



中华人民共和国国家标准

GB/T 18646—2018
代替 GB/T 18646—2002

动物布鲁氏菌病诊断技术

Diagnostic techniques for animal brucellosis

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

2018-02-06 发布

2018-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18646—2002《动物布鲁氏菌病诊断技术》。本标准与 GB/T 18646—2002 相比，主要技术变化如下：

- 增加了规范性引用文件(见第 2 章)；
- 增加了缩略语(见第 3 章)；
- 增加了临床诊断方法,包括流行特点、临床症状和病理变化(见 4.1、4.2 和 4.3)；
- 增加了试管凝集试验中的微量法(见 4.6.1)；
- 增加了补体结合试验中的微量法,并规定了其稀释液的制备、溶血素效价的测定、补体效价的测定、溶血标准比色的制备方法(见 4.7.1、附录 B、附录 C、附录 D 和附录 E)；
- 增加了间接酶联免疫吸附试验,并规定了酶联免疫吸附试验抗原包被板的制备、酶标抗体的制备、酶联免疫吸附试验用试剂的配制(见 4.8、附录 G、附录 H 和附录 I)；
- 增加了竞争酶联免疫吸附试验,并规定了酶联免疫吸附试验抗原包被板的制备、酶标抗体的制备、酶联免疫吸附试验用试剂的配制(见 4.9、附录 G、附录 H 和附录 I)；
- 增加了病原的涂片染色镜检(见 4.10)；
- 增加了病原的分离培养,规范了培养细菌所用的培养基及病料采集需采集的样本名称(见 4.11、附录 J 和附录 K)；
- 增加了病原的生化特性鉴定方法,并规定了不同生化试验的培养基制备(见 4.12.1~4.12.5、附录 L 和附录 M)；
- 增加了病原的因子血清试验鉴定方法,以表格形式列出单因子血清试验结果(见 4.12.6 和表 4)；
- 增加了病原的噬菌体溶解试验鉴定方法,以表格形式列出各菌种噬菌体溶解试验结果(见 4.12.7 和表 5)；
- 增加了布鲁氏菌种的 PCR 扩增图谱鉴定技术,并规范了其 8 对引物序列,以图谱形式列出布鲁氏菌种 10 个种的扩增条带和 3 个疫苗株的扩增条带(见 4.13、附录 N 和图 1)；
- 增加了警告内容,对于剖检、采样及实验室开展相关病原活动部分及实验室接触有毒物质部分给以警告。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:辽宁省动物疫病预防控制中心(辽宁省动物医学研究院)、中国动物卫生与流行病学中心、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:李璐、赵晓彤、曹东、范伟兴、段亚良、田莉莉、步志高、顾贵波、杨作丰、赵凤菊、谷志大、狄栋栋、闫明媚、张慧、魏澍、郑洪玲、张喜悦、胡森。

引 言

布鲁氏菌病(简称布病)是由布鲁氏菌属细菌感染导致人兽共患的传染病,在全世界范围内严重威胁人类健康并影响畜牧业发展。布鲁氏菌属包括羊种布鲁氏菌(*B.melitensis*)、牛种布鲁氏菌(*B.abortus*)、猪种布鲁氏菌(*B.suis*)、绵羊附睾种布鲁氏菌(*B.ovis*)、犬种布鲁氏菌(*B.canis*)、沙林鼠种布鲁氏菌(*B.neotomae*)、鲸种布鲁氏菌(*B.ceti*)、鳍种布鲁氏菌(*B.pinnipedialis*)和田鼠种布鲁氏菌(*B.microti*)及新报道的*B.inopinata*,其中动物布病主要是由羊种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌和猪种布鲁氏菌感染羊、牛和猪等动物呈急性或慢性经过,是人布病的主要传染来源。其临床主要特征是生殖器官和胎膜发炎,母畜流产、乳腺炎、不育和各种组织(如睾丸、关节)的炎症。世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizootic(法),OIE]将布病列为法定报告的传染病,我国《一、二、三类动物疫病病种名录》规定布病为多种动物共患的二类动物疫病。

本标准参考了OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》,转化了其相关的布病诊断方法并引入到本标准中。本标准修订了原有血清学诊断方法,引入了ELISA诊断方法,建立了我国微量凝集反应,补充了病原学和分子生物学诊断方法,不仅适用于我国布鲁氏菌病诊断需求,也达到了国际诊断水平。

动物布鲁氏菌病诊断技术

1 范围

本标准规定了动物布鲁氏菌病的临床诊断、血清学和病原学诊断的技术方法、操作程序和判定标准。

本标准规定的流行特点、临床症状、病理变化适用于动物布鲁氏菌病的临床诊断。

虎红平板凝集试验和间接酶联免疫吸附试验,适用于动物布鲁氏菌病的初筛试验;

乳牛全乳环状试验,适用于泌乳母牛布鲁氏菌病的初筛试验;

试管凝集试验、补体结合试验和竞争酶联免疫吸附试验适用于牛种、羊种和猪种布鲁氏菌病的血清学确诊;

病原的显微镜检查、分离培养适用于布鲁氏菌病的病原学初步诊断;病原的鉴定和 PCR 试验适用于动物布鲁氏菌病的病原学确诊。

本标准规定的乳牛全乳环状试验,不适用于检测患乳房炎及其他乳房疾病母牛的乳、初乳、脱脂乳和煮沸过的乳,也不适用于腐败、变酸和冻结过的乳。

本标准规定的虎红平板凝集试验、试管凝集试验和补体结合试验,不适用于犬种和绵羊附睾种布鲁氏菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489—2008 实验室生物安全通用要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

OIE 世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizootic(法))

RBT 虎红平板凝集试验(Rose Bengal Test)

MRT 乳牛全乳环状试验(Milk Ring Test)

SAT 试管凝集试验(Serum Agglutination Test)

CFT 补体结合试验(Complement Fixation Test)

iELISA 间接酶联免疫吸附试验(Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

cELISA 竞争酶联免疫吸附试验(Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

PCR 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

DNA 脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

dNTPs 脱氧核苷三磷酸(Deoxy-Ribonucleoside Triphosphate)

TBE 三羟甲基氨基甲烷硼酸乙二胺四乙酸缓冲液(Tris Boric Acid EDTA)

HRP 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase)

4 诊断方法

4.1 流行特点

多种动物对布鲁氏菌易感,羊、牛、猪的易感性最强。母畜比公畜易感,成年畜比幼年畜易感。动物的易感性随着性成熟年龄接近而增高,在母畜中,第一次妊娠母畜发病较多。

患病和带菌动物是主要传染源,尤其是感染的妊娠母畜,在流产或分娩时将大量的布鲁氏菌随着胎儿、胎水和胎衣排出,流产后的阴道分泌物和乳汁中都含有布鲁氏菌。

布鲁氏菌病的传播途径主要是消化道,也可通过皮肤、黏膜、交配等感染,蝉的叮咬可传播本病。

布鲁氏菌病呈现明显的接触传播特征,通过直接接触或间接接触均可造成传播,在牧区或农牧区多发,疾病的发生不具有明显的季节性,在有感染的群体内呈扩散传播特点。一般为散发,羊种布鲁氏菌病可呈地方流行性发生。

4.2 临床症状

潜伏期一般为 14 d~180 d。

显著症状是妊娠母畜发生流产,流产后可能发生胎衣滞留和子宫内膜炎,从阴道流出污秽不洁、恶臭的分泌物。新发病的畜群流产较多;老疫区畜群发生流产的较少,但发生子宫内膜炎、乳房炎、关节炎、局部脓肿、胎衣滞留、久配不孕的较多。公畜往往发生睾丸炎、附睾炎或关节炎。

4.3 病理变化

警示——对本病剖检采样过程当中应当防止病原微生物扩散和感染。

主要病变为妊娠或流产母畜子宫内膜和胎衣的炎性浸润、渗出、出血及坏死,有的可见关节炎。胎儿主要呈败血症病变,浆膜和黏膜有出血点和出血斑,皮下结缔组织发生浆液性、出血性炎症。

组织学检查可见脾、淋巴结、肝、肾等器官形成特征性肉芽肿。

4.4 虎红平板凝集试验(RBT)

4.4.1 器材

微量移液器,灭菌移液器吸头、牙签或混匀棒,计时器,洁净的玻璃板(其上划分成 4 cm² 的方格)。

4.4.2 试剂

商品化的布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原、布鲁氏菌标准阳性血清和布鲁氏菌标准阴性血清。

4.4.3 操作方法

4.4.3.1 按常规方法采集和分离受检血清。

4.4.3.2 将受检血清、布鲁氏菌标准阴、阳性血清和抗原从冰箱取出平衡至室温。

4.4.3.3 涡旋混匀血清和抗原,分别吸取 25 μL 的血清和抗原加于玻璃板 4 cm² 方格内的两侧。

4.4.3.4 用灭菌牙签或混匀棒快速混匀血清和抗原,涂成 2 cm 直径的圆形,混匀后 4 min,在自然光下观察。

4.4.3.5 试验应设标准阴、阳性血清对照。

4.4.4 结果判定

4.4.4.1 在标准阴性血清不出现凝集、标准阳性血清出现凝集时,试验成立,方可对受检血清进行判定。

4.4.4.2 出现肉眼可见凝集现象者判定为阳性(+)，无凝集现象且反应混合液呈均匀粉红色者判定为阴性(-)。

4.5 乳牛全乳环状试验(MRT)

