

ICS 11.220
CCS B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 18646—2025

代替 GB/T 18646—2018

动物布鲁氏菌病诊断技术

Diagnostic techniques for animal brucellosis

2025-05-30 发布

2025-12-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	V
引言	VI
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 临床诊断	2
5.1 流行特点	2
5.2 临床症状	2
5.3 病理变化	3
5.4 结果判定	3
6 样品采集、保存、运输及处理	3
6.1 仪器设备	3
6.2 试剂材料	3
6.3 样品采集	3
6.4 样品运输和保存	4
6.5 样品处理	4
7 病原学诊断方法	5
7.1 改良萋-尼氏(Ziehl-Neelsen)抗酸染色	5
7.2 布鲁氏菌分离与鉴定	6
7.3 实时荧光 PCR 方法	7
7.4 荧光 RAA 方法	9
7.5 多重 PCR 方法	11
8 免疫学诊断方法	12
8.1 标准血清	12
8.2 虎红平板凝集试验(RBT)	13
8.3 试管凝集试验(SAT)	14
8.4 补体结合试验(CFT)	17
8.5 间接 ELISA 抗体检测方法(iELISA)	22
8.6 竞争 ELISA 抗体检测方法(cELISA)	24
8.7 荧光偏振试验(FPA)	26
8.8 全乳环状试验(MRT)(仅适用于牛)	29
8.9 免疫层析法(ICA)	30

9 综合判定	30
9.1 布鲁氏菌疑似感染动物判定	30
9.2 布鲁氏菌感染动物判定	31
附录 A(资料性) 检测方法的适用性	32
附录 B(规范性) 布鲁氏菌培养基的配制	33
B.1 基础培养基	33
B.2 血清葡萄糖培养基	33
B.3 选择培养基	33
附录 C(规范性) 生化反应试剂的配制	34
C.1 结晶紫储备液和工作液配制	34
C.2 氧化酶试验试剂配制	34
C.3 尿素酶活性试验培养基配方及制备	34
附录 D(规范性) 布鲁氏菌种和生物型的生化鉴定	35
附录 E(规范性) 实时荧光 PCR、RAA 及多重 PCR 引物和探针序列	37
附录 F(规范性) 多重 PCR 溶液配制及结果判定	39
F.1 TAE 电泳缓冲液	39
F.2 1.5% 琼脂糖凝胶	39
F.3 多重 PCR 判定标准	39
附录 G(规范性) 试管凝集试验(SAT)试剂的配制	40
G.1 含 0.5% 苯酚的生理盐水	40
G.2 含 0.5% 苯酚的 10% 氯化钠溶液	40
G.3 参照比浊管的制备	40
附录 H(规范性) 补体结合试验(CFT)试剂的配制及效价测定	41
H.1 稀释液配制	41
H.2 绵羊红细胞悬液的配制(2.5%)	41
H.3 溶血素效价测定	41
H.4 补体制备及效价测定	44
H.5 抗原效价的测定	49
H.6 溶血标准比色管的制备及补体结合试验结果判定方法	50
H.7 待检血清的稀释和灭活	51
附录 I(规范性) 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂的制备	52
I.1 包被抗原 LPS 提取	52
I.2 包被液(0.05 mol/L 的 pH 9.6 碳酸盐缓冲液)	52
I.3 封闭液(含 2% BSA、0.05% 吐温-20 的 pH 7.4 PBS)	52
I.4 样品稀释液(含 1% BSA 的 pH 7.4 PBS)	52
I.5 洗涤液(含 0.05% 吐温-20 的 pH 7.4 PBS)	52

I.6 显色液	52
I.7 终止液(2 mol/L 硫酸)	53
附录 J(资料性) 竞争酶联免疫吸附试验(cELISA)单克隆抗体的制备	54
附录 K(规范性) 荧光偏振试验(FPA)抗原和稀释液的制备	55
K.1 标记抗原的制备	55
K.2 样品稀释液的配制	55
参考文献	56



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 18646—2018《动物布鲁氏菌病诊断技术》，与 GB/T 18646—2018 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了“范围”(见第1章,2018年版的第1章)；
- b) 更改了“临床诊断”，增加了流行病学、临床症状和病理变化内容(见第5章,2018年版的4.1、4.2、4.3)；
- c) 增加了“实时荧光 PCR 方法”“荧光 RAA 方法”(见7.3和7.4)；
- d) 将“布鲁氏菌 Bruce-Ladder 检测方法”更改为“多重 PCR 方法”(见7.5,2018年版的4.13)；
- e) 增加了免疫学诊断方法中 RBT、SAT、CFT、iELISA、cELISA 和 FPA 方法的标准化内容(见第8章)；
- f) 更改了“虎红平板凝集试验(RBT)”(见8.2,2018年版的4.4)、“间接 ELISA 抗体检测方法(iELISA)”(见8.5,2018年版的4.8)、“竞争 ELISA 抗体检测方法(cELISA)”(见8.6,2018年版的4.9)；
- g) 增加了“荧光偏振试验(FPA)”“免疫层析法(ICA)”(见8.7和8.9)。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、中国兽医药品监察所、中国动物疫病预防控制中心、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国疾病预防控制中心、新疆生产建设兵团畜牧兽医工作站、辽宁省动物疫病预防控制中心、内蒙古自治区动物疫病预防控制中心、上海市动物疫病预防控制中心、河南省动物疫病预防控制中心、重庆市动物疫病预防控制中心、浙江省动物疫病预防控制中心、青岛市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：孙淑芳、李俊平、邵卫星、孙明军、姜海、南文龙、田莉莉、樊晓旭、焉鑫、孙雨、胡森、李岩、朱良全、王建龙、闫若潜、张存瑞、李彦、顾贵波、赵洪进、董春霞、赵灵燕、郭宇、孙翔翔、刘蒙达、张皓博、孙世雄、李嘉琪。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2002年首次发布为 GB/T 18646—2002,2018年第一次修订；

——本次为第二次修订。

引 言

布鲁氏菌病(Brucellosis)是由布鲁氏菌(*Brucella*)感染动物和人而引起的一种人兽共患传染病。目前已报道的布鲁氏菌属成员包括6个经典种、5个新鉴定种及部分未确定种型的非典型布鲁氏菌。经典种包括羊种布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)、牛种布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、猪种布鲁氏菌(*Brucella suis*)、绵羊附睾种布鲁氏菌(*Brucella ovis*)、犬种布鲁氏菌(*Brucella canis*)和沙林鼠种布鲁氏菌(*Brucella neotomae*)；新鉴定种包括鲸种布鲁氏菌(*Brucella ceti*)、鳍种布鲁氏菌(*Brucella pinnipedialis*)、田鼠种布鲁氏菌(*Brucella microti*)、人源布鲁氏菌(*Brucella inopinata*, 暂未确定其他动物宿主)和狒狒种布鲁氏菌(*Brucella papionis*)；未确定种型的包括分离自啮齿类、狐类和蛙类的非典型布鲁氏菌。本文件主要规定了对畜牧业影响最大的羊种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌三种光滑型布鲁氏菌引起的动物布鲁氏菌病相关诊断检测技术内容,仅在病原鉴定及PCR检测方法中涉及了粗糙型的绵羊附睾种和犬种布鲁氏菌检测。

布鲁氏菌病在全世界范围内严重威胁动物和人类健康。世界动物卫生组织(World Organization of Animal Health, WOAH)将布鲁氏菌病列入通报病种名录,我国农业农村部发布的《一、二、三类动物疫病病种名录》将布鲁氏菌病列为二类动物疫病,国家卫生健康委员会将布鲁氏菌病列为法定报告乙类传染病。从事布鲁氏菌病诊断相关的样品采集、包装运输、检测诊断等活动的人员,经过严格培训,在相应级别的生物安全防护条件下进行试验活动。

本文件参考了WOAH《陆生动物诊断试验与疫苗手册》3.1.4章“布鲁氏菌病(牛种、羊种和猪种布鲁氏菌感染)(2022版)”规定的诊断技术方法,包括临床诊断、病原学诊断方法(涂片镜检、分离与鉴定、实时荧光PCR方法)及免疫学诊断方法[虎红平板凝集试验(RBT)、试管凝集试验(SAT)、补体结合试验(CFT)、间接ELISA抗体检测方法(iELISA)、竞争ELISA抗体检测方法(cELISA)、荧光偏振试验(FPA)和全乳环状试验(MRT)];并根据我国技术发展增加了技术成熟的荧光RAA方法和免疫层析法(ICA)。

本文件的发布机构提请注意,声明相关产品符合本文件时,可能涉及本文件7.3中引物和探针序列与《一种区分布鲁氏菌A19疫苗株与野毒株的分子标记》(授权公告号:CN113186312B)、《鉴别布鲁氏菌疫苗株S2和野毒株的SNP分子标记及其应用》(授权公告号:CN111793704B)相关专利的使用。

本文件的发布机构对于涉及专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺,同意在公平、合理、无歧视基础上,免费许可任何组织或个人在实施该国家标准时实施专利。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利(授权公告号:CN113186312B)持有人姓名:中国动物卫生与流行病学中心。

地址:山东省青岛市市北区南京路369号。

专利(授权公告号:CN111793704B)持有人姓名:中国疾病预防控制中心传染病预防控制所。

地址:北京市昌平区昌百路155号。

请注意,除上述2项专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

动物布鲁氏菌病诊断技术

1 范围

本文件描述了动物布鲁氏菌病的临床诊断方法、病原学诊断方法和免疫学诊断方法,并规定了综合判定要求。

本文件适用于布鲁氏菌病畜群无疫检测、动物个体无疫检测、根除计划实施、疑似或临诊病例确诊、群体流行率监测等。

注:附录A中详细列出了不同领域检测方法的选择。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

cELISA:竞争酶联免疫吸附试验(Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

CFT:补体结合试验(Complement Fixation Test)

Ct:循环阈值(Cycle Threshold)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

FPA:荧光偏振试验(Fluorescence Polarisation Assay)

HRP:辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase)

ICA:免疫层析试验(Immunochromatography Assay)

iELISA:间接酶联免疫吸附试验(Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

LPS:脂多糖(Lipopolysaccharide)

MRT:全乳环状试验(Milk Ring Test)

OD值:光密度值(Optical Density)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

RAA:重组酶介导等温扩增技术(Recombinase Aided Amplification)

RBT:虎红平板凝集试验(Rose Bengal Test)

SAT:试管凝集试验(Serum Agglutination Test)

SDS:十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate)



5 临床诊断

5.1 流行特点

5.1.1 传染源与传播因子

布鲁氏菌病的主要传染源是患病或无症状的感染带菌动物。感染母畜流产或分娩时的胎儿、胎盘、胎衣、羊水、阴道分泌物等,感染动物的乳汁或精液中均含有大量布鲁氏菌。感染动物的头部淋巴结、脾脏、生殖器官(子宫、睾丸和附睾)以及关节病变部位均含有布鲁氏菌;在急性感染期,动物的肝脏、脾脏及主要淋巴结均含有布鲁氏菌。

5.1.2 传播途径

5.1.2.1 呈典型接触传播特征,直接或间接接触均可造成传播,主要感染途径是消化道,也可通过呼吸道、黏膜、皮肤(尤其是带有伤口的皮肤)感染。

5.1.2.2 动物可因接触或舔食感染母畜的流产物、刚分娩的幼畜、胎衣、被污染的饲料、饲草、地面和饮水而感染。

5.1.2.3 感染动物交配时可互相传染。若精液中含有布鲁氏菌,实施人工授精也可导致母畜感染。

5.1.2.4 垂直传播和未经消毒的感染动物乳汁饲喂是新生动物感染的主要途径。

5.1.3 易感动物

布鲁氏菌病是自然疫源性疫病,布鲁氏菌可感染多种易感动物。家养动物中,牛、羊、猪、犬、鹿相对易感,骆驼也可感染。野生动物中,羚羊、麋鹿、驯鹿等也可感染。

5.1.4 潜伏期

一般为 14 d~180 d。

5.1.5 种间特性

5.1.5.1 牛布鲁氏菌病通常由牛种布鲁氏菌引起,也可因感染羊种布鲁氏菌引起,由猪种布鲁氏菌感染病例极少。

5.1.5.2 羊布鲁氏菌病(不包括绵羊附睾种布鲁氏菌感染)主要由羊种布鲁氏菌引起,也可由牛种布鲁氏菌引起,由猪种布鲁氏菌感染病例较少。

5.1.5.3 猪布鲁氏菌病主要由猪种布鲁氏菌 1、2 或 3 生物型引起,也有较少由牛种布鲁氏菌或羊种布鲁氏菌感染所引发的病例。

5.1.5.4 单峰驼、双峰驼(包括羊驼)、水牛、牦牛、鹿、羚羊等,可因接触感染布鲁氏菌的反刍动物感染牛种布鲁氏菌或羊种布鲁氏菌。

5.1.5.5 犬布鲁氏菌病通常由犬种布鲁氏菌引起,也可因接触感染布鲁氏菌的反刍动物感染牛种布鲁氏菌或羊种布鲁氏菌。

5.2 临床症状

5.2.1 通常,未成年动物和未妊娠动物感染布鲁氏菌不表现明显临床症状。

5.2.2 母畜头胎发病较多且症状明显,牛在怀孕后 5 个月~9 个月、羊在怀孕后 3 个月~4 个月流产,猪怀孕后任何阶段都可流产,以怀孕 50 d~110 d 最常见。

5.2.3 在布鲁氏菌病长期流行地区,感染母畜可能不发生流产,主要表现为乳房炎、关节炎、局部脓肿、

胎衣不下、久配不孕等临床症状。慢性感染的母畜以不孕为主要临床症状。

5.2.4 成年公畜感染后主要症状表现为睾丸炎和附睾炎,并可引起不育。

5.2.5 少数情况下,感染牛仅在腿部关节处出现水囊瘤,无其他可见症状,水囊瘤液中常含有布鲁氏菌。

5.2.6 猪感染后可出现关节炎及腱鞘肿胀、跛行,偶尔出现后躯麻痹的症状。公猪感染布鲁氏菌,通常一侧睾丸出现肿胀,进而硬化和萎缩,伴随着生殖器官损伤,影响性行为。部分公猪感染后生殖器官没有明显异常,性行为表现正常,但公猪的精液中含有布鲁氏菌。

5.2.7 其他家养、圈养及野生动物感染后临床症状与牛、绵羊或山羊症状相似,但一些野生反刍动物感染后会出现关节化脓或钙化、睾丸炎、色素膜炎和神经系统疾病。

5.3 病理变化

5.3.1 妊娠或流产母畜子宫内膜出现炎性浸润、充血、出血及坏死。

5.3.2 流产胎儿呈败血症病变,浆膜和黏膜有出血点和出血斑,皮下结缔组织发生浆液性、出血性炎症。

5.3.3 公畜睾丸、附睾或精囊有炎症、出血、坏死灶或化脓灶。

5.4 结果判定

成年动物出现上述临床症状(5.2)和/或病理变化(5.3),可判定为疑似患布鲁氏菌病,应进一步开展实验室病原学和/或免疫学诊断。

6 样品采集、保存、运输及处理

6.1 仪器设备

6.1.1 器械:一次性无菌注射器(5 mL、10 mL)、解剖刀、剪子、镊子、移液器(200 μ L、1 000 μ L)、吸头(200 μ L、1 000 μ L)、离心机(离心力 $>2\ 000g$)、组织匀浆器、样品保温箱、II级生物安全柜等。

6.1.2 容器:血清采集管(不含抗凝剂)、全血采集管(含柠檬酸钠或EDTA抗凝剂)、带螺口的采样管(1.5 mL、5 mL、15 mL、50 mL)、带螺口的密封组织样品盒(50 mL)等。

