ICS 11.220
CCS B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXX—XXXX

基于梅花鹿感染布鲁氏菌的检测技术

Detection Technology of Sika Deer Infection with Brucella

（征求意见稿）

中国兽医协会
CVMA

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国兽医协会　　发布

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件由中国农业科学院兰州兽医研究所、中国动物疫病预防控制中心和甘肃省动物疫病预防控制中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

中国兽医协会
CVMA

基于梅花鹿感染布鲁氏菌的检测技术

1 范围

本标准规定了诊断梅花鹿感染布病所用的常规分离鉴定、qPCR检测方法及血样ELISA检测技术的要求和操作规范。

本标准适用于梅花鹿感染布鲁氏菌的诊断及可疑样品的检测。

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。

GB 13078 饲料卫生标准

GB/T 18635 动物防疫基本术语

GB/T 18646 动物布鲁氏菌病诊断技术

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

LY/T 2017 养鹿场良好管理规范

NY 5027 无公害食品畜禽饮用水水质

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。

Bp：碱基对（base pair）

Ct值：每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值所经历的循环数（cycle threshold）

dNTP：脱氧核糖核酸

DMSO：二甲基亚砜

EDTA：乙二胺四乙酸

HRP：商品化辣根过氧化物酶

PBS：磷酸盐缓冲液

PCR：聚合酶链式反应 （polymerase chain reaction）

qPCR：实时荧光聚合酶链式反应（Real-time polymerase chain reaction）

Taq酶：Taq DNA聚合酶（Taq DNA ploymerase）

TSA：胰蛋白酶大豆琼脂培养基

中国兽医协会 CVMA

TSB：胰蛋白酶大豆肉汤培养基

5 仪器与设备

5.1 II级生物安全柜。

5.2 荧光定量PCR扩增仪。

5.3 精液采样器。

5.4 高速台式冷冻离心机，可控温至4 ℃，离心速度可达12000 g以上。

5.5 微量移液器：量程为0.5 μL~10 μL、2μL~20 μL、20 μL~200 μL和200 μL~1000 μL。

5.6 涡旋震荡仪。

5.7 无菌注射器或EP管。

5.8 分析天平。

5.9 冰箱：2℃~8 ℃、-20 ℃和-70 ℃以下。

5.10 恒温水浴锅：0 ℃~100 ℃。

5.11 组织研磨器或研钵。

5.12 高压灭菌锅。

5.13 电热恒温鼓风干燥箱：0 ℃~100 ℃。

5.14 洗板机。

5.15 恒温培养箱。

5.16 酶标仪。

6 流行病学

梅花鹿在我国属特种经济动物，多个地区均有饲养，是布鲁氏菌的易感宿主。近年来，随着梅花鹿养殖规模增大，跨地区贸易增加，梅花鹿布病的流行率也呈上升趋势，已严重影响了我国梅花鹿养殖业健康、稳定、持续发展。梅花鹿对牛、羊两种类型的布鲁氏菌最易感染。至今发现的病例中，以牛型占比最多，还没有单独的鹿型，说明鹿布鲁氏菌病是由其它动物传播而发病，最有可能就是从牛传染给鹿。该病主要经消化道或者是经皮肤伤口，或者是经过黏膜感染，也可通过气溶胶传播，所以呼吸道是传染的一个重要渠道。同时，梅花鹿布鲁氏菌病还可以通过生殖道感染，即经交配传播，这增加了疾病在鹿群中的传播风险。

7 临床特征

鹿感染布鲁氏菌后有明显的临床症状，病菌主要侵害生殖系统和神经系统。公鹿感染通常发生睾丸炎和附睾炎，导致精子减少，或无精，从而失去配种能力。母鹿一般以发生流产和乳腺炎为主要临床症