4.5.1 器材

微量移液器,灭菌移液器吸头,内径为1 cm的灭菌试管。

4.5.2 试剂

商品化布鲁氏菌全乳环状试验抗原。

4.5.3 乳样

受检乳样应为新鲜的全乳,或混合奶;采乳样时应将乳牛的乳房用温水洗净、擦干,然后将乳汁(前三把乳不作为检测用)挤入洁净的器皿中;采集的乳样夏季时应于当日内检测。

4.5.4 操作方法

4.5.4.1 将乳样和布鲁氏菌全乳环状试验抗原平衡至室温。

4.5.4.2 取乳样1 000 μ L,加入灭菌凝集试管内。

4.5.4.3 取充分振荡混合均匀的布鲁氏菌全乳环状试验抗原50 μ L,加入乳样中充分混匀。

4.5.4.4 置37 $^{\circ}$ C~38 $^{\circ}$ C水浴中孵育60 min。

4.5.4.5 孵育后取出试管勿使振荡,立即进行判定。

4.5.5 结果判定

结果判定如下:

- a) 强阳性反应(+++),乳柱上层乳脂形成明显红色的环带,乳柱白色,临界分明;
- b) 阳性反应(++),乳脂层的环带呈红色,但不显著,乳柱略带颜色;
- c) 弱阳性反应(+),乳脂层的环带颜色较浅,但比乳柱颜色略深;
- d) 疑似反应(\pm),乳脂层的环带颜色不明显,与乳柱分界不清,乳柱不褪色;
- e) 阴性反应(-),乳柱上层无任何变化,乳柱颜色均匀。

4.6 试管凝集试验(SAT)

4.6.1 微量法

4.6.1.1 器材

96孔U型聚苯乙烯板、微量移液器、灭菌移液器吸头、塑料薄膜、湿盒、振荡器、适宜的稀释用器皿及温箱(37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C)。

4.6.1.2 试剂

商品化试管凝集试验抗原、布鲁氏菌标准阳性血清、布鲁氏菌标准阴性血清、稀释液为含0.5%石炭酸的生理盐水(用于检验牛血清时稀释血清和抗原)或含0.5%石炭酸的10%氯化钠溶液(用于检验羊血清时稀释血清和抗原)。

4.6.1.3 操作方法

4.6.1.3.1 按常规方法采集和分离受检血清。

4.6.1.3.2 受检血清的稀释:

- a) 以羊血清为例,每份血清用4个连续的U型孔;
- b) 在聚苯乙烯反应板的第1孔加184 μL 稀释液;
- c) 第2孔~4孔各加入100 μL 稀释液;
- d) 用微量移液器取受检血清16 μL ;加入第1孔,并混匀;
- e) 从第1孔吸取100 μL 混合液加入第2孔充分混匀,如此倍比稀释至第4孔,从第4孔弃去混合液100 μL ;
- f) 稀释完毕,从第1至第4孔的血清稀释度分别为1:12.5、1:25、1:50和1:100;
- g) 牛血清稀释法与上述基本一致,差异是第1孔加192 μL 稀释液和8 μL 受检血清,其稀释度分别为1:25、1:50、1:100和1:200。

4.6.1.3.3 分别取按说明书要求稀释的抗原100 μL 加入上述各孔稀释好的血清中,并振荡混匀,羊的血清稀释度则依次变为1:25、1:50、1:100和1:200,牛的血清稀释度则依次变为1:50、1:100、1:200和1:400。

4.6.1.3.4 将加完样的聚苯乙烯反应板各孔用塑料薄膜严密封盖后,放湿盒内置温箱($37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)孵育18 h~24 h,取出检查并记录结果。

4.6.1.3.5 每次试验均应设阳性血清对照、阴性血清对照和抗原对照,即:

- a) 阴性血清对照:冻干阴性血清按说明书稀释到规定容量后,对照试验中稀释和加抗原的方法与受检血清相同;
- b) 阳性血清对照:冻干阳性血清按说明书稀释到规定容量后,对照试验中稀释和加抗原的方法与受检血清相同;
- c) 抗原对照:抗原按说明书稀释到规定容量,取100 μL ,再加100 μL 稀释液,观察抗原是否有自凝现象。

4.6.1.4 结果判定及处理

4.6.1.4.1 凝集反应程度

凝集反应程度分为5个等级,分别记为“++++”“+++”“++”“+”“-”,按以下说明判定:

- a) ++++: 菌体完全凝集,1孔~4孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底;
- b) +++: 菌体几乎完全凝集,1孔~3孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底,第4孔孔底呈现白色点状;
- c) ++: 菌体凝集显著,1孔~2孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底,3孔~4孔孔底呈现白色点状;
- d) +: 凝集物有沉淀,第1孔凝集物呈伞状均匀铺于孔底,2孔~4孔孔底呈现白色点状;
- e) -: 无凝集,1孔~4孔孔底均呈现白色点状。

4.6.1.4.2 结果判定

当阳性血清出现完全凝集(++++) ,而阴性血清无凝集(-),抗原对照无自凝(-)现象时,试验成立,按以下对试验结果判定:

- a) 受检血清出现“++”及以上凝集现象时,判定为阳性;
- b) 受检血清出现“+”凝集现象时,判定为可疑;
- c) 受检血清出现“-”时,判定为阴性。

4.6.1.4.3 可疑结果的处理

试验结果可疑牛、羊经30 d后采血重检,如果仍为可疑,该家畜判为阳性。

4.6.2 常量法

4.6.2.1 器材

玻璃试管、试管架、移液器、灭菌移液器吸头及温箱(37℃±1℃)。

4.6.2.2 试剂

商品化布鲁氏菌试管凝集试验抗原、布鲁氏菌标准阳性血清和布鲁氏菌标准阴性血清、稀释液为含0.5%石炭酸的生理盐水和(或)含0.5%石炭酸的10%氯化钠溶液(用于检验羊血清时稀释血清和抗原)。

4.6.2.3 操作方法

4.6.2.3.1 按常规方法采集和分离受检血清。

4.6.2.3.2 受检血清的稀释:

- a) 以羊和猪血清为例,每份血清用4支凝集试管;
- b) 第1管标记检验编码后加920 μL稀释液;
- c) 第2管~4管各加入500 μL稀释液;
- d) 然后取受检血清80 μL,加入第1管内,并混合均匀;
- e) 取500 μL混合液加入第2管并充分混匀,如此倍比稀释至第4管,从第4管弃去混匀液500 μL;
- f) 稀释完毕,从第1至第4管的血清稀释度分别为1:12.5、1:25、1:50和1:100;
- g) 牛、马、鹿、骆驼血清稀释法与上述基本一致,差异是第一管加960 μL稀释液和40 μL受检血清,其稀释度分别为1:25、1:50、1:100和1:200。

4.6.2.3.3 将按说明书要求稀释的抗原液500 μL分别加入已稀释好的各管血清中,并振摇均匀,羊和猪的血清稀释度则依次变为1:25、1:50、1:100和1:200,牛、马和骆驼的血清稀释度则依次变为1:50、1:100、1:200和1:400。

大规模检疫时也可只用2个血清稀释度(加抗原后的终稀释度),即牛、马、鹿、骆驼用1:50和1:100,猪、山羊、绵羊和犬用1:25和1:50。

4.6.2.3.4 每次试验均应设阳性血清、阴性血清和抗原对照,即:

- a) 阴性血清对照:冻干阴性血清按说明书稀释到规定容量后,对照试验中稀释和加抗原的方法与受检血清相同;
- b) 阳性血清对照:冻干阳性血清按说明书稀释到规定容量后,对照试验中稀释和加抗原的方法与受检血清相同;
- c) 抗原对照:按说明书要求稀释抗原液500 μL,再加500 μL稀释液,观察抗原是否有自凝现象。

4.6.2.3.5 将加样后的试管置温箱(37℃±1℃)孵育18 h~24 h,取出检查并记录结果。

4.6.2.4 结果判定及处理

4.6.2.4.1 凝集反应程度

凝集反应程度应根据参照比浊管(制备方法见附录A)来判读,分别记为“++++”“+++”“++”“+”“-”,按以下说明判定:

- a) +++++ 菌体完全凝集,100%下沉,上层液体100%清亮;
- b) ++++ 菌体几乎完全凝集,上层液体75%清亮;
- c) ++ 菌体凝集显著,液体50%清亮;

- d) 十有凝集物沉淀,液体 25%清亮;
- e) 一无凝集物,液体均匀混浊。

4.6.2.4.2 试验成立条件及结果判定

当阳性对照血清出现完全凝集(++++),阴性对照血清无凝集(-),抗原对照无自凝(-)现象时,试验成立,可对结果进行如下判定:

- a) 牛、马、鹿和骆驼 1:100 血清稀释度,猪、山羊、绵羊和犬 1:50 血清稀释度,出现“++”及以上凝集现象时,判定为阳性;
- b) 牛、马、鹿、骆驼 1:50 血清稀释度,猪、山羊、绵羊和犬 1:25 血清稀释度,出现“++”以上凝集现象时,判定为可疑。

4.6.2.4.3 结果处理

试验结果可疑的家畜经 30 d 后采血重检,如果仍为可疑,该牛、羊判为阳性。猪和马经重检仍保持可疑水平,而农场的牲畜没有临床症状和大批阳性患畜出现,该畜判为阴性。

猪血清偶有非特异性反应,应结合流行病学调查判定,必要时配合补体结合试验和鉴别诊断,排除耶森氏菌交叉凝集反应。

4.7 补体结合试验(CFT)

4.7.1 微量法

4.7.1.1 器材

96 孔聚苯乙烯板、微量移液器、灭菌移液器吸头、离心机、稀释用器皿、温控范围为 37 °C~38 °C 和 54 °C~64 °C 水浴锅、计时器。

4.7.1.2 试剂及其制备

4.7.1.2.1 稀释液

巴比妥缓冲液(pH 7.2),配制方法见附录 B。

4.7.1.2.2 受检血清

其采集和处理见附录 B。

4.7.1.2.3 绵羊红细胞悬液

采取成年公绵羊血,按常规方法脱纤、洗涤、离心,用稀释液洗涤至上清无色为止,最后一次以 2 000 r/min 离心沉淀 10 min,取下沉的红细胞沉积物,以稀释液配制成 2.5%红细胞悬液(2.5 mL/100 mL)。

