

团 体 标 准

T/CVMA XXX—XXXX

骆驼奶样布鲁氏菌检测技术规范

The technical specification for the detection of *Bruceellosis* in camel
milk

(征求意见稿)

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、新疆维吾尔自治区动物卫生监督所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

骆驼奶样布鲁氏菌检测技术规范

1 范围

本文件规定了骆驼奶样布鲁氏菌检测的生物安全要求、奶样样品的采集与前处理、奶样病原鉴定与抗体检测、综合判定等内容。

本文件适用于检测中国地区骆驼奶样中的布鲁氏菌病原和抗体，用于骆驼布鲁氏菌病的筛查、辅助诊断等。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB/T 18646 动物布鲁氏菌病诊断技术

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

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。

BHQ1: 无荧光猝灭基团(Black hole quencher-1)

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)

DNA: 脱氧核糖核苷酸 (Deoxyribonucleic acid)

dNTP: 脱氧核糖核酸

DMSO: 二甲基亚砷

EDTA: 乙二胺四乙酸

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)

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)

Taq酶: Taq DNA聚合酶 (Taq DNA polymerase)

TSA: 胰蛋白酶大豆琼脂培养基

TSB：胰蛋白酶大豆肉汤培养基

5 仪器与设备

- 5.1 超净工作台。
- 5.2 荧光定量PCR扩增仪。
- 5.3 微流控系统。
- 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、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL和200 μL~1000 μL。
- 5.6 涡旋震荡仪。
- 5.7 分析天平。
- 5.8 冰箱：2℃~8℃、-20℃和-70℃以下。
- 5.9 水浴锅：0℃~100℃。
- 5.10 组织研磨器或研钵。
- 5.11 高压灭菌锅。
- 5.12 电热恒温鼓风干燥箱：0℃~100℃。

6 流行病学

骆驼布鲁氏菌病可引起妊娠母畜流产、公畜睾丸炎和附睾炎等严重后果。骆驼会通过饲料、水源、初乳、污染的牛奶、尤其是舔舐、嗅闻胎盘和流产胎儿经消化道感染布病，在接触已感染的动物时，可能通过吸入含有布鲁氏菌的飞沫或尘埃经呼吸道感染，在某些情况下，布鲁氏菌病也可能通过性接触传播。感染的母骆驼可能在分娩时将布鲁氏菌垂直传播传给新生骆驼。目前，已知有马耳他布鲁氏菌 1 型、2 型、3 型；流产布鲁氏菌 3 型、6 型均可感染骆驼，且成年骆驼易感性较高，感染母畜常在妊娠 7~10 个月发生流产。

7 病理特征

布鲁氏菌偏好的器官，如子宫、睾丸、附属性腺、淋巴结、关节囊和黏液囊会出现病理变化，包括子宫内膜红肿发炎、上皮组织可见坏死灶、子宫内膜纤维化、子宫角萎缩，卵巢囊性增大、粘连；关节滑液囊炎，可见琥珀色液体；流产胎盘中淋巴细胞、滋养层细胞大量缺失；淋巴结滤泡、窦和滤泡间区域结构模糊。肝脏可能出现肿大，肝细胞变性或坏死，脾脏也可能肿大，伴有脾窦扩张和脾髓增生。除了生殖系统外，消化系统也可能受到影响，出现胃肠炎、肝炎等。骆驼感染布鲁氏菌的临床症状可能较为隐蔽，增加了诊断的难度，因此通常需要结合多种检测方法和流行病学数据来进行综合诊断。

8 样品的采集及前处理

8.1 奶样的采集：因后段奶液含菌量较高，早晨挤出的奶液含菌量最高，故尽量于清晨采样，将头 3-4 把乳汁弃去，无菌采集样品后装入灭菌容器中。

8.2 奶样的前处理

8.2.1 用于核酸检测奶样的处理：在新鲜的 10mL 奶样中加 100mL Triton X-100，振荡混匀，2500xg 离心 20min，弃上清，取沉淀，加 1mL PBS，充分振荡混匀；将沉淀悬浮液移入微量离心管，15000xg 离心 10min，弃上清，收集沉淀物，置于-20℃贮存备用。

8.2.2 用于间接 ELISA 检测奶样的处理：在新鲜的 10mL 奶样中加入 500 μL 的 37% 福尔马林溶液，充分混匀备用。

9 病原学鉴定

9.1 细菌的分离：取 15 mL 乳样，2000xg 离心 15min，用 10 μL 接种环取奶油层 2 环，接种于 TSA 或选择培养基表面。选择性培养基见附录 A。

9.2 菌落观察

9.2.1 形态观察：取出置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中 3-7 d 的培养基，观察菌落生长情况。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。

9.2.2 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，形态呈短杆状或球杆形状。

9.3 微流控 qPCR

9.3.1 引物和探针

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

表 1 qPCR 检测奶样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

9.3.2 qPCR 反应程序

9.3.2.1 反应体系为 25 μL/管，包括 qPCR 反应预混酶 12 μL，Br qPCR-F 和 Br qPCR-R 引物各 1 μL，Br qPCR probe 2.5 μL，无菌去离子水 3 μL，ROX 染料 0.5 μL，奶样 DNA 模板 5 μL。

9.3.2.2 每次进行 qPCR 反应时均设置阳性对照、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），阴性对照是对 HI buffer 缓冲液进行提取后的 DNA。

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

9.3.2.4 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 \leq 25，阴性对照扩增曲线无 Ct 值显示，质控合格。

