

布 鲁 氏 菌 病

实验诊断的非特异性反应及其鉴别

尚德秋 于思庶 赵恒云 主编

7
海 洋 出 版 社

R516.7
SDQ

布鲁氏菌病实验诊断的 非特异性反应及其鉴别

尚德秋 于思庶 赵恒云 主编



海洋出版社



A0283303

内 容 提 要

本书共分6章,29节。其内容包括布鲁氏菌病实验诊断的基本原理与技术,其中有血清学、细胞学及过敏反应等。本书着重阐述近几年国内外有关学者在布鲁氏菌病实验诊断中所遇到的各类非特异性反应:自然抗体、免疫球蛋白受体引起的非特异性干扰,以及与布鲁氏菌有共同抗原的各种微生物所引起的非特异交叉反应,并对产生这些非特异性反应的原因进行了分析。本书还从实际应用出发,详细介绍了排除各种类型非特异性反应的技术方法。在本书最后还附有近年来国内外有关这方面调查研究的参考文献。对从事传染病医学研究者、各兽医站及对在基层工作的人、兽医工作者均有参考使用价值。

布鲁氏菌病实验诊断的非特异性反应及其鉴别

尚德秋 于恩庶 赵恒云 主编

*

海洋出版社出版(北京市复兴门外大街1号)

新华书店北京发行所发行 星城印刷厂印刷

开本: 184×130 1/32 印张: 9 字数: 200千字

1995年10月第一版 1995年10月第一次印刷

印数: 1—1000

*

ISBN 7-5027-3812-6/R·73

定价10.00元

主 编 尚德秋 于恩庶 赵恒云

副主编 肖东楼 杨 岩 迟文平 阎守敦

编 委 （以姓氏笔划为序）

于恩庶 王伟导 刘志文

肖东楼 李元凯 迟文平

尚德秋 杨 岩 卿 燕

阎守敦 赵恒云 鲁齐发

前 言

布鲁氏菌病是一种既影响畜牧业发展，又影响人类健康的较为严重的人畜共患的传染病。由于人畜感染布鲁氏菌后，经过一定潜伏期所出现的多种多样临床表现是没有特征性的，故在诊断人畜布鲁氏菌病时很大程度上依赖于特异性的实验室检查。过去几十年，采用各种特异性血清学、细胞学和过敏反应等方法，在诊断人畜布病、执行控制该病计划以及疫情监测中都发挥了重要作用。但在多年的实践中也逐渐看到了人畜血清对布鲁氏菌抗原呈阳性反应的并不都是因布鲁氏菌感染引起，其中有相当一部分阳性是属于非特异性交叉反应。尤其是近十几年来，随着对这种反应的研究的深入发展，越来越感到这些非特异性反应在干扰布鲁氏菌病诊断中的严重性及解决这个问题的迫切性。

当前国内外报告的资料认为，干扰人畜布鲁氏菌病诊断的非特异性交叉反应约占布鲁氏菌病阳性反应的10%~30%。这些反应包括血清学试验、皮肤过敏反应和免疫细胞学分析等。其中有的是布鲁氏菌感染对其他微生物抗原呈现的假阳性反应，有的是耶尔森氏菌、大肠菌等各种微生物感染对布鲁氏菌抗原呈现的阳性反应，有的是既查不到布鲁氏菌感染，也查不到其他微生物感染，而对布鲁氏菌抗原呈现的阳性反应等。这不仅影响对布鲁氏菌病的正确诊断以及准确判定疫情，同时也干扰了对小肠结肠炎、结核、伤寒等其他疾病的诊断和疫情分析，从而影响及时治疗和执行防治措

施。

鉴于此，国内外有关学者进行了多方面探索，寻求解决这类问题的途径和方法。经多年努力，某些非特异性反应得到良好解决，对某种干扰在某种程度上也得以澄清，而对影响诊断较严重的耶尔森氏菌O:9型的交叉反应，在某些情况下也可以适当地排除。为将这些国内外研究成绩展现出来，并为从事这方面工作的同道提供解决此类难题的新线索，我们编著了此书。

希望本书能成为从事这方面研究及实际工作的同行们有益参考资料。但因编著者的水平及其他因素的影响，书中难免出现这样或那样的不足，甚至于有谬误之处，望同道们不吝赐教，以期再版时予以改正。