4.7.1.2.4 商品化布鲁氏菌补体结合试验抗原、布鲁氏菌标准阳性血清、布鲁氏菌标准阴性血清

商品化布鲁氏菌补体结合试验抗原在有效期内按说明书稀释,稀释前需震荡混匀。

4.7.1.2.5 商品化溶血素

商品化溶血素在有效期内根据标示效价使用,对每批次溶血素都需要进行效价测定,方法见附录 C。将 100%溶血的最高稀释度所用溶血素作为一个单位溶血素工作效价,试验中用 2 倍溶血素工作效价。

4.7.1.2.6 商品化冻干补体

除使用商品化冻干补体外,也可使用新鲜豚鼠血清作为补体。补体制备及效价测定方法见附录 D。一个单位体积的标准红细胞悬液中 50% 红细胞发生溶解的补体量为一个补体单位,试验中用 6 倍补体工作效价。

4.7.1.3 操作方法

4.7.1.3.1 受检血清的前处理

按常规方法采集、分离和灭能受检血清,见附录 B。

4.7.1.3.2 血清样品稀释

96 孔板第 1、2 排作为血清抗补体对照,血清稀释度为 1/2、1/4;从第 3 排到第 8 排血清样品稀释度分别为 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64,按如下步骤操作:

- a) 第 1 排每孔分别加 50 μL 稀释液,第 2、4、5、6、7、8 排每孔分别加稀释液 25 μL ;
- b) 第 1 排每孔加 50 μL 灭能血清,混匀后吸取 25 μL 加入其后的第 2 排孔,混匀后弃去 25 μL ;
- c) 从第 1 排孔混匀液体中先后各吸取 25 μL 分别加入同列的第 3、4 排孔,混匀;
- d) 从第 4 排起倍比稀释,即从第 4 排孔吸取液体 25 μL 到同列第 5 排孔,混匀,以此类推到第 8 排;
- e) 第 8 排孔吸取 25 μL 液体弃去。

4.7.1.3.3 加抗原

除第 1、2 排外,上述每孔分别加工作量抗原 25 μL 。

4.7.1.3.4 加补体

上述每孔分别加工作量补体 25 μL ,轻轻混匀,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

4.7.1.3.5 制备致敏红细胞

将 2.5% 红细胞及溶血素等体积混匀至室温 20 min。

4.7.1.3.6 复温孵育

将 4.7.1.3.4 中孵育过夜的 96 孔板从冰箱取出置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。

4.7.1.3.7 加致敏红细胞

上述每孔加入 50 μL 致敏红细胞,轻轻混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

4.7.1.3.8 细胞沉降

室温 300 g 离心 5 min~10 min 或者在 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h~3 h 让细胞自然沉降,观察判定。

4.7.1.3.9 设立对照及主试验各要素的添加

每次试验需设阳性血清、阴性血清、抗原、致敏红细胞和补体对照。主试验各要素添加量和顺序如

表 1 所示。

表 1 布鲁氏菌病补体结合试验的主试验

单位为微升

血清	受检血清	受检血清 抗补体对照	阳性血清	阳性血清 抗补体对照	阴性血清	阴性血清 抗补体对照	对照管			
	血清稀释度	1/2~1/64	1/2~1/4	1/2~1/64	1/2~1/4	1/2~1/64	1/2~1/4	抗原	致敏 红细胞	补体
血清加入量	25	25	25	25	25	25	25	0	0	0
稀释液	0	25	0	25	0	25	25	75	50	
抗原	25	0	25	0	25	0	25	0	0	
工作量补体	25	25	25	25	25	25	25	0	25	
轻轻混匀后,置 37℃ 孵育 30 min 或 4℃ 孵育过夜(以 4℃ 孵育过夜为例)										
第二天:制备致敏红细胞,将提前配好的 2.5% 红细胞和溶血素(分别储存在冰箱)等体积混匀,置室温 10 min										
10 min 后,将 96 孔板从 4℃ 冰箱取出,置 37℃ 孵育 10 min(保证致敏红细胞置于室温 20 min)										
致敏红细胞	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
轻轻混匀,37℃ 孵育 30 min										
300 g 室温离心 5 min~10 min 或 4℃ 放置 2 h~3 h 让细胞自然沉降										

4.7.1.4 结果判定

4.7.1.4.1 试验成立条件:阴性血清对照、阴性血清抗补体对照、阳性血清的抗补体对照、抗原对照和补体对照呈完全溶血反应,致敏红细胞对照呈完全抑制溶血。

4.7.1.4.2 上述对照正确无误后即可对受检血清进行判定。受检血清的判定参照溶血标准比色记录结果,溶血标准比色孔的制备方法见附录 E。

4.7.1.4.3 按表 2 判定,溶血抑制程度 ≥ 20 IU/mL 判为阳性。

表 2 微量补体结合试验判定标准

血清稀释度	溶血抑制			
	25%(+)	50%(++)	75%(+++)	100%(++++)
1/2	8.33	10	11.67	13.33
1/4	16.67	20 ^a	23.33	26.67
1/8	33.33	40	46.67	53.33
1/16	66.67	80	93.33	106.67
1/32	133.33	160	187	213.33
1/64	266.67	320	373.33	426.67
1/128	533.33	640	746.67	853.33
1/256	1 066.67	1 280	1 493.33	1 706.67

^a 溶血抑制程度 ≥ 20 IU/mL 判为阳性。

4.7.2 常量法

4.7.2.1 器材

内口径 1 cm 玻璃试管、试管架、移液器、灭菌移液器吸头、适宜的稀释用器皿及温控范围为 37 ℃~38 ℃和 54 ℃~64 ℃水浴锅。

4.7.2.2 试剂及其制备

4.7.2.2.1 稀释液

0.85%生理盐水。

4.7.2.2.2 受检血清

受检血清的采集和处理见附录 B。

4.7.2.2.3 绵羊红细胞悬液

采取成年公绵羊血,按常规方法脱纤、洗涤、离心,用稀释液洗涤至上清无色为止,最后一次以 2 000 r/min 离心沉淀 10 min,取下沉的红细胞沉积物,以稀释液配制成 2.5%红细胞悬液(2.5 mL/100 mL)。

4.7.2.2.4 标准血清

商品化布鲁氏菌标准阳性血清、布鲁氏菌标准阴性血清。

4.7.2.2.5 溶血素

商品化溶血素在有效期内根据标示效价使用,如需进行效价测定见附录 C。

4.7.2.2.6 补体

除使用商品化冻干补体外,也可使用新鲜豚鼠血清作为补体。补体制备方法见附录 D。

4.7.2.2.7 抗原

商品化抗原在有效期内根据标示效价使用,如需进行效价测定见附录 E。

4.7.2.3 操作方法

4.7.2.3.1 按常规方法采集和分离受检血清。

4.7.2.3.2 将 1:10 稀释受检血清灭能(见附录 B)后,分别加入 2 支玻璃试管内,每管 500 μL。

4.7.2.3.3 其中一管加工作量抗原 500 μL,另一管加稀释液 500 μL。

4.7.2.3.4 上述 2 管均加工作量补体,每管 500 μL,振荡混匀。

4.7.2.3.5 置 37 ℃水浴 20 min,取出放于室温环境中。每管各加 2 单位的溶血素 500 μL 和 2.5%红细胞悬液 500 μL。充分振荡混匀。

4.7.2.3.6 再置 37 ℃水浴 20 min,之后取出立即进行第一次判定。

4.7.2.3.7 每次试验应设阳性血清、阴性血清、抗原、溶血素和补体对照。主试验各要素添加量和顺序如表 3。

表3 布鲁氏菌病补体结合试验的主试验

单位为微升

血清	被检血清		对照管						
			阳性血清		阴性血清		抗原	溶血素	补体
血清加入量	500	500	500	500	500	500	0	0	0
稀释液	0	500	0	500	0	500	0	1 500	1 500
抗原	500	0	500	0	500	0	1 000	0	0
工作量补体	500	500	500	500	500	500	500	0	500
37 ℃~38 ℃水浴 20 min									
二单位溶血素	500	500	500	500	500	500	500	500	0
2.5%红细胞	500	500	500	500	500	500	500	500	500
37 ℃~38 ℃水浴 20 min									
判定结果举例	++++	-	++++	-	-	-	-	++++	++++

4.7.2.4 判定

4.7.2.4.1 试验成立条件:第一次判定,不加抗原的阳性血清对照管,不加或加抗原的阴性血清对照管,抗原对照管呈完全溶血反应。初判后静置 12 h 作第二次判定,第二次判定时溶血素对照管,补体对照管应呈完全抑制溶血。

4.7.2.4.2 对照正确无误即可对受检血清进行判定,受检血清加抗原管的判定参照标准比色管记录结果。标准比色管的制备方法见附录 E。

4.7.2.4.3 结果判定:

- a) 0~40%溶血判为阳性反应;
 - b) 50%~90%溶血判为可疑反应;
 - c) 100%溶血判为阴性反应。
- 牛、羊和猪补体结合反应判定标准均相同。

4.8 间接酶联免疫吸附试验(iELISA)

实验室可按下列方法进行实验操作和结果判定,或根据商品化试剂盒进行实验操作和结果判定。

4.8.1 器材

96 微孔聚苯乙烯板,单道移液器,多道移液器,灭菌移液器吸头,酶标仪或分光光度计,具备 414 nm 或 405 nm 波长的滤光片,旋转振荡器,保湿盒,盖板,洗板机等。

