

## 检测 OMP28 抗体不能有效诊断羊布鲁氏菌病

王芳<sup>1</sup> 蒋卉<sup>1</sup> 朱良全<sup>1</sup> 王楠<sup>1</sup> 张阁<sup>1</sup> 鑫婷<sup>2</sup> 朱鸿飞<sup>2</sup> 丁家波<sup>1\*</sup>

(1. 中国兽医药品监察所 北京 100081)

(2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 北京 100194)

**摘要:**【目的】探索布鲁氏菌外膜蛋白 OMP28 作为羊布鲁氏菌病特异性检测方法的可行性。

【方法】体外表达和纯化 OMP28 蛋白, 建立并优化以 OMP28 重组蛋白为包被抗原的布鲁氏菌病 ELISA 诊断方法。以 3 个不同种属的 4 株布鲁氏菌(羊种布鲁氏菌 16M 和 M28, 猪种布鲁氏菌 S1330, 牛种布鲁氏菌 2308)分别感染山羊和绵羊至 42 周, 期间每隔 2 周收集血清, 分别用布鲁氏菌 LPS 包被的 ELISA 和 OMP28 ELISA 方法对不同阶段的分离血清进行检测, 比较 2 种不同 ELISA 对 4 株布鲁氏菌感染的山羊和绵羊的检测敏感性。【结果】4 株布鲁氏菌感染的山羊和绵羊均产生高水平针对 LPS 的抗体, 但是仅有 *B. melitensis* 16M 和 *B. melitensis* M28 感染的绵羊与 *B. melitensis* 16M 和 *B. abortus* 2308 感染的山羊可产生针对 OMP28 的抗体。【结论】基于 OMP28 的间接 ELISA 具有细菌属特异性和宿主动物品种特异性, 通过检测 OMP28 抗体不能有效诊断羊布鲁氏菌病。

**关键词:** 布鲁氏菌病, OMP28, ELISA, 诊断

## Antibody against OMP28 is not a reliable diagnostic target for brucellosis infected in sheep and goats

WANG Fang<sup>1</sup> JIANG Hui<sup>1</sup> ZHU Liang-Quan<sup>1</sup> WANG Nan<sup>1</sup> ZHANG Ge<sup>1</sup>  
XIN Ting<sup>2</sup> ZHU Hong-Fei<sup>2</sup> DING Jia-Bo<sup>1\*</sup>

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

(2. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100194, China)

**Abstract:** [Objective] The aim of this study is to evaluate the feasibility of using purified recombinant OMP28 to diagnose *Brucella*-infected sheep and goats. [Methods] We expressed and purified recombinant *Brucella* OMP28 protein in *Escherichia coli* system as a diagnostic antigen in an I-ELISA. Four different *Brucella* species (*B. melitensis* 16M, *B. melitensis* M28, *B. abortus* 2308, and *B. suis* S1330) were used to inoculate sheep and goat and sera samples were collected every two weeks, till 42 weeks post-inoculation. The antibodies against LPS and OMP28 were parallel compared by LPS-based and OMP28-based I-ELISA respectively. [Results] All *Brucella*-infected individuals could produce high levels of antibodies against LPS, but only *B. melitensis* 16M- and *B.*

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA101302); 北京市科技新星项目(No. xx2013099)

\*通讯作者: Tel: 86-10-61255327; ✉: dingjiabo@126.com

收稿日期: 2014-10-08; 接受日期: 2014-11-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-15

*melitensis* M28-infected sheep and *B. melitensis* 16M- and *B. abortus* 2308-infected goats could produce antibodies against OMP28 and the OMP28 specific antibody were undetectable in the rest groups. [Conclusion] OMP28-based I-ELISA showed specificity for both *Brucella* species and host kinds, which obviously limited its reliability as an antigen for diagnosing brucellosis in sheep and goats.

**Keywords:** Brucellosis, OMP28, ELISA, Diagnosis

布鲁氏菌是一种革兰氏阴性、细胞内寄生菌,可引起严重的人畜共患病,包括人流产和马耳他热<sup>[1-2]</sup>。本属细菌包括羊种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌、绵羊附睾种布鲁氏菌、猪种布鲁氏菌、犬种布鲁氏菌和沙漠森林鼠种布鲁氏菌以及一些感染海洋哺乳动物的布鲁氏菌。目前布鲁氏菌病在世界范围内呈反弹趋势,包括拉丁美洲、中东地区、亚洲、非洲、地中海地区等,每年新增病例 50 余万人。我国也是布鲁氏菌病流行极为严重的国家之一,根据卫生部网站公布的布鲁氏菌病疫情,2013 年我国布鲁氏菌病发病人数 46 089 人,为历年新高,布鲁氏菌病防控形势十分严峻。

