

布鲁氏菌病免疫学诊断技术研究进展

周江华^{1,2} 王鹏^{1*}

1. 云南省地方病防治所 云南大理 671000

2. 昆明医科大学 云南昆明 650000

摘要: 布鲁氏菌病是由布鲁氏菌感染机体引起的一种全球广泛流行的人畜共患传染病, 该病引发严重的公共卫生问题, 对人类生活质量产生影响, 也对畜牧业造成重大损失。该文对布鲁氏菌病现有免疫学诊断技术进行概括总结, 并对对比分析各诊断技术的优势及局限性, 以期对布鲁氏菌病诊断方法的研究提供参考, 为快速准确地诊断该病提供技术支持。

关键词: 布鲁氏菌病; 免疫学; 诊断

引言

布鲁氏菌病 (Brucellosis) 是全球重大的公共卫生问题, 世界卫生组织 (WHO) 认为布病是“容易被忽视的人畜共患病”之一^[1-3]。家畜患病后主要表现为流产、睾丸炎、附睾炎。其排泄物和产道分泌物对人类健康有极大威胁。人类被感染若不及时诊断和治疗, 可引起全身性多系统损害, 发展为慢性布鲁氏菌病后极难治愈, 影响患者的生活质量, 并加重家庭和社会的经济负担^[5]。近年来布病患者人数持续增长, 据世界卫生组织评估, 布病患者的实际数量约为报告病例数的10~25倍^[6], 由于该病宿主广泛和对社会经济的影响, 在布病防控方面有一定挑战^[4]。对布鲁氏菌病的诊断是防控的关键。金标准诊断方法是细菌学培养, 但该方法耗时较长, 敏感度不高, 对慢性布病几乎无效, 严重延误对布病的诊断^[8]。而分子生物学试验尚未广泛实施^[9], 不能作为活动性感染的证据^[10], 且基于DNA检测的分子生物学方法尚未被证明可用于直接诊断^[7]。因此, 免疫学检测得到了更广泛的应用。本文就国内外布鲁氏菌免疫学诊断技术研究的现状进行概括总结, 并对对比分析各诊断方法的优势及局限性, 以期及时准确地诊断布病提供参考。

1. 血清学检测方法

1.1 虎红平板凝集试验 (RBPT)

RBPT是一种检测凝集抗体和非凝集抗体的玻片型凝集试验, 简单快速, 价格低廉, 无论在布鲁氏菌感染的哪个阶段都是高灵敏度的, 不需要技术专长或特殊的实验室设备, 适合大规模筛查, 且结果不存在前带现象^[11], 是一种理想的初筛方法。但由于易受到观察者主观判断、抗原质量存在

差异、环境温度等因素影响, 易出现漏检和误诊的结果^[12]。

1.2 试管凝集试验 (SAT)

SAT作为一种确诊实验, 可以对结果半定量, 可针对IgM抗体进行检测, 不易受非特异性抗体的干扰, 具有较高的特异性, 用于人和动物布病的早期诊断。其原理与虎红平板凝集试验相似, 应用广泛, 常用于RBPT试验的复检, 但SAT耗时长, 相对繁琐, 结果判断受实验环境等多种因素影响, 同样有一定的主观性和差异性。另外, SAT检测的是布鲁氏菌S-LPS抗体, 对于诊断由粗糙型犬种菌引起的疾病无效, 且由于存在前带现象, 和面对复杂的慢性病例, SAT可能呈现假阴性。交叉反应、非凝集抗体和丙酮效应也会导致假阳性结果。尽管对抗生素治疗的反应与降低SAT滴度有良好的相关性, 但在完成有效抗菌治疗2年后, 仍有3%至5%的无症状患者存在显著的抗体滴度^[13]。传统的SAT已经小型化, 成为一种微量凝集法 (mSAT), 可以在微量板上进行, 使用少量试剂和低血清量, 同时测试多个样品^[14]。但是与SAT原理相似, 操作繁琐、耗时长。但近年来, 随着ELISA等检测技术的发展, 试管凝集试验的敏感性和特异性较其他方法低的缺点暴露出来。