4.8.2 试剂

4.8.2.1 牛种布鲁氏菌 S1119-3 株或 S99 株脂多糖抗原,抗原的提取和包被见附录 G。

4.8.2.2 商品化酶标多克隆抗体(兔抗牛或兔抗羊)或酶标单克隆抗体,见附录 H。

4.8.2.3 商品化布鲁氏菌标准阳性血清和标准阴性血清。

4.8.2.4 抗原包被缓冲液:0.05 mol/L 的 pH 9.6 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲体系,配制方法见附录 I 的 I.1。

4.8.2.5 稀释缓冲液(用于稀释酶标抗体和血清):0.01 mol/L 的 pH 7.2 磷酸盐缓冲体系 PBST1,配制方法见 I.2。

- 4.8.2.6 洗涤缓冲液:0.01 mol/L 的 pH 7.2 磷酸盐缓冲体系 PBST2, 配制方法见 I.3。
 4.8.2.7 底物溶液:3%过氧化氢溶液, 配制方法见 I.4。
 4.8.2.8 底物缓冲液:pH4.5 柠檬酸缓冲液, 配制方法见 I.5。
 4.8.2.9 显色液:0.16 mol/L ABTS(2,2-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸))溶液, 配制方法见 I.6。
 4.8.2.10 终止液:0.5 mol/L 叠氮化钠, 配制方法见 I.7。

4.8.3 操作方法

- 4.8.3.1 所有待检血清和对照血清吸取 25 μ L 加至 1 mL 血清稀释液中做 1/40 初始稀释。
 4.8.3.2 取包被酶标板, 每孔加入 80 μ L 稀释液。
 4.8.3.3 在第 1 列~10 列的各孔分别加入 20 μ L 初始稀释的待检血清(终稀释度为 1/200), 在第 11 列的各孔分别加入 20 μ L 初始稀释的阳性对照血清, 在第 12 列的前 7 个孔分别加入 20 μ L 初始稀释的阴性对照血清, 第 12 列的最后 1 孔不加入稀释缓冲液做空白对照(见图 1)。

说明:

B—空白对照孔
 T—待检血清孔

○—阳性对照孔
 ○—阴性对照孔

图 1 酶标板微孔排列示意

- 4.8.3.4 酶标板加盖, 在旋转振荡器上室温孵育 30 min(或 30 $^{\circ}$ C 静置 1 h)。
 4.8.3.5 甩出微孔中的液体, 用洗涤液润洗 5 次, 在吸水纸巾上反复拍打酶标板, 确保酶标板各孔内无残留液体。
 4.8.3.6 每孔加入 100 μ L 用稀释液稀释至工作浓度的酶标抗体结合物溶液, 加盖在旋转振荡器上室温孵育 30 min(或 30 $^{\circ}$ C 静置 1 h)。
 4.8.3.7 按 4.8.3.5 进行洗涤。
 4.8.3.8 每孔加入 100 μ L 配制好的底物显色混合液(混合液配制见 I.6), 在旋转振荡器上室温孵育 10 min~15 min。
 4.8.3.9 每孔加入 100 μ L 终止液。用吸水纸巾吸去酶标板底部的水珠, 在酶标仪 405 nm 测定吸光度(OD)值。

4.8.4 结果判定

4.8.4.1 实验成立的条件:

- a) 空白对照孔的 OD 值和 7 个阴性对照孔的平均 OD 值应 <0.100 , 8 个阳性孔的平均 OD 值应 >0.700 ;
 b) 结合率应 ≥ 10 , 结合率计算按式(1)。

$$\text{结合率} = \frac{8 \text{ 个阳性对照孔的平均 OD 值}}{7 \text{ 个阴性对照孔的平均 OD 值}} \dots\dots\dots (1)$$

4.8.4.2 判定:8个阳性对照孔的平均OD值×10%定为阴阳性的临界值。待检血清的OD值≥临界值判为阳性,待检血清的OD值<临界值判为阴性。

4.9 竞争酶联免疫吸附试验(cELISA)

实验室可按下列方法进行实验操作和结果判定,或根据商品化试剂盒进行实验操作和结果判定。

4.9.1 器材

96微孔聚苯乙烯板,单道移液器,多道移液器,灭菌移液器吸头,酶标仪或分光光度计,具备450 nm波长的滤光片,微量振荡器,旋转振荡器,保湿盒,盖板,洗板机等。

4.9.2 试剂

4.9.2.1 牛种布鲁氏菌 S1119-3 或羊种布鲁氏菌 16 M(M表位)脂多糖抗原,抗原的提取和包被见附录 G。

4.9.2.2 酶标单克隆抗体,见附录 H。

4.9.2.3 商品化布鲁氏菌标准阳性血清和标准阴性血清。

4.9.2.4 稀释缓冲液(用于稀释结合物):0.01 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲体系(PBST1),配制方法见 I.2。

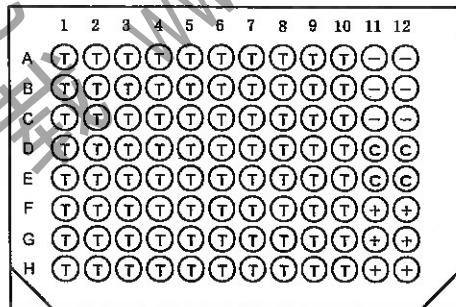
4.9.2.5 洗涤缓冲液:0.01 mol/L 磷酸氢二钠缓冲溶液(PBST2),配制方法见 I.3。

4.9.2.6 底物显色液:邻苯二胺(OPD)与过氧化氢混合溶液,配制方法见 I.8。

4.9.2.7 终止液:0.5 mol/L 柠檬酸溶液,配制方法见 I.9。

4.9.3 操作方法(以检测牛血清为例)

4.9.3.1 取包被酶标板,在1列~10列每孔加入20 μL待检血清,在A11、A12、B11、B12、C11、C12各孔各加入20 μL阴性血清,在F11、F12、G11、G12、H11、H12各孔各加入20 μL阳性血清,在D11、D12、E11、E12各孔不加入稀释缓冲液,留作酶标结合物对照(见图2)。



说明:

C—酶标结合物对照孔;

+—阳性对照孔;

T—待检血清孔;

-—阴性对照孔。

图2 酶标板微孔排列示意

4.9.3.2 酶标板每孔加入稀释至工作浓度的酶标单克隆抗体100 μL。

4.9.3.3 将酶标板放到微量振荡器上振摇2 min,加盖在旋转振荡器(160次/min)室温孵育30 min。当没有旋转振荡器时,则需要手动振摇。先振摇30 s,之后每10 min振摇10 s,时间共持续1 h。手动振摇不应使孔内液体溢出。

4.9.3.4 甩出微孔中的液体,用洗涤液润洗5次,在吸水纸巾上反复拍打酶标板,确保酶标板各孔内无残留液体。

4.9.3.5 每孔加入 100 μL 现配的底物显色液(混合液配制见 I.6),室温孵育 10 min~15 min。

4.9.3.6 每孔加入 100 μL 终止液。用吸水纸巾吸去酶标板底部的水珠,在酶标仪 450 nm 测定吸光度(OD)值。

4.9.4 结果判定

4.9.4.1 实验成立的条件:

- a) 6 个阴性对照孔的平均 OD 值应 >0.700 ,6 个阳性对照孔的平均 OD 值应 <0.100 ,4 个酶标结合物对照孔的 OD 值应 >0.700 。
- b) 结合率应 >10 ,结合率计算按式(2)。

$$\text{结合率} = \frac{6 \text{ 个阴性对照孔的平均 OD 值}}{6 \text{ 个阳性对照孔的平均 OD 值}} \dots\dots\dots (2)$$

4.9.4.2 判定:4 个酶标结合物对照孔的平均 OD 值 $\times 60\%$ 定为阴阳性的临界值。待检血清的 OD 值 \leq 临界值判为阳性,待检血清的 OD 值 $>$ 临界值判为阴性。

警示——以下的病原学操作包括涂片染色镜检、分离培养、细菌鉴定、布鲁氏菌 Bruce-Ladder 检测方法中涉及细菌活菌操作等应在满足 GB 19489—2008 的 BSL-3 级生物安全实验室内进行,检测人员应采取针对性防护措施。

4.10 涂片染色镜检

将组织或生物液体进行涂片,加热或酒精固定后,用改良斐-尼氏(Ziehl-Neelsen)方法染色后镜检,布鲁氏菌菌体染成红色球杆菌或短棒状杆菌,背景为蓝色。革兰氏染色呈阴性,一般不发生两极着染。

4.11 分离培养

4.11.1 细菌分离

对于采集的动物组织及疑似感染病料按以下方法处理并接种于培养基,样品采集符合 GB/T 18088 出入境动物检疫采样。

组织样品,对无菌采集的组织,剔除多余部分(如脂肪)剔除后,取 5 g 组织剪成小块,加入 10 mL 无菌 PBS 缓冲液进行研磨后,取 200 μL 接种于选择培养基表面,培养基见附录 J。

阴道冲洗液、精液、关节液、胃内容物等,取 200 μL 接种于选择培养基表面,培养基见附录 J。

取 15 mL 乳样,2 000 g 离心 15 min,用 10 μL 接种环取奶油层 2 环,接种于选择培养基表面。培养基见附录 J。

每份样品均一式两份,分别置于普通培养箱和 5%~10% CO_2 培养箱中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d~10 d。

4.11.2 菌落观察

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

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

4.12 细菌鉴定

4.12.1 对 CO₂ 需求试验

培养物分离后立即测定,用菌悬液接种 4 支含血清琼脂斜面,2 支置于普通培养箱,2 支置于 5%~10% CO₂ 培养箱,37 ℃ 培养 2 d~3 d,观察比较 4 支斜面生长情况。

