

冯育芳,邢进,张雪青,等. 实验动物布鲁杆菌 PCR 检测方法团体标准的编制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 88-91.
Feng YF, Xing J, Zhang XQ, et al. Establishment of group standards on *Brucella* detection in laboratory animals by PCR assay [J].
Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 88-91.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.03.015

实验动物布鲁杆菌 PCR 检测方法团体标准的编制

冯育芳,邢进,张雪青,王洪,李晓波,岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所,北京 100050)

【摘要】 布鲁杆菌病是一种人畜共患的传染病,病原为布鲁杆菌,该菌是实验动物必需排除的微生物之一。随着时间的推移、条件的变化及技术的进步,原有检测方法和标准已明显不适用于检测现状,需要制定新的实验动物布鲁杆菌检测方法和标准。本文介绍实验动物布鲁杆菌 PCR 检测方法团体标准的编制背景、法律依据、内容编制、及未来展望等内容,以便于相关人员更好的理解该标准,更好地进行实验动物布鲁杆菌的检测。本团体标准的编制完成进一步完善了实验动物相关标准,为保障实验动物质量,适应我国实验动物国际化发展的需求提供了技术支持。

【关键词】 实验动物;布鲁杆菌;PCR;检测方法;团体标准

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 03-0088-04

Establishment of group standards on *Brucella* detection in laboratory animals by PCR assay

FENG Yufang, XING Jin, ZHANG Xueqing, WANG Hong, LI Xiaobo, YUE Bingfei*

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 *Brucella* can cause acute and chronic infectious diseases in humans and animals, so it is one of the microorganisms that must be excluded from experimental animals. With the passage of time, changes in conditions and advances in technology, the original testing method and standards are no longer applicable for current *Brucella* detection, thus new method and standards for the detection of *Brucella* in laboratory animals need to be developed. This article introduces the background, legal basis, content compilation, and future prospects of the PCR test standards for *Brucella* in laboratory animals, so that relevant personnel can better understand the standards and better carry out the detection of *Brucella* in laboratory animals. This paper provides technical support for promoting the improved quality of laboratory animals and adapting to the needs of the international development of laboratory animals.

【Keywords】 laboratory animal; *Brucella*; PCR; detection assay; group standards

布鲁杆菌 (*Brucella*) 为革兰阴性的多形性球杆菌,无荚膜、鞭毛、芽孢及天然质粒,目前主要有 6 个种 19 个生物型,其中猪、牛、羊、犬种均可感染人,是重要的人畜共患病病原之一,该菌分离培养困难,

血清学检测方法存在特异性差、抗原难以制备等问题,急需制定新的实验动物布鲁杆菌检测方法和标准。基于此,我们建立了实验动物布鲁杆菌 PCR 检测标准,本文对标准进行了详细解读。

[作者简介] 冯育芳(1981—),女,硕士,副研究员,研究方向:实验动物细菌学。E-mail: fyf307@126.com

[通信作者] 岳秉飞(1960—),男,博士,研究员,研究方向:实验动物遗传学。E-mail: y6784@126.com

1 编制背景

布鲁杆菌是一种细胞内寄生的小球杆状菌,可自然感染实验犬等动物^[1],导致流产、不孕、睾丸炎等症状,降低实验动物产量^[2],并威胁饲养人员和实验人员的健康^[3-4],如东北农大就发生了布鲁杆菌感染事件^[5],引起政府和社会的广泛关注^[6]。为遏制布鲁杆菌对实验动物的影响,确保公共卫生安全,加强对实验动物布鲁杆菌的综合防治和净化工作就显得尤为重要。欧盟实验动物科学联合会和世界动物卫生组织等已将该菌列为动物排除病原。我国实验动物国标(GB14922.2-2001)也明确实验犬必需排除布鲁杆菌的感染。

布鲁杆菌的特异性诊断方法包括病原鉴定和血清学试验^[7-9]。其中,常用方法是血清凝集试验、试管凝集、及 ELISA 方法^[10]。现行国家标准(GB/T 14926.45-2001)中规定实验动物布鲁杆菌检测用的方法是试管凝集。而试管凝集需要使用大量的布鲁杆菌抗原,该抗原的生产需要生物安全三级(BSL-3)及以下的特殊实验室和布鲁杆菌菌种,但大多数实验室无法获得布鲁杆菌菌种,无法自行培养布鲁杆菌,并获得布氏抗原^[11]。以前销售试管凝集抗原的厂家也以不再供应该产品,所以实验动物布鲁杆菌检测遇到了无法解决的瓶颈问题^[7]。为此,我们需要寻求一种更加简便的、适用于大部分实验室的实验动物布鲁杆菌检测方法。

为选择合适的方法用于实验动物的布鲁杆菌检测,我们分析了国内外动物布鲁杆菌检测的相关标准和文献^[12-14],发现多重 PCR 方法不需要培养活菌,大大减少了实验室感染的可能性,也不需要使用布氏抗原,同时可以检测布鲁杆菌的多种型别,以减少漏检的发生,因此,多重 PCR 方法成为实验动物布鲁杆菌检测的较为合适的方法;鉴于其实用性和广适性,该方法也适合收录到实验动物团体标准,推广供各单位参考使用。

