

# 应用酶联SPA免疫吸附试验 (ELISA) 检测奶山羊布氏杆菌病<sup>\*</sup>

张国祥 李健强 王英珍 王应福

(西北农业大学兽医系)

## 摘 要

本文应用酶联SPA免疫吸附试验(ELISA)对710份奶山羊血清进行了布氏杆菌病的检测,并与SAT和CFT相对应。检测结果:ELISA的检出率(62%, 441/710)高于SAT(60.56%, 430/710, 包括可疑反应)和CFT(2.16%),漏检率(5.5%, 39/710)低于SAT(7.0%, 50/710);经抗原处理的ELISA和SAT均呈阳性或阴性反应血清的O.D值,与原血清的O.D值相对比,前者差异显著( $P < 0.05$ ),后者差异不显著( $P > 0.05$ )。说明ELISA是检测奶山羊布氏杆菌病的一种简单、特异、灵敏和快速的血清学方法之一,可用于本病的诊断检疫。

布氏杆菌病是一种人畜共患的慢性传染病,侵害多种家畜和动物,引起流产和不育等病症,影响畜牧业的发展,危害人民身体健康。目前常用的血清学试验方法有多种,各有其优缺点,但这些方法存在着敏感性低或因操作复杂而不易推广。因此,寻求简便、特异和敏感的检测法已为众望所归。用ELISA检测人、牛和猪的布氏杆菌病已有报道<sup>[2,3,4,6,8]</sup>。现将我们应用酶联SPA免疫吸附试验检测奶山羊布氏杆菌病报道如下。