1.3 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

ELISA是一种灵敏度高、特异度好的高通量抗体检测技术, 所需样品量少, 适用于大批量样本检测^[16]。ELISA可避免在RBPT阳性血清中出现非特异性反应。在疾病晚期, 非凝集抗体比凝集抗体更丰富, 在ELISA中结合IgG偶联物可以检测非凝集抗体, 灵敏度更高^[15]。但由于类风湿因子的存在会导致假阳性结果, 特异性低于凝集试验。Padilla

等人^[16]认为 ELISA 结果可靠,用单一凝集试验检测布鲁氏菌是不可能的,建议将 RBPT 与 ELISA 联合使用。Xu N 等^[17]研究表明 ELISA 在检测布鲁氏菌病的所有阶段都具有最高的敏感性和特异性,它优于血培养和凝集试验。并且强烈建议在日常临床实践中使用 ELISA 检测,特别在中国和许多其他流行地区尤其有价值,因为这些地区的许多患者最初表现为亚急性或慢性阶段,所以,ELISA 还是复杂病例与慢性病程患者中血清学检测的优选。ELISA 检测布病用酶标抗原判定试验结果,避免了肉眼观察判定结果的误差,但操作较繁琐,检测试剂比较昂贵,增加了检测成本,因而限制了 ELISA 的使用^[18]。

1.4 胶体金免疫层析法 (GICA)

GICA 法用胶体金作为抗原-抗体反应标记物,操作简单,检测时间短,对实验人员要求不高,血清样品用量少,不需要任何专业仪器和设备,结果判断直观^[19],因此特别适用于传染性疾病的快速诊断及野外现场检测。但因为其质控指标不统一,以及其灵敏度还需进一步提高。目前,我国对 GICA 的应用尚无完整的法律法规,因此相关的诊断技术尚未被广泛应用,但具有极大的研究前景。

1.5 补体结合实验 (CFT)

CFT 常常被用作 SAT 法的辅助诊断,对于慢性布病和复发患者的诊断具有高灵敏度和特异性,准确度较高^[21]。此外,CFT 是国际贸易指定试验,也是确诊方法之一^[20],可用于动物人畜共患病的根除计划。在感染后的第 4 或第 5 个月,滴度通常高于 SAT,并在疾病出现初始症状后持续约 12 个月在慢性布鲁氏菌病患者和康复患者中,可以观察到 SAT 阴性并伴有高 CF 滴度^[10],特别是对于 RBPT 初筛阳性或者 SAT 诊断可疑的均可用 CFT 进行确诊。但由于其技术复杂性和标准化问题,补体结合试验所需的溶血素制备困难,试验操作繁琐,涉及的反应成分复杂,对试验条件和实验人员要求较高、检测结果受主观因素影响较大,通常不用于诊断人类感染,也不适用于基层和现场检测,在临床上也较难被广泛应用^[22]。

1.6 荧光偏振免疫试验 (FPA)

FPA 原理基于荧光偏振现象,通过测量荧光分子在激发态下的偏振度变化,实现对目标分子的定量检测。FPA 技术具有灵敏度高、特异性强、操作简便等特点,因此在人畜共患病的诊断以及乳制品行业的布鲁氏菌病筛查中展现出

广阔的应用前景^[23]。FPA 试验具有快速、简便的特点,能够在短时间内完成大量样本的检测,提高了诊断效率。这一优势在应对突发疫情或大规模筛查时尤为重要,有助于及时控制疾病的传播^[24]。但 FPA 技术成本相对较高,限制了其在部分地区的推广和应用。随着便携式设备的开发,FPA 展现一定的应用前景。

1.7 库姆斯抗球蛋白凝集试验 (Coomb's)

