

研究报告

布鲁氏菌病荧光偏振抗体检测方法的建立

孙翠丽^{1,2Δ} 程汝佳^{1,2Δ} 张阁¹ 程君生¹ 朱良全¹ 蒋卉^{1*} 丁家波^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所 北京 100081)

(2. 山东农业大学动物科技学院 山东 泰安 271018)

摘要:【目的】布鲁氏菌病(Brucellosis)简称布病,是由布鲁氏菌引起的以感染家畜为主的人畜共患传染病,造成严重的公共卫生问题。目前全世界范围内消除该病的主要方法是扑杀与免疫相结合,所以建立快速准确的诊断方法对防治和清除布病非常必要。本文建立布鲁氏菌病荧光偏振(FPA)抗体检测方法,为布鲁氏菌病(布病)的快速高效诊断提供技术手段。【方法】提纯猪种布鲁氏菌 S2 株脂多糖 O 链(OPS),经异硫氰酸荧光素(FITC)标记后作为诊断抗原。通过对样品稀释液、抗原稀释度、反应时间等条件的优化,初步建立了布鲁氏菌荧光偏振诊断方法。用该方法对 148 份布病阳性血清(其中牛血清 70 份,羊血清 78 份)和 155 份布病阴性血清(其中牛血清 82 份,羊血清 73 份)进行检测,确定其敏感性和特异性。按确定的技术参数,制备 3 批布鲁氏菌 FPA 抗体检测试剂盒,使用质控阴、阳性血清分别评价试剂盒的批内和批间重复性。用 400 份临床样本比较本研究开发试剂盒与商品化进口 FPA 试剂盒的符合率。【结果】使用 0.5%蔗糖磷酸缓冲液作为血清样品稀释液;标记抗原的使用浓度为 90 μg/mL;最佳反应时间为 3–5 min。本检测方法的判定标准为:δmP 值<20 时为阴性,δmP 值≥20 时为阳性。按上述条件建立的 FPA 检测 148 份布病阳性血清和 155 份布病阴性血清,结果敏感性为 98.6%,特异性为 98.7%。对 400 份临床样本的比对检测显示,研究建立的 FPA 方法与进口商品化试剂盒的总符合率为 94.0%。【结论】研究建立的布鲁氏菌 PFA 抗体检测方法具有良好的特异性和敏感性,可作为一种重要的布病诊断快速诊断方法。

关键词: 布鲁氏菌, 荧光偏振诊断方法, 特异性, 敏感性

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0500902)

***Corresponding authors:** Tel: 86-10-62103674

E-mail: JIANG Hui: 15011216921@163.com; DING Jia-Bo: dingjiabo@126.com

^ΔThese authors equally contributed to this work

Received: July 03, 2017; **Accepted:** October 30, 2017; **Published online** (www.cnki.net): November 01, 2017

基金项目: 国家重点研发计划项目(No. 2016YFD0500902)

***通讯作者:** Tel: 86-10-62103674

E-mail: 蒋卉: 15011216921@163.com; 丁家波: dingjiabo@126.com

^Δ对本文贡献相同

收稿日期: 2017-07-03; 接受日期: 2017-10-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-11-01

Development of fluorescence polarization method in Brucellosis antibody detection

SUN Cui-Li^{1,2Δ} CHENG Ru-Jia^{1,2Δ} ZHANG Ge¹ CHENG Jun-Sheng¹
ZHU Liang-Quan¹ JIANG Hui^{1*} DING Jia-Bo^{1*}

(1. Department of Inspection Technology Research, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