编委会

1995年4月29日

目 次

第一章 布鲁氏菌病实验诊断基础知识	(1)
第一节 实验诊断的分类.....	(1)
第二节 布鲁氏菌的抗原结构.....	(4)
第三节 病原学诊断及其特点.....	(17)
第四节 布鲁氏菌病血清学诊断及其特点.....	(30)
第五节 免疫细胞学检查及其评述.....	(58)
第六节 过敏反应诊断意义及特点.....	(61)
第七节 乳汁诊断布鲁氏菌病的意义.....	(63)
第八节 绵羊附睾种布鲁氏菌感染后的血清学诊断及其特点.....	(66)
第二章 布鲁氏菌病实验诊断的非特异性反应类别 ...	(73)
第一节 自然抗体干扰布鲁氏菌病诊断类.....	(73)
第二节 免疫球蛋白受体引起的非特异性反应类.....	(78)
第三节 与布鲁氏菌有共同抗原的微生物对诊断的干扰类.....	(88)
第四节 交叉过敏反应类对布鲁氏菌病诊断的影响.....	(105)
第三章 与布鲁氏菌有共同抗原的非特异性交叉反应	(108)
第一节 与土拉伦斯菌 (<i>F. tularensis</i>) 的交叉反应.....	(108)
第二节 与可夫曼N群血清型沙门氏菌 (<i>S. ur-</i>	

	bana) 的交叉反应.....	(114)
第三节	与假单胞菌(<i>Pseudomonas maltophilia</i>) 的交叉反应.....	(117)
第四节	与霍乱弧菌(<i>V.cholera</i>) 的交叉 反应.....	(119)
第五节	与埃希氏大肠杆菌(<i>E.coli</i>) 的交叉 反应.....	(120)
第六节	与耶尔森氏菌(<i>Yersinia</i>) O:9型的交 叉反应.....	(125)
第七节	与其他菌的交叉反应.....	(143)
第四章	出现非特异性反应的动物种类.....	(153)
第一节	实验动物(豚鼠、兔、小鼠).....	(153)
第二节	偶蹄类(牛、猪、骆驼).....	(158)
第五章	非特异性反应的鉴别.....	(167)
第一节	对自然抗体的排除.....	(167)
第二节	对Ig受体干扰诊断的排除.....	(168)
第三节	对与布鲁氏菌有共同抗原细菌交叉反 应的排除.....	(172)
第四节	对O:9型耶尔森氏菌交叉反应的排除...	(177)
第五节	在诊断 <i>B.ovis</i> 感染中非特异性反应及排 除.....	(196)
第六章	排除各种非特异性反应的技术.....	(200)
第一节	血清学技术.....	(200)
第二节	细胞学检查法.....	(251)
第三节	皮肤过敏试验.....	(257)
参考文献		(263)

第一章 布鲁氏菌病实验诊断

基础知识

在布鲁氏菌病防治中，实验诊断对于患布鲁氏菌病病人、病畜的确诊、治疗、及时发现传染源、进行流行病学调查、疫情控制和执行根除计划，以及疾病监测等方面都有着十分重要的意义，所以布鲁氏菌病的实验诊断始终是疾病研究的重要课题之一。近年来，实验诊断技术发展较快，各种技术方法都具有其优缺点，本章将介绍实验诊断的分类，病原学及血清学诊断及特点，免疫细胞学检查及过敏反应诊断的意义等。

第一节 实验诊断的分类

布鲁氏菌病实验诊断包括病原学诊断；血清学诊断；免疫细胞学检查；过敏反应诊断及乳汁检查等。

一、病原学诊断

病原的分离是确诊布鲁氏菌病的最可靠的方法，且布鲁氏菌的分离意义，不单单是为病人和病畜确诊，它对布鲁氏菌病的流行病学，宿主的转移，防治对策的制定，防治效果的考核及布鲁氏菌病的监测等都有特殊价值。

病原学诊断包括布鲁氏菌的分离培养、鉴定等。分离方

法包括血培养，骨髓培养，尿培养，动物中流产胎儿解剖分离，胎衣中的细菌分离，乳汁及其他分泌物的分离培养等。为了提高布鲁氏菌的分离率和减少杂菌的污染，常常应用接种敏感动物的方法进行分离培养。这种方法与直接培养分离率相比有较大幅度的提高。如我国广西兽医研究所曾在25头猪的待检材料中直接分离培养出2株猪种布鲁氏菌，而同时将病料接种敏感动物豚鼠后分离出14株猪种布鲁氏菌，分离率提高了7倍之多。

此外还有人比较了直接培养与接种未受精鸡卵的方法，即将病人血样同时分成两份，一份直接培养，另一份无菌程序接种在鸡蛋的卵黄中培养7天后，再接种到培养基上，结果细菌的检出率比直接法提高了3倍。

