

新的人兽共患传染病—— 狐狸阴道加德纳氏菌病的研究

IV. Dot-ELISA 检测狐狸阴道加德纳氏菌病血清抗体的研究

阎新华 严忠诚 阎喜军 栾凤英 王长凤

(中国农业科学院特产研究所 吉林 132109)

摘要 应用建立的 Dot-ELISA 方法检测了 192 份狐狸阴道加德纳氏菌人工感染狐、疫苗免疫狐和菌检阳性狐血清,结果 187/192 呈阳性反应,检出率为 97.3%。阻断和交叉试验证实,本方法具有特异性。敏感度为平板凝集试验 (PAT) 的 28.1 倍,为微量凝集试验 (MAT) 的 5.5 倍。重复性良好,与 PAT、MAT 的阳性符合率为 100%。

关键词 狐狸,阴道加德纳氏菌, Dot-ELISA

阴道加德纳氏菌 (*Gardnerella vaginalis*) 对人的感染在 50 年代初就得到证实^[1],而该菌的分类到 1980 年方有定论^[2]。人们在研究该菌的同时,试图找到实验动物感染模型,但均未成功。1987 年我国某些野生动物饲养场怀孕狐发生原因不明的大批流产,经病原菌分离鉴定和人工感染试验^[3,4]证实,病原菌为狐狸阴道加德纳氏菌 (*Gardnerella vaginalis* of fox),从而首次确定阴道加德纳氏菌为人兽共患,是引起狐发生传染性流产的主要病原菌^[5]。

尽管对人的阴道加德纳氏菌的研究进行了较长的时间,但大部分工作都集中于病原分离鉴定及分类研究上,感染定性仍局限于微生物学诊断。有关血清学方面的研究,Donna 等^[6]利用试管凝集和免疫荧光, Mary 等^[7]利用免疫扩散技术, Ison 等^[8]利用 Dot-ELISA 只研究了分离于人的部分阴道加德纳氏菌抗原性及血清学关系,尚未能确定一种用于人的阴道加德纳氏菌感染临床诊断的特异血清学方法。

作者从国内不同地区、不同品种的流产狐及其流产胎儿分离得到的 145 株该菌,通过抗原性测定,血清分型,筛选出一株代表流行型的优良菌株,用它制成超声波可溶性抗原,成功地进行了 Dot-ELISA,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

选取抗原性良好的狐狸阴道加德纳氏菌 44 株,制备狐狸阴道加德纳氏菌 Dot-ELISA 诊断抗原。

参加本研究工作的还有中国兽药监察所毛开荣、吴福林、黄海波。
本文于 1994 年 4 月 15 日收到。

1.2 抗原制备方法

启封冻干狐狸阴道加德纳氏菌 44 株,适当稀释后,接种于 5% 兔血胰豚琼脂平板,37℃ 培养 48h,选取典型菌落接种于定量的胰豚汤中,37℃ 培养 24h 作为种子液,纯菌检验后将种子液按 10% 转种于胰豚汤中扩菌,48 h 后取出于 80℃ 水浴灭活 30 min,然后 5000r/min 离心 30min,收集菌体,以灭菌生理盐水洗 3 次,充分振荡后离心,最后一次弃掉上清液,称湿菌重,每克湿菌加 10ml 灭菌生理盐水,充分振匀,加入 0.1% 的溶菌酶,使终浓度为 0.01%,37℃ 作用 30min,其间多次振荡,5000r/min 离心 30min,弃上清液。换加原上清液等体积的灭菌生理盐水,于功率 250W 冰浴下超声处理 1h,10000r/min 离心 30min,弃沉淀,取上清液以 50% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀,5000r/min 离心 30min,弃上清液,其沉淀加灭菌生理盐水稀释,用 pH 7.4 的 PBS 透析,再以 20000r/min 离心 30 min,沉淀用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释,紫外分光测定蛋白浓度。

