

---

## 第 3.1.4 章

### 布鲁氏菌病（牛种、羊种和猪种布鲁氏菌感染）

(INFECTION WITH *B. ABORTUS*, *B. MELITENSIS* AND *B. SUIIS*)

---

---

#### 摘要

**疫病描述：**布鲁氏菌病是由布鲁氏菌属成员引起的动物和人类疾病的总称，病原主要包括牛种布鲁氏菌、羊种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌。牛布鲁氏菌病通常由牛种布鲁氏菌引起，少数可由羊种布鲁氏菌引起，偶尔也由猪种布鲁氏菌引起。羊种布鲁氏菌是引起绵羊和山羊布鲁氏菌病的主要病原。羊种布鲁氏菌和牛种布鲁氏菌也可能感染其他物种，包括骆驼。猪种布鲁氏菌 1-3 生物型均可感染猪，但由生物 2 型引起的疾病与其他生物型在宿主范围上存在差异，且具有地域局限性。在部分地区，猪种布鲁氏菌也可感染野猪。动物感染布鲁氏菌具有一种或几种临床症状，如流产、不育、胎衣不下、睾丸炎和附睾炎，偶尔出现关节炎，可通过子宫排出物、乳液、尿液和精液排出病原。该病确诊是从流产物、乳房分泌物或死亡动物组织中分离到布鲁氏菌。牛种布鲁氏菌、羊种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌对人均有很强的致病性，必须在适当防护条件下处理所有可能污染的组织、培养物和材料。

**病原鉴定：**采用改良抗酸染色流产物或阴道分泌物，如发现布鲁氏菌样微生物，尤其是经血清学验证，即可视为疑似布鲁氏菌感染。聚合酶链反应（PCR）方法为检测样本中存在布鲁氏菌 DNA 提供了新手段。可采集子宫排出物、流产胎儿、乳房分泌物以及淋巴结、生殖器等组织样本，应尽可能进行细菌分离。病原分离后，可通过噬菌体裂解、培养特性、生化和血清学方法，鉴定其种类和生物型。依据特异性基因序列建立的 PCR 方法既可作为补充鉴定，也可为病原分型提供依据。

**血清学和细胞免疫学检测：**血清学检测能提示感染布鲁氏菌，但无法确定感染哪个种的布鲁氏菌。缓冲布鲁氏菌抗原试验（如虎红平板凝集试验和缓冲平板凝集试验）、补体结合试验、酶联免疫吸附试验（ELISA）和荧光偏振试验适用于畜群筛查，以及对小型反刍动物、骆驼科动物、牛科动物（包括牛和水牛）进行个体检测。然而，单独一种血清学方法不可能适用于所有动物和所有流行病学情况，有些检测方法无法诊断出猪的布鲁氏菌病。因此，在筛查试验中，阳性样本应通过已建立的确诊方法或补充方法进行确认。使用间接 ELISA 或全乳环状试验检测混合奶样，可有效筛查和监测奶牛的布鲁氏菌病。在未免疫的反刍动物畜群、骆驼群和猪群中，在无明显风险因素的情况下如出现血清学阳性个体，可把布鲁氏菌素皮肤过敏反应试验作为畜群的筛查和确诊方法。

**疫苗和诊断用生物制品要求：**牛种布鲁氏菌 S19 株和羊种布鲁氏菌 Rev.1 株仍是分别控制牛、绵羊和山羊布鲁氏菌感染的参考疫苗，其他疫苗必须与这两个疫苗进行比较。这两种疫苗均应用适宜的种子批制备。在一些国家，粗糙型牛种布鲁氏菌 RB51 株疫苗也已成为预防牛布鲁氏菌病的官方指定疫苗。目前尚无防治猪布鲁氏菌病的合适疫苗。布鲁氏菌素不应含光滑型脂多糖，诊断抗原须用光滑型牛种布鲁氏菌（如 1119-3 株或 99 株）制备，用于 I-ELISA

---

的抗原应采用光滑型羊种布鲁氏菌16M株制备。疫苗和布鲁氏菌素的制备必须符合有关标准。

## A. 前言

布鲁氏菌病是牛种布鲁氏菌、羊种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌引起的动物和人类疾病的总称。绵羊附睾炎（绵羊附睾种布鲁氏菌）在第 3.8.7 章中单独描述。

**病原：**遗传学和免疫学证据表明，布鲁氏菌属所有成员之间密切相关。然而，主要种类之间不但在基因上有差异，且在宿主嗜好和流行病学上也有所不同。2005 年，国际原核生物分类委员会布鲁氏菌分类分会明确表示，重新使用 1986 年以前的布鲁氏菌分类法，意味着重新承认六种经典布鲁氏菌种及其生物型，尽管这两种观点均仍然有效。这六种布鲁氏菌的经典命名在《已批准的细菌名录》（1980 版）中正式公布，并指出相关参考菌株的名称，六个经典种名称分别为：牛种布鲁氏菌 (*B. abortus*)、羊种布鲁氏菌 (*B. melitensis*)、猪种布鲁氏菌 (*B. suis*)、沙林鼠种布鲁氏菌 (*B. neotomae*)、绵羊附睾种布鲁氏菌 (*B. ovis*) 及犬种布鲁氏菌 (*B. canis*)<sup>1</sup>。根据培养特性和血清学特征，前三种布鲁氏菌还可细分为不同生物型（见表 2 和表 3）。已从海洋哺乳动物中分离出一些布鲁氏菌菌株并被分类为两个新种：鲸种布鲁氏菌 (*B. cet*) 和鳍种布鲁氏菌 (*B. pinnipedialis*) (Foster 等, 2007)。从欧洲中部的田鼠、狐狸、土壤和供人类食用的青蛙中分离到一株布鲁氏菌，命名为田鼠种布鲁氏菌 (*B. microti*) (Scholz 等, 2008)。从感染的人乳房移植物、产下死胎的狒狒以及狐狸中，也分离到新的布鲁氏菌菌株，但这些菌株的自然宿主还不确定。虽然每种被发现的新类型仅有有限的分离株，但还是被命名为布鲁氏菌的第十、第十一和第十二个种，即人源布鲁氏菌 (*B. Inopinata*)、狒狒布鲁氏菌 (*B. Papionis*) 和狐狸布鲁氏菌 (*B. vulpis*) (Scholz 等, 2010; 2016; Whatmore 等, 2014)。最后，源自啮齿类、狐类和爬行动物、鱼类和蛙类的各种布鲁氏菌作为非典型的布鲁氏菌尚未被定为新种。

布鲁氏菌属于 $\alpha$ -变形菌纲，根瘤菌目，布鲁氏菌科。布鲁氏菌与一些植物的致病菌和共生体（包括农杆菌属和根瘤菌属），以及动物的致病菌（巴尔通氏体属，*Bartonella*）、条件菌致病菌和土壤细菌（比如苍白杆菌属）在遗传上密切相关。

## 1. 疫病描述

### 1.1 牛的布鲁氏菌感染

牛布鲁氏菌病通常由不同生物型的牛种布鲁氏菌引起。在一些国家，特别是南欧、非洲和西亚，牛与绵羊或山羊混养，因此本病也可由羊种布鲁氏菌引起 (Verges, 1985)。猪种布鲁氏菌有时可引起牛感染，该疾病在全球范围内分布，但一些国家被认为已消灭了牛种布鲁氏菌和羊种布鲁氏菌。有关最新信息，请参阅 OIE WAHIS 页面<sup>1</sup>。

幼畜和未怀孕母畜通常无临床症状。怀孕母牛感染牛种布鲁氏菌或羊种布鲁氏菌后，会引发胎盘炎，常导致产后 5~9 个月内流产。即使不发生流产，在胎盘、羊水和阴道排泄物中也有大量病原。乳腺和相关淋巴结也可被感染，并经乳汁排菌。感染动物的初乳是引起新生动物感染的主要传染源。随后的孕期通常能进行到足月生产，但子宫和乳房可能再次感染，在产后分泌物和牛奶中伴有少量细菌。急性感染时，全身大多数主要淋巴结都有细菌。成年

---

<sup>1</sup><https://www.woah.org/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/disease-data-collection/>

---

公牛可发生睾丸炎或附睾炎，或引起雌性和雄性动物不孕。牛种布鲁氏菌可通过精液、精浆和尿液排出。在一些热带国家，布鲁氏菌病通常表现为水囊瘤，常涉及腿关节，这可能是感染本病唯一的明显标志，水囊瘤液中常含有布鲁氏菌。

## 1.2 绵羊和山羊的布鲁氏菌感染

绵羊和山羊布鲁氏菌病（不包括绵羊附睾种布鲁氏菌感染）主要由羊种布鲁氏菌引发，由牛种布鲁氏菌或猪种布鲁氏菌也可零星引发病例，但这种病例极少。尽管一些国家已被认为无此病，但是绵羊和山羊感染布鲁氏菌是很普遍的。有关最新信息，请参阅 OIE WAHIS 页面。在致病性和流行性上，绵羊和山羊感染羊种布鲁氏菌与牛感染牛种布鲁氏菌非常类似。在大多数情况下，布鲁氏菌主要通过感染的母羊和山羊在流产或分娩后的几个月内的胎盘、羊水和阴道分泌物进行传播。在乳汁和精液中普遍存在布鲁氏菌，也可在其他组织如头部淋巴结、脾脏、生殖器官（子宫、睾丸和附睾）以及关节病变部位分离到布鲁氏菌（Alton 等，1988）。

## 1.3 猪的布鲁氏菌感染

猪布鲁氏菌病主要由猪种布鲁氏菌1、2、3型引起，少数情况是牛种布鲁氏菌或羊种布鲁氏菌感染。该病在许多养猪业发达国家均有发生。总的来说，该病流行率较低，但在一些特定地区流行率较高，如南美和东南亚。在一些国家，猪布鲁氏菌病是一种被严重忽略的疾病。美国南方诸州、澳大利亚的部分地区、地处大洋洲的一些国家均有野猪感染猪种1型布鲁氏菌的报告，并有从事捕猎和从事与处理野猪相关工作的人感染猪布鲁氏菌病的报告。该病可在猪群中通过被流产胎儿、流产物或子宫排出物污染的饲料传播。因猪本能地喜食流产的胎儿和胎盘膜。性传播是另一种常见的传播途径，同时精液中含有的布鲁氏菌会对影响到实施人工授精的工作人员。与反刍动物类似，猪在发生初始菌血症之后，布鲁氏菌会在公猪和母猪的生殖道内定植。该菌侵袭母猪的胎盘和胎儿，而在公猪体内，侵袭可发生在一个或多个器官中，如睾丸、前列腺、附睾、精囊及尿道球腺。公猪性器官的损伤通常是单侧性的，整个过程从组织增生开始，进而形成脓肿，最终导致器官的硬化和萎缩。母猪感染布鲁氏菌最常见的病症是流产，可出现在孕期任何阶段，以怀孕50~110天之间最常见。阴道分泌物并不明显，在慢性感染母猪群中，不孕是该病最主要的临床特征。布鲁氏菌在公猪中持续存在，伴随着生殖道损伤，进而影响性行为。该损伤可为暂时性或永久性的。然而公野猪能够在性器官、性行为表现正常的情况下分泌含布鲁氏菌的精液。所有感染该菌的猪各关节均可出现炎症，关节及腱鞘肿胀、跛行，偶尔也会出现后躯麻痹或脊柱炎。很大比例的感染猪能够在6个月内痊愈，但也有许多猪表现为持续性感染（Olsen等，2012）。

由猪种布鲁氏菌2型引起的感染在宿主范围、分布及致病性等方面都有别于1型和3型。以往认为猪种布鲁氏菌2型主要分布在斯堪的纳维亚半岛和巴尔干半岛之间的区域，而后来在整个欧洲大陆野猪中，该病流行率逐渐呈上升趋势（EFSA，2009）。在欧洲暴发的猪布鲁氏菌病疫情中，野猪被认为是主要传染源，将猪种布鲁氏菌2型传染给户外饲养的家猪（EFSA，2009）。猪种布鲁氏菌2型通常引起机体粟粒状病变，主要发生在生殖器官，进而发生组织化脓。迄今为止，很少有猪种2型布鲁氏菌引起人发病的报告，但报告有免疫力低下的猎人感染了猪种布鲁氏菌2型，这些猎人因屠宰野猪或野兔而广泛存在暴露风险。此外，有报告称，欧洲境内与野猪接触的牛和羊中，出现了罕见的无临床症状的猪种2型布鲁氏菌感染病例。

## 1.4 其他家养、圈养及野生动物的布鲁氏菌病

有关于单峰驼、双峰驼及南美洲骆驼（包括美洲驼、羊驼、原驼和小羊驼）感染牛种布

鲁氏菌和羊种布鲁氏菌的报告，与接触被感染的反刍动物有关。

此外，驯养水牛、美国和欧洲野牛、牦牛、麋鹿（马鹿）、梅花鹿、非洲水牛及非洲羚羊也会感染布鲁氏菌，临床表现与牛或绵羊和山羊相似。

野生反刍动物感染羊种布鲁氏菌通常出现在与绵羊和山羊有密切接触的地区，这些动物的临床表现与牛羊相似。但在一些野生反刍动物中（如羚羊、高山野山羊、伊利比亚野山羊）会出现关节化脓或钙化、睾丸炎、葡萄膜炎以及神经系统症状。这些物种是布鲁氏菌的终末宿主，除非有人为因素，该病会随着家畜布鲁氏菌病的根除而逐渐消失。目前，已经发现的野生反刍动物的布鲁氏菌有三个疫源地，即北美黄石地区野牛的牛种布鲁氏菌，阿尔卑斯山野山羊的羊种布鲁氏菌和加拿大伍德布法罗国家公园野牛的牛种布鲁氏菌。也有零星的报道称，从狗体内分离出了羊种布鲁氏菌，特别是与感染的绵羊或山羊接触，或摄入胎盘或流产的胎儿的狗。

其他动物感染猪种布鲁氏菌有两种不同的流行病学状况。一种情况是，非自然宿主因摄入污染食物或与已感染的自然宿主共处后而感染猪种布鲁氏菌。例如，北极狐和狼与驯鹿接触后感染猪种布鲁氏菌 4 型，狗和啮齿类动物（比如大鼠和小鼠）与感染宿主共栖后感染其他型猪种布鲁氏菌，牛和马与感染猪直接接触后受到感染。感染的细菌无一例外都是自然宿主所感染的细菌生物型。第二种情况是，野生动物是猪种布鲁氏菌或类猪种布鲁氏菌的自然宿主。例如，独立国家联合体（CIS）和波罗的海国家存在的所谓小鼠布鲁氏菌病，也就是小型啮齿类动物感染了猪种布鲁氏菌 5 型。

除了野猪，欧洲野兔也被认为是猪种布鲁氏菌 2 型的储存宿主，且被认为是家畜感染的另一可能来源。患病欧洲野兔的特征是形成结节，大小从粟粒至樱桃不等，甚至可能更大，且经常会化脓。这些结节可能会出现在任何地方，如皮下、肌肉、脾脏、肝脏、肺脏及生殖器官，但野兔的身体状况并不受影响。其他物种与感染猪、野猪或野兔同处后，也可能感染猪种布鲁氏菌 2 型。在牛舍内对野猪进行内脏剔除或剥皮时，会将该病传染给牛群。

猪种布鲁氏菌 4 型会在整个北极地区（包括西伯利亚、加拿大、阿拉斯加）的野生和家养驯鹿中导致严重人畜共患病。驯鹿对猪种布鲁氏菌很易感，会出现发热、精神不振和各种局部症状，如流产、胎盘滞留、子宫炎，有时也会有出血、乳腺炎、黏液囊炎及睾丸炎。传染给人类的途径可能是直接接触或食用生牛奶、未煮熟的驯鹿肉，尤其骨髓。

### 1.5 人畜共患风险及生物安全规定

人类很容易感染一些种属的布鲁氏菌，最值得注意的是羊种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌和可能影响较小的犬种布鲁氏菌。其可引起急性发热性疾病——波浪热，进而发展为慢性疾病，且会伴随影响骨骼肌、心血管、中枢神经系统的严重并发症。因此，需采取防范措施预防人类感染。感染通过口腔、呼吸道及黏膜途径。在该病流行地区，食用生乳制品构成主要传播风险。处理感染动物/尸体、流产胎儿及胎盘的兽医、屠宰场工人和农民等，还存在职业感染的风险。布鲁氏菌病是最容易发生实验室感染的传染病之一，因此，所有活菌培养或潜在感染/污染物操作均需依据风险分析在适当的生物安全设施水平下进行（见第 1.1.4 章《生物安全与生物安保：兽医实验室和动物设施生物风险管理标准》）。具体的布鲁氏菌感染材料生物安全预防措施建议见相关资料（Alton 等，1988；布鲁氏菌病 FAO/WHO 联合专家委员会，1986；世卫组织，1953；世卫组织，2004；本手册第 1.1.3 章《生物材料运输》）。

## B. 诊断技术

表 1. 牛种、羊种和猪种布鲁氏菌感染的诊断及用途

方法	用途					
	畜群无疫检测	无疫动物个体检测 <sup>a</sup>	适用于根除计划 <sup>b</sup>	疑似或临床病例确诊 <sup>c</sup>	群体流行率监测	疫苗接种后畜群或个体动物的免疫状态确认
<b>病原检测</b>						
染色法	-	-	-	+	-	-
培养法	-	-	-	+++	-	-
PCR <sup>d</sup>	-	-	-	+ / ++	-	-
<b>免疫应答检测</b>						
BBAT (RBT 或 BPAT)	+++	++	+++	+	+++	-
FPA	++	++	+	++	++	-
CFT	++	++	+++	++	+++	-
I-ELISA	+++	++	+++	++	+++	-
C-ELISA	++	+	+	+	++	-
BST	++	-	+	+++	++	-
SAT	++	+	+	-	+	-
NH (半抗原) 和胞质蛋白基底试验 <sup>e</sup>	-	-	+	++	-	-
散装奶检测 <sup>f</sup> 奶 I-ELISA 或乳环试验	+++	-	+++	+	+++	-

注: +++ = 推荐方法; ++ = 推荐但有局限性;

+ = 适用于非常有限的情况; - = 不适用于该用途。

PCR = 聚合酶链式反应; BBAT = 缓冲布鲁氏菌抗原测试 (即 RBT: 虎红/玫瑰红/孟加拉红平板凝集试验和 BPAT: 缓冲平板凝集试验); FPA = 荧光偏振检测; CFT = 补体结合试验;

I 或 C-ELISA = 间接或竞争酶联免疫吸附试验; BST = 布鲁氏菌素皮肤测试;

SAT = 试管凝集试验; NH = 天然半抗原。

<sup>a</sup> 此应用仅适用于无布鲁氏菌感染的国家、地区或牛羊畜群。

<sup>b</sup> 为了提高牛羊畜群布鲁氏菌病根除策略效率, 建议联合使用不同检测方法以提高诊断敏感性, 即至少用两种血清学方法, 如 BBAT 或 FPA 和 CFT 或 I-ELISA。通过血清学和 BST 平行检测可进一步提高敏感性。

<sup>c</sup> 在几乎无感染或低流行地区, 血清学检测阳性结果的预测价值可能很低。在这种情况下, 确诊临床病例通常需进行病原学检测。在已感染牛羊畜群中, 任何血清学检测阳性结果均可视为确诊的临床病例。即使无临床症状, 只要血清学检测为阳性都被认定为感染。在无感染或低流行地区, 单一血清学检测呈阳性的动物, 可用细菌培养 (或 PCR) 或 BST 试验进行确诊。在布鲁氏菌病根除国家或地区, 血清学筛查和验证性检测 (系列检测) 均呈阳性的可疑动物, 可用细菌培养 (或 PCR) 和/或 BST 试验进行确诊。

<sup>d</sup>可能会产生假阳性结果。

<sup>e</sup>皮下接种 S19 或 Rev.1 疫苗的地区，此方法可能有助于区分免疫和自然感染抗体。

<sup>f</sup>只针对奶牛。

所有牛、绵羊、山羊、骆驼和猪的流产以及睾丸炎都应怀疑患有布鲁氏菌病，并应调查牛群或羊群流行病史，提交样本进行实验室检测。布鲁氏菌感染的临床症状不具特异性，只有通过分离和鉴定布鲁氏菌，才能做出布鲁氏菌感染的确切诊断。无法进行细菌学检查时，必须依靠分子或免疫学方法进行诊断。

## 1. 病原检测

尽管现在可以通过不同分子学方法确诊布鲁氏菌，但通过细菌培养的生长特性鉴定是布鲁氏菌鉴定的经典方法（参见第 B.1.3 节鉴定和分型）。

所有疑似病例的样本在取样后均应立即低温保存（4°C），迅速转运至实验室。如果运输超过 12 小时，所有样本（除了阴道拭子）均应冷冻（-20°C）。到达实验室后，应冷冻不立即进行培养的样本（Alton 等，1988）。在所有情况下，运输和储存时间越短，成功分离布鲁氏菌的可能性越高，尤其是在布鲁氏菌初始含量较低的样本。没有特异性的细菌转移培养基可提高动物样本中布鲁氏菌的存活率。

