

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.04.12

动物布鲁氏菌病实验室检测技术研究进展

李林姣¹, 彭小薇¹, 刘铭赫¹, 张莹辉¹, 冯宇¹, 徐磊¹, 李俊平^{1*}

(中国兽医药品监察所 国家/OIE/FAO 布鲁氏菌病参考实验室, 北京 102600)

[收稿日期] 2022-09-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 04-0078-10 [中图分类号] S852.61

[摘要] 布鲁氏菌病是由布鲁氏菌引起的人畜共患传染病, 对我国畜牧业生产和公共卫生安全造成严重的威胁。科学准确诊断是布鲁氏菌病防控的重要技术依据, 然而布鲁氏菌病的检测和确诊一直以来都并非易事, 常常需要通过多种检测结果的综合分析, 因此发展敏感性高、特异性好的布鲁氏菌的检测技术十分重要。总结并分析了近年来布鲁氏菌检测技术基础研究和临床应用研究方面的最新进展, 结合国家动物布鲁氏菌病参考实验室工作经验, 对各类检测方法的优缺点和适用范围进行了分析, 旨在为动物布病诊断技术的选择和推广应用提供理论和实践依据, 为动物布鲁氏菌诊断技术的研究提供方向性思考。

[关键词] 布鲁氏菌病; 检测技术; 病原学; 血清学

Advances in Laboratory Testing Techniques for Animal Brucellosis

LI Lin-jiao¹, PENG Xiao-wei¹, LIU Ming-he¹, FENG Yu¹, ZHANG Ying-hui¹, XU Lei¹, LI Jun-ping^{1*}

(National/OIE Reference Laboratory for Brucellosis, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 102600, China)

Corresponding author: LI Jun-ping, E-mail: lijunping03@163.com

Abstract: Brucellosis is a zoonotic infectious disease caused by *Brucella*, which seriously threatens livestock production and public health safety in China. Scientific and accurate diagnosis is an essential technical basis for the prevention and control of brucellosis, however, the detection and confirmation of brucellosis has not been easy and often requires the comprehensive analysis of multiple test results, so it is important to develop detection techniques for *Brucella* with high sensitivity and good specificity. This paper summarizes and analyzes the recent progress in basic and clinical application research of *Brucella* detection techniques, and explores the advantages, disadvantages, and applicability of various detection methods in the light of the work experience of the National Animal Brucellosis Reference Laboratory. It aims to provide a theoretical and practical basis for the selection and promotion of the application of animal brucellosis diagnostic techniques and to provide directional thinking for the research of animal brucellosis diagnostic techniques.

Key words: brucellosis; detection technology; pathogenesis; serology

作者简介: 李林姣, 硕士研究生, 从事重大人畜共患病研究。

通讯作者: 李俊平。E-mail: lijunping03@163.com

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌 (*Brucella*) 引起的人畜共患传染病。自 1886 年英国医生 David Bruce 在患“马耳他热”死亡的士兵脾脏中观察到该病的病原体以来,广泛流行于世界各地。根据布鲁氏菌感染宿主的差异目前至少可将布鲁氏菌分为 9 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*)、沙林鼠布鲁氏菌 (*B. neotomae*)、绵羊种布鲁氏菌 (*B. ovis*)、犬种布鲁氏菌 (*B. canis*)、鲸种布鲁氏菌 (*B. cet*)、田鼠布鲁氏菌 (*B. microti*) 和鳍脚目布鲁氏菌 (*B. pinnipedia*)^[1]。布鲁氏菌的感染宿主十分广泛,从家畜到海洋哺乳动物鲸类都是布鲁氏菌的天然宿主,以猪、牛、羊为主要传染源。动物感染布鲁氏菌后,公畜出现睾丸炎、精囊炎、关节肿大;母畜发生流产,并伴有乳腺炎、子宫炎等症状。人感染布鲁氏菌的事件常有发生,已在 170 多个国家有布鲁氏菌感染人的报道,每年造成全球约 50 万人感染,有些国家每百万人感染病例超过 100 例^[2]。布鲁氏菌感染人后侵害生殖系统,并造成骨关节等损伤,甚至失去劳动力,不及时发现则可能终身带菌。因此,布鲁氏菌病不仅给畜牧业生产造成巨大的损失,还将严重威胁人类公共卫生安全。

准确诊断是布病防控的重要环节,因布鲁氏菌病无特殊的唯一性示病临床症状,所以仅依据临床症状很难与其他病原微生物感染区分。世界动物卫生组织 (World Organisation for Animal Health, WOAH) 推荐了多种布鲁氏菌病诊断的病原学和血清学方法。在 WOAH 推荐方法的基础上,国内外学者不断开发建立新的布病诊断方法,但每种诊断方法均有其优缺点,充分了解布病诊断方法的特点,对合理选择诊断方法和科学分析诊断结果非常重要。本文总结分析国内外动物布病诊断技术研究和应用的最新进展,结合动物布病参考实验室工作基础和经验,以期动物布病诊断技术的选择和推广应用提供理论和实践依据。