1.3 狐血清

1.3.1 阳性血清: 高度免疫血清: 用狐狸阴道加德纳氏菌 44 株多次静脉注射免疫狐制备的血清。人工感染狐血清: 用狐狸阴道加德纳氏菌 44 株接种 9 只健康狐,每只皮下 20 亿菌,于感染后 30d 采血。血清加入 0.01% 的硫柳汞,4℃ 保存。免疫狐血清: 随机采集 140 只免疫阴道加德纳氏菌疫苗后 30d 狐血,分离血清,加入 0.01% 的硫柳汞, -20℃ 保存。菌检阳性狐血清: 采自现场分菌阳性狐,共 43 份。

1.3.2 阴性血清: 采自无不孕和流产史,平板凝集和微量凝集试验阴性,分离菌阴性的取皮狐血清,采集的各阴性血清等量混合,分装, -20℃ 保存。

1.3.3 被检血清: 采自吉林、辽宁、黑龙江及山东等省主要狐场。

1.3.4 鉴别血清: 狐巴氏杆菌 (Carter A) 血清,狐布氏杆菌 (S_2) 血清,狐大肠杆菌 (O_{33}) 血清,狐犬瘟热血清、狐脑炎血清。上述血清均从人工免疫狐获得。

1.4 Dot-ELISA 材料和试剂

1.4.1 载体: 孔径 0.45 μm 的硝酸纤维素 (NC) 膜,上海医药工业研究所生产。

1.4.2 抗原稀释液: pH 9.6 碳酸盐缓冲液。

1.4.3 封闭液和血清稀释液: 含 0.5mol/L 的 NaCl, 0.4% 的明胶及 0.05% Tween 20 的 PBS (pH 7.4)。

1.4.4 洗涤液: 含 0.05% 的 Tween 20 的 pH 7.4 的 PBS。

1.4.5 酶联兔抗狐 IgG (HRP-IgG): 采用过碘酸钠一步法标记,其工作浓度为 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.4.6 底物: 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐 (DAB),上海化学试剂一厂生产。

1.5 Dot-ELISA 操作程序

1.5.1 抗原吸附与封闭: 用直径为 4mm 打孔器取下 NC 膜,放在洁净的玻璃板上,用微量加样器取 1 μl 抗原滴于膜中央,37℃ 干燥 10 min,再重复一次,然后将每个膜放在 40 孔酶标板孔中,每孔加封闭液 100 μl ,37℃ 作用 30min,甩掉封闭液。

1.5.2 加被检血清: 于每孔滴加适当稀释的被检血清 50 μl ,37℃ 作用 1h,甩掉血清,换加 100 μl 洗涤液,洗涤 5min,共洗 3 次。

1.5.3 加 HRP-IgG: 每孔 50 μl ,置 37℃ 反应 1h,冲洗同 1.5.2。

1.5.4 加底物溶液: 每孔 50 μl ,室温避光显色 15 min,各孔用蒸馏水冲洗 3 次,吸出液

体,干燥,进行结果判定。

1.5.5 判定标准: 背景呈棕色判为阳性。阳性分四级: 斑点呈深棕色者判(++++) , 斑点呈中等棕色判(++), 介于(++++)和(++)之间判为(++), 斑点较弱者判(+), 背景无色判为(-)。

2 结果

2.1 Dot-ELISA 试验条件确定

2.1.1 抗原、阳性及阴性血清最适反应浓度确定: 经用方阵法测定,以斑点显色最深,背景反应最浅为判定标准,结果抗原最适浓度为 $25 \mu\text{l/ml}$, 阳性、阴性血清最适稀释度为 1:80。

2.1.2 酶标兔抗狐 IgG 最适工作浓度的确定: 固定抗原和血清最适浓度,用方阵法测定(判定标准同前),酶标兔抗狐 IgG $1.5 \mu\text{g/ml}$ 为最适工作浓度。

2.1.3 封闭液的选择及封闭时间的确定: 以小牛血清白蛋白(0.5%、1%、2%、3%),小牛血清(5%、10%),明胶(0.1%、0.2%、0.4%、0.5%),兔血清(5%、10%)的不同浓度分别进行封闭,作用时间分别为 30、60、90、120min。结果以 0.4% 的明胶封闭 30min 效果最佳,此时对照阳性血清斑点显色最深,阴性血清斑点无色。