Coomb's 试验不存在前带效应。许多情况下,其可以检测出凝集反应结果为阴性的阳性样本。Coomb's 试验具有较高的敏感性和特异性。因为在长期感染布鲁氏菌的患者中,非凝集性抗体逐渐变得比凝集性抗体丰富,因此 SAT 可能会给出假阴性结果^[25]。在这种情况下,Coomb's 试验对于确诊疾病特别有用,因为它可以检测到非凝集抗体或不完整抗体的存在。是确诊患有长期慢性疾病患者复发的最合适和最灵敏的试验。但又由于 Coomb's 针对不完全 IgG 抗体的检测,而不完整抗体可竞争性地结合相应抗原,部分地阻断完全抗体与抗原的凝集反应,使凝集反应减弱,呈现出假阴性结果,故凝集试验阴性者可做此检查,但还需排除其他革兰阴性菌交叉感染的干扰^[26]。目前也很少有实验室拥有技术工具和专业知识来进行这种检测。另外还有一种布鲁氏菌库姆斯凝胶试验,快速、简便,可在 2 h 内得到结果,但相关研究报道较少。

1.8 2- 巯基乙醇试验

2-ME 是对 SAT 的改良,主要检测特异性 IgM 五聚体凝集抗体,对于急性布病的诊断和鉴别慢性布病具有重要意义^[27]。一般联合 SAT 区分 IgG 和 IgM 特异性凝集抗体。

1.9 时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET)

利用荧光团标记的抗原和抗体,基于它们之间的能量转移。利用荧光团标记抗原和抗体,针对布鲁氏菌 S-LPS 的血清抗体优于对该抗原也具有特异性的标记单克隆抗体。此方法快速,只需 30 分钟孵育时间,无需洗涤步骤,直接进行荧光读取,检测性能与其他方法相当^[31]。

1.10 琼脂扩散试验 (NH-GD)

NH-GD 利用光滑型布鲁氏菌表面的一种天然半抗原鉴定是否为布病疫苗或野毒株感染^[28],具有很好的特异性和重复性,但抗原的提取和纯化以及试验方法仍需优化。NH-GD 操作技术简便,所需要的试验仪器简单,特别适合在基层推广使用^[18]。

1.11 量子点免疫层析试纸条 (QD)

所用设备为手持式 QD 免疫层析条带装置, 用作快速发现和初步筛查布鲁氏菌病的即时检测。快速、方便、灵敏度高, 特异度高, 可与 SAT 相媲美^[32]。

2. 细胞免疫学检测方法

2.1 布鲁氏菌皮肤迟发性超敏反应试验 (SDTH)

该方法通过布鲁氏菌水解素 (brucellin) 皮内接种于待检动物后, 根据 24~48 小时后肿胀程度判断动物是否被感染。此方法已被列入 OIE 参考手册之中。与基于 S-LPS 的检测相比, 使用布鲁氏菌皮肤过敏原的免疫测定不受假阳性血清学反应的影响, 故布鲁氏菌素皮肤试验被认为是 FPSR 背景下的首选检测^[29]。因此, 使用独立于循环抗体的皮肤迟发性超敏反应 (SDTH) 试验可能会提高对布鲁氏菌病的诊断。虽然血清学检测在许多国家帮助控制了布鲁氏菌病, 但血清学检测并不足以发现潜伏的布鲁氏菌携带者。该试验是一种细胞免疫学试验, 它比血清学检测更早发现布鲁氏菌病, 并且具有很高的特异性^[30]。该方法简单有效, 不需要其他仪器设备即可完成检测, 有较好的实用性。但是, 该实验判定标准较为模糊, 主观影响较大, 也易受到结核病或其他寄生虫疾病的影响, 误差较大。

