

研究报告

犬种布鲁氏菌标准阳性血清的研制与应用

吕浪^{#1}, 冯宇^{#1}, 杨柏琼¹, 杜鹃², 蒋玉军³, 乌日恒³, 王拥军⁴, 蒋卉^{*1}

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

2 北京市动物疫病预防控制中心, 北京 102600

3 内蒙古阿拉善右旗动物疫病预防控制中心, 内蒙古 阿拉善右旗 737300

4 内蒙古阿拉善右旗阿拉腾朝格苏木综合行政执法局, 内蒙古 阿拉善右旗 737300

吕浪, 冯宇, 杨柏琼, 杜鹃, 蒋玉军, 乌日恒, 王拥军, 蒋卉. 犬种布鲁氏菌标准阳性血清的研制与应用[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 601-612.

LV Lang, FENG Yu, YANG Boqiong, DU Juan, JIANG Yujun, WU Riheng, WANG Yongjun, JIANG Hui. Preparation and application of standard positive serum of *Brucella canis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 601-612.

摘要:【背景】犬种布鲁氏菌(*Brucella canis*)是布鲁氏菌 6 个经典种之一, 是严重危害犬只健康的人畜共患病原。【目的】制备犬种布鲁氏菌阳性血清, 为犬布病诊断试剂的开发与应用提供标准物质。【方法】用犬种布鲁氏菌灭活菌液(约 1.5×10^{10} CFU/mL)多次免疫实验用比格犬, 制备获得犬种布鲁氏菌病阳性血清, 采用试管凝集试验方法, 以欧盟犬种布鲁氏菌标准阳性血清溯源并标定血清效价。再以本研究制备的标准阳性血清为标准物质, 质控本实验室研制的犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原和犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒的检测灵敏度, 并用上述 2 种方法同时检测北京地区宠物犬血清中犬种布鲁氏菌抗体, 比较各方法与补体结合试验结果的符合率。

【结果】经试管凝集试验测定, 制备获得的犬种布鲁氏菌阳性血清效价为 2 400 IU/mL, 采用犬阴性血清将阳性血清效价稀释至 1 000 IU/mL, 分装冻干, 即为本研究制备的犬种布鲁氏菌标准阳性血清。将该标准阳性血清作为质控品, 检测本实验室研制的犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原和犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒的检测灵敏度均为 20 IU/mL。用犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原与犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒对北京地区宠物犬血清临床样品进行检测, 与金标准的补体结合试验进行符合率比对, 虎红平板凝集试验和补体结合试验的阳性率均为 6.25%, 间接 ELISA 抗体检测试剂盒阳性率为 5.97%, 虎红平板凝集试验、间接 ELISA 抗体检

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1800703); 岭南现代农业科学与技术广东省实验室肇庆分中心“十四五”课题(P20211154-0105-02)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1800703), and “The 14th Five-year Plan” Project of Zhaoqing Subcenter of Guangdong Provincial Laboratory of Lingnan Modern Agricultural Science and Technology (P20211154-0105-02).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: jianghui01@caas.cn

Received: 2024-05-10; Accepted: 2024-11-25; Published online: 2025-01-02

测试剂盒与补体结合试验的符合率分别为 94.31%和 94.60%。【结论】本研究制备的犬种布鲁氏菌标准阳性血清为犬种布鲁氏菌诊断试剂的研发提供了必要的质控样品。

关键词：犬种布鲁氏菌；阳性血清；效价标定；血清凝集试验；间接 ELISA

Preparation and application of standard positive serum of *Brucella canis*

LV Lang^{#1}, FENG Yu^{#1}, YANG Boqiong¹, DU Juan², JIANG Yujun³, WU Riheng³, WANG Yongjun⁴, JIANG Hui^{*1}

1 Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2 Beijing Animal Disease Control Center, Beijing 102600, China

3 Alxa Youqi Animal Disease Control Center, Alxa Youqi 737300, Inner Mongolia, China

4 Comprehensive Administration and Law Enforcement Bureau of Alatenchage Sumu, Alxa Youqi 737300, Inner Mongolia, China

Abstract: [Background] *Brucella canis*, one of the six representative species of *Brucella*, is a zoonotic pathogen that poses a serious threat to the health of dogs. [Objective] To prepare the *B. canis* positive serum, providing the reference material for the development and application of diagnostic reagents for canine brucellosis. [Methods] Beagle dogs were immunized multiple times with the inactivated bacterial suspension (approximately 1.5×10^{10} CFU/mL) to obtain the positive serum of *B. canis*. By conducting the serum agglutination test, we calibrated the serum titer with the international standard serum provided by the European Union. We then used the standard positive serum prepared in this study as the reference material for quality control of the detection sensitivity of the *B. canis* antigen for rose bengal test and the *B. canis* indirect ELISA antibody detection kit developed by our laboratory. Furthermore, we used the above two methods to detect the *B. canis* antibody in the serum samples of pet dogs in Beijing and analyzed the coincidence rates of results between the two methods and the complement fixation test. [Results] The results of the serum agglutination test showed that the titer of *B. canis* positive serum was 2 400 IU/mL. The serum was diluted with the negative dog serum to reach a titer of 1 000 IU/mL, subpackaged, and freeze-dried to give the standard positive serum of *B. canis*. With the standard positive serum for quality control, the detection sensitivities of the *B. canis* antigen for rose bengal test and the *B. canis* indirect ELISA antibody detection kit developed by our laboratory were both 20 IU/mL. The positive rates obtained by both the *B. canis* antigen for rose bengal test and the complement fixation test was 6.25% and that obtained by the *B. canis* indirect ELISA antibody detection kit was 5.97%. The coincidence rates of results between the two detection methods and the complement fixation test were 94.31% and 94.60%, respectively. [Conclusion] The standard positive serum of *B. canis* that we prepared in this study provides a quality control sample for the development of diagnostic reagents for *B. canis*.

