

五种布鲁菌血清学检测方法对比分析

王淑云 刘熹 荣蓉 赵鸿雁 赵赤鸿 朴东日 赵娜 姜海 田国忠 王桂琴
崔步云

【摘要】 目的 分析 5 种检测人的布鲁菌病的血清学方法的特异性和敏感性。**方法** 于 2013 年 1—12 月,在内蒙古自治区的 4 个自治旗(察右后旗、科右中旗、林西县和四子王旗)进行调查。调查对象纳入标准:以养殖牛羊和屠宰为职业,伴有发热、乏力、关节痛等布鲁菌病疑似症状,年龄为 25~55 岁。对疑似患者清晨空腹采集静脉血 3~5 ml,共采集 236 份样品。分别采用平板凝集试验(PAT)、虎红平板凝集试验(RBPT)、标准试管凝集试验(SAT)、ELISA 和免疫胶体金法(GICA)等 5 种血清学检测方法进行布鲁菌抗体测定,以 SAT 为“金标准”,分析 RBPT、PAT、ELISA 和 GICA 法的敏感性和特异性。**结果** SAT 法阳性患者 136 例(57.6%),PAT 法阳性患者 150 例(63.6%),RBPT 法阳性患者 159 例(67.4%),ELISA 法阳性患者 143 例(60.6%),GICA 法阳性患者 147 例(62.3%),不同检测方法检测布鲁菌抗体阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.52, P=0.264$)。以 SAT 法为“金标准”,PAT、RBPT、ELISA 和 GICA 法的灵敏度分别为 97.7%(133/136)、98.5%(134/136)、94.8%(129/136)和 94.1%(128/136),特异度分别为 70.0%(70/100)、75.0%(75/100)、86.0%(86/100)和 81.0%(81/100),符合率分别为 86.0%(203/236)、88.5%(209/236)、91.1%(215/236)和 88.5%(209/236)。**结论** ELISA 与 GICA 法在诊断人布鲁菌病中特异性和敏感性都较高,并且两种方法均快速;现场检测可以采用 GICA 法,大样本检测适宜用 ELISA 法。

【关键词】 ELISA; 布鲁杆菌属; 敏感性与特异性

基金项目:国家卫生计生委公益性科研专项(201302006)

Comparative analysis five kinds of serological detection methods about *Brucella* Wang Shuyun*, Liu Xi, Rong Rong, Zhao Hongyan, Zhao Chihong, Pu Dongri, Zhao Na, Jiang Hai, Tian Guozhong, Wang Guiqin, Cui Buyun. Department of Microorganism and Immunity, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Wang Guiqin, Email: guiqinwang@sohu.com

【Abstract】 Objective To evaluation the specificity and sensitivity of 5 kinds of serological detection methods about brucellosis. **Methods** To investigate in the 4 autonomous banner (Cha You Hou Qi, Right-Wing Central Banner of Kerqin Region, Linxi County and Siziwangqi Banner) of Inner Mongolia autonomous region from January to December, 2013. Accepting criteria: professionals of breeding cattle and sheep, and slaughter, accompanied by Bloom's disease suspected symptoms such as fever, fatigue, arthralgia, ranging in age from 25 to 55 years old. To collect suspected patients venous blood 3-5 ml in the morning, a total of 236 samples were collected. To detect the *Brucella* antibody by using plate agglutination test (PAT), tiger red plate agglutination test (RBPT), standard test tube agglutination test (SAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immune colloidal gold method (GICA), SAT was taken as a golden standard, analyzed the sensitivity and specificity of RBPT and SAT, ELISA and GICA. **Results** SAT method of positive patients: 136 cases (57.6%). PAT method positive patients: 150 cases (63.6%). RBPT positive patients: 159 cases (67.4%), and 143 patients with ELISA method: positive (60.6%), 147 patients with positive GICA method (62.3%). The detection rate of *Brucella* antibody positive was different by different testing methods. There was no significant difference ($\chi^2=0.52, P=0.264$). To take the SAT method as

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.02.014

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学微生物免疫室(王淑云); 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, 感染性疾病诊治协同创新中心(刘熹、赵鸿雁、朴东日、赵娜、姜海、田国忠), 实验室管理处(荣蓉、赵赤鸿); 山西医科大学微生物免疫教研室(王桂琴); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所布病室(崔步云)

通信作者: 王桂琴, Email: guiqinwang@sohu.com

the gold standard, PAT, RBPT, ELISA and GICA method of the sensitivity were 97.7% (133/136), 98.5% (134/136), 94.8% (129/136) and 94.1% (128/136), respectively. The specificity was lower, the rate were 70.0% (70/100), 75.0% (75/100), 86.0% (86/100) and 81.0% (81/100), respectively. The total coincidence rate were 86.0% (203/236), 88.5% (209/236), 91.1% (215/236) and 88.5% (209/236), respectively.