中国兽医协会 CVMA

状。流产大多发生在第一胎，第二胎后一般不表现流产症状，主要表现出胎儿弱小，或者畸形、病胎，导致仔鹿很难成活。在分娩的流产物和奶液中含有大量的布鲁氏菌病原。

8 样品的采集及前处理

凡涉及本病的样本检测，应在生物安全2级实验室操作。凡涉及本菌的培养，应在生物安全3级实验室内操作。

8.1 血样的采集

具体操作方法：

a） 采血：从病鹿颈静脉采集约5 mL血液，或从母鹿采集5 mL全血。

b） 收集：将采集的血液放入无菌试管中。

c） 离心：将试管放入离心机，以2000转/分钟的速度离心10-15分钟，以分离血清和血细胞。

d） 血清分离：离心后，小心地收集上层的血清。

e） 灭活：将血清在水浴锅中进行70 ℃加热灭活10-15分钟，以消除病原体。

f） 保存：灭活后的血清样本应冷藏保存备用。

g） 沉淀处理：在保存过程中，如果血清出现沉淀，应再次离心以清除沉淀物，并重新收集上清液。

h） 记录和标记：在整个过程中，记录样本的采集、处理和保存条件，并在试管上标记样本信息。

8.2 病料采集

对于采集的鹿的组织样品及疑似感染病料按以下方法处理并接种于培养基,样品采集按照GB/T 18088-2000出入境动物检疫采样执行。

a)组织样品:对无菌采集的组织,应剔除多余部分(如脂肪)，确保采集过程中避免任何可能的污染。

b）病料采集：增加病料采集的种类，这可能包括血液、尿液、粪便、组织切片等，每种病料都应使用适当的方法进行采集。

c）样本保存：采集后，样本应立即放入适当的保存介质中，如生理盐水、PBS缓冲液或其他专用的样本保存液。

d）标记和记录：详细记录样本的采集时间、地点、动物标识和采集者信息，并在样本容器上进行清晰的标记。

e）运输：样本应在适宜的条件下运输至实验室，以保持样本的完整性和活性。

8.3 细菌培养和鉴定

a）接种培养基：每份样品均一式两份，接种于选择培养基表面,分别置于普通培养箱和 5%-10% CO_2,培养箱中,37℃培养 3d-10d.

b）细菌的分离：取5g组织剪成小块,加入10 mL无菌 PBS 缓冲液进行研磨后,取200μL接种于选择培养基表面,或阴道冲洗液、精液、关节液、胃内容物等,取 200μL接种于TSA或选择培养基表面（选择性培养基见附录A）。

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

d） 染色观察：用移液器吸取结晶紫稀释染液（制备方法见附录B），浸没菌落15 s～20 s，然后吸取染色液弃置到消毒液中。光滑型菌落不着色，变异菌落被染成紫色或红色。

e）观察和记录：在培养过程中，定期观察样本的生长情况，并记录任何变化。

中国兽医协会 CVMA

f）后续分析：根据培养结果，进行进一步的分析和检测，如PCR、ELISA、显微镜检查等，以确定病原体的种类和特性。

9 qPCR 方法

9.1 主要试剂

灭菌双蒸水或去离子水，细菌基因组提取试剂盒，qPCR扩增预混液，引物（上下游引物浓度分别为12.5μmol/L，探针浓度为1μmol/L），pH 7.2的 HI buffer缓冲液。

可以采用引物Br qPCR-F/Br qPCR-R、探针Br qPCR probe对布鲁氏菌组织或血样核酸进行检测，引物、探针序列和扩增产物的大小见表1。

表1 qPCR检测鹿布鲁氏菌的引物及探针

引物	目的	序列（5'-3'）
Br qPCR-F	正向引物	CAAGGGCAAGGTGGAAGATTT
Br qPCR-R	反向引物	CTGCGACCGATTTGATGTTT
Br qPCR probe	探针	ATCGTTTCCGGGTAAAGCGTCGCCA