Keywords: *Brucella canis*; positive serum; calibration of titer; serum agglutination test; indirect ELISA

布鲁氏菌病(brucellosis)简称布病,是由布鲁氏菌(*Brucella*)感染引起的一种世界范围内多发的重要人畜共患病,主要感染牛、羊、猪和犬等动物,人类通常通过直接接触被感染动物、食用或饮用被污染的动物产品等途径被感染。布病是《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病,也是《中华人民共和国动物防疫法》规定的二类疫病。犬种布鲁氏菌(*Brucella canis*)是布鲁氏菌经典的6个种之一^[1],毒力比牛种或羊种布鲁氏菌弱^[2],主要感染犬,并且多呈隐性感染,所以犬种布鲁氏菌病的发生往往容易被忽略。感染犬主要表现为流产、死胎、不孕等繁殖障碍,也可表现出视力缺陷、肌肉关节或皮肤受损等症状。人也是犬种布鲁氏菌的主要宿主之一,在中国、美国、墨西哥、日本及阿根廷均有人被犬种布鲁氏菌感染的报道^[3-8]。

随着经济水平的提高和人们生活方式的改变,犬成为最主要的伴侣动物之一。随着城市宠物犬比例增加,犬种布鲁氏菌直接或间接传播给人类的潜在风险大幅上升^[9]。准确诊断是防控犬布病的前提,目前缺乏针对犬种布鲁氏菌抗体检测的相关诊断方法和商品化试剂盒,临床上仍以观察临床症状和传统凝集类方法诊断为主^[10]。同时由于犬种布鲁氏菌为粗糙型菌株,相较于羊种、牛种等光滑型菌株,其脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)结构不完整,无法产生光滑型抗体^[11],所以目前针对光滑型抗体的检测方法均不能有效检测犬种布鲁氏菌的感染^[12]。此外,针对犬种布鲁氏菌抗体的诊断试剂在特异性、敏感性等重要指标上也缺乏科学的评价手段,导致目前对于犬种布病准确诊断和真实流行情况的掌握存在严重问题。目前国内尚无可供犬种布鲁氏菌标准阳性血清对外供应,世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOAH)提供的布病标准血清也

仅限于针对牛种或羊种布鲁氏菌的制备^[13],所以制备和标定犬种布鲁氏菌标准阳性血清对于后期诊断技术的开发和应用非常必要。

本研究拟采用犬种布鲁氏菌灭活菌液免疫实验用比格犬采集血清,以欧盟布病参考实验室提供的犬种布鲁氏菌标准阳性血清溯源并标定效价,同时对来自北京地区的352份临床血清样品进行检测,比较虎红平板凝集抗原、犬种布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒与补体结合试验的符合率,以期为犬种布鲁氏菌诊断试剂的研发提供必要的质控物质。

1 材料与方 法

1.1 样 品

犬种布鲁氏菌灭活抗原,购自青岛中创汇科生物科技有限公司;8-12月龄雌性实验用比格犬,北京芳元缘有限公司。动物实验方案获中国农业科学院北京畜牧兽医研究所动物实验福利委员会批准,动物伦理审批编号:IAS2024-5。实验用比格犬购入前采集血清,经虎红平板凝集试验检测布病抗体为阴性,并采集抗凝全血检测布鲁氏菌核酸为阴性;352份犬临床血清样品由北京市动物疫病预防控制中心采集并提供。

1.2 主要试剂和仪器

欧盟布鲁氏菌病参考实验室犬种布鲁氏菌标准阳性血清(100 IU/mL)由法国国家/欧盟/WOAH/联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization, FAO)布鲁氏菌病参考实验室馈赠;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记兔抗犬IgG,购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;犬种布鲁氏菌补体结合试验抗原、补体和溶血素,购自青岛中创汇科生物科技有限公司;商品化荧光定量PCR试剂盒,购自北京生科尚仪科技有限公司;细菌基因组提取试剂盒,购自北京天根生化科技有限公司;光

滑型布鲁氏菌阳性血清(500 IU/mL)由北京邦卓生物科技有限公司惠赠。碳酸盐(MENZEL)缓冲液(碳酸钠 12.4 g、碳酸氢钠 8.4 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL)、0.01 mol/L 磷酸盐(PBS)缓冲液(磷酸二氢钠 1.42 g、磷酸氢二钠 8.77 g、氯化钠 90 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL)等由本实验室配制;犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原、犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒由本实验室研制。

Multiskan FC 酶标仪, 赛默飞世尔科技公司; 恒温培养箱、生物安全柜, 青岛海尔生物医疗股份有限公司; 高速冷冻离心机, 贝克曼库尔特有限公司; 全自动超声破碎仪, 宁波新芝有限公司。