### 1.1 染色方法

布鲁氏菌为球杆菌或短棒状杆菌，长 0.6~1.5 $\mu\text{m}$ ，宽 0.5~0.7 $\mu\text{m}$ ，多单个存在，有时成对或成团。形态相当稳定，但在老旧培养物中可见多种形态。无运动力，无菌毛，无芽孢，不形成真正的荚膜。革兰氏染色呈阴性，一般不发生两极着色。布鲁氏菌可抵抗弱酸的脱色作用，可通过经 Stamp 改良的抗酸染色（Ziehl-Neelsen）方法，将其染成红色（Alton 等，1988）。器官或生物体液涂片，经加热或乙醇固定后，用改良的抗酸染色（Ziehl-Neelsen）方法染色，可将布鲁氏菌菌体染成红色，背景为蓝色。此外，也可用荧光素或过氧化物酶标记的抗体结合物染色，如细胞内出现弱抗酸性、具有布鲁氏菌形态的细菌，或出现具有免疫特异性着色的细菌，可初步判定为布鲁氏菌病。然而，检测乳和乳制品时，因样本含菌量较少，且脂肪滴可妨碍结果判读，因此这些方法不适用或敏感性较低。此外，由于难以区分布鲁氏菌和同样可引起流产的流产衣原体、伯氏立克次氏体等病原体，因此使用 Stamps 法时，需谨慎判读阳性结果。无论是阴性还是阳性结果，均需经细菌培养予以证实。

PCR 方法也可用于不同生物样本中的病原检测（Bricker, 2002; Whatmore & Gopaul, 2011）。但由于样品体积的限制，这些方法的敏感性与经典的细菌学检测相比可能较低。分子检测方法可以在样本储存不当即细菌失活时检测其感染情况。

### 1.2 样本收集和培养

尽管细菌分离周期长、成本高、操作烦琐，但只要有可能，在布病确诊和菌株种型鉴定时应该选用该方法。新出现的流行病学方法如高通量测序将可以运用在布鲁氏菌病确诊或布鲁氏菌种属确定中。虽然细菌分离方法通常并不敏感，但对样本的种类、数量、储存方法、接种量和培养基等进行优化后，会非常有效。

#### 1.2.1 基础培养基

一般在固体培养基上分离和培养布鲁氏菌。这种方法有助于分离和清楚识别菌落，通常

是最令人满意的方法，还可限制非光滑型突变体及杂菌的过量生长。然而，需处理大批样本或增菌时，推荐使用液体培养基。现有许多商业化干粉培养基可供选择，如布鲁氏菌基础培养基、胰蛋白大豆琼脂培养基（TSA）等。牛种布鲁氏菌 2 型等菌株生长需添加 2~5% 牛或马血清，许多实验室常规向血琼脂培养基或哥伦比亚琼脂等基础培养基中添加马血清，结果很好。其他合适的培养基还有血清葡萄糖琼脂（SDA）、甘油葡萄糖琼脂等（Alton 等，1988），SDA 常用于细菌形态观察。从血液和其他体液或奶中分离布鲁氏菌时，推荐选用非选择性的双相 Castañeda 氏培养基，并建议富集培养。选用非选择性的双相 Castañeda 氏培养基原因是布鲁氏菌在肉汤培养基中容易变异，从而影响用常规细菌学技术进行细菌分型。

### 1.2.2 选择培养基

上述所有基础培养基均可用于制备选择性培养基。为抑制其他微生物的生长，需加入合适的抗生素。

最常用的选择性培养基是加入了 6 种抗生素的 Farrell 氏培养基（FM）（Stack 等，2002）。1L 琼脂中含：硫酸多黏菌素 B（5 mg = 5000 单位）、杆菌肽（25 mg = 25000 单位）、那他霉素（50 mg）、萘啶酸（5 mg）、制霉菌素（100000 单位）和万古霉素（20 mg）。已有一种商业化冻干抗菌添加剂。然而，Farrell 氏培养基中萘啶酸和杆菌肽的浓度可抑制一些牛种布鲁氏菌、羊种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌的生长，所以同时使用 Farrell 氏和选择性较弱的 Thayer-Martin 改良培养基（mTM），是田间兽医样本布鲁氏菌初步分离的首选策略。Thayer-Martin 改良培养基因基础成分包含血红蛋白而不透明，不适用于直接观察细菌菌落形态，但可作为判断布鲁氏菌感染可能性的最实用方法（Alton 等，1988）。

由 De Miguel 等人配制的选择性半透明培养基（CITA 培养基）（2011）以血琼脂基础培养基为基础成分，添加 5% 无菌犊牛血清和万古霉素（20 mg/L）、硫酸粘杆菌素甲磺酸盐（7.5 mg/L）、呋喃妥因（10 mg/L）、制霉菌素（100000 国际单位 IU/L）和两性霉素 B（4 mg/L）。这种抗生素混合物的制备方法如下：称重后，将万古霉素、硫酸粘杆菌素、制霉菌素置于同一个 50 mL 灭菌容器中，用 10 mL 甲醇/水溶液（1:1）溶解。然后，称取呋喃妥因于另一个灭菌容器内，用 1 mL 0.1 M NaOH 溶液（0.22  $\mu$ m 过滤器除菌）溶解。最后，称取 10 mg 两性霉素 B 于 20 mL 灭菌容器中，用 1 mL 二甲基亚砜充分溶解（至少 5-10 min），添加 9 mL 的 10 mM 无菌磷酸盐缓冲液（PBS）（pH = 7.2 $\pm$ 0.2）。两性霉素 B 的最终浓度为 1 mg/mL，1 L 培养基需 4 mL 该抗生素溶液。剩余的两性霉素 B 溶液可在 5 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C 保存数日供下次使用。这种 CITA 培养基可抑制大多数微生物污染，又能使所有种类的布鲁氏菌增殖，且比 Thayer-Martin 改良培养基和 Farrell 氏培养基更敏感，更容易从样本里分离到布鲁氏菌。因此，尽管同时使用 FM 和 CITA 可获得最大的敏感性，但 CITA 被视为分离所有布鲁氏菌的首选培养基（De Miguel 等，2011）。

已开发出一种筛选牛种布鲁氏菌（包括 RB51 疫苗株）的改良布鲁氏菌选择性培养基（MBS 培养基），该培养基比 CITA 培养基更有效，但还需要进一步的验证研究以确认其性能。（Her *et al.*，2010）。

相比牛种布鲁氏菌的几个生物型和绵羊种布鲁氏菌的培养条件，羊种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌的生长不依赖 5%~10% CO<sub>2</sub>（表 2），但富含 CO<sub>2</sub> 的环境利于所有布鲁氏菌的培养。

与流产物相比，奶、初乳和某些组织样本中的布鲁氏菌数目可能较少，建议进行富集后培养。奶样离心后取上层奶油和沉淀进行培养，可提高分离效果，但应实行严格的生物安全措施，避免产生气溶胶。一种有效提高奶样培养敏感性同时避免离心风险的方法是增加每个奶样接种 FM 和 CITA 培养皿的数目（来自每个乳房的奶样至少接种两块培养皿），且每个培养皿接种大约 0.5 mL 奶样。增菌也可在血清葡萄糖肉汤、胰蛋白胍肉汤或胰蛋白胍大豆肉汤（TSB）或布氏肉汤构成的液体培养基中进行，培养基中至少加入 1  $\mu$ g/mL 两性霉素 B

和 20 µg/mL 万古霉素 (均为终浓度)。增菌培养需在 37°C±2°C 含 5%~10% (v/v) CO<sub>2</sub> 条件下进行, 可持续至 6 周, 每周从液体培养基取样, 并转至 FM 和 CITA 选择性培养基上作传代培养。可采用固液双相培养系统 (Castañeda 法, 在同一个瓶中有固相和液相选择性培养基), 以减少传代培养次数。分离牛奶中的布鲁氏菌, 也可用以下双相选择培养基: 以 Castañeda 氏培养基为基础培养基, 在液相培养基中加入多种抗生素, 每升培养基中含硫酸多黏菌素 B (6 mg = 6000 单位)、杆菌肽 (25 mg = 25000 单位)、那他霉素 (50 mg)、萘啶酸 (5 mg)、两性霉素 B (1 mg)、万古霉素 (20 mg) 和 D-环丝氨酸 (100 mg)。

表 2. 布鲁氏菌种的鉴别特征

种	菌落形态	是否需 要血清	噬菌体裂解 (Lysis by phages) <sup>a</sup>					氧化 酶	脲酶 活性	主要宿主
			Tb		Wb	Iz <sub>1</sub>	R/C			
			RTD <sup>c</sup>	10 <sup>4</sup> RTD	RTD	RTD	RTD			
牛种布鲁氏菌	S	- <sup>d</sup>	+	+	+	+	-	(+) <sup>e</sup>	(+) <sup>f</sup>	牛和其他牛科动物
羊种布鲁氏菌	S	-	-	-	(-) <sup>g</sup>	+	-	(+)	(+) <sup>h</sup>	绵羊和山羊
猪种布鲁氏菌	S	-	-	+	(+) <sup>i</sup>	(+) <sup>i</sup>	-	+	+ <sup>j</sup>	生物 1 型: 猪 生物 2 型: 猪、兔 生物 3 型: 猪 生物 4 型: 驯鹿 生物 5 型: 啮齿动物
沙林鼠种布鲁氏菌	S	-	- <sup>k</sup>	+	+	+	-	-	+ <sup>j</sup>	沙林鼠 <sup>l</sup>
绵羊附睾种布鲁氏菌	R	+	-	-	-	-	+	-	-	绵羊
犬种布鲁氏菌	R	-	-	-	-	-	+	+	+ <sup>j</sup>	狗
鲸种布鲁氏菌	S	ND	(-)		(+)	(+)	-	(+)	+	鲸
鳍种布鲁氏菌	S	ND	(-)		(+)	(+)	-	(+)	+ <sup>h</sup>	鳍
田鼠种布鲁氏菌	S	-	-	+	+	+	ND	+	+ <sup>h</sup>	未知 <sup>n</sup>
人源布鲁氏菌	S	ND	-	PL <sup>m</sup>	ND	ND	ND	ND	+ <sup>j</sup>	未知
狒狒布鲁氏菌	S		PL <sup>m</sup>	PL <sup>m</sup>	+	ND	-	-	+ <sup>j</sup>	未知
狐狸布鲁氏菌	S		+		+	+	-	-	+ <sup>j</sup>	未知

来源: Alton 等, 1988; Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 1986; Whatmore 等, 2009; Whatmore 等, 2014

(+) / (-) 大多数分离株阳性/阴性

a 噬菌体: Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1 (Iz<sub>1</sub>), R/C

b 正常形态: S: 光滑型, R: 粗糙型

c RTD: 常规试验稀释法

d 牛种布鲁氏菌 2 型初次分离时需血清

e 部分非洲牛种布鲁氏菌 3 型分离株是阴性

f 中等活性, 544 株和部分分离菌株为阴性

g 一些分离株被噬菌体 Wb 裂解

h 慢速, 部分分离株为快速除外

i 部分猪种布鲁氏菌 2 型分离株不能或部分被噬菌体 Wb 或 Iz<sub>1</sub> 裂解

j	快速
k	微小噬斑
L	沙林鼠
m	部分溶菌
n	从许多野生哺乳动物（啮齿动物、狐狸、野猪）、两栖动物和环境中的菌株
ND	未确定

所有使用的培养基均须利用参考菌株严格进行质量控制，以保证其性能正常。最好使用少量的对营养要求苛刻的菌株进行验证，如牛种布鲁氏菌 2 型、绵羊附睾种布鲁氏菌或猪种布鲁氏菌 2 型。

在适宜的固体培养基上培养 3~4 天后，可以清晰的看到牛种布鲁氏菌、羊种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌的菌落。4 天后，菌落呈圆形，直径 1~2 mm，边缘光滑。透过透明介质培养皿观察菌落，呈浅黄色，有光泽，半透明。从上方观察，菌落微隆起，呈珍珠白色。随时间推移，菌落变大，颜色略变暗。光滑型 (S) 布鲁氏菌在培养（特别是传代培养）时，易变成粗糙型 (R)，菌落透明度降低，表面呈黯淡的颗粒状，在反射或透射光下，颜色从哑光白到棕色不等。变异检查比较简单，可用结晶紫染色，粗糙型菌落染成红色/紫色，而光滑型菌落因不吸收染料而呈浅黄色。检测光滑型菌落，应使用光滑型布鲁氏菌抗血清，或最好用 A 和 M 表面抗原特异性抗血清。若检测非光滑型菌落，应使用针对布鲁氏菌 R 抗原的抗血清。菌落形态变化一般与细菌毒力、血清学特征或噬菌体敏感性的变化有关。分离菌株如具有典型的形态学特征，且布鲁氏菌特异性抗血清凝集反应、氧化酶和尿素酶试验（见表 2, 3）为阳性，可初步判定为布鲁氏菌。但是，建议送参考实验室进行进一步的确认和分型鉴定。

### 1.2.3 样本收集与培养

利用细菌培养诊断动物布鲁氏菌病时，样本的选择取决于观察到的临床症状。最有价值的样本包括阴道分泌物（拭子）、流产胎儿（胃内容物、脾和肺）、胎膜、奶、精液、关节炎或积液。如从动物尸体采样，首选组织为网状内皮组织（如头部、乳腺和生殖器淋巴结、脾）、怀孕期或产后早期的子宫、乳房等。通常培养 3~4 天后可见菌落，如 7~10 天后仍无菌落生长，应视为阴性并弃去。当布鲁氏菌含有数量较少时，很难从这些样本中分离出菌，因此建议把富集培养和分子检测作为平行补充诊断以提高检测的敏感性。

#### 1.2.3.1 组织

无菌采集样本，切除多余部分（如脂肪），剪成小块，加入少量无菌 PBS，用匀浆仪或研磨器研磨，最后取研磨液接种到固体培养基或增菌液进行培养。

#### 1.2.3.2 阴道分泌物

流产或分娩后阴道拭子，非常适合分离布鲁氏菌，且对人的危险性远小于流产物。可将棉拭子画线涂抹于固体培养基上进行培养。

#### 1.2.3.3 奶

乳汁培养对于筛选动物个体或畜群是否存在布鲁氏菌特别有价值。将乳头清洗，擦干并消毒，无菌采集奶样。必须全程佩戴个人防护用品。4 个乳头全采，每个乳头都需采集 10~20 mL 奶，从一头动物到另一头动物取样时要注意更换手套和消毒，以避免样本交叉污染。弃去最初挤出的奶，然后将奶直接挤入无菌容器中，必须避免操作人员的手直接接触到奶。奶样在密封离心管中离心，以避免操作人员吸入污染气溶胶。乳脂和沉淀混合或分别涂布于选择性固体培养基。如果从散装奶中分离布鲁氏菌，其数量一般较少，分离出布鲁氏菌的可能性也较小。

表 3. 布鲁氏菌种不同生物型的鉴别特征

种	生物型	是否需要 CO <sub>2</sub>	产生 H <sub>2</sub> S	有染料生长 <sup>a</sup>		与单特异血清的凝集			参考菌株 <sup>2</sup>		
				硫堇	碱性品红	A	M	R	菌株	ATCC	NCTC
牛种布鲁氏菌	1	(+) <sup>b</sup>	+	-	+	+	-	-	544	23448	10093
	2	(+) <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	-	86/8/59	23449	10501
	3 <sup>c</sup>	(+) <sup>b</sup>	+	+	+	+	-	-	Tulya	23450	10502
	4	(+) <sup>b</sup>	+	-	(+)	-	+	-	292	23451	10503
	5	-	-	+	+	-	+	-	B3196	23452	10504
	6 <sup>c</sup>	-	(-)	+	+	+	-	-	870	23453	10505
	9	+/-	+	+	+	-	+	-	C68	23455	10507
羊种布鲁氏菌	1	-	-	+	+	-	+	-	16M	23456	10094
	2	-	-	+	+	+	-	-	63/9	23457	10508
	3	-	-	+	+	+	+	-	Ether	23458	10509
猪种布鲁氏菌	1	-	+	+	(-)	+	-	-	1330	23444	10316
	2	-	-	+	-	+	-	-	Thomsen	23445	10510
	3	-	-	+	+	+	-	-	686	23446	10511
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	40	23447	11364
	5	-	-	+	-	-	+	-	513	ND	11996
沙林鼠种布鲁氏菌	-	+	- <sup>d</sup>	-	+	-	-	5K33	23459	10084	
绵羊附睾种布鲁氏菌	+	-	+	(-)	-	-	+	63/290	25840	10512	
犬种布鲁氏菌	-	-	+	(-)	-	-	+	RM6/66	23365	10854	
鲸种布鲁氏菌	(-)	-	(+)	(+)	+	(-)	-	B1/94 BCCN 94-74	ND	12891	
鳍种布鲁氏菌	(+)	-	+	(+)	(+)	(-)	-	B2/94 BCCN 94-73	ND	12890	
田鼠布鲁氏菌	-	-	+	+	(-)	(+)	-	CCM4915 BCCN 07-01 CAPM 6434	ND	ND	
人源布鲁氏菌	-	+	+	+	-	+ <sup>e</sup>	-	BO1 BCCN 09-01 CAPM 6436	ND	ND	
狒狒布鲁氏菌	-	-	-	-	+	-	-	F8/08-60 CIRMB 0958	ND	13660	
狐狸布鲁氏菌	-	-	+	+	+	-	-	F60 BCCN 09-	ND	ND	

来源: Alton 等 (1988), Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis (1986), Whatmore (2009), Whatmore 等 (2014), 和 Scholz 等 (2016)

- (+) / (-) 大多数分离菌株呈阳性或阴性
- a 血清葡萄糖培养基中的染料浓度: 20 µg/mL
  - b 初步分离通常为阳性
  - c 如需明确区分生物 3 型和 6 型, 需额外的硫堇试验 (40 µg/mL): 3 型为阳性 (+), 6 型为阴性 (-)
  - d 在 10 µg/mL 硫堇中生长
  - e 弱凝集反应
  - ND 未确定

#### 1.2.3.4 奶制品

奶酪等奶制品也应用上述培养基进行培养。由于这类样本通常含菌量较少, 建议先用选择性培养基进行增菌培养。培养前, 在样本中加入适量无菌 PBS (避免过度稀释) 浸软, 研磨器研磨, 或用匀浆仪、电动搅拌机捣碎, 仔细地对样本进行均质。奶制品表层 (外壳和下面的部分) 和中心部分都需进行培养。布鲁氏菌生长、存活和消失都非常快, 布鲁氏菌在乳制品不同部位中的分布与特定加工工序形成的局部理化环境有关。

#### 1.2.3.5 关节炎或囊肿-脓肿内容物

此类样本必须无菌采集, 且直接接种到固定选择培养基上。

上述所有样本采集后应立即冷藏 (4°C-10°C), 并以最快的方式送到实验室。否则, 样本应冻存以避免丧失活性。送到实验室后, 奶样和组织样本及其他生物液体如不立即培养, 应冷冻保存。

#### 1.2.3.6 血液培养

可以尝试从血液中培养细菌, 但是家畜的菌血症通常被认为是短暂的或间歇性的, 因此这种方法并不被广泛使用。可以在选择性或非选择性琼脂上进行抗凝血 (柠檬酸钠或肝素, EDTA[乙二胺四乙酸]除外) 直接培养, 以在更短的时间内获得结果 (4-7 天; Alton, 1988)。或用血液接种合适的非选择性培养基, 如 TSB, 并每隔一周传代至选择性 Farrell 氏培养基中培养四周。

#### 1.2.3.7 动物传代

尽管以往使用过实验动物进行传代, 但除非绝对必要, 否则应避免使用。但有时因样本污染严重或含菌量少, 动物试验是唯一检测布鲁氏菌的方法。动物接种可采用小鼠静脉或腹腔接种的途径, 或用豚鼠进行肌肉、皮下或腹腔接种。这些操作必须在本手册第 1.1.4 章中介绍的适当生物安全条件下进行。如用小鼠, 接种 7 天后取小鼠脾脏分离细菌; 如用豚鼠, 接种后 3 至 6 周取脾脏分离细菌。豚鼠解剖前可通过心内采血获取血清样本, 并用 BBAT 法检测, 血清学阳性则预示感染了布鲁氏菌 (Alton 等, 1988)。

