

布鲁氏菌抗体检测试纸条的研制和初步比较

齐安生¹, 邵钰², 宫枫举², 张兴进², 张如民², 朱绍辉², 孙学强^{2,3}

(1. 黑龙江省动物卫生监督所, 黑龙江哈尔滨 150069;

2. 青岛立见诊断技术发展中心, 山东青岛 266114;

3. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

摘要: 本试验利用胶体金免疫层析技术原理, 研制了布鲁氏菌抗体检测试纸条, 并以布鲁氏菌阳性血清国家标准品进行了敏感性试验, 确定了最低检出量, 同时与有可能存在交叉反应的血清和阴性血清进行了特异性试验; 然后将保存不同时间的试纸条在进行了敏感性和特异性试验, 证明其稳定期可以达到 15 个月。选择临床牛羊血清 30 份, 利用该试纸条与布鲁氏菌病虎红平板试验抗原进行同步检测, 发现两种试剂的检测符合率为 98%。试验证明, 所研制的布鲁氏菌抗体检测试纸条敏感性高、特异性强、稳定期长。

关键词: 布鲁氏菌; 脂多糖; 胶体金; 免疫层析; 金黄色葡萄球菌 A 蛋白

中图分类号: S852.65+9.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-944X (2018) 10-0078-05

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.10.021

Development and Preliminary Comparison of *Brucella* Antibody Test Strips

Qi Ansheng¹, Shao Yu², Gong Fengju², Zhang Xingjin³, Zhang Rumin², Zhu Shaohui², Sun Xueqiang^{2,3}

(1. Heilongjiang Animal Health Supervision Institution, Harbin, Heilongjiang 150069, China;

2. Qingdao Regen Diagnostics Development Center, Qingdao, Shandong 266114, China;

3. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: In this study, a kind of *Brucella* antibody detection strip was developed by the principle of colloidal gold immunochromatography. Using the national standard positive serum of *Brucella*, the sensitivity tests were carried out, and the lowest detection limit was determined. Meanwhile, specificity tests were also carried out using the negative samples and serum suspected of having cross reaction. Then the sensitivity and specificity of the strips at different retention time were detected, and the results showed the stable period could last for 15 months. At last, thirty clinical serum samples of cattle and sheep were selected to conduct *Brucella* antibody detection by this test strip and the rose-bengal plate agglutination assay simultaneously, and the compliance rate of the two reagents was 98%. As a result, the developed test strip was sensitive, specific and had long-term stability.

Key words: *Brucella*; lipopolysaccharide; colloidal gold; immunochromatographic; *Staphylococcus aureus* A protein

布鲁氏菌病 (Brucellosis) 是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 侵入机体, 引起传染变态反应性的人兽共患细菌性传染病^[1]。本病发现至今已有 130 多年历史, 不仅没有被消灭, 近年来还有逐年上升的趋势。该病分布广泛, 在全世界范围内流行。布鲁氏菌病是世界动物卫生组织 (OIE) 须通报动物疫

病, 为我国二类动物疫病^[2]。布鲁氏菌能感染人、多种家畜和野生动物, 引起发热、流产、睾丸炎、关节炎及神经损伤等临床症状, 严重危害人类健康与畜牧业发展, 并且威胁公共卫生与食品安全, 在国际贸易检疫中为必检传染病之一^[3]。

布鲁氏菌为革兰氏阴性菌, 是一种胞内寄生的球形或短杆状菌, 无鞭毛和荚膜, 不形成芽孢。布鲁氏菌是专性需氧菌, 最适生长温度为 37 °C,

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC120050)

通信作者: 孙学强

最适 pH 6.6~7.4^[4]。布鲁氏菌分为光滑型(Smooth, S)和粗糙型(Rough, R)菌落,也有 S-R 中间型菌落。S 型细菌中细胞壁含有 O 链的 LPS,而 R 型 LPS 中 O 链缺失^[5]。根据宿主特异性,布鲁氏菌属分为 6 个种,分别是流产布鲁氏菌(牛种)、马尔他布鲁氏菌(羊种)、猪布鲁氏菌、绵羊布鲁氏菌、犬布鲁氏菌和沙林鼠布鲁氏菌。最近又发现了 6 个新的布鲁氏菌种,分别是鲸型布鲁氏菌(*B. ceti*)、鳍型布鲁氏菌(*B. pinnipedialis*)^[6]、田鼠种布鲁氏菌(*B. microti*)^[7]、歧见玛瑙宝螺种布鲁氏菌(*B. inopinata*, 又名意外布鲁氏菌,指意外在人类身上发现)^[8]、狒狒种布鲁氏菌(*B. papionis*)^[9]、赤狐种布鲁氏菌(*B. vulpis*)^[10]。布鲁氏菌抗原结构复杂,分属内抗原和属外抗原^[4]。属内抗原包括 A、M 和 R 等表面抗原。S 型布鲁氏菌的抗原决定簇主要位于 LPS 的多糖链部分,为 A 和 M 两种表面抗原。LPS 是刺激机体产生抗体的主要有效成分,O 链在血清学诊断中起重要作用^[5]。R 型布鲁氏菌共同具有 R 抗原。S 型布鲁氏菌表面抗原与小肠结肠炎耶尔森菌 O9、霍乱弧菌和大肠杆菌 O157 间有共同抗原成分^[4]。