4.12.2 H₂S 试验

将 H₂S 试纸条放入接种培养物的斜面培养基管内,夹在管壁和塞子之间,且不和培养基接触。置于 37 ℃ 培养箱培养,若有 H₂S 产生,则试纸条顶端变黑。每天记录结果并更换试纸条,持续 4 d。

4.12.3 氧化酶试验

新鲜配制氧化酶试剂,配制方法见附录 L,取约载玻片大小的滤纸条在该试剂中浸渍后置于平皿中备用。用接种环蘸取一环新鲜培养物,涂压在准备好的滤纸条上,10 s 后观察颜色变化。氧化酶阳性可使涂压培养物处变为黑色。

4.12.4 脲酶试验

用接种环蘸取一环新鲜培养物,涂压在含 2% 尿素的培养基上,培养基配制方法见附录 M,观察颜色变化。室温保存该培养基,24 h,约 5 h 观察一次。分解脲的菌株可使培养基由黄色变为粉红色。

4.12.5 对硫堇、复红染料的敏感性试验

用无菌棉拭子浸蘸菌悬液,在分别含硫堇、复红染料的培养基(染料浓度为 20 μg/mL)上划一横线,置于 37 ℃ 培养箱培养,3 d~4 d 后观察平皿菌落生长情况。每个平皿上的不同菌悬液横线不得交叉、接触。

4.12.6 特异性血清凝集反应试验

光滑型菌应用布鲁氏菌 A 和 M 表面抗原特异单价血清进行凝集反应试验,粗糙型菌应用布鲁氏菌 R 抗原的单价血清进行凝集反应试验。出现明显的凝集反应可确定菌株为相应种、型的布鲁氏菌(表 4)。

表 4 布鲁氏菌生化反应及单因子血清试验

种	生物型	菌落形态	氧化酶	脲酶	对 CO ₂ 需求	H ₂ S 产生	在染料中的生长		单因子血清凝集试验			
							硫堇	复红	A	M	R	
羊种	1	光滑	+	+ ^a	-	-	+	+	-	+	-	
	2								+	-	-	
	3								+	+	-	
牛种	1	光滑	+	+ ^b	+ ^d	+	-	+	+	-	-	
	2				+ ^d	+	-	-	+	-		
	3				+ ^d	+	+	+	+	-		
	4				+ ^d	+	-	+ ^h	-	+		-
	5				-	-	+	+	-	+		
	6				-	-	+	+	+	-		
	9			+/-	+	+	+	-	+			

表 4 (续)

种	生物型	菌落形态	氧化酶	脲酶	对 CO ₂ 需求	H ₂ S 产生	在染料中的生长		单因子血清凝集试验		
							硫堇	复红	A	M	R
猪种	1	光滑	+	+ ^c	—	—	+	— ^e	+	—	—
	2								+	—	—
	3								+	—	—
	4								+	+	—
	5								—	+	—
沙林鼠种		光滑	—	+ ^c	—	+	— ^g	—	+	—	—
绵羊附睾种		粗糙	—	—	+	—	+	— ^f	—	—	+
犬种		粗糙	+	+ ^c	—	—	+	— ^f	—	—	+

^a 中等速度,有些菌株很快。
^b 除参考株 A544 和少数野毒株为阴性外,其余为中等速度。
^c 快速。
^d 在初级分离时通常为阳性。
^e 在南美和东南亚分理处一些对复红有抗性的菌株。
^f 大多数为阴性。
^g 硫堇浓度 10 μg/mL 可生长。
^h 一些在加拿大、英国和美国分离株不能在染料上生长。

4.12.7 噬菌体溶解试验

应用本方法可将布鲁氏菌鉴别到种(表 5)。

以无菌生理盐水将待检菌株制成 10 亿/mL 悬液,然后涂布于干燥的琼脂平皿上,稍干后,用直径为 2 mm 的铂金耳环勾取标准噬菌体液加于平皿上,置 37 °C 恒温箱中经 24 h 初步观察结果,再放置室温下,经 24 h 后判定最后结果。

结果判定依据:细菌完全不生长,判为+ (阳性);部分生长,判为± (可疑);细菌生长良好,判为一 (阴性)。

表 5 噬菌体对不同种布鲁氏菌的溶解

布鲁氏菌种	Tb	Wb	Fi	BK2	R	R/O	R/C	Iz
牛种菌 ^a	+	+	+	+	—	±	—	— ^b
羊种菌 ^a	—	—	—	+	—	—	—	+
猪种菌 ^a	—	+	±	+	—	±	—	+
沙林鼠种菌 ^a	±	+	+	+	—	—	—	— ^b
绵羊附睾种菌	—	—	—	—	—	+	+	+ ^c
犬种菌	—	—	—	—	—	—	+	—

^a 为光滑型菌株。
^b 为噬菌体浓度大于等于 10⁵ RTD 时裂解。
^c 为部分裂解。

4.13 布鲁氏菌 Bruce-Ladder 检测方法

4.13.1 布鲁氏菌 DNA 的制备

从平板上选择单个菌落,用灭菌接种环取一环菌,接种到 200 μL 生理盐水中,煮沸 30 min,12 000 g 离心 30 s,取 1 μL 上清液作为 DNA 模板用于 PCR 扩增(约 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),或使用商品化的 DNA 提取试剂盒提取 DNA 作为模板,DNA 模板可置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

4.13.2 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 6。

表 6 PCR 反应体系(总体积为 25 μL)

成分	终浓度	体积
10 倍 PCR 缓冲液	1 倍	2.5 μL
dNTPs(2 mmol/L)	400 $\mu\text{mol}/\text{L}/\text{个}$	5.0 μL
镁离子(50 mmol/L)	3.0 mmol/L	1.5 μL
8 对引物混合液(12.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$)	6.25 pmol/条	7.6 μL
超纯水		7.1 μL
Taq DNA 聚合酶	1.5U	0.3 μL
DNA 模板	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1 μL

PCR 反应管中依次加入上述成分,充分混匀后,瞬时离心,确保所有反应成分混匀并集于管底。

4.13.3 PCR 对照

同时设阴性对照、阳性对照,阳性对照为标准菌株 DNA,阴性对照为不含 DNA 的反应体系。

4.13.4 扩增程序

将上述加有 DNA 模板的 PCR 管,置于 PCR 仪内进行反应。反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 7 min 预变性;然后进行 25 个循环的扩增(95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s,64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min),最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.13.5 电泳

用 1 倍 TBE 缓冲液,参见附录 N,配制 1.5% 琼脂糖凝胶平板,同时,加入 0.005% GoldView 核酸染料,取 PCR 产物 7 μL 与适量 6 倍溴酚蓝缓冲液混合,加样,7 $\mu\text{L}/\text{孔}$,同时,设定 1 kb plus DNA ladder 标准分子量标准,120 V 稳压电泳 1 h,紫外灯下观察条带。

4.13.6 结果判定

4.13.6.1 试验成立的条件

当阴性对照不出现条带、阳性对照出现条带,试验成立时,参照图 3 进行判定。

4.13.6.2 判定

4.13.6.2.1 牛种布鲁氏菌:电泳同时出现 152 bp、450 bp、587 bp、774 bp 和 1 682 bp 共 5 条带。

- 4.13.6.2.2 羊种布鲁氏菌:电泳同时出现 152 bp、450 bp、587 bp、774 bp、1 071 bp 和 1 682 bp 共 6 条带。
- 4.13.6.2.3 绵羊附睾种布鲁氏菌:电泳同时出现 152 bp、450 bp、587 bp、774 bp 和 1 071 bp 共 5 条带。
- 4.13.6.2.4 猪布鲁氏菌:电泳同时出现 152 bp、272 bp、450 bp、587 bp、774 bp、1 071 bp 和 1 682 bp 共 7 条带。
- 4.13.6.2.5 S19 疫苗菌株:电泳同时出现 152 bp、450 bp、774 bp 和 1 682 bp 共 4 条带。
- 4.13.6.2.6 RB51 疫苗菌株:电泳同时出现 152 bp、450 bp、587 bp、774 bp 和 2 524 bp 共 5 条带。
- 4.13.6.2.7 Rev1 疫苗菌株:电泳同时出现 152 bp、218 bp、450 bp、587 bp、774 bp、1 071 bp 和 1 682 bp 共 7 条带。
- 4.13.6.2.8 犬种布鲁氏菌:电泳同时出现 152 bp、272 bp、450 bp、587 bp、1 071 bp 和 1 682 bp 共 6 条带。
- 4.13.6.2.9 沙林鼠种布鲁氏菌:电泳同时出现 272 bp、450 bp、587 bp、774 bp、1 071 bp 和 1 682 bp 共 6 条带。
- 4.13.6.2.10 海洋种布鲁氏菌(鳍型布鲁氏菌、鲸型布鲁氏菌):电泳同时出现 152 bp、587 bp、774 bp、1 071 bp、1 320 bp 和 1 682 bp 共 6 条带。
- 4.13.6.2.11 田鼠种布鲁氏菌:电泳同时出现 152 bp、272 bp、450 bp、510 bp、587 bp、774 bp、1 071 bp 和 1 682 bp 共 8 条带。
- 4.13.6.2.12 *B. inopinata* 布鲁氏菌:电泳同时出现 152 bp、272 bp、450 bp、587 bp、774 bp 和 1 682 bp 共 6 条带。