6.1.3 个人防护用品:手套、口罩、鞋套、防护服、护目镜等。

6.1.4 其他:封口膜、密封袋、冰袋等。

6.2 试剂材料

6.2.1 无菌PBS(0.1 mol/L,pH 7.2~7.4)或0.85%生理盐水。

6.2.2 消毒剂:0.2%新洁尔灭或其他有效消毒剂。

6.3 样品采集

6.3.1 血清及全血

按NY/T 541的规定执行。

6.3.2 乳样

6.3.2.1 个体乳样:先将整个乳房清洗擦干,用适于黏膜的消毒剂(如聚维酮碘溶液)对乳头区消毒。采样时,挤弃前三把乳,之后每个乳头各采集10 mL~20 mL,混合保存。采集不同动物样品时,应更换手套,避免交叉污染。

6.3.2.2 大缸乳样:采集牛场当日奶厅大缸乳样,每缸采集 20 mL~40 mL。

6.3.3 组织样

包括流产胎儿的胃内容物、肝、脾、肺,母畜的胎盘、胎衣,公畜的精囊、睾丸、附睾,屠宰后动物的子宫、乳房、淋巴结等。采集上述组织样品至少 20 g,将其置于样品盒中,拧紧密封。

6.3.4 拭子样

用棉拭子蘸取动物羊水、阴道分泌物、鼻腔黏液及粪尿等,置于含 1 mL~2 mL PBS 或生理盐水的离心管中(用于病原分离时,可用含 50% 甘油的 PBS 或生理盐水),拧紧密封。

6.3.5 阴道分泌物、羊水、胃液、关节液、精液等液体样

6.3.5.1 阴道分泌物、羊水、胃液、关节液等液体样:用一次性注射器抽取 1 mL~2 mL,装入 5 mL 的无菌螺口离心管中,拧紧密封。

6.3.5.2 精液:可在冻精库随机抽取冻精样品;也可现场采集精液 1 mL~2 mL,装入 5 mL 的无菌螺口离心管中,拧紧密封。

6.4 样品运输和保存

6.4.1 采集后 12 h 内能够送达实验室的样本,可放在 4℃左右的容器中冷藏运输;不能在 12 h 运输到实验室的样本,应在-20℃以下冷冻后冷藏运输。

6.4.2 样品到达实验室后,应尽快处理;如不能立即进行处理和检测,应置-20℃以下冷冻保存;若需长期保存,应置-70℃超低温冰箱。

6.5 样品处理

6.5.1 血清样

恢复至室温待检。样品浑浊时,3 000g~5 000g 离心 10 min~15 min,将血清移至另一管中,沉淀弃去。

6.5.2 全血样

冷冻全血应解冻后使用,新鲜全血可直接检测。用于布鲁氏菌分离培养时,直接涂布于固体培养基上进行培养;用于布鲁氏菌 DNA 提取时,按细菌 DNA 提取试剂盒说明书进行。

6.5.3 乳样

6.5.3.1 用于抗体检测:冷冻后的样品应在解冻后使用,新鲜样品直接用于检测,按商品化试剂盒提供的方法处理。

6.5.3.2 用于病原学检测:样品应在Ⅱ级生物安全柜中处理。用于病原分离时,取 10 mL~15 mL 乳样置于 15 mL 离心管中,3 000g 离心 10 min,留取离心管上部奶油层和下部沉淀层。用于实时荧光 PCR 或 RAA 检测时,取 200 μL 乳样至 1.5 mL 离心管,加入 1 mL PBS,混匀,12 000g 离心 5 min,弃上清液,用无菌棉签擦去残余乳脂,用 200 μL ddH₂O 重悬沉淀。

6.5.4 组织样

样品应在Ⅱ级生物安全柜中处理。每份样品取约 5 g 组织,将其剪碎,加入研磨管中,再加入 10 mL 无菌 PBS,旋紧研磨管,在研磨器上研磨 5 min~10 min,取上清液 200 μL 备用待检。

6.5.5 拭子样

将拭子管中的拭子充分振荡后,在Ⅱ级生物安全柜中取出,并弃于含消毒剂的容器中,留取管中液体 200 μL 备用待检。

6.5.6 阴道分泌物、羊水、胃液、关节液、精液等液体样

样品应在Ⅱ级生物安全柜中进行处理。阴道分泌物、羊水、胃液、关节液等液体样,取 200 μL 备用待检;精液样品,取 200 μL 精液加入 1 mL PBS,12 000g 离心 5 min,弃上层液体,用 200 μL 无菌 PBS 重悬沉淀备用待检。

7 病原学诊断方法

7.1 改良萋-尼氏(Ziehl-Neelsen)抗酸染色

7.1.1 仪器设备

7.1.1.1 光学显微镜(100 \times 油镜)。

7.1.1.2 酒精灯、载玻片。

7.1.2 试剂材料

7.1.2.1 碱性复红染色液:碱性复红乙醇饱和液 10 mL,加 5% 苯酚水溶液 90 mL,混合。

7.1.2.2 乙酸(0.05%)。

7.1.2.3 亚甲蓝溶液:0.1% 亚甲蓝水溶液。

7.1.2.4 二甲苯、乙醚、乙醇(体积分数 95%)。

7.1.3 样品

全血样、乳样、组织样、拭子样及液体样,按 6.5 进行处理。

7.1.4 试验程序

7.1.4.1 涂片

吸取处理后的样品,均匀涂布于玻片上。如待检样品为乳样,涂片后,应滴加二甲苯或乙醚,使其覆盖整个涂片,摇动 1 min~2 min 脱脂后弃去,再滴加乙醇(体积分数 95%),以除去二甲苯,待乙醇挥发后即可染色。

7.1.4.2 染色

涂片经火焰固定后,滴加苯酚复红染色液,覆盖整个涂片,染色 15 min 后充分水洗,滴加乙酸(0.05%)脱色 15 s,充分洗涤,滴加亚甲蓝溶液复染 2 min。水洗,晾干,镜检。

7.1.5 结果判定

在光学显微镜下观察,背景为蓝色,出现长 0.6 μm ~1.5 μm 、宽 0.5 μm ~0.7 μm 的红色球杆菌或短棒状杆菌,多为单个存在,有时成对或成团,可判定为疑似布鲁氏菌。

7.2 布鲁氏菌分离与鉴定

7.2.1 仪器设备

- 7.2.1.1 II级生物安全柜。
- 7.2.1.2 恒温培养箱(37℃)、CO₂培养箱(37℃)。
- 7.2.1.3 光学显微镜(100×油镜)。
- 7.2.1.4 冰箱(2℃~8℃、-20℃)。
- 7.2.1.5 无菌器具:接种环、棉拭子、涂布棒、玻璃试管、试管塞、滤纸条、培养皿。
- 7.2.1.6 微量移液器(10 μL、200 μL、1 000 μL)及配套无菌枪头。

7.2.2 试剂材料

- 7.2.2.1 基础培养基,按附录 B 中 B.1 配制。
- 7.2.2.2 血清葡萄糖培养基,按 B.2 配制。
- 7.2.2.3 选择培养基,按 B.3 配制。
- 7.2.2.4 结晶紫储备液和工作液,按附录 C 中 C.1 配制。
- 7.2.2.5 氧化酶试验试剂,按 C.2 配制。
- 7.2.2.6 2% 尿素酶活性试验培养基,按 C.3 配制。
- 7.2.2.7 乙醇(体积分数 70%)、乙醇(体积分数 75%)、生理盐水、PBS(0.1 mol/L, pH 7.4)乙酸铅试纸条。
- 7.2.2.8 布鲁氏菌 A、M 和 R 表面抗原特异单价血清。
- 7.2.2.9 标准噬菌体液。

7.2.3 样品

全血样、乳样、组织样、拭子样及液体样,按 6.5 进行处理。

7.2.4 分离培养

7.2.4.1 涂布

取经过处理的样品 100 μL,涂布于选择培养基固体平板表面;对于乳样,用接种环分别取离心后的奶油层和沉淀层各 2 环,分别涂布于选择培养基固体平板表面。每份样品均涂布两个平板。

7.2.4.2 培养

将上述每份样品涂布的两个选择培养基固体平板分别置于普通培养箱和含 5%~10%(体积分数) CO₂培养箱中,37℃培养,观察 3 d~10 d。

7.2.5 菌落鉴定

7.2.5.1 菌落形态观察

布鲁氏菌菌落呈圆形,直径 1 mm~2 mm,边缘光滑。透射光下,菌落呈浅黄色有光泽,半透明。菌落微隆起,灰白色。随时间推移,菌落变大,颜色变暗。

7.2.5.2 光滑型/粗糙型菌落鉴定

用移液器吸取结晶紫稀释染液,浸没菌落 15 s~20 s,然后吸出染色液,弃至 0.2% 新洁尔灭消毒

液中。光滑型菌落不着色,粗糙型菌落被染成紫色。

7.2.6 生化鉴定

7.2.6.1 对 CO₂ 需求试验

用菌悬液接种 4 支血清葡萄糖培养基斜面,2 支置于恒温培养箱,2 支置于 5%~10% (体积分数) CO₂ 培养箱,37 °C 培养 2 d~3 d,观察比较 4 支斜面生长情况。

7.2.6.2 产 H₂S 试验

将乙酸铅试纸条放入接种细菌的斜面培养基管内,夹在管壁和塞子之间,且不和培养基接触。置于 37 °C 恒温培养箱培养,若有 H₂S 产生,则试纸条顶端变黑。每天记录结果并更换试纸条,持续 4 d。

7.2.6.3 氧化酶试验

新鲜配制氧化酶试剂。取载玻片大小的滤纸条在氧化酶试剂中浸渍后置于平皿中备用。接种环蘸取新鲜培养物,涂在平皿中的滤纸条上,10 s 后观察颜色变化。涂抹处呈鲜红色或深红色,则表示氧化酶阳性。

7.2.6.4 脲酶试验

用接种环蘸取一环新鲜培养物,涂抹在含 2% 尿素的培养基上,分解脲的菌株可使培养基由黄色变成粉红色或紫色。通常情况下会很快出现反应,有些菌株反应较慢,可置室温保存 24 h,约 2 h~5 h 观察一次颜色变化。

7.2.6.5 对硫堇、复红染料的敏感性试验

用无菌棉拭子浸蘸菌悬液,在分别含硫堇、复红染料的培养基(染料质量浓度为 20 μg/mL)上划线,并置于 37 °C 恒温培养箱培养,3 d~4 d 后观察平皿菌落生长情况。每个平皿上的不同菌悬液划线不应交叉、接触。

7.2.6.6 特异性血清凝集试验

吸取 25 μL~30 μL 布鲁氏菌 A、M、R 表面抗原特异单价血清置于玻片上,取等量菌液加到血清样品旁,然后用混匀棒充分混匀血清和菌液,轻轻摇晃玻片,在自然光或强灯光下立即观察。粗糙型菌株与布鲁氏菌 R 抗原的单价血清产生凝集反应,光滑型菌株与 A 或 M 单价血清产生凝集反应。

7.2.6.7 噬菌体溶解试验

用无菌生理盐水将待检菌株制成 10⁹ CFU/mL 悬液,涂布于干燥的琼脂平皿上,待表面无液体后,用直径为 2 mm 的接种环勾取标准噬菌体液加于平皿上,置 37 °C 恒温培养箱中培养,24 h 后初步观察结果,再放置室温下,经 24 h 后最后判定结果。细菌完全不生长,判为阳性(+);部分生长,判为可疑(±);细菌生长良好,判为阴性(-)。

7.2.6.8 结果判定

进行上述试验操作后,按附录 D,判定布鲁氏菌菌株的种和生物型。

7.3 实时荧光 PCR 方法

7.3.1 方法特性

实时荧光 PCR 方法可检测布鲁氏菌 DNA 片段,既可用于布鲁氏菌分离株的鉴定,也可用于临床



样品检测。本文件列入了布鲁氏菌属、牛种、羊种、猪种(犬种)布鲁氏菌及 A19、S2 疫苗株与野毒株鉴别特异性引物序列和探针。根据免疫背景,可采用多种引物和探针联用的方式进行检测。

7.3.2 仪器设备

7.3.2.1 II 级生物安全柜。

7.3.2.2 干式加热器。

7.3.2.3 水浴锅。

7.3.2.4 荧光 PCR 扩增仪及配套 PCR 管。

7.3.2.5 台式高速冷冻离心机(离心力 $\geq 12\ 000g$)。

7.3.2.6 冰箱($2\ ^\circ\text{C}\sim 8\ ^\circ\text{C}$ 、 $-20\ ^\circ\text{C}$ 、 $-80\ ^\circ\text{C}$)。

7.3.2.7 微量移液器(量程 $10\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}$ 、 $200\ \mu\text{L}$ 、 $1\ 000\ \mu\text{L}$)及配套无菌枪头。

7.3.3 试剂材料

7.3.3.1 $2\times$ 荧光 PCR 预混液($2\times$ Buffer, 含 $0.05\ \text{U}/\mu\text{L}$ Taq 酶、 $0.4\ \text{mmol/L}$ dNTPs 及 $4\ \text{mmol/L}$ 氯化镁)。

7.3.3.2 ddH₂O、PBS($0.1\ \text{mol/L}$, pH 7.4)。

7.3.3.3 阳性对照,为参考菌株(牛种、羊种、猪种、犬种布鲁氏菌基因组以及 A19 和 S2 疫苗株等) DNA,可使用 $10^2\ \text{CFU/mL}\sim 10^3\ \text{CFU/mL}$ 的细菌 $200\ \mu\text{L}$ 提取细菌 DNA。

7.3.3.4 阴性对照,为 ddH₂O。

7.3.3.5 细菌 DNA 提取试剂盒。

7.3.4 引物探针序列

按附录 E 中表 E.1。

7.3.5 菌株及样品灭活处理

7.3.5.1 疑似布鲁氏菌分离株

疑似布鲁氏菌分离株的灭活:在 BSL-3 实验室的生物安全柜内,用接种环从培养皿上挑取单个疑似菌落或多个经纯培养的疑似菌落,加入含 $200\ \mu\text{L}$ 的 PBS 或 ddH₂O 的离心管中,重悬菌液,密封管盖,置于干式加热器, $80\ ^\circ\text{C}$ 灭活 2 h。

7.3.5.2 样品

全血样、乳样、组织样、拭子样及液体样,按 6.5 进行处理后,置于干式加热器或水浴锅, $80\ ^\circ\text{C}$ 灭活 2 h。

7.3.6 菌株及样品 DNA 提取

可采用细菌 DNA 提取试剂盒,按说明书规定程序提取样品 DNA,也可采用酚-三氯甲烷-异戊醇抽提法,步骤如下:

- a) 取 $200\ \mu\text{L}$ 处理过的样品放入离心管,加入裂解液($10\ \text{mmol/L}$ EDTA, $150\ \text{mmol/L}$ NaCl, 0.5% SDS, $200\ \mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K) $200\ \mu\text{L}$, $56\ ^\circ\text{C}$ 消化 2 h, $12\ 000g$ 离心 20 s, 取上清液置于另一个管中, 然后加入等体积的酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)混合物, 上下颠倒 3 次~4 次, 混匀;
- b) $4\ ^\circ\text{C}$ $7\ 000g$ 离心 10 min, 移上层液相置于另一个管中, 加入 2.5 倍体积预冷 70%(体积分数)

