

布鲁氏菌病不同血清学检测方法结果分析

王 斌, 王淑芳*, 白天俊, 何金桂

(天祝县动物疫病预防控制中心, 甘肃 天祝 733299)

摘 要: [目的] 为了确定不同布病检测方法在临床应用中的意义。[方法] 对疑似感染布鲁氏菌病羊血清同时作虎红平板凝集实验(RBT)、试管凝集实验(SAT)、ELISA 抗体检测(cELISA)检测, 分析它们的 Kappa 值、符合率、敏感度和特异性等。[结果] 数据显示三者符合度较高, Kappa 值在 0.76 以上, 一致性相当可靠, 其中 RBT 敏感度高, 但假阳性率也高, 相比 SAT 结果, cELISA 敏感度和特异性都高, 且两者 Kappa 值达到了 0.85。[结论] 综合判断临床工作中适合先用 RBT 广泛筛选, 再用 cELISA 确诊的方法检测布鲁氏菌病。

关键词: 布鲁氏菌病; 血清学检测; 对比分析

中图分类号: s855.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2021)06-0000-00

布鲁氏菌病(Brucellosis, 以下简称布病)是一种由布鲁氏菌引起的严重危害人民健康和畜牧业发展的人畜共患传染病, 是《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病, 世界动物卫生组织和我国将其列为二类动物疫病。据报道全球每年发病人数在 50 万以上。染疫的家畜是人间布病的主要传染源, 人由于接触患病的牲畜及其产品或其污染物而感染布病。近几年, 我国人、畜间布病疫情呈增长态势, 虽然不同地区采取了不同的防控措施, 但布病检出率还是高高低低, 没有明显下降趋势。

布病的实验室诊断方法有许多种, 包括细菌培养、PCR 检测和血清学检测。前两种方法耗时长、费力、环境要求高、成本也高, 不适合临床检测和调运检疫检测, 因此基层检测布病主要用血清学方法。布鲁氏菌侵入机体后, 不断刺激机体产生抗体, 所以检测血液里的特异性抗体对诊断有重要意义, 目前应用比较多的血清学诊断方法有 3 种, 即虎红平板凝集实验(RBT)、试管凝集实验(SAT)、ELISA 抗体检测, ELISA 检测目前有竞争(cELISA)和间接 ELISA(iELISA)两种方法, 其中 SAT 是我国以往确诊布病方法之一。几种方法各有优劣, 敏感度和特异性都不同, 为了找出更适合牛羊布病临床检测的方法, 笔者选用 SAT、RBT、cELISA 3 种方法检测几群流产羊群布病抗体, 并作对比分析。

1 材料与方法

1.1 血清来源

收集 2 年内各乡镇流产羊群采集的血清共 260 份, -20℃ 保存备用。

1.2 试剂

RBT 和 SAT 抗原及阴阳对照血清均来自哈药集团生物有限公司, 稀释液自配; cELISA 为布鲁氏菌竞争 ELISA 抗体检测试剂盒, 厂家为广州悦洋生物技术有限公司。

1.3 检测方法

检测方法均采用 GB/T 18646—2018 规定和试剂盒要求。

1.3.1 RBT 先将样品和阴阳血清及抗原恢复到室温, 混匀抗原和血清, 分别吸取 25 μL 加于反应板上, 用移液器吸头快速混匀血清和抗原, 涂成圆形, 4 min 内在自然光下观察。阴阳对照结果成立时方可判断。4 min 内出现肉眼可见凝集现象这判断为阳性, 无凝集现象者判断为阴性。

1.3.2 SAT 配制 0.5% 石炭酸的 10% 氯化钠溶液作稀释液。每份血清用 4 支凝集试管, 第 1 管加 920 μL 稀释液, 第 2~4 管各加入 500 μL 稀释液, 然后取血清 80 μL 加入到第 1 管内, 混匀后吸取 500 μL 加入到第 2 管, 并充分混匀, 如此倍比稀释