1.3 抗原鉴定与免疫抗原制备

采用细菌标准比浊管将灭活抗原浓度稀释至约 1.5×10^{10} CFU/mL 作为免疫抗原, 灭活抗原采用商品化细菌基因组提取试剂盒提取核酸, 使用文献[14]报道的 *Brucella ladder* PCR 和 16S rRNA 基因方法进行种属鉴定。

1.4 犬种布鲁氏菌阳性血清的制备

将免疫抗原皮下注射于 4 只比格犬腹股沟, 每只 2 mL。每隔 2 周加强 1 次免疫, 免疫 3 次后采血检测效价。当血清试管凝集试验效价高于 1 000 IU/mL 后, 可于颈静脉采血分离血清。若效价不足, 则继续加强免疫。

1.5 阳性血清效价的测定

用碳酸缓冲液将灭活菌液稀释至 1.5×10^{10} CFU/mL 作为试管凝集试验抗原, 将欧盟犬种布鲁氏菌标准阳性血清用 MENZEL 缓冲液分别做 1:25、1:50、1:100、1:200 等 4 个不同稀释度, 每个稀释度取 0.5 mL 与等量抗原混合, 混合后血清最终稀释度为 1:50、1:100、1:200、1:400。同时将制备的阳性血清用 MENZEL 缓冲液分别做 1:25、1:50、1:100、1:200、1:400、

1:600、1:800、1:1 000、1:1 200、1:1 400 等稀释度, 每个稀释度取 0.5 mL 与等量抗原混合, 混合后血清最终稀释度为 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 200、1:1 600、1:2 000、1:2 400、1:2 800。各管混匀后于 37 °C 孵育 18–24 h, 判断结果^[15]。待测血清所含国际单位=欧盟标准阳性血清所含国际单位×待测血清的凝集价÷欧盟标准阳性血清凝集价。

1.6 犬种布鲁氏菌标准阳性血清的制备定值与稳定性检验

根据 1.5 测得的阳性血清的效价, 用犬阴性血清稀释至 1 000 IU/mL, 分装冻干, 每瓶 1 mL。按 1.5 中效价测定与计算方法对冻干后的标准阳性血清定值, 其中冻干血清先用 PBS 复溶至 1 mL, 再用 MENZEL 缓冲液分别作 1:300、1:400、1:500、1:600、1:700 等 5 个稀释度, 每个稀释度取 0.5 mL 与等量抗原混合, 混合后血清最终稀释度为 1:600、1:800、1:1 000、1:1 200、1:1 400。欧盟犬种布鲁氏菌标准阳性血清的稀释和效价定值方法与 1.5 相同。待阳性血清定值后冻干保存, 随机选取规定数量的冻干品分别放 56、37 和 25 °C 温箱在规定时间内取样品分别进行试管凝集试验测定其效价。

1.7 犬种布鲁氏菌标准阳性血清标化犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原检测灵敏度

参考《中华人民共和国兽用生物制品规程(2000 年版)》^[15]方法制备犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验待标化抗原, 待标化抗原用 MENZEL 缓冲液作 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 倍稀释。将本研究制备的犬种布鲁氏菌标准阳性血清用 PBS 稀释至 80、40、20、10、5 IU/mL, 取 0.03 mL 不同稀释度血清与等量不同稀释度待标化抗原做平板凝集反应, 4 min 内观察结

果。同时设阴性血清、光滑型布鲁氏菌阳性血清、欧盟标准阳性血清作为对照。当对照阴性血清和光滑型布鲁氏菌阳性血清呈现“-”反应，欧盟标准阳性血清呈现“++++”反应时，试验成立，标准阳性血清在 80 IU/mL 呈现“+++”反应；在 40 IU/mL 呈现“++”反应；在 20 IU/mL 呈现“+”反应；在 10 IU/mL 和 5 IU/mL 呈现“-”反应时的抗原稀释度为抗原使用浓度。将抗原稀释至使用浓度即为犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原，再与上述稀释度标准阳性血清反应，确定抗原的检测灵敏度。

1.8 犬种布鲁氏菌标准阳性血清标化犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒检测灵敏度

将 1.3 制备的免疫用抗原经 200 W、20 min 超声裂解，裂解菌体蛋白经辛酸-硫酸铵纯化后，按蛋白浓度稀释至 40、20、10、5、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 分别包被酶标板，每孔 100 μL ，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 放置 16 h。用 PBST 洗涤液洗板 1 次，每孔加入 2% 牛血清白蛋白，2-8 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 24 h，PBST 洗涤液洗涤 3 次后备用。将本研究制备的犬种布鲁氏菌标准阳性血清用 PBS 稀释至 80、40、20、10、

5 IU/mL，作为样品分别加入不同浓度抗原包被酶标板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。每孔加入 100 μL 工作浓度的 HRP 标记兔抗犬 IgG，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min，PBST 洗涤液洗涤 3 次，每孔加入底物显色液 100 μL ，避光显色 15 min，每孔加入 50 μL 终止液，用酶标仪 450 nm 处读取 OD 值，计算样品 P 值。20 IU/mL 标准阳性血清的 P 值 \geq 30%；10 IU/mL 标准阳性血清的 P 值 $<$ 30%时的抗原包被浓度即为试剂盒标化的抗原浓度，按该浓度包被酶标板组装试剂盒，再用上述稀释度标准阳性血清作为样品进行检测，确定试剂盒的检测灵敏度。