乙醇, -20 °C 沉淀 30 min, 12 000g 离心 10 min, 弃去液相, 加入 1 mL 70% (体积分数) 乙醇漂洗, 12 000g 离心 2 min~3 min, 弃去液相, 留取沉淀, 真空或室温干燥, 加入 20 μ L ddH₂O, -20 °C 保存备用。

7.3.7 反应体系

按表 1 配制反应体系, 每次检测, 应设阴性对照和阳性对照, 采用商品化试剂盒时, 按试剂盒提供的方法配制。

表 1 实时荧光 PCR 反应体系

试剂成分	储存液浓度	体积/ μ L
荧光 PCR 反应预混液	2 \times	10.0
上游引物	10 pmol/ μ L	0.4
下游引物	10 pmol/ μ L	0.4
探针	10 pmol/ μ L	0.2
无核酸酶水	—	4.0
样品 DNA	—	5.0
总体积	—	20.0

7.3.8 反应条件

将 PCR 扩增管置入荧光 PCR 仪中。设定反应条件: 第一步, 95 °C 5 min; 第二步, 95 °C 10 s, 60 °C 25 s, 40 个循环, 在 60 °C 延伸结束时收集荧光信号。

7.3.9 试验成立条件

阳性对照 Ct 值 < 26 , 并出现特异性扩增曲线; 阴性对照无 Ct 值, 且没有特异性扩增曲线, 试验成立。

7.3.10 结果判定

满足 7.3.9 条件下:

- 样品 Ct 值 ≤ 36 , 且出现特征性的扩增曲线, 可判定为核酸阳性;
- 样品无 Ct 值或者无特征性扩增曲线, 可判定为核酸阴性;
- 样品 Ct 值 > 36 , 且出现特征性的扩增曲线, 应重新检测。重新检测时, 模板量加倍, 并做 3 个重复; 复检后有 2 个以上重复反应 Ct 值 ≤ 38 , 则判为核酸阳性, 否则判为阴性。

注: 附录 E 表 E.1 的引物及探针序列, 对应识别相应的布鲁氏菌属、种或疫苗株核酸检测结果。

7.4 荧光 RAA 方法

7.4.1 方法特性

RAA 是一种恒温核酸快速扩增方法, 可快速得到结果, 适用于牧场产地检疫等现场快速筛查检测, 本文件给出的引物序列为布鲁氏菌属通用型。

7.4.2 仪器设备

7.4.2.1 恒温荧光基因检测仪及配套反应管。

7.4.2.2 样品前处理系统。

7.4.2.3 其余器材同 7.3.2。

7.4.3 试剂材料

7.4.3.1 荧光基础反应单元(含重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶的冻干粉)及配套缓冲液。

7.4.3.2 ddH₂O。

7.4.3.3 乙酸镁(140 mmol/L)。

7.4.3.4 阳性对照、阴性对照,同 7.3.3.3 和 7.3.3.4。

7.4.4 引物和探针

引物和探针序列按附录 E 中表 E.2。

7.4.5 样品、样品处理及细菌 DNA 提取

同 7.3.5、7.3.6。

7.4.6 RAA 反应体系

7.4.6.1 按表 2 配制 RAA 反应混合液(40 μL)。

表 2 RAA 反应混合液

组分	体积/μL
缓冲液	25.0
ddH ₂ O	10.2
BRU-F(10 pmol/μL)	2.1
BRU-R(10 pmol/μL)	2.1
BRU-P(10 pmol/μL)	0.6
总体积	40.0

7.4.6.2 将 40 μL RAA 反应混合液加入 RAA 荧光基础反应单元管中。

7.4.6.3 将 5 μL 乙酸镁(反应催化剂)加在反应单元管盖内侧。

7.4.6.4 向反应单元管中依次加入 5 μL 待测核酸,最后扣紧反应单元管盖。

7.4.7 反应程序

7.4.7.1 将反应单元管置于样品前处理系统中,39 °C下按程序运行 4 min。

7.4.7.2 将反应单元管放入恒温核酸扩增检测仪,设置扩增温度为 39 °C,扩增时间 30 min,每隔 20 s 收集荧光信号。

注:样品前处理系统和恒温核酸扩增检测仪提前 30 min 预热。

7.4.8 试验成立条件

同时满足以下条件,可判定试验成立,否则应重新试验:

- a) 阳性对照出现特异性扩增曲线,扩增曲线的斜率 $K \geq 20$;
- b) 阴性对照无特异性扩增曲线,扩增曲线的斜率 $K < 20$ 。

7.4.9 结果判定

在满足 7.4.8 的条件下,当样品扩增曲线的斜率 $K \geq 20$ 时,可判为阳性;否则判为阴性。

7.5 多重 PCR 方法

7.5.1 方法特性

采用多对引物,用 PCR 方法扩增布鲁氏菌 DNA 片段,依据扩增片段的电泳图谱差异可判定布鲁氏菌的种,本文件推荐的引物不能区分猪种和犬种。本方法适合分离菌株的鉴定检测,对临床样品检测的敏感性较低。

7.5.2 仪器设备

- 7.5.2.1 恒温培养箱。
- 7.5.2.2 PCR 扩增仪及配套的 PCR 反应管。
- 7.5.2.3 电泳仪和电泳槽。
- 7.5.2.4 凝胶成像系统或紫外透射仪。
- 7.5.2.5 旋涡混匀器。
- 7.5.2.6 其余器材同 7.3.2。

7.5.3 试剂材料

- 7.5.3.1 Goldview 或其他等效核酸染料。
- 7.5.3.2 DNA marker(100 bp~2 000 bp)。
- 7.5.3.3 Tris-乙酸(TAE)电泳缓冲液及 1.5% 琼脂糖凝胶,按附录 F 中 F.1 和 F.2 配制。
- 7.5.3.4 PCR 预混液(2×)。
- 7.5.3.5 阳性对照、阴性对照,同 7.3.3.3 和 7.3.3.4。

7.5.4 引物

按表 E.3。分别用无核酸酶水将引物稀释成 10 pmol/ μ L。取等量 8 条引物混合,配制引物混合液。

7.5.5 样品及样品处理

- 7.5.5.1 样品:布鲁氏菌培养菌落。
- 7.5.5.2 样品处理,同 7.3.5、7.3.6。

7.5.6 PCR 反应体系

按表 3 配制反应体系,在 PCR 反应管中依次加入以下成分,充分混匀后,瞬时离心,确保所有反应成分混匀并集于管底,使用 PCR 反应混合液时,将试剂稀释至工作浓度。

表 3 多重 PCR 反应体系配制

组分	体积/ μL
8条引物混合液	8.0
2 \times PCR 预混液	15.0
无菌水	6.0
样品 DNA	1.0
总体积	30.0

7.5.7 PCR 反应条件

95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s,64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,进行 30 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7.5.8 电泳

用 1 \times TAE 电泳缓冲液配制 1.5% 琼脂糖凝胶,按每 100 mL 凝胶溶液加入 10 μL 的比例加入核酸染料,倒凝胶平板;取 PCR 产物 5 μL 与 1 μL 溴酚蓝缓冲液混合,加样;加 DNA marker 作为分子质量对照。5 V/cm~8 V/cm 电泳 1 h,置凝胶成像系统或紫外透射仪上观察,拍照记录检测结果。

7.5.9 试验成立条件

阴性对照无特异性扩增产物,阳性对照有与分子质量相符的特异性扩增产物,试验成立。

7.5.10 结果判定

按 F.3 的判定标准,待检验样品出现种特异扩增条带,则判定为相应的布鲁氏菌种:

- 扩增结果出现 1 682 bp 和 587 bp 两条电泳带时,判为牛种布鲁氏菌;
- 扩增结果出现 1 682 bp、1 071 bp 和 587 bp 三条电泳带时,判为羊种布鲁氏菌;
- 扩增结果出现 1 682 bp、1 071 bp、587 bp 和 272 bp 四条电泳带时,判为猪种或犬种布鲁氏菌;
- 扩增结果出现 1 682 bp 一条电泳带时,判为 A19 疫苗株;
- 扩增结果出现 1 071 bp 和 587 bp 两条电泳带时,判为绵羊附睾种布鲁氏菌。

8 免疫学诊断方法

8.1 标准血清

8.1.1 布鲁氏菌 WOAH 国际标准血清是所有其他标准血清(如国家标准血清、工作标准血清)进行比较和标准化的依据。依据 WOAH 国际标准血清可建立国家标准血清或可溯源至上述血清的工作标准血清,国际和国家标准血清可用于对布鲁氏菌病的抗体检测方法进行标准化。

8.1.2 虎红平板凝集试验(RBT)、试管凝集试验(SAT)、补体结合试验(CFT)和全乳环状试验(MRT)中所使用的抗原,可按 WOAH 国际标准血清(WOAHISS)或能溯源至 WOAHISS 的国家标准血清进行标准化。WOAHISS 来源于牛,含有 1 000 IU(SAT)和 1 000 ICFTU(国际补体结合试验单位)。

8.1.3 检测牛血清的 iELISA、cELISA 和荧光偏振试验(FPA),可使用国际标准血清中强阳性标准血清(WOAHELISA_{SPSS})、弱阳性标准血清(WOAHELISA_{WPSS})和阴性标准血清(WOAHELISA_{NSS}),

或可追溯至这 3 种标准血清的国家标准血清进行标准化。

8.1.4 检测绵羊和山羊血清的 iELISA、cELISA 和荧光偏振试验(FPA),可使用国际标准血清(IS-aBmS)或可追溯至 ISaBmS 的国家标准血清进行标准化。

8.1.5 检测猪血清的 iELISA、cELISA 和荧光偏振试验(FPA),目前还没有国际标准血清可用于标准化,但可用欧盟的标准血清或国家相关机构研制的标准血清对这 3 种方法进行标准化。

8.2 虎红平板凝集试验(RBT)

8.2.1 方法特性

RBT 是目前国内外应用最广泛的布鲁氏菌病抗体检测筛选方法之一,该方法经济、简单快速、易操作,可人工判读,也可通过与人工判读比对等效的仪器判读。

8.2.2 抗原标准化

WOAHISS 或国家标准血清稀释,与抗原进行 RBT 试验。标准血清 1:45 稀释应观察到凝集,呈阳性反应,标准血清 1:55 稀释时观察不到凝集,呈阴性反应。

8.2.3 仪器设备

8.2.3.1 微量移液器(100 μL)。

8.2.3.2 灭菌移液器枪头(200 μL)。

8.2.3.3 混匀棒、计时器。

8.2.3.4 反应板(玻璃板、白色陶瓷砖或搪瓷板)。

8.2.4 试剂材料

8.2.4.1 布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原。

8.2.4.2 布鲁氏菌阳性对照血清和阴性对照血清。

8.2.5 样品

牛、羊、鹿、骆驼、马等动物血清。

8.2.6 试验程序

8.2.6.1 在每次开始检测样品前,应用阳性对照血清和阴性对照血清分别与抗原进行反应,以确保试验条件适于检测。

8.2.6.2 将待检血清和抗原从冰箱取出,平衡至室温($22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

8.2.6.3 轻轻混匀待检血清,每份样品吸取 30 μL ,加到反应板上。

8.2.6.4 轻轻混匀抗原,在每份血清旁滴加 30 μL 等量抗原。

8.2.6.5 立即将血清与抗原混合(每个样品用一个干净的混匀棒),混合成直径约 2 cm 的圆形或椭圆形。

8.2.6.6 双手端起反应板,按不同方向轻轻摇晃反应板,室温($22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$)下作用 4 min 后,在自然光或强灯光下立即观察凝集情况。

注:检测山羊和绵羊血清时,待检血清与抗原的比例调整为 3:1(如,75 μL 血清:25 μL 抗原)能提高其检测灵敏性。

8.2.7 凝集判定标准

凝集反应程度分为 5 个等级:

- a) ++++:出现大的凝集片或颗粒,凝集块间液体完全清亮透明;
- b) +++:有明显凝集颗粒,凝集块间液体几乎清亮透明;
- c) ++:有较明显凝集颗粒,凝集块间液体稍清亮透明;
- d) +:有微弱凝集,凝集物间液体浑浊;
- e) -:无凝集,反应混合液均匀浑浊。

8.2.8 试验成立条件

同时满足下列条件,判定试验条件成立:

- a) 阳性对照血清出现“++”及以上凝集现象;
- b) 阴性对照血清无凝集“—”。

8.2.9 结果判定

符合 8.2.8 的条件,结果判定如下:

- a) 待检血清出现“+”及以上凝集现象时,判定为阳性;
- b) 待检血清出现“—”时,判定为阴性。

8.3 试管凝集试验(SAT)

8.3.1 方法特性

SAT 可在玻璃试管中或 96 孔板上进行。由于 SAT 较低的敏感性,不推荐用于非免疫畜群个体的筛查和确诊,不适用于粗糙型布鲁氏菌感染的检测。结果可人工判读,也可通过与人工判读比对等效的仪器判读。

8.3.2 抗原标准化

用 WOAHISS 或国家标准血清进行多个稀释度的 SAT 试验,标准血清 1:1 000 稀释,凝集程度应为 50%(++)。

8.3.3 样品

牛、羊、猪、鹿、骆驼、马、犬等动物血清。

8.3.4 常量法

8.3.4.1 仪器设备

8.3.4.1.1 恒温培养箱。

8.3.4.1.2 振荡器。

8.3.4.1.3 比浊仪。

8.3.4.1.4 移液器(1 000 μ L)和配套无菌吸头、玻璃试管及试管架。

8.3.4.2 试剂材料

8.3.4.2.1 布鲁氏菌试管凝集试验抗原。

8.3.4.2.2 布鲁氏菌阳性对照血清和阴性对照血清。

8.3.4.2.3 含 0.5% 苯酚的生理盐水,按附录 G 中 G.1 配制,用于牛(马、猪、鹿、骆驼、犬)血清的稀释和抗原的稀释。

8.3.4.2.4 含 0.5% 苯酚的 10% 氯化钠溶液,按 G.2 配制,用于羊血清的稀释。

8.3.4.2.5 参照比浊管,按 G.3 配制。

8.3.4.3 血清稀释

8.3.4.3.1 牛(马、鹿、骆驼)血清稀释

每份血清用 4 支试管,第 1 管加 960 μL 稀释液(含 0.5% 苯酚的生理盐水),第 2 管~第 4 管各加入 500 μL 稀释液,然后取待检血清 40 μL ,加入第 1 管内,并混合均匀;取 500 μL 混合液加入第 2 管并充分混匀,如此倍比稀释至第 4 管;从第 4 管取混匀液 500 μL 弃去。

注:稀释完毕,血清从第 1 管至第 4 管的血清稀释度分别为 1:25、1:50、1:100 和 1:200。

8.3.4.3.2 羊(猪、犬)血清稀释

每份血清用 4 支试管;第 1 管加 920 μL 稀释液(含 0.5% 苯酚的 10% 氯化钠溶液);第 2 管~第 4 管各加入 500 μL 稀释液;然后取待检血清 80 μL ,加入第 1 管内,并混合均匀;取 500 μL 混合液加入第 2 管并充分混匀,如此倍比稀释至第 4 管;从第 4 管取混匀液 500 μL 弃去。

注:稀释完毕,血清从第 1 管至第 4 管的血清稀释度分别为 1:12.5、1:25、1:50 和 1:100。

8.3.4.4 抗原稀释

用含 0.5% 苯酚的生理盐水稀释抗原到工作抗原。

8.3.4.5 加入工作抗原

分别取 500 μL 稀释好的工作抗原,加入上述各孔已稀释好的血清中,并振荡混匀。

注:牛(马、鹿、骆驼)的血清稀释度则依次变为 1:50、1:100、1:200 和 1:400;羊(猪、犬)的血清稀释度则依次变为 1:25、1:50、1:100 和 1:200。