**关键词** 免疫吸附试验;奶山羊;布氏杆菌病

## 材料和方法

### 一、材料

1、固相载体:上海塑料三厂生产的聚苯乙烯微孔板(100×45mm, 40孔)。试验前测定其吸附的均一性。

2、SPA—HRPO(葡萄球菌A蛋白与辣根过氧化物酶结合物)由第四军医大学403室提供。

3、包被抗原用缓冲液:pH9.6的0.05M碳酸盐缓冲液(包被液)。

●本研究曾得到第四军医大学汪美先教授和403室薛采芳讲师的指导和支持,表示感谢。

本刊编辑室收到此稿时间:1985年5月8日。

4、洗涤液: pH7.4的0.05%吐温—20磷酸盐缓冲液(PBS—T)。

5、保温液: 含2%健康马血清的洗涤液, 供稀释血清和结合物用。

6、布氏杆菌抗原: 布氏杆菌猪型Ⅰ号菌株培养的菌体悬液, 经乙二胺四乙酸(EDTA)处理的菌体及被膜可溶性抗原<sup>[6,7]</sup>。

#### 7、血清来源

阳性血清: 用布氏杆菌猪型Ⅰ号菌株培养的菌体悬液, 加完全弗氏佐剂免疫奶山羊的血清。其凝集价为1:6400, 补体结合试验阳性。

阴性血清: 凝集试验和补体结合试验均为阴性的健康奶山羊混合血清。

被检血清: 为1983—1984年布氏杆菌病检疫时收集的奶山羊血清。

8、兔抗山羊丙种球蛋白: 由本实验室制备, 其琼脂扩散抗体效价为1:16—32。

9、底物: 为邻苯二胺(O.P.D)溶液。

10、酶联免疫检测仪(DG—I型): 为国营华东电子管厂制造。

## 二、方法

### 1、ELISA试验按下列步骤进行

(1) 包被抗原: 将抗原用包被液稀释后, 加入聚苯乙烯微孔板的各孔中, 每孔0.1毫升, 于4℃冰箱过夜。

(2) 洗涤: 甩去微孔板各孔中的抗原溶液, 用洗涤液加满各孔, 室温下放置3分钟后倒掉, 如此反复进行三次、空干(以下简称3'×3)。

(3) 加保温液: 每孔0.1毫升, 37℃温箱中孵育1小时。

(4) 洗涤: 用PBS—T洗涤3'×3, 空干。

(5) 加被检血清: 每份血清稀释后加入微孔板上下两孔中, 每孔0.1毫升。于37℃温箱中孵育1小时。

(6) 洗涤: 用PBS—T洗涤3'×3, 空干。

(7) 加兔抗山羊丙种球蛋白溶液, 每孔0.1毫升, 37℃孵育1小时。

(8) 洗涤: 用PBS—T洗3'×3, 空干。

(9) 加SPA—HRPO结合物的稀释液, 每孔0.1毫升, 37℃孵育1小时。

(10) 洗涤: 用PBS—T洗3'×3, 空干。

(11) 加底物溶液: 每孔0.1毫升, 于37℃水浴箱中孵育30分钟后, 每孔加2'M'硫酸溶液0.025毫升, 以终止反应。

(12) 用酶联免疫检测仪测定各孔O.D值, 并求得校正的两孔的平均值。

每板同时设有阳性血清、阴性血清和空白对照孔各两孔。

### 2、最适使用浓度和作用时间的测定

将酶结合物、抗原、血清和兔抗山羊丙种球蛋白分别作不同的稀释度, 用方阵滴定法作试验, 找出这些反应成份的最适使用浓度和最适作用时间。

### 3、血清试管凝集试验(SAT)和补体结合试验(CFT)按常规方法进行<sup>[8]</sup>。

## 试 验 结 果

### 一、各种反应成份的最适使用浓度和作用时间:

SPA—HRPO为 1 : 4000, 1 小时; 抗原为 20 毫克/毫升, 4 ℃ 16—20 小时; 阳性血清、阴性血清和被检血清均为 1 : 100, 1 小时; 兔抗山羊丙种球蛋白为 7 微克/毫升, 1 小时。

### 二、终点稀释度O.D值的确定:

对 280 份试管凝集试验阴性的正常奶山羊血清进行 ELISA 测定, 结果全距为 0.07—0.27, 平均 O.D 值为  $0.2202 \pm 0.0466$ ; 280 份试管凝集试验阳性的奶山羊血清检测结果, 全距为 0.27—0.95, 平均 O.D 值为 0.42, 其中 O.D 值在 0.4 以上者占 59%。根据实验结果确定被检血清的 O.D 值比阴性血清平均值高 25% 者即判为阳性。

### 三、ELISA和SAT对710份奶山羊血清检测结果的比较:

用 ELISA 和 SAT 对 710 份奶山羊血清进行检测的结果是: ELISA 阳性 441 份 (62%)、阴性 269 份 (38%); SAT 阳性 280 份 (39.44%)、可疑 150 份 (21.12%)、阴性 280 份 (39.44%) (见表 1)。

表1 ELISA和SAT对710份血清的检测结果

| 结 果    | 方 法   |        |
|--------|-------|--------|
|        | ELISA | SAT    |
| 阳性反应份数 | 441   | 280    |
| 阳性率    | 62%   | 39.44% |
| 可疑反应份数 | 0     | 150    |
| 可疑率    | 0     | 21.12% |
| 阴性反应份数 | 269   | 280    |
| 阴性率    | 38%   | 39.44% |
| 合计     | 710   | 710    |

在检测的 710 份血清中, SAT 阳性的 280 份血清, 用 ELISA 检测时, 有 272 份血清呈阳性反应, 占 SAT 阳性的 97%, 仅有 8 份血清未被 ELISA 检出 (3%); SAT 阴性的 280 份血清呈 ELISA 阴性反应者有 230 份 (82%), 呈 ELISA 阳性反应者有 50 份, 即在 280 份 SAT 阴性血清中有 18% 被 ELISA 检出; 在 150 份 SAT 可疑反应的血清中, ELISA 阳性 119 份 (79%), ELISA 阴性 31 份 (21%) (见表 2)。

### 四、ELISA、SAT和CFT三种方法检测结果:

ELISA、SAT 检测的 710 份血清中, 有 364 份血清经 CFT 检测, 结果有 5 份阳性和

表2 710份血清用ELISA和SAT检测结果的比较

| ELISA | 阳 性       | 阴 性       | 合 计 |
|-------|-----------|-----------|-----|
| SAT   |           |           |     |
| 阳 性   | 272 (97%) | 8 (3%)    | 280 |
| 可 疑   | 119 (79%) | 31 (21%)  | 150 |
| 阴 性   | 50 (18%)  | 230 (82%) | 280 |
| 合 计   | 441       | 269       | 710 |

3份可疑,检出率为2.16%。其结果如表3所示。

表3 8份CFT阳性和可疑反应血清的检测结果

| 血 清 号              | CFT | ELISA (O.D) | SAT |
|--------------------|-----|-------------|-----|
| 6                  | +   | +(0.93)     | +   |
| 14                 | +   | +(0.97)     | +   |
| 29                 | +   | +(0.66)     | +   |
| a <sub>4</sub> -59 | +   | +(0.88)     | +   |
| a <sub>3</sub> -72 | +   | +(0.75)     | +   |
| a <sub>4</sub> -44 | ±   | +(0.33)     | +   |
| 75                 | ±   | +(0.40)     | +   |
| 59                 | ±   | +(0.32)     | +   |

### 五、ELISA的特异性测定:

为了证明ELISA结果的特异性,将ELISA和SAT皆为阳性反应的血清10份,ELISA和SAT皆为阴性的血清10份,分别加入等量抗原溶液(280毫克/毫升),37℃温箱作用4小时,离心(4000转/分)30分钟,取上清液进行ELISA检测,其结果阳性血清平均O.D值由2.49下降到0.25;而阴性血清平均O.D值由0.21降到0.17。