分离出的布鲁氏菌需要初步鉴定，一般根据培养物菌落形态、涂片染色观察、布鲁氏菌阳性血清凝集等可初步判定为布鲁氏菌。如果分离物某些特性异常，或分离宿主异常，需用常规和特殊布鲁氏菌鉴定技术来进行鉴定。

近年来，随着分子生物学的发展，基因诊断技术以它特有的高度敏感性，高度特异性等优点，渗透到生物学界各个领域，在传染病的诊断方面，包括病毒、细菌、支原体、寄生虫病等都有所应用。在布鲁氏菌病诊断方面，虽然起步较晚，还处于实验室研究阶段，一旦各种基因诊断技术方法成熟，就可以解决布鲁氏菌病诊断中一些难度较大的问题(如布鲁氏菌与其他细菌的交叉反应，感染与免疫的鉴别，布鲁氏菌病的早期诊断及慢性布鲁氏菌病的诊断问题)，而使布鲁氏菌病的诊断水平提高到一个新阶段，同时通过对其发病机理，治愈标准，疗效判定等都可能对过去未认识的微观世界进行

揭示，从而提高我们防治布鲁氏菌病的水平。基因诊断技术包括：核酸探针技术，多聚酶链反应技术（PCR）及原位PCR技术等。

二、血清学诊断分类

血清学诊断分类包括血清凝集反应（可分直接凝集和间接凝集反应试验），补体参与的试验，琼脂扩散沉淀反应，免疫电泳技术，放射免疫技术，免疫荧光技术和酶联免疫技术与免疫酶斑点试验等。

凝集反应包括试管凝集、玻片凝集、酸化平板抗原试验及其他方法。如：热灭活试验，含巯基化合物处理血清的凝集试验，雷凡诺尔凝集试验及EDTA处理凝集试验，虎红平板凝集和胶乳凝集试验（LAT）等，还有间接血凝试验、不完全抗体试验等。这些从实践中发展起来的方法，都试图解决布鲁氏菌病诊断中的各种缺点，提高特异性，增加敏感度。

以检查IgG为主的补体结合试验（CFT），可分为温补体结合试验和冷补体结合试验。

以乳液为样本的家畜布鲁氏菌病诊断，包括乳环反应，乳清凝集和乳的ELISA试验。

琼脂扩散沉淀技术，免疫电泳技术和对流电泳技术，多用于抗原分析及布鲁氏菌病的诊断。琼脂扩散反应一般特异性较强，敏感性较差，但是应用热盐水法提取的抗原，采用双向凝胶扩散试验，检查绵羊附睾种布鲁氏菌病是一种比较常用的方法。免疫电泳技术，主要也是用于布鲁氏菌的抗原分析，很少用于布鲁氏菌病的诊断，免疫电泳较琼脂扩散技术的敏感性要高。对流电泳技术较琼脂扩散、免疫电泳的敏

感性都要好，且快速、简便，但由于影响因素较多，稳定性差，影响到实际应用。

免疫荧光技术，放射免疫技术和酶联免疫技术都是60年代发展起来的技术，其特点为特异性和敏感性较好，但操作相对较复杂，且技术操作，抗原提取等一系列问题尚无统一标准。待标准化后，可能成为最有竞争力的技术方法。

三、免疫细胞学诊断技术

免疫细胞学诊断技术是随着免疫学发展而发展起来的诊断技术，由于操作较复杂，稳定性较差，很少用于人、畜布鲁氏菌病的诊断上。有少量报告表明，诊断中曾应用这些方法，但仅作为参考指标。不过，这种技术对于今后深入地进行布鲁氏菌病发病机理、免疫、诊断、治疗等方面的研究还是有十分重要意义的。它包括淋巴细胞转化试验，白细胞游走抑制试验，E玫瑰花形成试验等。

四、皮肤过敏试验

利用皮肤过敏试验诊断人、畜布鲁氏菌病是一项有80年历史的诊断技术。该方法经过多年实践，已证明是特异的、敏感的、简便易行的方法。它不仅应用于病人的诊断，在为羊、牛、马、豚鼠、小鼠、家兔诊断中也都有所应用。