1.9 犬种粗糙型布鲁氏菌补体结合试验

参照《中华人民共和国兽用生物制品规程》(2000 版)^[15]“布鲁氏菌病补体结合试验抗原与阴、阳性血清制造及检验规程”中提及的方法。基本步骤如下：将待检犬临床血清、犬阴性血清、制备的犬种布鲁氏菌阳性血清均用生理盐水做 1:10 稀释，于 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min 后，按表 1 稀释并进行试验，最后一次水浴加温 20 min 后按表 2 配制标准溶血管，并进行结果判定。

表 1 补体结合试验各试剂加样量及操作程序

Table 1 Dosage and operation procedure of each reagent for the complement fixation test

Item	The test serum		The test serum				The complement	The antigen	The hemolysin
	Test	Control	<i>Brucella canis</i> standard positive serum		Negative serum				
			Test	Control	Test	Control			
1:10 dilution of serum	50	50	50	50	50	50	None	None	None
One unit antigen	50	None	50	None	50	None	None	50	None
One unit complement	50	50	50	50	50	50	50	50	None
Normal saline	None	50	None	50	None	50	100	50	150
Water bath at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes									
The hemolysin	50	50	50	50	50	50	50	50	50
2.5% red blood cell suspension	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Water bath at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 20 minutes									
The expected result	/	-	++++	-	-	-	-	-	++++

None: 不加此项; /: 结果未知; +++++: 溶血程度 100%; -: 无溶血。

None: Do noting; /: The unknown result; -: No hemolysis.

表2 标准溶血管配制及判定标准

Table 2 Preparation and determination criteria of standard hemolytic tubes

Determination criteria	The test take number										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
100% hemolysis (μL)	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0
Normal saline	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Hemolysis degree	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
Hemolysis inhibition	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Decision symbol	-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++	++++
The criterion	Negative			Suspect			Positive				

++++: 溶血程度 100%; +++: 溶血程度 75%; ++: 溶血程度 50%; +: 溶血程度 25%; -: 无溶血。

++++: Hemolysis degree 100%; +++: Hemolysis degree 75%; ++: Hemolysis degree 50%; +: Hemolysis degree 25%; -: No hemolysis.

1.10 临床样品的检测

采用已标化的犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原、犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒对北京地区 352 份犬血清样品进行抗体检测, 比较与犬种布鲁氏菌补体结合试验之间的符合率。

2 结果与分析

2.1 种属鉴定结果

灭活抗原经 *Brucella ladder* PCR 鉴定为犬种布鲁氏菌^[16], 其扩增片段与犬种布鲁氏菌一致(图 1), 分别为 152、272、450、587、1 071 和 1 682 bp。采用 16S rRNA 基因鉴定扩增出 1 323 bp 的片段(图 2), PCR 产物经测序后提交 NCBI 进行比对, 结果与 NCBI 数据库已有的 2 株犬种布鲁氏菌 16S rRNA 基因 100%符合。

2.2 犬种布鲁氏菌标准阳性血清的效价测定及稳定性检验结果

实验用比格犬在免疫 12 周后血清效价均大于 1 000 IU/mL, 抗体效价变化曲线见图 3。4 只犬分别经静脉采血后分离血清, 血清混合后按 1.5 所述试管凝集试验方法测定血清效价为 2 400 IU/mL, 结果见表 3。用阴性血清将阳性血清稀释 2.4 倍, 分装冻干, 即为犬种布鲁氏

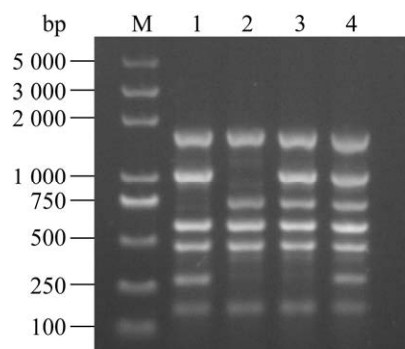


图1 *Brucella ladder* PCR 产物电泳图 M: DL5000 DNA Marker; 1: 灭活抗原; 2: 牛种布鲁氏菌 A19 疫苗; 3: 羊种布鲁氏菌 M5 疫苗; 4: 猪种布鲁氏菌 S2 疫苗。

Figure 1 Electrophoretograms of *Brucella ladder* PCR products. M: DL5000 DNA Marker; 1: Inactivated antigen; 2: *Brucella abortus* A19; 3: *Brucella melitensis* M5; 4: *Brucella suis* S2.

菌标准阳性血清。按 1.6 所述对犬种布鲁氏菌标准阳性血清的效价进行定值, 结果为 1 000 IU/mL (表 4)。将冻干的血清放入 56、37 和 25 °C 温箱进行稳定性检验, 在第 1、2、3、4、6、8 和 10 周取出进行性状和效价检验, 结果见表 5。冻干血清性状未见明显变化, 56 °C 温箱保存 3 周时效价开始逐渐下降, 37 °C 温箱保存 8 周时效价开始逐渐下降, 25 °C 温箱保存 10 周时效价开始逐渐下降。

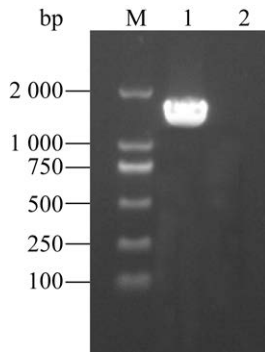


图2 16S rRNA 基因产物电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1: 灭活抗原; 2: 灭菌水阴性对照。
Figure 2 Electrophoretograms of 16S rRNA gene products. M: DL2000 DNA Marker; 1: Inactivated antigen; 2: Sterilized water negative control.