21 世纪以来,随着畜牧业发展,布鲁氏菌病在世界范围内呈现出快速回升趋势。布鲁氏菌病疫情在全球分布广泛,约有 1/5 的人口受到该病威胁,每年新发病例约 50 万^[11]。据有关数字统计,我国在 1996—2017 年,人的布鲁氏菌病感染率从 0.09/100 000 上升到 2.79/100 000,是原来的 31 倍。人感染率的增加预示着动物疫情的加重^[12]。我国近年来的布病呈现老疫区死灰复燃,新疫区范围持续扩大,疫情小规模、多点散发的特点^[11]。我国《兽医公报》的数据显示,2011 年我国家畜布鲁氏菌病发病 125 030 例,2012 年发病 28 958 次,2015 年 23 个省份发病^[13]。因此,研制快速便捷的抗体检测试纸条,加强动物布鲁氏菌病抗体水平监测特别必要。

1 材料与方法

1.1 试验材料

布鲁氏菌脂多糖(LPS):本实验室提取;布鲁氏菌,牛羊阳性血清、阴性血清,大肠杆菌

O157、小肠结肠耶尔森菌、沙门氏菌、牛结核病阳性血清:中国动物卫生与流行病学中心提供。布鲁氏菌病虎红平板凝集试验阳性血清国家标准品、布鲁氏菌病虎红平板凝集试验抗原:购自中国兽药监察所;硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜、PVC 胶板:购自上海金标生物;SPA、氯金酸均为西格玛产品。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 布鲁氏菌 LPS 的提取及纯化 采用热酚法提取,具体方法见参考文献[14]。

1.2.2 胶体金探针的制备 采用柠檬酸三钠还原法,制备胶体金溶液。胶体金标记的蛋白为金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)。具体方法见参考文献[15]。

1.2.3 SPA 多克隆抗体的制备与纯化 质控线抗原采用 SPA 免疫的兔血清。将 SPA 免疫健康兔,免疫 3 次后,采血,析出血清。血清的纯化采用辛酸-硫酸铵沉淀法。具体方法见参考文献[14]。

1.2.4 试纸条的制备

1.2.4.1 质控线(C线)与检测线(T线)的划线条件优化 对 NC 膜上的 C 线和 T 线分别设置几个浓度梯度,进行划膜浓度摸索,确定划膜浓度后,对包被条件从缓冲液、划膜速度和划膜宽度进行优化。

1.2.4.2 质控线(C线)与检测线(T线)的划线方法 首先,将 2.5 cm 宽的 NC 膜贴在 PVC 膜的中间对应位置。将纯化好的 SPA 多克隆抗体按照摸索好的稀释浓度稀释后,装入金标划膜仪的喷头 1,将提取的 LPS,按照摸索好的稀释浓度稀释后,装入金标划膜仪的喷头 2;C 线与 T 线之间的距离设置为 4 mm,将贴在 PVC 板上的 NC 膜,固定在划膜仪的合适位置,按开始键,进行划线。将包被好抗原的 PVC 板放于 37 °C 温室中干燥 2 h 后,放密封袋中保存。

1.2.4.3 试纸条的组装与斩切 在相对湿度控制在 30% 的温室中,进行试纸条组装。取出包被有抗原的 PVC 板,取 3.3 cm 宽的吸水纸压 NC 膜上端 2 mm,小心抹平,黏紧。0.6 cm 宽的金标垫上端压 NC 膜上端 1 mm,1.9 cm 宽的样品垫上端

压金标垫下方一半，每贴一种都要抹平黏紧。最后，在吸水纸上贴上绿色胶条，在金标垫上贴蓝色MAX胶条，包装完成。用高速斩切机切成3 mm宽的试纸条，加入干燥剂，放入铝箔袋密封保存。