2 法规依据

依据质检总局、国家标准委、民政部于 2017 年底发布的《团体标准管理规定(试行)》的相关规定,团体标准是依法成立的社会团体为满足市场和创新需要,协调相关市场主体共同制定的标准。团体标准的编写参照 GB/T 1.1《标准化工作导则第 1 部分:标准的结构和编写》的规定执行。《实验动物布

鲁杆菌 PCR 检测方法团体标准》的制定均严格遵照该规定的要求执行。

本标准收集、整理了国内外有关组织、地方和实验动物专业生产公司的实验动物布鲁杆菌检测的先进标准,在研究分析质量标准和控制要求的异同点后,在我国现有的实验动物微生物质量控制研究基础之上制定。在确定本标准各项指标时,以《实验动物管理条例》和《实验动物质量管理办法》为依据,同时参考了国家标准《实验动物 微生物学等级及监测》、《实验动物 微生物学检测方法》、《实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂》和《动物布鲁氏菌病诊断技术》,商检行业推荐性标准《布氏杆菌检疫技术规范》,以及国际公认的具有权威性的资料如 FELASA 及世界动物卫生组织(OIE)等资料,使本标准的各项指标与国际水平接轨,符合国家标准的要求,使标准具有一定的可操作性和广适性。

3 内容编制

3.1 适用范围

基于感染情况调查及实验研究数据,实验动物常感染牛种、猪种、犬种、羊种、绵羊种和沙林鼠种布鲁杆菌。为此,本标准适用于牛种、猪种、犬种、羊种、绵羊种和沙林鼠种布鲁杆菌感染的动物检测。

3.2 检测程序

检测程序如图 1 所示。

3.3 操作步骤

按照国家标准《实验动物细菌学检测标本采集》,采取 EDTA 抗凝血、流产胎盘、胎膜、精液、奶、关节液和水囊瘤液等样本。使用商品化试剂盒提取细菌 DNA,菌液可直接提取,样本需进行研磨处理,具体提取步骤参照试剂盒使用说明。建立 PCR 反应体系(见表 1),PCR 反应条件为:94℃ 5min;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 2min,重复 35 个循环;72℃ 7min。

如果多重 PCR 扩增结果相同,则用限制性内切酶对 910 bp 片段进行组合酶切,酶切反应体系及条件参照限制性内切酶说明书,KpnI 只能切开沙林鼠种(690)和羊种(712),在猪型上没有酶切位点;EcoRI 在沙林鼠种上的酶切位点是 458,在另两型上有两个酶切位点,分别是猪种(450,652),羊种(243,455),见表 2。利用组合酶切的方式可以区分沙林鼠种、猪种和羊种。

如条件允许,可将 PCR 产物送公司进行测序,并进行序列比对。当阳性对照出现相对应目的条带,以及阴性空白对照无条带时,检测结果有效,对结果进行判读。待检样品出现相应条带时,如果难以区分是哪个种的布氏,需进行酶切鉴定;可疑样品 PCR 产物需送公司进行测序;当测序结果和 PCR 结果都确定为布鲁杆菌时,判定为布鲁杆菌阳性结果。

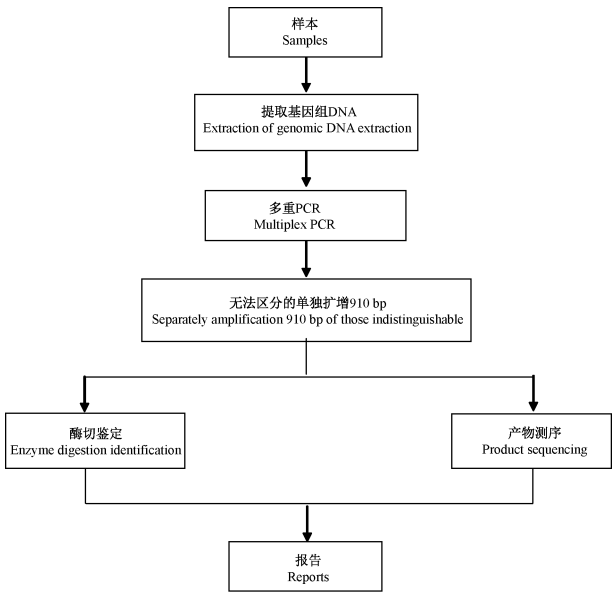


图 1 检测程序
Figure 1 Detection procedure

4 未来展望

布鲁杆菌的检出要求犬厂家对阳性犬进行扑杀,基于福利伦理以及经济价值的考虑,我们判断结果都需要慎重再慎重,所以对于阳性结果的判断我们不能仅仅依赖一种方法,需要用其他的方法去验证,布鲁杆菌的分子检测方法可以有效弥补血清学检测方法特异性略差的问题,对结果的判断可以更为准确,因此,该方法可以作为国标布鲁杆菌检测方法的验证方法纳入团体标准的范围。

