

绵羊红细胞敏感性对补体结合试验的最佳反应时间

蒋卉¹ 彭小薇¹ 张阁¹ 冯宇² 张振² 孙翠丽² 朱良全^{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)

关键词: 绵羊红细胞, 敏感性, 布鲁氏菌, 补体结合试验

The optimum reaction time of sheep red blood cell sensitivity on complement fixation test

JIANG Hui¹ PENG Xiao-Wei¹ ZHANG Ge¹ FENG Yu² ZHANG Zhen² SUN Cui-Li²
ZHU Liang-Quan^{1*} DING Jia-Bo^{1*}

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

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

Keywords: Sheep red blood cell (SRBC), Sensitivity, *Brucella*, Complement fixation test (CFT)

补体结合试验(CFT)是一种经典的抗原、抗体检测方法,其敏感性、特异性均较高,不仅可用于诊断各种传染病,也可用于鉴定病原体,是免疫学上一个应用较广泛的重要试验^[1]。在布鲁氏菌病(布病)的血清学诊断方法中,CFT被世界动物卫生组织(OIE)认可为布病血清学确诊的经典标准方法^[2]。

在CFT实际操作中经常发现,使用不同保存时间的绵羊红细胞(SRBC)滴定同一批次溶血素和补体时,结果存在较大差异,有时效价可能相差一倍以上,最终导致CFT效价无法确定。SRBC作为滴定CFT其他组分效价的基点,其敏感性直接决定了溶血素效价、补体用量,并与CFT结果密

切相关,而SRBC的敏感性主要受保存条件和保存时间的影响。根据以上分析,本研究采用布病CFT为研究模型,用不同保存期的SRBC配制2.5%红细胞悬液,比较其敏感性对CFT结果的影响,从而确定SRBC的最适保存时间,为CFT的科学应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

抗原由中国兽医药品监察所生产供应,批号201401。溶血素和补体购自浙江省玉环县南方试剂厂,批号201506和201509。生理盐水和阿氏液由本实验室参照《兽用生物制品规程》(2000版)制

Foundation item: National Key Research and Development Program (No. 2016YFD0500902); Beijing Science and Technology New Star Program (No. XX2013099)

*Corresponding authors: E-mail: ZHU Liang-Quan: zhuliangquan@ivdc.org.cn; DING Jia-Bo: dingjiabo@126.com

Received: December 16, 2015; Accepted: May 04, 2016

基金项目: 国家重点研发计划项目(No. 2016YFD0500902); 北京市科技新星计划项目(No. XX2013099)

*通讯作者: E-mail: 朱良全: zhuliangquan@ivdc.org.cn; 丁家波: dingjiabo@126.com

收稿日期: 2015-12-16; 接受日期: 2016-05-04

备^[3]。红细胞采自绵羊,按 1:1 (体积比)保存于阿氏液中,存放于 4 °C。布病标准阳性血清由本实验室制备,经试管凝集试验(SAT)和虎红平板凝集试验(RBPT)标定为 1 000 IU,批号 201404。

SIGMA 离心机,型号:SIGMA 3K18;IKA 涡旋器,型号:Lab Dancer S25,由中国兽医药品监察所提供。

1.2 2.5%红细胞悬液的制备

分别取在阿氏液中保存了不同天数的 SRBC,以 5–10 倍体积的生理盐水离心沉淀并洗涤 3 次,最后一次以 2 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,取沉淀血球泥,用生理盐水配制成 2.5%红细胞悬液,不同保存时间 SRBC 的分组情况见表 1。

1.3 标准溶血管的配制

分别取 2.5% SRBC 悬液 1、2、3、4 按《家畜布鲁氏菌病细菌学及血清学诊断操作手册》(简称“手册”)^[4]配制标准溶血管。

1.4 溶血素、补体和抗原效价的测定

按手册中溶血素效价、补体效价和抗原效价滴定程序表^[4]分别先后测定溶血素、补体及抗原的效价,与标准溶血管进行比浊,并判定结果。

1.5 血清 CFT 效价测定

将布病标准阳性血清用 0.5%石碳酸生理盐水稀释成 1:100、1:200、1:300、1:400、1:500,以此类推至 1:1 500,同时设立 1:2 000 稀释度。按手册中补体结合反应正式试验操作程序表^[4]分别加入各反应成分,设补体、抗原、溶血素对照。判定反应结果时与标准溶血管作比较,阳性血清 CFT 判为阳性的最高稀释度即为其补体结合试验反应效价(简称“补反效价”)。