1.2.4.4 试纸条的结果判定 将试纸条放入稀释好的血清样品中，样品用量不可超过MAX线，室温下作用5~10 min，观察结果。质控线和检测线均显色，则为布鲁氏菌抗体阳性；如果只有质控线显色，则为阴性；质控线不显色，该试纸条无效。

1.2.5 试纸条的鉴定

1.2.5.1 试纸条的敏感性检测 布鲁氏菌病虎红平板凝集试验阳性血清国家标准品（4 000 IU/mL）用生理盐水做倍比稀释后用试纸条进行检测，出现阳性信号的血清最高稀释度作为试纸条的敏感性。

1.2.5.2 试纸条的特异性检测 同一批次试纸条分别检测牛羊布鲁氏菌病阳性血清和阴性血清各2份，大肠杆菌O157、小肠结肠耶尔森菌、沙门氏菌、牛结核病阳性血清各1份，观察其特异性。

1.2.5.3 试纸条的重复性检测 取同一批次及不同批次制作的试纸条分别检测同样的布鲁氏菌病阴阳性血清，根据试验结果评价试纸条的批内和批间重复性。

1.2.5.4 试纸条的稳定性检测 取密封后置于室温环境下保存3、6、9、12、15个月的试纸条进行检测，根据试验结果评价试纸条的稳定性。

1.2.6 试纸条与虎红平板试验比对 待检血清样品60份、阳性血清30份，包括15份牛血清和15份羊血清，阴性血清30份，包括15份牛血清和15份羊血清，分别采用该两种方法，对60份样品进行检测，根据结果评价二者符合率。

2 结果

2.1 胶体金表征分析

采用柠檬酸三钠还原氯金酸方法制备的胶体金溶液，在其他反应条件不变的情况下，浓度为0.01%氯金酸溶液中加入的柠檬酸钠量与形成的胶体金颗粒大小呈反比，当在100 mL体系内快速加入1.5 mL 1%柠檬酸三钠时，制备的胶体金颗粒大小约为25 nm。制备的胶体金在自然光照下呈酒红

色，清澈透亮。制备的胶体金颗粒呈球形，分散性较好，颗粒大小均一（图1）。

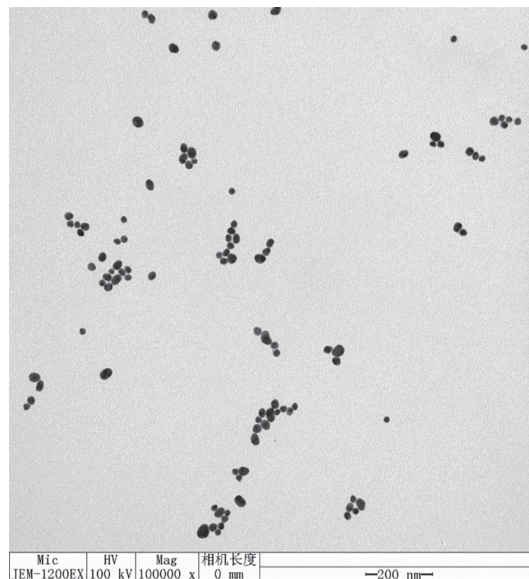


图1 胶体金颗粒电镜图片

2.2 试纸条的制备

2.2.1 C线和T线条件优化 对NC膜上的C线和T线分别设置几个浓度梯度，进行划膜浓度的摸索，确定划膜浓度后，对包被条件从缓冲液、划膜速度和划膜宽度进行优化。具体结果见表1。

名称	缓冲液	包被浓度 / (mg/mL)	划膜速度 / (ms/cm)	划膜宽度 / (μL/cm)
C线	磷酸盐	1.5	100	1
T线	磷酸盐	0.5	100	1

2.2.2 试纸条的组装 按照1.2.4.3的方法将试纸条组装，使用时按照1.2.4.4方法判定。

2.3 试纸条的鉴定

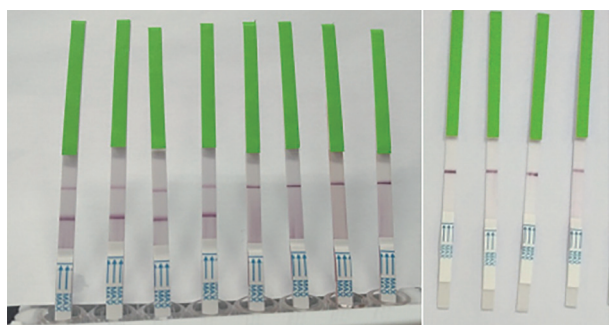
2.3.1 敏感性检测 布鲁氏菌病虎红平板凝集试验阳性血清国家标准品（4 000 IU/mL）用新生牛血清进行倍比稀释后用试纸条进行检测，结果显示最低检出量为0.5 IU/mL（图2）。