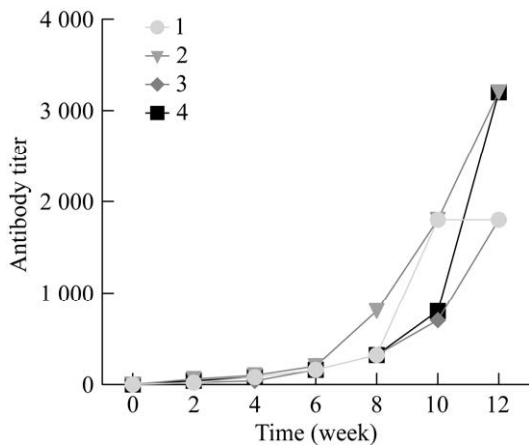


图3 实验犬免疫后抗体效价趋势图
Figure 3 Trend plots of antibody titers in experimental dogs after immunization.

2.3 犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原检测灵敏度标化结果

采用犬种布鲁氏菌标准阳性血清作为质控, 标化不同稀释度犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原, 结果待标化抗原在 1:5 稀释时与标准阳性血清在 80 IU/mL 呈现“+++”反应; 在 40 IU/mL 呈现“++”反应; 在 20 IU/mL 呈现“+”反应; 在 10 IU/mL 和 5 IU/mL 呈现“-”反应。将标化抗原按 1:5 稀释后即为犬种布鲁氏菌虎

表3 阳性血清试管凝集效价测定结果

Table 3 Results of serum agglutination test titer determination of positive serum

Dilution of serum	European Union standard positive serum	Positive serum from immunized dogs
1:50	+++	++++
1:100	++	++++
1:200	+	++++
1:400	-	++++
1:800	/	++++
1:1 200	/	++++
1:1 600	/	+++
1:2 000	/	+++
1:2 400	/	++
1:2 800	/	+

++++: 100%凝集; +++: 75%凝集; ++: 50%凝集; +: 25%凝集; -: 无凝集; /: 不涉及。当血清出现不低于 50%凝集(++)的最高稀释度即为血清凝集价。下同。

++++: 100% agglutination; +++: 75% agglutination; ++: 50% agglutination; +: 25% agglutination; -: No agglutination; /: Indicates not involved. The highest dilution of serum with no less than 50% agglutination (++) is the serum agglutination value. The same below.

表4 冻干后犬种布鲁氏菌标准阳性效价测定结果

Table 4 Results of the standard positive titer determination of *Brucella canis* after freeze-drying

Dilution of serum	European Union standard positive serum	<i>Brucella canis</i> standard positive serum
1:50	+++	++++
1:100	++	++++
1:200	+	++++
1:400	-	++++
1:600	/	++++
1:800	/	+++
1:1 000	/	++
1:1 200	/	+
1:1 400	/	-

红平板凝集试验抗原, 采用不同稀释度犬种布鲁氏菌标准阳性血清测定犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原检测灵敏度, 结果抗原与 20 IU/mL 标准阳性血清呈现“+”反应; 与 10 IU/mL 标准阳性血清呈现“-”反应, 抗原检测灵敏度为不低于 20 IU/mL (表6-表7)。

表 5 稳定性检验结果

Table 5 Stability test results

Time of preserving (weeks)	Preserving temperature (°C)					
	25		37		56	
	Character test	Titer test	Character test	Titer test	Character test	Titer test
1	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:1 000 (++)
2	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:1 000 (++)
3	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:800 (++)
4	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:600 (++)
6	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:400 (++)
8	Faint yellow	1:1 000 (++)	Faint yellow	1:800 (++)	/	/
10	Faint yellow	1:800 (++)	/	/	/	/

表 6 犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原标准化结果

Table 6 Antigen calibration results of the *Brucella* antigen for the rose bengal test

Antigen dilution ratio	Antigen solution (mL)	Add buffer volume (mL)	Titer of serum (IU/mL)				
			5	10	20	40	80
1:1	1	0	-	-	-	-	+
1:2	1	1	-	-	-	-	+
1:3	1	2	-	-	-	+	++
1:4	1	3	-	-	-	+	++
1:5	1	4	-	-	+	++	+++
1:6	1	5	-	+	+	+++	++++
1:7	1	6	+	++	++	++++	++++

++++: 出现大的凝集片或颗粒, 液体完全透明; +++: 有明显的凝集颗粒, 液体几乎完全透明; ++: 有较明显的凝集颗粒, 液体稍透明; +: 稍能见到凝集, 液体混浊; -: 无凝集, 液体均匀混浊; /: 不涉及。下同。

++++: Appear big agglutination plate or granule, the liquid is completely transparent; +++: Obvious agglutination granule and the liquid was almost completely transparent; ++: More obvious agglutination granule, and the liquid was slightly transparent; +: Agglutination can be seen slightly, and the liquid is cloudy; -: Without agglutination, the liquid was uniformly turbid; /: Not involved. The same below.