1 动物布病病原学诊断研究进展

1.1 病原分离鉴定 病原的分离鉴定是布病病原学诊断中最经典的方法,在患病动物的组织脏器以

及血液骨髓中分离出病原菌被视为诊断的金标准^[3],是布鲁氏菌病确诊的重要依据。布鲁氏菌常用的基础培养基有马铃薯琼脂培养基、血清葡萄糖琼脂培养基 (SDA)、胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA) 等。在基础培养基中加入适当的血清可以促进菌株的生长,如牛种布鲁氏菌 2 型的培养需在培养基中加 2% ~ 5% 的牛或马血清^[4]。若样品有污染可使用选择性培养基,常用的有 Farrel 氏 SDA、改良 Thayer - Martin 培养基等。在培养过程中,不同种布鲁氏菌的培养条件也有所不同,如牛种、绵羊附睾种布鲁氏菌的生长需要 5% ~ 10% 二氧化碳的气体环境^[5]。

布鲁氏菌的分离方法已十分成熟,但对实验人员和环境设施的要求较高,按照我国动物病原生物实验检测相关法律法规,需要在生物安全 3 级实验室进行,同时因布鲁氏菌的生长营养要求高,生长速度缓慢,首次进行分离培养需要 5 - 10 天左右,检测周期较长,不适合一般实验室检测,相关方面未见有突破性进展。

1.2 分子生物学诊断 分子生物学技术现已成为当前布鲁氏菌病检测与诊断的重要手段之一,主要包括聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)、实时定量 PCR (Quantitative Real - time PCR, q - PCR) 和多重 PCR (Multiplex PCR, MPCR) 分子生物学检测技术,其中我国动物布鲁氏菌诊断标准 (GB/T 18646 - 2018) 将布鲁氏菌 Bruce - Ladder 检测方法收录在内。这些技术具有特异、高效、敏感等优点,可根据鉴定的目的,可以选择不同的方法。

1.2.1 PCR 技术 随着分子生物学的发展,PCR 技术在布鲁氏菌病检测过程中逐渐成熟。1990 年,第一次报道利用 PCR 技术检测布鲁氏菌,主要用于检测牛种布鲁氏菌的外膜蛋白^[6]。1994 年 Bricker 和 Halling 由布鲁氏菌 IS711 基因设计引物,通过该基因的多态性进行区分不同种属的布鲁氏菌^[7]。该方法命名为 AMOS - PCR (Abortus Melitensis Ovis Suis - PCR) 方法,成功分离鉴定了牛 (1、2、4 型)、羊 (1、2、3 型)、猪 (1 型) 和绵羊附睾型布鲁氏菌。1994 年, Sangari 等^[8] 发现牛种布

鲁氏菌 S19 ery 位点存在 702 bp 的片段缺失,随后 Bricker 等^[9]在原本的 AMOS - PCR 方法基础上增加了一对特异性引物,可鉴别出疫苗株 S19 和 RB51。

随着 PCR 检测技术的进一步优化,筛选出合适的菌株特异性引物提高了检测的灵敏度。Bricker 等^[10]针对布鲁氏菌 BCSP31 基因和 16S - 23S rRNA 操纵子的种属特异性进行 PCR 分析,确定布鲁氏菌中高度保守的独特遗传位点,用来筛查人类的布鲁氏菌病和食品污染。Baily 等^[11]针对布鲁氏菌 BCSP31 基因序列设计引物,用于区分牛、羊种布鲁氏菌。随后 Da Costa 等^[12]证实了该方法可鉴别所有布鲁氏菌的亚种和生物亚型,其他 98 种

细菌对照组均为阴性,目前该方法已应用于布鲁氏菌属的检测。Lopez - Goni 等^[13]发明了 Bruce - ladder 检测方法,在原本多重 PCR 基础上增加了 8 对布鲁氏菌的特异性引物,该方法是通过区分同种布鲁氏菌出现的不同带型,可以在一个反应鉴定出所有种属的布鲁氏菌,准确性较高且简单快捷,为 WOAHA 推荐的分型方法之一。2011 年, Lopez - Goni 等^[14]设计了四对引物在生物型上对猪种布鲁氏菌进行鉴定,从而发明了 Suis - ladder 法。PCR 技术以其特异性强、灵敏度高、假阳性和假阴性率低、规避实验人员感染布病等优点,成为布病诊断的重要分子生物学技术。

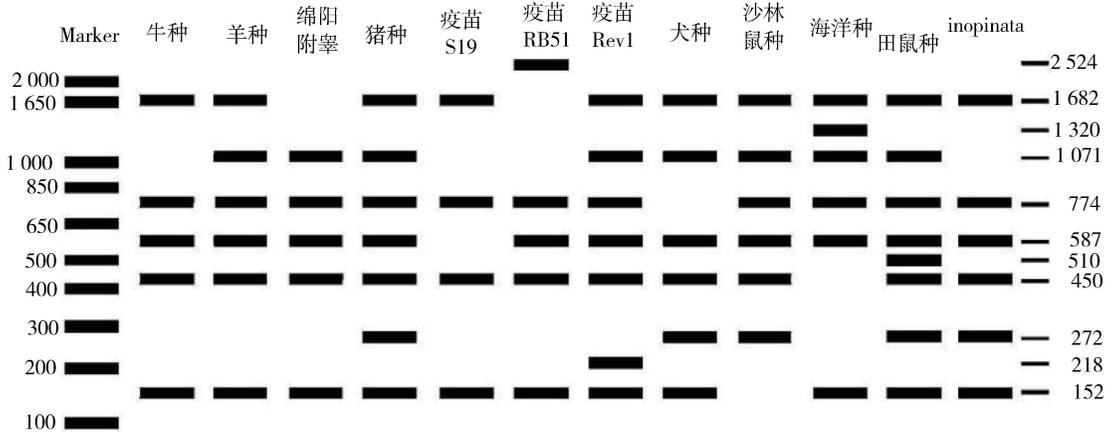


图 1 布鲁氏菌种 PCR 扩增图谱^[14]