2.3.2 特异性检测 用胶体金试纸条检测牛羊布鲁氏菌病阳性血清和阴性血清各2份，大肠杆菌O157、小肠结肠耶尔森菌、沙门氏菌、牛结核病阳性血清各1份。结果显示，阳性血清均为阳性，阴性血清均为阴性，其他交叉菌均为阴性（图3）。



从左到右依次为 2、1、0.5、0.2、0.125 IU/mL

图2 试纸条敏感性检测结果



从左到右, 第1~2条为牛布鲁氏菌阳性血清, 第3~4条为羊布鲁氏菌阳性血清, 第5~6条为牛布鲁氏菌阴性血清, 第7~8条为羊布鲁氏菌阴性血清, 第9条为大肠杆菌 O157 阳性血清, 第10条为小肠结肠耶尔森菌阳性血清, 第11条为沙门氏菌阳性血清, 第12条为牛结核病阳性血清

图3 试纸条特异性检测结果

2.3.3 重复性检测 用同一批试纸条检测 10 份阴性血清和 10 份阳性血清, 试验重复 3 次, 结果一致。用 3 个不同批次试纸条分别检测 10 份阴性血清和 10 份阳性血清, 结果一致。

2.3.4 稳定性检测 于室温环境下保存一批试纸条, 分别于 3、6、9、12、15 个月, 用同一批血清样品进行检测, 发现保存 15 个月的试纸条显色强度稍有减弱, 仍能进行结果判定。

2.3.5 试纸条与虎红平板试验比对 待检血清样品共 60 份, 阳性血清 30 份, 包括 15 份牛血清和 15 份羊血清; 阴性血清 30 份, 包括 15 份牛血清和 15 份羊血清。分别采用上述两种方法对 60 份样

品进行检测, 结果发现与虎红平板凝集试验阳性符合率为 100%, 阴性符合率为 96.67%, 总符合率为 98.33% (表 2)。

表2 试纸条与虎红平板凝集试验比对结果

试纸条		虎红平板凝集		合计
		阳性	阴性	
试纸条	阳性	30	1	31
	阴性	0	29	29
	合计	30	30	60

3 讨论

布鲁氏菌能引起人、家畜和多种野生动物患病, 给畜牧业造成重大的经济损失^[16], 对人的健康造成重大的威胁, 导致严重的公共卫生问题。

通过对血清抗体的监测发现, 最早出现的抗体为 IgM, 随后是 IgG, 再后是 IgA, 持续 1 年左右开始下降; 当病情反复发作时, IgG 又可以迅速回升^[1]。

我国动物布鲁氏菌病诊断技术标准 (GB/T 18646-2002) 介绍了 4 种布鲁氏菌血清学检测方法, 分别是虎红平板凝集试验、乳牛全乳环状试验、试管凝集试验和补体结合试验。其中, 前两种方法适用于家畜布鲁氏菌病田间筛选试验和乳牛场布鲁氏菌病监测及诊断的初筛试验, 后两种方法为我国动物布鲁氏菌病的确诊方法^[17]。2018 年国家动物疫病监测与流行病学调查计划中也提议, 布鲁氏菌病虎红平板凝集试验、OIE 推荐的间接 ELISA 和荧光偏振试验常被用于布鲁氏菌病的初筛, 试管凝集试验或补体结合试验或 OIE 推荐的竞争 ELISA 为布鲁氏菌病的确诊方法^[18]。而在上述所提到的用于初筛的方法中, 虎红平板凝集试验由于操作简单、成本低廉, 被广泛使用。但该方法结果判定主观性强, 主观差异性较大。乳牛全乳环状试验只适用于奶牛, 且操作方法复杂; 荧光偏振方法需要特定的仪器设备, 且价格昂贵, 难以在基层中推广使用。布鲁氏菌病的临床诊断更倾向于一种简便、快速、不需要特殊仪器设备, 适用于临床高通量检测的诊断方法。胶体金试纸条凭借其操作方便和判定迅速的优势, 在动物疫病检测中已得到较广泛的应用^[19]。目前国内取得新兽药证书的布鲁氏菌抗体