(2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agriculture University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: [Objective] Brucellosis (Brucellosis) referred to as cloth disease, is caused by *Brucella* to livestock-based zoonotic infectious diseases, causing serious public health problems. At present, the main method of eliminating the disease around the world is the combination of culling and immunization, so the establishment of rapid and accurate diagnostic methods for the prevention and removal of brucellosis is necessary. We establish a diagnostic method of fluorescence polarization (FPA) for brucellosis and provide a scientific and efficient method for diagnosis of brucellosis. **[Methods]** In the present study, the conjugate of lipopolysaccharide O-chain (OPS) and fluorescein isothiocyanate (FITC) was purified from purified S2 strain of *Brucella* spp. As an antigen, and the optimal dilution, dilution concentration, reaction conditions, the results to determine parameters such as the initial establishment of the *Brucella* fluorescence polarization diagnosis method. The results showed that the sensitivity and specificity of the positive serum of 148 bovine serum (including 70 bovine serum and 78 goat serum) and 155 negative bovine serum (including 82 bovine serum and 73 goat serum) were determined by this method. The intra-assay and inter-assay reproducibility was assessed using the controlled positive and negative serum assay kits. At the same time, 400 samples of bovine serum samples were detected by FPA kit and commercial kit, and the coincidence rate was compared. **[Results]** The optimal conditions of each component in the kit were: the best sample dilution was 0.5% sucrose phosphate buffer; the concentration of the labeled antigen was 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$; the best reaction time was 3 to 5 minutes; δmP value of <20 , was negative, δmP value of ≥ 20 , was positive. The sensitivity of the method was 98.6% and the specificity was 98.7%. The comparison of 400 clinical samples showed that the FPA method established in this study coincided with the import commercialization kit 94.0%. **[Conclusion]** The method of fluorescence polarization diagnosis with good specificity and sensitivity was established.

Keywords: *Brucella*, Fluorescence polarization diagnosis method, Specificity, Sensitivity

布鲁氏菌(*Brucella*)是一种胞内寄生革兰氏阴性菌,能引起人和多种动物的急性和慢性感染^[1],布鲁氏菌病(简称“布病”)以流产和发热为特征^[2],能够导致母畜流产、早产、不孕不育和产奶量下降,以及公畜睾丸炎和个体瘦弱等临床症状^[3]。更严重的是,人感染布鲁氏菌后往往难以治愈,从而造成严重的公共卫生问题。近年来,布病感染病例呈回升态势,早期快速检测是治疗和预防布病的关键环节^[4]。

布病检测的常规方法包括细菌学和血清学方

法。细菌学方法是布病流行、疫情判定及临床诊断中最直接的证据,但存在安全隐患且耗时长,在人群之间病例的检查及暴发调查等紧急情况下并不适用^[5]。自 Weight 在 1897 年建立了试管凝集反应后,血清学检测技术得到快速的发展和改进,包括各种凝集反应、沉淀反应、补体结合反应、试纸试验、标记抗体技术以及 20 世纪 70 年代发展起来的高灵敏度酶联免疫吸附试验^[6]。其中补体结合试验(Complement fixation test, CFT)是公认的确诊方法,但其实验条件复杂苛刻^[7],结果判断也具有一

定主观性,目前在国内很少被采用。试管凝集反应(Serum agglutination test, SAT)敏感性较高,但单独使用时特异性较差,而且部分感染动物的抗体滴度达不到诊断水平,因而也易造成误诊和漏诊^[8]。高灵敏度、简便、快速的检测技术正在取代现有的常规测试。

荧光偏振方法(Fluorescence polarisation assay, FPA)是以荧光素标记物作为示踪剂^[9]来检测抗原/抗体相互作用的一种简便技术^[10],该方法属于同源性分析,分析物不需进行分离,因而该法简便快捷。FPA 诊断布鲁氏菌的特异性和敏感性几乎和竞争 ELISA (Competitive enzyme-linked immunosorbent assay, C-ELISA)相同^[11],一次检测仅需 15 min,即可完成上百份样品的检测,可应用于动物群体布鲁氏菌病的检疫、筛查和净化。FPA 检测方法在某些发达国家已经得到了大量应用,并经研制开发了商品化 FPA 检测试剂盒。而我国对 FPA 检测方法的研究起步较晚,目前尚无商品化 FPA 检测试剂盒,进出口贸易中牛、羊布鲁氏菌病 FPA 检测方法均依赖于使用进口试剂盒,因此开发布鲁氏菌荧光偏振抗体检测方法有其现实意义。