2.1.4 阳性血清和 HRP-IgG 最适反应时间的确定: 在湿盒, 37°C 封闭液作用 30min,阳性血清和酶标抗体均作用 1h 为最适反应时间。

2.2 Dot-ELISA 特异性试验

2.2.1 阻断试验: 取 10 份狐狸阴道加德纳氏菌强阳性血清, 1:40 稀释, 分别吸取 0.5 ml 稀释血清,分 2 次加入等量的浓缩菌液中,充分混合,于 37°C 水浴各吸收 1h,其间多次振荡,然后离心取上清液,即为 1:80 稀释血清。另取该 10 份阳性血清作 1:80 稀释(不吸收),与前者同时做 Dot-ELISA,结果,经吸收的血清终点斑点为(++),(+)或(-),未经吸收对照血清斑点呈(++++)。据此说明,该抗体为狐狸阴道加德纳氏菌特异抗体。

2.2.2 交叉试验: 分别取巴氏杆菌、布氏杆菌、大肠杆菌、犬瘟热及脑炎阳性血清各 2 份,进行 1:80 稀释,同时以 1:80 稀释的狐狸阴道加德纳氏菌阴、阳性血清作对照,在相同条件下连续进行 3 次 Dot-ELISA。结果表明,上述鉴别血清均呈(-)反应,而参考阳性血清呈(++++)反应,参考阴性血清呈(-)反应。因此, Dot-ELISA 无交叉反应。

2.3 Dot-ELISA 敏感度试验

取 10 份(编号 1—10)自然感染狐血清,分别用 PAT、MAT 和 Dot-ELISA 测其抗体终点滴度,计算各方法测定的平均值进行比较。结果表明, Dot-ELISA 敏感度最高,为 PAT 的 28.1 倍,为 MAT 的 5.5 倍(表 1)。

2.4 Dot-ELISA 检出率测定

采用此法检测人工感染狐、疫苗免疫狐和菌检阳性狐血清 192 份,结果 187/192 呈阳性反应,其检出率为 97.3%。

2.5 Dot-ELISA 重复性试验

选 10 份 (S_1-S_{10}) 不同抗体水平(经 PAT 测定)的自然感染狐血清样品进行 Dot-ELISA,在相同条件下,连续复试 5 次。其结果充分证实, Dot-ELISA 具有良好的重复

表 1 Dot-ELISA、MAT、PAT 3种方法敏感度比较

Table 1 Comparison of sensitivity among Dot-ELISA, MAT and PAT

| 方法 Method | 血清样品 Serum sample | | | | | | | | | | 平均值 Average |
|--------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| Dot-ELISA | 40 ^a | 160 | 320 | 320 | 640 | 640 | 80 | 320 | 160 | 640 | 332 |
| MAT | 8 ^b | 32 | 64 | 64 | 128 | 128 | 16 | 64 | 32 | 64 | 60 |
| PAT | 2 ^c | 8 | 16 | 8 | 32 | 16 | 4 | 16 | 8 | 8 | 11.8 |

注: a. 斑点显色呈现“+”时血清最高稀释倍数; b. 呈现“+”凝集时血清最高稀释倍数; c. 呈现“++”凝集时血清最高稀释倍数。

Notes: a. The highest dilution times of serum of the color of dotting appearing “+”; b. The highest dilution times of serum of agglutination appearing “+”; c. The highest dilution times of serum of agglutination appearing “++”.

表 2 Dot-ELISA 重复性试验

Table 2 The repeatability of the test of Dot-ELISA

| 试验次数 Experiment times | 被检血清 Detected serum | | | | | | | | | | 对照血清 Control serum | |
|-----------------------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|--------------------|-------------|
| | S ₁ | S ₂ | S ₃ | S ₄ | S ₅ | S ₆ | S ₇ | S ₈ | S ₉ | S ₁₀ | 阳性 Positive | 阴性 Negative |
| 1 | - | - | +++ | +++ | + | - | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | - |
| 2 | - | ± | +++ | ++ | + | - | + | ++ | +++ | ++ | +++ | - |
| 3 | - | - | +++ | +++ | + | - | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | - |
| 4 | - | ± | +++ | +++ | + | - | ++ | + | +++ | +++ | +++ | - |
| 5 | - | - | +++ | ++ | + | - | ++ | + | +++ | ++ | +++ | - |