9.2 操作步骤

9.2.1 反应体系及体积见表 2。

表2 qPCR反应体系

反应体系	25μL/管
qPCR 反应预混酶	1-2 μL
Br qPCR-F	1 μL
Br qPCR-R	1 μL
Br qPCR probe	2.5μL
无菌去离子水	3 μL
ROX 染料	3 μL
血样或组织 DNA 模板	5 μL

9.2.2 每次进行 qPCR 反应时应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照是以扩增片段构建的 pMD-19T-br 阳性质粒以及利用其制作的标准曲线（制备方法见附录 C），阴性对照是在 DNA 提取过程中，同时对 HI buffer 缓冲液进行提取后的 DNA。

9.2.3 PCR 扩增程序为：95℃ 3 min，（95℃ 3s，60℃ 30s）共 40 个循环，68℃ 30s，在 60℃ 30s 时收集荧光探针信号。

9.2.4 质控标准

如果阳性对照扩增曲线有明显对数扩增曲线，且Ct值≤25，阴性对照扩增曲线无Ct值显示，说明质控合格。

中国兽医协会 CVMA

9.2.5 结果判定

阳性：检测通道Ct≤37.0，且有明显的指数增长曲线，表示样本为布鲁氏菌阳性；

阴性：检测结果无Ct，无明显扩增曲线；

可疑：检测通道Ct＞37.0，且出现典型扩增曲线的样本建议重复试验，重复试验结果仍出现Ct＞37.0和典型扩增曲线为布鲁氏菌阳性，否则为阴性。

10 间接 ELISA 方法

10.1 主要试剂

布鲁氏菌重组VirB10-OMP31-OMP25蛋白抗原（制备方法见附录D），标准阳性对照血清，标准阴性对照血清，商品化辣根过氧化物酶（HRP）标记兔抗鹿IgG抗体、血清稀释液和TMB底物溶液，包被液，封闭液，洗涤液，终止液（相关试剂的配制方法见附录G）。

10.2 操作步骤

10.2.1 抗原包被

用包被缓冲液将布鲁氏菌重组VirB10-OMP31-OMP25蛋白抗原稀释至1μg/mL，100 μL/孔包被酶标板，37℃吸附1 h，转入4℃吸附12 h～16 h。次日甩掉孔内液体，每孔加300 μL洗涤液，洗涤3次，每次1 min，最后一次拍干。

10.2.2 封闭酶标板

加入封闭液，100 μL/孔，用封口膜封口，37℃孵育 30 min。然后取掉封口膜，甩掉孔内液体，每孔加 300 μL 洗涤液，洗涤 3 次，每次 1 min，最后一次拍干。

10.2.3 加入待检血清

在检测前用血清稀释液将标准阳性对照血清、标准阴性对照血清和待检血清作 400 倍稀释（1μL 的样品用血清稀释液稀释到 400μL，混匀）。

加入稀释好的血清，100 μL/孔，每份血清做 2 个重复。用封口膜封口，37℃孵育 30 min。然后取掉封口膜，甩掉孔内液体，每孔加 300 μL 洗涤液，洗涤 3 次，每次 1 min，最后一次拍干。

10.2.4 加入HRP标记兔抗鹿IgG抗体

加入工作浓度的HRP标记兔抗鹿IgG抗体，100 μL/孔，用封口膜封口，37℃孵育30 min。然后取掉封口膜，甩掉孔内液体，每孔加300 μL洗涤液，洗涤3次，每次1 min，最后一次拍干。

10.2.5 加入底物溶液

加入TMB底物溶液，100 μL/孔，37℃避光孵育10 min。

10.2.6 加入终止液

加入终止液，100 μL/孔，2 分钟内在酶标仪上读取 OD_{450} 值。

10.3 质控标准

中国兽医协会 CVMA

P（标准阳性血清）/N（标准阴性血清）≥4 或 PC$\overline{X}$-NC$\overline{X}$>0.15，NC$\overline{X}$≤0.3 说明质控合格。其中NC$\overline{X}$（标准阳性血清的平均）=[NC1A(450)+NC2A(450)]/2；PC$\overline{X}$（标准阴性血清的平均）=[PC1A(450)+PC2A(450)]/2