表 1 不同保存时间配制的 2.5%红细胞分组表

Table 1 2.5% SRBC of different storage time

编号 Number	阿氏液中保存时间 Storage time in alsever's solution (d)
1	3
2	7
3	14
4	18

2 结果与分析

2.1 溶血素效价、补体效价、抗原效价确定

用 2.5% SRBC 悬液 1、2、3、4 先后滴定溶血素效价、补体效价、抗原效价,结果见表 2。结果表明,2.5% SRBC 悬液 3 有较好的敏感性,滴定的溶血素和补体效价均较高。2.5% SRBC 悬液 2 敏感性高于 1,但低于 3。虽然 2.5% SRBC 悬液 1、2、3 滴定溶血素效价、补体效价各不相同,但是抗原效价滴定结果均为 1:100。在 2–8 °C 阿氏液中保存 18 d 的 SRBC 配制 2.5% SRBC 悬液 4 时有部分溶血现象,其滴定的溶血素效价虽最高,但滴定的抗原效价最低。

2.2 血清 CFT 效价测定结果

阳性血清用生理盐水做 16 个不同稀释度后 CFT 效价测定结果见表 3。2.5% SRBC 悬液 1、2、3 滴定标准阳性血清的最高稀释度均为 1:500,由于该稀释度中,阳性血清加入量为 0.5 mL,占 1 mL 总反应体积的 50%,因此判定冻干标准阳性血清(1 mL/支)的补反效价为 1:1 000。但是阳性血清在 1:600–1:1 000 稀释度滴定中,2.5% SRBC 悬液 3 的滴定结果略高于 2.5% SRBC 悬液 1、2,表现出更高的敏感性。2.5% SRBC 悬液 4 因有溶血现象,导致其滴定标准阳性血清的阳性最高稀释度为 1:200,补反效价为 1:400,比 2.5% SRBC 悬液 1、2、3 滴定的标准阳性血清补反效价低 60%,其敏感性远低于 2.5% SRBC 悬液 1、2、3。

表 2 不同 2.5%红细胞悬液滴定溶血素效价、补体效价、抗原效价结果

Table 2 Hemolysin titer, complement titer and antigen titer by different 2.5% SRBC

2.5%红细胞悬液编号 2.5% SRBC number	溶血素效价 Hemolysin titer	补体效价 Complement titer	抗原效价 Antigen titer
1	1:1 500	1:13	1:100
2	1:2 000	1:14	1:100
3	1:3 000	1:16	1:100
4	1:5 000	1:15	1:75

表3 用不同2.5%红细胞悬液测定血清CFT效价结果

Table 3 Serum titer by different 2.5% SRBC

稀释倍数 Dilution	2.5%红细胞悬液 2.5% SRBC			
	1	2	3	4
1:100	4 ⁺	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺
1:200	4 ⁺	4 ⁺	4 ⁺	3 ⁺
1:300	4 ⁺	4 ⁺	4 ⁺	2 ⁺
1:400	3 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	2 ⁺
1:500	3 ⁺	3 ⁺	3 ⁺	1 ⁺
1:600	2 ⁺	2 ⁺	2 ⁺ -3 ⁺	1 ⁺
1:700	2 ⁺	2 ⁺	2 ⁺ -3 ⁺	1 ⁺
1:800	1 ⁺ -2 ⁺	2 ⁺	2 ⁺	--1 ⁺
1:900	1 ⁺ -2 ⁺	1 ⁺	2 ⁺	--1 ⁺
1:1 000	1 ⁺	1 ⁺	1 ⁺ -2 ⁺	-
1:1 100	1 ⁺	1 ⁺	1 ⁺	-
1:1 200	1 ⁺	1 ⁺	1 ⁺	-
1:1 300	--1 ⁺	--1 ⁺	--1 ⁺	-
1:1 400	--1 ⁺	--1 ⁺	--1 ⁺	-
1:1 500	-	--1 ⁺	--1 ⁺	-
1:2 000	-	-	-	-

注：-：阴性；1⁺-2⁺：可疑；3⁺-4⁺：阳性。

Note: -: Negative; 1⁺-2⁺: Suspect; 3⁺-4⁺: Positive.

