

第二十三章 T/CALAS 23—2017《实验动物 布鲁杆菌 PCR 检测方法》实施指南

第一节 工 作 简 况

中国实验动物学会作为团体标准改革的试点单位，结合实际需求，提出了该标准的研究和撰写，由中国食品药品检定研究院完成。

第二节 工 作 过 程

2015 年 12 月编写组提出框架，2016 年上半年完成标准草案的编写。2016 年 10 月 10 日在广西召开的第十二届中国实验动物学会学术年会上征求与会专家意见，经修改成为征求意见稿。经公开征求意见，提出意见单位 3 个，提出意见数量 7 个，采纳 5 个，不采纳 2 条。经修改成为送审稿。

2017 年 2 月 21 日经过标准审查会议讨论，与会专家针对该标准提出了生物安全要求标准问题，均做了修改，形成标准报批稿。

2017 年 5 月，本标准经中国实验动物学会第六届理事会常务理事会第八次会议审议通过，批准发布，于 2017 年 5 月 19 日起正式实施。

第三节 编 写 背 景

目前国家标准中规定实验动物布鲁杆菌检测用的方法是试管凝集，试管凝集需要用大量的布鲁杆菌抗原，抗原的生产需要三级及以上实验室，而且大多数实验室也拿不到布鲁杆菌菌种，以前市面上有销售试管凝集抗原，现在生产厂家也不再供应，所以我们的布鲁杆菌检测遇到了无法解决的问题，为此，我们需要寻求一种更加简便的、同时对实验室要求并没有那么高的检测方法。多重 PCR 方法不需要培养活菌，大大减少了实验室感染的可能性，同时可以检测布鲁杆菌的多种型别，以减少漏检的发生。

第四节 编 制 原 则

本标准在制定中应遵循以下基本原则：

(1) 本标准编写格式应符合 GB/T 1.1—2000 的规定；

- (2) 本标准规定的技术内容及要求应科学、合理, 具有适用性和可操作性;
- (3) 本标准的水平应达到国内领先水平。

第五节 内容解读

本标准主要采取多重 PCR 加酶切的方式对布鲁杆菌进行检测, 采取这样的检测方式可以对布鲁杆菌进行检测, 而不是布鲁杆菌抗体, 同时可以对检出的布鲁杆菌进行分型, 指导下一步的防护及净化工作。第一步的多重 PCR 可以有效区分流产布鲁杆菌、犬型布鲁杆菌菌和绵羊型布鲁杆菌, 其他三型 (包括马耳他布鲁杆菌、猪布鲁杆菌和沙林鼠布鲁杆菌) 第一步多重 PCR 的电泳结果是无法区分的, 需要通过 *Kpn*I、*Eco*RI 和 *Pvu*II 酶切分析得到确切结果。*Kpn*I 只能切开沙林鼠型 (690) 和羊型 (712), 在猪型上没有酶切位点; *Eco*RI 在沙林鼠型上的酶切位点是 458, 大概在 PCR 产物中间的位置, 而在另两型上分别有两个酶切位点, 分别是猪型 (450, 652), 羊型 (243, 455); *Pvu*II 不能切开沙林鼠型, 可以切开另两型, 酶切位点分别是猪型 (285), 羊型 (614)。利用这样的组合酶切可以成功区分沙林鼠型、猪型和马耳他型。

一、菌株及抗原

本研究中共使用了 5 种布鲁杆菌或布鲁杆菌抗原 (表 1), 这些抗原为直接裂解菌体得到, 其中含有细菌 DNA; 这些布氏杆菌经常感染实验犬。

表 1 研究中使用的布鲁杆菌或抗原详细信息

编号	名称	种属	来源	备注
A	布鲁杆菌 55010 株	流产布鲁杆菌	中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所	(104M) 弱毒株生产人用活疫苗
B	试管抗原	具体分型有待验证	中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所	批号: 2002
C	R. 试管抗原	具体分型有待验证	中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所	批号: 2002
D	虎红平板凝集抗原	具体分型有待验证	中国兽医药品监察所	批号: 200809
E	虎红平板凝集抗原	犬型	中国兽医药品监察所	批号: 200901

二、检测体系的建立

(一) 布鲁杆菌种和型特异性 PCR 结果

五个菌株用三重 PCR 方法扩增出的条带如图 1 所示, 第 1 条为 A 株, 报道为牛型, 但扩增结果显示并不完全是牛型, 似乎是牛型和其他的混合型; 第 2 条为 B 株, 与 A 株一样, 可能是两种的混合型; 第 3 条为 C 株, 为犬型抗原; 第 4 条为 D 株, 它有三条带, 分别在 600bp、400bp 和 200bp 的位置, 与理论图相比较, 其型别难以确定, 有待进一步测序分析; 第 5 条为 E 株, 但 PCR 结果显示并非犬型, 需进一步酶切鉴定。