2.2 γ -干扰素释放试验

γ -干扰素释放试验在最初应用于结核病, 与结核分枝杆菌相同, 布鲁氏菌是胞内寄生菌, IFN- γ 在机体抗布鲁氏菌感染时发挥重要作用^[33]。涉及布鲁氏菌素刺激全血中的淋巴细胞, 由此产生 γ -干扰素。该试验特异性高, 能区分假阳性病人, 但目前还没有更多的文献对该方法进行验证和应用。

3. 总结

综上所述, 免疫学诊断技术在布鲁氏菌病的应用中发挥了重要作用, 为疾病的诊断、预防控制和疫情监测提供了有力支持。然而, 在实际应用中, 我们也需要认识到其局限性, 并结合其他诊断技术进行综合判断。随着科学技术的不断进步和免疫组化技术等手段的技术创新和优化, 免疫学诊断技术在布鲁氏菌病领域的应用将会更加广泛和深入。通过整合不同技术的优势, 可应用更敏感的高通量方法, 如化学发光免疫分析法。尽管几乎没有针对布病的检测报道, 但此项技术已在多种疾病的检测中有应用, 是一种极具潜力的布病免疫学诊断技术, 为疾病的早期发现和治理提供有力

支持。且随着对布鲁氏菌蛋白抗原的研究, 利用多个蛋白联合建立布病检测方法或发展针对其他靶点的蛋白将是布病检测方法研究的重要方向。不仅如此, 对 LPS 进一步提纯, 对于布病诊断有重大意义。相信未来还会有更多创新结合的应用和抗原提纯技术问世, 为布鲁氏菌病的防控工作带来更大的突破。

参考文献:

- [1]El-Sayed A, Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int J Vet Sci Med.* 2018;6(Suppl):S31-S35.
- [2]Harrison ER, Posada R. Brucellosis. *Pediatr Rev.* 2018;39(4):222-224.
- [3]Zilberman B, Motro Y, Sagi O, et al. Genomic Epidemiology of Clinical *Brucella melitensis* Isolates from Southern Israel. *Microorganisms.* 2022;10(2):238.
- [4]Ducrottoy M, Bertu WJ, Matope G, et al. Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control. *Acta Trop.* 2017;165:179-193.
- [5]张雪健, 吴向未, 谢松松等. 布鲁氏菌分子诊断与分型技术研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2022,38(06):533-538.
- [6]Xu N, Wang W, Chen F, et al. ELISA is superior to bacterial culture and agglutination test in the diagnosis of brucellosis in an endemic area in China[J]. *BMC Infect Dis*, 2020, 20(1):11.
- [7]Ducrottoy MJ, Conde-Álvarez R, Blasco JM, Moriyón I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016;171:81-102.
- [8]Qureshi KA, Parvez A, Fahmy NA, et al. Brucellosis: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment—a comprehensive review. *Ann Med.* 2023;55(2):2295398.
- [9]Mitka S, Anetakis C, Souliou E, et al. Evaluation of Different PCR Assays for Early Detection of Acute and Relapsing Brucellosis in Humans in Comparison with Conventional Methods[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(4):1211.
- [10]Yagupsky P, Morata P, Colmenero J D. Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, 33(1)
- [11]Ramón Díaz, Casanova A, Ariza J, et al. The Rose Bengal Test in Human Brucellosis: A Neglected Test for the

Diagnosis of a Neglected Disease[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2011, 5(4):e950.

[12] 邵卫星, 盖文燕, 左媛媛等. 正确认识和应用布鲁氏菌虎红平板凝集试验 [J]. *中国动物检疫*, 2022, 39(10):72–78.

[13] Roushan MR, Amiri MJ, Laly A, Mostafazadeh A, Bijani A. al. Follow-up standard agglutination and 2-mercaptoethanol tests in 175 clinically cured cases of human brucellosis – ScienceDirect[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2010, 14(3).

[14] Park S H, Lee Y H, Chu H, et al. Application of the Microagglutination Test for Serologic Diagnosis of Human Brucellosis[J]. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 2012, 3(1).