### 1.3 鉴定与分型

任何显示布鲁氏菌形态学特征的菌落都应做革兰氏染色涂片检查。由于非光滑型菌落的水清学特性、染色特性和噬菌体敏感性通常会发生改变, 在以下介绍的分型试验中, 必须注意菌落形态。检查菌落形态, 建议采用倾斜反射光观察的 Henry 法、Braun 和 Bonestell 建立的吡啶黄试验, 或 White 和 Wilson 建立的结晶紫染色试验 (Alton 等, 1988)。

可采用以下组合试验方法鉴定布鲁氏菌种生物型: 革兰氏或 Stamp 氏染色后的菌体形

态, 直接观察菌落形态, 生长特性, 脲酶和氧化酶测定, 用抗布鲁氏菌多克隆血清进行玻片凝集试验等。种和生物型鉴定需要更详细的试验 (如噬菌体裂解、用 A、M 或 R 特异性单因子血清进行的凝集反应等), 需在参考实验室由专业技术人员进行操作。经验丰富的实验员可同时应用 Tbilissi (Tb)、Weybridge (Wb)、Izatnagar1 (Iz1) 和 R/C 噬菌体分型系统, 对布鲁氏菌的种类进行鉴定。在有合适装备的非专业实验室, 可通过常规试验, 检查其他一些特征, 如细菌生长对 CO<sub>2</sub> 的需求、是否产生 H<sub>2</sub>S (醋酸铅试纸测定)、细菌在碱性品红和硫堇中的生长情况等 (见表 2 和表 3)。虽然这项技术特别是在种水平上仍然有用, 但是生物型作为流行病学标志物的价值越来越受到质疑, 特别是在羊种布鲁氏菌生物型和一些牛种布鲁氏菌生物型中。分子生物学证据表明, 基因分型与生物分型并不相符。

MALDI-TOF (基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱) 越来越多地用于微生物学诊断, 并已应用于布鲁氏菌的鉴定。尽管应用 MALDI-TOF 方法对布鲁氏菌种的鉴定有效, 但由于布鲁氏菌种间遗传关系密切和商业数据库覆盖范围的限制性, 这种方法不能对布鲁氏菌种进行有力和明确的区分。

如需保存牛种、羊种和猪种布鲁氏菌菌株, 以及送到参考实验室进行分型鉴定, 必须选择光滑型菌落。培养物可在 5°C±3°C 下短期保存, 长时间保存则需冻干或保存在含 15% (v/v) 甘油培养基的螺口瓶中, 于 -16°C 以下冻存。为便于运输, 应将培养物冻干, 密封于安瓿瓶, 并装入螺口罐中, 或在适当的营养琼脂斜面上传代培养并装入螺口瓶内。也可将菌株悬浮于运送培养液中 (如 Amies), 但这易使菌株向粗糙型转变。

运送布鲁氏菌培养物时, 应拧紧瓶塞, 用 PVC 膜密封。航空运输时应遵守国际航空运输联盟 (IATA) 有关危险物品的运输要求 (IATA, 2021), 用吸水纸或棉絮包裹瓶子, 密封于聚乙烯袋内, 放入硬质容器内 (三层包装)。这些规定详见第 1.1.2 章《诊断用样本的采集、送检和保存》和第 1.1.3 章《生物材料运输》, 必须严格遵守。

#### 1.4 核酸识别方法

PCR 方法 (包括实时定量 PCR) 也可用于布鲁氏菌种的检测和鉴定 (Bricker, 2002; Lopez-Goñi 等, 2011; Ocampo-Sosa 等, 2005; Whatmore & Gopaul, 2011)。尽管布鲁氏菌属内部存在高度 DNA 同源性, 过去已建立起多种分子方法, 包括 PCR、限制性片断长度多态性 (RFLP) 和 Southern blot 法, 可在一定程度上鉴别布鲁氏菌种及其一些生物型 (综述见 Bricker, 2002; Moreno 等, 2002; Whatmore & Gopaul, 2011)。

Bricker 和 Halling 首次建立了区分布鲁氏菌种的特异性多重 PCR 法, 命名为 AMOS-PCR (1994)。该方法基于 IS711 序列在不同种布鲁氏菌染色体中插入位置的多态性, 设计 5 对引物, 能鉴定 (但不能区分) 牛种布鲁氏菌 1、2 和 4 型, 但不能鉴定 3、5、6 和 9 型。目前, 该方法已经过改进, 引入其他一些菌株的特异性引物, 可鉴定牛种布鲁氏菌疫苗株以及其他布鲁氏菌种和生物型 (Ocampo-Sosa 等, 2005)。Bruce-ladder 法是一种多重 PCR 方法, 可简单快速地一步鉴定布鲁氏菌 (Lopez-Goni 等, 2011)。该方法的优点在于只需一步操作, 即可鉴定和区分大多数种类的布鲁氏菌, 以及牛种布鲁氏菌 S19、RB51 和羊种布鲁氏菌 Rev.1 疫苗株。与其他 PCR 方法不同, Bruce-ladder 法还可检测沙林鼠种、鲸种和鳍种布鲁氏菌的 DNA。原有的 Bruce-ladder PCR 操作程序进行了升级更新, 新版 Bruce-ladder V2.0 经多个实验室验证, 能够区分猪种布鲁氏菌和犬种布鲁氏菌, 并且由 Kang 等 (2011) 报道的修订方法还能区分田鼠种布鲁氏菌。同样地, 还开发了另一种新型多重 PCR 方法 (Suis-ladder), 其能够快速准确鉴定猪种布鲁氏菌生物型 (Lopez-Goñi 等, 2011)。

基于单核苷酸多态性 (SNP) 的方法, 利用引物延伸或实时 PCR 或连接酶链反应可鉴定所有的布鲁氏菌种、猪种布鲁氏菌各生物型和疫苗菌株。此类方法快速、简单、准确, 且基于强大的群体遗传学分析, 有助于确保所用的布鲁氏菌种型标记的特异性 (Whatmore &

Gopaul, 2011)。

另外, 若干附加了有用的流行病学信息的其他方法也被描述, 并被广泛使用。包括多位点测序方案 (Whatmore & Gopaul, 2011) 和一些基于 MLVA (多位点可变数目串联重复序列分析) 的分型方案 (Le Fleche 等, 2006; Scholz & Vergnaud, 2013; Whatmore & Foster, 2021)。根据选择的标记不同, 这些方法可在种的水平上鉴别分离株, 或在亚种水平上提供流行病学信息。最后, 基于全基因组序列的方法正迅速成为包括布鲁氏菌病在内的几种传染病的常规监测和暴发检测的工具。通过各种正在开发的分析方法, 包括基于 SNP 的方法或通过核心基因组多位点序列分型 (cgMLST) 进行的基因间的比较, 很明显, 全基因组测序方法将提供最高水平的流行病学准确性。随着时间的推移, 这些工具将变得更加普及, 并最终极大地促进对国内外布鲁氏菌病流行病学的了解。

## 1.5 疫苗菌株鉴定

牛种布鲁氏菌 S19、RB51 及羊种布鲁氏菌 Rev.1 疫苗菌株可利用特异性 PCR (Kang 等, 2011; Lopez-Goñi 等, 2011), 或培养时的生长特性进行鉴定。

牛种布鲁氏菌 S19 疫苗菌株有牛种布鲁氏菌 1 型的典型特征, 但生长无需 CO<sub>2</sub>, 不能在含有青霉素 (3 μg/mL=5 IU/mL)、硫堇 (2 μg/mL) 和 i-赤藓醇 (1 mg/mL) (均为终浓度) 的培养基中生长, 且大量利用 L-谷氨酸盐 (Alton 等, 1988)。

羊种布鲁氏菌 Rev.1 株具有羊种布鲁氏菌 1 型的正常特性, 但在普通培养基上生长较慢, 不能在含有碱性品红、硫堇 (20 μg/mL) 或青霉素 (3 μg/mL) (最终浓度) 的培养基上生长, 但可在含 2.5 或 5 μg/mL (5IU/mL) 链霉素的培养基上生长 (Alton 等, 1988)。

鉴别牛种布鲁氏菌 RB51 和光滑型牛种布鲁氏菌 1 型可通过如下特征: RB51 菌落为粗糙型, 并在含利福平 (250 μg/mL) 的培养基上生长。

## 2. 血清学检测

没有单一的血清学方法能够适用于所有流行病学状况和所有动物, 每种方法都有其局限性, 特别是用于动物个体筛查时。应考虑到影响某一检测方法及其结果与特定诊断结论的所有因素。比如, 在一个接种了光滑型布鲁氏菌疫苗的动物群体中, 依据所用的接种方法 (剂量/途径), 由于疫苗免疫和野生型菌株感染产生的抗体存在交叉反应, 因此在接种疫苗的动物中可能会出现血清阳性结果。此外, 许多菌株尤其是小肠结肠炎耶尔森菌 O:9, 可诱导免疫应答, 并导致布鲁氏菌病血清学检测出现假阳性反应 (FPSR), 干扰准确的血清学诊断。所有种类的动物均可发生假阳性反应, 其发生率因时间和地域不同而异。

在国际贸易中, 用血清凝集试验 (SAT) 检测布鲁氏菌病被普遍认为不可靠。补体结合试验 (CFT) 的特异性高于 SAT, 且有标准化体系, 但会受到抗补体活性的影响。一些酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和荧光偏振试验 (FPA) 的诊断性与 CFT 相当或更好, 且操作相对简单, 也比较稳定, 因此可优先选用。上述方法的诊断性能已在牛、小反刍动物和猪中进行了比较。

在国家或地区层面上控制布鲁氏菌病时, 缓冲布鲁氏菌抗原试验 (BBATs) (如虎红平板试验 [RBT]、缓冲平板凝集试验 [BPAT])、ELISA 和 FPA 都是适用的筛查方法。应根据检测目的, 采用适当的确认或补充方法对阳性样本进行确诊。

其他动物如水牛 (*Bubalus bubalus*)、美洲和欧洲野牛 (*Bison bison*, *Bison bonasus*)、牦牛 (*Bos grunniens*)、麋鹿 (*Cervus elaphus*)、骆驼 (*Camelus bactrianus* 和 *C. dromedarius*)、南美驼等, 其布鲁氏菌感染的过程与牛相似, 可采用相同的血清学方法检测这些动物, 但应

验证每种方法对相应动物的适用性。

## 2.1 参考血清

OIE 参考血清是所有其他标准血清进行比较和校准所依据的标准。各国家布鲁氏菌病参考实验室均可获得这些参考血清，并依此建立二级参考标准品或国家标准品，用以验证布鲁氏菌病诊断工作标准品，供诊断实验室日常使用。

现已研制出参考血清，并被 OIE 定为国际标准血清<sup>3</sup>。这些血清的应用将促进诊断方法的国际统一和抗原的标准化：

- i) RBT、CFT、SAT 和乳环实验 (MRT) 采用 OIE 国际标准血清 (OIEISS, 以前称为 WHO 第二国际抗牛种布鲁氏菌血清, WHO, 1953)。该血清来源于牛, 含有 1000IU (SAT) 和 ICFTU (国际补体结合试验单位)。
- ii) 牛的间接酶联免疫吸附试验 (I-ELISA)、竞争酶联免疫吸附试验 (C-ELISA) 和 FPA 试验有三种标准血清可供使用, 包括强阳性标准血清 (OIEELISA<sub>SpSS</sub>)、弱阳性标准血清 (OIEELISA<sub>WpSS</sub>) 和阴性标准血清 (OIEELISA<sub>NSS</sub>)。
- iii) 绵羊和山羊的间接酶联免疫吸附试验 (I-ELISA)、竞争酶联免疫吸附试验 (C-ELISA) 和 FPA 实验使用标准抗羊种布鲁氏菌血清 (ISaBmS) (McGiven 等, 2011)。
- iv) 猪的间接酶联免疫吸附试验 (I-ELISA)、竞争酶联免疫吸附试验 (C-ELISA) 和 FPA 实验, 目前没有标准血清可用。不过, 目前已有有一个欧盟标准 EUPIGBSS<sup>3</sup> 用于猪 I-ELISA 和 C-ELISA。

## 2.2 抗原制备

制备 BBATs、SAT、CFT 和 FPA 的诊断抗原时, 应使用牛种布鲁氏菌 S99 菌株<sup>1</sup> (Weybridge) 或 1119-3 菌株 (USDA) (S1119-3)<sup>4</sup>。这些牛种布鲁氏菌还可用于 ELISA 或半抗原检测试验的可溶性抗原 (光滑型脂多糖 S-LPS 或 OPS) 的提取, 羊种布鲁氏菌 16M 菌株也可作此用途。需强调的是, 任一以上牛种或羊种 16M 布鲁氏菌菌株制备的抗原, 均可用于检测其他光滑型布鲁氏菌引起的感染。

这些菌株必须是完全光滑型菌落, 且在生理盐水和 0.1% (W/V) 的吡啶黄中不发生自凝集; 必须是纯培养物, 其特征与不依赖 CO<sub>2</sub> 的牛种和羊种布鲁氏菌 1 型菌株一致。原种传代制备的生产菌种批次必须符合原种特征, 并冻干或置液氮中冷冻保存。

生产抗原时, 将种子菌接种一定数量的马铃薯浸液琼脂斜面, 37°C±2°C 培养 48 小时。使用血清葡萄糖琼脂 (SDA) 和胰蛋白大豆琼脂培养基 (TSA) 时, 可添加 5% 马血清或新生牛血清和/或 0.1% 酵母浸出物, 这是培养上述种子菌比较理想的固体培养基。检查培养物的纯度, 将培养物悬浮于 pH 6.4 的无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 接种于装有马铃薯浸液琼脂或甘油葡萄糖琼脂培养基的 Roux 瓶中, 接种面向下, 37°C±2°C 培养 72 小时。每瓶都要取样, 进行革兰氏染色, 检查培养物的纯度。每瓶加 50~60mL 石炭酸生理盐水 (含 0.5% 苯酚的 0.85% 氯化钠溶液), 轻轻摇动后倒出悬液, 80°C 加热 90min 灭活细菌, 进行灭活检验, 将抗原储存在 5°C±3°C。

此外, 也可用液体培养基批量生产或在发酵罐中连续培养, 液体培养基配方如下: 每升蒸馏水中含 30g D-葡萄糖、30g 优质蛋白胍、10g 酵母提取物 (Difco)、9g 磷酸二氢钠和 3.3g 磷酸氢二钠。开始时 pH 为 6.6 (±0.2), 但在生长过程中, pH 值往往会升到 7.2 (±0.2)。必须

<sup>2</sup> 可从位于英国的 OIE 布鲁氏菌病参考实验室获取 (参见 OIE 参考实验室在线列表: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>)。

<sup>3</sup> 可从位于法国的 OIE 布鲁氏菌病参考实验室获取。

<sup>4</sup> 可从美国农业部国家兽医实验室 (National Veterinary Services Laboratories, NVSL) 获取, 地址: 1800 Dayton Road, Ames, United States of America。

注意检查每批蛋白胨和酵母提取物，确保细菌良好生长，避免出现异常或变异。生长期间需良好通气，并不断搅拌。必要时，可用 0.1M 无菌盐酸将 pH 值调整到 7.2 ( $\pm 0.2$ )。按上述方法制备种子接种物，37°C $\pm 2^\circ\text{C}$  培养 48 小时。连续培养所需时间更长，技术性更高。无论是固体还是液体培养，均应进行过程控制，以确保纯度、适当的活菌数及无粗糙型变异菌体。收获用于制备抗原的菌株时，应检查其纯度和光滑性。

通过离心沉淀菌体收获培养物，悬于石炭酸生理盐水中，80°C 加热 90min 灭活细菌，保存于 5°C $\pm 3^\circ\text{C}$ 。菌体在生理盐水溶液中必须形成稳定的悬浮液，无自凝集现象。必须对悬液进行细菌灭活检验，37°C $\pm 2^\circ\text{C}$  孵育 10 天后不得有细菌生长。测定灭活悬液的菌体细胞压积 (PCV) 时，可将 1mL 悬液置于 Wintrobe 离心管中，3000g 离心 75min。

## 2.3 缓冲布鲁氏菌抗原试验 (BBAT)

### 2.3.1 虎红凝集试验 (RBT)

RBT 是一种简单的斑点凝集试验，使用虎红染色的抗原，抗原缓冲液 pH 值较低，一般为 3.65 $\pm 0.05$  (Morgan 等, 1969)。

#### 2.3.1.1 抗原制备

制备虎红平板凝集试验抗原悬液，将灭活的牛种布鲁氏菌 S99 株或 S1119-3 株在 5°C $\pm 3^\circ\text{C}$  下 23000g 离心 10min (或 14000g 离心 40min)，收集菌体，按 1g 菌体加 22.5mL 灭菌石炭酸生理盐水 (0.5%) 的比例，均匀重悬沉淀 (注：制备菌体浓缩液时，如使用羧甲基纤维素钠盐作为沉淀剂，染色前必须用 AMF-CUNO Zeta-plus (CPR 01A 型) 预过滤器去掉菌体悬液中的不溶性残渣)。在液体培养基中培养细菌 (比如在生物反应器中)，离心前可以浓缩细菌悬液 (最多 40 次)，使用 0.1 $\mu\text{m}$  微孔滤膜的切向流过滤系统 (TFFS)，用无菌苯酚生理盐水 (0.5%) 洗涤三次 (1:3 比例)。按每 35mL 菌悬液加 1mL 含 1% (w/v) 虎红 (CI No.45440) 的无菌蒸馏水溶液，室温搅拌两小时，无菌脱脂棉纱过滤，10000g 离心，沉淀染色菌体按 1g 菌体加 7 mL 稀释液的比例 (稀释液：21.1g 氢氧化钠溶于 353mL 无菌石炭酸溶液中，加 95mL 乳酸，无菌石炭酸生理盐水补至 1056mL)，均匀悬浮菌体。悬浮液应为深粉红色，**离心后上清液应无染色剂**，悬液 pH 值应为 3.65 $\pm 0.05$ 。用脱脂棉纱过滤后，Sartorius 13430 号玻璃纤维预过滤器过滤两次，将细胞压缩体积 (PCV) 调整到约 8%，用 OIEISS 校准过的血清标定，5°C $\pm 3^\circ\text{C}$  避光保存。抗原应按生产商推荐的方法保存，不应冷冻。

#### 2.3.1.2 抗原标定

按标准 RBT 程序使用抗原时，RBT 抗原应与用 0.5% 石炭酸盐水或普通盐水按 1/45 稀释的 OIEISS 出现清晰的阳性反应，但与 1/55 稀释的血清无阳性反应。

也可使用 ISaBmS 进行辅助检查。该标准血清的最高稀释度 1/16 (用阴性山羊血清稀释) 应为阳性结果，而最低稀释度 1/200 (用阴性山羊血清稀释) 应为阴性结果 (McGiven 等, 2011)。

**此外，建议采用确定的血清盘，对新制备抗原和以前标定抗原的活性进行比较。**

然而，**采用 OIEISS 标定可能会降低虎红抗原在诊断小反刍动物羊种布鲁氏菌感染上的敏感性，以及导致与补体结合试验 (CFT) 检测结果产生偏差** (Blasco 等, 1994a)。检测小反刍动物时，为了降低与 CFT 检测结果的偏差，使用的**血清和抗原的体积比应为 3:1** (如分别为 75 $\mu\text{L}$  和 25 $\mu\text{L}$ ) 而不是标准测试程序里使用的 1:1 比例。但是，这一改进方法不适用于检测牛和猪的血清。

#### 2.3.1.3 试验步骤

- i) 将血清样本和抗原 (当天试验所需抗原量) 置于室温 (22 $\pm 4^\circ\text{C}$ )。
- ii) 每份血清样本取 25~30 $\mu\text{L}$ ，放在白色瓷砖、搪瓷板、塑料板或 WHO 血凝反应板上。
- iii) 轻轻混匀抗原，在每份血清样本旁边滴加等量的抗原。

- iv) 加完最后一滴抗原后, 立即混合血清和抗原 (每次试验使用一个干净的玻璃棒或塑料棒), 形成直径约 2cm 的圆形或椭圆形区域。
- v) 在振荡器 (如果反应区为椭圆形) 或三向搅拌器 (如果反应区是圆形) 上, 室温  $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$  轻摇 4min。
- vi) 立即读取凝集结果, 出现可见的凝集反应均判为阳性。每天试验前, 应检测一个弱阳性对照血清, 以验证试验条件的敏感性。

**RBT 是一个很敏感的试验**, 但与其他血清学方法一样, 有时因 S19 疫苗免疫或假阳性血清反应 (FPSR) 而出现阳性结果。同样的现象也出现在受 FPSR 影响的小反刍动物和猪的检测中, 以及接种了羊种 Rev.1 疫苗的小反刍动物检测中。因此, 阳性反应应通过适当的确证和/或补充试验进行复查 (包括流行病学调查)。相反, **假阴性反应较少发生**。尽管如此, RBT 仍可作为畜群布鲁氏菌感染的筛查方法, 或用来确定牛、羊群无布鲁氏菌感染状态。