9.3.2.5 结果判定

阳性：检测通道 Ct \leq 37.0，且有明显的指数增长曲线，表示样本为阳性；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 和典型扩增曲线为阳性，否则为阴性；阴性：检测结果无 Ct，无明显扩增曲线。

9.3.3 微流控检测流程

将处理后奶样、磁珠、内标、qPCR 摸索后的引物探针加入微流控卡盒内，通过全封闭智能分析一体机进行反应，反应结束后直接在仪器上读取结果。反应流程如下：检测样本和内标在裂解液的作用下释放核酸，核酸吸附在磁珠上，并随磁珠向下移动，在向下移动的过程中进行了核酸的纯化，最后磁珠带核酸进入反应液中进行高效扩增。微流控对 150 拷贝/mL 的样本可稳定检出，在 15 拷贝/mL 时仍可大概率检出，qPCR 在样本 1.5×10^3 拷贝/mL 时可检出，在样本 150 拷贝/mL 及 15 拷贝/mL 时无法检出。在检测引物探针相同的条件下，微流控的灵敏度高于 qPCR 方法 10-100 倍。

9.4 间接ELISA方法

9.4.1 主要仪器

洗板机，恒温培养箱，酶标仪等。

9.4.2 主要耗材

洗瓶，一次性封板膜，酶标板等。

9.4.3 材料与试剂

布鲁氏菌重组蛋白抗原（制备方法见附录 D），标准阳性对照奶样，标准阴性对照奶样，商品化辣根过氧化物酶（HRP）标记兔抗骆驼 IgG 抗体、奶样稀释液和 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。

9.4.4 操作步骤

9.4.4.1 抗原包被

用包被缓冲液将布鲁氏菌重组蛋白抗原稀释至 $1 \mu\text{g/mL}$ ， $100 \mu\text{L}$ /孔包被酶标板， 37°C 吸附 1 h，转入 4°C 吸附 12 h~16 h。次日弃掉孔内液体，每孔加 $300 \mu\text{L}$ 洗涤液，洗涤 3 次，每次 1 min，最后一次拍干。

9.4.4.2 封闭酶标板

加入封闭液， $100 \mu\text{L}$ /孔，用封口膜封口， 37°C 孵育 30 min。然后取掉封口膜，弃掉孔内液体，每孔加 $300 \mu\text{L}$ 洗涤液，洗涤 3 次，每次 1 min，最后一次拍干。

9.4.4.3 加入待检奶样

在检测前用 7 毫升的福尔马林（37%）加入到 1 升水中配制奶样稀释液，将 $500 \mu\text{L}$ 稀释液加入 10mL 标准阳性对照奶样、标准阴性奶样和待检奶样。吸取奶液时，尽量不动管壁上的脂肪以减少脂肪的含量。

加入稀释好的奶样，100 μL /孔，每份血清做2个重复。用封口膜封口，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。然后取掉封口膜，弃掉孔内液体，每孔加300 μL 洗涤液，洗涤3次，每次1 min，最后一次拍干。

9.4.4.4 加入 HRP 标记兔抗骆驼 IgG 抗体

加入工作浓度的HRP标记兔抗骆驼IgG抗体，100 μL /孔，用封口膜封口，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。然后取掉封口膜，弃掉孔内液体，每孔加300 μL 洗涤液，洗涤3次，每次1 min，最后一次拍干。

9.4.4.5 加入底物溶液

加入TMB底物溶液，100 μL /孔，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育10 min。

9.4.4.6 加入终止液

加入终止液，100 μL /孔，立即在酶标仪上读取 OD_{450} 值。

9.4.5 质控标准

符合以下两种情况之一，质控合格：(1) $\text{PC}/\text{NC} \geq 4$ ，且 $\text{NC} \leq 0.3$ ；(2) $\text{PC}-\text{NC} > 0.15$ ， $\text{NC} \leq 0.3$ 。其中 NC （标准阳性奶样的平均）= $[\text{NC1A}(450)+\text{NC2A}(450)]/2$ ； PC （标准阴性奶样的平均）= $[\text{PC1A}(450)+\text{PC2A}(450)]/2$ ，下同。

9.4.6 结果判定

计算 S/P ： $S/P = (\text{样本 } \text{OD}_{450} \text{ 平均值} - \text{NC}) / (\text{PC} - \text{NC})$

$S/P > 0.29$ ，判为奶样布鲁氏菌抗体阳性， $S/P \leq 0.29$ ，判为奶样布鲁氏菌抗体阴性。

10 综合判定

凡具有9.3、9.4中任何一项阳性者，均判为布鲁氏菌阳性。

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 °C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°C, 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

附录 B
(资料性)
结晶紫储备液配置方法

B.1 A液

称取 2.0 g 结晶紫染料溶于 20 mL 无水乙醇中。

B.2 B液

称取 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。

中国兽医药学
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°C预变性5min; 95°C变性45s, 60°C退火1min, 72°C延伸1min, 共35个循环; 72°C再延伸10min, 4°C5min。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°C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°C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。

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: $10^{10} \sim 10^0$,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。

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/ μ L), *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0.45 μ m)。

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 μ g/mL的卡那霉素的500 mL LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min震荡培养至菌液OD₆₀₀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 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C, 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0.45 μ m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。

附录 E
(规范性)
间接 ELISA 试验溶液的配制

E.1 包被缓冲液

Na ₂ CO ₃	0.318 g
NaHCO ₃	0.588 g
去离子水	200 mL

将Na₂CO₃和NaHCO₃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 ₂ SO ₄	11.1 mL
去离子水	88.9 mL

将浓 H₂SO₄ 缓慢加入到去离子水中，混匀，冷却至室温。