[15] Legesse A, Mekuriaw A, Gelaye E, et al. Comparative evaluation of RBPT, I-ELISA, and CFT for the diagnosis of brucellosis and PCR detection of *Brucella* species from Ethiopian sheep, goats, and cattle sera[J]. *BMC Microbiology*, 2023, 23(1).

[16] Poester F P, Nielsen K, Samartino L E, et al. Diagnosis of Brucellosis[J]. *Open Veterinary Science Journal*, 2010, 4(1):46–60.

[17] Xu N, Wang W, Chen F, Li W, Wang G. ELISA is superior to bacterial culture and agglutination test in the diagnosis of brucellosis in an endemic area in China. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):11. Published 2020 Jan 6.

[18] 王刚, 范伟兴, 刘坤, 等. 布鲁氏菌病血清学检测方法优缺点对比 [J]. *中国动物检疫*, 2021, 38(5):4.

[19] 程婷婷, 石峰, 陈创夫, 等. 布鲁氏菌抗体胶体金免疫层析法快速检测技术的建立 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(2):6.

[20] Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol*. 2002;90(1):447–459.

[21] Di Bonaventura G, Angeletti S, Ianni A, Petitti T, Gherardi G. Microbiological Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis: An Overview. *Pathogens*. 2021;10(12):1623. Published 2021 Dec 14.

[22] 杜清春, 王鹏. 布鲁氏杆菌病检测技术研究进展 [J]. *中国动物传染病学报*, 2019, 27(2):5.

[23] Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Paulo PS, Nielsen K. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human

brucellosis. *J Med Microbiol*. 2003;52(Pt 10):883–887.

[24] Dong SB, Xiao D, Liu JY, et al. Fluorescence polarization assay improves the rapid detection of human brucellosis in China. *Infect Dis Poverty*. 2021;10(1):46. Published 2021 Mar 31.

[25] Segel GB, Lichtman MA. Direct antiglobulin (“Coombs”) test–negative autoimmune hemolytic anemia: a review. *Blood Cells Mol Dis*. 2014;52(4):152–160.

[26] Parker V, Tormey CA. The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation, and Pitfalls. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(2):305–310.

[27] Zhou Y, Chen L, Jiang T, et al. 2-Mercaptoethanol (2-ME)-based IATs or Polybrene method mitigates the interference of daratumumab on blood compatibility tests. *Hematology*. 2021;26(1):365–370.

[28] 杨珍, 尼博, 田莉莉, 等. 半抗原-琼脂扩散试验鉴别布鲁氏菌感染抗体和 S2、Rev.1 免疫抗体的研究与应用 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33(02):126–130.

[29] Dieste-Pérez L, Blasco JM, De Miguel MJ, et al. Performance of skin tests with allergens from *B. melitensis* B115 and rough *B. abortus* mutants for diagnosing swine brucellosis. *Vet Microbiol*. 2014;168(1):161–168.

[30] Bercovich Z. The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review. *Vet Q*. 2000;22(3):123–130.

[31] McGiven, J.A.; Thompson, I.J.; Commander, N.J.; Stack, J.A. Time resolved fluorescent resonance energy transfer assay for simple and rapid detection of anti-*Brucella* antibodies in ruminant serum sample. *J. Clin. Microbiol*. 2009, 47, 3098–3107.

[32] Li, G.; Rong, Z.; Wang, S.; Zhao, H.; Piao, D.; Yang, X.; Tian, G.; Jiang, H. Rapid detection of brucellosis using a quantum dot-based immunochromatographic test strip. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2020, 14, e0008557.

[33] Zhu L, Feng Y, Zhang G, et al. *Brucella suis* strain 2 vaccine is safe and protective against heterologous *Brucella* spp. infections. *Vaccine*. 2016;34(3):395–400.

作者简介:

周江华(1999—),女,汉族,云南省保山市,在读研究生,云南省地方病防治所,无,布鲁氏菌病免疫学诊断。