8.3.4.6 孵育

完成上述加样后,将试管放置恒温恒湿培养箱,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 18 h~24 h。

8.3.4.7 结果观察

取出试管,与制备的比浊管进行比较,观察并记录结果。

8.3.4.8 设置对照

每次试验时均应设阳性血清对照、阴性血清对照和抗原对照。阴性血清对照和阳性血清对照的稀释与待检血清来源的动物种相同;抗原对照稀释到规定容量,取 500 μL ,再加 500 μL 稀释液,观察抗原是否有自凝现象。

8.3.4.9 凝集判定标准

凝集反应程度分为 5 个等级(参照比浊管,按各试管上层液体清亮度判读):

- a) ++++: 菌体完全凝集和沉淀,液体 100% 清亮;
- b) +++: 菌体几乎完全凝集和沉淀,液体 75% 清亮;
- c) ++: 菌体有显著凝集和沉淀,液体 50% 清亮;
- d) +: 有清楚可见的凝集和沉淀,液体 25% 清亮;
- e) -: 无凝集和沉淀,液体均匀浑浊。

8.3.4.10 试验成立条件

同时满足下列条件,判定试验条件成立:

- a) 阳性对照血清出现完全凝集“++++”;
- b) 阴性对照血清无凝集“—”;
- c) 抗原对照无自凝“—”。

8.3.4.11 结果判定

符合 8.3.4.9 的条件下,对试验结果作出阳性、可疑、阴性的判定。

- a) 阳性结果:
 - 牛、马、鹿、骆驼血清 1:100 稀释,出现“++”及以上凝集;
 - 猪、山羊、绵羊、犬血清 1:50 稀释,出现“++”及以上凝集。
- b) 可疑结果:
 - 牛、马、鹿、骆驼血清 1:50 稀释,出现“++”以上凝集;
 - 猪、山羊、绵羊、犬血清 1:25 稀释,出现“++”以上凝集。

对试验结果为“可疑”的动物,应于 3 周~4 周后重新采血检验,若为可疑,判为阳性。
- c) 阴性结果:

待检血清出现“—”,即不出现任何凝集,判定为阴性。

8.3.5 微量法

8.3.5.1 仪器设备

- 8.3.5.1.1 恒温培养箱。
- 8.3.5.1.2 振荡器。
- 8.3.5.1.3 微量移液器(20 μ L~200 μ L)及配套吸头、96 孔 U 形反应板。
- 8.3.5.1.4 薄膜、湿盒(带盖子长方形容容器,底部铺一层湿纱布或湿水纸)。

8.3.5.2 试剂材料

同 8.3.4.2。

8.3.5.3 血清稀释

8.3.5.3.1 牛(马、鹿、骆驼)血清稀释

每份血清用 4 个连续的 U 形孔;在反应板的第 1 孔加 192 μ L 稀释液(含 0.5% 苯酚的生理盐水);第 2 孔~第 4 孔各加入 100 μ L 稀释液;用微量移液器取待检血清 8 μ L,加入第 1 孔,并混匀;从第 1 孔吸取 100 μ L 混合液加入第 2 孔充分混匀,如此倍比稀释至第 4 孔,从第 4 孔弃去混合液 100 μ L。

注:稀释完毕,血清从第 1 孔至第 4 孔的血清稀释度分别为 1:25、1:50、1:100 和 1:200。

8.3.5.3.2 羊(猪、犬)血清稀释

每份血清用 4 个连续的 U 形孔,在反应板的第 1 孔加 184 μ L 稀释液(含 0.5% 苯酚的 10% 氯化钠溶液),第 2 孔~第 4 孔各加入 100 μ L 稀释液;用微量移液器取待检血清 16 μ L,加入第 1 孔,并混匀;从第 1 孔吸取 100 μ L 混合液加入第 2 孔充分混匀,如此倍比稀释至第 4 孔,从第 4 孔弃去混合液 100 μ L。

注:稀释完毕,血清从第 1 孔至第 4 孔的血清稀释度分别为 1:12.5、1:25、1:50 和 1:100。

8.3.5.4 抗原稀释

用含 0.5% 苯酚的生理盐水稀释液稀释成工作抗原。

8.3.5.5 加入工作抗原

分别取 100 μL 稀释好的工作抗原,加入上述各孔稀释好的血清中,并振荡混匀。

注:牛血清稀释度则依次变为 1:50、1:100、1:200 和 1:400;羊血清稀释度则依次变为 1:25、1:50、1:100 和 1:200。

8.3.5.6 孵育

完成上述加样后,用薄膜将反应板严密封盖后,放入湿盒,并置恒温培养箱,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 18 h~24 h。

8.3.5.7 结果观察

取出反应板,观察并记录结果。

8.3.5.8 设置对照

每次试验时均应设阳性血清对照、阴性血清对照和抗原对照。阴性血清对照和阳性血清对照的稀释与待检血清相同;抗原对照按说明书稀释到规定容量,取 500 μL ,再加 500 μL 稀释液,观察抗原是否有自凝现象。

8.3.5.9 凝集判定标准

凝集反应程度分为 5 个等级:

- a) ++++: 菌体完全凝集,1 孔~4 孔凝集物呈伞状均匀铺于孔;
- b) +++: 菌体几乎完全凝集,1 孔~3 孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底,第 4 孔孔底呈现白色点状;
- c) ++: 菌体凝集显著,1 孔~2 孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底,3 孔~4 孔孔底呈现白色点状;
- d) +: 凝集物有沉淀,第 1 孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底,2 孔~4 孔孔底呈现白色点状;
- e) -: 无凝集,1 孔~4 孔孔底均呈现白色点状。

8.3.5.10 试验成立条件

同时满足下列条件,判定试验条件成立:

- a) 阳性对照血清出现完全凝集“++++”;
- b) 阴性对照血清无凝集“-”;
- c) 抗原对照无自凝“-”。

8.3.5.11 结果判定

符合试验成立条件下,结果判定如下:

- a) 待检血清出现“++”及以上凝集现象时,判定为阳性;
- b) 待检血清出现“+”凝集现象时,判定为可疑;
- c) 待检血清出现“-”时,判定为阴性。

对试验结果为“可疑”的动物,应于 3 周~4 周后重新采血检验,若为可疑,判为阳性。

8.4 补体结合试验(CFT)

8.4.1 方法特性

CFT 特异性高,但灵敏性低于 RBT、ELISA 和 FPA。CFT 操作相对复杂,应有良好的实验设施

和训练有素的人员操作。孵育血清抗原和补体时,热结合(37℃,30 min)和冷结合(2℃~8℃,14 h~18 h)均可。热结合出现前带现象的频率和强度增加,易产生假阴性。血清学初筛方法确认抗体滴度高的样品,建议采用冷结合方式。

8.4.2 抗原标准化方法

8.4.2.1 WOAHISS 或国家标准阳性血清在 1/200 稀释度时发生 50% 补体结合反应,并在较低血清稀释度下(<200 倍稀释)发生 100% 补体结合反应。

8.4.2.2 CFT 抗原作 1/10 稀释时,37℃±2℃孵育 18 h 后,为外观均一、稠密的白色悬液,无可见凝集或沉积,试验中不产生抗补体效应。

8.4.3 常量法

8.4.3.1 仪器设备

8.4.3.1.1 水浴锅(温控范围为 37℃~38℃和 54℃~64℃)。

8.4.3.1.2 移液器和灭菌移液器吸头。

8.4.3.1.3 内口径 1 cm 玻璃试管。

8.4.3.1.4 试管架。

8.4.3.1.5 稀释用器皿。

8.4.3.2 试剂材料

8.4.3.2.1 稀释液:巴比妥缓冲液(1×)或不含巴比妥缓冲液,按附录 H 中 H.1 配制。

8.4.3.2.2 绵羊红细胞悬液,除使用商品化绵羊红细胞外,也可按 H.2 制备。

8.4.3.2.3 布鲁氏菌阳性对照血清和阴性对照血清。

8.4.3.2.4 溶血素,在有效期内根据说明书标示效价使用。如需进行效价测定,按 H.3 进行。

8.4.3.2.5 补体,每次补体结合试验时,应于当日测定补体效价。优先使用商品化冻干补体,也可使用新鲜豚鼠血清作为补体。补体制备及效价测定方法按 H.4 进行。

8.4.3.2.6 抗原,在有效期内根据说明书标示效价进行使用,如需进行效价测定,按 H.5 进行。

8.4.3.2.7 溶血标准比色管,按 H.6 制备。

8.4.3.3 样品

牛、羊、猪、鹿、骆驼、马等动物血清,待检血清的稀释和灭活按 H.7。

8.4.3.4 试验程序

每次试验应设阳性血清对照、阴性血清对照、抗原对照、溶血素对照和补体对照。试验各要素添加量和顺序见表 4,具体步骤如下。

- a) 将灭活后的待检血清作 1:10 稀释,分别加入 2 支玻璃试管内,每管 500 μL。
- b) 其中一管加工作浓度抗原 500 μL,另一管加稀释液 500 μL。
- c) 上述两管均加工作浓度补体,每管 500 μL,振荡混匀。
- d) 置 37℃水浴 20 min,取出,放于室温(22℃±4℃)环境中。每管各加 2 单位的溶血素 500 μL 和 2.5% 红细胞悬液 500 μL。充分振荡混匀。
- e) 置 37℃水浴 20 min,取出,立即进行第一次判定。

表 4 常量法补体结合试验程序

各要素加入顺序	试验各要素加入量/ μL									
	待检血清管		对照管							
			阳性血清		阴性血清		抗原	溶血素	补体	
稀释灭活血清	500	500	500	500	500	500	0	0	0	
稀释液	0	500	0	500	0	500	0	1 500	1 500	
抗原	500	0	500	0	500	0	1 000	0	0	
工作量补体	500	500	500	500	500	500	500	0	500	
37℃~38℃水浴 20 min										
2单位溶血素	500	500	500	500	500	500	500	500	0	
2.5%红细胞	500	500	500	500	500	500	500	500	500	
37℃~38℃水浴 20 min										
结果 示例	溶血 程度	—	+++ +	—	+++ +	+++ +	+++ +	+++ +	—	—
	溶血 抑制	+++ +	—	+++ +	—	—	—	—	+++ +	+++ +
	阴/阳性和 成立情况	阳性		阳性		阴性		成立	成立	成立

8.4.3.5 试验成立条件

同时满足下列条件,判定试验成立。

- 第一次判定,不加抗原的阳性血清对照管、不加或加抗原的阴性血清对照管、抗原对照管呈完全溶血反应。
- 第一次判定静置 12 h 后,作第二次判定。第二次判定时,溶血素对照管、补体对照管应呈完全抑制溶血反应,即 100% 不发生溶血。

8.4.3.6 结果判定

在试验成立条件下,对待检血清进行判定。将加抗原的待检血清管与参照标准比色管(见 H.6.1)进行比色,记录结果。牛、羊和猪补体结合反应判定标准均相同,判定标准如下:

- 溶血抑制程度 $<50\%$,判为阳性;
- 溶血抑制程度 $50\% \sim <100\%$,判为可疑;
- 溶血抑制程度为 100% ,判为阴性。

8.4.4 微量法

8.4.4.1 仪器设备

8.4.4.1.1 水浴锅(温控范围为 $37\text{℃} \sim 38\text{℃}$ 和 $54\text{℃} \sim 64\text{℃}$)。

8.4.4.1.2 移液器($100\ \mu\text{L}$ 、 $200\ \mu\text{L}$)和配套灭菌移液器吸头。



8.4.4.1.3 96孔U形聚苯乙烯板。

8.4.4.1.4 稀释用器皿。

8.4.4.2 试剂材料

同 8.4.3.2。

8.4.4.3 样品

牛、羊、猪、鹿、骆驼、马等动物血清，待检血清的稀释和灭活按 H.7。

8.4.4.4 试验程序

每次试验应设阳性血清、阴性血清、抗原、致敏红细胞和补体对照。补体结合试验各要素添加量和顺序见表 5，具体操作按以下试验程序。

- a) 血清样品稀释，96孔板第 1、2 排作为血清抗补体对照，血清稀释度为 1/2、1/4；从第 3 排到第 8 排血清样品稀释度分别为 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64，按如下步骤操作：
 - 1) 第 1 排每孔分别加 50 μL 稀释液，第 2、4、5、6、7、8 排每孔分别加稀释液 25 μL；
 - 2) 第 1 排每孔加 50 μL 灭能血清，混匀后吸取 25 μL 加入其后的第 2 排孔，混匀后弃去 25 μL；
 - 3) 从第 1 排孔混匀液体中先后各吸取 25 μL 分别加入同列的第 3 排、第 4 排孔，混匀；
 - 4) 从第 4 排起倍比稀释，即从第 4 排孔吸取液体 25 μL 到同列第 5 排孔，混匀，以此类推到第 8 排；
 - 5) 第 8 排孔吸取 25 μL 液体弃去。
- b) 加抗原，除第 1 排、第 2 排外，上述每孔分别加工作量抗原 25 μL。
- c) 加补体，上述每孔分别加工作浓度补体 25 μL，轻轻混匀，置 4℃ 孵育过夜或 37℃ 孵育 30 min。
- d) 制备致敏红细胞，将 2.5% 红细胞及溶血素等体积混匀至室温 20 min。
- e) 孵育，将孵育过夜的 96 孔板从冰箱取出置 37℃ 孵育 10 min。
- f) 加致敏红细胞，上述每孔加入 50 μL 致敏红细胞，轻轻混匀，37℃ 孵育 30 min。
- g) 在室温条件下 1 000g 离心 5 min~10 min，或者在 2℃~8℃ 放置 2 h~3 h 让细胞自然沉降，观察判定。

表 5 微量法补体结合试验程序

试验要素	待检血清孔/μL		对照孔/μL						
	待检血清	抗补体对照	阳性血清	阳性血清抗补体对照	阴性血清	阴性血清抗补体对照	抗原	致敏红细胞	补体
血清稀释度	1/2~1/64	1/2~1/4	1/2~1/64	1/2~1/4	1/2~1/64	1/2~1/4	—	—	—
被稀释的血清	25	25	25	25	25	25	0	0	0
稀释液	0	25	0	25	0	25	25	75	50
抗原	25	0	25	0	25	0	25	0	0
工作浓度补体	25	25	25	25	25	25	25	0	25

轻轻混匀后，置 37℃ 孵育 30 min 或 2℃~8℃ 孵育过夜（以 2℃~8℃ 孵育过夜为例）

表5 微量法补体结合试验程序(续)

试验要素	待检血清孔/ μL		对照孔/ μL						
血清	待检血清	抗补体对照	阳性血清	阳性血清抗补体对照	阴性血清	阴性血清抗补体对照	抗原	致敏红细胞	补体
第二天:制备致敏红细胞,将提前配好的2.5%红细胞和溶血素(分别储存在冰箱)等体积混匀,置室温10 min									
10 min后,将96孔板从2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出,置37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min(保证致敏红细胞置于室温20 min)									
致敏红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50
轻轻混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min									
1 000g 室温离心5 min~10 min或2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 放置2 h~3 h让细胞自然沉降。根据每孔溶血程度判定阴性或阳性									

8.4.4.5 试验成立条件

满足下列条件,试验成立:

阳性血清的抗补体对照、阴性血清对照、阴性血清抗补体对照、抗原对照和补体对照呈完全溶血反应,致敏红细胞对照呈完全抑制溶血反应。

8.4.4.6 结果判定

满足试验成立条件,将待检血清孔与溶血标准比色孔进行比色,记录结果,并按表6,将溶血抑制的百分比换算成标准的国际单位。结果判定标准:待检血清的溶血抑制程度 ≥ 20 IU/mL,判为抗体阳性。