第二节 布鲁氏菌的抗原结构

所谓抗原结构，一般是指各种生物体（包括细胞、细菌、真菌、病毒等）具有多种抗原成分的性质、数量、分布

及抗原构成的分子结构。抗原的化学组成主要是蛋白质、多糖、类脂等。

一、布鲁氏菌的多糖

人们很早就了解到布鲁氏菌有不同的血清型。早在1932年, Wilson和Miles就确定A抗原是光滑型牛种布鲁氏菌的主要抗原, M抗原是光滑型羊种布鲁氏菌占优势的抗原。两年后Topping报道用加热方法和稀醋酸处理得到了牛种、羊种布鲁氏菌具有抗原性的多糖, 但未能阐明两种抗原的差异。直到最近, Redfearn证实牛种布鲁氏菌1生物型菌株光滑型脂多糖(S-LPS)含有A抗原, 而Diaz提出脂多糖蛋白复合物中同时含有A和M抗原, 而以A抗原制备的兔抗A因子血清与牛种布鲁氏菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌O:9发生凝集, 这种细菌之间的交叉反应可能是由于它们O-多糖的相似性。

布鲁氏菌和一些革兰氏阴性细菌, 其光滑型脂多糖是由O-多糖通过核心寡糖连接到类脂A上, 而后者把整个脂多糖分子镶嵌在外膜上(图1-1)。实际上光滑型脂多糖和细胞主要抗原决定簇存在于O-多糖部分。

1985年, L'vov等研究了羊种布鲁氏菌的多糖和脂多糖抗原, 发现羊种布鲁氏菌的O-多糖结构与牛种布鲁氏菌的O-多糖结构基本相似, 两者均为4,6-二脱氧-4甲酰氨基- α -D吡喃甘露糖残基的均质多聚体。但这不能说明A抗原和M抗原在血清学方面的差异。实际上除下面叙述差异外, 在纯化的A和M抗原的O-多糖的旋光活性也不同。这也表现在 ^1H 和 ^{13}C -核磁共振谱上。经深入研究的结果分析表明, A抗原

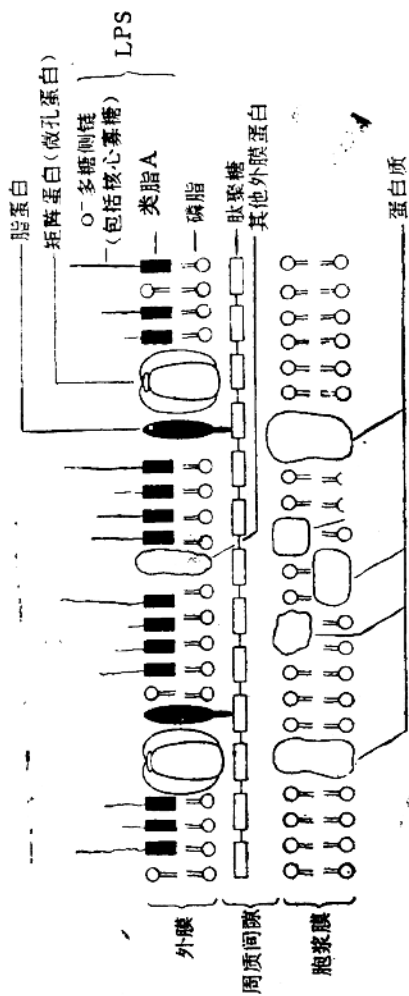


图1-1 革兰氏阴性细菌细胞表层断面的模式图

基本上是以1,2联键连接的4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -D吡喃甘露糖残基的多聚体, M抗原则是含一个1,3联键和4个1,2联键的4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -D吡喃甘露糖残基组成的五糖重复单位形成的线性多聚体。根据上述研究的结果, Perters和Bundle报道了合成以1,2联键连接的4,6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -D吡喃甘露糖残基(A抗原)和含有1,3联键结构(即M抗原)的寡糖, 以此提供了一种特异性诊断试剂。

早在1932年, Wilson等提出每种布鲁氏菌都有两类不同抗原, 但在含量上有所区别, 牛种布鲁氏菌以A抗原为主, 而羊种布鲁氏菌(1生物型)以M抗原为主, 且大量核磁共振谱分析也支持这一结论。即使在同一种布鲁氏菌中, M、A抗原含量也有差别, 如羊1型布鲁氏菌以M抗原为主, 羊2型以A抗原为主, 羊3型细胞表面含有A、M两种抗原。

由于抗原决定簇的相似性, 便产生了布鲁氏菌与其他细菌的交叉反应, 尤其是与小肠结肠炎耶尔森氏菌 O:9间的交叉。这两种菌的交叉反应就是由于光滑型脂多糖-蛋白复合物的O-多糖上的共同决定基都是以1,2-糖苷键连接的4, 6-二脱氧-4-甲酰氨基- α -D吡喃甘露糖残基形成的线性均质多聚物。与其他细菌的交叉反应, 如E. coli O:157, 沙门氏菌, 假单胞菌等所有这些有交叉反应的革兰氏阴性细菌均含有4-氨基-4,6- α -吡喃型甘露糖的N-酰基衍生物。可能正是由于含有这种氨基糖苷的抗原决定基才引起了上述交叉反应。