### 2.3.2 缓冲平板凝集试验

#### 2.3.2.1 抗原制备

根据 Angus 和 Barton 描述的步骤, 采用牛种布鲁氏菌 S1119-3 株制备 BPAT 抗原 (1984)。

需制备两种染色液: 将符合标准的亮绿 (2g/100mL) 和结晶紫 (1g/100mL) 溶于蒸馏水中, 放置 24 小时后等量混合, 置于一棕色瓶内, 冰箱保存至少 6 个月后才能使用, 且混合液配制后应在 6~12 个月内使用。

在 3~4L 无菌石炭酸盐水中缓慢溶解 150g 氢氧化钠, 制成缓冲稀释液, 加入 675mL 乳酸, 再加入无菌石炭酸盐水, 调至终体积为 6L, pH 值应为  $3.65 \pm 0.05$ 。

牛种布鲁氏菌 S1119-3 株的压积菌体用石炭酸盐水稀释成 250g/L 浓度, 每升菌体悬液内加染色液 6mL, 充分振荡, 无菌脱脂棉纱过滤,  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  10000g 离心沉淀, 沉淀物用上述缓冲稀释液重悬成 50g/100mL 浓度, 充分振荡 2 小时, 每 100mL 细菌悬液中加入 300mL 缓冲稀释液作进一步稀释 (终浓度为每 400mL 缓冲稀释液含 50g 沉淀菌体)。室温下搅拌混合物 20~24 小时, 用缓冲稀释液将浓度调至 11% (w/v), 检验前震荡过夜。在最后的的质量检验期间, 抗原应保存于  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  备用, 不能冷冻保存。

缓冲平板凝集抗原的 pH 值应为  $3.70 \pm 0.03$ , 将血清和抗原按 8:3 混合, pH 值应为  $4.02 \pm 0.04$ 。浓度为 11% 的染色菌体悬液应为蓝绿色。每批缓冲平板凝集抗原须至少用 10 份弱阳性血清进行测试, 并与此前一批或多批抗原进行比较。如有可能, 每批抗原要与美国农业部 (USDA) 国家兽医服务实验室 (NVSL, 地址见脚注 5) 制备的标准抗原进行比较。然而, 尚未建立使用 OIEISS 或 IsaBmS 的国际标准化操作步骤。

#### 2.3.2.2 试验步骤

- i) 将血清样本和抗原 (当天试验所需抗原量) 放置于室温 ( $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ )。
- ii) 充分混匀血清样本, 每份样本取 80 $\mu\text{L}$ , 置于标出  $4 \times 4\text{cm}$  方格的玻璃板上。
- iii) 轻轻摇匀抗原瓶, 取 30 $\mu\text{L}$  抗原置于每个血清样本旁边。
- iv) 加完最后一滴抗原后, 立即混合血清和抗原。
- v) 每次试验使用一个干净的玻璃棒或塑料棒, 形成直径约 3cm 的圆形区域。
- vi) 将板倾斜旋转三次, 使试剂均匀散开, 置于湿盒内室温孵育 4min。
- vii) 取出板, 按上述方式旋转, 放入湿盒中再孵育 4min。
- viii) 立即读取实验结果。任何可见的凝集反应均判为阳性。每天试验前, 应检测一个弱阳性对照血清, 以验证试验条件的敏感性。

与 RBT 一样, 此试验用于牛血清检测非常敏感, 尤其是检测疫苗诱导的抗体。阳性样本应通过验证和/或补充试验进行复查。因前带现象可能出现假阴性结果, 通过稀释血清或过一段时间后复查可解决这一问题。BPAT 已在一些国家广泛用于小反刍动物和猪的检测, 并获得很好的结果, 但其在其他动物上的诊断价值在国际上尚无相关报告。

## 2.4 补体结合试验

尽管 CFT 操作复杂, 需有良好的实验设施和训练有素的人员, 以保证试剂准确滴定和保存, 该技术仍被广泛使用, **且为一种公认的确证方法**。实际应用中有多种 CFT 方法, 其中微量板操作最方便。孵育血清、抗原和补体时, 热结合或冷结合均可行,  $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  时需 30min, 而  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  时则为 14~18 小时。方法的选择受一些因素的影响, 例如, 质量差的血清样品中的抗补体活性在冷结合时更明显; 而  $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  孵育增加前带现象出现的频率和强度, 因此每份样本应进行多个稀释梯度检测。

补体结合试验有多种方式, 用不同稀释度的新鲜或储存的绵羊红细胞(SRBCs)悬液(通常推荐使用 2、2.5%或 3%的悬液), 以等体积的兔抗绵羊红细胞血清致敏, 该血清是预先稀释成含几倍(通常为 2~5 倍)最小溶血浓度的工作血清。最小溶血浓度指在有一定滴度的豚鼠补体存在情况下, 能使绵羊红细胞 100%溶血的抗血清浓度。豚鼠补体需单独滴定(根据所用方法在有或没有抗原的情况下), 以确定在 1 个单位体积标准悬液中产生 50%或 100%致敏红细胞溶血所需的补体数量, 分别命名为 50%或 100%补体/最小溶血剂量 ( $\text{C}'\text{H}_{50}$  或  $\text{MHD}_{50}$ , 或  $\text{C}'\text{H}_{100}$  或  $\text{MHD}_{100}$ )。建议在每组试验前对补体滴度进行滴定, 最好用大体积法确定  $\text{C}'\text{H}_{50}$ 。**试验中一般选择 1.25~2  $\text{C}'\text{H}_{100}$  或 5~6  $\text{C}'\text{H}_{50}$ 。**

CFT 的标准稀释液为巴比妥缓冲盐水, 既可选用商品化片剂配制, 也可用以下方法制备: 向 1L 蒸馏水中加 42.5g 氯化钠、2.875g 巴比妥酸、1.875g 巴比妥钠、1.018g 硫酸镁和 0.147g 氯化钙, 作为缓冲盐水母液, 使用前加 4 倍体积的 0.04%明胶溶液稀释。但是一些国家已不再使用巴比妥衍生物。使用不含巴比妥衍生物的缓冲液也能获得令人满意的结果, 其制备方法是: 在 1L 液体中添加 0.85%氯化钠以及 1M 氯化镁和 0.3M 氯化钙(无水氯化镁 9.5 克, 氯化钙 3.7 克, 补充超纯水至 100 毫升)(少量分装保存于  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) (Alton 等, 1988)。溶液的 pH 值很关键, 必须调整为 7.35 ( $\pm 0.05$ )。用这种不含巴比妥的缓冲液替换原缓冲液已由法国的 OIE 布鲁氏菌病参考实验室进行了验证<sup>5</sup>。

### 2.4.1 抗原制备

现有多种 CFT 试验方法, 但无论选择何种操作程序, 所用抗原都必须由光滑型牛种布鲁氏菌菌株(如 S99 株或 S1119-3 株)制备, 且经 OIEISS 血清标定。可通过特殊程序 (Alton 等, 1988) 制备 CFT 抗原, 或使用全菌抗原。全菌体抗原应稀释后使用, 在用 OIEISS 血清标定前, 悬液的 PCV 应约为 2%。

### 2.4.2 抗原的标定

需对抗原进行标定, 使其与 OIEISS 阳性血清在 1/200 稀释度时产生 50%结合, 并在较低血清稀释度下达到完全结合。这是因为血清稀释度很低时, 如抗原浓度过低(或过高), 可能达不到 100%结合。若抗原的两个稀释度均合适, 必须选用高浓度, 以避免发生前带现象。抗原作 1/10 稀释时, 外观应为均一、稠密的白色悬液,  $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  孵育 18 小时后, 无可见凝集或沉积, 试验中不产生抗补体作用。抗原应于  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  存放, 不得冻存。

### 2.4.3 试验步骤(示例)

未稀释的待检血清和适当的工作标准品应  $60^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中灭活 30min, 如果血清事先用等体积的巴比妥缓冲盐水稀释, 则应  $58^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  灭活 50min。常规检测通常只检查一个血清稀释度(根据所选 CF 试验程序, 一般为 1/4 或 1/5 稀释度), 但在贸易中或已出现临诊症

<sup>5</sup>可从位于法国的 OIE 布鲁氏菌病参考实验室获取。

状的动物，建议对待检血清样本做系列稀释，以检测是否有前带现象。

使用标准 96 孔 U 形微量反应滴定板，具体操作如下：

- i) 第一、第二和第三排每孔加 25 $\mu$ L 稀释的待检灭活血清，第一排为每种血清的抗补体对照。第一排每孔加 25 $\mu$ LCFT 缓冲液（抗补体对照），以补偿抗原体积缺失。除第二排外，其他各排每孔加 25 $\mu$ LCFT 缓冲液。从第三排取稀释血清 25 $\mu$ L，向后作系列倍比稀释。最后一排的混合物弃掉 25 $\mu$ L。
- ii) 除第一排外，每孔加入 25 $\mu$ L 稀释至工作浓度的抗原。
- iii) 每孔加入 25 $\mu$ L 稀释至含所需单位的补体。
- iv) 对照孔包括 a) 仅含稀释液、b) 补体+稀释液、c) 抗原+补体+稀释液，每种对照总体积都设定为 75 $\mu$ L。

每次试验都设最小阳性反应血清对照，以检测试验条件的敏感性。

- v) 微量板于 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 孵育 30min 或 5 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C 过夜，每孔加一定体积的致敏 SRBC 悬液（根据所用技术，加 25 $\mu$ L 或 50 $\mu$ L），于 37 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 再孵育 30min。
- vi) 微量板 5 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C 下 1000g 离心 10min，或 5 $^{\circ}$ C $\pm$ 3 $^{\circ}$ C 静置 2~3 小时，使未溶解红细胞沉淀，然后判读结果。溶血程度与相当于 0%、25%、50%、75% 和 100% 标准溶血孔对比。第一排用来检测每份血清的抗补体活性缺失情况。
- vii) CFT 结果标准化：

以 OIEISS 的活性单位为基础对结果进行标定。该血清抗体滴度为 1000ICFTU/mL，如用某一给定方法检测该血清，例如滴度为 200（50% 溶血），通过下列公式可获得用同一方法检测的未知血清抗体滴度： $1000 \times 1/200 \times$  待检血清滴度 = 每毫升待检血清中 ICFTU 数。OIEISS 含有特异性 IgG，国家标准血清也应以这种抗体亚型为依据确定特异性补体结合活性。不同 CF 技术会因免疫球蛋白类型不同而有所差异，而导致难以标准化。建议任何以 CFT 为国家标准的国家应在其相关实验室之间达成一致，采用统一的方法，以确定相同的敏感性结果。为便于国家间对比，结果应用 ICFTU 表示，以标准血清平行滴定获得的单位数进行计算，该标准血清可用 OIEISS 标定。

- viii) 结果判读：滴度相当于 20ICFTU/mL 或更高时，血清判为阳性。

3-6 月龄动物经过牛种布鲁氏菌 S19 或羊种布鲁氏菌 Rev.1 免疫，在 18 月龄或更大时经补体结合试验检测，血清滴度为  $\geq 30$  ICFTU/mL 时，则判定为发生感染。

以上试验步骤仅为举例，在标准检验中，也可采用其他一定体积和数量的试剂，前提是试验已按上所述方法用 OIEISS 进行了标定，且结果用 ICFTU/mL 表示。

**CFT 通常特异性较强，但敏感性低于 RBT 和 ELISA**，特别是猪样本检测，由于猪补体与豚鼠补体产生的相互作用会降低补体反应的敏感性。因此，CFT 对诊断猪种布鲁氏菌感染的敏感性减弱，不能消除 FPSR 问题，建议只作为诊断猪感染的补充试验。此外，与大多数血清学方法一样，反刍动物接种牛种布鲁氏菌 S19 和羊种布鲁氏菌 Rev.1 疫苗株后，因 FPSR 存在而使 CFT 产生非特异阳性。因此，阳性样本需通过适当的验证实验进行复核检验。

## 2.5. 酶联免疫吸附试验

### 2.5.1 间接 ELISA

已有多种针对牛、小反刍动物、骆驼科和猪的间接 ELISA (I-ELISA) 试验方法，采用了不同方法制备抗原物、抗免疫球蛋白-酶结合物、底物/显色剂。应采用牛种布鲁氏菌 99 菌株 (Weybridge) (S99)<sup>3</sup> 或 1119-3 (USDA) (S1119-3)<sup>4</sup> 生产这些抗原，布鲁氏菌 16 M 也适用。广泛的田间试验已验证了多种采用全菌、光滑型菌株脂多糖 (S-LPS) 或 O-脂多糖

(OPS) 作为抗原的商业化 I-ELISA 试剂盒，这些试剂盒目前被广泛应用。然而，所使用的技术和结果解读必须依据第 1.1.6 章《传染性疾病诊断技术的验证原则和方法》进行验证。**这些菌株的 O-脂多糖抗体表位也可以通过化学合成方法获得，并将其成功地作为 ELISA 抗原，但这些方法还有待全面验证。**

#### 2.5.1.1 间接 ELISA 的校准 (EU, 2008; McGiven *et al.* 2011)

##### 2.5.1.1.1 牛的布鲁氏菌感染

- i) 用阴性牛血清（或混合阴性牛血清）将 OIEELISA<sub>wpSS</sub> 做 1/2 稀释或将 OIEELISA<sub>spSS1/16</sub> 稀释，稀释后检测结果必须为阳性。  
且
- ii) 用阴性牛血清（或混合阴性牛血清）将 OIEELISA<sub>wpSS</sub> 做 1/8 稀释或将 OIEELISA<sub>spSS</sub> 做 1/64 稀释，稀释后检测结果必须为阴性。  
且
- iii) OIEELISA<sub>NSS</sub> 检测结果必须是阴性。

##### 2.5.1.1.2 绵羊和山羊的布鲁氏菌感染

- i) 用阴性羊血清（或混合羊阴性血清）将 ISaBmS 做 1/64 稀释，稀释后检测结果必须为阳性。  
且
- ii) 用阴性羊血清（或混合阴性羊血清）将 ISaBmS 做 1/750 稀释，稀释后检测结果必须为阴性。  
且
- iii) 上述阴性羊血清（或混合阴性羊血清）检测结果必须是阴性。

##### 2.5.1.1.3 猪和骆驼科的布鲁氏菌感染

- i) 在无合适的国际标准血清的情况下，需采用恰当方法对检测方法进行验证，并在一定检测数量的基础上设置 cut-off 值（阈值）（见第 1.1.6 章）。

以 S-LPS 或 OPS 为抗原的 I-ELISA 对于检测牛、小反刍动物和猪的抗体具有很高的敏感性，但不能完全鉴别牛种布鲁氏菌 S19 和羊种布鲁氏菌 Rev.1 免疫接种产生的抗体。**牛种布鲁氏菌疫苗株 RB51 也会干扰基于 S-LPS 作为抗原的 I-ELISA 结果。**对阳性结果应进行适当的确认或补充方法进行验证，如 BBAT 和 CFT。

**使用 OIE 标准血清校准的 I-ELISA，在诊断牛、小反刍动物和猪布鲁氏菌病上，其敏感性等于或高于 BBATs(RBT/BPAT) 或 CFT，但是，特异性通常会降低 (EFSA,2006;2009;Greiner 等, 2009; Gusi 等, 2019)。**

在 I-ELISA 试验中（尤其在猪的实验中），使用粗糙型布鲁氏菌的提取物能够降低 FPSR 问题但不能彻底解决。大部分 FPSR 是与 S-LPS 分子的 O-多糖部分发生交叉反应的结果，虽然核心表位之间发生交叉反应不太常见，但确实存在。使用离液盐（某些盐高浓度下可降低非特异结合）I-ELISA 或将异源布鲁氏菌提取物或胞内蛋白作为抗原并不能解决这一问题，至少在牛（Muñoz 等，2005）的实验中是如此。此外，如出现 FPSR，最特异性的诊断方法仍是布鲁氏菌皮试（见下节 B.3.1）。

根据易得性和性能要求，可选用单克隆、多克隆抗体或蛋白 A/G 作为酶交联物。如使用牛 IgG<sub>1</sub> 重链的特异性单抗，可在一定程度上提高试验的特异性，但可能同时降低敏感性。**蛋白 A/G 酶标物可作为检测多种哺乳动物的一种有效试剂。**

已有一些商品化 I-ELISA 试剂盒可用。一些方法的敏感性或特异性低于其他方法，因此，不同方法的结果不一定具有可比性。I-ELISA 检测小反刍动物和猪的血清本质上与牛的抗体检测基本相同，但需采取适当的验证方法建立合适的阈值（见第 1.1.6 章）。此外，绵羊和山羊 I-ELISA 应采用 ISaBmS 进行标准化（McGiven 等，2011）。

无论使用哪种 I-ELISA 方法，应注意：

- i) 每块板必须包含一个阳性和一个阴性血清对照。必须确定这两个对照光密度(OD)值范围，以确定验证每块板结果的标准。将每份待检血清的 OD 值与阳性对照 OD 值进行比较得到最终结果（阴性或阳性）。
- ii) 每个检测板中还必须包含另外一种阳性血清（内控血清），以验证不同板和不同日期检测的可重复性。

## 2.5.2 竞争 ELISA

已有多种以 S-LPS 或 OPS 为抗原的 C-ELISA 方法，用于牛、小反刍动物、骆驼科和猪的检测，采用不同的抗免疫球蛋白-酶复合物、底物或显色剂，以及用不同光滑型布鲁氏菌制备的抗原。所使用的技术和结果解读必须按照第 1.1.6 章规定的原则进行验证。

### 2.5.2.1 竞争 ELISA 的校准 (EU, 2008; McGiven *et al.* 2011)

#### 2.5.2.1.1 牛的布鲁氏菌感染

- i) 用阴性牛血清（或混合阴性牛血清）将 OIEELISA<sub>wpSS</sub> 做 1/2 稀释或将 OIEELISA<sub>spSS</sub> 做 1/16 稀释，稀释后检测结果必须为阳性。  
且
- ii) 用阴性牛血清（或混合阴性牛血清）将 OIEELISA<sub>wpSS</sub> 做 1/8 稀释或将 OIEELISA<sub>spSS</sub> 做 1/64 稀释，稀释后检测结果必须为阴性。  
且
- iii) OIEELISA<sub>NSS</sub> 检测结果必须始终是阴性。

#### 2.5.2.1.2 绵羊和山羊的布鲁氏菌感染

- i) 用阴性羊血清（或混合阴性羊血清）将 ISaBmS 做 1/8 稀释，稀释后检测结果必须为阳性。  
且
- ii) 用阴性羊血清（或混合阴性羊血清）将 ISaBmS 做 1/300 稀释，稀释后检测结果必须为阴性。  
且
- iii) 上述阴性羊血清（或混合阴性羊血清）检测结果必须始终是阴性。

#### 2.5.2.1.3 猪的布鲁氏菌感染

- i) 在没有猪布鲁氏菌病国际标准血清的情况下，需采用恰当的验证方法对检测方法进行验证，并在一定检测数量的基础上设置 *cuf-off* 值（阈值）（见第 1.1.6 章）。

已有一些商品化 C-ELISA 检测试剂盒可用。一些方法的敏感性或特异性低于其他方法，因此，不同方法的结果不一定具有可比性。但需采取适当的验证方法建立合适的阈值。

在牛、绵羊和猪的检测中，已证明，利用针对牛种布鲁氏菌 OPS 特异表位的单克隆抗体 (MAb) 建立的竞争 ELISA (C-ELISA) 通常（但不总是）比 BBAT 和 I-ELISA 具有更高的特异性，但敏感性较低 (Muñoz 等, 2005; 2012; Nielsen 等, 1995; Praud 等, 2012; Stack 等, 1999)。

**C-ELISA 可能减少但不能完全消除因接种疫苗而产生的抗体引起的反应。极有可能的是，与 BBAT 和 I-ELISA 相比，C-ELISA 的特异性提高可能是由于其敏感性下降。因此，与 RBT、BBAT、CFT 和 I-ELISA 一样，C-ELISA 反应的结果不应单独考虑，与适当的确认或补充方法一起评估。**

MAb 的选择及其或多或少的特异性和亲和性可对本试验的诊断性能产生显著影响。与任何基于 MAb 的试验一样，为使试验方法获得国际认可并得以广泛应用，必须考虑所选 MAb 或杂交瘤细胞是否能普遍获得。

无论使用哪种 C-ELISA 方法，应注意：

- i) 每块板必须包含一个阳性和一个阴性血清对照。必须确定这两个对照光密度(OD)值范围，以确定验证每块板结果的标准。将每份待检血清的 OD 值与阳性对照 OD 值进行比较得到最终结果（阴性或阳性）。
- ii) 每个检测板中还必须包含另外一种阳性血清（内控血清），以验证不同板和不同日期检测的可重复性。