Fig 1 PCR amplification profile of *Brucella* species (bp)

1.2.2 荧光定量 PCR 技术 荧光定量 PCR 技术是一种定量检测 DNA 片段的方法与常规 PCR 相比灵敏性和特异性更高,已经在动物疫病的检测中较为广泛的使用。Kattar 等^[15]针对布鲁氏菌 16S - 23S 内转录间隔区 (ITS) 和编码 OMP25 和 OMP31 的基因设计了三种杂交探针检测方法。三种方法可以检测到 28 个布鲁氏菌的临床分离株和 19 种常见革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌病原体的临床分离物,其中 ITS 分析是最灵敏的,每个 PCR 反应的最小值为两个基因组。Himic 等^[16]建立的探针法荧光定量 PCR 方法,可以鉴别牛、羊、猪、犬、绵羊、

沙林鼠种布鲁氏菌,且最小拷贝数为 10。苏娇等^[17]用布鲁氏菌菌属特异性基因 BCSP31 和菌种特异性标志 IS711 插入元件设计引物和 TaqMan 探针建立方法。该方法的核酸检测下限为 2.8 ~ 3.2 fg,可快速、准确地检测猪、羊、牛种布鲁菌。董浩等^[18]对目前研究最多的 per、IS711 和 BCSP31 三种荧光定量 PCR 进行了敏感性、特异性、重复性和临床样品检测效果的比较,发现 IS711 荧光定量 PCR 方法敏感性相较于其他两种更高。中国兽医学会对动物布鲁氏菌实时荧光 PCR 检测的试剂、样品、试验步骤、试验数据处理等制订了标准,当被检样

品的荧光信号 Ct 值 ≤ 38 并出现特定的扩增曲线,可判定为布鲁氏菌核酸阳性^[19]。荧光定量 PCR 方法虽然高效、特异性强,但由于荧光定量 PCR 仪价格昂贵,且需要专门技术人员操作,故该技术主要适用于实验室检测。

1.2.3 微滴式数字 PCR (Droplet Digital PCR, ddPCR) 数字 PCR 技术是一种绝对定量的 PCR 技术,通过将反应体系均匀分布到大量的反应单元中。每个反应单元内都包含一个或多个核酸序列,并独立进行扩增,所以数字 PCR 可以做到对核酸的绝对定量。梅力等^[20]利用布鲁氏菌的保守基因设计引物,建立了可以识别 9 株不同种属的布鲁氏菌的数字 PCR 检测方法。董浩等^[21]对布鲁氏菌数字 PCR 的条件进行了优化,并首次将其应用于较大规模的家畜临床样本。数字 PCR 技术与荧光定量 PCR 相比,敏感性更高,特异性更好,已经在微生物检测、基因突变检测等领域得到了越来越广泛地应用。但是该方法仍存在一定的缺陷,如检测时间较长、通量待进一步提高等。

1.2.4 环介导等温扩增技术 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) 环介导等温扩增技术 (LAMP) 特点是在核酸扩增在恒温 (60 ~ 65 °C) 条件下进行,整体反应与 PCR 相似,且无需专业设备进行检测。其结果判定有肉眼观察法、浊度仪检测、琼脂糖凝胶电泳法、荧光染料法四种,检测成本较低。许邹亮等^[22]针对布鲁氏菌外膜蛋白 OMP25 基因保守区设计引物建立 LAMP 方法,该方法最低检出限约为 17 fg 布鲁氏菌基因组 DNA。谢文萍等^[23]对布鲁氏菌的保守基因 16S rDNA 设计引物建立 LAMP 检测方法,通过浊度仪法、实时荧光法与普通 PCR 法,三种方法对其建立的 LAMP 进行检测,LAMP 检测技术的灵敏度高于普通 PCR 方法。布鲁氏菌 LAMP 检测方法特异性强、灵敏度高且操作简单,适合于基层应用的布鲁氏菌快速检测方法。

2 血清学诊断研究进展

现阶段,简单、方便的血清免疫学方法作为布鲁氏菌病的临床诊断和常规检疫监测的主要方法。

然而布鲁氏菌病作为国家动物疫病强制免疫计划之一,在临床上广泛使用布鲁氏菌弱毒疫苗进行免疫。动物接种弱毒苗后刺激机体产生的抗体与田间野毒株感染产生的抗体无法有效区分,这给布鲁氏菌病的检测带来相当大的困难。所以血清免疫学检测的使用有了一定的局限性,仅适用于没有进行过疫苗免疫的动物或可鉴别诊断的疫苗免疫的动物。

我国现行的动物布鲁氏菌病诊断标准 (GB/T 18646-2018) 规定的布病血清学诊断方法有试管凝集试验 (Serum Agglutination Test, SAT)、补体结合实验 (Complement Fixation Text, CFT)、虎红平板凝集试验 (Rose Bengal Test, RBT)、酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 和全乳环状试验 (Protocol of Milk Ring Test, MRT) 等^[14]。这些方法有的操作简单,易于推广,有的可以实现高通量检测,但存在特异性差异,容易出现假阳性等缺点,临床诊断中很难依据某一种检测结果做出最终判断。除以上常见检测方法外,利用免疫学原理研究出一些新型检测方法,如胶体金免疫层析法 (GoldImmune Chromatographic Assay, GICA)、荧光偏振技术 (Fluorescence Polarization Assay, FPA)。本实验室已成功制备出布鲁氏菌病补体结合抗原、虎红平板凝集试验抗原、全乳环状反应抗原等多种布病血清学诊断用标准品。