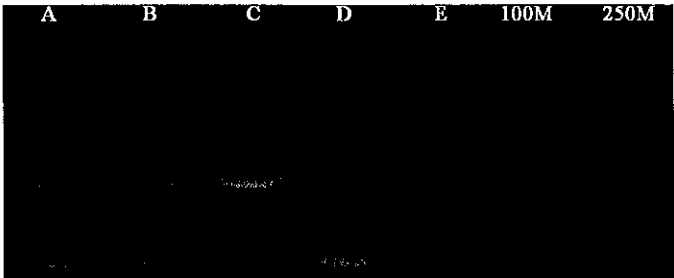


图1 5个不同来源的菌株用三重PCR方法扩增的结果

(二) 限制内切酶酶切分析

三重PCR结果表明：A株、B株和E株扩增条带结果一致。用组合酶切的方式酶切上述三株细菌910bp的片段，然后进行分析鉴定。结果见图2，由图可见，*Kpn*I可以切开三个菌株，首先排除猪型；*Eco*RI和*Pvu*II结果显示，E株实际为羊型；A株和B株900bp酶切结果显示为沙林鼠株，具体情况有待于测序结果的验证。

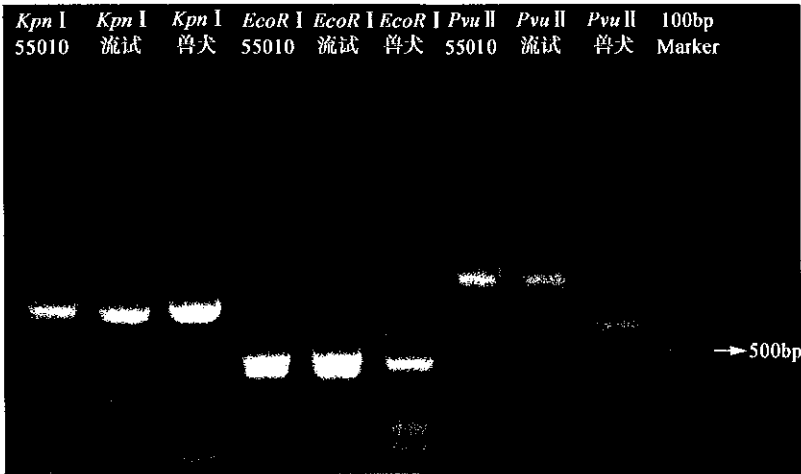


图2 三个菌株组合酶切结果

(三) 测序结果

5个菌株的600bp片段和4个菌株的910bp片段均送公司进行测序，测序结果在NCBI上进行Blast比对，结果显示，9条片段均为布鲁氏杆菌片段，相似性很高，达到99%~100%。而A株和B株910bp和600bp均为沙林鼠型的；C株确为犬型的；D株是田鼠型的；E株实为羊型。与多重PCR结果一致。

(四) 方法的特异性

用该方法同时扩增几种肠道菌，如图3，从1~11分别为D株、金黄色葡萄球菌、沙门菌、耶尔森菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯、绿脓杆菌、嗜肺杆菌、变形杆菌、正常犬血对照、水对照，结果均未得到阳性条带，说明该方法的特异性很好。

(五) 方法的敏感性

用D株作10倍系列稀释，结果见图4，由图可以看出，本实验最高可检测到 10^{-8} 的稀释度，也就是 $1.8 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$ 。



图3 三重 PCR 方法特异性测定结果

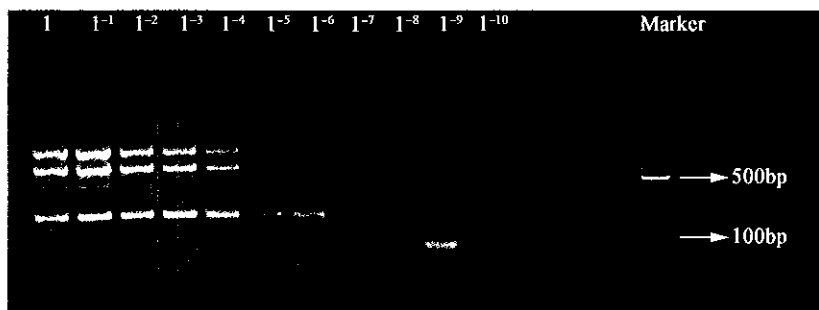


图4 多重 PCR 方法敏感性试验

第六节 分析报告

通过多重 PCR 和组合酶切的方式可以区分常见的布鲁杆菌型别，如果出现不同于标准中示意图的条带结果，需要进行测序，并结合试管凝集试验结果及动物的临床表现进行判定，如果有条件的实验室可以对有扩增条带的动物进行病原分离，多项结果同时证实为阳性时可以出具阳性检测报告。