表6 微量补体结合试验判定标准

血清稀释度	溶血抑制/(IU/mL)			
	25%(+)	50%(++)	75%(+++)	100%(++++)
1/2	8.33	10	11.67	13.33
1/4	16.67	20 ^a	23.33	26.67
1/8	33.33	40	46.67	53.33
1/16	66.67	80	93.33	106.67
1/32	133.33	160	187	213.33
1/64	266.67	320	373.33	426.67
1/128	533.33	640	746.67	853.33
1/256	1 066.67	1 280	1 493.33	1 706.67

^a 溶血抑制程度 ≥ 20 IU/mL判为阳性。

8.5 间接 ELISA 抗体检测方法 (iELISA)

8.5.1 方法特性

iELISA 方法常用光滑型脂多糖(S-LPS)作为包被抗原,用于检测血清和乳样中的抗体。需要注意的是由于布鲁氏菌与小肠耶尔森菌(O:9)、大肠杆菌 O:157 等细菌存在表面一致性抗原,动物存在上述细菌感染时,可能出现假阳性结果,其发生率因时间和地域不同而异,实际工作中当一个从未确诊过布鲁氏菌病的畜群,检出少量阳性时,应进行鉴别检测。

8.5.2 iELISA 检测方法标准化

8.5.2.1 用于检测血清样品 iELISA 检测方法的标准化

8.5.2.1.1 用于检测牛血清方法标准化,同时满足如下条件:

- 用阴性牛血清(或多头阴性牛混合血清)将国际标准抗牛种布鲁氏菌弱阳性血清(WOAHELISA_{WP}SS)(或可追溯到 WOAHELISA_{WP}SS 的国家标准血清),作 1/2 稀释;或将国际标准抗牛种布鲁氏菌强阳性血清(WOAHELISA_{SP}SS)(或可追溯到 WOAHELISA_{SP}SS 的国家标准血清),作 1/16 稀释。稀释后的血清经 iELISA 检测,结果为阳性;
- 用阴性牛血清(或多头阴性牛混合血清)将国际标准抗牛种布鲁氏菌弱阳性血清(WOAHELISA_{WP}SS)(或可追溯到 WOAHELISA_{WP}SS 的国家标准血清),作 1/8 稀释;或将国际标准抗牛种布鲁氏菌强阳性血清(WOAHELISA_{SP}SS)(或可追溯到 WOAHELISA_{SP}SS 的国家标准血清),作 1/64 稀释。稀释后的血清经 iELISA 检测,结果为阴性;
- 国际标准牛源阴性血清,或国家标准阴性血清,经 iELISA 检测,结果为阴性。

8.5.2.1.2 用于检测绵羊和山羊血清的方法标准化,同时满足如下条件:

- 用阴性羊血清(或多头阴性羊混合血清)将标准抗羊种布鲁氏菌阳性血清(ISaBmS)(或可追溯到 ISaBmS 的国家标准血清),作 1/64 稀释,稀释后的血清经 iELISA 检测,结果为阳性;
- 用阴性羊血清(或多头阴性羊混合血清)将标准抗羊种布鲁氏菌阳性血清(ISaBmS)(或可追溯到 ISaBmS 的国家标准血清),作 1/750 稀释,稀释后的血清经 iELISA 检测,结果为阴性;
- 上述阴性羊血清(或多头阴性羊混合血清)经 iELISA 检测,结果为阴性。

8.5.2.2 用于检测乳样 iELISA 检测方法的标准化

满足如下条件:

- 用阴性牛血清对国际标准抗牛种布鲁氏菌强阳性血清(WOAHELISA_{SP}SS)作 1/125 稀释,再用阴性牛乳作 1/10 稀释,检测结果仍为阳性;
- 检测绵羊和山羊乳的 iELISA 和检测牛的相同,可用合适的验证方法设置阈值(cut-off 值)。

8.5.3 仪器设备

8.5.3.1 恒温培养箱。

8.5.3.2 酶标仪。

8.5.3.3 振荡器。

8.5.3.4 96 孔酶标板、洗板机或洗涤瓶、储液槽、封板膜、吸水纸。

8.5.3.5 移液器(2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL)及配套无菌枪头。

8.5.4 试剂材料

8.5.4.1 包被抗原 LPS,按附录 I 中 I.1 提取。

- 8.5.4.2 包被液(0.05 mol/L 的 pH 9.6 碳酸盐缓冲液),按 I.2 配制。
- 8.5.4.3 封闭液(含 2% BSA、0.05% 吐温-20 的 pH 7.4 PBS),按 I.3 配制。
- 8.5.4.4 样品稀释液(含 1% BSA 的 pH 7.4 PBS),按 I.4 配制。
- 8.5.4.5 洗涤液(含 0.05% 吐温-20 的 pH 7.4 PBS),按 I.5 配制。
- 8.5.4.6 显色液,按 I.6 配制。
- 8.5.4.7 终止液(2 mol/L 硫酸),按 I.7 配制。
- 8.5.4.8 酶标蛋白 G:辣根过氧化物酶标记链球菌蛋白 G。
- 8.5.4.9 布鲁氏菌阳性对照血清和阴性对照血清。

8.5.5 样品

- 8.5.5.1 血清。
- 8.5.5.2 乳样。

8.5.6 试验程序

- 8.5.6.1 用包被液将 LPS 包被抗原稀释至终浓度 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔加入 100 μL ,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 包被 16 h。弃去反应孔中的液体,以洗涤液 300 μL /孔洗板 3 次后拍干。
- 8.5.6.2 加入封闭液,200 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,以洗涤液 300 μL /孔洗板 3 次后拍干备用。
- 8.5.6.3 用样品稀释液将待检血清(或乳样)和阴性对照血清、阳性对照血清作 40 倍稀释。
- 8.5.6.4 按图 1 分布,分别加入稀释后的阴性对照血清、阳性对照血清和待检血清。每孔加入稀释后血清 200 μL ,室温(22 $^{\circ}\text{C}$ ±4 $^{\circ}\text{C}$)孵育 40 min。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	S5										
B	NC	S6										
C	PC											
D	PC											
E	S1											
F	S2											
G	S3											
H	S4											

标引序号说明:

- PC —— 阳性对照血清;
- NC —— 阴性对照血清;
- S1、S2、S3、S4 等 —— 待检血清孔,其余类推。

图 1 酶标板血清排列分布示意(推荐模式)

- 8.5.6.5 弃去反应孔中的液体,加入洗涤液,300 μL /孔,洗板 3 次后拍干。
- 8.5.6.6 加入用样品稀释液按 1:1 000 稀释的酶标蛋白 G,100 μL /孔,室温避光孵育 40 min。
- 8.5.6.7 弃去反应孔中的液体,加入洗涤液,300 μL /孔,洗板 3 次后拍干。
- 8.5.6.8 加入显色液,100 μL /孔,室温避光孵育 10 min。
- 8.5.6.9 加入终止液,50 μL /孔,终止反应。
- 8.5.6.10 用酶标仪在 450 nm 波长下测定每孔 OD 值。
- 8.5.6.11 S/P 值按式(1)计算:

$$S/P = (OD_{450-S} - OD_{450-NC}) / (OD_{450-PC} - OD_{450-NC}) \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- S/P ——样品数值；
- OD_{450-S} ——待检血清样品在 450 nm 波长处的 OD 值；
- OD_{450-NC} ——阴性对照血清在 450 nm 波长处的 OD 值；
- OD_{450-PC} ——阳性对照血清在 450 nm 波长处的 OD 值。

8.5.7 试验成立条件

OD_{450-NC} ≤ 0.2 且 OD_{450-PC} ≥ 0.8, 试验结果有效；否则重新进行检测。

8.5.8 结果判定

在试验成立的条件下, 样品 S/P < 1.0 时, 判为抗体阴性；样品 S/P ≥ 1.0, 判为抗体阳性。

注：商品化试剂盒的操作和结果判定见其说明书。

8.6 竞争 ELISA 抗体检测方法 (cELISA)

8.6.1 方法特性

采用布鲁氏菌光滑型 LPS 抗原及其特异性单克隆抗体建立的 cELISA 方法, 检测牛、羊血清时, 与 RBT 和 iELISA 相比, 具有较高的特异性和稍低的敏感性。

8.6.2 cELISA 检测方法标准化

参照 8.5.2。

8.6.3 仪器设备

同 8.5.3。

8.6.4 试剂材料

- 8.6.4.1 单克隆抗体制备, 见附录 J。
- 8.6.4.2 酶标二抗, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗鼠酶标二抗。
- 8.6.4.3 包被抗原、包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液, 同 8.5.4。
- 8.6.4.4 布鲁氏菌强阳性对照血清、弱阳性对照血清和阴性对照血清。

8.6.5 样品

血清。

8.6.6 试验程序

- 8.6.6.1 用包被液将 LPS 包被抗原稀释至终浓度 2.0 μg/mL, 每孔加入 100 μL/孔, 4 °C 孵育 16 h~18 h, 以洗涤液 300 μL/孔洗板 3 次后拍干。
- 8.6.6.2 加入封闭液, 200 μL/孔, 37 °C 孵育 2 h, 以洗涤液 300 μL/孔洗板 3 次后拍干备用。
- 8.6.6.3 用样品稀释液将待检血清与强阳性对照血清, 弱阳性对照血清, 阴性对照血清作 10 倍稀释。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC++	S1										
B	PC++	S2										
C	PC+	S3										
D	PC+	S4										
E	NC											
F	NC											
G	Blank											
H	Blank											

标引序号说明:

- PC++ ——强阳性对照血清;
 PC+ ——弱阳性对照血清;
 NC ——阴性对照血清;
 Blank ——空白对照;
 S1、S2、S3、S4 等 ——待检血清孔,其余类推。

图 2 酶标板微孔排列示意(推荐模式)

8.6.6.4 按图 2 分布,分别加入稀释后的待检血清与强阳性对照血清、弱阳性对照血清和阴性对照血清,50 μL/孔,立即加入工作浓度的酶标单克隆抗体 50 μL/孔,缓和混匀后,室温(22℃±4℃)孵育 45min。

8.6.6.5 弃去反应孔中的液体,加入洗涤液,300 μL/孔,洗板 4 次后拍干。

8.6.6.6 加入用样品稀释液按 1:8 000 稀释的 HRP 标记抗鼠 IgG,100 μL/孔,室温(18℃~25℃)孵育 45min。

8.6.6.7 弃去反应孔中的液体,加入洗涤液,300 μL/孔,洗板 4 次后拍干。

8.6.6.8 加入显色液,100 μL/孔,室温(18℃~25℃)避光孵育 10 min。

8.6.6.9 加入终止液,50 μL/孔,终止反应。

8.6.6.10 用酶标仪在 450 nm 波长下测定每孔 OD 值。

8.6.6.11 待检样品抑制率按式(2)计算:

$$PI = (OD_{450-NC} - OD_{450-S}) / OD_{450-NC} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- PI ——抑制率;
 OD_{450-NC} ——阴性对照血清在 450 nm 波长处的 OD 值;
 OD_{450-S} ——待检血清样品在 450 nm 波长处的 OD 值。

8.6.7 试验成立条件

- 空白对照 OD 值(450 nm):0.75~2.0。
 强阳性对照血清抑制率(PI):80%~100%。
 弱阳性对照血清抑制率(PI):35%~65%。
 阴性对照血清抑制率(PI):—15%~15%。

8.6.8 结果判定

在试验成立的前提下,抑制率(PI)≥30% 判为阳性,抑制率(PI)<30% 判为阴性。

注:商品化试剂盒的操作和结果判定见其说明书。

8.7 荧光偏振试验(FPA)

8.7.1 方法特性

FPA方法的原理是将光滑型LPS的O侧链多糖(OPS)用异硫氰荧光素(FITC)进行标记作为抗原,通过荧光偏振仪来检测血清或乳中的抗布鲁氏菌抗体。该方法有单管便携式和96孔台式两种,其中单管便携式也适用于野外检测。现有检测数据证明,仅对幼畜规范免疫后,相对于其他血清学方法,FPA检测免疫抗体呈阴性结果的时间缩短。

8.7.2 FPA检测方法标准化

8.7.2.1 用于检测牛血清FPA方法的标准化

同时满足如下条件:

- a) 对国际标准血清(WOAHELISA_{WP}SS和WOAHELISA_{SP}SS),或可追溯到WOAHELISA_{WP}SS和WOAHELISA_{SP}SS的国家标准血清,均呈阳性反应;
- b) 用阴性牛血清(或多头阴性牛混合血清)将国际标准血清WOAHELISA_{WP}SS(或可追溯到WOAHELISA_{WP}SS的国家标准血清),作1/8稀释;或将国际标准血清WOAHELISA_{SP}SS(或可追溯到WOAHELISA_{SP}SS的国家标准血清),作1/64稀释。稀释后的血清经FPA检测,结果均为阴性;
- c) 用国际标准阴性血清(WOAHELISA_NSS),或可追溯到WOAHELISA_NSS的国家标准血清,经FPA检测,结果为阴性。

8.7.2.2 用于检测绵羊和山羊血清FPA方法的标准化

同时满足如下条件。

- a) 用阴性羊血清(或多头阴性羊混合血清)将标准抗羊种布鲁氏菌阳性血清(ISaBmS)(或可追溯到ISaBmS的国家标准血清),作1/16稀释。稀释后的血清经FPA检测,结果为阳性。
- b) 用阴性羊血清(或多头阴性羊混合血清)将国际标准抗羊种布鲁氏菌阳性血清(ISaBmS),或可追溯到ISaBmS的国家标准血清,作1/200稀释。稀释后的血清经FPA检测,结果为阴性。
- c) 上述阴性羊血清(或多头阴性羊混合血清),经FPA检测,结果为阴性。

8.7.3 样品

牛、羊、骆驼、鹿等动物血清。

8.7.4 单管法

8.7.4.1 仪器设备

- 8.7.4.1.1 荧光偏振仪(单管便携式)。
- 8.7.4.1.2 旋涡振荡器。
- 8.7.4.1.3 移液器(10 μ L、100 μ L、1 000 μ L)及配套吸头。
- 8.7.4.1.4 10 mm \times 75 mm 硼硅玻璃试管(试管应清洁、无指纹、无刮痕)。

8.7.4.2 试剂材料

- 8.7.4.2.1 标记抗原,按附录K中K.1制备。

8.7.4.2.2 样品稀释液,按 K.2 配制。

8.7.4.2.3 布鲁氏菌阳性对照血清和阴性对照血清。

8.7.4.3 试验程序

8.7.4.3.1 从冰箱取出待检血清及试剂,平衡至室温($22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

8.7.4.3.2 在硼硅玻璃试管加入 1 mL 的 FPA 样品稀释液,加入 10 μL 牛血清(或 25 μL 绵羊血清、或 40 μL 山羊血清、或 40 μL 猪血清、或 10 μL 骆驼血清、或 10 μL 鹿血清),旋涡混合器振动 5 s 充分混匀。

8.7.4.3.3 使用荧光偏振仪读取待检血清试管的空白 FP 值(荧光偏振值,单位为 mP)。

8.7.4.3.4 在上述试管中加入 10 μL 标记抗原,充分混合均匀(旋涡混合器振动 5 s),孵育 2 min~5 min,使用荧光偏振仪读取待检血清的 FP 值。