## 2.6 荧光偏振试验

荧光偏振试验 (FPA) 是一种检测抗原-抗体相互作用的简便技术。这是一种均质分析技术，无须分离分析物，十分快捷。与其他均质分析如 RBT 不同的是，在加入抗原前，需对每一个样本的背景值进行读数，这是一个两步法实验技术。

诊断布鲁氏菌病时，将牛种布鲁氏菌 S1119-3 株 S-LPS 的 OPS 小分子量片段（平均 22kD），标记上异硫氰荧光素 (FITC)，用作抗原。背景值读数完成后 (2-3min)，将此抗原加到稀释的血清中，可在 2min 内用荧光偏振分析仪测定抗体含量 (Nielsen 等, 1996)。

### 2.6.1 抗原制备 (示例)

制备 OPS，于 5g 干重 (或 50g 湿重) 牛种布鲁氏菌 S1119-3 株菌体悬液中，加 400 mL 2% (v/v) 醋酸，121°C 高压灭菌 15min，5°C±3°C 10000g 离心 10min，去除菌体碎片。上清液以 20g 三氯醋酸处理，沉淀蛋白质和核酸。再次 5°C±3°C 10000g 离心 10min，去除沉淀。上清液用至少 100 倍原液体积的蒸馏水进行透析，透析后进行冻干。将 3mg OPS 溶于 0.6mL 0.1M 氢氧化钠溶液 (4gNaOH/L)，37°C±2°C 孵育 1 小时，加入 0.3mL 以二甲基亚砜配制的 FITC 异构体-1 (浓度为 100mg/mL)，37°C±2°C 温育 1 小时。之后将 FITC 标记的 OPS 用 1×10cm 层析柱层析。该层析柱填充二乙氨基乙基葡聚糖凝胶 (DEAE) A 25，使用前先用 0.01M 磷酸缓冲液 (pH 7.4±0.2) 平衡柱子。层析过程中加入 10~15mL 缓冲液后，第一部分流出液为亮绿色，然后换为 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.4±0.2)，流出 10~15mL 缓冲液后，再流出 25~40mL 绿色荧光物质，此物质即为 FPA 试验抗原。可按此比例大规模地制备抗原。

如需确定试验所用的抗原量，可稀释上述洗脱物，直至荧光偏振分析仪 (FPM) 测定的荧光总强度达到 250000~300000。

抗原为液体状态，应贮存在深色瓶中，于 5°C±3°C 可保存数年，或冻干保存于深色瓶中。可以购买商品化的抗原，但市面上所售较少。

### 2.6.2 FPA 的校准 (EU, 2008; McGiven 等, 2011)

#### 2.6.2.1 牛的布鲁氏菌感染

- i) OIEELISA<sub>WPSS</sub> 和 OIEELISA<sub>SPSS</sub> 均呈阳性反应。  
且
- ii) 用阴性牛血清 (或混合阴性牛血清) 将 OIEELISA<sub>WPSS</sub> 做 1/8 稀释将或 OIEELISA<sub>SPSS</sub> 做 1/64 稀释，稀释后检测结果必须为阴性。  
且
- iii) OIEELISA<sub>NSS</sub> 检测结果必须始终是阴性。

#### 2.6.2.2 绵羊和山羊的光滑型布鲁氏菌感染

- i) 用阴性羊血清 (或混合阴性羊血清) 将 ISaBmS 做 1/16 稀释，稀释后检测结果必须呈阳性。  
且
- ii) 用阴性羊血清 (或混合阴性羊血清) 将 ISaBmS 做 1/200 稀释，稀释后检测结果必须呈阴性。

且

iii) 上述阴性羊血清（或混合阴性羊血清）检测结果始终必须是阴性。

### 2.6.2.3 猪的布鲁氏菌感染

i) 在无猪布鲁氏菌病国际标准血清情况下，需采用恰当的验证方法对检测方法进行验证，并在一定检测数量的基础上设置 cut-off 值（临界值）（见第 1.1.6 章）。

FPA 诊断牛布鲁氏菌病的特异性和敏感性几乎与 C-ELISA 相同。FPA 诊断小反刍动物和猪的抗布鲁氏菌抗体与牛的抗体检测基本相同，但需采用适当的验证方法建立合适的临界值（见第 1.1.6 章）。应按上述相应国际标准血清进行标准化。

FPA 方法能够减少但无法消除疫苗免疫产生的残留抗体对检测结果的影响 (Nielsen 等, 1996)。此外，在牛和小反刍动物的实验中，**FPA 对 FPSR 的特异性目前尚不清楚**。但可以确定的是，在猪的实验中，FPA 并不能解决 FPSR 的问题 (Praud 等, 2012)。

因此，与其它血清学检测方法一样，应通过适当的确认和补充方法对阳性结果进行进一步分析调查。

### 2.6.3 试验程序 (Nielsen 等, 1996)

FPA 可在玻璃试管内或 96 孔板上进行。

如果用 96 孔板，将牛血清按 1/10 稀释，如果用试管则应将牛血清稀释至 1/100。

如果用 96 孔板，按 1/10 稀释绵羊、山羊、猪的血清，而用试管则应将山羊和猪血清稀释至 1/25，绵羊血清稀释至 1/40。

1L 稀释液 (pH 7.2, Tris 缓冲液): 0.01M Tris (1.21 g)、0.15M 氯化钠 (8.5g)、0.05% Igepal CA630 (500  $\mu$ L) (以前是 NP40) 和 10 mM EDTA (3.73 g)，蒸馏水配制。

混合后，用荧光偏振分析仪 (FPM) 获取偏光起始读数。加入适量的标记滴定抗原，混合，约 2min 后，通过 FPM 获取第 2 个读数。

FPM 读数 (用微偏振单位 mP 来表示) 如超出设定的临界值，则表明是阳性。

一般的临界水平为 90~100 mP 单位，但需使用相应的 OIE 参考标准血清 (如上所述) 进行校准。试验应包括一个强阳性、一个弱阳性和一个阴性对照血清 (根据上述 OIE 参考标准血清进行校准)。

#### 2.6.3.1 牛血清样本

i) 如用 10 $\times$ 75 mm 硼硅玻璃试管，加 1 mL Tris 缓冲液、10  $\mu$ L 血清或 20  $\mu$ L 经 EDTA 处理的全血。如用 96 孔板，取 20  $\mu$ L 血清，加到 180  $\mu$ L 缓冲液中。充分混匀，在 FPM 上读取偏光值。

ii) 将一定体积的抗原 (产生总荧光强度为 250~300 $\times$ 10<sup>3</sup>) 加到试管或混合孔中，混匀。不同批次抗原的添加量有所不同，但通常在 10  $\mu$ L 左右。室温下 (22 $\pm$ 4 $^{\circ}$ C) 孵育 2 min (血清) 或 15 sec (EDTA 处理的全血)，在 FPM 上读取第二个数值。

iii) 高于临界值的读数判为阳性反应。

### 2.7 血清凝集试验 (仅用于牛)

多年来，血清凝集试验 (SAT) 一直被成功应用于牛布鲁氏菌监测和防控计划中，尤其在北欧地区。**在抗原中加入了 EDTA**，使得该试验的特异性显著提高 (MacMillan & Cockrem, 1985)。

本试验的抗原为溶于石炭酸生理盐水的牛种布鲁氏菌 99 或 1119-3 菌株悬液。其中，石炭酸生理盐水含 0.85% (w/v) NaCl 和 0.5% (v/v) 苯酚，注意不能使用甲醛。抗原可以浓缩状态运输，前提是包装瓶上需标明应使用的稀释液。抗原悬液中可加入**终浓度为 5 mM 的 EDTA**，以减少假阳性结果。且抗原悬液的 pH 值必须调整为 7.2 $\pm$ 0.2。

OIEISS 含 1000 个凝集单位 (IU)。制备抗原**无须考虑细菌浓度**，但其敏感性需根据 OIEISS 进行校准，**以保证最终血清稀释度为 1/600~1/1000 时产生 50%凝集，而 1/500~1/750 时产生 75%凝集**。此外，还可用已知血清盘来比较新制备的抗原和以前已经校准的抗原活性。

SAT 试验可在玻璃试管或 96 孔板上进行。将抗原和血清稀释液混合， $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  孵育 16~24 小时。如试验在微量反应板上进行，孵育时间可缩短为 6 小时。每个血清样本应至少准备三个稀释度，以防前带假阴性反应。确定可疑血清的稀释度时，必须使中间管（或微量反应板上中间孔）的读数达到阳性限定值。

结果判读：血清中布鲁氏菌的凝集程度必须用 IU/ml 表示，**30 IU/ml 或以上的血清判定为阳性**。

## 2.8 基于天然半抗原和胞质蛋白的试验（仅用于反刍动物）

天然半抗原试验<sup>6</sup>在检测用 S19 疫苗株免疫的牛上有很高的特异性，它和 RBT 试验曾一起成功应用于布鲁氏菌病的筛查。在反向放射免疫扩散系统 (RID) 内，血清扩散入含多聚糖的高渗凝胶中，可获得最佳敏感性（接近 CFT，但明显低于 RBT 和基于 S-LPS 的 I-ELISA），也可使用双向凝胶扩散的方法 (Muñoz 等, 2005)。用标准剂量 S19 皮下接种 3~5 月龄小牛，免疫两个月后为阴性反应；用减少剂量的 S19 皮下接种成年牛，免疫 4~5 个月后不会发生阳性反应，除非动物被感染并将疫苗菌排入奶中。在天然半抗原试验中，结膜免疫（小牛和成年牛）达到阴性反应的时间明显缩短。无论是实验室还是自然感染的牛，均显示 RID 试验阳性结果与排菌相关 (Jones 等, 1980)。至于**小肠结肠炎耶尔森菌 O:9 引起的 FPSR 以及原因不明的 FPSR，使用天然半抗原或胞质蛋白的凝胶沉淀试验，通常也可得出阴性结果** (Munoz 等, 2005)。

天然半抗原凝胶试验在山羊和绵羊检测上也较为重要，可特异性地区分自然感染动物（阳性）和 Rev.1 疫苗免疫动物（免疫后一段时间内通常是阴性）。检测山羊和绵羊血清时，双向凝胶扩散试验或 RID 试验可获得最佳诊断敏感性（约 90%）。

## 2.9 全乳试验

筛查奶牛群的一个有效方法是从**混装容器**中取乳检查。如检出阳性，所有供奶的牛都应采血检测。全乳 I-ELISA 是一种敏感性和特异性都很好的方法，尤其在对大型牛场进行检测时具有很好的应用价值。当 I-ELISA 试验不便开展时，可进行全乳环状试验 (MRT)，但此试验**不适用于低龄反刍动物**。

### 2.9.1 全乳 I-ELISA（仅用于牛、绵羊和山羊）

与血清 I-ELISA 相似，全乳 I-ELISA 试验有很多种方法。此外，广泛的田间试验已验证了多种商业化 I-ELISA 试剂盒，这些试剂盒目前被广泛应用。为便于国际统一，国家参考实验室应采用三种 OIE ELISA 标准血清，对某一特定的试验方法进行标定。

#### 2.9.1.1 全乳 I-ELISA 的标定

I-ELISA 标准化方法：取 OIE ELISA 强阳性标准血清，先用阴性血清按 1/125 稀释，再用阴性奶按 1/10 稀释，检测结果应仍为阳性 (EU, 2008)。

检测散装奶的稀释度通常远低于血清，一般用稀释液按 1/2~1/10 稀释，其余检测步骤与血清 ELISA 试验相似。

<sup>6</sup>详细程序可从阿拉贡政府农业食品研究与技术中心布鲁氏菌病实验室获得，地址：Avenida Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain。

与血清学检测相比，全乳 I-ELISA 发生 FPSR 的可能性较低。

I-ELISA 检测绵羊和山羊的全乳和检测牛的全乳基本相同，但应采用合适的验证方法（见第 1.1.6 章）设置 cut-off 值。然而，目前并没有建议用 ISaBmS 对全乳 I-ELISA 检测进行国际标准化。

## 2.9.2 全乳环状试验（仅用于牛）

MRT 可用来筛查泌乳期牛群的布鲁氏菌病。

检测大型牛群（超过 100 头泌乳牛）时，本试验的敏感性会降低。可调整 MRT 试验样本量，以弥补因稀释大型牛群混装奶而带来的影响。样本调整方法如下：牛群规模 < 150 头时，用 1mL 奶；150~450 头，用 2mL 奶样；451~700 头，用 3mL 奶样。

以下情况可导致假阳性反应：供奶的牛免疫接种后不足 4 个月；奶样中含有异常成分（如初乳）或供奶的牛患乳房炎。在小型农场，上述问题会对试验结果造成较大的影响，因此不建议采用 MRT 方法。

### 2.9.2.1 抗原制备

MRT 抗原是由浓缩的灭活牛种布鲁氏菌 S99 或 S1119-3 菌悬液制备而成，菌液培养如前所述。菌液  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  23000g 离心 10min，将沉淀用苏木精染色液重悬。苏木精染色液配制，目前有多种可行方法，例如：取 100mL 4% (w/v) 苏木精 (C1No. 75290) 溶液（用 95% 酒精配制），加入到 100mL 5% 硫酸铝铵（蒸馏水配制）和 48mL 甘油溶液中，加入 2mL 现配的 10% (w/v) 碘化钠溶液，室温 ( $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ) 静置 30min，将这一深紫色的溶液加到 940mL 用蒸馏水配制的 10% (w/v) 硫酸铝铵水溶液中，将混合物的 pH 值调至  $3.1 \pm 0.2$ ，在室温下避光储存 45~90 天。

使用前，摇匀染色液，并使用脱脂棉纱过滤，以 1g 压积菌体加 30mL 染色液的比例，混悬菌体，室温 ( $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ ) 放置 48 小时（但一些实验室选择  $80^{\circ}\text{C}$  加热 10min）。通过离心，沉淀着色菌体，洗涤液洗 3 次（洗涤液含 6.4g NaCl、1.5mL 85% 乳酸和 4.4mL 10% NaOH，溶于 1.6L 蒸馏水中，最终 pH  $3.0 \pm 0.2$ ）。按 1g 菌体加 27mL 缓冲液的比例，重悬菌体，缓冲液为 0.5% 石炭酸生理盐水，用 0.1M 柠檬酸（约 2.5mL）和 0.5M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ （约 1mL），将 pH 调至  $4.0 \pm 0.2$ ， $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  下放置 24 小时。将混合物经脱脂棉纱过滤，测定其 pH 值，确定菌体压积 (PCV)，并配成约 4% 悬液。

### 2.9.2.2 抗原的标定

抗原需用 OIEISS 进行标定，以保证其稀释度为 1/500 时呈阳性反应，而稀释度是 1:1000 时呈阴性反应。应确定新配制抗原的敏感性：将阳性血清用牛奶稀释成不同反应强度的样本盘，利用此样本盘，与以前已标定的抗原进行比较。

抗原贮存应依照厂家说明书，通常置  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  保存。

抗原的 pH 值应为  $3.5 (\pm 0.2)$ ，颜色应为深蓝色，离心样本上清液中允许有少量染色剂。用布鲁氏菌阴性动物全乳稀释抗原时，乳层必须颜色均一，无沉淀，乳脂层应无色。

### 2.9.2.3 试验步骤

本试验用于检测混装容器内的奶样。在必要的情况下，样本在使用前可加防腐剂（0.1% 福尔马林或 0.02% 溴硝丙二醇）处理，并于  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  放置 2~3 天。

- i) 从冰箱中取出适量抗原，将奶样和抗原置于室温 ( $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ )。
- ii) 轻摇抗原瓶，直至摇匀。
- iii) 取 30~50 $\mu\text{L}$  抗原，加到 1~2mL 全乳中（来自大型牛群的混装乳样可适量增加检测体积）。
- iv) 试管中的乳样高度必须至少为 25mm。不得冷冻、加热或剧烈振荡乳样。乳样储存不得超过 72 小时。

- v) 全乳和抗原混合物在  $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  作用 1 小时或  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  过夜孵育，后者可增加试验敏感性，结果判读更容易，同时设置阳性和阴性对照。
- vi) 乳柱上部形成一个深蓝色环，判为强阳性。乳清和乳脂层界面出现蓝色层，应视作阳性，特别是对于大型畜群，这一结果具有很大意义。
- vii) 如下层乳清的颜色超出乳脂层的颜色，则判为阴性。
- viii) 为检测大型畜群样本（2 或 3mL 奶样）而调整 MRT 时，可将 0.1mL 混合阴性奶油加到试管中，再加入 30~50 $\mu\text{L}$  乳环试验抗原，混合后孵育，其结果判读与以上 MRT 试验相同。混合阴性奶油可用 25 头或更多布鲁氏菌阴性牛的牛乳制备，牛乳不得进行巴氏灭菌。

## 2.10 野生动物的血清学检测

野生动物血清学调查的目的通常是进行筛查。在这些特殊情况下，检测方法的特异性尤为重要。RBT 可作为诊断所有野生动物的通用方法，也可采用 CFT，但是补体灭活温度的选择和临界（cut-off）滴度对于不同种类的野生动物并不明确。这两项检测需使用高质量的血清样本，但这在野生动物研究中较难获得。如使用质量较差的血清进行 RBT 和 CFT 检测，结果通常无法判读。与 RBT 和 CFT 相比，I-ELISA 和 C-ELISA 用于野生动物的血清学检测更为可靠，且这两种方法使用质量较差或溶血的血清也可以获得较好的结果 (Stack 等, 1999)。ELISA 检测的另一个优点是，如果没有血清样本，可用肉浆样本替代。但需要注意的是，I-ELISA 实验中使用的酶标抗体必须与野生动物的抗体具有很好的亲和力。然而，因缺乏验证，野生动物的 ELISA 检测结果可能会有异常情况。在可行的情况下，应通过恰当的验证方法，设置特定动物的 ELISA 临界值（见第 1.1.6 章）。当发现血清学结果为阳性或可疑时，应尽可能通过细菌学检测来进行确诊。

## 3. 细胞免疫学试验

### 3.1 布鲁氏菌素皮肤试验

布鲁氏菌素皮肤试验为一种备选的免疫学试验方法，可用于未免疫牛群的筛查，前提是采用**提纯（无 S-LPS）的标准抗原制品**。布鲁氏菌素皮肤试验具有很高的特异性，血清学阴性的非免疫动物如布鲁氏菌素皮试阳性，则可认为是感染动物 (Pouillot 等, 1997)。布鲁氏菌素皮肤测试对幼龄反刍动物感染羊种布鲁氏菌也有很高的敏感性，在未接种疫苗动物的诊断上被认为是最特异的诊断方法之一。

**布鲁氏菌素**试验是针对反刍动物检测开发的，但对于猪群感染确诊同样有效。田间实验显示，其对布鲁氏菌感染的猪具有很好的敏感性 (Dieste-Pérez 等, 2014)。另外，该试验**有助于排除因感染其他细菌产生交叉反应而造成的假阳性反应 (FPSR)**，因为 FPSR 动物用皮肤试验可得出阴性结果 (Dieste-Pérez 等, 2014; Pouillot 等, 1997)。初步研究表明，布鲁氏菌素可用于骆驼的确证诊断试验 (Khalafalla 等, 2020)。

用羊种布鲁氏菌 Rev.1、牛种布鲁氏菌 S19 或 RB51 疫苗株接种动物，**接种数年后皮肤试验仍为阳性** (Pouillot 等, 1997; De Massis 等, 2005)。因此，在布鲁氏菌疫苗免疫地区，不建议将该方法作为唯一诊断方法或用于国际贸易。此外，并不是所有感染动物均能呈阳性反应，因此不建议用于个体诊断或用于国际贸易。但是该方法在群体水平具有高度的特异性和足够的敏感性，推荐用于无布鲁氏菌感染地区畜群监测。

虽然布鲁氏菌素皮肤试验是诊断未免疫动物布病特异性最高的一种方法，但最终诊断不应仅依据畜群中少数动物的阳性反应，应有补体结合试验结果作为支持。至少在一些动物中，

因细胞免疫反应，皮内注射布鲁氏菌素可诱导一过性过敏反应 (Blasco 等, 1994b)。因此，**建议在检测同一动物时，两次检测之间应间隔 6 周。**

### 3.1.1 试验步骤

#### 3.1.1.1 牛的布鲁氏菌感染

- i) 取 0.1mL 布鲁氏菌素 (2000 单位/毫升)，在牛尾褶、肋腹部或颈侧部皮内注射。
- ii) 48~72 小时后读取试验结果。
- iii) 注射前，用游标卡尺测量注射部位的皮肤厚度，注射后重新测量。
- iv) 通过局部肿胀和硬结很容易辨认出强阳性反应。判读可疑反应时要小心谨慎，皮肤增厚 1.5~2mm 应判为阳性。