10.4 结果判定

计算 S/P：S/P=（样本 OD450 平均值-NC$\overline{X}$）/（PC$\overline{X}$-NC$\overline{X}$）

若 S/P＞0.29，判为布鲁氏菌抗体阳性，若 S/P≤0.29，判为布鲁氏菌抗体阴性。

11 综合判定

凡具有9.2.5、10.4中任何一项阳性者，均判为布鲁氏菌阳性。

中国兽医协会
CVMA

附　录　A
（资料性）
布鲁氏菌培养基的制备

A.1　基础培养基

琼脂15g～20g；蛋白胨10g；氯化钠5g；肉膏5g

加水1000 mL上述成分混合，加热使琼脂溶化，然后调pH至7.8，再将培养基分装三角瓶中，然后置 20磅(1磅≈0.00689 MPa)高压灭菌，顷刻间可析出大量盐类结晶，趁热过滤，再调 pH 至 7.4，10磅高压15 min。冷却后置4 ℃冰箱备用。

A.2　血清葡萄糖培养基

将基础培养基融化，冷却至50℃，于其中加入除菌并灭活的正常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%。该培养基用于布鲁氏菌的纯培养。

A.3　选择培养基

在1000 mL血清葡萄糖培养基中加入下列成分，即为选择培养基。

多黏菌素5mg、杆菌肽25mg、游霉素50mg、萘啶酸5mg、制霉菌素17.7mg、万古霉素20mg

若培养羊种布鲁氏菌，需1000 ml血清葡萄糖培养基中加入下列成分：

多黏菌素7.5mg、万古霉素3mg、呋喃妥因10mg、制霉菌素17,7mg、两性霉素B2.5mg

中国兽医协会
CVMA

附　录　B
（资料性）
结晶紫储备液配制方法

B.1　A液

秤取 2.0 g结晶紫染料溶于 20 mL无水乙醇中。

B.2　B液

秤取 0.8 g草酸铵溶于 80 mL蒸馏水中。

B.3　储备液

A液和B液充分混合后即为储备液。储备液应在密封瓶中 4℃避光保存，可使用 3 个月。

B.4　工作液

使用时用蒸馏水按1:40比例将储备液稀释，即为工作液。

中国兽医协会
CVMA

附 录 C
（规范性）
qPCR 阳性质粒及标准曲线的建立

C.1 器械与设备

恒温摇床、制冰机、PCR仪、电泳仪、凝胶成像仪、荧光定量PCR仪。

C.2 材料与试剂

引物Br ZL-F/MS ZL-R（25 pmol/μL）、胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒、pMD-19T质粒、感受态大肠杆菌JM109、10 mg/mL氨苄青霉素、LB培养基。

C.3 引物序列

上游引物Br ZL-F：5'- TGGCTCGGTTGCCAATATC-3'

下游引物Br ZL-R：5'-CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG-3'

C.4 阳性质粒的构建和鉴定

C.4.1 扩增、回收PCR产物

以Br ZL-F和Br ZL-R为引物，以提取到的布鲁氏菌DNA为模板，扩增条件为94℃预变性5min；95℃变性45s，60℃退火1min，72℃延伸1min，共35个循环；72℃再延伸10min，4℃5min。PCR 产物于10g/L 的琼脂糖凝胶中进行电泳鉴定，以确定扩增得到目的基因片段。

C.4.2 质粒构建及鉴定

用胶回收试剂盒回收PCR 产物，与pMD-19T克隆载体连接，转化大肠杆菌感受态细胞JM109，涂布于含100mg/L 氨苄青霉素的LB培养基平板上，37℃培养12~16h。筛选出阳性单菌落到含有氨苄青霉素的液体培养基中，37℃培养，取菌液2-5mL，利用质粒提取试剂盒提取质粒，送测序。将序列测定为阳性的质粒命名pMD-19T-147，并将质粒和含有重组子的阳性菌保存于-70℃。