布鲁氏菌其他种类的多糖:

多糖B: 是用0.2mol/L三氯醋酸处理布鲁氏菌而提取出的一种低分子量糖类。多糖B曾引起人们极大的关注, 因为感染布鲁氏菌的动物能产生沉淀多糖B的抗体, 而免疫动物则

不能。但有些报道对此有些争论。Bundle等人从羊种布鲁氏菌16M菌株中提取、纯化了多糖B。通过结构分析证明其主要成分是42和71碳之间的环化的1,2- β 键连接吡喃葡萄糖残基的环状多聚物，基本上与其他细菌产生的环状D-葡萄糖相似，所有布鲁氏菌都含有多糖B。经纯化的环状 β -D葡萄糖并不显示抗原性，而以前所报道的多糖B引起的血清学反应，可能是由于制品中含有O-多糖的缘故。后来有人发现 β -D葡萄糖与羊种布鲁氏菌16M的S-LPS结合，形成复合物。因此多糖B粗制品的抗原性可能因制品中含有O-多糖成分所致。

多糖B是从粗糙型羊种布鲁氏菌B115细胞质内提取的，含有大量的葡萄糖（89%）。由此看来，它是胞内成分，不像O-多糖那样存在于细胞表面。

天然半抗原（NH）：天然半抗原是大分子多糖，应用不破坏脂多糖中共价键的方法，可以从布鲁氏菌内毒素中提取。其特点是不含KDO，不与细胞结合，可与蛋白质结合。另外有人纯化了天然半抗原，发现它与酸处理的布鲁氏菌光滑型脂多糖分离的O-多糖相类似，并可检出核心糖和KDO。关于天然半抗原的证实仍有许多争论。

鉴别牛种布鲁氏菌感染与免疫中多糖的差别：

前面提到在牛种布鲁氏菌感染与免疫的血清免疫扩散试验中，出现两种不同类型的沉淀反应。感染牛种布鲁氏菌野毒株的牛血清可沉淀光滑型脂多糖-蛋白复合物和多糖B（后经单克隆抗体试验证实为O-多糖），而用牛种布鲁氏菌S19菌苗免疫的牛血清只沉淀光滑型脂多糖-蛋白复合物。由此看来，牛种布鲁氏菌感染与免疫的差别在于布鲁氏菌的O-多糖。

在这多糖成分中，阐述了牛种布鲁氏菌和羊种布鲁氏菌中A、M抗原的异同，证实这些抗原的化学构成都是含有4-甲酰氨基-4,6-二脱氧- α -D吡喃甘露糖残基的N-酰化衍生物。而A、M抗原差别也就是M抗原的第15葡萄糖基通过1,3联键代替1,2联键连接4-甲酰氨基-4,6-二脱氧- α -D吡喃型甘露糖残基的差别。因而想到这种微小的差别所决定的A和M抗原是受何种基因调控？是不是这种调控基因决定布鲁氏菌的生物型？这些问题随着现代分子生物学的进展及对抗原结构的认识，终有一天能寻找到答案。

二、布鲁氏菌的蛋白抗原

布鲁氏菌的蛋白抗原包括细胞壁（外膜）和胞内蛋白抗原。研究布鲁氏菌蛋白抗原成分，主要是通过高效免疫血清和各种蛋白提取物采用免疫扩散或免疫电泳方法分析抗原成分。到目前为止，人们对布鲁氏菌蛋白抗原定位了解得很少。

近年来，随着各种技术的发展，对布鲁氏菌蛋白抗原的分析更加深入。在我国，应用SDS（十二烷基硫酸钠）提取的OMP（外膜蛋白）的PAGE（聚丙烯酰胺凝胶电泳）探讨了不同种布鲁氏菌蛋白图谱差异，为布鲁氏菌鉴定分型提供了一个新方法。并用羊种布鲁氏菌强毒株和弱毒株提取的可溶性蛋白和OMP的SDS-PAGE、薄层等电聚焦及高效液相色谱分析、证明在蛋白上强弱毒株有所区别。于恩庶等曾用Western-Blot技术对提取的布鲁氏菌OMP和Ye O:9的OMP进行布布鲁氏菌和Ye O:9感染的鉴别诊断。

1. 细菌壁蛋白抗原

布鲁氏菌也和其他革兰氏阴性菌一样，细胞表层是由细