准确可靠的诊断是控制布鲁氏菌病的前提,传统的布鲁氏菌病诊断方法主要有凝集试验和补体结合试验,其主要是检测抗布鲁氏菌 LPS-O 链的抗体;然而,针对 LPS 抗体的血清学方法无法鉴别诊断免疫动物与感染动物<sup>[3]</sup>,此外,布鲁氏菌的 LPS-O 链是多种革兰氏阴性菌的共同抗原,因此布鲁氏菌与其他革兰氏阴性菌如大肠杆菌 O:157 和小肠结肠炎耶尔森菌 O:9 存在的交叉反应,采用针对 LPS 抗体的血清学方法无法鉴别<sup>[4]</sup>,这也是布鲁氏菌病诊断存在的一大难题。迄今为止,基于血清学对于布鲁氏菌病的诊断,尚未报道能够有效区分布鲁氏菌抗血清和小肠结肠炎耶尔森菌 O:9 抗血清的方法。

因此,研究者致力于开发特异性更高的诊断方法来克服 LPS 诊断方法的不足。1996 年,Debbbarh 等发现羊布鲁氏菌外膜蛋白 28 kD 蛋白(OMP28)在布鲁氏菌感染绵羊表现出较高的免疫原性,可用于鉴别羊布鲁氏菌 Rev. 1 免疫的绵羊和羊布鲁氏菌 H38 强毒株感染的绵羊。随后,研究者建立并评价了 OMP28 蛋白作为包被抗原的间接 ELISA (i-ELISA)和竞争 ELISA (c-ELISA)方法<sup>[5-6]</sup>。根据之

前的研究结果,OMP28 ELISA 的敏感性介于 88.7% 到 100%,特异性介于 85.59%到 98.41%<sup>[7-9]</sup>。已有的研究表明基于 OMP28 建立的 ELISA 方法可用于诊断山羊布鲁氏菌或绵羊布鲁氏菌感染的绵羊或山羊<sup>[5,7,10-12]</sup>,但无对其它种属布鲁氏菌感染山羊和绵羊的报道<sup>[6,13]</sup>。为了进一步研究基于 OMP28 蛋白建立的间接 ELISA 诊断方法对不同种属布鲁氏菌感染山羊和绵羊的诊断适用性,本研究采用 3 种不同种属的 4 株布鲁氏菌强毒参考株(羊种布鲁氏菌 16M 和 M28,猪种布鲁氏菌 S1330,牛种布鲁氏菌 2308)分别感染山羊和绵羊,同时以 LPS 方法作为对照,评价了用 OMP28 间接 ELISA 方法对山羊和绵羊诊断的可靠性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和载体:** 布鲁氏菌国际参考强毒株 *Brucella melitensis* 16M (生物 1 型)、*B. melitensis* M28 (生物 1 型)、*B. abortus* 2308 (生物 1 型)及 *B. suis* S1330 (生物 1 型)均由本实验室保存。表达载体 pET32a(+)以及表达菌株 *Escherichia coli* BL21 (DE3)均由本实验室保存。

**1.1.2 试剂及仪器:** 细菌基因组提取试剂盒购自博大泰克生物科技有限公司; *Pfu* DNA Polymerase、BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo 公司; dNTPs、*Hind* III和 *Bam*H I 购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;蛋白纯化柱购自 GE 公司;HRP 标记的鼠抗山羊/绵阳单克隆抗体购自 Sigma 公司;Pourquier ELISA Brucellosis Individual and Pool Serum Screening 购自 IDEXX 公司;4700 proteomics analyzer 7044 购自 Applied Biosystems 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 OMP28 重组蛋白的表达、纯化及鉴定:** 布鲁氏菌 *B. melitensis* 16M (GenBank No. :AE008918)、*B. melitensis* M28 (GenBank No. : CP002459.1)、*B. abortus* 2308 (GenBank No. : AM040264.1)以及 *B. suis* S1330 (GenBank No. : AE014291.4)的 OMP28 氨基酸序列完全一致,本研究采用细菌基因组提取试剂盒提取 *B. abortus* 2308 的全基因组,并以其为模板扩增 OMP28 基因片段。上游引物序列为 5'-CGCGGATCCATGAACACTCGTGCTAGCAAT-3', 下游引物序列为 5'-CCCAAGCTTTTACTTGATTTC AAAAACGAC-3'。PCR 反应体系为: 0.4  $\mu\text{mol/L}$  引物 1  $\mu\text{L}$ , dNTPs 0.2 mmol, 2 $\times$ GC Buffer 25  $\mu\text{L}$ , *Pfu* DNA polymerase 1.25 U, 补充双蒸水至 50  $\mu\text{L}$ 。反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 产物经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切后,用胶回收试剂盒回收片段,酶切后的 PCR 片段定向连接至 pET-32a(+) 表达载体上,连接产物转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株中,筛选测序正确的重组质粒,并将其命名为 pET32a-omp28。

