Anim Health Prod, 2013, 45(8):1751-1756. DOI: 10.1007/s11250-013-0427-y
- [9] Baum, M, Zamir O, Bergman-Rios R et al. Comparative evaluation of microagglutination test and serum agglutination test as supplementary diagnostic methods for brucellosis[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(8):2166-2170.
- [10] Sayan M, Erdenlig S, Stack J, et al. A serological diagnostic survey for *Brucellacanis* infection in Turkish patients with Brucellosis-like symptoms[J]. Jpn J Infect Dis, 2011, 64(6):516-519.
- [11] de Oliveira, MZ, Vale V, Keid L, et al. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*[J]. Res Vet Sci, 2011, 90(3):425-431. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.07.004
- [12] 夏邦世,吴金华.*Kappa*一致性检验在检验医学研究中的应用[J].中华检验医学杂志,2006,29(1):83-84.