表 7 犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原检测灵敏度

Table 7 Sensitivity of antigen detection by the rose bengal test of *Brucella canis*

Titer of serum (IU/mL)	Serum			
	<i>Brucella canis</i> standard positive serum	Negative serum	Smooth <i>Brucella</i> positive serum	European Union standard positive serum
Original concentration	/	-	-	++++
5	-	/	/	-
10	-	/	/	-
20	+	/	/	+
40	++	/	/	++
80	+++	/	/	+++

2.4 犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒检测灵敏度标准化结果

采用犬种布鲁氏菌标准阳性血清作为质控, 标化犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒, 结果 10 μg/mL 包被抗原酶标板进行 ELISA 抗体检测, 20 IU/mL 标准阳性血清的 P 值≥30%; 10 IU/mL 标准阳性血清的 P 值<30%, 按该浓度包被酶标板组装试剂盒。试剂盒检测灵敏度为不低于 20 IU/mL (表 8–表 9)。

2.5 临床样品检测结果

对于来自北京地区 352 份犬血清临床样品分别使用犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原和犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒进行检测, 与犬种布鲁氏菌补体结合试验结果进行比对, 结果见表 10–表 11。犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原检出 22 份阳性样品, 阳性率 6.25%; 犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒检出 21 份阳性样品, 阳性率 5.97%; 犬种布鲁氏菌补体结合试验检出 22 份阳性样品, 阳性率 6.25% (表 12)。本研究标化的犬种布鲁氏

表 8 犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒标准化结果

Table 8 Standardized results of the *Brucella canis* indirect ELISA antibody detection kit

Concentration of coated antigen (μg/mL)	Titer of serum (IU/mL)				
	80	40	20	10	5
40.0	69%	43%	21%	10%	3%
20.0	72%	46%	26%	9%	4%
10.0	87%	65%	32%	14%	8%
5.0	94%	89%	67%	34%	15%
2.5	97%	90%	73%	40%	26%

当 P 值≥30%时, 判定为犬种布鲁氏菌抗体阳性; 当 P 值<30%时, 判定为犬种布鲁氏菌抗体阴性。下同。

P value≥30%, as antibody positive for *Brucella canis*; P value<30% as antibody negative for *Brucella canis*. The same below.

表 9 犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒检测灵敏度

Table 9 Detection sensitivity of the *Brucella canis* indirect ELISA antibody detection kit

Titer of serum (IU/mL)	Test results (%)
Original concentration	96
5	8
10	15
20	34
40	62
80	85

表 10 犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒与虎红平板凝集试验检测结果符合率

Table 10 The coincidence rate of the *Brucella canis* indirect ELISA antibody detection kit and the rose bengal test

The rose bengal test for <i>Brucella canis</i>	The <i>Brucella canis</i> indirect ELISA antibody detection kit		Total
	P	N	
P	14	8	22
N	7	323	330
Total	21	331	352
Coincidence rate (14+323)/352=95.74%			

P 为阳性; N 为阴性。下同。

P: Positive; N: Negative. The same below.

表 11 虎红平板凝集试验与补体结合试验检测结果符合率

Table 11 The coincidence rate of the rose bengal test for *Brucella canis* and the complement fixation test

The complement fixation test	The rose bengal test for <i>Brucella canis</i>		Total
	P	N	
P	12	10	22
N	10	320	330
Total	22	330	352
Coincidence rate (12+320)/352=94.31%			

菌虎红平板凝集试验抗原和犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒的符合率最高为 95.74%。两种方法与犬种布鲁氏菌补体结合试验的符合率分别为 94.31%和 94.60%。

表 12 犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒与补体结合试验检测结果符合率

Table 12 The coincidence rate of the *Brucella canis* indirect ELISA antibody detection kit and the complement fixation test

The complement fixation test	The <i>Brucella canis</i> indirect ELISA antibody detection kit		Total
	P	N	
P	12	10	22
N	9	321	330
Total	21	331	352
Coincidence rate	(12+321)/352=94.60%		

3 讨论

犬的布鲁氏菌病虽然偶见光滑型表型的羊种布鲁氏菌感染犬的报道,但仍主要由粗糙型表型的犬种布鲁氏菌引起。由于犬布病在感染后的症状不明显,感染犬往往是在宠物医院治疗其他疾病或是在怀孕后期出现流产等症状时才被发现,所以犬布病相较于牛羊布病来说,大众的关注度和警惕性都较低。人感染犬种布鲁氏菌的病例较少,多呈阴性感染,但感染后会出现包括间歇性发热、寒战、出汗、食欲不振、体重减轻、疲劳、头痛、背痛或关节疼痛等症状,严重者会出现心内膜炎、动脉瘤、腹膜炎、关节炎、骨脊髓炎和硬膜外脓肿^[17-19],由于临床症状多为非特异性症状,易与其他疾病混淆,所以相较于牛羊布病,犬布病的公共卫生风险更高。这主要是由于犬类尤其是宠物犬与人类的接触更为紧密,而犬在感染布鲁氏菌后菌血症持续时间可长达数月,尿液等排泄物中均能分离到活菌,加之犬类动物有着排尿进行信号标记的行为,使得布鲁氏菌的传染风险和散布范围更加广泛和持续^[20-22]。近年来随着我国城市化进程的加快,城市宠物犬的数量急剧增长,导致犬布病成为不容忽视的伴侣动物人兽共患病^[23]。