将重组质粒 pET32a-omp28 转化至 *E. coli* BL21(DE3)中,涂布在含有 50  $\mu\text{g/L}$  氨苄青霉素的 LB 平板上,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 12–16 h。挑取单个菌落转接至 100 mL LB 液体培养基(含有 50  $\mu\text{g/L}$  氨苄青霉素),待菌液的  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 时,加入 100  $\mu\text{L}$  1 mol/L 的 IPTG, 22  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养 12 h。将菌液在 4  $^{\circ}\text{C}$  下 4 000 $\times g$  离心 10 min,倾去上清,并用 PBS (pH 7.4)清洗沉淀 2 次,菌体沉淀用 10 mL PBS (pH 7.4)重悬,并进行超声裂解,将裂解液于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$  离心 30 min,收集上清并用  $\phi$  0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤,收集滤液。滤液用镍柱(HisTrap FF Crude, 1 mL, GE Healthcare)进行纯化,纯化后的蛋白用脱盐柱(HiTrap 26/10 Desalting column, GE Healthcare)进行脱盐,将纯化后的蛋白置换到 PBS (pH 7.4)缓冲体系中。纯化后的蛋白用 12%的 SDS-PAGE 进行检测,并用 BCA 蛋白定量试剂盒

进行定量。

为了对重组蛋白进行鉴定,将重组蛋白用 Thrombin 在 22  $^{\circ}\text{C}$  酶切 1 h,并用 12% SDS-PAGE 进行检测,切下 26 kD 大小的条带,送至上海生化研究所进行 MS/MS 鉴定。

**1.2.2 OMP28 间接 ELISA 检测方法的建立:** 通过对间接 ELISA 的抗原包被浓度、封闭液、反应时间、样品稀释液等条件的优化,OMP28 i-ELISA 反应条件确定如下:用碳酸盐包被缓冲液稀释重组蛋白 OMP28 至 1 mg/L,100  $\mu\text{L/孔}$  4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜;TBST 洗涤 6 次后,用 5%的鸡血清(TBST 配制) 200  $\mu\text{L/孔}$  37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h;TBST 洗涤 6 次后,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  1:100 TBST 稀释的血清样本,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h;TBST 洗涤 6 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的用 TBST 1:30 000 稀释的 HRP 标记的鼠抗山羊/绵阳单克隆抗体,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h;TBST 洗涤 6 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB 显色液,室温避光反应 15 min,加入 100  $\mu\text{L}$  2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应,用酶标仪检测  $OD_{450}$  读值。为验证 OMP28 i-ELISA 的有效性,将 2 份健康绵羊阴性血清和 2 份感染 *B. melitensis* 16M 的绵羊阳性血清分别用 TBST 倍比稀释成 1:20、1:40、1:80、1:160 和 1:320,用该方法检测梯度稀释血清的  $OD_{450}$  值。用优化后的 OMP28 间接 ELISA 方法检测 20 份布鲁氏菌阴性的健康山羊血清和 20 份布鲁氏菌阴性的健康绵羊血清,以山羊/绵羊样品  $OD_{450}$  的平均值+3s 作为临界值。

**1.2.3 LPS 抗体检测方法:**用间接 ELISA 检测试剂盒(Pourquier ELISA Brucellosis Individual and Pool Serum Screening, P04130/10)检测实验动物不同感染阶段血清中针对布鲁氏菌 LPS 的 IgG 抗体水平。该试剂盒能够检测牛、山羊和绵羊体内针对 LPS 的抗体,但是说明书只提供了牛布鲁氏菌病诊断的临界值。因此,从无布鲁氏菌病的羊场分别采集 10 头健康绵羊(虎红平板试验和补体结合试验均为阴性)和 10 头健康山羊(虎红板试验和补体结合试验均为阴性)的静脉血,制备血清作为临床阴性样品;分别采集 20 份人工感染布鲁氏菌山羊和 20 份人工感

染布鲁氏菌绵羊的静脉血并制备血清作为阳性样本。用间接 ELISA 试剂盒检测阴性和阳性样本,按说明书计算阴性和阳性样本的 S/P 值,并用 ROC 方法分别计算山羊和绵羊的临界值。

**1.2.4 人工感染实验动物及血清样本采集:** 从布鲁氏菌病阴性养殖场筛选 15 头健康 1-2 岁雌性小尾寒羊和 15 头健康 1-2 岁雌性波尔山羊,将小尾寒羊和波尔山羊分别随机分为 5 组,每组 3 头实验动物,经结膜接种 3 种不同种属的布鲁氏菌菌株(分组情况详见表 1) 其中包含了猪种布鲁氏菌 S1330 株,羊种布鲁氏菌 16M 和 M28 株,以及牛种布鲁氏菌 2 308 株。每 2-4 周采集静脉血,制备血清,用间接 ELISA 检测方法检测各实验动物体内针对 LPS 和 OMP28 的 IgG 抗体水平,直至感染后 42 周。