检测试纸条有 2017 年中国兽药药品监察所联合 3 家生物制品公司申报的布鲁氏菌抗体检测试纸条，为一类新兽药（农业部公告号 2526）。该产品申报名称虽然为试纸条，但是以检测卡的形式，采用了竞争抑制免疫层析的原理，特异性较高，但灵敏度稍差，漏检概率较大。

本研究采用的是布鲁氏菌抗体检测试纸条，利用了间接法免疫层析原理，对国家阳性血清标准品的最低检出量能达到 0.5 IU/mL，和文中有可能存在交叉的血清均没有交叉现象，灵敏度和特异性均较高，和虎红平板凝集试验的符合率高达 98%，并且以试纸条形式，可以直接插入稀释好的待检样品中，根据判定结果被时间直接读取结果，简单方便快捷。但是，不可否认的是，相比虎红平板凝集试验，价格成本相对较高；其次，由于在研制过程中，没有加入滤血垫，因此不能进行全血检测。

4 结论

本研究进行了试纸条的敏感性和特异性试验，并与虎红平板凝集试验进行了比对试验，结果标明该试纸条敏感性高、特异性好，且与虎红平板凝集试验具有很高的符合率，可替代虎红平板凝集试验抗原用于布鲁氏菌病初筛。下一步有待于扩大样本数，进行进一步考核，同时还有待于临床试验和实践检验。

参考文献：

- [1] 高平. 白银市白银区奶牛布鲁氏菌病的流行病学调查与防治技术研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
- [2] 王传清, 李星. 布鲁氏菌病的流行和研究现状及防控策略 [J]. 中国动物检疫, 2009, 26 (6): 63-65.
- [3] 任璐, 周晓翠, 范伟兴, 等. 牛布鲁氏菌四种血清学检测方法的比较 [J]. 中国动物检疫, 2016, 33 (3): 74-76.
- [4] 陆承平. 兽医微生物学: 兽医专业用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [5] 丁家波, 毛开荣, 程君生, 等. 布氏杆菌病疫苗的应用和研究现状 [J]. 微生物学报, 2006, 46 (5): 856-859.
- [6] FOSTER G, OSTERMAN B S, GODFROID J, et al. *Brucella microti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts.[J]. international journal of systematic and evolutionary microbiology, 2007, 57 (11): 2688-2693.
- [7] SCHOLZ H C, HUBALEK Z, SEDLÁČEK I, et al. *Brucella microti* sp. nov. isolated from the common vole *Microtus arvalis*. [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2008, 58 (2): 375-382.
- [8] SCHOLZ H C, NÖCKLER K, GÖLLNER C, et al. *Brucella inopinata* sp. nov. isolated from a breast implant infection [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2010, 60 (4): 801.
- [9] WHATMORE A M, DAVISON N, CLOECKAERT A, et al. *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp) [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2014, 64 (12): 4120.
- [10] SCHOLZ H C, REVILLA-FERNÁN S, ALD S, et al. *Brucella vulpis* sp. nov. isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*) [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2016, 66 (5): 2090-2098.
- [11] 王传清, 李星. 布鲁氏菌病的流行和研究现状及防控策略 [J]. 中国动物检疫, 2009, 26 (6): 63-65.
- [12] 2017 年全国法定传染病疫情概况 [EB/OL]. (2018-02-26) [2018-08-21]. <http://www.moh.gov.cn/jkj/s3578/201802/de926bdb046749abb7b0a8e23d929104.shtml>.
- [13] 赵贵民, 王洪梅, 何洪彬. 我国家畜布鲁氏菌病流行现状与诊断技术研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2016, 52 (16): 33-39.
- [14] 唐景峰. 布鲁氏菌种特异性抗原抗体免疫胶体金试纸条的研制及初步应用 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [15] 程婷婷. 布鲁氏菌病与莱姆病胶体金免疫层析试纸条的研制 [D]. 石河子: 石河子大学, 2014.
- [16] 王兴龙, 李晓艳, 唐景峰, 等. 动物布鲁氏菌抗体胶体金试纸膜检测试剂盒 [J]. 化学分析计量, 2007 (6): 56-56.
- [17] 农业部. 动物布鲁氏菌病诊断技术: GB/T 18646-2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [18] 农业部兽医局. 2018 年国家动物疫病监测与流行病学调查计划: 农医发 [2018] 17 号 [A]. 北京: 农业部, 2018.
- [19] 邱荣超, 韩占兵, 刘永祥, 等. 猪伪狂犬病 g B 抗体快速检测试纸条的研制和评价 [J]. 中国兽医学报, 2017, 37 (8): 1463-1467.

(责任编辑: 朱迪国)