Conclusion The specificity and sensitivity of ELISA and GICA method is higher in the diagnosis of disease. The two methods are rapid, GICA method can be used on-site testing, large sample test is suitable for using ELISA.

【Key words】 ELISA; Brucella; Sensitivity and specificity

Fund program: National Health and Family Planning Commission (201302006)

布鲁菌病(Brucellosis)是由布鲁菌(*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变态反应性疾病,在我国20年持续高发,在世界范围内广泛流行,每年新发病例超过50万例^[1-2],是对人类健康和畜牧业发展危害最严重的一种传染病^[3-6]。布鲁菌病的诊断技术包括病原学检测技术和血清学检测技术。细菌学检测虽是诊断布鲁菌病的金标准,但其存在培养周期长、培养条件苛刻、检出率低、实验室生物安全等问题。血清学检测布鲁菌抗体技术使用广泛、试剂稳定性好、生物风险小、国际国内均有统一的结果判定标准,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》^[7](“标准”)中适用的血清学检测技术有平板凝集试验(PAT)、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,而近年未列入标准中的ELISA、免疫胶体金法(GICA)等亦有使用报道。但血清学检测技术的敏感性和特异性,不同的研究报道有不同的结果^[8]。本研究通过用标准SAT、PAT、RBPT、ELISA、GICA等5种血清学检测方法,7种试剂对内蒙古自治区(内蒙古)4个旗236例疑似布鲁菌病感染者的血清样本进行检测分析。

对象与方法

一、对象

1.对象:于2013年1—12月,在内蒙古的4个自治旗(察右后旗、科右中旗、林西县和四子王旗)进行调查。调查对象纳入标准:以养殖牛羊和屠宰为职业,伴有发热、乏力、关节痛等布鲁菌病疑似症状,年龄为25~55岁。按照流行病学个案调查结果和临床症状及SAT实验结果等,根据“标准”将对象分为布鲁菌病患者和非布鲁菌病患者。本研究通过了内蒙古医科大学医学伦理委员会审核[批号:(2013)伦审第(003)]。所有调查对象均签署了知

情同意书。

2.样本采集与保存:对疑似患者清晨空腹采集静脉血3~5 ml,全血300~500×g离心5 min,分离血清,置于-40℃低温冰箱保存待检。共采集236份样品。

二、试剂与仪器

SAT试剂(辽宁迪浩公司)、PAT试剂(吉林博德医学免疫制品有限公司)、RBPT试剂(试剂一:英国国际兽医参考实验室, Lot:313;试剂二:辽宁迪浩公司)、ELISA试剂盒(德国HAMBURG公司)、GICA试纸(辽宁迪浩生物科技有限公司),以上试剂均在有效期内使用。全波长酶标仪(美国Bio-Rad公司)、恒温培养箱(德国Memmert公司)、低速离心机(美国Sigma公司)。

三、检测方法

1.SAT法:按“标准”操作,人血清凝集价 $\geq 1:100$ (++)时判为阳性(++:上清液略微透明,菌体呈较薄伞状沉淀,呈50%凝集)。

2.PAT法:按“标准”。0.02 ml血清量出现两个加号(++以上凝集现象时,判为阳性;0.04 ml血清量出现两个加号(++以上凝集现象时,判为可疑)。

3.RBPT法:操作方法按标准操作,根据其是否产生了裸目可见的凝集颗粒现象,判断血清阴性。凝集者为阳性,无凝集为阴性。

4.ELISA法:根据试剂盒说明书操作,对236份疑似感染者的血清样品进行检测,同时设置阴、弱阳、阳性以及临界值(cut-off值)标准对照孔。用双波长酶标仪检测各孔吸光度值(测量波长450 nm,参比波长630 nm),检测结果450 nm/630 nm双波长处透板, A_{450} 值大于cut-off的A值,判断为阳性。