**1.2.5 临床样本检测:** 为验证 OMP28 间接 ELISA 检测方法在临床样本的应用,从临床采集 58 份山羊血清和 55 份绵羊血清,同时用 LPS 间接 ELISA 试剂盒和 OMP28 间接 ELISA 检测方法进行诊断。

## 2 结果与分析

### 2.1 OMP28 重组蛋白的表达、纯化及鉴定

SDS-PAGE 检测结果表明,OMP28 重组蛋白获得了良好表达,其大小与预测一致(44.5 kD),经纯化后的重组蛋白纯度大于 90% (图 1),利用 BCA 方法对纯化的蛋白进行定量,结果为 0.6 g/L。串联质谱分析(MS/MS)表明该重组蛋白为布鲁氏菌 OMP28 特异性蛋白(图 2)。

### 2.2 OMP28 间接 ELISA 检测方法的建立及其初步评价

为了评价优化后的 OMP28 间接 ELISA 检测方法,分别将 *B. melitensis* 16M 感染后的阳性羊血清和阴性健康羊血清梯度稀释,并用该方法检测梯度

稀释的各血清(以  $OD_{450}$  值表示),检测结果显示该方法可以区分 5 个不同稀释度(1:20、1:40、1:80、1:160、1:320)的阳性和阴性血清样本(图 3) 其  $OD_{450}$  检测值与血清中针对 OMP28 IgG 抗体浓度具有良好的线性关系,证明研究建立的 OMP28 间接 ELISA 可用来检测血清样本中针对 OMP28 的 IgG 抗体水平。

用优化后的 OMP28 间接 ELISA 检测 20 份布鲁氏菌病阴性健康山羊血清和 20 份布鲁氏菌病阴性健康绵羊血清,山羊的临界值设为 0.22,绵羊的临界值设为 0.20。

### 2.3 LPS 间接 ELISA 检测方法诊断人工感染动物

采用 ROC 方法确定基于 LPS 的间接 ELISA 方法检测绵羊血清时的临界值为 75%,检测山羊血清时的临界值为 84%,利用 LPS 间接 ELISA 检测人工感染后不同阶段山羊和绵羊血清中的布鲁氏菌抗体(图 4) 其中感染 *B. melitensis* 16M、*B. melitensis* M28 和 *B. suis* S1330 的绵羊血清,感染 *B. melitensis* 16M 和 *B. abortus* 2308 的山羊血清中均能检测到较高水平的布鲁氏菌 LPS 抗体,且可持续到 42 周以后,表明基于 LPS 的 ELISA 对于检测不同属布鲁氏菌感染不同品种的羊所产生的抗体都是有效的。然而,随着时间推移,*B. abortus* 2308 感染的绵羊和 *B. melitensis* M28、*B. suis* S1330 感染的山羊血清中 LPS 抗体水平逐渐下降,特别是 *B. abortus* 2308 感染的绵羊血清中抗 LPS 的 IgG 仅能持续到 12-16 周,而 *B. abortus* 2308 感染的山羊血清中此抗体持续时间可超过 42 周,这可能是由于 *B. abortus* 2308 对绵羊的毒力低于山羊,所以与山羊相比,绵羊机体可以更快地清除细菌。

表 1 不同布鲁氏菌感染绵羊/山羊的分组情况

Table 1 Sheep and Goats infected with different *Brucella* species

Animal	<i>B. melitensis</i> 16M ( $10^{11}$ CFU/animal)	<i>B. melitensis</i> M28 ( $10^{11}$ CFU/animal)	<i>B. abortus</i> 2308 ( $10^{11}$ CFU/animal)	<i>B. suis</i> S1330 ( $10^{11}$ CFU/animal)	PBS control
绵羊 Sheep	3	3	3	3	3
山羊 Goats	3	3	3	3	3

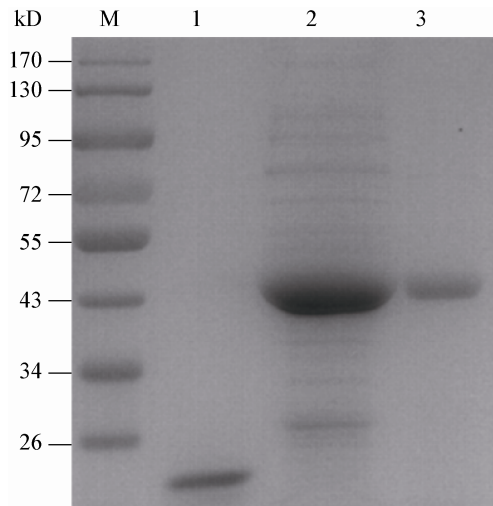


图 1 重组蛋白 OMP28 的 SDS-PAGE 结果

**Figure 1 SDS-PAGE analysis of recombinant OMP28**

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 纯化后的标签蛋白(载体对照); 2: OMP28 总蛋白; 3: 纯化后的 OMP28 蛋白。

Note: M: Prestained protein ladder (Ferments); 1: Purified pET32a(+) tag; 2: OMP28 expressed in *E. coli* BL21(DE3); 3: Purified recombinant OMP28.