#### 3.1.1.2 绵羊和山羊的布鲁氏菌感染

- i) 取 0.1mL 布鲁氏菌素 (2000 单位/毫升)，在下眼睑皮内注射。
- ii) 48 小时后读取试验结果。
- iii) 任何可见或可触知的反应，如水肿反应导致皮肤肿胀或眼睑增厚 ( $\geq 2$  毫米)，应判为阳性。

#### 3.1.1.3 猪的布鲁氏菌感染

用于猪的诊断时，取 0.1mL 布鲁氏菌素悬液 (2000 单位/毫升)，在耳根或靠近尾巴根部皮内注射，以在靠近尾巴根部皮内注射为最佳，更实用且危险性较低。接种 48 小时后进行观察，阳性反应的特点是，接种部位出现红斑水肿及非色素沉着，有时还可能出现出血或坏死。

### 3.2 $\gamma$ -干扰素释放试验

$\gamma$ -干扰素释放试验 (IGRA) 使用**布鲁氏菌素**等合适的抗原刺激全血中的淋巴细胞，由此产生的  $\gamma$  干扰素可通过捕获 ELISA 试验来检测。该试验可用于区分假阳性反应，但需更具特异性的抗原，且试验步骤尚需标准化，并需在不同动物种类和不同流行病学条件下进行验证。目前尚无完整的验证程序。

## C. 疫苗和诊断用生物制品

### 1. 疫苗

如前所述，布鲁氏菌病是最易通过实验室感染的疫病之一，应严格执行安全措施。实验室操作布鲁氏菌活培养物 (包括疫苗株) 具有危险性，须依据生物风险评估情况在适当的生物安全和防护水平下进行操作 (参见第 1.1.4 节)。S19、RB51 和 Rev.1 疫苗株均对人有害，因此应在成品疫苗瓶的标签上标注警告标识。发生意外接种或暴露时，应寻求医疗救助 (见 C.1.2.3.2.3 预防措施一节) (Ashford 等, 2004; Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 1986; USDA, 2003)。

#### 1.1 背景

##### 1.1.1 牛种布鲁氏菌 S19 株疫苗

预防牛布鲁氏菌病使用最广泛的疫苗是牛种布鲁氏菌 S19 株疫苗，它也是参考疫苗，任何其他疫苗必须与之进行比较。该疫苗为活苗，通常用于 3~6 月龄小母牛，一次皮下注射

$5 \times 10^{10} \sim 8 \times 10^{10}$  个活菌。接种成年牛可将菌量减至  $3 \times 10^8 \sim 3 \times 10^9$ ，但一些牛会持续产生抗体，发生流产或从奶中排出疫苗菌。此外，可通过结膜途径给任何年龄段的牛接种一个或两个  $5 \times 10^9$  CFU 剂量的疫苗活菌，产生针对牛种布鲁氏菌 (Nicoletti 等, 1978) 和羊种布鲁氏菌 (Jiménez de Bagües 等, 1991) 保护力，而无持续性抗体反应，同时可减少流产和奶中排菌。

布鲁氏菌疫苗 S19 株保护效果良好，可抵抗牛种布鲁氏菌和羊种布鲁氏菌强毒菌株的中度攻击。疫苗生产必须使用来源于 USDA 的菌种（地址见脚注 5），并对每批疫苗进行纯粹检验（无外源微生物）、活菌计数（单位剂量活菌数）和变异检查（确定没有变异）。用于 S19 株疫苗生产的种子批必须定期用小鼠检查残余毒力和免疫原性。

本疫苗的控制程序见下文 C1.2.2.3 的过程控制。

### 1.1.2 牛种布鲁氏菌 RB51 株疫苗

自 1996 年起，牛种布鲁氏菌 RB51 疫苗成为一些国家预防牛布鲁氏菌病的官方疫苗。然而，相对于牛种布鲁氏菌 S19 株疫苗产生的保护力，RB51 株的保护效果仍存在争议 (Moriyon 等, 2004)。每个国家使用的接种方法都不尽相同。在美国（引进疫苗株 RB51 前几乎无牛布鲁氏菌病）接种方法为，4~12 月龄小牛经皮下接种  $1 \sim 3.4 \times 10^{10}$  个活菌。接种 12 月龄以上的牛必须获得州或联邦动物卫生官员授权，推荐剂量是  $1 \sim 3 \times 10^9$  个活菌 (USDA, 2003)。在其他国家，则建议对 4~12 月龄小牛使用  $1 \sim 3.4 \times 10^{10}$  剂量进行免疫，12 月龄后再接种同等剂量，以加强免疫，提高其免疫性。

然而，有报告显示，给母牛全剂量静脉注射 RB51 会引起大多数接种牛发生严重的胎盘炎和胎盘感染，且相当数量的母牛还在乳中排菌。田间试验也表明，如接种孕牛，在某些情况下可诱发流产和围产期死亡率增加。鉴于此，建议避免对孕牛接种 RB51。减少 RB51 副作用的一个方法是减少接种剂量。如果将剂量减少至  $1 \times 10^9$  CFU（菌落形成单位），皮下免疫妊娠晚期的奶牛，则不会引起流产或胎盘炎，但相当多的免疫奶牛仍可排菌。这种减少接种剂量的免疫不能保护犊牛免于牛种布鲁氏菌感染，用做成年牛疫苗时，对牛种布鲁氏菌感染的保护也只是中等程度。RB51 抵抗羊种布鲁氏菌感染的作用尚不清楚。

本疫苗的控制程序见下文 1.2.2.3。

### 1.1.3 羊种布鲁氏菌 Rev.1 疫苗株

在小反刍动物布鲁氏病高度流行的国家，从牛体内分离到羊种布鲁氏菌并不少见 (Verger, 1985)。关于 S19 疫苗对羊种布鲁氏菌感染的保护效力过去还存在争议，但现有证据表明，该疫苗能够控制牛的羊种布鲁氏菌感染。有假说认为，在这种情况下，Rev.1 疫苗比 S19 更有效，但支持此假说的信息甚少 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 1986)，且没有试验证明 Rev.1 疫苗可抵抗奶牛的羊种布鲁氏菌感染。此外，这种疫苗对牛的安全性几乎未知。因此，尚需在严格控制的条件下，检验 Rev.1 疫苗对处于不同生理状态的牛的安全性，以及抗羊种布鲁氏菌感染的有效性。在此之前，不建议将 Rev.1 疫苗接种牛。

羊种布鲁氏菌 Rev.1 疫苗是预防绵羊和山羊布鲁氏菌病应用最广泛的疫苗，尽管存在缺点，但仍作为其他疫苗的参考菌株。相比之下，粗糙型 RB51 疫苗不能有效预防绵羊感染羊种布鲁氏菌。Rev.1 疫苗使用冻干的布鲁氏菌 Rev.1 株活菌，用于绵羊和山羊的免疫。应给 3 至 5 月龄羊羔进行单次皮下或结膜接种，5 月龄是最大免疫月龄，是为了最大限度地减弱抗体反应，使疫苗接种与进一步的血清学检测相配套。无论以何种途径接种，标准接种剂量所含活菌必须介于  $0.5 \times 10^9$  和  $2.0 \times 10^9$  之间。减少接种剂量所提供的保护作用低于标准剂量，因此不建议采用。皮下接种疫苗诱导长期的血清学反应，会严重干扰以后的血清学检测，因此不建议在布病根除计划中使用皮下接种疫苗的方法。然而，当该疫苗以标准剂量通过眼结膜免疫时，会产生相似保护作用而不会引起持久的抗体反应，有利于将根除计划与疫苗接种

相结合。使用布鲁氏菌 Rev.1 疫苗必须小心，避免污染环境或引起人的感染。在许多发展中国家和布鲁氏菌病流行地区，全群进行疫苗接种是控制该病的最佳选择 (Blasco, 1997)。但是，在怀孕期间给动物接种全剂量或减剂量 Rev.1 疫苗，经常会导致流产和奶中排菌 (Blasco, 1997)。给处于产羔期、哺乳期或交配前的成年动物通过结膜接种（全剂量）疫苗，这些副作用会大大降低。因此，如大规模疫苗接种是控制该病的唯一手段，建议在动物未怀孕或产羔后期和配种前使用标准剂量的 Rev.1 通过结膜途径进行疫苗接种 (Blasco, 1997)。

给年轻动物和成年动物皮下接种 Rev.1 疫苗，即使减剂量也可能导致大多数疫苗动物长期存在抗体反应，会严重干扰布鲁氏菌病的血清学诊断。如上所述，结膜接种可最大限度地减少这些问题（尤其是在 5 月龄以内接种）。因此，结膜免疫是联合根除计划的首选方法。此外，布鲁氏菌病的血清学诊断应考虑羊群的免疫状况，以及检测到的抗体滴度在羊群中的整体分布。

本疫苗的控制程序见下文 1.2.2.3。

### 1.1.4 猪用疫苗

已就猪布鲁氏菌病疫苗问题开展了大量研发，但尚未发现完全有效的疫苗。中国（中华人民共和国）生产的猪种布鲁氏菌病活疫苗 S2 株是由猪源分离出来的猪种布鲁氏菌生物 1 型强毒株经连续传代生产的，目前已在中国广泛应用（猪及其他品种）。但仍缺乏严格控制条件下抗猪布鲁氏菌感染的效力数据。

牛种布鲁氏菌 RB51 疫苗株已被证实对抵抗猪种布鲁氏菌感染无效 (Stoffregen 等, 2006)。

### 1.1.5 其他动物用疫苗

在野生动物中，特别是牛种布鲁氏菌病疫苗用于美洲野牛 (Bison bison) 和麋鹿 (Cervus canadensis) 以及 Rev.1 疫苗用于阿尔卑斯高山野山羊 (Ponsart 等, 2019)，已经观察到野生和驯养的动物之间免疫效果的差异。相关研究表明，相较于山羊，Rev.1 株用于野山羊会持续产生更持久，更高水平的载菌量。鉴于这种差异，很难根据在驯养动物中的实验数据来评估疫苗在野生动物中的效力。应系统地评估疫苗的注射途径、类型、剂量、攻毒保护。

## 1.2 生产概要和规定

### 1.2.1 菌种特性

#### 1.2.1.1 基础种子的生物学特性

用于生产疫苗的牛种布鲁氏菌 S19 株原始菌种必须从 USDA 获取（地址见脚注<sup>4</sup>）。种子应冻干保存或在液氮中冻存，其特性必须与不依赖 CO<sub>2</sub> 的牛种布鲁氏菌生物 I 型菌株的纯培养物一致，对青霉素 (3 μg, [5 IU]/mL)、硫堇 (2 μg/mL) 和异-赤癣醇 (1 μg/mL) 敏感，且对豚鼠显示出最小的致病力。

牛种布鲁氏菌 RB51 疫苗株的原始菌种通过商业化购买，也可从美国农业部获得（地址见脚注）。其具有牛种布鲁氏菌生物 I 型的一般特性，但应 100% 为粗糙型，且能在含利福平 (250 μg/mL) 的培养基中生长。

用于制备疫苗的羊种布鲁氏菌 Rev.1 株原始菌种可从市场购得。可从法国 OIE 布鲁氏菌病参考实验室（地址见脚注<sup>5</sup>）获得具有原始种子特性的欧洲版 Rev.1 参考株。Rev.1 株必须具有羊种布鲁氏菌生物 1 型参考株的特性，但生长较为缓慢。37°C ± 2°C 空气孵育（含 CO<sub>2</sub> 的气体会改变结果），能在含 2.5 μg/mL 链霉素的琼脂培养基上生长，在适宜的培养基中加入苄甲青霉素盐 (3 μg, 5 IU/mL)、硫堇 (2 μg/mL) 或碱性品红 (20 μg/mL) 可抑制其生长。

PCR 和分子技术已被用于进一步鉴定 S19、RB51 和 Rev.1 疫苗（参见 B.1.4 节）。

生产 S19 和 Rev.1 疫苗时，特别要求用来生产疫苗的种子批自原始种子培养开始传代不

超过三次，且由种子批或原始菌种至收获疫苗不能超过三代。使用前需检查原始菌种是否有变异。准备种子培养物参见由 Alton 等推荐的方法（1988）。

#### 1.2.1.2 质量标准

应检查牛种布鲁氏菌 S19 和 RB51 以及羊种布鲁氏菌 Rev.1 基础种子的纯净性和特异性，并在适当情况下检查是否为光滑型或粗糙型。S19 和 Rev.1 种子批次必须符合原始种子对小鼠的残留毒力和免疫原性等特征。

##### 1.2.1.2.1 纯净性

纯净性和无外源微生物污染的检测参见第 1.1.9 章《兽医用生物材料无菌和无污染检验》。

##### 1.2.1.2.2 安全性

S19 和 Rev.1 疫苗是毒力降低的菌株，但为保证效力需保留一定低的毒力（参见 C1.2.1.2.3 效力）。然而，日常并不进行安全性检验，仅当启用新的生产方法或疫苗安全性可能会发生改变时，可用牛或羊进行安全性检验。操作步骤如下：选 12 只 4~6 月龄雌性犊牛或绵羊/山羊分成 2 组，每组 6 只，分别注射接种 1 倍和 3 倍推荐剂量，两组动物隔离饲养，观察 21 天，不应发生明显的局部或全身反应。对于已确定的剂量和接种途径，如疫苗批次的安全性检验获得较好的结果，则无需对用同一原始菌种以相同工艺生产的其他批次疫苗进行重复检验。S19 或 Rev.1 疫苗的安全性也可用豚鼠进行检验。取几组豚鼠，每组至少 10 只，肌肉注射用 PBS (pH 7.2±0.2) 稀释的菌苗，每头份含  $5 \times 10^9$  活菌。接种豚鼠不应出现明显的不良反应，且无死亡。

如对代表性种子或疫苗的进行了这种安全性检验，且结果良好，则无须重复检验由同一种子批按相同工艺生产的其他批次疫苗。

如需对 RB51 进行安全性检验，可用 8 至 10 周龄的雌性 Balb/c 小鼠，腹腔注射  $1 \times 10^8$  活菌，并在接种后 6 周取脾脏进行培养。脾脏应无 RB51 菌，小鼠不应产生抗 OPS 抗体。

##### 1.2.1.2.3 效力

###### i) S19 疫苗

S19 疫苗如具有 S19 原始菌株的特性，即具有均一性、光滑型特征，则此疫苗为有效。此外，应采用特定的种子批生产，并具有足够的免疫原性和适当的残留毒力（Grilló 等，2000）。

###### a) 特性

牛种布鲁氏菌疫苗菌株可通过适当的形态学、血清学、生化试验及培养特性进行鉴定：牛种布鲁氏菌 S19 具有牛种布鲁氏菌 1 型菌株的共有特性，但生长不需要 CO<sub>2</sub>，不能在含有青霉素（3 μg/mL = 5IU/mL）、硫蛋白蓝（2 μg/mL）和异赤藓糖醇（1mg/mL）（均为最终浓度）的培养基上生长。可用 PCR 和分子技术进一步鉴定 S19 疫苗株（详见 B.1.4 节）

###### b) 光滑型（变异检查）

将 S19 疫苗用纯水重悬，画线接种于 6 个血清-葡萄糖琼脂或胰蛋白酶大豆琼脂平板上（添加 5% 血清或 0.1% 酵母提取物），使菌落在某些区域密集，而在其他区域不密集或呈分散状。与分散的菌落相比，紧邻菌落的外观差别更容易观察。平板置 37°C±2°C 培养 5 天，在结晶紫（White & Wilson's 染色法）染色（用三块板）之前和之后，用倾斜反射光进行镜检（Henry 氏法）。

染色前菌落形态：S 型菌落呈圆形，带闪光，呈蓝色或蓝绿色。R 型菌落表面呈干燥颗粒状，为暗黄白色。黏液样菌落（M 型）为透明的灰白色，用接种环触碰时，有一定的黏性度，与 S 和 R 型菌落容易区分。最难区分的是介于 S 型与 R 型之间的中间型菌落（I），呈轻微浑浊，比 S 型菌落更显颗粒状。

结晶紫染色后菌落形态：S 型菌落不着色。变异菌落（I、M 或 R）能染成不同

程度的红色及紫红色，表面可呈现放射状裂纹。有时，染色的菌膜会从菌落上滑落，并在附近可见。

通过吡啶黄凝集试验，可确定菌落形态 (Alton 等, 1988)。S 型菌落仍呈悬浮状，R 型菌落立即凝集，M 型菌落形成丝状，而 I 型菌落可呈悬浮状或出现细微凝集。

种子批至少 99% 的细菌应为光滑型。

c) 残留毒力 (半数动物带菌时间或半数动物痊愈时间) (Grilló 等, 2000; Pouillot 等, 2004)

1) 制备适量的 S19 待检种子批混悬液和 S19 原始种子培养物 (作为参考菌株)，操作如下：菌株培养 24 ~ 48 小时后，收获菌体并悬于无菌盐水缓冲液 (BSS: NaCl 8.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.0g, 溶于 1000 mL 纯水, pH 6.8±0.2)，然后用 BSS 将悬液浓度调为  $10^9$  CFU/mL (分光光度计 600nm 测量时的 OD 值为 0.170)。随后经 10 倍梯度稀释，将不同梯度稀释液涂布在适当的培养基上 (建议使用血琼脂平板或 TSA)，来准确测定悬液含菌量。

2) 取 32 只 5 ~ 6 周龄雌性 CD1 小鼠，皮下注射 0.1mL ( $10^8$  CFU/只) 活菌悬液。同时，用含 S19 参考菌株的菌悬液平行接种另外 32 只小鼠。在免疫原性和/或残余毒力方面，S19 原始种子株已显示出令人满意的结果，该种子可从 USDA 获得 (地址见脚注 4)。

3) 分别于接种后 3、6、9 和 12 周，每组随机选取 8 只小鼠断颈处死。

4) 逐个取出脾脏，加 1mL 无菌 BBS，用玻璃研磨器逐个无菌匀浆 (或装入合适的无菌袋，用拍打器处理)。

5) 把全部脾悬液涂布于若干含适宜培养基的平皿中，在适合布鲁氏菌生长的条件下，培养 5 ~ 7 天 (检出最低限：每个脾脏分离出 1 个细菌)。从脾上分离到至少一个细菌就说明动物已感染。

6) 依照专门为计算  $RT_{50}$ <sup>7</sup>而开发的统计学方法，计算半数动物带菌时间或半数动物痊愈时间 ( $RT_{50}$ )。为此，可采用 Reed 和 Muench 的方法 (Grilló 等, 2000)，根据每次扑杀 (每次 8 只) 时痊愈小鼠 (脾脏无菌) 的数目，计算随时间累计的小鼠痊愈率。此百分率的分布曲线为 S 形曲线，通过统计软件包中的 PROBIT 程序处理，对其进行线性化后计算  $RT_{50}$  值。

7) 使用专门设计的软件，将 S19 参考疫苗株和被检菌株所得的分布曲线 (截距和斜率) 进行统计学对比。如两个  $RT_{50}$  值都来自曲线的平行部分，则二者具有统计学可比性。如不存在平行关系，说明被检菌株的残余毒力不足，不能用于疫苗生产。

8) 如确定存在平行性，则利用软件，对 S19 参考疫苗株和被检菌株的  $RT_{50}$  值进行统计学比较。如二者无显著差异 ( $RT_{50}$  值的置信限为  $7.0 \pm 1.3$  周)，则被检菌株可用于疫苗生产。

已有文献详细介绍了上述残余毒力统计学计算方法 (Grilló 等, 2000)。上述步骤 6 至 8 中的统计学计算可利用易于使用的 HTMLJAVA 免费程序 (Rev2)，从法国 OIE 参考实验室获得 (地址见脚注 5) (Pouillot 等, 2004)。

如对种子或待检疫苗的代表批次进行了此项试验，且结果良好，则无须重复检验由同一批种子按相同工艺生产的其他批次疫苗。

d) 小鼠免疫原性 (Grilló 等, 2000)