C.5 标准曲线的建立

C.5.1 对pMD-19T-Br阳性质粒进行10倍倍比稀释，使其为：10^{10}～10^{0}，每个梯度重复三次进行定量PCR。

C.5.2 根据扩增情况从中选取5~6个点制作适合标准曲线要求的标准曲线。

中国兽医协会 CVMA

附 录 D
（规范性）
布鲁氏菌重组蛋白抗原的制备

D.1 器械与设备

超声波细胞破碎仪，恒温摇床，制冰机，紫外可见分光光度计。

D.2 材料与试剂

引物（25 pmol/μL）, *Bam*H I限制性内切酶，*Xho* I限制性内切酶，T4 DNA连接酶，琼脂糖凝胶回收试剂盒，质粒纯化试剂盒，pET-30a质粒，感受态大肠杆菌BL21（DE3），50 mg/mL卡那霉素，异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷（IPTG），His标签蛋白纯化试剂盒，LB培养基，一次性针头滤器（孔径0.45μm）。

D.3 序列合成及表达载体的构建

分析布鲁氏菌 VirB10、OMP31、OMP25 蛋白的抗原表位，通过密码子优化和基因串联顺序的优化后，送公司合成序列，并连接 pET-28a 质粒，并转入 BL21(DE3)。

D.4 目的蛋白的表达和纯化

D.4.1 取A.3中的菌液，以1:100的比例转接到含50 μg/mL的卡那霉素的500 mL LB培养基中，37℃，200 r/min震荡培养至菌液OD_{600}值0.6～0.8，加入终浓度为1.0 mmol/L 的IPTG，诱导培养5 h。

D.4.2 将以上菌液分装到250 mL容量的离心管中，在4℃，6000 r/min离心10 min，弃上清。

D.4.3 用10 mL pH 7.4 PBS重悬沉淀，充分吹散混匀，转移到50 mL容量的离心管中，在4℃，6000 r/min离心10 min，弃上清。

D.4.4 用15 mL pH 7.4 PBS重悬沉淀，充分吹散混匀，将离心管置于碎冰中，再放到超声波细胞破碎仪中，以超声5 s，间隔1 s的程序，超声破碎30 min，然后冻融1次，再超声破碎1次。

D.4.5 将超声破碎裂解物在4℃，6000 r/min离心30 min，弃上清。

D.4.6 用His标签蛋白纯化试剂盒纯化D.4.5上清中的可溶性目的蛋白，纯化步骤按照试剂盒说明书操作。

D.4.7 纯化后的蛋白溶液，用0.45μm一次性针头滤器过滤除菌。

D.4.8 用紫外可见分光光度计测定蛋白的浓度，蛋白浓度达到0.6 mg/mL以上符合要求。

D.4.9 用高效液相色谱法进一步纯化并分析蛋白纯度，纯度达到90%以上符合要求。

中国兽医协会 CVMA

附　录　E
（规范性）
间接 ELISA 试验溶液的配制

E.1 包被缓冲液

Na_2CO_3	0.318 g
$NaHCO_3$	0.588 g
去离子水	200 mL

将Na_2CO_3和$NaHCO_3$加入去离子水中，完全溶解后，用0.45 μm一次性针头滤器过滤除菌，室温保存备用。

E.2 洗涤液

pH 7.4 PBS	1 000 mL
吐温-20	0.5 mL

将 0.5 mL 吐温-20 加入 1 000 mL pH 7.4 PBS 溶液中，混匀后使用。

E.3 封闭液

马血清	5 mL
pH 7.4 PBS	95 mL

将马血清加入 pH 7.4 PBS 中混匀，4℃保存。

E.4 终止液

浓 H_2SO_4	11.1 mL
去离子水	88.9 mL

将浓H_2SO_4缓慢加入到去离子水中，混匀，冷却至室温。

中国兽医协会 CVMA