

团 体 标 准

T/CVMA 291—2025

鉴别免疫与感染动物的布鲁氏菌天然半抗原抗体琼脂扩散试验

The Protocol of detecting the antibodies of Brucella native hapten by argar gel immunodiffusion test (AGID) for discriminating infected animals from vaccinated animals

2025 - 9 - 30 发布

2025 - 9 - 30 实施

中国兽医协会
CVMA
全国团体

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国动物卫生与流行病学中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：中国动物卫生与流行病学中心、青岛市动物疫病预防控制中心、新疆生产建设兵团第十二师畜牧水产发展服务中心、青岛立见生物技术有限公司、包头市动物疫病预防控制中心、内蒙古包头市固阳县畜牧技术服务中心。

本文件主要起草人：邵卫星、李彦、焉鑫、段笑笑、赵明、孙荣钊、徐晶晶、孙世雄、张培培、张研博、亓菲、杜建军、王东云、马帅、孙明军、张皓博、刘蒙达、靳继惠、黄孟锴、孙翔翔。

引 言

布鲁氏菌病（Brucellosis）是我国当前最重要的人兽共患病之一。由于动物接种布鲁氏菌疫苗可严重干扰布鲁氏菌病的流行病学监测及诊断，因此，需要一种简单、快速、可有效区分疫苗免疫和感染动物的抗体检测方法。光滑型布鲁氏菌的天然半抗原（Native Hapten, NH）是一种分子量小、抗原性较弱的抗原，感染动物与免疫动物诱导的NH抗体不同，主要体现在：野生型布鲁氏菌感染动物后，可持续刺激机体产生针对NH的抗体，持续时间长，且抗体与NH抗原结合常数相对高；而接种动物后，疫苗株可被机体快速清除，不能持续刺激机体产生NH抗体，持续时间短，且抗体与抗原结合常数相对低。依据NH抗体在感染和免疫动物体内抗体的滴度、持续时间及与NH抗原结合常数的不同，可通过检测NH抗体来鉴别免疫动物和感染动物。

本文件仅规定了牛种布鲁氏菌和羊种布鲁氏菌两种光滑型布鲁氏菌感染牛、羊引起的NH抗体琼脂扩散检测方法的技术内容。

本文件等同采用WOAH《陆生动物诊断试验与疫苗手册》中3.1.4章“布鲁氏菌病（牛种、羊种和猪种布鲁氏菌感染）（2022版）”的8.9节内容。

鉴别免疫与感染动物的布鲁氏菌天然半抗原抗体琼脂扩散试验

1 范围

本文件规定了检测牛、羊血清中布鲁氏菌天然半抗原（NH）抗体琼脂扩散试验方法（AGID）的程序。

本文件适用于检测布鲁氏菌疫苗免疫背景清晰、且虎红平板凝集试验结果为阳性的牛、羊。在适当时机检测，其阳性结果可作为已感染牛、羊且在体内处于感染活跃期布鲁氏菌的指征或布鲁氏菌正在经阴道/或乳汁、精液向体外排出的指征。

本文件不适用于接种粗糙型疫苗牛、羊的检测；本文件阴性结果不适用于判定牛、羊没有感染布鲁氏菌。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

感染活跃期 active stage

病原菌感染易感动物，且在易感动物体内处于增殖状态的阶段。如布鲁氏菌感染牛、羊等易感动物后且进入感染活跃期，感染动物常出现菌血症，并通过机体向外排菌的情况（其血液、乳汁、阴道分泌物、精液等可分离检测到布鲁氏菌）。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AGID：琼脂凝胶免疫扩散试验（Agar gel immunodiffusion test）

NH：天然半抗原（Native hapten）

5 试剂和耗材

5.1 试剂与耗材

- 5.1.1 除特别说明以外，本文件所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 中二级水的要求。
- 5.1.2 布鲁氏菌天然半抗原，制备方法见附录 A。
- 5.1.3 带梅花形孔的琼脂糖平板，制备方法见附录 B。
- 5.1.4 阴性对照血清为布鲁氏菌疫苗免疫血清，制备方法见附录 C。
- 5.1.5 阳性对照血清为布鲁氏菌感染血清，制备方法见附录 D。
- 5.1.6 离心管（2.0 mL，无核酸酶）。
- 5.1.7 微量移液器吸头（10 μ L、200 μ L，无核酸酶）。

6 仪器设备

- 6.1 冰箱：2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C，-20 $^{\circ}$ C 以下。
- 6.2 密闭湿盒。
- 6.3 恒温培养箱。
- 6.4 酒精灯。
- 6.5 微量移液器（量程为2 μ L ~ 20 μ L、20 μ L ~ 200 μ L）。

7 样品制备

牛、羊血液样品采集与处理按照 NY/T 541 执行，且血清经虎红平板凝集试验检测为阳性。

8 检测时机的选择

8.1 对于仅在未成年免疫一次疫苗的牛、羊

8.1.1 对于未成年羊（3 月龄 ~ 4 月龄）

口服或皮下注射 S2 疫苗，可在免疫后 2 个月开始检测。皮下注射 M5、M5-90、M5-90 Δ bp26 或 BA0711 疫苗，可在免疫后 4 个月开始检测。点眼接种 Rev I 疫苗，可在免疫后 2 个月开始检测。