此外,随着实验动物科学的发展,实验动物质量标准要求的越来越高,团体标准转化为国家标准或地方标准势在必行,将成熟的经实践检验过的团体标准转化为实验动物的国家标准,也是促进我们的国家标准与国际接轨,提高我国实验动物质量整体水平的必然要求。

当然,随着病原检测技术的不断进步,本团体标准也将在未来的实施和实践中也会不断的改进和提高;特别是,其他领域的标准及国际标准中的布鲁杆菌诊断方法要比实验动物国家标准中规定的布鲁杆菌的检测方法全面,我们也需要不断的补充完善实验动物布鲁杆菌检测方法和检测标准,努力提升实验动物质量,从而保障药品质量评价和人民群众的身体健康。

表 1 PCR 反应体系
Table 1 PCR reaction system

试剂名称 Reagents	浓度 Concentration	50 μL 体系 (1×) Total 50 μL
10×缓冲液 10× buffer	10×	5 μL
dNTP	2.5 mmol/L	4 μL
2ab	10 μmol/L	2.5 μL
2ab200	10 μmol/L	2.5 μL
2ab600	10 μmol/L	2.5 μL
2ab900	10 μmol/L	2.5 μL
Taq HS DNA 聚合酶 Taq HS DNA polymerase	5 U/μL	2.5 μL
不含核酸酶的水 Nuclease-free water	/	23.5 μL
DNA	0.3 pg/μL~300 ng/μL	5 μL

表 2 不同种布鲁杆菌 PCR 产物(910 bp)的酶切片段
Table 2 Enzyme digestion fragments of PCR products (910 bp) from different species of *Brucella*

限制性内切酶 Restriction enzyme	羊种 <i>B. melitensis</i>	猪种 <i>B. suis</i>	沙林鼠种 <i>B. neotomae</i>
KpnI	712 bp + 198 bp	910 bp	690 bp + 220 bp
EcoRI	243 bp + 212 bp + 455 bp	450 bp + 202 bp + 258 bp	458 bp + 452 bp

参考文献:

[1] 吐尔洪, 努尔, 谷文喜, 等. 布鲁菌病研究进展 [J]. 动物医学进展, 2007, 28(7): 82-87.

[2] 毛开荣. 动物布鲁氏菌病防治研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(9): 37-40.

[3] 江森林, 崔步云, 苏增华, 等. 全国布氏菌病防治工作调研报告 [J]. 中国地方病防治杂志, 2006, 21(6): 5-8.

[4] Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC, et al. Human infection with M-strain of Brucella canis [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(1): 146-148.

[5] 东北农大 28 名师生因实验染传布氏杆菌病 [J]. 中国动物保健, 2011(10): 90.

[6] Madkour MM. Brucellosis: overview [J]. Brucellosis. 2nd edition. Berlin: Springer Verlag. 2001: 165-178.

[7] 冯育芳, 邢进, 岳秉飞, 等. 实验犬布氏杆菌的多重 PCR 检测与分型鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(5): 57-61.

[8] 钟佑宏, 王鹏, 宋志忠. 布鲁杆菌病检测研究进展 [J]. 中国地方病防治杂志, 2012, (2): 90-93.

[9] Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, et al. Laboratory-based diagnosis of brucellosis - a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of Brucella spp [J]. Clin Lab, 2003, 49(9-10): 487-505.

[10] 师志海, 王文佳, 兰亚莉. 布氏杆菌检测方法的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011, (15): 44-46.

[11] 邢进, 王春玲, 范薇, 等. 实验犬布鲁杆菌诊断试剂的制备和应用 [J]. 实验动物科学, 2004, 21(2): 24-27.

[12] Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, et al. Single-step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(12): 3087-3090.

[13] Mukherjee F, Jain J, Patel V, et al. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals [J]. J Med Microbiol, 2007, 56(Pt 10): 1309-1316.

[14] Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2004, 4(1): 115-123.

[收稿日期] 2018-09-21

专题计划

2019 年《中国实验动物学报》专题计划

《中国比较医学杂志》2019 年第 5 期	专题: 基因工程猪研究及其应用 主持人: 顾为望 E-mail: Guww100@163.com
《中国比较医学杂志》2019 年第 8 期	专题: 实验动物新资源开发研究 主持人: 刘云波 E-mail: yunboliu@126.com
《中国比较医学杂志》2019 年第 10 期	专题: 代谢性肥胖动物模型应用研究 主持人: 周迎生 E-mail: zys626@aliyun.com
《中国比较医学杂志》2019 年第 11 期	专题: 肿瘤模型的制备及评价应用研究 主持人: 师长宏 E-mail: changhong@fmmu.edu.cn
《中国比较医学杂志》2019 年第 12 期	专题: 药物安全性评价专题 主持人: 靳洪涛 E-mail: jinhongtao@ugcro.com

有相关研究内容请与主持人联系!