2.1 SAT 又称莱特试验,可以分为常量法和微量法,其方法简便,可半定量检布鲁氏菌抗体滴度,因此有很高的诊断价值。1897 年 Wright 和 Smith^[24]首次利用试管凝集的方法检测布鲁氏菌,通过不断的完善试验方法,试管凝集试验已经成为比较准确的血清学定量试验。SAT 主要是检测血清中的 IgG、IgM 和 IgA,将动物的待检血清稀释不同倍数与抗原进行反应,通过观察凝集程度来确定血清的效价。实践证明试管凝集试验作为布鲁氏菌病确诊的经典方法,我国将该方法应用于临床布鲁氏菌病的诊断检测,并将其规定为法定的布鲁氏菌病确诊诊断方法。其操作简单,结果判定简便,能适当地排除一些交叉性反应^[25]。但 SAT 会因为布鲁氏

菌产生变异或抗体过高发生前带现象,使得检测结果呈假阴性,该方法还与结肠耶尔森菌 O9 产生的抗体以及体内某些自身抗体产生假阳性^[26]。此情况下应结合多种诊断方法进一步确诊。WOAH 推荐的血清学方法中,SAT 仅用于牛血清抗体测定。当检测血清中抗体滴度下降,达不到检测浓度时可能会出现漏诊或误诊的情况。

2.2 RBT 20 世纪 70 年代,利用虎红染料对布鲁氏菌菌体染色而研发出 RBT,该试验抗原为灭活的布鲁氏菌,将其用虎红染料染色后与待检血清中的抗体反应而产生凝集现象。RBT 操作方法简单,几分钟内即可读取结果,且试验成本低,适合于群体的大规模普查,同时为我国人间布鲁氏菌病初筛和国际贸易中检测牛、羊、猪布鲁氏菌病的方法。但是该方法敏感性有限,特异性也较差,容易产生假阳性。所以检出的阳性结果需其他特异性检测方法进一步验证^[27]。对于小反刍兽血清样品检测,WOAH 在发布的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》中推荐了一种改良的 RBPT 方法^[28],将 3 倍血清与 1 倍虎红平板凝集抗原进行混合后检测。董浩等^[29]发现改良后的 RBPT 方法敏感性比常规 RBPT 高,可以筛选到感染早期的抗体效价较低的动物。但特异性方面有所降低,必须结合 SAT、cELISA 等特异性高的方法共同确诊。

2.3 CFT CFT 是我国规定的诊断布鲁氏菌病的法定方法之一。现行的国家标准中将 CFT 分为常量法补体结合试验(CFT)和微量法补体结合试验(mCFT),由于布病诊断国标中采用的微量法与常量法对阴阳性结果的判定标准存在较大差异,故通过对反应时间、稀释液、效价测定方法、结果判定等各方面进行改进,改进后的微量法 CFT 与常量法判定标准一致^[30]。CFT 检测有国际标准,方便各国操作,所以受到各国贸易的青睐,其在国际贸易中用于羊、牛、绵羊附睾种的布鲁氏菌的确诊实验。但是豚鼠与猪的补体会出现互相干扰,影响检测结果,所以 CFT 不用于猪布鲁氏菌病的诊断^[31]。因为 CFT 需要通过溶血现象和溶血程度来判定试验结果,实验人员的主观性较强且实验操作复杂,不

适用于大规模的现场检测。

2.4 ELISA ELISA 方法分为间接法(iELISA)和竞争法(cELISA)。大部分 iELISA 抗原采用光滑性脂多糖(S-LPS)或 O-脂多糖(OPS),检测野毒感染的牛、羊和猪抗体具有较高的灵敏度,但不能完全识别疫苗株(S19 和 Rev. 1)的抗体,其中牛种布鲁氏菌疫苗株 RB51 也会干扰基于 S-LPS 的 iELISA 检测^[14]。cELISA 特异性较高,可减少疫苗株抗体产生的干扰,但其灵敏度出现一定程度的下降。