<sup>7</sup>软件的详细信息可从位于法国的 OIE 布鲁氏菌病参考实验室获取。

随机选择 5~7 周龄雌性 CD1 小鼠，分为 3 组，每组 6 只。

- 1) 如上所述，准备疫苗悬液，并用分光光度计测量后调整浓度。
- 2) 第一组的 6 只小鼠皮下注射含  $10^5$  CFU 的被检疫苗菌悬液 (0.1 mL/只)。
- 3) 第二组的 6 只小鼠皮下注射含  $10^5$  CFU 的 S19 参考菌株悬液。第三组作为非免疫对照组，皮下接种 0.1mL BSS。
- 4) 随后应准确测定菌悬液的 CFU 数值。为此，可 10 倍系列稀释悬液，涂布于适宜的培养平板 (建议使用血琼脂平板或 TSA)。
- 5) 免疫后 30 天 (并在禁食后 16 小时)，攻毒所有小鼠，腹内注射含  $2 \times 10^5$  CFU (0.1mL/只) 的牛种布鲁氏菌 544 株 ( $\text{CO}_2$  依赖型)，该菌株的制备、浓度调整和相关检查如上所述。
- 6) 15 天后断颈处死小鼠。
- 7) 无菌取脾，去除脂肪，称重，匀浆。
- 8) 也可冷冻脾脏， $-16^\circ\text{C}$  以下保存 24 小时至 7 周。
- 9) 每个脾脏加 9 倍无菌 BBS (pH  $6.8 \pm 0.2$ )，用玻璃研磨器逐个无菌匀浆 (或装入合适的无菌袋，用拍打器处理)，用同一稀释液进行 3 个连续梯度稀释 (1/10、1/100、1/1000)。每份悬液取 0.2mL，均匀涂布在 4 个琼脂平板上，其中 2 个在 10%  $\text{CO}_2$  下培养 (疫苗株和攻毒株均可生长)，另外 2 个空气中培养 (抑制  $\text{CO}_2$  依赖型牛种布鲁氏菌 544 株的生长)， $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  培养 5 天。
- 10) 选择少于 300 CFU (牛种布鲁氏菌 544 株) 的平板进行菌落计数。稀释度为 1/10 时，如平板上无任何菌落，可认定脾脏感染了 5 个细菌。每个脾脏的布鲁氏菌数最初记为 X，换算后用 Y 表达，换算公式为： $Y = \log(X/\log X)$ 。计算每组 6 只小鼠反应的平均值及标准差。即为该疫苗的反应值。
- 11) 对照试验成立的条件为：i) 未免疫鼠的反应值 (Y 的平均值) 至少为 4.5；ii) S19 参考疫苗免疫小鼠的反应值小于 2.5；iii) 每组 6 只小鼠计算出的标准差小于 0.8。
- 12) 用统计学方法，比较被检 S19 疫苗免疫组、参考疫苗免疫组和未免疫对照组小鼠的免疫原性值 (建议使用最小显著差异 LSD 检验)。如被检疫苗的免疫原性值明显低于未免疫对照组，且与参考疫苗免疫组无显著差异，则疫苗合格 (如需获得该方法的详细信息，参见法国 OIE 参考实验室)。

如对待检疫苗的代表批次进行了此项试验，且结果良好，则无须重复检验由同一种子批按相同工艺生产的其他批次疫苗。

#### ii) RB51 疫苗

RB51 疫苗种子批必须具有 RB51 原始菌株的特征，即在特性、粗糙型和效力方面符合规定。

##### a) 特性

重悬的 RB51 疫苗不应包含外源微生物。疫苗株通过适当的形态学、血清学、生化试验、培养特性进行鉴定：RB51 株具有牛种布鲁氏菌生物 1 型菌株的特性，但 100% 是粗糙型且能在含利福平 ( $250\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的培养基中生长。PCR 和分子生物学被用于进一步研究 RB51 疫苗株的特性 (详见 B1.4 部分)。

##### b) 粗糙型 (变异性测定)

RB51 的检测方法和 S19 疫苗株的一致 (见 C1.2.1.2.3.i S19 疫苗)。RB51 菌落应 100% 为粗糙型，且用 OPS 特异的单抗作斑点印迹分析时，所有菌落都应呈

阴性。

c) 效力

因为 RB51 作为牛用疫苗在美国注册时论证了其使用剂量 (CFU) 与保护力的关系, 所以通常不对各批次 RB51 疫苗进行体内效力试验。在美国, 已批准采用活菌计数方法进行疫苗效力测定, 与 S19 疫苗的效检方法一致 (USDA, 2003 年)。关于布鲁氏菌粗糙型疫苗详见文献 (Moriyon 等, 2004)。

iii) Rev.1 疫苗

如 Rev.1 菌苗能保持 Rev.1 原始菌株的特性, 即均一性、光滑型方面符合要求, 则此疫苗有效。此外, 应使用具有足够免疫原性和残留毒力并符合规定的种子批进行生产 (Grilló 等, 2000)。

a) 培养特性

羊种布鲁氏菌疫苗菌株可通过适当的形态学、血清学、生化试验、细菌培养特性进行鉴定: 羊种布鲁氏菌 Rev.1 在  $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  条件生长, 不能在苜蓿青霉素盐 ( $3\ \mu\text{g}$ ,  $[5\ \text{IU}]/\text{mL}$ )、硫堇 ( $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或碱性品红 ( $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 培养基上生长, 可在含链霉素 ( $2.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 培养基上生长。PCR 和分子生物学也被用于进一步鉴定 Rev.1 疫苗株 (详见 B1.4 部分)。

b) 光滑型 (变异检查)

必须对 Rev.1 采用与 S19 疫苗株相同的技术程序 (C. 1.2.1.2.3.i)。

有时, 在 Rev.1 菌落大小上可以看到轻微的、难以观察的差异。典型的 Rev.1 菌落较小 ( $1\text{-}1.2\ \text{mm}$  直径), 也会出现大的菌落, 这与不同的培养基、培养箱的残余水分和有无  $\text{CO}_2$  有关。菌落大小变化的频率通常以 1 个大菌落对  $10^3$  个小菌落。所有 Rev.1 均是光滑型菌落。为避免在连续传代过程中增加菌落大小变化, 需始终选择小菌落来准备种子批, 这一点很重要。

种子批中至少 99% 的菌应为光滑型。

c) 残留毒力 (半数动物带菌时间或半数动物痊愈时间) (Grillo 等, 2000)

S19 测定 50% 痊愈时间 ( $\text{RT}_{50}$ ) 计数法 (见上) 同样也适用于 Rev.1 菌株, 不同的是, 接种菌株从 S19 替换为 Rev.1, Rev.1 原始种子作为参考菌株, 而疫苗用于检测。对于原始 Rev.1 参考菌株,  $\text{RT}_{50}$  和置信区间是  $7.9\pm 1.2$  周。给定的 Rev.1 疫苗种子批次应保持相似残留毒力才可以接受。

如对种子或待检疫苗的代表批次进行了此项试验, 且结果良好, 则无须重复检验由同一批种子按相同工艺生产的其他批次疫苗。

d) 小鼠免疫原性

必须对 Rev.1 采用与 S19 疫苗免疫原性计算相同的技术程序 (见上文), 不同的是, 接种的菌株从 S19 替换为 Rev.1, 原始种子作为参考菌株, 而疫苗用于检测。

对照试验成立的条件为: i) 未免疫鼠的反应值 (Y 的平均值) 至少为 4.5; ii) Rev.1 参考疫苗免疫小鼠的反应值小于 2.5; iii) 每组 6 只小鼠计算出的标准差小于 0.8。

如对待检疫苗的代表批次进行了此项试验, 且结果良好, 则无须重复检验由同一种子批按相同工艺生产的其他批次疫苗。

### 1.2.1.3 疫苗验证

许多独立研究已证实, 牛种布鲁氏菌 S19 疫苗株可预防牛布鲁氏菌病, 且目前大多数已根除了布鲁氏菌病的国家, 都曾在牛布鲁氏菌病根除过程中使用了此疫苗 (结合血清学检测和扑杀)。在性未成熟的牛上使用该疫苗时, 效果与弱毒株相同。皮下接种标准剂量疫苗,

仅极少病例出现生殖道局部感染，主要是雄性。因此，不建议公畜接种疫苗。以标准剂量皮下接种成年牛，相当一部分牛出现持续性抗体反应，可持续6个月或更长时间。小牛皮下接种后可能会诱发关节病，尤其是股胫关节。在3~8月龄接种，该疫苗对大多数雌性牛是安全的。也可用于成年母牛，但剂量要小一些，这样做的好处是可减少诊断干扰，且能产生持续的免疫力，但确切的免疫持续时间尚不清楚。S19对预防羊种布鲁氏菌感染的保护期限也未知。该疫苗株稳定，毒力几乎不返强。不慎用于怀孕牛时，可能会出现利用*i*-赤癣醇的变异株。该菌株对小鼠表现为弱毒，可很快从组织中清除。

尽管牛种布鲁氏菌 RB51 疫苗在预防牛布鲁氏菌病感染方面有价值，但实验室攻毒试验和田间研究报告对此仍存在争议（见上文）。该菌株对犊牛为弱毒，但对成年牛却存在安全问题。RB51 株 OPS 表达量极少，对于免疫牛，用标准 RBT 和 CFT 均检测不到阳性血清。此外，也有报告称，RB51 株不诱导针对 OPS 的抗体（用现有方法检测不到抗体）（USDA, 2003）。但由于光滑布鲁氏菌和粗糙布鲁氏菌中都存在共同核心表位，无论使用 S-LPS 还是 OPS 为抗原的 ELISA，不能总是准确区分 RB51 免疫抗体与光滑型布鲁氏菌野毒株感染产生的抗体（Gusi 等, 2019）。RB51 疫苗株对牛种布鲁氏菌感染的保护力存在争议（Moriyón 等, 2004）。据报告，它可抵抗牛种布鲁氏菌强毒株中度程度的攻击，但确切的保护持续期尚不清楚。该菌株对预防羊种布鲁氏菌感染的作用未知。此菌株非常稳定，体内和体外未见突变为光滑型的报告。在多种动物中（包括小鼠），该菌株表现为弱毒株，可迅速从组织中清除。

许多实验均证明，羊种布鲁氏菌 Rev.1 作为疫苗株可有效预防绵羊和山羊感染布鲁氏菌。用怀孕绵羊和山羊传代后，其毒力保持不变。然而，将 Rev.1 疫苗接种怀孕母羊和山羊后，可能会导致流产和奶中排菌。即使减少接种剂量至  $10^6$ ，无论是皮下还是结膜接种，也不能完全避免怀孕动物流产和奶中排菌（Blasco, 1997）。

## 1.2.2 生产方法

### 1.2.2.1 流程

布鲁氏菌活疫苗的制备是基于种子批系统，与 BBAT 和 CFT 抗原制备方法一致（见 B.2.2）。

可按照上述方法生产牛种布鲁氏菌 S19 疫苗，不同之处在于，用 pH6.3±0.2 的 PBS 收集菌体，离心沉淀，或加羧甲基纤维钠盐（终浓度为 1.5g/L）沉淀。收集同一发酵罐中培养的菌体为一组，或收集用同一种子批同时接种 Rowx 瓶培养的细菌为一组，多组菌体可混合在一起，制成一批疫苗。混合前，必须检查每组的纯度、菌体浓度、变异情况和特性。混合后，必须进行相同检查，并进行活菌计数（应为  $8 \sim 24 \times 10^9$  CFU/mL）。以液体形式分装的疫苗通过添加 PBS 或疫苗冻干稳定剂来调节浓度。如用稳定剂，应考虑到冻干时的活力损失，但不应超过 50%。最终冻干产品在干燥过程中不应暴露于超过 35°C 的温度，剩余水分含量应在 1-2%，干燥后，应立即在真空或充氮气条件下密封，5°C±3°C 保存。

牛种布鲁氏菌 RB51 疫苗的生产方法与 S19 株疫苗的生产方法非常相似。

可按照上述方法生产羊种布鲁氏菌 Rev.1 疫苗（Alton 等, 1988），不同之处在于，将菌体收集在冻干稳定剂中，并通过离心收集沉淀。同一发酵罐中培养出的菌体为一组，或收集用同一种子批同时接种 Rowx 瓶培养的细菌为一组，多组菌体可混合在一起，制成一批疫苗。混合前，必须检查每组的纯度、菌体浓度、变异情况和特性。通过添加足够的稳定剂来调节半成品体积，以保证疫苗中含有适当数量的活菌。调整最终浓度后，进行特异性、变异性和纯净性检查（见下文）。

### 1.2.2.2 成分要求

菌株应在合适的培养基上培养。

牛种布鲁氏菌 S19 和羊种布鲁氏菌 Rev.1 的生产，应使用无血清或不合其他动物产品的

培养基，与牛种布鲁氏菌菌株 S99 或 S1119-3 生产条件相似 (Alton 等, 1988)。苯酚生理盐水用冻干稳定剂取代。

布鲁氏菌 RB51 遵循类似的培养方法。

添加了 5%血清或 0.1%酵母提取物的血清-葡萄糖和胰酪大豆琼脂固体培养基适用于 Rev.1 的培养 (Alton 等, 1988)。但 Rev.1 菌株在马铃薯琼脂上生长不好，通常需生长 3-5 天。

对所有疫苗，按下面所述进行质量控制时，不灭活菌体，在  $5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  存储。

制备冻干疫苗，建议使用含 2.5%酪蛋白消化物 (如胰蛋白, Oxoid)、5%蔗糖和 1%谷氨酸钠的稳定剂，纯净水溶解后过滤除菌。

抗菌类防腐剂不能用于 S19、RB51 和 Rev.1 活疫苗株。

### 1.2.2.3 过程控制

收获每组牛种布鲁氏菌 S19、RB51 和羊种布鲁氏菌 Rev.1 菌苗时，都应作纯净性、特异性、光滑型或粗糙型 (如适用) 检查。应检查整批疫苗的菌体浓度，可通过浊度法来测量。必须对最终分装批次疫苗进行活菌计数。进行特性检验时，可用抗布鲁氏菌 A、R 或 M 抗原的抗血清作凝集试验。

冻干后，成品中活菌数量不应少于建议的剂量 (见上)。

S19 和 Rev.1 种子批中至少 99%的细菌、最终批次中至少 95%的细菌为光滑型，而对 RB51，100%细菌应为粗糙型。此外，用 OPS 特异的单抗作斑点印迹分析时，所有菌落都应呈阴性。

对于 S19 和 Rev.1，还应对种子批用小鼠模型确定免疫原性和残留毒力 (半数动物带菌时间或半数动物痊愈时间)。如果在种子批上完成了这些测试且结果良好，则无需对由相同种子菌株采用相同工艺生产的种子批和疫苗批次进行重复试验。

### 1.2.2.4 最终批次检验

对于冻干疫苗，对照菌株和疫苗应采用同样的配制方法 (相同的稀释剂) 进行稀释和检验。

#### 1.2.2.4.1 纯净性

纯净性和无生物材料污染的检验见第 1.1.9 章。

#### 1.2.2.4.2 特异性

参见 C.1.2.1.2.3 效力。

#### 1.2.2.4.3 安全性

参见第 C.1.2.1.2.2 节“安全性”。

#### 1.2.2.4.4 批效力

##### i) 效力

S19 和 Rev.1 疫苗的效力可通过最终冻干产品进行确定。程序如上所述 (特异性、变异性、残留毒力和免疫原性检测，参见 C.1.2.1.2.3 节)。如果对疫苗的批次进行残留毒力和免疫原性检测，且结果良好，则不必对由相同种子批和相同工艺生产的其他疫苗批次进行重复检测。

##### ii) 活菌计数

应检验疫苗批次的活菌数量。S19、Rev.1 和 RB51 疫苗批次可采用相同的检测方法。将疫苗适当稀释，取 0.1mL 稀释液分别接种至五块胰蛋白示血清葡萄糖或其他合适的琼脂培养板，用无菌玻璃、金属丝或塑料棒均匀涂布。计算疫苗单位体积的 CFU。

合适的 CFU 计数如下：

S19:

- a)  $0.5-1 \times 10^{11}$  CFU (标准剂量, 皮下途径)
- b)  $0.5-5 \times 10^9$  CFU (减少剂量, 皮下途径)
- c)  $5 \times 10^9$  CFU (减少剂量, 结膜途径)

Rev.1:

- a)  $0.5-2 \times 10^9$  CFU (标准剂量, 皮下或结膜途径)

RB51:

- a)  $1-3.4 \times 10^{10}$  CFU (标准剂量, 皮下途径)

### 1.2.3 监管机构的批准要求

#### 1.2.3.1 生产工艺

监管机构批准疫苗应向当局提交有关疫苗生产和质量控制测试的所有相关信息 (见上文)。应根据连续三个批次疫苗的相关数据提供这些信息, 批次疫苗产量不少于典型工业批次的 1/3。

#### 1.2.3.2 安全要求

##### 1.2.3.2.1 目标和非目标动物的安全性

有关布鲁氏菌疫苗对于不同动物状况的潜在副作用, 请见 C.1.1.背景。

##### 1.2.3.2.2 毒力返强

只要符合上述过程和批次控制要求, 且无毒力返强趋势, 则可视使用适当来源的种子库制备的布鲁氏菌 S19 和 Rev.1 疫苗为稳定。

经过多次体内或体外传代, RB51 疫苗株没有显示出向光滑型强毒菌株转化的倾向, 这很可能由该菌株突变的性质和位置所致。RB51 株的 *wboA* 基因 (推断为糖基转移酶基因) 存在 IS711 插入元件, 从而阻止了 OPS 合成。但尽管如此, 在胞质内仍会积聚少量 M 样 OPS。

##### 1.2.3.2.3 注意事项

牛种布鲁氏菌 S19 和 RB51 株虽是弱毒株, 但仍能引起人发病, 必须在相应的生物安全条件下操作菌体培养物和悬液 (见第 1.1.4 章)。疫苗复溶及复溶后的处理应格外小心, 防止意外注射或污染皮肤和眼睛。残留的疫苗和注射器材应使用推荐浓度的消毒剂 (酚、碘伏或醛制剂) 进行消毒。万一意外接触, 应咨询医生。抗生素治疗由 S19、RB51 或 Rev.1 引起的人类感染的疗效尚未完全确定。必须强调的是, S19 菌株与其他布鲁氏菌分离株相比没有特殊的抗生素抗性, 但 Rev.1 和 RB51 菌株分别对链霉素和利福平具有抗性。

该疫苗对接种者具有致病性。生产商应提供充分的警告, 自我注射或暴露于疫苗 (包括气溶胶) 时应寻求医疗建议, 并在产品标签和说明书上注明警示, 以使接种者了解可能的任何危险。

##### 1.2.3.3 有效性要求

效力也可在最终批次中确定, 但如已对种子批或待检疫苗进行了安全性和有效性测试, 且结果良好, 则不必对由相同种子批并使用相同生产工艺的其他批次进行常规重复检测。

##### 1.2.3.4 免疫持续期

一般认为用全剂量 S19 疫苗免疫犊牛后, 可产生长期免疫力, 不建议补免。但这方面的证据很少, 在流行地区可能最好在 6 到 12 个月内重新接种疫苗。

无论剂量或接种年龄如何, RB51 疫苗对牛的免疫期都还未知, 建议在流行地区在 6 至 12 个月内重新接种疫苗, 以增强免疫力。

标准剂量 Rev.1 皮下或结膜接种能够在绵羊和山羊体内产生稳固而持久的免疫力。然而, 越来越多的田间证据表明, 免疫力会随着时间的推移而下降, 建议在流行地区在 6 至 12 个月内重新接种疫苗。

### 1.2.3.5 稳定性

只要符合上述过程控制和批次控制的要求，无毒力返强现象，则可视使用适当来源的种子库制备的布鲁氏菌 S19 和 Rev.1 疫苗具有稳定特性。冻干的疫苗活菌数会逐渐降低，但在建议的保质期内应保持其效力。冻干前的活菌数通常远远高于最低要求，以确保冻干后活菌数。疫苗运输期间维持冷链系统可确保其活性。

经过多次体内或体外传代后，RB51 株没有向光滑型强毒菌株转化的倾向，这很有可能归因于该菌株突变的性质和位置。RB51 株的 wboA 基因存在 IS711 插入元件，从而阻止了 OPS 合成。尽管如此，有报告称在胞质内仍会积聚少量 M 样 OPS。

## 2. 生物诊断制剂：布鲁氏菌素

### 2.1 背景

法国国家农业研究所 (INRA) 布鲁氏菌素 (brucellin-INRA) 是一种粗糙型羊种布鲁氏菌 B115 的提取物，不含 LPS，单次接种不产生 BBAT、CFT 或 ELISA 反应性抗体。但粗糙型布鲁氏菌胞质提取物中含有 OPS 糖，反复接种布鲁氏菌素可诱导抗体形成，干扰其他诊断试验。因此，有报告称，已从粗糙型牛种布鲁氏菌突变体中获得了胞质蛋白提取物，该突变体中合成 perosamine (4-Amino-4,6-dideoxymannose, OPS 的组成分子) 的必需基因有缺陷，因而突变体胞质蛋白提取物不能在绵羊中产生 OPS 抗体应答。

### 2.2 生产和规定概要

#### 2.2.1 菌种管理

##### 2.2.1.1 基础种子生物特性及质量标准

生产 INRA 布鲁氏菌素基于与生产抗原和疫苗相同的种子批系统。用于生产布鲁氏菌素的羊种布鲁氏菌 B115 株原始菌种应经繁殖制备种子批，将种子批冻干或冻存于液氮中。其特性应与粗糙型羊种布鲁氏菌纯培养物一致，不得产生光滑型布鲁氏菌 LPS，应产生适量的与光滑型和粗糙型布鲁氏菌抗血清反应的蛋白抗原混合物。