## 讨论和小结

一、SPA—HRPO的ELISA方法可用于奶山羊布氏杆菌病的检测

### 1、ELISA和SAT比较:

用这两种方法对710份血清检测的结果表明,ELISA的检出率为62% (441/710),

比SAT的阳性检出率39.44%高22.56%；若把SAT可疑反应也计为检出率，SAT的检出率为60.56%，ELISA的检出率也比SAT高1.44%。

在280份SAT阳性血清中，呈ELISA阳性有272份，即SAT阳性血清的97%能被ELISA检出，仅有3%（8/280）的SAT阳性血清未被ELISA检出；在280份SAT阴性血清中，有82%的血清仍为ELISA阴性，有18%（50/280）的血清呈ELISA阳性反应；用ELISA检测150份SAT可疑反应的血清时，其中有79%的血清呈ELISA阳性反应。从漏检率比较，ELISA为5.5%（39/710），而SAT为7.0%（50/710）。说明ELISA的检出率和灵敏性均优于SAT。

## 2、ELISA和CFT的比较：

ELISA和SAT检测的阳性反应血清〔注〕，经CFT检出5份阳性和3份可疑反应，而这8份血清的ELISA O.D值均较高。说明ELISA的O.D值与CFT阳性和可疑反应有明显的相关性。

3、ELISA的特异性强。ELISA和SAT阳性和阴性血清，经抗原处理后，O.D值均有下降，但前者比后者降低显著。经t检验，经抗原处理的阳性血清和未处理的血清，差异显著（ $P < 0.05$ ），而经抗原处理的阴性血清和未处理的血清，差异不显著（ $P > 0.05$ ）。

4、ELISA是一种操作简单、容易掌握、省时省力、特异性强、灵敏性高的血清学方法；适合于大量样品的测试；它是通过O.D值的测定来判定终点滴度的，所以在一定程度上减少了人的主观因素的影响。随着科学研究的进展，只要试剂和仪器商品化，测试程序标准化和自动化，那么这种方法一定会得到广泛的应用。

二、ELISA法用于人和家畜布氏杆菌病的检测，国内外均有报导〔2,3,4,6,7,8,9〕，其使用价值多数人认为，可用于布氏杆菌病的监测和初筛。根据我们对奶山羊布氏杆菌病的ELISA检测，表明本法可用布氏杆菌病的诊断，且具有快速、特异、简单、灵敏的特点。但据有关资料报导，本法常出现不足1%的假阳性反应。〔9,8〕在建立ELISA诊断时有多种因素会影响实验结果，而抗原的制备则是重要的因素之一。

## 参 考 文 献

〔1〕薛采芳等：酶标记葡萄球菌A蛋白及其在酶联免疫吸附试验中的应用，《中华微生物学和免疫学杂志》，1982年，第2卷，第2期。

〔2〕谢昕等：应用酶标记免疫吸附试验(ELISA)检测牛布氏杆菌病试验，《中国兽医杂志》，1980年，第3卷，第6期。

〔3〕梁玉裕：SPA—HRPO结合物用于检查猪布氏杆菌病的价值，《家畜传染病》，1984年，第3期，第46—48页。

〔4〕李之桂等：两种酶结合物诊断布鲁氏菌病的研究，《中华流行病学杂志》，1983年，第4卷，第1期，第26页。

〔注〕SAT阳性血清多采自口服疫苗后一年以上的羊只。

- [5] 农业部:《动物检疫操作规程》, 1979年。  
[6] Chin, J.C.:《Aust.vet.J》60 (9):1983, 261—264.  
[7] Chin, J.C.:《Aust.vet.J.》6 (6):1983, 264—267.  
[8] Brewer R.A.:《Br.Vet.J.》139 (6):1983, 496—500.  
[9] Lee K.:《Aust.Vet.J.》62 (3):1985, 91—93.

## Brucellosis in Milk Goats Detected by the Application of SPA ELISA

Zhang Guoxiang Li Jianqiang Wang Yinzong Wang Yinfu  
(Veterinary Science Department, Northwestern Agricultural  
University)

### Abstract

Brucellosis in sera of 710 samples of milk goats was detected by the application of SPA ELISA in comparison with SAT and CFT. Results from detection indicated that the detected rate (62%, 441/710) of ELISA was higher than that (60.56%, 430/710) including reaction in doubt) of SAT and CFT (2.16%); the undected rate (5.5%, 39/710) was lower than that of SAT (7.0%, 50/710). ELISA and SAT treated with antigen appeared to have O.D value of positive or negative serum reaction/. In comparison with O.D value of the original sera, the former had a significant difference ( $P > 0.05$ ) while the latter had no significant difference ( $P > 0.05$ ). This indicated that ELISA was one of the simple, special, sensitive and fast serological methods in detecting Brucellosis in milk goats, and it can be used in diagnosis of quarantine.

**Key words** ELISA/milk goat/Brucellosis