## 2.4 OMP28 间接 ELISA 检测方法诊断人工感染动物

用优化后的 OMP28 间接 ELISA 检测方法检测人工感染后不同感染阶段的山羊/绵羊血清, 其检测结果如图 5 所示。结果表明, 不同种属布鲁氏菌感染绵羊和山羊的 OMP28 抗体水平并不一致, 仅 *B. melitensis* M28 和 *B. melitensis* 16M 感染的绵羊, 以及 *B. melitensis* 16M 和 *B. abortus* 2308 感染的山羊能在试验阶段(42 周)持续检测到 OMP28 抗体。 *B. suis* S1330 感染的山羊和绵羊, *B. abortus* 2308 感染的绵羊在整个实验阶段均检测不到抗 OMP28 的抗体。

## 2.5 临床样品检测

同时用 LPS 间接 ELISA 试剂盒和 OMP28 间接 ELISA 检测方法对从临床采集的 58 份山羊血清和 55 份绵羊血清进行检测。结果表明(表 2), 对于绵

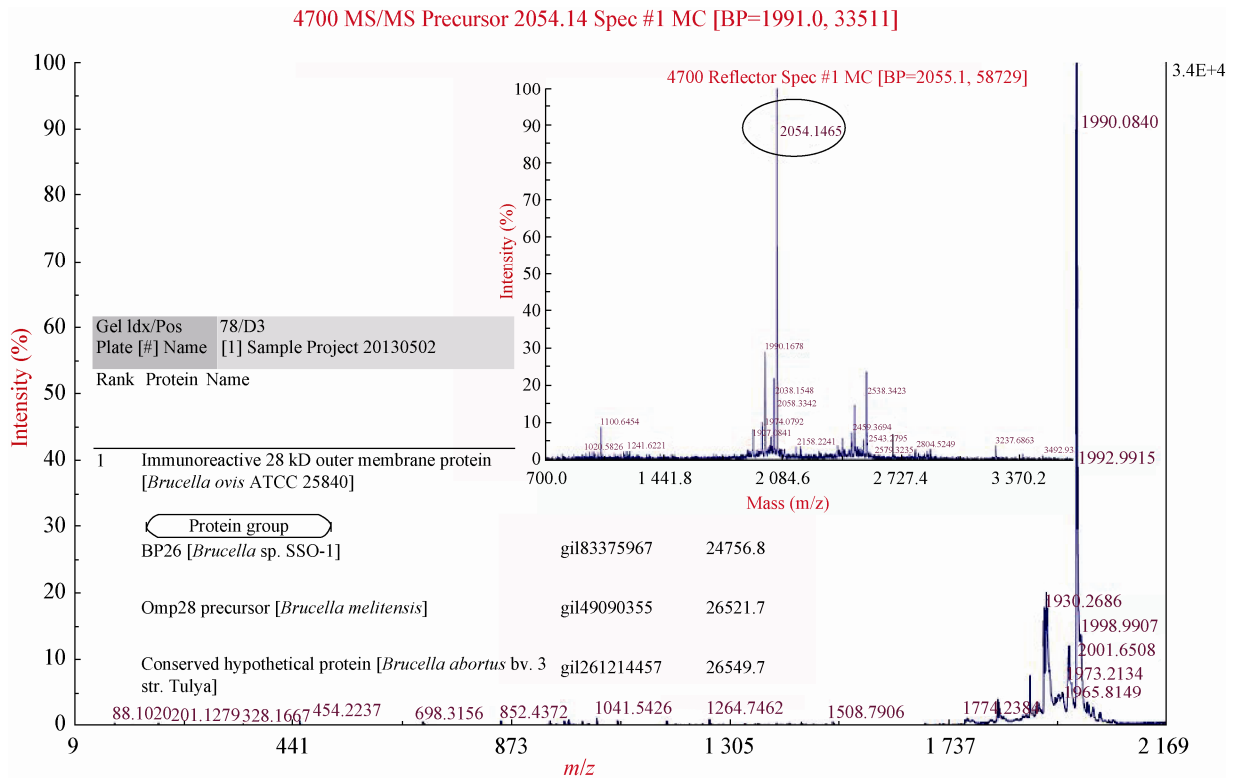


图 2 重组蛋白 OMP28 的 MS/MS 鉴定结果

**Figure 2 The tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis of the OMP28**

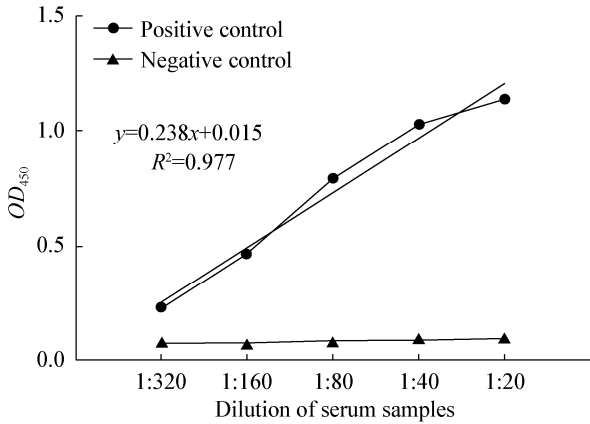


图3 OMP28 间接 ELISA 检测方法的初步评价  
Figure 3 The efficacy of OMP28-based i-ELISA

羊, OMP28 间接 ELISA 对 LPS 间接 ELISA 的特异性和敏感性分别为 90% 和 82.2%。对于山羊, OMP28 间接 ELISA 对 LPS 间接 ELISA 的特异性和敏感性分别为 100% 和 80%。

### 3 讨论

基于 LPS 的 ELISA 方法具有较高的敏感性和特异性, 被认为是诊断布鲁氏菌病最有效的方法<sup>[13-14]</sup>。本研究中, 感染布鲁氏菌的动物在感染后 2-4 周可