近年来,已出现许多研究将布鲁氏菌毒力蛋白作为包被抗原建立 iELISA 方法,为布鲁氏菌血清学诊断提供了新思路。田路路等^[32]将原核表达及纯化的外膜蛋白 OMP16 作为包被抗原,通过优化条件,建立了敏感性高于虎红平板凝集试验的 iELISA 方法,且在临床样本应用中与 RBT 结果总体符合率达到 93%。杨宁宁等^[33]利用生物信息学对外膜蛋白 OMP19 进行分析,利用原核表达系统成功表达出有较好反应原性的蛋白并建立 iELISA 方法。王海丽等^[34]利用原核表达的外膜蛋白 OMP25 和 OMP31 建立 ELISA 方法,经检验该方法与大肠杆菌、巴氏杆菌和沙门氏菌均无交叉反应,且与 RBT 的符合率为 91.4%。吕素芳等^[35]选择外膜蛋白 bp26 为包被抗原,建立并优化 ELISA 方法,经试验后该方法对耶尔森菌、大肠杆菌、沙门氏菌、巴氏杆菌无交叉反应。但使用 bp26 蛋白为包被抗原的 iELISA 方法与使用 LPS 的经典 ELISA 方法相比,存在两个限制其检测准确性和特异性的因素,即布鲁氏菌的种属特异性和宿主特异性^[36]。张婷婷等^[37]将分泌蛋白 VirB12 作为抗原包被 ELISA 板,优化条件后初步建立了 iELISA 检测方法。临床样品检测结果表明该方法与 SUANOVIR Brucella - Ab C - ELISA 试剂盒的总体符合率达到 90.6%。孙天浩等^[38]利用布鲁氏菌 Dps 蛋白建立的 iELISA 方法检测山羊布鲁氏菌病、山羊口疮病、绵羊肺腺瘤病、山羊梅迪 - 维斯纳病、山羊巴氏杆菌病、山羊支原体性肺炎的阳性血清及山羊布鲁氏菌阴性血清,除布病阳性血清外均为阴性,且与布

鲁氏菌凝集试验的符合率为 91.1%。赵鹭等^[39]对布鲁氏菌脂多糖合成的关键基因 *wzt* 进行原核表达和纯化,作为包被抗原建立 ELISA 方法。该方法小肠耶尔森血清、大肠杆菌血清、布鲁氏菌阴性血清结果均为阴性,无交叉反应,该方法有良好的特异性。但针对布鲁氏菌的外膜蛋白、分泌蛋白等研制的 ELISA 检测方法与 LPS 为包被抗原相比均存在一定的缺陷,如敏感性降低等。

本实验室已开发动物布鲁氏菌 cELISA、iELISA 检测试剂盒、牛布鲁氏菌 iELISA 检测试剂盒等检测制品。酶联免疫吸附试验优势在于简单、便捷、灵敏度高,可以实现高通量检测,适用于大规模筛查检测。但其依然具有一些缺陷,比如存在一定的交叉反应、易出现假阳性、干扰因素较多、难于共同检测多种病原菌等。

2.5 GICA GICA 是将免疫检测、蛋白层析技术和胶体金相结合的免疫分析技术。1971 年, Faulk 和 Taylor 将免疫学和胶体金技术相结合后,免疫胶体金技术在生物医药行业作为检测方法得到大规模的应用。胶体金试纸条具有操作简单,无需专用设备和技术人员操作等优点,是一种比较受欢迎的检测方法,适用于基层进行初步的检测。张秋霞等^[40]对 RBT、试管凝集试验、ELISA 方法和免疫胶体金四种方法进行对比分析,发现免疫胶体金技术的敏感性最高,操作方法最为便捷,且样品间不易造成污染。董浩等^[41]使用胶体金试纸条检测通过试管凝集试验确诊的阳性羊血清样品比 RBT 多检出了 22.86%。在检测山羊血清中,免疫胶体金技术的敏感性高于平板凝集试验。肖妍等^[42]建立了一种用于检测牛奶样品中的布鲁氏菌抗体的免疫层析法,该方法制作的试纸条灵敏度为 98.0%,特异性为 96.0%,各个批间、批内重复性均良好,但出现假阳性结果。因此建立特异性高、灵敏度强、经济实惠的胶体金技术有利于基层兽医对布鲁氏菌病的初步和大批量的筛查。

2.6 MRT MRT 是将布鲁氏菌全乳环状试验抗原和待检的新鲜乳样在 37 ℃ 的水浴条件下共同孵育 1 h,通过乳脂层的环带颜色判定结果^[43]。MRT 主

要应用于牛奶样品中的筛查,该方法操作便捷、能够快速、大批量地检测样品。由于不需要采血,可避免奶牛的应激反应,最小程度的降低对奶牛的刺激。目前 WOA 将其作为牛布鲁氏菌病筛查试验的主要方法,多用于大型奶牛场的现场筛查。臧鹏伟等^[44]认为奶牛布鲁氏菌检测可使用 MRT 法,该方法可广泛用于牛场等基层布病检测,用于替代 RBT 和试管凝集试验。但 MRT 法检测的灵敏度有限,当牛奶样品质量较差时,对检测结果有干扰易出现假阳性^[45]。

2.7 FPA FPA 在 1996 年研发成功^[46],是 WOA 规定的检测牛和猪布鲁氏菌病的方法之一。对于布鲁氏菌病血清学诊断方面,用异硫氰酸荧光素标记的布鲁氏菌脂多糖 O 链 (OPS) 小分子量亚单位作为抗原。如果加入抗原的稀释血清、牛奶或全血中含有 OPS 抗体,则标记的抗原的旋转速度将会减慢,下降的速度与存在的抗体数量成正比。孙翠丽等^[47]将 FITC 标记牛种布鲁氏菌 O 抗原侧链,用于检测牛奶、血液、血清样本中的抗体,该方法的灵敏度为 99.02%,特异性 99.96%,并可区分自然感染和人工免疫的牛。Falzon 等^[48]将接种疫苗的山羊血清用 RBPT、CFT 和 FPA 检测布鲁氏菌抗体,发现 FPA 的检测结果不受疫苗接种的影响,并且还可以根据该地区流行病学情况对临界值进行调整,提高其检测的特异性和灵敏度。目前本实验室已获得布鲁氏菌荧光偏振抗体检测试剂盒的新兽药证书 (新兽药证字 56 号)。该试剂盒可用于检测牛、羊、猪血清中的光滑型布鲁氏菌抗体,是检验免疫效果的重要依据,为布病防控和净化提供了重要技术手段。荧光偏振试验具有快速、准确、高通量检测等优点,可以调整其敏感性和特异性并且不会受到疫苗免疫的影响。