3 讨论

CFT 作为经典的血清学方法已经广泛应用于多种疾病的诊断，然而以往的研究大多集中于比较不同动物红细胞对 CFT 试验结果的影响。如黄企光等用山羊血代替绵羊血进行 CFT，证明了完全可用山羊红细胞替代 SRBC 用于溶血反应和 CFT^[5]，但尚无针对不同保存期 SRBC 敏感性对 CFT 影响的相关研究报道。本实验室在实际应用中发现 SRBC 的敏感性与其保存条件、保存时间密切相关，且直接影响 CFT 的结果。为了明确 SRBC 敏感性导致的差异，本研究设计了上述试验。

考虑到 CFT 是布病诊断中最常用的方法之一，作为农业部指定的布病专业实验室，我们需要经常用经典方法对布病进行确诊，因此本研究选取布病的 CFT 为研究模型，比较不同保存期 SRBC 的敏感性对 CFT 的影响。布病作为模型具有

广泛的代表性，本研究中的结论并不影响 SRBC 在其它 CFT 试验中应用。

本研究中，在 SRBC 未发生溶血的前提下，相同保存条件的 SRBC 在阿氏液中保存时间与其敏感性成正相关，即 SRBC 在阿氏液中 2-8 °C 保存时间越长，敏感性越高。其中保存 14 d 的 SRBC 敏感性最高，保存 7 d 的 SRBC 敏感性次之，保存 3 d 的 SRBC 敏感性最低，本实验室经多次试验验证该结果可重复。而本研究中相同条件保存 18 d 的 SRBC 因发生轻微溶血，相对于保存 14 d 的 SRBC 其敏感性显著下降，效价由 1:1 000 下降至 1:400，下降达 60%。但是在重复试验中发现 SRBC 在阿氏液中 2-8 °C 保存 18 d 如果不发生溶血仍可用于 CFT，其敏感性与保存 14 d 的 SRBC 相似。尽管如此，考虑到保存 18 d 的 SRBC 可能发生溶血现象，不建议使用。研究结果表明，在 CFT 中，SRBC 在阿氏液中置于 2-8 °C 保存 7-14 d 具有较高的敏感性和重复性，其中 14 d 最佳。

参考文献

- [1] Sun XB, He YL, Yuan L, et al. Control physical and chemical factors of complement activity, improve effect of CFT[J]. Journal of Nongken Medicine, 2014, 36(3): 283-284 (in Chinese)
孙向彬, 贺亚玲, 袁俐, 等. 控制好补体活性的理化因素提高“补体结合试验”效果[J]. 农垦医学, 2014, 36(3): 283-284
- [2] Wang XL, Jiang YW, Mao KR, et al. Research progress on laboratory diagnosis techniques on Brucellosis[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(11): 37-42 (in Chinese)
王秀丽, 蒋玉文, 毛开荣, 等. 布鲁氏菌病实验室诊断方法的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(11): 37-42
- [3] Veterinary Biological Products Regulation Committee of the Ministry of Agriculture. Rules of veterinary biological products of the people's Republic of China (2000)[S]. Beijing: Chemistry Industry Press, 2000: 426 (in Chinese)
农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程(2000版)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 426
- [4] Yang PY. Operation Manual for Diagnosis of Bacteriology and Serology on Brucellosis[M]. China Institute of Veterinary Drug Control, 1987 (in Chinese)
杨培豫. 家畜布鲁氏菌病细菌学及血清学诊断操作手册[M]. 中国兽药监察所, 1987
- [5] Huang QG, Tang S, Liu J, et al. Study on CFT of goat blood instead of sheep blood[J]. Journal of Guangxi Medical University, 1998, 15(1): 116-117 (in Chinese)
黄企光, 唐深, 刘瑾, 等. 用山羊血代替绵羊血进行补体结合试验的探讨[J]. 广西医科大学学报, 1998, 15(1): 116-117