以检测到布鲁氏菌病阳性, 抗 LPS 抗体可以持续近 42 周。然而, *B. abortus* 2308 感染的绵羊, *B. melitensis* M28 和 *B. suis* S1330 感染的山羊, 在感染 16 周后, LPS 的抗体下降至阴性, 提示对布鲁氏菌长期感染的绵阳或山羊, 存在漏检的风险。Çelik 等<sup>[15]</sup>曾报道了两例经细菌培养或穿刺活体诊断为阳性的布鲁氏菌病, 经血清学诊断却为阴性, 同样也证明该风险的存在。

本研究发现, 基于 OMP28 的间接 ELISA 表现出了细菌种属特异性(表 1, 图 5)。仅有 *B. melitensis* 16M 感染的绵羊和山羊血清可以持续检测到 OMP28 抗体, 而 *B. suis* S1330 感染的无论绵羊还是山羊均不能检测到 OMP28 抗体阳性。研究结果同时还表明, OMP28 间接 ELISA 也表现出了宿主动物特异性, *B. abortus* 2308 感染的绵羊和山羊对 OMP28 的体液免疫应答较弱, 仅有感染后的山羊血清可以与 OMP28 反应。此外, 感染 *B. melitensis* 28M 的绵羊可以产生良好 OMP28 的抗体, 但感染山羊却为 OMP28 抗体阴性。对自然感染动物血清的检测结果进一步证实了基于 OMP28 的间接 ELISA 不能有效检测到所有布鲁氏菌感染的动物。

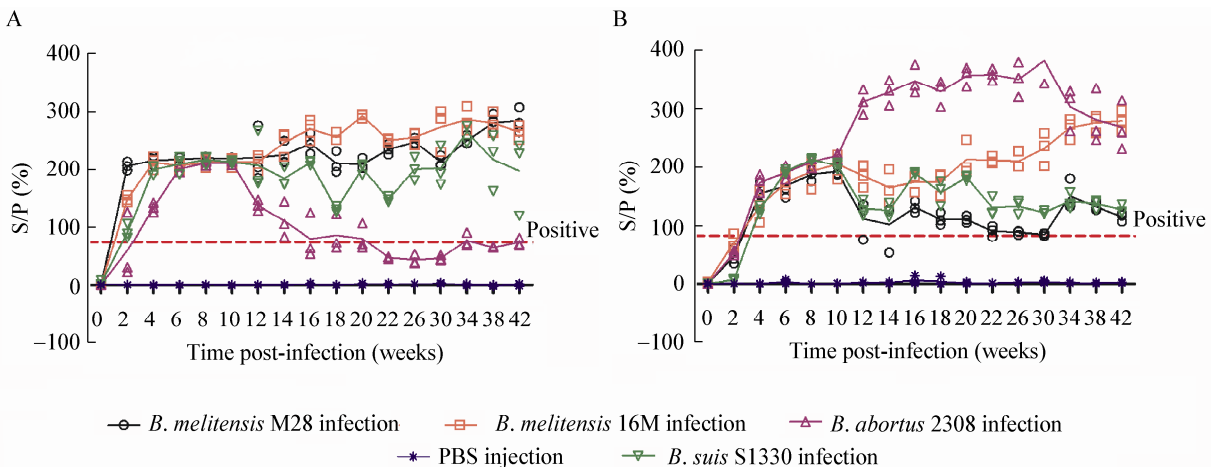


图4 LPS ELISA 检测人工感染绵羊/山羊的抗体水平

Figure 4 The levels of antibodies against LPS in serum samples of experimental infected-sheep and goats

注: A: LPS 间接 ELISA 检测不同种属布鲁氏菌感染的绵羊抗体水平; B: LPS 间接 ELISA 检测不同种属布鲁氏菌感染的山羊抗体水平。

Note: A: The antibody level for sheep infected by different *Brucella* strains (detected by LPS based i-ELISA); B: The antibody level for goats infected by different *Brucella* strains (detected by LPS based i-ELISA).