自 1897 年 Wright 和 Smith 发明布鲁氏菌病血清学试验以来^[24],诊断布鲁氏菌病的血清学试验已经有了长足的发展。现代技术的准确性提高了诊断水平,从而更有效地控制了疾病。然而,目前临床检测的方法绝大多数都是针对布鲁氏菌的脂多糖设计,而其疫苗抗原也是其他革兰氏阴性菌的

共同抗原。

目前的血清学检测存在以下问题:(1)血清学检测方法无法区分疾病感染的时期,也无法准确鉴别是野毒株感染还是免疫后产生的抗体;(2)在布鲁氏菌感染的早期难以检测到抗体的存在;(3)布鲁氏菌的脂多糖和大肠杆菌 O157 和耶尔森 O9 的脂多糖存在交叉反应,因此在检测过程中可能出现假阳性的结果。随着我国对布鲁氏菌病的重视程度不断加深,以及畜牧业的不断发展,对布鲁氏菌病检测技术的要求越来越高,更准确高效的血清学检测技术仍在不断的探索中。

3 展 望

虽然现有已建立了多种布鲁氏菌感染的病原学和血清学检测方法,但尚未有一种检测方法可以满足所有的检测情况,仍需多种方法相互结合,对结果进行比较分析,综合共同判断检测结果。

随着国家对布鲁氏菌病防控的重视,对布鲁氏菌病的检测技术的要求越来越高,但仍有几个挑战需要进一步探索。(1)确定特定的血清学诊断标志物。布病检测过程中应用最多的为血清学诊断。其核心为标志物的选择,决定了诊断的特异性和敏感性。现常见的血清学标志物有三类:脂多糖(LPS)、外膜蛋白(OMPs)及其它菌体蛋白。LPS 为布病血清学诊断中最重要的标志物^[49],但仍存在交叉反应的问题。外膜蛋白和其他菌体蛋白则为诊断特异性的重要研究方向。(2)区分野毒株感染和活疫苗免疫后的动物群体。目前我国布病防控仍以活疫苗为主,主要为猪种 S2 株、羊种 M5 株/M5-90 株、牛种 A19 株^[50]。疫苗株均为光滑型,免疫后可持续刺激引起机体产生抗体。但疫苗免疫和野毒株感染产生的均为特异性抗体,目前的血清学方法尚不能区分。(3)确定每个疾病阶段的特异抗原表位预测因子。动物感染布鲁氏菌后多为隐性感染,早期不表现临床症状,进而发展为长期慢性感染^[51]。因此确定疾病阶段的特异性抗原表位预测因子对布病的治疗、控制和净化起到了极大作用。(4)对已有方法进行优化,增强方法的使用的便捷性。(5)提升分子生物学检测结果的灵敏度

和准确性等。这些问题需要随着免疫学、分子生物学等学科的进一步发展,不断创新和优化检测方法,使得布鲁氏菌病检测更加准确、便捷。

参考文献:

- [1] Yoon-Suk Kang, Daniel A Brown, *et al.* *Brucella neotomae* recapitulates attributes of zoonotic human disease in a murine infection model[J]. *Infect Immun*, 2018, 87(1):e00255-18.
- [2] Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, *et al.* The new global map of human brucellosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2006, 6(2): 91-99.
- [3] 世界动物卫生组织 OIE. OIE 陆生动物诊断试验与疫苗手册-哺乳动物、禽类与蜜蜂[M]. 北京:中国农业出版社,2017.
- [4] World organization for animal health. OIE handbook of terrestrial animal diagnostic tests and vaccines - mammals, birds and bees [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017.
- [5] 农业部. 动物布鲁氏菌病诊断技术:GB/T 18646-2018[S]. 北京:中国标准出版社, 2018.
- [6] Kuzdas C D, Morse E V. A selective medium for the isolation of *Brucella* from contaminated materials[J]. *J Bacteriol*, 1953, 66(4): 502-504.
- [7] Fekete A, Bantle J A, Halling S M, *et al.* Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 2010, 69(2): 216-227.
- [8] Bricker B J, Halling S M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32(11):2660-2666.
- [9] Sangari F J, García-Lobo J M, Agüero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, 121: 337-342.
- [10] Bricker B J, Halling S M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(6):1640-1642.
- [11] Bricker B J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis[J]. *Vet Microbiol*, 2002, 90: 435-446.
- [12] Baily G G, Krahn J B, Drasar B S, *et al.* Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification[J]. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 1992, 95(4): 271.
- [13] Costa M D, Guillou J P, Garin-Bastuji B, *et al.* Specificity of