第七节 国内外同类标准分析

一、国外标准

欧洲实验动物联合会 (FELESA) 规定的犬布鲁杆菌所用检测方法为培养法，暂时没有查到其他国外标准中关于布鲁杆菌检测的规定。

世界动物卫生组织 (OIE) 推荐的具有高敏感性和特异性的三种检测布鲁杆菌病的方法为：间接酶联免疫吸附 (IELISA)、竞争酶联免疫吸附 (CELISA) 与荧光偏振检测法 (FPA)。

二、国内标准

国内关于布氏杆菌诊断的标准目前查到的有以下条目，这些标准的诊断方法要比实验动物国家标准中规定的布鲁杆菌的检测方法全面，我们也需要不断的补充完善检测方法。

1. 动物布鲁杆菌病诊断技术

GB/T 18646—2002 国家标准

本标准规定了动物布鲁杆菌病的诊断技术。本标准规定的虎红平板凝集试验、乳牛全乳环状试验适用于家畜布病田间筛选试验和乳牛场布病的监测及诊断泌乳母牛布病的初筛试验；试管凝集试验和补体结合试验适用于诊断羊种、牛种、和猪种布病感染的家畜。

本标准规定的试管凝集试验不适用于犬种和绵羊附睾种布病感染家畜的检疫。

2. 山羊和绵羊布鲁杆菌病检疫规程

SN/T 2436—2010 行业标准 - 商品检验 (CN-SN)

本标准规定了山羊和绵羊布鲁杆菌病的虎红平板凝集试验、试管凝集试验、补体结合试验、酶联免疫吸附试验、琼脂扩散试验等技术要求。本标准适用于山羊和绵羊牛种、羊种、绵羊种布鲁杆菌病的检疫。

3. 布鲁杆菌病诊断标准

WS 269—2007 行业标准 - 卫生 (CN-WS)

本标准规定了人群布鲁杆菌病的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。本标准适用于各级各类医疗卫生机构及其工作人员对布鲁杆菌病的诊断与报告。

4. 奶牛布鲁杆菌病 PCR 诊断技术

NY/T 1467—2007 行业标准 - 农业 (CN-NY)

本标准规定了检测牛种布鲁杆菌 (*B. abortus*) 套式聚合酶链反应诊断方法要求。本标准适用于奶牛布鲁杆菌病的病原诊断、奶牛场检疫、疫情监测和流行病学调查。其他偶蹄动物布鲁杆菌病 PCR 诊断可参照本标准。

5. 布氏杆菌检疫技术规范

SN/T 1088—2010 行业标准 - 商品检验 (CN-SN)

本标准规定了布氏杆菌显微镜检查、细菌培养、聚合酶链反应、虎红平板凝集试验、缓冲平板凝集试验、试管凝集试验、补体结合试验、酶链免疫吸附试验、荧光偏振试验、全乳环状试验等技术要求。本标准适用于牛种、猪种布氏杆菌的检疫。

6. 动物布氏杆菌病控制技术规范

NY/T 907—2004 行业标准 - 农业 (CN-NY)

本标准规定了动物布氏杆菌病的诊断技术、控制措施和考核验收标准。

本标准适用于动物布氏杆菌病控制。

第八节 与法律法规、标准关系

布鲁杆菌病简称布病，是由布鲁杆菌感染引起的人兽共患传染病。世界动物卫生组织 (World Organization for Animal, OIE) 将其列为 B 类动物疫病，我国将其列为二类动物疫病，依据《中华人民共和国动物防疫法》和其他相关的法律法规，制定了《布鲁杆菌病防治技术规范》，这个规范适用于中华人民共和国境内一切从事牛、羊、猪、鹿、犬等布病易感动物的饲养、经营及其产品的生产、经营，以及从事动物防疫活动的单位和个人。根

据这个技术规范参照国家标准或行业标准对动物进行检测，如果出现阳性参照技术规范进行下一步操作。

第九节 重大分歧的处理和依据

从标准结构框架和制定原则的确定、标准的引用、有关技术指标和参数的试验验证、主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见（通过函寄和会议形式多次咨询和研讨），均未出现重大意见分歧的情况。

第十节 作为推荐性标准的建议

布鲁杆菌的检出要求犬厂家对阳性犬进行扑杀，基于福利伦理以及经济价值的考虑，我们判断结果都需要慎重再慎重，所以对于阳性结果的判断我们不能仅仅依赖一种方法，需要用其他的方法去验证，布鲁杆菌的分子检测方法可以有效弥补血清学检测方法特异性略差的问题，对结果的判断可以更为准确，因此该方法可以作为国标布鲁杆菌检测方法的验证方法纳入团体标准的范围。

第十一节 本标准常见知识问答

问：是否能对所有布鲁杆菌的型别进行鉴定？

答：不能，只能对常见的 5 种型别进行鉴定。

问：如果出现 5 种型别意外的布鲁杆菌型，如何进行鉴定

答：建议将 PCR 产物送公司进行测序后，比对分析，如果有条件的话可以进行分离鉴定。