本研究使用异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的布鲁氏菌光滑型 LPS 的小分子片段脂多糖-O-链(O-polysaccharide, OPS)作为抗原,通过对标记抗原、反应条件、结果判断标准等多方面条件的优化,建立敏感性和特异性良好的布鲁氏菌荧光偏振方法,为多种动物布病检测提供快速高通量的新技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:猪布鲁氏菌 S2 菌株(CVCC 70502)由本实验室保存。

1.1.2 实验用血清:布鲁氏菌病阳性血清国家标准品由本实验保存,布鲁氏菌病阴、阳性血清样本由本实验采集并保存。

1.1.3 主要试剂和仪器:布鲁氏菌荧光偏振试剂盒购自 Diachemix 公司;胰大豆肉汤(TSB)和胰大豆琼

脂(TSA)购自美国 BD 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)、表面活性剂脱氧胆酸钠(Sodium deoxycholate)、三乙胺购自 Sigma 公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自康为世纪公司。低温离心机购自 Sigma 公司;超声破碎仪购自新芝生物科技有限公司;Powerpac Universal 通用型电源购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 OPS 的提取及标记:(1) OPS 提取。鉴定合格的 *B. suis* 2 株二级种子,大量培养并灭活,参照世界动物卫生组织(OIE)编著的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》^[12]提取 OPS。上清液置 100 倍蒸馏水透析过夜,用 PEG 8000 浓缩 40 倍,再次置于蒸馏水透析过夜,收集透析袋内容物,分装成 2 mL/瓶冻干保存,此即提纯的 OPS。

(2) OPS 鉴定与标记。参照徐先栋等^[13]改良的脂多糖快速银染方法对其进行银染。银染鉴定的 OPS 进行标记,步骤如下:将 4 mg OPS 加入到 2 mL 0.5% (体积比)的三乙胺溶液中,置 4 °C 超声处理 15 min,超声后加入 200 μ L 100 mmol/L 的 EDTA 溶液,并用 10 μ L 1 mol/L 的盐酸将溶液 pH 调为 5.0。取 20 mg FITC (异构体 I)溶解于 800 μ L 0.25 mol/L 的硼酸溶液(pH 10.5)中,然后全部加入到 OPS 溶液中,继续超声处理 1 min。加入 1 mL 1.6%脱氧胆酸钠溶液,37 °C 搅拌孵育 18 h。4 °C、10 000 \times g 离心 30 min,浓缩,透析,将透析物用 PD-10 柱脱盐,收集所有 FITC-OPS 标记物,合并后再浓缩,透析,收集透析后产物 4 °C 保存,即为标记抗原原液。

1.2.2 FPA 试剂盒条件优化:(1) FPA 步骤。取反应板,将待检血清、阳性对照血清和阴性对照血清分别加入到 ELISA 板中,20 μ L/孔,其中阳性对照血清加 1 孔(孔 1)和阴性对照血清各加 3 孔(孔 2、3、4)。加样过程要注意避免产生气泡。每孔加 180 μ L 样品稀释液,充分混匀。室温下孵育反应板 3-5 min。读取每孔的空白值。每孔立即加入 10 μ L 荧光标记抗原,充分混匀。室温下孵育反应板 3-5 min。读取每孔偏振值。

(2) 布鲁氏菌荧光偏振(FPA)检测试剂盒阴、

阳性对照血清的制备。采用虎红平板凝集试验、试管凝集试验及补体结合试验检测临床牛。3种方法均检测为阴性的牛作为制备阴性血清的候选牛。

对3种方法均检测为阳性的牛进行强毒株 M28 免疫, 当效价超过 800 IU/mL 时制备阳性血清。

(3) 布鲁氏菌荧光偏振试剂盒(FPA)标记抗原浓度及稀释液的选择。棋盘法分别采用阴性和阳性血清各两份, 通过稀释抗原浓度与选用不同的样品稀释液确定该方法的抗原稀释浓度和最佳样品稀释液。

1.2.3 临界值的确定: 取经虎红平板凝集试验、试管凝集试验、补体结合试验检测均为阳性的血清 148 份、阴性血清 155 份, 测定偏振值。采用 SPSS17.0 软件对检测结果进行分析。使用非参数法构建 ROC 曲线, 并以 Youden 指数最大的切点作为阴性和阳性判断的临界点, 同时确定该试剂盒的敏感性和特异性。