- six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 2010, 81(3): 267–275.
- [13] López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín C M, *et al.* Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(10): 3484–3487.
- [14] López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín C M, *et al.* New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 154(1/2): 152–155.
- [15] Kattar M M, Zalloua P A, Araj G F, *et al.* Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis [J]. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 2007, 59(1): 23–32.
- [16] Hinić V, Brodard I, Thomann A, *et al.* Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems[J]. *J Microbiol Methods*, 2008, 75(2): 375–378.
- [17] 苏娇, 王艳杰, 智达夫, 等. 鉴别牛羊布鲁菌实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. *畜牧与饲料科学*, 2013, 34(005): 7–12.
- Su J, Wang Y J, Zhi D F, *et al.* Establishment of real-time fluorescence quantitative PCR to identify *B. abortus* and *B. melitensis*[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2013, 34(005): 7–12.
- [18] 董浩, 原霖, 赵明海, 等. 3 种检测布鲁氏菌荧光定量 PCR 方法的比较[J]. *安徽农业大学学报*, 2021, 48(6): 947–952.
- Dong H, Yuan L, Zhao M H, *et al.* Comparison of three real time PCR assays for *Brucella*[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2021, 48(6): 947–952.
- [19] 动物布鲁氏菌实时荧光 PCR 检测方法: T/CVMA-20-2020 [S]. 北京: 中国兽医协会, 2020.
- Real-time PCR method for the detection of *Brucella* spp. in animal. T/CVMA-20-2020[S]. Beijing: Chinese Veterinary Medical Association, 2020.
- [20] 梅力, 王英超, 程汝佳, 等. 1 种布鲁氏菌微滴式数字 PCR 检测方法的建立[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(06): 1753–1759.
- Mei L, Wang Y C, Cheng R J, *et al.* A droplet digital PCR method for detection of *Brucella* [J]. *Acta Veterinaria et zootechnica Sinica*, 2021, 52(06): 1753–1759.
- [21] 董浩, 原霖, 刘洋, 等. 布氏杆菌微滴数字 PCR 方法的建立[J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54(2): 97–101.
- Dong H, Yuan L, Liu Y, *et al.* Development of droplet digital PCR for the detection of *Brucella* strains[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 54(2): 97–101.
- [22] 许邵亮, 南文龙, 周洁, 等. 布鲁氏菌环介导等温扩增 (LAMP) 可视化检测方法的建立[J]. *中国动物检疫*, 2011, 28(8): 37–40.
- Xu Z L, Nan W L, Zhou J, *et al.* Visual detection of *Brucella* by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye[J]. *China Animal Health Inspection*, 2011, 28(8): 37–40.
- [23] 谢文萍, 肇慧君, 张琳, 等. LAMP 技术快速诊断布鲁氏菌病的研究[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(3): 186–192.
- Xie W P, Zhao H J, Zhang L, *et al.* Rapid diagnosis of *Brucella* by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(3): 186–192.
- [24] Wright A E, Smith F. On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever [J]. *Lancet*, 1897, 149(3836): 656–659.
- [25] Goonaratna C. *Brucellosis in Humans and Animals*[M]. World health organization, 2009.
- [26] Roushan M R, Amiri M J, Laly A, *et al.* Follow-up standard agglutination and 2-mercaptoethanol tests in 175 clinically cured cases of human brucellosis [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2010, 14(3): 250–253.
- [27] Araj G F. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, 36 Suppl 1: S12–S17.
- [28] World Organization for Animal Health (OIE) *Terrestrial Manual 2022*[M].
- [29] 董浩, 彭小微, 冯宇, 等. 两种虎红平板凝集试验检测羊布鲁氏菌病效果比较[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(11): 87–90.
- Dong H, Peng X W, Feng Y, *et al.* Comparative analysis on two kinds of RBPT methods for sheep Brucellosis[J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(11): 87–90.
- [30] 蒋卉, 冯宇, 秦玉明, 等. 布鲁氏菌病微量补体结合试验的方法改进和应用[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(08): 1676–1684.
- Jiang H, Feng Y, Qin Y M, *et al.* Method improvement and its application of micro complement fixation test for Brucellosis[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(08): 1676–1684.