8.7.4.4 试验成立条件

在每次试验前或荧光偏振仪被移动后,按 8.7.4.3 的程序,对荧光偏振仪进行校准,对照血清 FP 值:

- a) 阴性对照血清的 FP 值应在 65 mP~75 mP;
- b) 阳性对照血清的 FP 值应大于 150 mP。

如果荧光偏振仪检测的阴性对照血清或阳性对照血清不在上述范围内,应按荧光偏振仪提供的校准程序,调试荧光偏振仪的参考因子值,直到荧光偏振仪检测的阴性对照血清或阳性对照血清处于上述范围内。

8.7.4.5 结果判定

8.7.4.5.1 牛血清:

- a) 待检牛血清 FP 值 $<95\text{ mP}$,判为阴性;
- b) 待检牛血清 FP 值 $\geq 95\text{ mP}$,判为阳性;
- c) 仅对犍牛(3月龄~6月龄)免疫,免疫后 12 个月~18 个月进行检测,待检牛血清 FP 值 $>115\text{ mP}$,判为阳性;牛血清 $95\text{ mP}\leq\text{FP 值}\leq 115\text{ mP}$ 判为可疑。判为“可疑”的动物,应于 3 周~4 周后重新采血检验,若仍为可疑,判为阳性。

8.7.4.5.2 绵羊血清:

- a) 待检绵羊血清 FP 值 $<78\text{ mP}$ 为阴性;
- b) 待检绵羊血清 FP 值 $\geq 78\text{ mP}$ 为阳性;
- c) 仅对羔羊(3月龄~4月龄)免疫,免疫后 6 个月~12 个月进行检测,待检绵羊血清 FP 值 $>88\text{ mP}$ 为阳性,判为阳性;绵羊血清 $78\text{ mP}\leq\text{FP 值}\leq 88\text{ mP}$ 为可疑;判为“可疑”的动物,应于 3 周~4 周后重新采血检验,若仍为可疑,判为阳性。

8.7.4.5.3 山羊血清:

- a) 待检山羊血清 FP 值 $<88\text{ mP}$ 为阴性;
- b) 待检山羊血清 FP 值 $\geq 88\text{ mP}$ 为阳性。

8.7.4.5.4 骆驼血清:

- a) 待检骆驼血清 FP 值 $<90\text{ mP}$ 为阴性;
- b) 待检骆驼血清 $90\text{ mP}\leq\text{FP 值}\leq 110\text{ mP}$,判为可疑;判为“可疑”的动物,应于 3 周~4 周后重新采血检验,若仍为可疑,判为阳性。
- c) 待检骆驼血清 FP 值 $>110\text{ mP}$ 为阳性。

8.7.4.5.5 鹿血清：

- a) 待检鹿血清 FP 值 < 88 mP 为阴性；
- b) 待检鹿血清 FP 值 ≥ 88 mP 为阳性。

注：商品化试剂盒的操作和结果判定见其说明书。

8.7.5 微量法

8.7.5.1 仪器设备

8.7.5.1.1 荧光偏振仪(96孔台式)。

8.7.5.1.2 平板振荡器。

8.7.5.1.3 96孔荧光偏振板、移液器(10 μ L、200 μ L、1 000 μ L)、多道移液器(200 μ L)和配套无菌吸头。

8.7.5.2 试剂材料

 同 8.7.4.2。

8.7.5.3 试验程序

8.7.5.3.1 血清稀释：取 96 孔黑色平底不透明微量板，将待检血清、阳性对照血清和阴性对照血清分别加入到 96 孔荧光分析板中，20 μ L/孔。其中阳性对照血清和阴性对照血清各加 3 孔。加样过程注意避免产生气泡。向每孔中加 180 μ L 1 \times 样品稀释液，充分混匀。

8.7.5.3.2 孵育：室温下孵育反应板 3 min~30 min。

8.7.5.3.3 读本底 FP 值：将反应板置于荧光偏振仪中，读取每孔血清本底 FP 值。

8.7.5.3.4 加入抗原：取出反应板，向每孔立即加入 10 μ L 荧光标记抗原，充分混匀。

8.7.5.3.5 孵育：室温下孵育反应板 2 min~5 min。

8.7.5.3.6 读取每孔 FP 值：将反应板再次置于荧光偏振仪中，读取每孔抗原-抗体复合物 FP 值。

8.7.5.3.7 待检样品 Δ mP 值的计算：经荧光偏振仪操作系统软件，自动计算出每孔的 Δ mP 值(Δ mP 值为样品 FP 值与阴性对照平均 FP 值的差)。

8.7.5.4 试验成立条件

在每次试验前或荧光偏振仪被移动后，都要用对照血清，按 8.7.5.3，对荧光偏振仪进行校准，对照血清 FP 值：

- a) 阴性对照血清的 FP 值应在 70 mP~95 mP；
- b) 阳性对照血清的 FP 值应大于 120 mP~250 mP。

如果阴性对照或阳性对照产生的值超出上述范围，则使用荧光偏振仪提供的校准程序重新校准仪器。

8.7.5.5 结果判定

结果判定如下：

- a) 待检样品的 Δ mP > 20 mP，判为阳性；
- b) 待检样品的 Δ mP ≤ 10 mP，判为阴性；
- c) 待检样品的 10 mP $< \Delta$ mP ≤ 20 mP，判为可疑。

判为“可疑”的动物，应于 3 周~4 周后重新采血检验，若仍为可疑，判为阳性。

注：商品化试剂盒的操作和结果判定见其说明书。

8.8 全乳环状试验(MRT)(仅适用于牛)

8.8.1 方法特性

MRT 可用于泌乳期牛个体水平和群体水平布鲁氏菌病的筛查。用于群体水平筛查时,应根据牛群规模,调整所用的大缸乳样量,以降低乳样对抗体稀释造成的影响。当乳样中含有异常成分(如初乳)或牛患乳房炎,易出现假阳性。

8.8.2 抗原标准化方法

用含 0.5% 苯酚的生理盐水将抗原 1:20 稀释,乳层颜色均一,无沉淀,乳脂层无色;WOAHISS 或国家标准血清 1:1 000 稀释,用 50 μ L 稀释血清和 50 μ L 稀释抗原混合进行 MRT 试验,应呈阳性反应“++”。

8.8.3 仪器设备

移液器(100 μ L、1 000 μ L)及灭菌吸头、内径为 1 cm 的灭菌试管。

8.8.4 试剂材料

8.8.4.1 布鲁氏菌全乳环状试验抗原。

8.8.4.2 含 0.5% 苯酚的生理盐水,按 G.1 配制。

8.8.5 样品

新鲜乳样。新鲜乳样如不能立即检测,可在样品中加入防腐剂(终浓度为 0.1% 福尔马林或 0.02% 溴硝丙二醇)处理,未加防腐剂的乳样储存不应超过 72 h,乳样不应冻结、加热或剧烈振荡。

8.8.6 试验程序

8.8.6.1 将乳样和抗原置于室温($22\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$);仅从冰箱中取出试验当日所需抗原量。

8.8.6.2 轻轻摇动抗原瓶,直至摇匀。

8.8.6.3 取 50 μ L 抗原,加到 1 mL~2 mL 全乳上面。大缸乳样可适量增加体积,乳样量的调整为牛群规模 <150 头时,用 1 mL 乳样;150 头~450 头时,用 2 mL 乳样;451 头~700 头时,用 3 mL 乳样。

8.8.6.4 全乳和抗原混合物在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h,同时设置阳性和阴性对照。为增加试验的灵敏性和结果的易读性,可在 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

8.8.7 结果判定

结果按以下标准进行判定,判为“可疑”的动物,应于 3 周~4 周后重新采血检验,若仍为可疑,判为阳性。

- a) 强阳性反应(+++):上层乳脂形成明显红色环带,下部乳柱为白色,与红色环带界限分明。
- b) 阳性反应(++):乳脂层呈红色,但不显著,下部乳柱略带颜色。
- c) 弱阳性反应(+):乳脂层带颜色,但不显著,下部乳柱不褪色。
- d) 可疑反应(\pm):乳脂层环带颜色不明显,与下部乳柱分界不清,乳柱不褪色。
- e) 阴性反应(-):乳脂层无颜色变化,下部乳柱颜色均匀。

注:使用不同的抗原染料,环带颜色可能不同。

8.9 免疫层析法(ICA)

8.9.1 方法特性

免疫层析检测方法亦称为试纸条检测方法,基于光滑型 LPS 建立的 ICA 抗体检测方法其敏感性高于 RBT,可用于牛、羊布鲁氏菌病抗体的筛查,尤其适于田间检测。ICA 方法可根据标记物的不同,选择相应的检测仪器和试验程序。

8.9.2 仪器设备

滴管(每滴 20 μL ~30 μL)。

8.9.3 试剂材料

8.9.3.1 布鲁氏菌抗体检测试纸条。

8.9.3.2 PBS(0.01 mol/L pH 7.2)。

8.9.4 样品

血清。

8.9.5 操作程序(以间接法为例)

8.9.5.1 拆开密封袋,取出试纸条。

8.9.5.2 用滴管吸取待检血清,加 1 滴(20 μL ~30 μL)到试纸条的加样孔中。

8.9.5.3 用滴管向加样孔中加 PBS 缓冲液 2 滴~3 滴(60 μL ~100 μL)。

8.9.5.4 置于室温 10 min~20 min,读取结果。

8.9.6 试验成立条件

在试纸条标记“C”的位置出现一条反应指示条带,判定试验结果成立,否则判定试验结果不成立。

8.9.7 结果判定

在试验成立条件下,进行判定如下:

- a) 出现两条反应指示条带,一条位于标记“C”的位置,另一条位于标记“T”的位置,判为阳性;
- b) 只出现一条反应指示条带,位于标记“C”的位置,而在标记“T”的位置无反应指示条带,判为阴性。

注:商品化试剂盒的操作和结果判定见其说明书。



9 综合判定

9.1 布鲁氏菌疑似感染动物判定

满足下列条件之一,可判定为疑似布鲁氏菌感染动物:

- a) 出现临床症状(5.2)和/或病理变化(5.3)的;
- b) 经涂片镜检(7.1),结果为疑似布鲁氏菌的;
- c) 非免疫动物,经 RBT(8.2)、iELISA(8.5)、cELISA(8.6)、FPA(8.7)、ICA(8.9)的任意一种方法进行筛查,结果为阳性的。

9.2 布鲁氏菌感染动物判定

9.2.1 非免疫动物及停止免疫 24 个月以上的动物,满足以下条件之一,可判定为布鲁氏菌感染动物:

- a) 经病原学诊断方法(7.2、7.3 和 7.4)之一,检测结果为阳性的;
- b) 符合 9.1a)和/或 9.1b),经 RBT(8.2)、CFT(8.4)、iELISA(8.5)、cELISA(8.6)、FPA(8.7)或 ICA(8.9)任意一种方法检测,结果为阳性的;
- c) 符合 9.1c),经 CFT(8.4)、iELISA(8.5)、cELISA(8.6)或 FPA(8.7)的任意一种方法进行复核,结果为阳性的,且所选复核方法应与 9.1c)筛查方法不同。

9.2.2 免疫动物,满足以下条件之一的,可判定为布鲁氏菌感染动物:

- a) 经 7.3 检测,结果为野毒株核酸阳性,或免疫 6 个月之后,经病原学诊断方法(7.2、7.3 和 7.4)之一检测,结果为阳性的;
- b) 仅实施幼畜(牛 3 月龄~6 月龄,羊 3 月龄~4 月龄)免疫,牛免疫 18 个月后,羊免疫 12 个月后,经 RBT(8.2)、iELISA(8.5)、cELISA(8.6)、FPA(8.7)或 ICA(8.9)的任意一种方法初筛为阳性,经 SAT(8.3)、CFT(8.4)、cELISA(8.6)或 FPA(8.7)的任意一种方法再次检测,结果为阳性的。

附 录 A
(资料性)
检测方法的适用性

每种检测方法的适用性如表 A.1 所示。

表 A.1 各检测方法的适用性

方法	适用目的				
	畜群无疫检测	无疫动物个体检测	根除计划实施	疑似动物或临床病例确诊	群体流行率监测
病原学方法					
菌体染色镜检	—	—	—	+	—
细菌培养	—	—	—	+++	—
实时荧光PCR	—	—	—	+/+++	—
荧光RAA	—	—	—	+/+++	—
免疫学方法					
虎红平板凝集试验(RBT)	+++	++	+++	+	+++
免疫层析试验(ICA)	++	++	++	+	++
荧光偏振试验(FPA)	++	++	+	++	++
补体结合试验(CFT)	++	++	+++	++	+++
间接酶联免疫吸附试验(iELISA)	+++	++	+++	++	+++
竞争酶联免疫吸附试验(cELISA)	++	+	+	+	++
试管凝集试验(SAT)	++	+	+	—	+
全乳环状试验(MRT)	+++	—	+++	+	+++
注：+++ 推荐方法；++ 适用方法；+ 在某些情况下可能适用，但是方法的成本、可靠性或其他因素严重限制其使用；— 不适合此目的。					

附 录 B
(规范性)
布鲁氏菌培养基的配制

B.1 基础培养基

配制基础培养基的配方如下：

- 15 g 琼脂；
- 10 g 蛋白胨；
- 5 g 氯化钠；
- 5 g 酵母浸出物；
- 1 000 mL 双蒸水。

上述成分混合,加热使琼脂融化,调 pH 至 7.4,然后置 121 ℃高压灭菌 15 min。

B.2 血清葡萄糖培养基

将 B.1 中基础培养基融化,冷却至 50 ℃,加入除菌并灭活的马或小牛血清以及除菌的葡萄糖溶液,使血清的终浓度为 5%,葡萄糖的终浓度为 1%。用于布鲁氏菌的纯培养。

B.3 选择培养基

取 1 000 mL 血清葡萄糖培养基加入下列成分：

- 20 mg 万古霉素(Vancomycin)；
- 100 000U 制霉菌素(Nystatin)；
- 7.5 mg 黏菌素(Colistin)；
- 10 mg 呋喃妥因(Nitrofurantoin)；
- 4 mg 两性霉素 B(Amphotericin B)。

配制成选择培养基,用于陈旧性病料和污染性病料布鲁氏菌的分离培养。



附 录 C
(规范性)
生化反应试剂的配制

C.1 结晶紫储备液和工作液配制

C.1.1 A液

称取 2 g 结晶紫染料溶于 20 mL 无水乙醇中。

C.1.2 B液

称取 0.8 g 草酸铵溶于 80 mL 蒸馏水中。

C.1.3 储备液

将 A 液和 B 液充分混合,即为储备液。储备液应在密封瓶中保存,可使用 3 个月。

C.1.4 工作液

使用时用蒸馏水按 1:40 稀释为工作液即可。

C.2 氧化酶试验试剂配制

警示——*N,N*-二甲基-1,4-苯二胺草酸盐具有毒性,有害健康,可通过吸入、与皮肤接触或吞食而中毒。

取 1.0 mL 蒸馏水于离心管中,加入 *N,N*-二甲基-1,4-苯二胺草酸盐 10 mg,盖好密封盖,振荡混匀,配制成氧化酶试剂。现配现用。

C.3 尿素酶活性试验培养基配方及制备

C.3.1 培养基配方

所需试剂如下:

- 1 g 蛋白胨;
- 5 g 氯化钠;
- 2 g 磷酸二氢钾;
- 1 g 葡萄糖;
- 0.012 g 酚红;
- 15 g 琼脂;
- 20 g 尿素;
- 1 000 mL 蒸馏水。

C.3.2 制备方法

C.3.2.1 除尿素外,其余各成分混合后加 900 mL 蒸馏水,加热溶解,调 pH 至 6.9,并 121 °C 高压灭菌 15 min,然后冷却至 55 °C。