1.2.4 重复性试验及保存期试验: 制作 3 批试剂盒(分别命名为 201506、201507、201508), 使用由本实验室采集并保存的阳性血清测定试剂盒批内和批间的重复性。

1.2.5 临床样本检验: 将临床采集的 400 份样品分别使用本实验建立的 FPA 方法和进口 FPA 试剂盒进行检测, 比较其差异性。

2 结果与分析

2.1 布鲁氏菌 S2 特性

细菌接种后, 经 37 °C 培养 2-4 d 后在 TSA 平板上可见菌落边缘整齐、圆润, 露滴状, 斜光照射逆光观察微带蓝色乳光。革兰氏染色为阴性, 显微镜下观察为球杆菌, 单个散在。菌落传代培养后进行 PCR 鉴定的扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 出现 2 条特异性 PCR 条带, 大小分别为 178 bp 和 285 bp (图 1)。

2.2 OPS 鉴定

OPS 提取物与参照 OIE 手册提取的 LPS 比较, 主要条带清晰且位置相同, 分子量约为 10 kD, 可与异硫氰酸荧光素结合并用作荧光偏振示踪剂(图 2)。

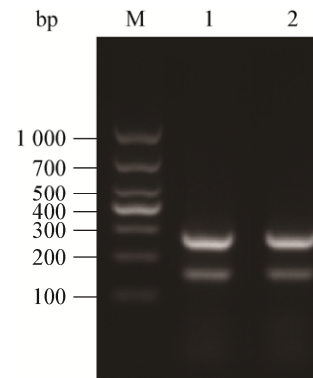


图 1 布鲁氏菌 S2 的凝胶电泳图

Figure 1 Gel electrophoresis of *Brucella* S2

注: M: Marker; 1: 猪种布鲁氏菌 S1330; 2: 猪种布鲁氏菌 S2.

Note: M: Marker; 1: *Brucella suis* S1330; 2: *Brucella suis* S2.

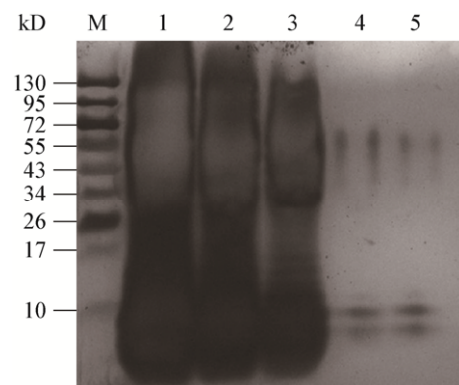


图 2 布鲁氏菌 S2 的 OPS 银染图

Figure 2 OPS silver staining of *Brucella* S2

注: M: Marker; 1-3: 脂多糖; 4-5: 脂多糖-O-链.

Note: M: Marker; 1-3: LPS; 4-5: OPS.

2.3 阳性对照血清制备

二免 14 d 后采血, 观察血清制品色泽为淡黄或微红色澄明液体。按现行《中华人民共和国兽药典》附录进行检验, 为无菌生长。测定试管凝集效价, 912、936 和 963 号牛进行二次免疫后采用试管凝集试验测定的效价分别为 1:900、1:1 000、1:1 200。进一步用阴性对照血清将分离的阳性血清按比例稀释到预期效价为 1:320, 加入 ProClin 300 (SUPELCO 公司)至终浓度为 0.05%, 无菌分装, -20 °C 保存备用, 作为试剂盒中布病阳性血清。

2.4 阴性对照血清制备

血清制品色泽为淡黄或微红色澄明液体。按现

表 1 3 种稀释液 FPA 结果(mP)比较

Table 1 FPA results (mP) of three kinds of dilution comparison

样品稀释液 Sample diluent	阳性血清 1 Positive serum1	阳性血清 2 Positive serum2	阴性血清 1 Negative serum1	阴性血清 2 Negative serum2
碳酸盐缓冲液 Carbonate buffer solution	96	91	0	4
磷酸盐吐温缓冲液 PBST	88	84	-4	-1
0.5%蔗糖的磷酸缓冲液 0.5% sucrose phosphate buffer solution	112	109	-2	3

注: δmP =样品的 mP-阴性血清 mP 的平均值.