8.1.2 对于未成年牛（3 月龄 ~ 8 月龄）

口服 S2 疫苗，可在免疫后 2 个月开始检测。皮下注射 A19、A19 Δ virB12、S19 或 BA0711 疫苗，可在免疫后 4 个月开始检测。

8.2 对于成年（性成熟）后仅免疫一次疫苗的牛、羊

8.2.1 对于成年羊

口服S2疫苗，可在免疫后2个月开始检测。皮下注射M5-90、M5-90 Δ bp26或BA0711疫苗，可在免疫后4个月开始检测。点眼接种Rev I疫苗，可在免疫后2个月开始检测。无论何种疫苗免疫，都可在分娩1个月后进行检测。

8.2.2 对于成年牛

皮下注射A19、A19 Δ virB12、S19或BA0711疫苗，可在免疫后4个月开始检测。无论何种疫苗免疫，都可在分娩1个月后进行检测。

8.3 对于成年（性成熟）后免疫二次（间隔1年以上）的牛、羊

皮下二次接种A19、A19 Δ virB12、S19或BA0711疫苗，可在免疫后9个月开始检测，或在分娩（二免后）后1个月进行检测。

8.4 对于成年后频繁免疫或每年免疫一次的牛、羊

本方法不适用该类牛、羊的检测。

9 试验程序

9.1 从2 °C ~ 8 °C冰箱中取出带有梅花形（一个梅花形包含6个周围孔和1个中间孔）孔的琼脂糖平板，从-20 °C冰箱中取出检测抗原、对照血清和待检血清，恢复至室温。将琼脂糖平板快速在酒精灯火苗上反复经过4次 ~ 5次（不超过10 s），对琼脂糖平板梅花形孔的底部进行封闭，避免加入的抗原或血清从梅花孔底部渗漏。

9.2 向琼脂糖平板上梅花形周围孔中加入待测血清，每孔加18 μ L ~ 20 μ L。将等量的阴性对照血清和阳性对照血清分别加到琼脂糖平板上同一个梅花形周围邻近的2个孔中（参见1中NC孔和PC孔）。每批检测只需设1孔阳性对照和1孔阴性对照。

9.3 将18 μ L ~ 20 μ L的检测抗原加到琼脂糖平板每个梅花形的中央孔中（参见图1中A孔）。

9.4 将加完血清和抗原的琼脂糖平板盖上平皿盖，放入湿盒中，密闭，在37 °C恒温培养箱中孵育24 h ~ 96 h。

9.5 结果判定

9.5.1 沉淀线观察

在37 °C恒温培养箱中孵育12 h以上（最长不超过24 h）后，取出琼脂糖平板，对着光源，并倾斜一定的角度，观察在抗原孔和血清孔之间是否存在沉淀线。

9.5.2 试验成立条件

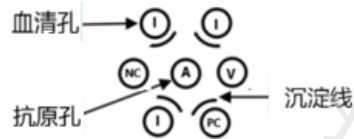
阳性对照血清孔与抗原孔之间出现1条沉淀线，并靠近血清孔一侧（参见图1中PC孔）；而阴性对照血清与抗原孔之间不出现沉淀线（参见图1中NC孔）。

9.5.3 结果判定

9.5.3.1 非结构蛋白3ABC抗体个体阳性率在抗原孔与血清孔之间无沉淀线（参见图1中V孔），判定该血清不含天然半抗原沉淀抗体，表明该血清来自接种布鲁氏菌疫苗的牛、羊或布鲁氏菌感染但处于

静默期的牛、羊。对于阴性结果，可在本次采样后1月~2月或分娩后1月~2月再次采样检测，可增加检测的敏感性。

9.5.3.2 在抗原孔与样品血清孔之间出现1条沉淀线，并靠近血清孔（参见下图I孔），判定该血清含天然半抗原沉淀抗体，表明该血清来自布鲁氏菌感染牛、羊；对于成年雌性牛、羊，表明正在通过阴道或奶向体外排菌，对于成年雄性牛、羊，表明正在通过精液向体外排菌。



标引序号说明：

I——感染血清；

V——免疫血清；

A——检测抗原；

NC——阴性对照血清；

PC——阳性对照血清。

图1 AGID 试验结果示意图

10 实验室生物安全要求

实验室生物安全要求应符合GB 19489的相关要求。

附录 A

(资料性)

布鲁氏菌 NH 抗原的制备

A.1 布鲁氏菌的培养

在生物安全三级实验室,从-80℃取出鲁氏菌16M株菌种,在TSA平板上划线,于37℃培养箱中培养72 h,挑取单个菌落,接种到2 mL的TSB中,于37℃摇床(200 r/min)中培养48 h。取出,涂布到TSA平板中,200 μL/块,于37℃培养箱中培养72 h。取出TSA平板,用PBS洗脱菌苔,2 mL/块,置于15 mL离心管中,向管中加入终浓度为2%的苯酚,室温灭活48 h,从管中取出10 μL,涂布TSA平板,于37℃培养箱中培养72 h,无菌落生长,证明灭活完全。将灭活的菌液管经传递窗传递到生物安全二级实验室进行如下实验操作。