收稿日期: 2021-08-07 修回日期: 2021-08-15

作者简介: 王斌(1970—), 男, 高级畜牧师, 主要从事动物疫病防控工作。

* 通讯作者: 王淑芳(1972—), 女, 高级兽医师, 主要从事兽医实验室检测。

到第 4 管,从第 4 管弃去混匀液 500 μL 。然后每管加入试管凝集抗原 500 μL ,同时作阴阳对照管和抗原对照管、比浊管,将各试管混匀后放置 37℃ 恒温箱内孵育 18~24 h,判断以 1: 50 血清稀释度出现“++”以上凝集现象时,判定为阳性,1: 25 血清稀释度出现“++”以上凝集现象时,判定为可疑,无凝集现象者判为阴性。

1.3.3 cELISA 试剂盒恢复到室温后取出抗原包被板,以 1x 洗涤液洗涤 1 次并拍干,将血清和阴阳对照分别以 50 μL 加入到 ELISA 板,再每孔加入 50 μL 已稀释好的单克隆抗体,混匀 5 min,37℃ 孵育 30 min。用洗涤液洗板 3 次拍干,再加入稀释好的羊抗鼠酶标抗体 100 μL ,37℃ 孵育 30 min,再次洗板 3 次,然后加入底物液各 50 μL ,室温避光反应 15 min,再每孔加终止液 50 μL ,15 min 内用酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 。

结果判断:当样品的 $\text{PI} \geq 30\%$ 时,为布病抗体阳性,样品 $\text{PI} < 30\%$ 时,为布病抗体阴性。

1.3.4 统计方法 采用 Kappa 一致性评测方法统计 3 种结果的一致性。按照标准,Kappa 系数的强弱代表一致性的强弱,系数越大,代表一致性越强。当 k 值 < 0 ,表示一致性极差, K 值 > 0.6 ,表示一致性相当可靠,当 k 值为 0.81~1.0 时,表示一致性极强。

2 结果与分析

按照布病防治技术规范,RBT 检测阳性而 SAT 阴性的,经 30 d 后再采样检测,转阳的或仍然可疑的按照阳性判断,对样品中可疑的重新采样检测,转阴的,按照阴性判断。2018 版诊断技术规定 SAT 和 cELISA 都可为布病确诊标准,所以笔者以 SAT 和 cELISA 为标准,RBT 与它们对比结果假阳性率、假阴性率、符合率、敏感度、特异度和 Kappa 值,形成结果见表 1、表 2,SAT 与 cELISA 对比一致性和 K 值,结果见表 3。

表 1 RBT 与 SAT 检测结果对比

检测方法	SAT 结果		假阳性率/ (%)	假阴性率/ (%)	符合率/ (%)	K 值 K	敏感度/ (%)	特异度/ (%)
	(+) 份	(-) 份						
RBT 结果	(+) 份	77	27	14.9	2.5	88.8	0.76	97.5
	(-) 份	2	154					

表 2 cELISA 与 RBT 检测结果对比

检测方法	cELISA 结果		假阳性率/ (%)	假阴性率/ (%)	符合率/ (%)	K 值 K	敏感度/ (%)	特异度/ (%)
	(+) 份	(-) 份						
RBT 结果	(+) 份	90	14	8.23	0	94.6	0.88	100
	(-) 份	0	156					

表 3 SAT 与 cELISA 检测结果对比

检测方法	SAT 结果		符合率/ (%)	K 值
	(+) 份	(-) 份		
cELISA 结果	(+) 份	76	14	93.5 0.85
	(-) 份	3	167	

2.1 分析 3 种检测方法的一致性

三者的符合率均在 88.8% 以上,用 Kappa 值检验, K 值均大于 0.76(0.76~0.88),说明三者有较高的一致性,其中 cELISA 与 RBT 结果相比 K 值最高,达到 0.88,符合率也高达 94.6%,而 RBT 与 SAT 检测结果 K 值差点,低了 0.12。