Note: δmP =Sample mP-Negative serum mP.

行《中华人民共和国兽药典》附录进行检验,为无菌生长。经虎红平板凝集试验、试管凝集试验及补体结合试验检测均为阴性。无菌分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用,作为试剂盒中布病阴性血清。

2.5 样品稀释液选择结果

通过对 3 种样品稀释液比较,阳性血清反应 δmP 值最高者作为效果最好的稀释液,结果可知 0.5%蔗糖的磷酸缓冲液阳性血清反应 δmP 值最高。表明含 0.5%蔗糖的磷酸缓冲液作为稀释液的稀释效果最好,结果见表 1。

2.6 标记抗原的稀释浓度及检验

标记抗原原液用抗原保护剂(商品化)稀释至 250、500、1 000、2 000 倍,随着抗原浓度的降低,FPA 检测的敏感性逐步提高;当标记抗原作 1:1 000 倍稀释时,FPA 检测方法的灵敏度为 5 IU/mL,结果见表 2;与 ELISA 方法和布鲁氏菌抗体检测试

纸条灵敏度一致,因此确定最佳抗原稀释浓度为 1:1 000。稀释抗原即为 FPA 试剂盒标记抗原,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 棕色瓶避光保存,并且标记抗原为无色透明液体,按现行《中华人民共和国兽药典》附录进行检验,无菌生长。

2.7 临界值的确定

对 148 份阳性血清和 155 份阴性血清进行检测,结果阳性血清和阴性血清在 2 个明显不同的范围之内(图 3)。得到敏感性和特异性相关的 ROC 曲线(图 4)。

从 ROC 曲线相关的一系列有关敏感性与特异性的数值中,选择 Youden 指数最大值作为本方法的临界值。本研究中 Youden 指数最大值为 0.997,所对应的 δmP 值为 20,最终临界值确定为 20,此临界值对应的敏感性为 98.6%,特异性为 98.7%。

表 2 不同抗原稀释浓度 FPA 结果比较
Table 2 FPA results of different antigen dilution concentrations

血清 Serum	抗原稀释倍数 Antigen dilution factor			
	1:250	1:500	1:1 000	1:2 000
阳性血清 1 Positive serum1	96	46	21	18
阳性血清 2 Positive serum2	90	42	20	15
阴性血清 1 Negative serum1	-4	-2	0	2
阴性血清 2 Negative serum2	-2	0	1	3

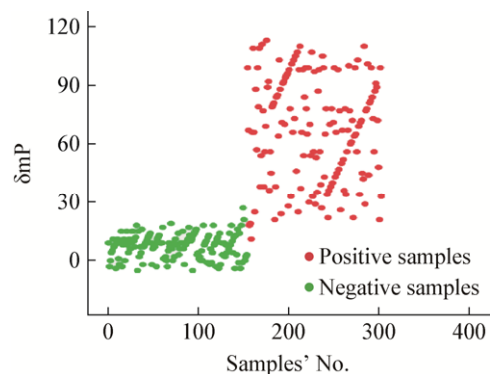


图 3 148 份阳性血清和 155 份阴性血清检测的结果分布图
Figure 3 Scattergram of detection result for the 148 *Brucella* positive samples and 155 *Brucella* negative samples