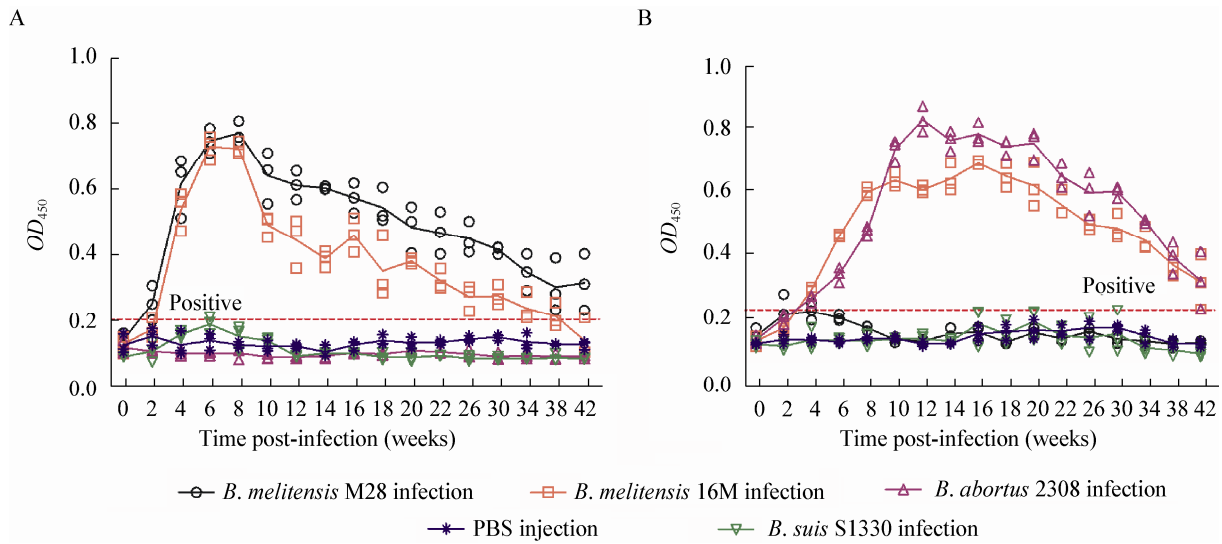


图5 OMP28 间接 ELISA 检测人工感染绵羊/山羊的抗体水平

Figure 5 The levels of antibodies against OMP28 in serum samples of experimental infected-sheep and goats

注：A：OMP28 间接 ELISA 检测不同种属布鲁氏菌感染的绵羊抗体水平；B：OMP28 间接 ELISA 检测不同种属布鲁氏菌感染的山羊抗体水平。

Note: A: The antibody level for sheep infected by different *Brucella* strains (detected by OMP28 based i-ELISA); B: The antibody level for goats infected by different *Brucella* strains (detected by OMP28 based i-ELISA).

表2 OMP28 和 LPS 间接 ELISA 检测临床样本的符合率

Table 2 Numbers of tested animals and the agreement between OMP28-based i-ELISA and LPS-based i-ELISAs

OMP-28 间接 ELISA OMP-28 i-ELISA	绵羊 Sheep		山羊 Goats	
	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative
阳性 Positive	37	1	40	0
阴性 Negative	8	9	10	8

有研究者认为，基于 OMP28 的 ELISA 在诊断绵羊、山羊、牛和人类的布鲁氏菌病具有高度特异性和敏感性<sup>[5,7-9]</sup>。Chaudhuri 等发现基于 OMP28 的 ELISA 在诊断牛布鲁氏菌病的敏感性和特异性分别为 88.7%和 93.8%<sup>[8]</sup>。2011 年，Tiwari 等发现 *B. abortus* 的 OMP28 区的 10 kD 重组蛋白可用于牛布鲁氏菌病诊断<sup>[16]</sup>。不同菌株感染不同宿主动物所产生的针对 OMP28 的抗体水平不同可能是由于不同布鲁氏菌感染不同宿主时，OMP28 蛋白存在的位点和数量不同有关。然而，对 OMP28 的定位缺乏深入研究，Rossetti 等<sup>[17]</sup>发现 OMP28 位于布鲁氏菌的外膜和圆泡，将该蛋白定位于布鲁氏菌的周质中，