C.3.2.2 取 20 g 尿素溶于 100 mL 蒸馏水,然后用 0.22 μm 滤器过滤除菌。

C.3.2.3 将过滤除菌的尿素溶液加入冷却至 55 °C 的灭菌培养基中,充分混匀,最后倒入平皿,冷却后置 4 °C 备用。

附录 D

(规范性)

布鲁氏菌种和生物型的生化鉴定

按表 D.1 和表 D.2 判定布鲁氏菌菌株的种和生物型。

表 D.1 布鲁氏菌种的鉴定表

布鲁氏菌种	菌落形态 ^b	血清需求	噬菌体裂解 ^a					氧化酶	脲酶	优势宿主
			Tb		Wb	Iz ₁	R/C			
			RTD ^c	10 ⁴ RTD	RTD	RTD	RTD			
牛种	S	— ^d	+	+	+	+	—	(+) ^e	(+) ⁱ	牛和其他牛科动物
羊种	S		—	—	(—) ^g	+	—	+	+ ^h	山羊和绵羊
猪种	S	—	—	+	(+) ⁱ	(+) ⁱ	—	+	+ ^j	猪、野兔、驯鹿和啮齿动物
犬种	R	—	—	—	—	—	+	+	+ ^j	狗
绵羊附睾种	R	+	—	—	—	—	+	—	—	绵羊

注：(+) / (—) 多数为阳性 / 阴性。

^a 噬菌体：Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1 (Iz₁) 和 R/C。

^b 正常菌落形态：S：光滑，R：粗糙。

^c RTD：常规试验稀释度。

^d 牛种布鲁氏菌生物 2 型初次分离时需血清。

^e 部分非洲牛种布鲁氏菌生物 3 型分离株是阴性。

^f 中等速度，544 株和部分田间分离株为阴性。

^g 一些分离株被噬菌体 Wb 裂解。

^h 慢速，一些分离株为快速。

ⁱ 部分猪种布鲁氏菌生物 2 型分离株不能或部分被噬菌体 Wb 或 Iz₁ 降解。

^j 快速。

表 D.2 布鲁氏菌生物型的鉴定表

布鲁氏菌种	生物型	CO ₂ 需求	H ₂ S产生	染料中生长 ^a		单因子血清凝集试验			参考菌株
				硫堇	复红	A	M	R	
牛种	1	(+) ^b	+	—	+	+	—	—	544
	2	(+) ^b	+	—	—	+	—	—	86/8/59
	3	(+) ^b	+	+	+	+	—	—	Tulya
	4	(+) ^b	+	—	(+)	—	+	—	292
	5	—	—	—	+	+	—	+	B3196
	6	—	—	(—)	+	+	+	—	870

表 D.2 布鲁氏菌生物型的鉴定表(续)

布鲁氏菌种	生物型	CO ₂ 需求	H ₂ S产生	染料中生长 ^a		单因子血清凝集试验			参考菌株
				硫堇	复红	A	M	R	
牛种	9	(+/-)	+	+	+	-	+	-	C68
羊种	1	-	-	+	+	-	+	-	16M
	2	-	-	+	+	+	-	-	63/9
	3	-	-	+	+	+	+	-	Ether
猪种	1	-	+	+	(-)	+	-	-	1 330
	2	-	-	+	-	+	-	-	Thomsen
	3	-	-	+	+	+	-	-	686
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	40
	5	-	-	+	-	-	+	-	513
犬种	无	-	-	+	(-)	-	-	+	RM6/66
绵羊附睾种	无	+	-	+	(-)	-	-	+	63/290
注：(+) / (-) 多数为阳性 / 阴性。									
^a 血清葡萄糖培养基中的染料质量浓度：20 μg/mL。									
^b 初次分离通常为阳性。									



附录 E

(规范性)

实时荧光 PCR、RAA 及多重 PCR 引物和探针序列

表 E.1~表 E.3 分别规定了实时荧光 PCR、RAA 及多重 PCR 的引物和探针序列。

表 E.1 实时荧光 PCR 方法引物、探针序列

实时荧光 PCR	上游引物 5'-3'序列	下游引物 5'-3'序列	探针 5'-3'序列	识别的布鲁氏菌属、种或疫苗株
布鲁氏菌属通用型	CGCTCGCGCGGTG GAT	CTTGAAGCTTGCG GACAGTCACC	ACGACCAAGCTGCA TGCTGTTGTCGATG	布鲁氏菌属,包括所有种布鲁氏菌及疫苗株
牛种布鲁氏菌	CAGTTCTCGAACA AGCTGACG	CTATAATCATTGG CCGCCGAAAG	CAGCGTGCCAGAAC CCGACACAGC	牛种布鲁氏菌及其疫苗株
羊种布鲁氏菌	AGCGAGATTGGA ATAGCTTACCC	CTGGTTACGTTGA ATGCAGACAC	CGCCCTGCCACCAG CCAATAACGG	羊种布鲁氏菌及其疫苗株
猪(犬)布鲁氏菌通用型	CCTGCAAAAAGCA GGAACCA	CCTCCGCCAGTCG TGAAA	ATATGGCCGGCTAT CCGCGTTCG	猪种布鲁氏菌及疫苗株,和犬种布鲁氏菌
A19 (S19) 疫苗株与野毒鉴别(双重)	GCGGCTTTTCTAT CACGGTATTC	CATGCGCTATGAT CTGGTTACG	ACACGCCCTAGAAC GCCTTTTCGGA	A19 疫苗株及其基因缺失疫苗、S19 疫苗
	CGGGATTCAAACG TCAAA	GGCTTTTCTATCA CGGTATTC	TCAATCCACTAGAA CGCC#	A19 疫苗株以外的所有国内流行菌株及疫苗株
S2 疫苗株与野毒鉴别(双重)	TCGATGGCGATGC GGA	GCTGGTCGCCATC GATGA	CGTGTGCGTCTGG#	S2 疫苗株
	TCGATGGCGATGC GGA	GCTGGTCGCCATC GATGA	CGTGTGCTTCTGG#	S2 疫苗株以外的所有国内流行菌株及疫苗株

注: #MGB 探针,3'端标记为 MGB;其余为 Taqman 探针,3'端标记为 BHQ1。

表 E.2 布鲁氏菌属通用型 RAA 方法引物及探针序列

上游引物 5'-3'序列(BRU-F1)	TCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTC
下游引物 5'-3'序列(BRU-R1)	TCCTTACGCGCAACGATATGGATCGTTTCCG
特异性探针 5'-3'序列(BRU-P1)	CTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGA(i6FAMdT)(idSp)(iBHQ1dT) GCGCCTTCTGGCGAC-3'C3spacer

表 E.3 多重 PCR 方法引物序列

PCR 反应	上游引物 5'-3'序列	下游引物 5'-3'序列	扩增片段长度/bp
PCR1	ATCCTATTGCCCCGATAAAGG	GCTTCGCATTTTCACTGTAGC	1 682
PCR2	TTTACACAGGCAATCCAGCA	GCGTCCAGTTGTTGTTGATG	1 071

表 E.3 多重 PCR 方法引物序列 (续)

PCR反应	上游引物 5'-3'序列	下游引物 5'-3'序列	扩增片段长度/bp
PCR3	GCCGCTATTATGTGGACTGG	AATGACTTCACGGTCGTTTCG	587
PCR4	GGAACACTACGCCACCTTGT	GATGGAGCAAACGCTGAAG	272



附 录 F

(规范性)

多重 PCR 溶液配制及结果判定

F.1 TAE 电泳缓冲液

10×TAE 的配制:

——48.4 g Tris;

——11.4 mL 冰乙酸;

——20 mL 0.5 mol/L EDTA。

加水定容至 1 000 mL。使用时,用蒸馏水稀释 10 倍即为 1×TAE 电泳缓冲液。

F.2 1.5% 琼脂糖凝胶

称取 1.5 g 琼脂糖粉,加入 100 mL 1×TAE 电泳缓冲液,加热溶解,冷却至 60 ℃,加 10 μL Gold-view 或其他等效核酸染料,混匀。

F.3 多重 PCR 判定标准

表 F.1 规定了多重 PCR 判定标准。

表 F.1 布鲁氏菌种型 PCR 鉴定判定标准

布鲁氏菌种	PCR1(1 682 bp)	PCR2(1 071 bp)	PCR3(587 bp)	PCR4(272 bp)
牛种	+	—	+	—
羊种	+	+	+	—
猪种(犬种)	+	+	+	+
A19	+	—	—	—
绵羊附睾种	—	+	+	—

注：“+”表示阳性,有扩增产物;“—”表示阴性,无扩增产物。

附 录 G

(规范性)

试管凝集试验(SAT)试剂的配制

G.1 含 0.5% 苯酚的生理盐水

取 5 g 苯酚、8.5 g NaCl,加少量蒸馏水溶解,用蒸馏水定容至 1 000 mL,121 °C高压 20 min。

G.2 含 0.5% 苯酚的 10% 氯化钠溶液

取 5 g 苯酚、100 g NaCl,加少量蒸馏水溶解,用蒸馏水定容至 1 000 mL,121 °C高压 20 min。

G.3 参照比浊管的制备

每次试验应配比浊管,作为判定凝集反应程度的依据,先将已经稀释好的工作抗原用等量稀释液作 1:1 稀释,然后按表 G.1 配制比浊管。

表 G.1 参照比浊管的配制

管号	1:1 稀释后的抗原液/ μL	稀释液/ μL	清亮度/%	记录标记
1	0	1 000	100	++++
2	250	750	75	+++
3	500	500	50	++
4	750	250	25	+
5	1 000	0	0	—

附录 H

(规范性)

补体结合试验(CFT)试剂的配制及效价测定

H.1 稀释液配制

H.1.1 巴比妥缓冲液(1×)

配制贮存液(5×)所需试剂如下:

- 42.5 g 氯化钠(NaCl);
- 2.875 g 巴比妥酸(Barbituric acid);
- 1.875 g 二乙基巴比妥酸钠(Sodium diethyl barbiturate);
- 1.018 g 硫酸镁(MgSO₄);
- 0.147 g 氯化钙(CaCl₂)。

加去离子水至 1 000 mL。在试验前,用 4 倍体积的 0.04% 明胶溶液加入 1 倍体积贮存液配制成 1×巴比妥缓冲液。

H.1.2 不含巴比妥缓冲液

配制贮存液(1 000×)所需试剂如下:

- 9.5 g 氯化镁(MgCl₂);
- 3.7 g 氯化钙(CaCl₂)。

加去离子水至 100 mL,保存在 5℃±3℃ 条件下。在试验前,取 1.0 mL 贮存液加入 1 000 mL 的 0.85% 氯化钠盐水中,并调 pH 至 7.35±0.05。

H.2 绵羊红细胞悬液的配制(2.5%)

用含抗凝剂的采血器采取成年公绵羊血,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加 0.85% 生理盐水至 15 mL,摇匀,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,重复两次,最后一次离心 10 min。用无菌生理盐水配制成 2.5% 绵羊红细胞悬液即得。置 2℃~8℃ 备用,有效期 7 d。

H.3 溶血素效价测定

H.3.1 溶血素基础液(100×)配制

取 0.2 mL 溶血素原液,加 19.8 mL 稀释液配成 20 mL 溶血素基础液(100×)。

H.3.2 不同稀释倍数溶血素工作液的配制

按表 H.1 进行稀释。稀释后置于 37℃~38℃ 水浴 20 min。

表 H.1 不同稀释倍数溶血素工作液的配制

单位为微升

加入量	管号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
溶血素基础液	200	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
稀释液	800	900	1 400	1 900	2 400	2 900	3 400	3 900	4 400	4 900	5 400
溶血素稀释倍数	500	1 000	1 500	2 000	2 500	3 000	3 500	4 000	4 500	5 000	5 500

H.3.3 溶血素效价测定程序

H.3.3.1 常量法

按表 H.2,加入各组分。水浴后,对各反应管 2 500g~3 000g 离心 10 min,取出,与溶血标准比色管进行比较,确定各反应管的溶血比例。

H.3.3.2 微量法

按表 H.3 进行。

溶血素对照孔应完全不溶血。

H.3.4 溶血素效价判定

从水浴中取出,离心后,立即判定结果。能使 25 μL (微量法)或 500 μL (常量法)红细胞悬液(2.5%)完全溶血的最大量溶血素稀释倍数定为溶血素效价或一单位溶血素(1 IU)。以表 H.2 为例(常量法),在对照管均不溶血条件下,第 1 管~第 6 管完全溶血,而第 6 管中溶血素稀释倍数(3 000 倍)最大,则判定该溶血素效价为 3 000 IU;或以表 H.3 为例(微量法),在对照孔不溶血条件下,第 1 孔~第 5 孔都完全溶血,而第 5 孔中溶血素稀释倍数(3 000 倍)最大,则判定该溶血素效价为 3 000 IU。

在检测时,一般规定所使用的溶血素的工作浓度为 2 倍溶血素效价,即 2 单位(IU)溶血素效价。如溶血素效价为 3 000 IU,则溶血素工作效价为 1 500 IU。溶血素效价测定后,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,2 个月~3 个月内可按此效价使用,不必重测。



表 H.2 常量法测定溶血素效价程序

加样顺序及加入量	试验管编号											对照管编号					
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	11#	溶血素 12#	补体 13#	稀释液 14#			
溶血素	500	1 000	1 500	2 000	2 500	3 000	3 500	4 000	4 500	5 000	5 500	100	—	—			
稀释倍数	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	0			
加入量	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 500	1 500	2 000			
稀释液	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	500	0			
工作浓度补体	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500			
2.5% 红细胞	100	100	100	100	100	100	100	75	50	25	0	0	0	0			
溶血比例/(%) (例)	全部溶血											部分溶血			完全不溶血		
37℃~38℃水浴 20 min																	

单位为微升

表 H.3 微量法测定溶血素效价程序

加样顺序及加入量	对照孔	反应孔							
		1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#
溶血素	250	250	500	1 000	2 000	3 000	4 000	5 000	6 000
加入量	25	25	25	25	25	25	25	25	25
2.5% 红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25
稀释液	75	50	50	50	50	50	50	50	50
工作浓度补体	0	25	25	25	25	25	25	25	25
轻轻振荡平板混匀,而后 37℃水浴 30 min; 2℃~8℃, 300g~600g 离心 5 min~10 min									
溶血比例/(%) (例)	0	100	100	100	100	100	50	25	0
不溶血	完全溶血			部分溶血			不溶血		

单位为微升

H.4 补体制备及效价测定

H.4.1 补体制备

选择健康豚鼠 3 只~5 只,于使用前一天早晨喂饲前或停食后 6 h 从心脏采血,分离血清(含有补体),混合,保存于-20℃冰箱中。商品化补体根据使用说明书进行稀释后使用。

H.4.2 补体效价测定

H.4.2.1 常量测定法

H.4.2.1.1 测定程序

用稀释液对豚鼠血清(含补体)作 1:20 倍预稀释(如果测定过程中发现补体含量低,可作 1:10 稀释或选择其他稀释倍数;商品化补体的稀释倍数按说明进行)。取阳性血清和阴性血清,分别作 10 倍稀释。对于稀释后的阳性血清和阴性血清,分别进行加抗原和不加抗原 2 个反应操作,按表 H.4 的顺序和量加入各种成分,在 37℃~38℃经过 2 次水浴,每次 20 min,进行补体效价判定。