5.GICA法:用吸管取血清100 μ l加入反应板孔内,15 min内判读结果,反应板同时出现检测带(T)和质控带(C),为布鲁菌抗体阳性;反应板只出现C线,为布鲁菌抗体阴性,反应板不出现C线为反应板失效。

四、统计学分析

采用Excel 2007软件进行数据双录入,核对无

误后导入 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。采用 χ^2 检验比较不同检测方法检测疑似布鲁菌病患者的抗体阳性率差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、基本情况

236 例疑似患者中, SAT 法阳性患者 136 例; PAT 法阳性患者 150 例; RBPT 法英国生产试剂阳性患者 130 例 (55.1%), 中国生产试剂阳性患者 159 例 (67.4%); ELISA 法阳性患者 143 例, 其中 IgG 阳性 132 份 (55.9%), IgM 阳性 49 份 (20.8%); GICA 法阳性患者 147 例。不同检测方法检测布鲁菌抗体阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.52, P = 0.264$)。详见表 1。

表 1 5 种方法检测疑似布鲁菌病患者的抗体阳性率 ($n = 236$)

检测方法	阳性例数	阳性率 (%)
SAT	136	57.6
PAT	150	63.6
RBPT	159	67.4
ELISA	143	60.6
GICA	147	62.3

注: SAT: 试管凝集试验; PAT: 平板凝集试验; RBPT: 虎红平板凝集试验; ELISA: 酶联免疫吸附试验; GICA: 免疫胶体金法

二、不同方法的检测结果

以 SAT 法为“金标准”其他方法的灵敏度、特异度与符合率结果见表 2。细菌培养法检测的布鲁菌阳性例数为 136 例, 阴性为 100 名。5 种方法中, RBPT 和 PAT 的灵敏度均较高, 分别为 97.7% (133/136) 和 98.5% (134/136), ELISA-IgM 较低, 为 33% (45/136); PAT 和 RBPT 的特异度较低, 分别为 70% (70/100) 和 75% (75/100), ELISA-IgM 较高, 为 96% (96/100)。详见表 2。

讨 论

布鲁菌病是中国的重大疾病, 人在感染布鲁菌 7~15 d 后即可出现抗体, 布鲁菌病诊断的常用方法是检测血清中的抗体^[9-11]。目前我国实行的“标准”中适用的血清学检测技术主要为 PAT、RBPT、SAT, 就目前的这些方法而言各有其优缺点, 并且存在很

表 2 不同方法检测布鲁菌标本的灵敏度、特异度与符合率 ($n = 236$)

检测方法	阳性例数	阴性人数	灵敏度 (%)	特异度 (%)	符合率 (%)
PAT	133	70	97.7	70.0	86.0
RBPT	134	75	98.5	75.0	88.5
ELISA	129	86	94.8	86.0	91.1
ELISA-IgG	120	88	88.2	88.0	88.1
ELISA-IgM	45	96	33.0	96.0	59.7
GICA	128	81	94.1	81.0	88.5

注: 以试管凝集试验为“金标准”, 其检测的布鲁菌阳性例数为 136, 阴性人数为 100。“阳性例数”为“金标准”和对应检测方法同时检测为阳性的例数。PAT: 平板凝集试验; RBPT: 虎红平板凝集试验; GICA: 免疫胶体金法

多不足之处。PAT 法是诊断人布鲁菌病最常用的实验室检测方法, 检测速度较快, 为人群流行病学快速初筛的一种简易检测方法, 易出现非特异性凝集。RBPT 法由于其主要受试验凝集时间和温度的影响较大, 不易准确判定结果, 有假阴性的出现, 主要用于初筛实验, 并且需配其他方法提高准确率。SAT 法是我国布鲁菌病诊断的标准方法, 为布鲁菌病的确诊试验, 操作复杂、耗时长。SAT 法检测的主要是血清中的 IgG、IgM、IgA 抗体, 单独使用时特异性较差, 并且由于个别人畜血清样本的前带现象, 使 SAT 法假阴性率较高, 容易造成漏检, 在大量检疫时易漏掉一部分病畜或患者。因此, 重新选择更特异、敏感、简便、实用的实验诊断方法, 是实际工作中亟待解决的问题。