相较于牛羊布病,我国适用于犬种布病的诊断方法十分匮乏,仍以凝集类试验的血清学诊断为主。目前国内常用的犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验和试管凝集试验等方法由于方法本身的敏感性与特异性不高,常常导致假阳性或假阴性。国际上常用的犬种布鲁氏菌琼扩试验、ELISA 方法等又未收录在相关国家标准或兽药典中。导致犬种布病诊断中除了进行病原学鉴定外,缺乏能够准确诊断的血清学方法与试剂,所以制备和标定犬种布鲁氏菌标准阳性血清对于犬种布病新型诊断试剂的开发十分必要。

本研究中实验比格犬经 6 次免疫抗体效价才达到不低于 1 000 IU/mL 的要求,粗糙型布鲁氏菌抗体的产生速度和效价低于光滑型布鲁氏菌抗体^[24]。这可能与粗糙型布鲁氏菌的脂多糖(LPS)结构不完整有关,导致动物机体抗体产生时间晚且效价较低^[25]。欧盟犬种布鲁氏菌标准阳性血清的效价仅有 100 IU/mL,也进一步表明高效价犬种布鲁氏菌阳性血清制备存在一定难度。而本研究中采用多次加强免疫的方式将血清效价提升至 2 000 IU/mL 以上,远远高于国际上同类制品。

由于在全球范围内针对犬种布病的研究较少,WOAH 也无犬种布鲁氏菌病诊断技术标准^[26],导致针对该病的诊断方法少,并且敏感性和特异性相对较差。不同方法之间的检测灵敏度相差较大,缺乏统一的标准物质定值,导致不同方法检测结果各异,降低了临床诊断的准确性。而本研究提供了一种可用于标化不同犬种布鲁氏菌病诊断方法的标准阳性血清,通过该血清标化犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原和犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒,使 2 种方法的检测灵敏度一致,均为 20 IU/mL。同时借鉴 WOA 收录的绵羊附睾种(粗糙型)布鲁氏菌补体结合试验的试验步骤进行了犬种布鲁氏

菌补体结合试验^[27], 采用 3 种方法对北京地区临床犬血清进行犬种布鲁氏菌抗体检测, 3 种检测方法符合率超过 90%, 个体阳性率在 6% 以上, 其中采用标准阳性血清标化的犬种布鲁氏菌虎红平板凝集试验抗原和犬种布鲁氏菌间接 ELISA 抗体检测试剂盒检测结果的符合率最高(95.74%)。

4 结论

本研究中临床犬血清的阳性率结果也表明北京地区犬种布病流行情况已较为严重, 应进一步加强流行病学的监测, 采取必要的防治措施。目前尚无针对犬种布鲁氏菌病的疫苗可用, 而对于犬的抗菌治疗不能保证完全清除细菌, 并且感染复发的报道频繁, 增加了抗生素耐药性发展的风险。虽然有报道指出, 在几乎所有的欧洲国家都可检测到犬种布鲁氏菌^[28-29], 但目前尚无系统地监测犬种布病的文献报道。相较于欧洲国家, 我国在相关方面的关注程度和防控力度更低, 亟须引起重视, 并加强完善相关法律法规和技术规范^[30]。