H.4.2.1.2 效价判定

经过 2 次水浴,在工作浓度溶血素(即 2 IU)存在的情况下,阳性对照血清加抗原的试管完全不溶血,而在阳性对照血清未加抗原管及阴性血清管(无论有无抗原)都发生完全溶血所需要的最小补体量,即为所测得的补体效价,也称为一个补体单位(IU)。以表 H.4 为例,在第 6 管,250 μL 的 1:20 预稀释补体是使阳性血清未加抗原管及阴性血清管(无论是否加入抗原)都发生完全溶血(即溶血比例 100%)所需要的最小补体量,即为该补体效价。

H.4.2.1.3 检测时补体稀释倍数计算

检测时,按公式(H.1)计算补体稀释倍数:

$$N_{CT}=(N_{PCT}/E_{CT})\times CC \dots\dots\dots(H.1)$$

式中:

- N_{CT} —— 补体稀释倍数;
- N_{PCT} —— 补体预稀释倍数;
- E_{CT} —— 补体效价;
- CC —— 试验时每管加入补体量,单位为微升(μL)。

以表 H.4 为例:

补体稀释倍数按公式计算, $\frac{20}{250} \times 500 = 40$ 倍。在检测时,将补体作 40 倍稀释,每管加 500 μL,即为一个工作补体单位。考虑补体性质不稳定,操作过程中效价可能会自动降低,为此,在实际操作时,将补体的浓度提高 10%,即为原来的 90%,补体的最终稀释倍数为: $40 \times 90\% = 36$,即补体作 36 倍稀释,每管加 500 μL。

H.4.2.2 微量测定法

H.4.2.2.1 测定程序

对于自制补体,用稀释液对豚鼠血清(含补体)作 1:100 倍预稀释(如果测定过程中发现补体含量

低,可减少稀释倍数)。对于商品化补体,按说明书进行补体预稀释。取阳性血清和阴性血清,分别作10倍稀释。对于稀释后的阳性血清和阴性血清,分别进行加抗原和不加抗原2个反应操作,按表H.5的顺序和量加入各种成分,在37℃~38℃经过2次水浴,每次20min,然后进行补体效价判定。

H.4.2.2.2 补体效价判定

加入致敏红细胞,经过水浴后,阳性血清加抗原的试管完全不溶血,而阳性血清未加抗原管和阴性血清管(无论是否加入抗原)则发生完全溶血所需最小补体量,即为补体效价,也称为一个补体单位(IU)。在与溶血标准管进行颜色比较时,应以自然光或白色光为背景。以表H.5为例,在第7孔,100μL的1:100预稀释补体是使阳性血清未加抗原管及阴性血清管(无论是否加入抗原)都发生完全溶血(即溶血比例100%)所需要的最小补体量,即为该补体效价。

H.4.2.2.3 检测时补体稀释倍数的计算

检测时补体稀释倍数按公式(H.1)计算。

以表H.5为例,补体稀释倍数 $= (100/100) \times 25 = 25$

在此例中,补体应作25倍稀释,每孔加25μL,即为一个工作补体单位。考虑补体性质不稳定,操作过程中效价会降低,正式试验时使用浓度比补体效价要大10%左右,本例中,补体应作22.5倍稀释,即 $25 \times 90\% = 22.5$,每孔加入25μL。

表 H.4 常量法测定补体效价的加样顺序及加样量

单位为微升

加样顺序及加样量	试验管										对照管		
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	补体 11#	溶血素 12#	红细胞 13#
20倍稀释补体	100	130	160	190	220	250	280	310	340	370	500	0	0
稀释液	400	370	340	310	280	250	220	190	160	130	1 500	1 500	2 000
工作浓度抗原 ^a	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	0	0
10倍稀释血清 ^b	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	0	0
振荡均匀后置 37℃~38℃水浴 20 min													
二单位溶血素	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	500	0
2.5%红细胞悬液	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
振荡均匀后置 37℃~38℃水浴 20 min													
结果 ^c	加抗原	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	阳性血清	0	0	25	50	75	100	100	100	100	100	100	100
	阴性血清	0	0	25	50	75	100	100	100	100	100	100	100
	不加抗原	0	0	25	50	75	100	100	100	100	100	100	100
^a 对于不加抗原的操作反应管,应加入等量的稀释液。 ^b 10×稀释的阳性血清或阴性血清。 ^c 溶血比例(%)。													

表 H.5 微量法补测定体效价的加样顺序及加样量

加顺序及加样量		试验孔													对照孔	
		1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	11#	12#	13#	补体 14#	血清 15#
预稀释补体	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	400	0	
稀释液	160	150	140	130	120	110	100	90	80	70	60	50	40	0	0	
补体稀释倍数	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	完全 溶血	完全 抑制	
工作浓度抗原	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	
10倍稀释血清	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	0	400	
振荡混匀后置37℃水浴30 min																
致敏红细胞 ^a	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	
振荡混匀后置37℃水浴30 min, 1 000g离心, 5 min~10 min或2℃~8℃冰箱放置2 h~3 h																
结果 ^b	阳性血清	加抗原	0	0	25	50	75	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		不加抗原	0	0	25	50	75	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	阴性血清	加抗原	0	0	25	25	50	50	100	100	100	100	100	100	100	100
		不加抗原	0	0	25	50	75	75	100	100	100	100	100	100	100	100

^a致敏红细胞:提前将红细胞和2 IU溶血素等体积混合,放置室温20 min,使红细胞致敏。试验结束后剩余致敏红细胞可存放4℃不超过1周,可用于补体结合试验。

^b溶血比例(%)。

表 H.6 抗原效价的测定

单位为微升

加样顺序及加样量	试验管										对照管 ^b		
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	补体对照	溶血素对照		
抗原	稀释倍数	10	50	75	100	150	200	300	400	500	500	10#	11#
	加入量	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	—	—
各稀释度血清 ^a	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	0
工作单位补体	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0
37℃~38℃水浴 20 min													
二单位溶血素	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
2.5%红细胞	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
37℃~38℃水浴 20 min													
^a 加入不同稀释度的阴性血清或阳性血清。 ^b 对照管中缺少的液体量用稀释液补齐,10#管补加1 000 μL,11#管补加2 000 μL。													



H.5 抗原效价的测定

H.5.1 测定抗原效价所需血清

2份阳性血清(分别为强阳性和弱阳性血清)和1份阴性血清。

H.5.2 阴性血清和阳性血清的稀释

用稀释液对阴性对照血清作1:10稀释,弱阳性血清稀释作1:10、1:25稀释,强阳性血清作1:50、1:75和1:100稀释。

H.5.3 抗原的稀释

用稀释液将抗原稀释成9个稀释度:1:10、1:50、1:75、1:100、1:150、1:200、1:300、1:400和1:500。

H.5.4 抗原效价测定程序

用稀释的阴性血清和不同稀释度的阳性血清,按表H.6加入各种成分,并经37℃~38℃进行水浴,每次20min,共进行2次。

H.5.5 抗原效价测定结果

从水浴中取出反应管,2500g~3000g离心10min,与溶血标准比色管比较,记录每个管的溶血百分比例。例如表H.7(示例)。

表 H.7 抗原对不同稀释倍数血清管溶血比例

血清稀释倍数		抗原稀释倍数								
		10	50	75	100	150	200	300	400	500
阴性血清	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
弱阳性血清	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	100	0	0	0	0	0	0	0	0
强阳性血清	50	100	10	0	0	0	0	0	10	20
	75	100	50	20	0	0	0	20	30	80
	100	100	80	50	20	10	20	80	80	100

%

H.5.6 抗原效价

阴性血清管应100%溶血,不同稀释度阳性血清发生溶血比例最低的管所对应的抗原最高稀释倍数作为该抗原效价。

在检测时,抗原的稀释度应比测定的效价要高25%。以表H.7为例,其效价为1:150,正式试验时按 $150 \times 75\% = 112.5$ 倍稀释使用。

H.6 溶血标准比色管的制备及补体结合试验结果判定方法

H.6.1 常量法

溶血标准比色管的制备及补体结合试验结果判定见表 H.8。牛、羊和猪补体结合反应判定标准均相同。

表 H.8 常量法溶血标准比色管的制备及补体结合试验结果判定

单位为微升

溶血溶液 ^a	0	250	500	750	1 000	1 250	1 500	1 750	2 000	2 250	2 500
2.5% 红细胞	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50	0
稀释液	2 000	1 800	1 600	1 400	1 200	1 000	800	600	400	200	0
溶血比例/%	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
2 500g~ 3 000g 离心 10 min											
溶血程度	—	—	+	+	+	++	++	++	++ +	++ +	++ ++
补体结合试验结果判定											
溶血抑制程度	++ ++	++ ++	++ +	++ +	++ +	++	++	++	+	+	—
判定标准	阳性					可疑					阴性
^a 试验中 100% 溶血试管内的液体即为溶血溶液。											

H.6.2 微量法

溶血标准比色孔的制备及补体结合试验结果判定见表 H.9。牛、羊和猪补体结合反应判定标准均相同。制备时以完全溶血的对照(抗原对照或补体对照)和完全抑制溶血的对照(致敏红细胞对照)各取 50 μL 做 50% 溶血对照。

表 H.9 微量法溶血标准比色孔的制备及补体结合试验结果判定

单位为微升

溶血溶液 ^a	100	75	50	25	0
稀释液	0	25	50	75	100
溶血比例/%	100	75	50	25	0
300g 离心 10 min					
溶血程度	++++	+++	++	+	—
补体结合试验结果判定					
凝血抑制程度	—	+	++	+++	++++
判定标准	阴性	可疑		阳性	
^a 100% 溶血的孔中溶液即为溶血溶液。					

H.7 待检血清的稀释和灭活

以常规方法采血和分离血清。常量法用稀释液将血清作 1:10 稀释,微量法用稀释液将血清作 1:3 稀释(25 μ L 血清加入 75 μ L 稀释液)。按表 H.10 对稀释的血清进行灭活。

表 H.10 各种动物血清的灭能温度和时间

血清类别	灭能温度/ $^{\circ}$ C	灭能时间/min
羊	58~59	30
马	58~59	30
驴、骡	63~64	30
牛、猪	56~57	30
鹿、骆驼	54	30



附 录 I

(规范性)

酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂的制备

I.1 包被抗原 LPS 提取

将灭活检验合格的菌悬液(布鲁氏菌 A19 株或 S2 株)以 10 000g 离心 20 min,收集沉淀。称量并计算菌体湿重,加入相应的灭菌蒸馏水(按 1 g 菌体加入 3 mL 灭菌蒸馏水的比例),充分混匀后,加热至 66 ℃,然后加入等体积 66 ℃预热的 90%(体积分数)苯酚溶液。在此温度下(66 ℃)持续搅拌 15 min,置室温自然冷却后,置 4 ℃以 10 000g 离心 15 min。

用一长管吸取下层棕红色的酚相,用 Whatman 1 号滤纸过滤去除大菌体碎片。用量筒量取酚相体积,然后加入 3 倍体积 2 ℃~8 ℃预冷的甲醇(含 1% 饱和乙酸钠冷甲醇),2 ℃~8 ℃孵育 2 h,置 4 ℃以 10 000g 离心 10 min,弃上清液,将沉淀用原水相 1/2 体积灭菌蒸馏水重悬,4 ℃以 10 000g 离心 10 min。收集上清溶液于 2 ℃~8 ℃保存。

将沉淀再用等体积灭菌蒸馏水重悬,2 ℃~8 ℃再搅拌 2 h,依上法离心获上清液,并与前述上清液混合。随后,在上清液中加入终浓度为 5% 的三氯乙酸,室温搅拌 15 min 后,10 000g 离心 15 min,弃去沉淀,上清液用蒸馏水透析过夜,换液 2 次(每次至少 4 000 mL),收集透析袋内容物,此即纯化的 LPS。

I.2 包被液(0.05 mol/L 的 pH 9.6 碳酸盐缓冲液)

配制所需试剂如下:

——0.318 g Na_2CO_3 ;

——0.588 g NaHCO_3 ;

——200 mL 去离子水。

混匀后,使用 0.22 μm 滤膜过滤,室温保存备用。

I.3 封闭液(含 2% BSA、0.05% 吐温-20 的 pH 7.4 PBS)

配制所需试剂如下:

——1 000 mL PBS(pH 7.4);

——20 g BSA;

——0.5 mL 吐温-20。

现配现用。

I.4 样品稀释液(含 1% BSA 的 pH 7.4 PBS)

取 1 000 mL PBS(pH 7.4);10 g BSA 混匀,现配现用。

I.5 洗涤液(含 0.05% 吐温-20 的 pH 7.4 PBS)

取 1 000 mL PBS(pH 7.4);0.5 mL 吐温-20 混匀,现配现用。

I.6 显色液

底物溶液 A:取 200 mg TMB;100 mL 无水乙醇,加蒸馏水至 1 000 mL。

底物溶液 B:取 71.7 g 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4 ,分析纯);9.33 g 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$,分析纯);6.4 mL

0.75% (体积分数) 过氧化氢, 加蒸馏水至 1 000 mL, 调 pH 至 5.0~5.4。

使用时, 将底物溶液 A 液与底物溶液 B 液按 1:1 混合, 现配现用。

I.7 终止液(2 mol/L 硫酸)

将 111 mL 分析纯浓硫酸沿烧杯壁缓缓倒入盛有 889 mL 去离子水的烧杯中, 此过程中不断用玻璃棒进行搅拌来散热, 分装, 室温保存。



附 录 J

(资料性)

竞争酶联免疫吸附试验(cELISA)单克隆抗体的制备

用羊种布鲁氏菌光滑型 LPS 抗原免疫小鼠,通过 iELISA 筛选与牛、羊和猪都能特异性识别的杂交瘤细胞系。将此杂交瘤细胞接种 Balb/C 小鼠,抽取小鼠腹水制备单克隆抗体,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。使用时用样品稀释液进行约 1 000 倍稀释。



附 录 K

(规范性)

荧光偏振试验(FPA)抗原和稀释液的制备

K.1 标记抗原的制备

K.1.1 抗原的提取

将灭活的布鲁氏菌疫苗株 A19 株或 S2 株菌悬液以 10 000 g 离心 20 min,收集沉淀。称量并计算菌体湿重,加入 2%(体积分数)乙酸(按 1 g 菌体加入 8 mL 2% 乙酸的比例),121 °C 高压灭菌 15 min。4 °C 以 10 000 g 离心 20 min 去除菌体碎片。在上清液中加入终浓度为 5% 的三氯乙酸,室温搅拌 15 min 后,4 °C 10 000g 离心 10 min,弃去沉淀。上清液置 100 倍体积蒸馏水透析过夜,收集透析袋内容物,分装冻干保存,此即提纯的 OPS 抗原。

K.1.2 抗原的标记

将 3 mg OPS 加入 0.6 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液中,置 37 °C 孵育 1 h,加入 0.3 mL 100 mg/mL FITC(异构体 I)溶液,继续置 37 °C 孵育 1 h。将标记的 OPS 加入 DEAE Sephadex A 50 柱层析,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)的缓冲液洗脱标记物,收集所有 FITC-OPS 标记物,即为标记 OPS 抗原原液。

K.1.3 抗原液的稀释

用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)的缓冲液将抗原原液稀释至荧光偏振仪最佳检出荧光强度即可。

K.2 样品稀释液的配制

称取 Tris 1.21 g、NaCl 8.5 g、Igepal CA630 0.5 mL、EDTA 3.73 g,加去离子水至 800 mL,调 pH 至 7.2±0.2,定容至 1 000 mL,分装备用。



参 考 文 献

- [1] 世界动物卫生组织(WOAH) 陆生动物诊断试验与疫苗手册
-