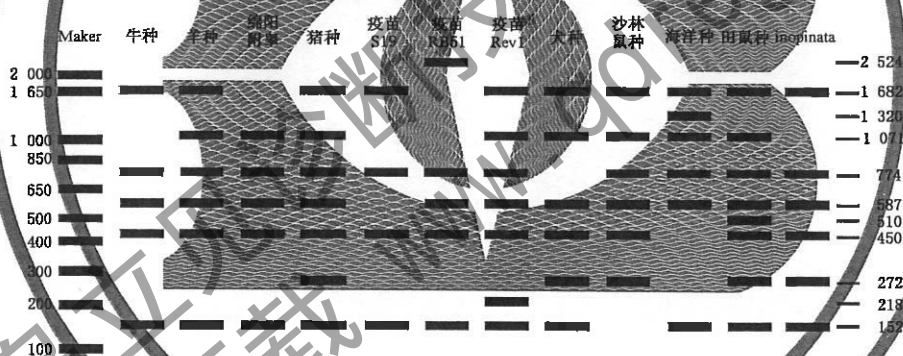


图 3 布鲁氏菌种 PCR 扩增图谱

附录 A

(规范性附录)

试管凝集试验参照比浊管的制备

每次试验需配比浊管,作为判定凝集反应程度的依据,先将已经稀释好的工作抗原用等量稀释液作对倍稀释,然后按表 A.1 配制比浊管。

表 A.1 参照比浊管的配制

管号	对倍稀释后的抗原液/ μL	稀释液/ μL	清亮度/%	记录标记
1	0	1 000	100	++++
2	250	750	75	+++
3	500	500	50	++
4	750	250	25	+
5	1 000	0	0	—

附录 B
(规范性附录)

补体结合试验试剂配制及受检血清的采集和处理

B.1 巴比妥缓冲液(pH 7.2)

取巴比妥 0.575 g, 巴比妥钠 0.185 g, 氯化钠 8.500 g, 六水氯化镁 0.168 g, 无水氯化钙 0.028 g, 加蒸馏水使溶解并稀释至 1 000 mL, 用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 7.2, 过滤即得。

B.2 血清稀释

以常规方法采血和分离血清。微量补体结合试验用巴比妥缓冲液(B.1)将血清作 1:4 稀释(25 μ L 血清加入 75 μ L 稀释液); 常量补体结合试验用稀释液(4.7.2.2.1)将血清作 1:10 稀释, 按表 B.1 规定的水浴灭能。

表 B.1 各种被检动物血清的灭能温度和时间

血清类别	灭能温度/℃	灭能时间/min
羊	58~59	30
马	58~59	30
驴、骡	63~64	30
黄牛、水牛、猪	56~57	30
鹿、骆驼	54	30

附录 C
(规范性附录)
溶血素的效价测定

C.1 稀释溶血素

取 0.2 mL 含等量甘油防腐的溶血素,加 9.8 mL 稀释液配成 100 倍稀释的基础稀释液,按表 C.1 方法作进一步稀释。

表 C.1 溶血素稀释法 单位为微升

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
100 倍稀释溶血素加入量	200	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
稀释液加入量	800	900	1 400	1 900	2 400	2 900	3 400	3 900	4 400	4 900	5 400
溶血素稀释倍数	500	1 000	1 500	2 000	2 500	3 000	3 500	4 000	4 500	5 000	5 500

C.2 按表 C.2 加入各成分,而后 37 ℃~38 ℃水浴 20 min。

表 C.2 微量法溶血素效价测定表 单位为微升

孔	(溶血素对照)	2	3	4	5	6	7	8	9
溶血素稀释倍数	250	250	500	1 000	2 000	3 000	4 000	5 000	6 000
稀释的溶血素	25	25	25	25	25	25	25	25	25
2.5%红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25
稀释液	75	50	50	50	50	50	50	50	50
10 倍稀释补体	—	25	25	25	25	25	25	25	25
轻轻震动平板混匀,而后 37 ℃水浴 30 min									
300 g~600 g 冷冻离心 5 min~10 min									

溶血素对照应完全不溶血。

表 C.3 常量法溶血素效价测定表

单位为微升

管号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	对照管		
													溶血素	补体	稀释液
溶血素	稀释倍数	500	1 000	1 500	2 000	2 500	3 000	3 500	4 000	4 500	5 000	5 500	100	—	—
	加入量	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	0
稀释液		1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 500	1 500	2 000
20 倍稀释补体		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	500	0
2.5% 红细胞		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
37 ℃~38 ℃水浴 20 min															
结果(例)		—	—	—	—	—	—	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
		全部溶血						部分溶血				全部不溶血			

C.3 溶血素效价

从水浴中取出,立即判定结果,能使 2.5% 红细胞液 25 μL (微量法)或 500 μL (常量法)完全溶血的最小量溶血素为溶血素效价或称一单位溶血素。以表 C.3 为例,对照管均不溶血,1 管~6 管完全溶血,测定溶血素效价为 3 000 倍稀释。

在主试验时溶血素的工作效价为滴定效价的倍量或称二单位溶血素,则工作效价为 1 500 倍稀释。效价测定后,2~3 个月内可按此效价使用,不必重测。

青岛立见诊断技术发展研究中心
提供下载 www.qdlijian.com

附 录 D
(规范性附录)
补体制备

D.1 补体采集

选择健康豚鼠 3 只~5 只,于使用前一天早晨喂饲前或停食后 6 h 从心脏采血,分离血清后混合保存于普通冰箱中,也可从兽医生物药品厂购买冻干补体,使用前加稀释液恢复原量后使用。

每次补体结合试验,应于当日测定补体效价。

D.2 补体效价测定

D.2.1 微量法补体效价测定

D.2.1.1 稀释补体并加各种成分

应于补体结合试验当日测定补体效价。按商品使用说明书提供稀释度稀释(以 1:100 为例)。用稀释液配制 1:100 稀释补体(如果测定过程中发现补体含量低,可做其他稀释度选择),按表 D.1 加入各种成分后,前后经 37 °C 30 min 水浴 2 次。

D.2.1.2 效价测定

经过 2 次水浴,在二单位溶血素存在情况下,阳性血清加抗原的试管完全不溶血,而在阳性血清未加抗原及阴性血清无论有无抗原的试管发生完全溶血所需要最小补体量,就是所测得的补体效价。以表 D.1 为例,第 7 管 1:100 稀释的补体 100 μL 即为一个补体单位。

表 D.1 微量补体结合试验补体效价测定

单位为微升

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	溶血对照	
稀释度	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	完全溶血	完全抑制
补体 1/100	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	400	0
稀释液	160	150	140	130	120	110	100	90	80	70	60	50	40	0	0
抗原	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
稀释液	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	0	400
振荡混匀后置 37 °C 水浴 30 min															
致敏红细胞 ^a	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
振荡混匀后置 37 °C 水浴 30 min, 300 g 离心 5 min~10 min															
^a 致敏红细胞:提前红细胞和溶血素等体积混合,放置室温 20 min;剩余致敏红细胞可存放 4 °C 于主实验用。															

一单位补体工作效价:将完全溶血及完全抑制各取 500 μL 至试管中,制备成 50% 溶血补体稀释度;对照准备对比各个补体稀释度,取颜色与 50% 溶血补体相近稀释度的补体量为 一单位补体工作效价。

原补体使用时应稀释倍数的计算：对比颜色时以自然光或白色为背景对比。以上表为例，第7管1:100稀释的补体100 μL即为一单位补体工作效价。以一个微孔反应板为例，根据以下式计算出所需补体用量： $100/200 \times 1/100 \times 6 \times 25 \times 100 = 75 \mu\text{L}$ 。

D.2.2 常量法补体效价测定

D.2.2.1 稀释补体并加各种成分

应于补体结合试验当日测定补体效价。用稀释液配制1:20稀释(如果测定过程中发现补体含量低,可做1:10稀释或其他稀释度选择)补体,按表D.2加入各种成分后,前后经37℃~38℃20min水浴2次。

D.2.2.2 效价测定

经过2次水浴,在2单位溶血素存在情况下,阳性血清加抗原的试管完全不溶血,而在阳性血清未加抗原及阴性血清无论有无抗原的试管发生完全溶血所需要最小补体量,就是所测得的补体效价。以表D.2为例,第6管1:20稀释的补体250 μL即为一个补体单位。

表 D.2 补体效价测定 单位为微升

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	对照		
											11	12	13
20倍稀释补体加入量	100	130	160	190	220	250	280	310	340	370	500	0	0
稀释液加入量	400	370	340	310	280	250	220	190	160	130	1 500	1 500	2 000
工作量抗原加入量 (不加抗原量加稀释液)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	0	0
10倍稀释阳(阴)性血清加入量	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	0	0
振荡均匀后置37℃~38℃水浴20min													
二单位溶血素	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	500	0
2.5%红细胞悬液	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
振荡均匀后置37℃~38℃水浴20min													
结果	阳性血清加抗原	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	阳性血清不加抗原	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
	阴性血清加抗原	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
	阴性血清不加抗原	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-

D.2.2.3 原补体使用时应稀释倍数的计算

原补体使用时应稀释倍数按式(D.1)计算:

$$\text{原补体稀释倍数} = \frac{\text{补体稀释倍数}}{\text{测得效价}} \times \text{使用时每管加入量} \dots\dots\dots (D.1)$$

式中“补体稀释倍数”为补体效价测定试验补体的实际稀释度,“测得效价”为稀释后的补体加入量,“使用时每管加入量”为主试验时每管需加的含一个工作单位补体的液体量。

以表 D.1 为例,按式(1)计算 $\frac{20}{250} \times 500 = 40$ 倍

即此例补体应作 40 倍稀释,每管加 500 μL ,即为一个补体单位。考虑补体性质不稳定,操作过程中效价会降低,正式试验时使用浓度比补体效价要大 10% 左右,本例补体工作单位应作 36 倍稀释,每管使用 500 μL 。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