##### 2.2.1.2 质量标准

应检查羊种布鲁氏菌 B115 株种子的纯净性。

纯净性和无外源生物污染检测见第 1.1.9 章。

##### 2.2.1.3 体内诊断制剂的验证

法国的实验室和田间研究证实，INRA 布鲁氏菌素安全、无毒且具有特异性。该制剂含 50~75% 蛋白质 (主要是低分子量蛋白质) 及 15~30% 碳水化合物，不含 S-LPS 抗原，在未致敏动物中不会产生炎症反应，本身不是致敏原。单次接种后，用标准的布鲁氏菌病血清学方法没有检测到抗体反应。90% 以上感染了羊种布鲁氏菌的小反刍动物会在接种后某阶段对 INRA 布鲁氏菌素出现迟发型变态反应。因此，本产品不适用于个体诊断，但可用于畜群筛查。小反刍动物皮内注射 100 $\mu$ g 布鲁氏菌素 48~72 小时后，对致敏动物引起可见的局部迟发型变态反应。免疫及感染动物均可呈阳性反应 (Pouillot 等, 1997)。

#### 2.2.2 生产方法 (Alton 等, 1988)

##### 2.2.2.1 步骤和原料

根据文献 (Alton 等, 1988)，布鲁氏菌素是从羊种布鲁氏菌 B115 株生产的。

##### 2.2.2.2 过程控制

丙酮提取后，对粗提的布鲁氏菌素进行无菌检验，以确保完全灭活布鲁氏菌菌体。操作结束时再进行一次无菌检查，确定无污染杂菌。应检测 pH 值及蛋白浓度，并在最后分装前，对散装产品进行质量检验（见 C2.2.2.3）。

### 2.2.2.3 成品检测

#### i) 无菌检验

对布鲁氏菌素制剂应按第 1.1.9 章所述进行无菌检验。

#### ii) 安全性

异常毒性检验：取 2 只未接触过布鲁氏菌或抗原的正常豚鼠，以相当于 20 只牛（2mL）的剂量腹腔注射，同时取 5 只正常小鼠，皮下注射 0.5mL 布鲁氏菌素（2000 U/mL），观察 7 天，应无局部或全身性反应。

致皮肤坏死检验：取 3 只未接触过布鲁氏菌或其抗原的正常白化豚鼠，腋窝去毛、消毒，皮内注射 0.1mL 待检产品，不应观察到皮肤反应。

无过敏及血清学致敏性检验：皮内注射 3 只正常白化豚鼠，每隔 5 天注射一次，共注射 3 次，每次注射 0.1mL 按 1/10 稀释的待检产品，15 天后，按相同方式对这 3 只豚鼠进行第 4 次注射，同时注射 3 只相同重量且此前未经注射的豚鼠作对照，24 小时后取样，豚鼠血清学反应（RBT、CFT）应为阴性，且不应出现迟发型变态反应。

#### iii) 批次效力

检验布鲁氏菌素的效力：可用 0.5mL 加有弗氏完全佐剂的参考布鲁氏菌素或活布鲁氏菌致敏（如 Rev1 株，前提是该菌株可产生同样水平的致敏性），皮下注射豚鼠致敏。1~6 个月后，皮内注射分级剂量的布鲁氏菌素制品<sup>8</sup>。24 小时读取和测量红斑反应，通过与参考布鲁氏菌素<sup>9</sup>比较，计算滴度。此方法只适用于比较按生产致敏变态反应原程序制备的布鲁氏菌素。已有文献描述布鲁氏菌素过敏原最初标准化程序及其在反刍动物体内的敏感性和滴度（Altonet 等，1988）。

## 2.2.3 监管机构的批准要求

### 2.2.3.1 生产工艺

布鲁氏菌素注册应根据监管部门的要求，向其提交有关产品生产和质量控制测试的所有相关信息（见上文）。应根据连续三个批次疫苗的相关数据提供这些信息，批次疫苗产量不少于典型工业批次的 1/3。

### 2.2.3.2 安全要求

#### i) 目标和非目标动物的安全性

无动物使用布鲁氏菌素出现副作用的报告。

#### ii) 毒力返强

不适用。

#### iii) 注意事项

布鲁氏菌素无毒，但如不慎接触，对过敏个体可引起严重的过敏反应。应小心避免意外注射或粘（黏）膜感染。用过的容器或注射器械应仔细去除污染，或在适宜容器内焚烧处理。

布鲁氏菌应确保对从业人员无潜在危害。生产商应提供充分的警告，自我注射或粘

<sup>8</sup>欧盟参考布鲁氏菌素（2000 单位/毫升）可从位于法国的 OIE 布病参考实验室获取。

<sup>9</sup>统计程序可从位于法国的 OIE 布鲁氏菌病参考实验室获取。

膜暴露时应寻求医疗意见，并在产品标签和说明书上注明警示，以使接种者了解可能的任何危险。

### 2.2.3.3 有效性

应使用最后一批有代表性的产品进行效力试验，具体流程如上所述。

### 2.2.3.4 敏感期

敏感期不确定。每只动物对布鲁氏菌素的过敏反应差异很大。处于早期感染阶段或长期感染的动物，皮内注射布鲁氏菌素，可能无过敏反应。

### 2.2.3.5 稳定性

冻干制剂可在数年内保持全部效力。商业化液体制剂在规定的有效期内应始终保持效力。

## 参考文献

1. ALTON G.G., JONES L.M., ANGUS R.D. & VERGER J.M. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
2. ANGUS R.D. & BARTON C.E. (1984). The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. *Dev. Biol. Stand.*, **56**, 349–356.
3. ASHFORD D.A., DI PIETRA J., LINGAPPA J., WOODS C., NOLL H., NEVILLE B., WEYANT R., BRAGG S.L., SPIEGEL R.A., TAPPERRRO J. & PERKINS B.A. (2004). Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, **22**, 3435–3439.
4. BLASCO J.M. (1997). A review on the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.*, **31**, 275–283.
5. BLASCO J.M., GARIN-BASTUJI B., MARÍN C.M., GERBIER G., FANLO J., JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P. & CAU C. (1994a). Efficacy of different rose bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Rec.*, **134**, 415–420.
6. BLASCO J.M., MARÍN C., JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P. & BARBERÁN M. (1993). Efficacy of *Brucella suis* strain 2 vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, **11**, 1291–1294. doi: 10.1016/0264-410x(93)90097-h. PMID: 8296481
7. BLASCO J.M., MARÍN C.M., JIMÉNEZ DE BAGÜES M.P., BARBERAN M., HERNANDEZ A., MOLINA L., VELASCO J., DIAZ R. & MORIYÓN I. (1994b). Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection of sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1835–1840.
8. BRICKER B.J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet. Microbiol.*, **90**, 435–446.
9. BRICKER B.J. & HALLING S.M. (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2660–2666.
10. DE MASSIS F., ATZENI M., CALISTRI P., DI GIANNATALE E., FERRI N., MARCHI E., MARTUCCIello A. & TITTARELLI M. (2015). A diagnostic protocol to identify water

- 
- buffalo (*Bubalus bubalis*) vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 vaccine. *Vet. Ital.*, 51, 99–105. doi:10.12834/VetIt.472.2296.3
11. DE MASSIS F., GIOVANNINI A., DI EMIDIO B., RONCHI G.F., TITTARELLI M., DI VENTURAM., NANNINI D. & CAPORALE V. (2005) . Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Vet. Ital.*, **41** (4) , 291–299.
  12. DE MIGUEL M.J., MARÍN C.M., MUÑOZ P.M., DIESTE L., GRILLÓ M.J. & BLASCO J.M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.*, 49, 1458–1463.
  13. DIESTE-PÉREZ L., BLASCO J.M., DE MIGUEL M.J., MARÍN C.M., BARBERÁN M., CONDE-ÁLVAREZ R., MORIYÓN I., MUÑOZ P.M. (2014). Performance of skin tests with allergens from *B. melitensis* B115 and rough *B. abortus* mutants for diagnosing swine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, 168, 161–168.
  14. EUROPEAN FOOD SAFETY AGENCY (EFSA) (2009). Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). *EFSA J.*, 1144, 1–112.
  15. EUROPEAN UNION (2008). Commission Decision of 10 December 2008 amending Annex C to Council Directive 64/432/EEC and Decision 2004/226/EC as regards diagnostic tests for bovine brucellosis (notified under document number C(2008) 7642) (Text with EEA relevance) (2008/984/EC). *Official Journal of the European Union*, L 352/38-45.
  16. FOSTER G., OSTERMAN B.S., GODFROID J., JACQUES I. & CLOECKAERT A. (2007) . *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 2688–2693.
  17. GREINER M., VERLOO D. & DE MASSIS F. (2009). Meta-analytical equivalence studies on diagnostic tests for bovine brucellosis allowing assessment of a test against a group of comparative tests. *Prev. Vet. Med.*, 92, 373–381.
  18. GRILLO M.J., BOSSERAY N. & BLASCO J.M. (2000) . In vitro markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev.1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals*, **28**, 119– 127.
  19. GUSI A.M., BERTU W.J., JESÚS DE MIGUEL M., DIESTE-PÉREZ L., SMITS H.L., OCHOLI R.A., BLASCO J.M., MORIYÓN I. & MUÑOZ P.M. (2019). Comparative performance of lateral flow immunochromatography, iELISA and Rose Bengal tests for the diagnosis of cattle, sheep, goat and swine brucellosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 13, e0007509.
  20. HER M., CHO D.H., KANG S.I., CHO Y.S., HWANG I.Y., BAE Y.C., YOON H., HEO Y.R., JUNG S.C. & YOO H. (2010). The development of a selective medium for the *Brucella abortus* strains and its comparison with the currently recommended and used medium *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 67, 15–21.
  21. INTERNATIONAL AIR TRANSPORT ASSOCIATION (IATA) (2021). *Dangerous Goods Regulations Manual* <https://www.iata.org/en/publications/dgr/>

- 
22. JIMENEZ de BAGUES M.P., MARIN C. & BLASCO J.M. (1991). Effect of antibiotic therapy and strain 19 vaccination on the spread of *Brucella melitensis* within an infected dairy herd. *Prev. Vet. Med.*, **11**, 17–24.
  23. JOINT FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON BRUCELLOSIS (1986). Technical Report Series 740, Sixth Report. WHO, Geneva, Switzerland.
  24. JONES L.M., BERMAN D.T., MORENO E., DEYOE B.L., GILSDORF M.J., HUBER J.D. & NICOLETTI P.L. (1980). Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 753–760.
  25. KANG S.I., HER M., KIM J.W., KIM J.Y., KO K.Y., HA Y.M. & JUNG S.C. (2011). Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6726–6728.
  26. KHALAFALLA A.I., RASHID J., KHAN R.A., ALAMIN K.M., BENKHELIL A., DE MASSIS F., CALISTRI P., GIOVANNINI A., KHAN I.A., AL HOSANI M.A. & AL MUHAIRI S.S. (2020). Preliminary Comparative Assessment of Brucellergene Skin Test for Diagnosis of Brucellosis in Dromedary Camels *Camelus dromedarius*. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **20**, 412–417.
  27. LE FLECHE P., JACQUES I., GRAYON M., AL DAHOUK S., BOUCHON P., DENOEUDE F., NÖCKLER K., NEUBAUER H., GUILLOTEAU L.A. & VERGNAUD G. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.*, **6**, 9.
  28. LÓPEZ-GOÑI I., GARCÍA-YOLDI D., MARÍN C.M., DE MIGUEL M.J., MUÑOZ P.M., JACQUES I., GRAYON M., CLOECKAERT A., FERREIRA A.C., CARDOSO R., CORRÊA DE SÁ M.I., WALRAVENS K., ALBERT D. & GARIN-BASTUJI B. (2008). Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species and of the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 3484–3487.
  29. MCGIVEN J., TAYLOR A., DUNCOMBE L., SAYERS R., ALBERT D., BANAI M., BLASCO J.M., ELENA S., FRETIN D., GARIN-BASTUJI B., MELZER F., MUÑOZ P.M., NIELSEN K., NICOLA A., SCACCHIA M., TITTARELLI M., TRAVASSOS DIAS I., WALRAVENS K. & STACK J. (2011). The first International Standard anti-*Brucella melitensis* Serum. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **30**, 809–819.
  30. MACMILLAN A.P. & COCKREM D.S. (1985). Reduction of non-specific reactions to the *Brucella abortus* serum agglutination test by the addition of EDTA. *Res. Vet. Sci.*, **38**, 288–291.
  31. MORENO E., CLOECKAERT A. & MORIYON I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, **90**, 209–227.
  32. MORGAN W.J.B., MACKINNON D.J., LAWSON J.R. & CULLEN G.A. (1969). The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.*, **85**, 636–641.
  33. MORIYON I., GRILLO M.J., MONREAL D., GONZALEZ D., MARIN C.M., LOPEZ-GONI I., MAINAR-JAIME R.C., MORENO E. & BLASCO J.M. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.*, **35**, 1–38.
  34. MUÑOZ P.M., BLASCO J.M., ENGEL B., DE MIGUEL M.J., MARÍN C.M., DIESTE L., MAINAR-JAIME R.C. (2012). Assessment of performance of

- 
- selected serological tests for diagnosing brucellosis in pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 146, 150–158
35. MUNOZ P.M, MARIN C.M, MONREAL D., GONZALES D., GARIN-BASTUJI B., DIAZ R., MAINAR-JAIME R., MORIYON I. & BLASCO J. (2005) . Efficacy of several serological tests and antigens for the diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **12**, 141–151.
36. NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING AND MEDICINE (2020). *Revisiting Brucellosis in the Greater Yellowstone Area*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/24750>.
37. NICOLETTI P. (1990). Vaccination against *Brucella*. *Adv. Biotech. Processes*, 13, 147–168.
38. NICOLETTI P, JONES L M & BERMAN D.T. (1978). Comparison of the subcutaneous and conjunctival route of vaccination with *Brucella abortus* strain 19 vaccine in adult cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173, 1450–1456. .
39. NIELSEN K., GALL D., JOLLEY M., LEISHMAN G., BALSEVICIUS S., SMITH P., NICOLETTI P. & THOMAS F. (1996a) . A homogenous fluorescence polarisation assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J. Immunol. Methods*, **195**, 161–168.
40. NIELSEN K., KELLY L., GALL D., NICOLETTI P. & KELLY W. (1995) . Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **46**, 285–291.
41. OCAMPO-SOSAA.A., AGÜERO-BALBÍN J. & GARCÍA-LOBO J.M. (2005) . Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet. Microbiol.*, **110**, 41–51.
42. OLSEN S.C., GARIN -BASTUJI B., BLASCO J.M., NICOLA A.M., SAMARTINO L. (2012). Swine Brucellosis. In: *Diseases of Swine*, Zimmerman J.J., Karriker A.L., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. eds, 10 th Edition, John Wiley & Sons, USA, 697–708.
43. PONSART C., RIOU M., LOCATELLI Y., JACQUES I., FADEAU A., JAY M., SIMON R., PERROT L., FREDDI L., BRETON S., CHAUMEIL T., BLANC B., ORTIZ K., VION C., RIOULT D., QUÉMÉRÉ E., SARRADIN P., CHOLLET J.Y., GARIN-BASTUJI B. & ROSSI S. (2019). *Brucella melitensis* Rev.1 vaccination generates a higher shedding risk of the vaccine strain in Alpine ibex (*Capra ibex*) compared to the domestic goat (*Capra hircus*). *Vet. Res.*, 50, 100.
44. POUILLOT R., GARIN –B ASTUJI B., GERBIER G., COCHE Y., CAU C., DUFOUR B. & MOUTOU F. (1997). The brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet. Res.*, 28, 365–374.
45. POUILLOT R., GRILLO M.J., ALABART J.L., GARIN-BASTUJI B. & BLASCO J.M. (2004) . Statistical procedures for calculating the residual virulence of *Brucella abortus* strain 19 (S19) and *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccines in mice: theoretical basis and practical applications. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **22** (3) , 1051– 1063.
46. PRAUDA., GIMENEZ O., ZANELLA G., DUFOUR B., POZZI N., ANTRAS V., MEYER L. & GARIN-BASTUJI B. (2012). Estimation of sensitivity and specificity of

- 
- five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. *Prev. Vet. Med.*, 104, 94–100.
47. SCHOLZ H.C., HUBALEK Z., SEDLACEK I., VERGNAUD G., TOMASO H., AL DAHOUK S., MELZER F., KÄMPFER P., NEUBAUER H., CLOECKAERT A., MAQUART M., ZYGMUNT M.S., WHATMORE A.M., FALSEN E., BAHN P., GÖLLNER C., PFEFFER M., HUBER B., BUSSE H-J. & NÖCKLER K. (2008) . *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58** (2) , 375–382.
  48. SCHOLZ H.C., NÖCKLER K., GÖLLNER C., BAHN P., VERGNAUD G., TOMASO H., AL DAHOUK S., KÄMPFER P., CLOECKAERT A., MAQUART M., ZYGMUNT M.S., WHATMORE A.M., PFEFFER M., HUBER B., BUSSE H.J. & DE B.K. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 801–808.
  49. SCHOLZ H.C., REVILLA-FERNÁNDEZ S., DAHOUK S.A., HAMMERL J.A., ZYGMUNT M.S., CLOECKAERT A., KOYLASS M., WHATMORE A.M., BLOM J., VERGNAUD G., WITTE A., AISTLEITNER K. & HOFER E. (2016). *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 2090–2098.
  50. SCHOLZ H.C. & VERGNAUD G. (2013). Molecular characterisation of *Brucella* species. *Rev. Sci. Tech.*, 32, 149–162.
  51. STACK J.A., HARRISON M. & PERRETT L.L (2002). Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 724–728.
  52. STACK J.A., PERRETT L.L., BREW S.D. & MACMILLAN A.P. (1999). C–ELISA for bovine brucellosis suitable for testing poor quality samples. *Vet. Rec.*, 145, 735–736.
  53. STOFFREGEN W.C., OLSEN S.C., BRICKER B.J. (2006). Parenteral vaccination of domestic pigs with *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.*, 67, 1802–1808.
  54. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2003) . Animal and Plant Health Inspection Services (APHIS) :. Availability of an Environmental Assessment for Licensing of *Brucella abortus* Vaccine, Strain RB-51, Live Culture. *Federal Register*, 18 Feb 2003, **68** (32) , 7761.
  55. VERGER J.M. (1985) . *B. melitensis* infection in cattle. In: *Brucella melitensis*, Plommet & Verger, eds. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht-Boston-Lancaster. 197–203.
  56. VERGER J.M., GRAYON M., ZUNDEL E., LECHOPIER P. & OLIVER-BERNARDIN V. (1995). Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev.1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*, 13, 191–196.
  57. WHATMORE A.M. (2009). Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect. Genet. Evol.*, 9, 1168–1184.
  58. WHATMORE A.M. & FOSTER J.T. (2021). Emerging diversity and ongoing expansion of the genus *Brucella*. *Infect. Genet. Evol.*, 16, 104865.

- 
59. WHATMORE A.M. & GOPAUL K.K. (2011). Recent advances in molecular approaches to *Brucella* diagnostics and epidemiology. In: *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, López-Goñi I. & O'Callaghan D., eds, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 57–88.
  60. WHATMORE A.M., DAVISON N., CLOECKAERT A., AL DAHOUK S., ZYGMUNT M.S., BREW S.D., PERETT L.L., KOYLASS M.S., VERGNAUD G., QUANCE C., SCHOLZ H.C., DICK E.J. Jr, HUBBARD G. & SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH N.E. (2014). *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 4120–4128.
  61. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1953). WHO Technical Report Series No. 68. Sixth report of the WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO, Geneva, Switzerland.
  62. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004) . WHO Laboratory Biosafety Manual, Third Edition. WHO, Geneva, Switzerland.
  63. XIE X. (1986). Orally administrable brucellosis vaccine: *Brucella suis* strain 2 vaccine. *Vaccine*, 4, 212–216.
  64. ZHU L., FENG Y., ZHANG G., JIANG H., ZHANG Z., WANG N., DING J. & SUO X. (2016). *Brucella suis* strain 2 vaccine is safe and protective against heterologous *Brucella* spp. infections. *Vaccine*, 34, 395–400. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.116. Epub 2015 Nov 25. PMID: 26626213.

\*

\* \*

说明：这里是 OIE 布鲁氏菌病参考实验室  
(牛种布鲁氏菌、羊种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌)

(请到 OIE 网站查询最新名单：<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>)。

如需获得更多有关牛布鲁氏菌病诊断试验、试剂及疫苗的信息，请联系 OIE 参考实验室。

注：牛布鲁氏菌病章节于 1990 年首次通过，绵羊、山羊和猪的布鲁氏菌病章节于 1991 年首次通过，本章于 2016 年首次通过。2022 年采用最新的更新。