A.2 NH抗原的提取

将灭活的菌液用生理盐水洗3次,5000 g离心15 min,然后将菌体以菌体(湿重):2%乙酸-10%NaCl溶液为100 g:500 mL的比例加入2%乙酸-10%NaCl溶液中,重悬菌液。对细菌悬液高压(151 b/in², 121℃, 30 min),冷却至室温,10,000 g离心15 min,保留上清液。向上清液中加入等体积的含1%乙酸钠的甲醇溶液,4℃搅拌18 h,10,000 g离心30 min,获得沉淀。沉淀用Tris盐(1% NaCl, 0.02% NaN₃, 0.12% Tris hydrochloride (pH7.0))溶解,用纯水在4℃透析24 h,冻干,获得NH抗原粗提物。

A.3 NH抗原的纯化

将NH抗原粗提物按溶解到PBS中,制成1 mg/mL溶液。按每毫升溶液分别加入25 μg的溶菌酶、RNase、DNase,在室温持续搅拌18 h,然后加入50 μg/mL的蛋白酶K,55℃作用1 h,然后置于室温24 h。在4℃条件下200,000 g离心6 h。取出上清,去除沉淀。向上清溶液中加入等体积的90%饱和酚,在70℃持续搅拌30 min,然后将溶液在2℃~8℃冰箱放置过夜。在0℃条件下10,000 g离心15 min,吸出苯酚层,分别加入5倍体积和7倍-20℃从苯酚层沉淀NH抗原,用含1%乙酸钠的甲醇溶液洗涤2次,经Tris盐溶解和透析,然后进行超速离心(100,000 g, 18 h, 4℃),去除蛋白和LPS等杂质,上清用纯水透析24 h后冻干。冻干的NH粉末溶于pH 4.0的0.05 M乙酸吡啶(溶液:NH=1000:1),然后用葡聚糖G-50柱(2.5 cm×100 cm)洗脱,洗脱液分部分收集,并冻干,获得纯化的NH抗原。进行琼脂试验前,将NH抗原溶于纯水中(纯水:NH=100 mL:16 mg),一周之内,可保存在2℃~8℃冰箱,长期应保存在-20℃以下。

附 录 B
(资料性)
琼脂平板的制备

B.1 琼脂的配制

1.0%琼脂成分及含量见表 B.1。

表B.1 1.0%琼脂成分及含量

成分	含量
10×Tris HCl (pH 7.6)	10 mL
琼脂糖粉	1.0 g
氯化钠	10 g
纯水	100 mL

B.2 琼脂板的制备

向 250 mL 三角瓶中加入表 B.1 中各成分，置于微波炉中加热 5 min，期间摇动三角瓶 1~2 次，至琼脂糖完全熔化，然后置于 70 °C 水浴中。用 10 mL 移液管吸取 7.0 mL 1.0%琼脂糖至直径为 60 mm 的一次性平皿中（注意不要产生气泡），待琼脂糖完全凝固，置于 2 °C~8 °C 冰箱中过夜，取出，用孔径 4 mm、孔距 3 mm 的 7 孔梅花型打孔器进行打孔，将切下的中间琼脂柱用针头轻轻挑出，保持孔的边缘平整。每个平皿打 3 组梅花孔。将打孔后的琼脂板在酒精灯 外焰上均匀转动 4 s~5 s，封底。铝箔袋真空包装，2 °C~8 °C 保存，保存期 12 个月。

附录 C
(资料性)
阳性对照血清的制备

C.1 羊的选择

在无害化处理场采集布鲁氏菌感染的羊。选择制备阳性血清羊的标准需同时达到以下条件：1) 血清经虎红平板凝集试验和 NH-AGID 试验检测，结果均为强阳性；2) 采集脏器（脾、淋巴结）和/或奶和/或阴道拭子样品，经细菌分离鉴定或荧光 PCR 方法检测，结果为阳性。

C.2 阳性血清制备

从羊的颈静脉无菌采集羊的血液，室温放置 2 h~4 h，待血清析出，3500 g 离心 10 min，取血清，分装 1.8 mL 管中，-20 °C 保存备用。血清应无溶血，呈淡黄色。

附 录 D
(资料性)
阴性对照血清的制备

D.1 羊的选择

选择性成熟羊，皮下接种 M5-90 疫苗。接种后 4 个月，选择制备阴性对照血清的羊需同时满足以下两个条件：1) 血清经虎红平板凝集试验为强阳性，而 NH-AGID 试验检测结果为阴性；2) 采集脏器（脾、淋巴结）和/或奶和/或阴道拭子样品，经细菌分离鉴定或荧光 PCR 方法检测，结果为阴性。

D.2 阴性对照血清的制备

从羊的颈静脉无菌采集羊的血液，室温放置 2 h ~ 4 h，待血清析出，3500 g 离心 10 min，取血清，分装 1.8 mL 管中，-20 °C 保存备用。血清应无溶血，呈淡黄色。