致谢

感谢北京邦卓生物科技有限公司皮向成先生惠赠犬布病光滑型阳性血清。

REFERENCES

- [1] SOLER-LLORÉNS PF, QUANCE CR, LAWHON SD, STUBER TP, EDWARDS JF, FICHT TA, ROBBE-AUSTERMAN S, O'CALLAGHAN D, KERIEL A. A *Brucella* spp. isolate from a pac-man frog (*Ceratophrys ornata*) reveals characteristics departing from classical brucellae[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2016, 6: 116.
- [2] SANTOS RL, SOUZA TD, MOL JPS, ECKSTEIN C, PAIXÃO TA. Canine brucellosis: an update[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 594291.
- [3] de OLIVEIRA ALB, de MACEDO GC, ROSINHA GMS, MELGAREJO JL, ALVES AGL, BARRETO WTG, SANTOS FM, CAMPOS JBV, HERRERA HM, de OLIVEIRA CE. Detection of *Brucella* spp. in dogs at Pantanal Wetlands[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2019, 50(1): 307-312.
- [4] COSFORD KL. *Brucella canis*: an update on research and clinical management[J]. *The Canadian Veterinary Journal*, 2018, 59(1): 74-81.
- [5] PAPPAS G, PAPADIMITRIOU P, AKRITIDIS N, CHRISTOU L, TSIANOS EV. The new global map of human brucellosis[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2006, 6(2): 91-99.
- [6] DI DD, CUI BY, WANG H, ZHAO HY, PIAO DR, TIAN LL, TIAN GZ, KANG JL, MAO X, ZHANG XJ, DU PF, ZHU L, ZHAO Z, MAO LL, YAO WQ, GUAN PY, FAN WX, JIANG H. Genetic polymorphism characteristics of *Brucella canis* isolated in China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84862.
- [7] BOERI EJ, MADARIAGA MJ, DOMINGUEZ ML, TEIJEIRO ML, FERNANDEZ NM, ELENA SA, TRANGONI MD. *Brucella canis* group 2 isolated in Argentina[J]. *Revista Argentina de Microbiologia*, 2021, 53(2): 98-103.
- [8] SEBZDA MK, KAUFFMAN LK. Update on *Brucella canis*: understanding the past and preparing for the future[J]. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 2023, 53(5): 1047-1062.
- [9] McGETTIGAN S. Risk of *Brucella canis* via importation[J]. *Veterinary Record*, 2023, 193(2): 84.
- [10] 王秀丽, 蒋玉文, 毛开荣, 丁家波, 王秋菊, 何宇, 彭小兵. 布鲁氏菌病实验室诊断方法的研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2011, 45(11): 37-42.
- [11] WANG XL, JIANG YW, MAO KR, DING JB, WANG QJ, HE Y, PENG XB. Research progress on laboratory diagnosis techniques on brucellosis[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2011, 45(11): 37-42 (in Chinese).
- [12] STRANAHAN LW, ARENAS-GAMBOA AM. When the going gets rough: the significance of *Brucella* lipopolysaccharide phenotype in host-pathogen interactions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 713157.
- [13] SHAKIR R. Brucellosis[J]. *Neurological Sciences*, 2021, 420: 117280.
- [14] McGIVEN J, TAYLOR A, DUNCOMBE L, SAYERS R, ALBERT D, BANAI M, BLASCO JM, ELENA S, FRETIN D, GARIN-BASTUJI B, MELZER F, MUÑOZ PM, NIELSEN K, NICOLA A, SCACCHIA M, TITTARELLI M, TRAVASSOS DIAS I, WALRAVENS K, STACK J. The first international standard anti-*Brucella melitensis* serum[J]. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 2011, 30(3): 809-819.
- [15] BRICKER BJ, HALLING SM. 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.
- [16] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典-三部: 2020年版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [17] Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. *Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (three): 2020 edition*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020 (in Chinese).
- [18] LÓPEZ-GOÑI I, GARCÍA-YOLDI D, MARÍN CM, de MIGUEL MJ, BARQUERO-CALVO E, GUZMÁN-VERRI C, ALBERT D, GARIN-BASTUJI B. 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.
- [17] SOLERA J. Update on brucellosis: therapeutic challenges[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2010, 36(Suppl 1): S18-S20.
- [18] BODUR H, ERBAY A, COLPAN A, AKINCI E. *Brucella spondylitis*[J]. *Rheumatology International*, 2004, 24(4): 221-226.
- [19] ESMAEILNEJAD-GANJI SM, ESMAEILNEJAD-GANJI SMR. Osteoarticular manifestations of human brucellosis: a review[J]. *World Journal of Orthopedics*, 2019, 10(2): 54-62.
- [20] BORIE C, GALARCE N. *Brucella canis*[J]. *Revista Chilena De Infectologia*, 2015, 32(2): 219-20.
- [21] BOYDEN P. Should we be doing more about *Brucella canis*?[J]. *Veterinary Record*, 2022, 191(2): 82.
- [22] BOYDEN P. Testing for *Brucella canis*[J]. *Veterinary Record*, 2022, 191(12): 503.
- [23] Veterinary Record Press. *Brucella canis* cases showing year-on-year increase[R]. *Veterinary Record*, 2023, 192: 465-465.
- [24] CAPORALE V, BONFINI B, Di GIANNATALE E, Di PROVVIDO A, FORCELLA S, GIOVANNINI A, TITTARELLI M, SCACCHIA M. Efficacy of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 compared to the reference vaccine *Brucella abortus* strain 19 in water buffalo[J]. *Veterinaria Italiana*, 2010, 46(1): 13-19, 5-11.
- [25] WANKE MM. Canine brucellosis[J]. *Animal Reproduction Science*, 2004, 82/83: 195-207.
- [26] DJOKIC V, FREDDI L, de MASSIS F, LAHTI E, van den ESKER MH, WHATMORE A, HAUGHEY A, FERREIRA AC, GAROFOLO G, MELZER F, SACCHINI F, KOETS A, WYLLIE S, FONTBONNE A, GIRAULT G, VICENTE AF, McGIVEN J, PONSART C. The emergence of *Brucella canis* as a public health threat in Europe: what we know and what we need to learn[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2023, 12(2): 2249126.
- [27] World Organization for Animal Health. *Terrestrial Manual: Ovine Epididymitis (Brucella ovis)* (Chapter 3.8.7)[M]. WOA, 2018.
- [28] KOLWIJCK E, LUTGENS SPM, VISSER VXN, van APELDOORN MJ, GRAHAM H, KOETS AP, SCHRAUWEN MMWP, REUBSAET FAG, BROENS EM, KORTBEEK LM. First case of human *Brucella canis* infection in the Netherlands[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2022, 75(12): 2250-2252.
- [29] de MASSIS F, SACCHINI F, AVERAIMO D, GAROFOLO G, LECCHINI P, RUOCCO L, LOMOLINO R, SANTUCCI U, SGARIGLIA E, CROTTI S, PETRINI A, MIGLIORATI G, D'ALTERIO N, GAVAUDAN S, TITTARELLI M. First Isolation of *Brucella canis* from a breeding kennel in Italy[J]. *Veterinaria Italiana*, 2021, 57: 3.
- [30] 盖文燕, 齐茜, 刘平. 犬布鲁氏菌病的流行现状与防控建议[J]. *中国动物保健*, 2023, 25(7): 9-10.