性,阴性血清稳定,斑点无色,阳性血清各次试验终点显色程度有时略有差异,但仍在阳性范围之内(表2)。

2.6 Dot-ELISA、PAT 以及 MAT 对流产狐血清抗体检测结果比较

对现场采集的 215 份流产狐血清用 Dot-ELISA、PAT、MAT 3 种方法同时检测,结果 Dot-ELISA 检出阳性狐 169 只,阳性率 78.6%, PAT 检出 151 只,阳性率 70.2%, MAT 检出 158 只,阳性率 73.5%,且 PAT、MAT 检出的阳性狐用 Dot-ELISA 均可检出。因此, Dot-ELISA 与 PAT、MAT 的阳性符合率为 100%。

2.7 Dot-ELISA 快速诊断膜

将 Dot-ELISA 诊断抗原吸附于直径为 4mm 的 NC 膜上,干燥后,移至 40 孔酶标板中,加封闭液 37℃ 封闭 30min,甩干,加盖,于 4℃ 分别放置 30、60、90、120、150、180d 测定抗原活性。结果表明,制备的快速诊断膜于 150d 内, Dot-ELISA 斑点仍呈强阳性(++++→+++)反应;至 180d 测定,斑点呈弱阳性(++→+)反应,因此,制成的快速诊断膜于 4℃ 至少可保存 5 个月,为快速诊断该病提供了方便。

3 讨论和结论

Dot-ELISA 作为一种快速、敏感、特异的血清学诊断方法已得到公认。试验中,抗原的提取方法和纯度直接关系到 Dot-ELISA 的成败。本试验采用超声波破碎、分段离心和盐析技术相结合。制备出的抗原颗粒均匀,纯度较高,吸附性好,稳定。在特异性、敏感

性、检出率、重复性及符合率等方面均取得了满意的结果,为狐狸阴道加德纳氏菌病的诊断、流行病学调查和免疫监视等提供了可靠的血清学特异性手段。

试验发现,用溶菌酶处理细胞后再超声波处理,细胞容易破碎,可溶性蛋白产量显著提高,大大降低了试验成本。

试验时,抗原进行 2 次点样,与一次点样相比,阳性血清终点斑点相差一个“+”,而与 3 次点样相比并无差异,说明一次点样,NC 膜上可能有更多的空位未吸附上抗原,因而降低了试验的敏感度。

参 考 文 献

- [1] Leopold S. *United States Armed Forces Medical Journal*, 1953, 4: 263—266.
- [2] Greenwood J R, Picket M J. *Int J Syst Bacteriol*, 1980, 30 (1): 170—178.
- [3] 严忠诚,阎新华,栾凤英,等. *微生物学报*, 1995, 35(1): 28—32.
- [4] 蔡妙英,卫军,严忠诚,等. *微生物学报*, 1995, 35(1): 33—37.
- [5] 严忠诚,阎新华,栾凤英,等. *微生物学报*, 1995, 35(3): 209—215.
- [6] Donna L, Kotcher E. *J Gen Microbiol*, 1963, 33: 77—87.
- [7] Mary F, John L. *Applied Microbiology Mar*, 1974, 469—477.
- [8] Ison C. A, Harvey D G, Tanna A *et al. Genitourin Med*, 1987, 63: 196—201.

A NEW ZONOSIS—INVESTIGATION OF GARDNERELLA VAGINALIS DISEASE OF FOX

IV. STUDY OF DOT-ELISA FOR THE DETECTION OF SERUM ANTIBODY OF GARDNERELLA VAGINALIS DISEASE OF FOX

Yan Xinhua Yan Zhongcheng Yan Xijun

Luan Fengying Wang Changfeng

(Speciality Institute of CAAS, Jilin 132109)

Abstract 192 *Gardnerella vaginalis* antibody positive sera from artificially infected foxes, immunized foxes and foxes that the bacterial examination were positive were analysed by the established Dot-ELISA. The results showed that 187/192 were positive, the positive rate was 97.3%. Block and cross tests showed that the method was specific. The method was 28.1 times sensitive as PAT and 5.5 times sensitive as MAT respectively. The repeatability of the test was good and the positive coincidence rate among the three techniques was 100%.

Key words Fox, *Gardnerella vaginalis*, Dot-ELISA