附录 E
(规范性附录)
标准比色管/孔

E.1 微量补体结合试验溶血标准比色孔的制备

制备时以完全溶血的对照(抗原对照或补体对照)和完全抑制溶血的对照(致敏红细胞对照)各取 50 μL 做 50% 溶血对照,见表 E.1。

表 E.1 微量法溶血标准比色孔的制备 单位为微升

溶血对照/%	100	75	50	25	0
	—	+	++	+++	++++
稀释液	0	25	50	75	100
溶血上清 ^a / μL	100	75	50	25	0
^a 可从主试验中 100% 溶血的孔中吸取上清制备。					

E.2 常量补体结合试验溶血标准比色管的制备

配制方法如表 E.2,牛、羊和猪补体结合反应判定标准均相同。

表 E.2 常量法溶血标准比色管的制备 单位为微升

溶血溶液/%	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
溶血溶液 ^a	0	250	500	750	1 000	1 250	1 500	1 750	2 000	2 250	2 500
2.5% 红细胞液	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50	0
稀释液	2 000	1 800	1 600	1 400	1 200	1 000	800	600	400	200	0
判定符号	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	—
判定标准	阳性					可疑					阴性
^a 试验中全溶血的试管内液体即为溶血溶液。											

附录 F
(规范性附录)
抗原效价测定

一般按照兽医制药厂产品说明书的效价使用。在初次使用或过久等其他原因需要测定时按下述步骤进行。

F.1 测定抗原效价

取两份阳性血清(分别为强阳性和弱阳性血清)和一份阴性血清来测定抗原效价。

F.2 阴性血清和阳性血清稀释

用稀释液对阴性对照血清仅作 1:10 稀释,阳性血清稀释成 1:10、1:25、1:50、1:75 和 1:100, 5 个稀释度。

F.3 稀释抗原

用稀释液将抗原稀释成 1:10、1:50、1:75、1:100、1:200、1:300、1:400 和 1:500 等稀释度。

F.4 加样

按表 F.1 加入各种成分,并经 37℃~38℃ 20 min 水浴 2 次。

表 F.1 布鲁氏菌补体结合抗原效价测定

单位为微升

管号		2	3	4	5	6	7	8	9	对照		
抗原	稀释倍数	10	50	75	100	150	200	300	400	500	10	11
	加入量	500	500	500	500	500	500	500	500	500	补体对照	溶血素对照
各种血清稀释度加入量		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	0
工作量补体		500	500	500	500	500	500	500	500	500	0	0
37℃~38℃水浴 20 min												
二单位溶血素		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
2.5%红细胞		500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
37℃~38℃水浴 20 min												

F.5 记录抗原测定结果

从水浴中取出反应管,观察溶血百分数,记录结果。

例举范例如表 F.2。

表 F.2 布鲁氏菌补体结合抗原效价滴定结果(举例)

抗原稀释倍数		10	50	75	100	150	200	300	400	500
血清稀释倍数	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	100	10	0	0	0	0	0	10	20
	75	100	50	20	0	0	0	20	30	80
	100	100	80	50	20	10	20	80	80	100

F.6 抗原效价

抗原对阴性血清应完全溶血。对两份阳性血清各稀释度发生抑制溶血最强的抗原最高稀释度为抗原效价。

在正式试验时,抗原的稀释度应比测定的效价浓 25%。以表 F.2 为例,其效价为 1:150,正式试验时按 1:112.5 稀释使用。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdreger.com

附录 G

(规范性附录)

酶联免疫吸附试验抗原包被板的制作

G.1 试剂与材料

- G.1.1 菌株: 流产布鲁氏菌 S 1119-3 或 S 99 菌株。
- G.1.2 苯酚溶液: 称取 90 g 苯酚溶于 10 mL 水中, 混匀。
- G.1.3 乙酸钠甲醇溶液: 5 mL 饱和乙酸钠溶液中加入 495 mL 甲醇, 混匀。
- G.1.4 三氯乙酸
- G.1.5 96 微孔聚苯乙烯板

G.2 仪器

恒温水浴锅、转速可达到 10 000 g 的低温离心机(4 ℃±1 ℃) 冰箱。

G.3 制作步骤

G.3.1 抗原提取

警示——以下操作应在三级、四级生物安全实验室从事的高致病性病原微生物实验活动。遵从《病原微生物实验室生物安全管理条例》第二十一条。

以牛种布鲁氏菌为例:

提取光滑型布鲁氏菌脂多糖(LPS), 将牛种布鲁氏菌 S 1119-3 或 S 99 株(G.1.1)干重 5 g 或湿重 50 g 菌细胞溶于 170 mL 蒸馏水中, 加热到 66 ℃, 然后加入 66 ℃ 190 mL 苯酚溶液(G.1.2), 在此温度下持续搅拌 15 min, 冷却后在 4 ℃条件下以 10 000 g 离心 15 min。静止分层后吸弃下层棕红色的酚相, 过滤(用 Whatman 1 号滤器)以去除大块菌体碎片。

加入 500 mL 饱和乙酸钠甲醇溶液(G.1.3)沉淀脂多糖。4 ℃孵育 2 h, 10 000 g 离心 10 min, 分离沉淀物。沉淀用 80 mL 蒸馏水搅拌 18 h, 10 000 g 离心 10 min。上清液于 4 ℃保存。沉淀再悬浮于 80 mL 灭菌蒸馏水, 于 4 ℃再搅拌 2 h。依上法离心获上清液, 并与前述上清液混合。

随后, 在 160 mL 粗制脂多糖中加入 8 g 三氯乙酸(G.1.4)。搅拌 10 min 后, 离心除去沉淀, 上清液以蒸馏水透析(换 2 次, 每一次至少 4 000 mL), 然后冻干。

对冻干的脂多糖称重, 以 1 mg/mL 的含量悬浮于抗原包被缓冲液(I.1)中, 然后于冰浴中用大约 6 瓦超声裂解 3 次, 每次 1 min。然后以 1 mL 量分装冻干, 室温保存。

G.3.2 抗原的包被

冻干的脂多糖(G.3.1)重新溶解到 1 mL 蒸馏水中, 再用抗原包被缓冲液(I.1)稀释到 0.5 μg/mL。用稀释后的脂多糖溶液包被 96 孔聚苯乙烯板(G.1.5), 每孔加 100 μL, 加盖于 4 ℃温孵 18 h~24 h。孵育后, 用 PBST1(I.2)洗涤微量板 4 次以去除未吸附的抗原。平板可直接使用, 也可封起来, 于 -20 ℃冻存一年以上。用前于 37 ℃ 30 min~45 min 解冻。

附录 H
(规范性附录)
酶标抗体的制备

H.1 酶标单克隆抗体的制备

用预定抗原免疫小鼠,通过杂交瘤技术获取分泌特异性单抗的杂交瘤细胞系,将此杂交瘤细胞免疫 Balb/C 小鼠,抽取小鼠腹水制备单克隆抗体(BM40)。

用此单克隆抗体与辣根过氧化物酶(HRP)偶联后,0.2 μm 滤膜过滤,储存于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 。使用时用酶标抗体稀释缓冲液(I.2)进行 100 倍稀释。

H.2 酶标多克隆抗体的制备

分离纯化青年牛(或羊)血清中 IgG,以牛(或羊)IgG 免疫新西兰兔,获得兔抗牛(或羊)IgG 的血清,分离纯化,制备兔抗牛(或羊)IgG。将兔抗牛(或羊)IgG 和辣根过氧化物酶(HRP)偶联后,0.2 μm 滤膜过滤,储存于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 。使用时用酶标抗体稀释缓冲液(I.2)进行 100 倍稀释。

青岛立见诊断技术有限公司
提供下载 www.qdreg.com

附录 I
(规范性附录)
酶联免疫吸附试验用试剂配制

I.1 抗原包被缓冲液(0.05 mol/L 的 pH 9.6 碳酸盐缓冲液)

称取 2.93 g 碳酸氢钠,1.59 g 碳酸钠,0.2 g 叠氮钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,混匀。121 ℃,30 min 高压灭菌,4 ℃冰箱保存备用,保存不超过 1 个月。

I.2 稀释缓冲液(0.01 mol/L 的 pH 7.2 磷酸盐缓冲体系 PBST1)

称取 1.4 g 磷酸氢二钠、0.20 g 磷酸二氢钾、8.50 g 氯化钠,量取 0.5 mL 吐温-20 溶于 1 000 mL 蒸馏水中,混匀。调节 pH 值至 7.2,121 ℃高压灭菌 30 min,待其冷却后加入 0.5 mL 吐温-20,混匀,4 ℃冰箱保存备用,保存不超过 1 个月。

I.3 洗涤缓冲液(0.01 mol/L 的 pH 7.2 磷酸盐缓冲体系 PBST2)

称取 1.4 g 磷酸氢二钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,混匀。调节 pH 值至 7.2,121 ℃高压灭菌 30 min,待其冷却后加入 0.1 mL 吐温-20,混匀,4 ℃冰箱保存备用,保存不超过 1 个月。

I.4 底物溶液(3%过氧化氢溶液)

量取 50 mL 30%过氧化氢原液溶于 450 mL 蒸馏水中,混匀,避光保存,现配现用。

I.5 底物缓冲液(pH 4.4 柠檬酸缓冲液)

称取 7.6 g 二水柠檬酸三钠、4.6 g 柠檬酸溶于 1 000 mL 蒸馏水中,混匀。调节 pH 值至 4.5,121 ℃高压灭菌 30 min。冷却后 4 ℃冰箱保存备用,保存不超过 1 个月。

I.6 显色液[0.16 mol/L ABTS(2,2-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸))溶液]