- [31] Ndengu M, Matope G, Garine - Wichatitsky M D, *et al.* Seroprevalence of brucellosis in cattle and selected wildlife species at selected livestock/wildlife interface areas of the Gonarezhou National Park, Zimbabwe[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2011, 146: 158 - 165.
- [32] 田路路, 李会玲, 支飞杰, 等. 布鲁氏菌 OMP16 抗体的间接 ELISA 方法建立[J]. 动物医学进展, 2021, 42(03): 30 - 35.
- Tian L L, Li H L, Zhi F J, *et al.* Establishment of iELISA for detection of antibody against *Brucella* OMP16 [J] Progress in Veterinary Medicine, 2021, 42(03): 30 - 35.
- [33] 杨宁宁, 王震, 杨亚军, 等. 布鲁氏菌 Omp19 基因的生物信息学分析, 克隆表达和 ELISA 方法的初步建立[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(10): 3078 - 3087.
- Yang N N, Wang Z, Yang Y J, *et al.* Bioinformatics analysis, cloning and expression of Omp19 gene of *Brucella* and preliminary establishment of ELISA method [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(10): 3078 - 3087.
- [34] 王海丽, 董炳梅, 李芬, 等. 布鲁氏菌 OMP25 与 OMP31 蛋白的表达及其间接 ELISA 诊断试剂盒研制[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(05): 404 - 410.
- Wang H L, Dong B M, Li F, *et al.* Expression of OMP25 and OMP31 proteins of *Brucella suis* and development of indirect ELISA antibody detection kit [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(05): 404 - 410.
- [35] 吕素芳, 董炳梅, 郭广君, 等. 基于布鲁氏菌外膜蛋白 OMP28 的 ELISA 检测试剂盒的研制与应用[J]. 中国草食动物科学, 2020, 40(05): 47 - 52.
- Lv S F, Dong B M, Guo G J, *et al.* Development and application of ELISA kit based on outer membrane protein OMP28 of *Brucella suis* [J]. China Herbivore Science, 2020, 40(05): 47 - 52.
- [36] Xin T, Yang H, Wang N, *et al.* Limitations of the BP26 protein - based indirect enzyme - linked immunosorbent assay for diagnosis of Brucellosis [J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(9): 1410 - 1417.
- [37] 张婷婷, 刘梦志, 冯生, 等. 布鲁氏菌 VirB12 蛋白纯化及其抗体 ELISA 方法的初步建立[J]. 沈阳农业大学学报, 2019, 50(2): 154 - 160.
- Zhang T T, Liu M Z, Feng S, *et al.* Purification of VirB12 protein of *Brucella* and preliminary establishment of ELISA for its antibody [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2019, 50(2): 154 - 160.
- [38] 孙天浩, 关飞虎, 张倩, 等. 基于布鲁氏菌 Dps 蛋白间接 ELISA 检测方法的建立与初步应用[J]. 中国兽医科学, 2022, 52(2): 143 - 151.
- Sun T H, Guan F H, Zhang Q, *et al.* Establishment and preliminary application of indirect ELISA detection method based on Dps protein of *Brucella* [J]. Chinese Veterinary Science, 2022, 52(2): 143 - 151.
- [39] 赵鹭, 葛志毅, 刘永生, 等. 羊种布鲁氏菌 wzt 基因的原核表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(12): 3707 - 3714.
- Zhao L, Ge Z Y, Liu Y S, *et al.* Prokaryotic expression of wzt gene in *Brucella melitensis* and the establishment of indirect ELISA [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 46(12): 3707 - 3714.
- [40] 张秋霞, 云秀玲. 布鲁氏菌病几种血清学检测方法的应用分析[J]. 疾病监测与控制, 2017, 11(09): 687 - 688.
- Zhang Q X, Yun X L. The application of brucellosis serological detection methods were analyzed [J]. Diseases Monitor & Control, 2017, 11(09): 687 - 688.
- [41] 董浩, 孙雨, 王晓英, 等. 虎红平板凝集试验和胶体金免疫层析法诊断布鲁氏菌病效果的比较[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(3): 121 - 122.
- Dong Hao, Sun Yu, Wang Xiaoying, *et al.* Comparative analysis of Rose Bengal plate agglutination test and colloidal gold immunochromatography assay in diagnosis of brucellosis [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 48(3): 121 - 122.
- [42] 肖妍, 李蓉蓉, 霍蕾, 等. 一种检测奶样中布鲁氏菌抗体免疫层析方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2019, 36(05): 68 - 73.
- Xiao Y, Li R R, Huo L. Establishment of an immunochromatography for detection of *Brucella* antibodies in milk samples [J]. China Animal Health Inspection, 2019, 36(05): 68 - 73.
- [43] 赵智香, 康京丽, 蔡一非, 等. OIE 标准全乳 iELISA 与国标全乳环状试验在奶牛布鲁氏菌病检测中的研究[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(11): 24 - 25.
- Zhao Z X, Kang J L, Cai Y F, *et al.* A Comparison of OIE standard iELISA and the GB Ring Milk Test in the detection of brucellosis in dairy cows [J]. China Animal Health Inspection, 2007, 24(11): 24 - 25.
- [44] 臧鹏伟, 张振岚, 范万东, 等. 全乳环状试验检测奶牛布氏杆菌病的试验探讨[J]. 畜牧与兽医, 2002(06): 28 - 29.
- Zhang P W, Zhang Z L, Fan W D, *et al.* Experimental investigation of the whole milk ring test for detection of brucellosis in dairy cows [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2002, 52(2): 143 - 151.

- 2002(06): 28-29.
- [45] Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, *et al.* The new global map of human brucellosis [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2006, 6(2): 91-99.
- [46] Nielsen K, Gall D, Jolley M, *et al.* A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus* [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1996, 195 (1/2): 161-168.
- [47] 孙翠丽, 程汝佳, 张阁, 等. 布鲁氏菌病荧光偏振抗体检测方法的建立 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44 (12): 2822-2829.
- Sun C L, Cheng R J, Zhang G, *et al.* Development of fluorescence polarization method in Brucellosis antibody detection [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(12): 2822-2829.
- [48] Falzon L C, Traoré S, Kallo V, *et al.* Evaluation of the fluorescence polarization assay as a rapid on-spot test for ruminant brucellosis in Côte d'Ivoire [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, 6: 287.
- [49] Laurent T C, Mertens P, Jean - François Dierick, *et al.* Functional, molecular and structural characterisation of five anti-*Brucella* LPS mAb [J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40 (17): 1237-1247.
- [50] 秦玉明, 冯宇, 蒋卉, 等. 动物布鲁氏菌病活疫苗生产环节生物安全风险分析与对策 [J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55 (06): 67-72.
- Qin Y M, Feng Y, Jiang H, *et al.* Prevention and control of biosafety risk in the production of animal Brucellosis live vaccine [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2021, 55 (06): 67-72.
- [51] 丁家波, 董浩. 动物布鲁氏菌病 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Ding J B, Dong H. *Animal Brucellosis* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020.

(编辑:李文平)