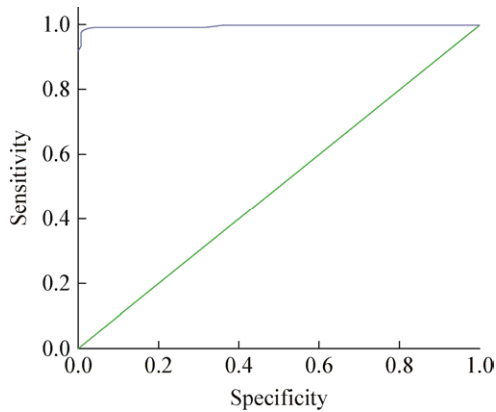


图4 ROC 曲线

Figure 4 Receiver operating characteristic curve

2.8 重复性实验

3 批 FPA 试剂盒检测梯度稀释阳性对照血清的结果一致, 血清效价均检测至 1:64 倍(δmP 值 ≥ 20), 结果见表 3。3 批 FPA 试剂盒检测已知 148 份阳性血清的敏感性均为 98.0%, 说明建立的方法具有良好的重复性, 结果见表 4。3 批 FPA 试剂盒检测

已知 155 份阴性血清, 特异性均为 98.7%, 结果见表 5。

2.9 符合率实验

在临床检测的 400 份牛血清样本中, FPA 检测试剂盒检测出 207 份阳性和 193 份阴性, 进口 FPA 试剂盒检测出 209 份阳性和 191 份阴性。检测结果不符的样本为 16 份, 两种试剂盒的总符合率为 94%。具体结果见表 6。结果可知两试剂盒符合率较高, 说明本试剂盒检测结果较好, 弥补了国内 FPA 试剂盒空缺。

3 讨论

由于传统布病诊断方法(如 RBPT、SAT、CFT)存在各种缺陷, 使其逐步被迅速、简便、特异性和敏感性良好的血清学检测方法(ELISA 或 FPA)所取代。其中 FPA 方法简便、快速、通量大、特异性和敏感性都较高, 极适合于大批量牛布鲁菌病检测、筛查和疫病监控, 被 OIE 收录为布鲁氏菌病

表 3 对梯度稀释的阳性对照血清的灵敏度检测
Table 3 Sensitivity tests for gradient-diluted positive control serum

稀释倍数 Dilution factor	批号 Batch number					
	201506		201507		201508	
	δmP 值 δmP value	结果判定 Result determination	δmP 值 δmP value	结果判定 Result determination	δmP 值 δmP value	结果判定 Result determination
1:2	100	+	96	+	101	+
1:4	93	+	88	+	95	+
1:8	80	+	82	+	81	+
1:16	71	+	71	+	75	+
1:32	40	+	53	+	56	+
1:64	34	+	30	+	36	+
1:128	7	-	14	-	10	-
1:256	0	-	7	-	0	-
1:512	-2	-	-1	-	2	-
阳性对照 mP 值 Positive control mP value	183	/	187	/	184	/
阳性对照 δmP 值 Positive control δmP value	108	/	110	/	112	/
阴性对照 mP 平均值 Negative control mP average value	75	/	77	/	72	/

注: 布鲁氏菌荧光偏振(FPA)检测试剂盒的判定标准为: 样本 $\delta mP \geq 20$ 时, 布鲁氏菌抗体阳性(标为“+”); 样本 $\delta mP < 20$ 时, 为布鲁氏菌抗体阴性(标为“-”).

Note: Criteria of *Brucella* fluorescence polarization (FPA) detection kit: sample $\delta mP \geq 20$, *Brucella* antibody positive (marked “+”); sample $\delta mP < 20$, *Brucella* antibody negative (labeled “-”).

表 4 对已知阳性血清的敏感性分析
Table 4 The test result of sensitivity experiments to known positive serum

	201506	201507	201508
Di Positive number/total (positive rate, %)	145/148 (98.0)	145/148 (98.0)	145/148 (98.0)

表 5 对已知阴性血清的特异性分析
Table 5 The test result of specificity experiments to known negative serum

	201506	201507	201508
阴性数/总数(阴性率) Negative number/total (negative rate, %)	153/155 (98.7)	153/155 (98.7)	153/155 (98.7)

表 6 牛布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒与进口试剂盒符合率

Table 6 The coincidence rate between FPA kits and import kits

		Brucella FPA		
		P	N	Total
荧光偏振试剂盒 FPA kit	P	105+95=200	3+4=7	207
	N	3+6=9	88+96=184	193
	Total	209	191	400
符合率 Coincidence rate		(200+184)/200=94%		