ELISA 法虽然 20 世纪已经有研究, 但是仅仅停留在研究水平, 本实验采用高危地区人群对此评价。ELISA 法同时检测 IgG 和 IgM 两种抗体, IgG 抗体检出率明显高于 IgM 抗体, IgM 抗体出现在急性期, IgG 抗体出现反应疾病已进入恢复期。许多患者就诊时已错过急性期, 只检测 IgM 易漏诊, 所以用 ELISA 法同时检测 IgG 和 IgM 两种抗体, 可以提高阳性检出率, 避免漏诊。GICA 法有较好的敏感性, 特异性及总符合率, 且 GICA 法操作简单, 容易掌握, 结果快速, 不需要特殊仪器, 适合于布鲁菌病监测地区的现场应用^[12-13]。ELISA 和 GICA 两种方法的应用, 为完善修订布鲁菌病诊断标准提供参考依据。RBPT 和 PAT 操作简单, 且阳性检出率高, 用于布鲁菌病初筛。

实验操作方法比较, 最简单是 GICA 法, 其次是 RBPT、PAT、SAT 和 ELISA 法^[14-15]。实验费用比较, 费用最高的是 GICA 法, 其次是 ELISA 法, 费用较低

的是 PAT 法和 RBPT 法。因此建议检测程序,用阳性检出率较高、操作简单且费用较低的 RBPT 法或 PAT 法做为布鲁菌病的初筛方法,大量标本时采用 ELISA 法筛查,在现场工作时可以采用 GICA 法。ELISA 法与 GICA 法在诊断人布鲁菌病中特异性和敏感性都较高,并且两种方法均快速,适用于人布鲁菌病的血清流行病学调查,尤其是 GICA 法对专业操作人员要求不高,适合防疫现场使用。国内外诊断人布鲁菌病都采用 SAT 为确诊实验,与本实验结果基本相符。血清学检测技术的敏感性和特异性,不同的研究报道有着不同的结果,甚至有不同结论^[16]。

综上所述,ELISA 与 GICA 法在诊断人布鲁菌病中特异性和敏感性都较高,并且两种方法均快速,适用于人布鲁菌病的血清流行病学调查,尤其是 GICA 法仅需要购买试纸条,不需要专业操作人员,适合基层医疗单位使用。

参 考 文 献

- [1] 崔步云. 中国布鲁氏菌病流行状况及防治对策[J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48(12): 1035-1038. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.12.003.
- [2] Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis[J]. Vet Microbiol, 2010, 140(3-4): 392-398. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.06.021.
- [3] Adone R, Francia M, Pistoia C, et al. B. melitensis rough strain B115 is protective against heterologous Brucella spp. infections[J]. Vaccine, 2011, 29(14): 2523-2529. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.072.
- [4] Golding B, Scott DE, Scharf O, et al. Immunity and protecting against Brucella abortus[J]. Microbes Infect, 2001, 3(1): 43-48.
- [5] 丁家波,程君生,牟巍,等. 布鲁氏菌 S2WboA 基因缺失株的构建及免疫效果[J]. 中国农业科学, 2008, 41(8): 2448-2453.
- [6] Muñoz PM, Marin CM, Monreal D, et al. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to Yersinia enterocolitica O: 9[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(1): 141-151.
- [7] 肖东楼. 布鲁氏菌病防治手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [8] 刘志国,任清华,王妙,等. 布病特异性血清学检测技术应用概述[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(10): 1026-1031.
- [9] Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens[J]. Infect Genet Evol, 2009, 9(6): 1168-1184. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.07.001.
- [10] 江敏,肖云,黄家胜. 九江市首例布鲁氏菌病流行病学调查[J]. 现代预防医学, 2014, 41(10): 1748-1749.
- [11] 张国丽,苏慧勇,杨磊. 大理地区布鲁氏菌病 8 例临床分析[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2014, 41(4): 251-253. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2014.04.013.
- [12] Smits HL, Abdoel TH, Solera J, et al. Immunochromatographic Brucella-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(6): 1141-1146.
- [13] 朱明东,杨蓉,洪林娣,等. 快速诊断布鲁氏菌病胶体金免疫层析法的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(7): 1344-1345.
- [14] 徐卫民,朱明东,王衡,等. 滴金免疫测定法检测不同人群布鲁氏菌病[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(2): 140-141.
- [15] 贾剑锋,张琴. 双抗夹心 ELISA 方法检测人布鲁氏菌抗原的研究及初步应用[J]. 当代医学, 2009, 15(24): 87-89.
- [16] 刘志国,任清华,王妙,等. 布病特异性血清学检测技术应用概述[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(10): 1026-1031.

(收稿日期: 2015-03-11)

(本文编辑: 梁明修 吕相征)

中 华 医 学 会