称取 87.79 g ABTS 溶于 1 000 mL 蒸馏水中,混匀即为 0.16 mol/L 的 ABTS。121 ℃高压灭菌 30 min,冷却后 4 ℃冰箱保存备用,保存不超过 1 个月。

使用时,将 100 μL 的 3%过氧化氢、500 μL 的 0.16 mol/L ABTS 加入 20 mL 底物缓冲液中,即得底物显色混合液(含 1.0 mmol/L 过氧化氢、4 mmol/L ABTS)。

I.7 终止液(0.5 mol/L 叠氮化钠)

称取 32.5 g 叠氮化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,混匀,4 ℃冰箱保存备用,保存不超过 1 个月。

I.8 底物显色液[邻苯二胺(OPD)与过氧化氢混合溶液]

称取 30 mg 邻苯二胺溶于 75 mL 蒸馏水中,加入 30%过氧化氢 0.3 mL,混匀,现配现用。

I.9 终止液(0.5 mol/L 柠檬酸溶液)

称取 96.07 g 柠檬酸溶于 1 000 mL 蒸馏水中,混匀,4 ℃冰箱保存备用,保存不超过 1 个月。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

附录 J

(规范性附录)

布鲁氏菌培养基制作及病料采集

J.1 培养基

J.1.1 基础培养基配方

琼脂	15 g~20 g
蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
肉膏	5 g
加水	1 000 mL

上述成分混合,加热使琼脂溶化,然后调 pH 至 7.8,再将培养基分装三角瓶中,然后置 20 磅 (1 磅 \approx 0.006 89 MPa) 高压灭菌,顷刻间可析出大量盐类结晶,趁热过滤,再调 pH 至 7.4,10 磅高压 15 min。冷却后置 4 ℃ 冰箱备用。

J.1.2 血清葡萄糖培养基

将基础培养基(J.1.1)融化,冷却至 50 ℃,于其中加入除菌并灭活的正常马或小牛血清以及除菌和葡萄糖溶液,使血清的终浓度为 5%,葡萄糖的终浓度为 1%。

该培养基用于布鲁氏菌的纯培养。

J.1.3 选择培养基

在 1 000 mL 血清葡萄糖培养基中加入下列成分,即为选择培养基。

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

若培养羊种布鲁氏菌,需 1 000 mL 血清葡萄糖培养基中加入下列成分:

多黏安乃近	7.5 mg
万古霉素	3 mg
呋喃妥因	10 mg
制霉菌素	17.7 mg
两性霉素 B	2.5 mg

选择培养基用于陈旧性病料和污染性病料的培养。

J.2 病料采集

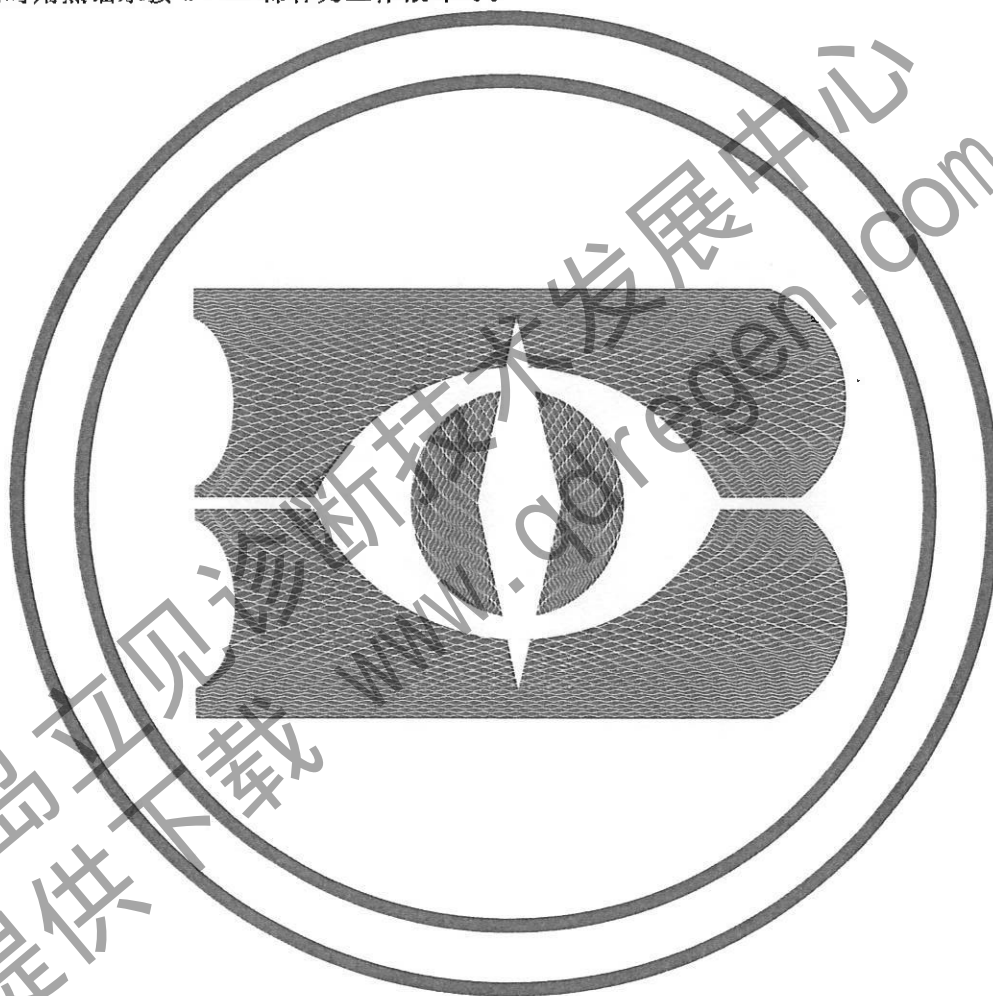
警示——对本病剖检采样过程当中应当防止病原微生物扩散和人员感染。

对于出现布鲁氏菌病临床症状的动物,采集的样品包括流产的胎儿(胃内容物、脾、肺)、胎衣、阴道分泌物(阴道冲洗物)、奶、精液和关节液。死后采集样品的首选组织为网状内皮组织(乳头、乳腺、生殖器淋巴结、脾)、妊娠后期或生产后早期的子宫、乳腺。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

附 录 K
(规范性附录)
结晶紫储备液配制方法

- K.1 A液:称取 2 g 结晶紫染料溶于 20 mL 无水乙醇中。
K.2 B液:称取 0.8 g 草酸铵溶于 80 mL 蒸馏水中。
K.3 A液和 B液充分混合后即为储备液。储备液应在密封瓶中保存,可使用 3 个月。
K.4 使用时用蒸馏水按 1:40 稀释为工作液即可。



附 录 L

(规范性附录)

氧化酶试验试剂配制方法

警示——*N,N*-二甲基-1,4-苯二胺草酸盐具有毒性,有害健康。

- L.1 取 1 mL 蒸馏水于带密封盖离心管中。
- L.2 加入 *N,N*-二甲基-1,4-苯二胺草酸盐约 10 g。
- L.3 盖好密封盖,震荡混匀,配制成氧化酶试剂。
- L.4 实验时现用现配。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

附录 M

(规范性附录)

尿素酶活性试验培养基配方及制备方法

M.1 培养基配方

蛋白胨	1 g
氯化钠	5 g
磷酸氢二钾	2 g
葡萄糖	1 g
酚红	0.012 g
琼脂	10 g
尿素	20 g
蒸馏水	1 000 mL

M.2 制备方法

除葡萄糖、酚红和尿素外,其余各成分按比例混合加热溶解过滤,调 pH 为 6.9,加葡萄糖和酚红,高压灭菌 20 min 取出,冷却至 55 ℃,无菌加入尿素充分混匀,制备成平板或斜面培养基。

附 录 N
(规范性附录)
PCR 引物序列及电泳缓冲液

N.1 PCR 引物序列

- N.1.1 上游引物: 5'-ATCCTATTGCCCCGATAAGG-3'; 下游引物: 5'-GCTTCGCATTTTCACTGTAGC-3'
- N.1.2 上游引物: 5'-GCGCATTCTTCGGTTATGAA-3'; 下游引物: 5'-CGCAGGCCGAAAACAGCTATAA-3'
- N.1.3 上游引物: 5'-TTTACACAGGCAATCCAGCA-3'; 下游引物: 5'-GCGTCCAGTTGTTGTTGATG-3'
- N.1.4 上游引物: 5'-TCGTCGGTGGACTGGATGAC-3'; 下游引物: 5'-ATGGTCCGCAAGGTGCTTTT-3'
- N.1.5 上游引物: 5'-GCCGCTATTATGTGGACTGG-3'; 下游引物: 5'-AATGACTTCACGGTCGTTCG-3'
- N.1.6 上游引物: 5'-GGAACACTACGCCACCTTGT-3'; 下游引物: 5'-GATGGAGCAAACGCTGAAG-3'
- N.1.7 上游引物: 5'-CAGGCAAACCCCTCAGAAGC-3'; 下游引物: 5'-GATGTGGTAACGCACACCAA-3'
- N.1.8 上游引物: 5'-CGCAGACAGTGACCATCAAA-3'; 下游引物: 5'-GTATTCAGCCCCCGTTACCT-3'

N.2 10 倍 TBE 缓冲液

N.2.1 组分

89 mmol/L Tris-硼酸, 2.0 mmol/L EDTA, pH 8.0。

N.2.2 配制

称取 Tris 108 g, Na₂EDTA · 2H₂O 7.44 g, 硼酸 55 g, 置于 1 L 烧杯中, 向烧杯中加入约 800 mL 蒸馏水, 充分搅拌溶解, 调 pH 至 8.0, 加蒸馏水定容至 1 L, 室温保存。