检测方法之一^[14]。在 Nielsen 等最早建立了检测布鲁氏菌病的 FPA 检测方法后^[15]，近年来有许多学者报道建立了对布鲁氏菌病的 FPA 检测方法。而目前我国布病 FPA 检测试剂盒研制仍为空白，该方法的样品检测完全依赖进口。本实验建立的 FPA 方法在特异性、敏感性、稳定性和可操作性方面均达到国际水平，有效解决了我国布病 FPA 试剂盒依赖进口、价格昂贵的困境。

我国目前使用的布鲁氏菌疫苗主要有 3 种(均为光滑型)：牛种 A19、羊种 M5、猪种 S2^[16]，其中以 S2 疫苗株使用最为广泛^[17]。猪种布鲁氏菌 S2 株是目前已知毒力最弱的光滑型布鲁氏菌疫苗株，利用该疫苗株制备 FPA 抗原，大大降低了细菌培养和 OPS 制备过程的生物安全风险，减少了生产成本，因此选择提取 S2 疫苗株的 OPS 作为标记抗原，以期检测不同种布鲁氏菌的抗体。

检测方法临界值直接影响检测结果的准确性。在统计学上，检测方法的特异性和敏感性往往会呈现矛盾。有学者指出，提高临界值会使特异性提高，减少假阳性的出现，但同时会引起灵敏度的下降^[18]。所以，确定合适的临界值对于 FPA 方法的建立以及后期结果判断十分重要。本研究中，为了客观评价试剂盒的特异性和敏感性，选择了 343 份 RBPT 初步检测为布病阳性的田间样本，再用 SAT 和 CFT 检测，共确定了 148 份 3 种方法均检测为布病阳性的血清作为阳性参照血清，并用同样的方法确定了 155 份布病阴性参照血清。用建立的 FPA 方法检测上述背景清楚、数量充足的样本，结果阳性血清和阴性血清基本落在 2 个明显不同的范围内，说明本方法能够有效区分布病阴、阳性血清；对检测结果进行生物统计分析，得到敏感性和特异性相关的 ROC 曲线。从 ROC 曲线相关的一系列有关于敏感性与特异性的数值中，选择 Youden 指数最大值作为本方法的临界值。本研究中 Youden 指数最大值为 0.997，所对应的 δmP 值为 20，最终临界值确定为 20，此临界值对应的敏感性为 98.6%，特异性为 98.7%。通过向上调整截止值，特异性可以增加至 100%，但损失灵敏度。在这种类型的分析中，选择在特定情况下使用的最合适的临界值，取决于特异性和灵敏度要求。

FPA 检测方法的敏感性为 2-8 IU/mL 时，FPA 诊断布鲁氏菌的特异性和敏感性几乎和竞争 ELISA 相同，比较合理。最终确定标记抗原作 1:1 000 倍稀释时，FPA 方法的检测灵敏度与 ELISA 方法和布鲁氏菌抗体检测试纸条一致，敏感性均为 5 IU/mL。

本实验建立了一种布鲁氏菌抗体高通量检测技术，其核心是将提纯的布鲁氏菌光滑型 LPS 的小分子片段 OPS 标记上异硫氰酸荧光素，用作抗原。加到待检血清或全血，用于检测多种动物血清中的光滑型布鲁氏菌抗体。检测 92 份样品，不需要重复洗涤未结合的反应物，可在 15 min 内完成，大大缩短了高通量检测所需的时间，因此该方法具有极其广阔的应用前景^[19]。

4 结论

本实验通过抗原、反应条件、结果判定标准多方面条件的优化建立的布鲁氏菌荧光偏振试剂盒具有良好的敏感性和特异性,其敏感性和特异性分别达到 98.6%和 98.7%。与国内相关布鲁氏菌检测试剂盒相比,本试剂盒具有方便、省时等优点。