2.2 分析三者的敏感度和特异度

以 RBT 检测结果对比其他两者结果,cLEISA 的敏感度高于 SAT,达到了 100%,特异性也高出 SAT6.6 个百分点。如果以 SAT 作为标准判定,RBT 的假阳性达到 14.9%,容易误判假阳性畜,造成不必要的经济损失,如果以 cELISA 为标准,CELISA 的阳性检出率在两者之间,高于 SAT 低于 RBT。RBT 的假阳性率比前者低为 8.23,低了 7.57 个百分点,误判假阳性畜的比例低,并且特异性达到 91.7%,高于表 1 组,说明漏检几率也更低。

2.3 SAT 与 cELISA 检测结果对比分析

虽然从表 3 看两者 K 值达到 0.85,呈高度一致性,符合率为 93.5%,但还是有些差别,没有完 全一

致。

3 讨 论

3种检测方法中,RBT方法简单快速易操作,是猪、牛、羊布鲁氏菌病检疫的国标方法。但是溶血现象、交叉反应和超过4 min容易出现纤维素的凝集块等原因会造成假阳性的凝集,导致假阳性较高,特异性不强,容易误判假阳性畜,也无法区分野毒感染抗体和免疫抗体,致使RBT不能作为确诊判断标准^[1]。SAT法能定量检测抗体的凝集滴度,尤其对感染初期产生的IgM比较敏感,能很好地检测感染初期和疫苗免疫后血清抗体的早期诊断,特异性也强,但检测耗时长,需要20 h以上,判断时受主观因素影响大,不适合大批量检疫检测使用。ELISA法检测,可根据最后一步颜色的深浅定性或定量判断。据报道,ELISA法检测IgG敏感度高,已被OIE定为判断方法之一^[2]。cELISA适合牛种、羊种和猪种布鲁氏菌病的血清学诊断,从以上实验得出结论,

cELISA与其他两种方法有高度一致性,敏感度和特异性都强,耗时达2 h左右,操作方便,与SAT相比更适合临床使用,即先用RBT广泛筛选,再用cELISA确诊,尤其针对种畜检测,可避免误判假阳性畜和假阴性畜,减少不必要的经济损失和生物安全危害。

参考文献:

- [1] 宋耀丽,张俊杰,牛国永,等. 204例布氏杆菌病实验室检测结果分析[J]. 微生物学免疫学进展,2015,43(5):49-51.
- [2] 王芳,冯宇,张阁,等. 牛布鲁氏菌间接ELISA抗体检测方法的建立[J]. 中国农业科学,2016,49(9):1818-1825.
- [3] 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(1):29-34.
- [4] 武海玉,韩惠瑛. 布鲁氏菌常用病原学诊断方法的建立与评价[J]. 中国动物检疫,2009,26(11):63-64.
- [5] 李玉鑫. 不同方法检测布鲁氏菌抗体的对比评价[J]. 中国实用医药,2019,14(7):197-198.
- [6] 任燕斌. 布鲁氏菌竞争ELISA检测方法的建立及应用[D]. 重庆:重庆理工大学,2016.

Analysis of Resultsof Different Serological Detections Inibrucellosis

WANG Bin,WANG Shu-fang*, BAI Tian-jun, HE Jin-gui

(Animal Epidemic Prevention and Control of Tianzhu County,Tianzhu, Gansu733299)

Abstract: [Objective] Determine the significance of different methods of brucellosis detection in clinical application. [Method] RBT, SAT and Celisa were used to detect the suspected infected brucellosis sheep serum, and the Kappa value, coincidence rate, sensitivity and specificity were analyzed. [Conclusion] Data showed that the three factors had high coincidence, the Kappa value was above 0.76, and the consistency was quite reliable. The sensitivity of RBT was high, but the false positive rate was also high. Compared with the results of SAT, the sensitivity and specificity of Celisa were both high, and the Kappa value of RBT and CELISA was 0.85. [Conclusion] In clinical work, it is suitable to use RBT to screen widely and then cELISA to confirm the diagnosis of brucellosis.

Key words: Brucellosis; serological detections; comparative analysis