而 Cloeckert 等<sup>[10]</sup>采用单克隆抗体发现该蛋白是严格定位于细胞内的可溶性蛋白。这些研究结果的差异可能是由于在布鲁氏菌的整个感染过程中，布鲁氏菌的蛋白表达谱会随着宿主、环境等因素发生改变<sup>[18]</sup>。在实验条件下，一些蛋白可能不表达，即使在同样实验条件下，*B. melitensis* 与 *B. abortus* 的蛋白表达谱也不同<sup>[19]</sup>。因此，我们推测在不同的布鲁氏菌感染不同种动物后，OMP28 蛋白可能以多种状态存在<sup>[18,20]</sup>，被感染动物体内针对 OMP28 产生抗体的水平也因此存有差异。此外，机体产生针对胞内或胞外抗原的抗体还取决于巨噬细胞对细菌捕获、加工以及细菌的致病性。因此，本研究认为基



于 OMP28 的间接 ELISA 作为诊断布鲁氏菌病的诊断方法存在风险。

#### 4 结论

本研究表明基于 OMP28 间接 ELISA 检测方法具有布鲁氏菌种属特异性以及感染宿主特异性, 明确了基于 OMP28 间接 ELISA 用于山羊和绵羊布鲁氏菌病的诊断谱, 并且阐明了 OMP28 用于诊断羊布鲁氏菌病的局限性。

#### 参 考 文 献

- [1] de Jong MF, Tsois RM. Brucellosis and type IV secretion[J]. Future Microbiology, 2012, 7(1): 47-58
- [2] Christopher S, Umapathy BL, Ravikumar KL. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis[J]. Journal of Laboratory Physicians, 2010, 2(2): 55-60
- [3] Barrio MB, Grilló MJ, Muñoz PM, et al. Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep[J]. Vaccine, 2009, 27(11): 1741-1749
- [4] Nielsen K, Smith P, Widdison J, et al. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7[J]. Veterinary Microbiology, 2004, 100(1/2): 25-30
- [5] Debbarh HS, Zygmunt MS, Dubray G, et al. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies to the *Brucella melitensis* BP26 protein to evaluate antibody responses in infected and *B. melitensis* Rev.1 vaccinated sheep[J]. Veterinary Microbiology, 1996, 53(3/4): 325-337
- [6] Lindler LE, Hadfield TL, Tall BD, et al. Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis[J]. Infection and Immunity, 1996, 64(7): 2490-2499
- [7] Zygmunt MS, Baucheron S, Vizcaino N, et al. Single-step purification and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 87(3): 213-220
- [8] Chaudhuri P, Prasad R, Kumar V, et al. Recombinant OMP28 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis[J]. Molecular and Cellular Probes, 2010, 24(3): 142-145
- [9] Thavaselvam D, Kumar A, Tiwari S, et al. Cloning and expression of the immunoreactive *Brucella melitensis* 28 kD outer-membrane protein (Omp28) encoding gene and evaluation of the potential of Omp28 for clinical diagnosis of brucellosis[J]. Journal of Medical Microbiology, 2010, 59(Pt 4): 421-428
- [10] Cloeckaert A, Debbarh HS, Vizcaino N, et al. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep[J]. FEMS Microbiology Letters, 1996, 140(2/3): 139-144
- [11] Seco-Mediavilla P, Verger JM, Grayon M, et al. Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2003, 10(4): 647-651
- [12] Cloeckaert A, Jacques I, Grilló MJ, et al. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis[J]. Vaccine, 2004, 22(21/22): 2827-2835
- [13] Perrett LL, McGiven JA, Brew SD, et al. Evaluation of competitive ELISA for detection of antibodies to *Brucella* infection in domestic animals[J]. Croatian Medical Journal, 2010, 51(4): 314-319
- [14] Chand P, Rajpurohit BS, Malhotra AK, et al. Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep[J]. Veterinary Microbiology, 2005, 108(3/4): 305-311
- [15] Çelik AD, Yulugkural Z, Kilincer C, et al. Negative serology: could exclude the diagnosis of brucellosis?[J]. Rheumatology International, 2012, 32(8): 2547-2549
- [16] Tiwari AK, Kumar S, Pal V, et al. Evaluation of the recombinant 10-kilodalton immunodominant region of the BP26 protein of *Brucella abortus* for specific diagnosis of bovine brucellosis[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2011, 18(10): 1760-1764
- [17] Rossetti OL, Arese AI, Boschirolu ML, et al. Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(1): 165-169
- [18] Rafie-Kolpin M, Essenberg RC, Wyckoff JH 3rd. Identification and comparison of macrophage-induced proteins and proteins induced under various stress conditions in *Brucella abortus*[J]. Infection and Immunity, 1996, 64(12): 5274-5283
- [19] Eschenbrenner M, Horn TA, Wagner MA, et al. Comparative proteome analysis of laboratory grown *Brucella abortus* 2308 and *Brucella melitensis* 16M[J]. Journal of Proteome Research, 2006, 5(7): 1731-1740
- [20] Zhao Z, Yan F, Ji W, et al. Identification of immunoreactive proteins of *Brucella melitensis* by immunoproteomics[J]. Science China-Life Sciences, 2011, 54(9): 880-887