参考文献

- [1] Mei JJ, Shi HY. Progress on surface antigens of *Brucella* spp.[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(10): 13-18 (in Chinese)
梅建军, 石慧英. 布鲁氏菌表面抗原研究进展[J]. 动物医学进展, 2005, 26(10): 13-18
- [2] Ding JB, Cheng JS, Mou W, et al. Construction of a *WboA*-deficient *Brucella suis* S2 strain and its immune effect[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(8): 2448-2453 (in Chinese)
丁家波, 程君生, 牟巍, 等. 布鲁氏菌 S2 *WboA* 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
- [3] Wang JL, Hu S, Zheng XH, et al. Preparation and identification of the monoclonal antibody against smooth *Brucella* LPS[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2009, 31(8): 642-645, 649 (in Chinese)
王加兰, 胡森, 郑孝辉, 等. 光滑型布鲁氏菌 LPS 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(8): 642-645, 649
- [4] Zi ZC, Kang WH, Ma Y, et al. Fluorescence polarisation assay for detection of brucellosis[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2014, 30(10): 1057-1061 (in Chinese)
訾占超, 亢文华, 马英, 等. 荧光偏振技术在布鲁氏菌病检测中的应用[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(10): 1057-1061
- [5] Zhong YH, Wang P, Song ZZ. Research progress of brucellosis detection[J]. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 2012, 27(2): 90-93 (in Chinese)
钟佑宏, 王鹏, 宋志忠. 布鲁杆菌病检测研究进展[J]. 中国地方病防治杂志, 2012, 27(2): 90-93
- [6] Weight AE. On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever: and on the further application of the method of serum diagnosis to the elucidation of certain problems in connexion with the duration of immunity and the geographical distribution of disease[J]. The Lancet, 1897, 149(3836): 656-659
- [7] Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 90(1/4): 447-459
- [8] Zeng RX, Su YH. Comparison of various detection methods of *Brucella*[J]. Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2006(5): 65-70 (in Chinese)
曾瑞霞, 苏玉虹. 布鲁氏杆菌各类检测方法的比较[J]. 现代畜牧兽医, 2006(5): 65-70
- [9] Nielsen K, Gall D, Jolley M, et al. A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*[J]. Journal of Immunological Methods, 1996, 195(1/2): 161-168
- [10] Millet DB, Guenther A, Siegel DA, et al. Global atmospheric budget of acetaldehyde: 3-D model analysis and constraints from in-situ and satellite observations[J]. Atmospheric Chemistry and Physics, 2009, 10(7): 3405-3425
- [11] Zhao C, Zhang L, Ni Y. Development of fluorescence polarization in life sciences[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(16): 3154-3156 (in Chinese)
赵晨, 张亮, 倪原. 荧光偏振技术在生命科学中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(16): 3154-3156
- [12] International Office of Epizootics. Biological Standards Commission, International Office of Epizootics. International Committee. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees[S]. Office international des épizooties, 2008
- [13] Xu XD, Xie ZY, Wang SF, et al. A modified Silver-staining method for lipopolysaccharides detection[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(3): 95-97 (in Chinese)
徐先栋, 谢珍玉, 王世锋, 等. 脂多糖快速银染检测方法的改良[J]. 生物技术通报, 2009(3): 95-97
- [14] Dajer A, Luna-Martínez E, Zapata D, et al. Evaluation of a fluorescence-polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in México[J]. Preventive Veterinary Medicine, 1999, 40(1): 67-73
- [15] Nielsen K, Gall D, Smith P, et al. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use[J]. Veterinary Microbiology, 2001, 80(2): 163-170
- [16] Wang XG, Lin PF, Li Y, et al. *Brucella suis* vaccine strain 2 induces endoplasmic reticulum stress that affects intracellular replication in goat trophoblast cells *in vitro*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2016, 6: 19
- [17] Mustafa AA, Abusowa M. Field-oriented trial of the Chinese *Brucella suis* strain 2 vaccine on sheep and goats in Libya[J]. Veterinary Research, 1993, 24(5): 422-429
- [18] Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, et al. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(10): 3245-3248
- [19] Wang YL, Li BW, Liu HM. Sensitivity and specificity evaluation of fluorescence polarization detection methods of bovine brucellosis[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2012, 48(11): 25-26 (in Chinese)
王玉玲, 李丙文, 刘红梅. 牛布鲁菌病荧光偏振检测方法敏感性和特异性评估[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(11): 25-26