

2308、M28、S1330、16M 四株布鲁氏菌灭活参数研究

朱良全¹ 王芳¹ 吴竞² 冯宇³ 张金亚¹ 王楠¹ 朱鸿飞^{2*} 丁家波^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所 北京 100081)

(2. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所 北京 100193)

(3. 山东农业大学 动物科技学院 山东 泰安 271018)

摘 要:【目的】比较不同灭活方法对布鲁氏菌灭活的效果, 确定灭活参数, 为制备布鲁氏菌灭活抗原提供参考。【方法】将4株布鲁氏菌参考强毒株2308(牛种)、M28(羊种)、S1330(猪种)以及16M(羊种)分别经大豆酶消化蛋白胨(TSA)培养基培养繁殖后, 用生理盐水制成 $(4-8) \times 10^{10}$ CFU/mL的菌悬液, 分成等份于80℃灭活不同时间, 另将同样浓度的菌悬液分别用不同浓度甲醛于37℃灭活不同时间, 通过灭活检验, 确定灭活效果。取经甲醛和热灭活的16M抗原, 分别以 1×10^{10} CFU/只剂量皮下注射1.5-2.0 kg家兔2只, 免疫6周内, 每周采血用虎红平板凝集试验(RBT)和试管凝集试验(SAT)测定抗体效价。【结果】80℃、5 min可灭活2308、S1330和16M三种菌株, 80℃、10 min可灭活全部4种菌株。0.2%甲醛灭活7 d, 4种试验菌株均不能被彻底灭活; 0.4%甲醛在12 h内只能灭活16M, 72 h可灭活M28; 0.4%甲醛灭活2308和S1330两次试验结果差异较大。0.6%甲醛可在72 h内灭活4种试验菌。不同方法灭活的16M抗原免疫家兔后, 其血清抗体虎红平板凝集和试管凝集效价消长趋势基本一致, 甲醛灭活的抗原免疫原性略高于热灭活抗原。【结论】80℃热灭活和0.6%甲醛灭活均可用于对布鲁氏菌的灭活, 且不影响布鲁氏菌的免疫原性。

关键词: 布鲁氏菌, 灭活, 加热, 甲醛, 参数

基金项目: 国家863计划项目(No. 2012AA101302); 北京市科技新星计划项目(No. XX2013099)

*通讯作者: 朱鸿飞: Tel: 86-10-62819061; ✉: bioclub@vip.sina.com

丁家波: Tel: 86-10-62103675; ✉: dingjiabo@126.com

收稿日期: 2014-05-21; 接受日期: 2014-06-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-07-08

Comparison of the inactivation parameter of four *Brucella* strains *B. abortus* 2308, *B. melitensis* M28, *B. suis* S1330 and *B. melitensis* 16M

ZHU Liang-Quan¹ WANG Fang¹ WU Jing² FENG Yu³ ZHANG Jin-Ya¹
WANG Nan¹ ZHU Hong-Fei^{2*} DING Jia-Bo^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

(2. Institute of Animal Sciences of CAAS, Beijing 100193, China)

(3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agriculture University,
Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: [Objective] To define and compare the parameters for the heat and formaldehyde inactivation of *Brucella* strains, and provide information for preparation of *Brucella* inactivated antigen. [Methods] The four *Brucella* virulent reference strains 2308 (*B. abortus*), M28 (*B. melitensis*), S1330 (*B. suis*) and 16M (*B. melitensis*) were cultivated in TSA media, and the harvested culture were resuspended to a concentration of $(4-8) \times 10^{10}$ CFU/mL by saline. Then the suspension was divided into the equal two parts for heat inactivation at 80 °C for different time or formaldehyde inactivation at different concentration and for different time at 37 °C, and the inactivation effects for the two methods were compared. The rabbits of 1.5–2.0 kg were subcutaneously inoculated with the heat or formaldehyde inactivated 16M antigen at the dosage of 1×10^{10} CFU/mL. The serum antibody titer was measured weekly during six weeks post inoculation by Rose Bengal test (RBT) and Serum agglutination test (SAT). [Results] It takes 5 min to inactivate *Brucella* strains 2308, S1330 and 16M by heating at 80 °C, and 10 min for all four strains. The four *Brucella* strains could not be completely inactivated while incubated in 0.2% formaldehyde even for 7 days. The strains 16M and M28 could be inactivated thoroughly via incubation in 0.4% formaldehyde for 12 or 72 hours, respectively. Although the effect varied for the inactivation of strains 2308 and S1330 in two independent experiments, the four strains could be entirely inactivated by incubation in 0.6% formaldehyde for 72 hours. The fluctuation trends were almost consistent for the stimulated serum antibodies against the two heat or formaldehyde inactivated 16M antigens. Moreover, the antibody titer against the formaldehyde inactivated antigen was slightly better than that against the heat inactivated antigen. [Conclusion] Heat inactivation at 80 °C and inactivation in 0.6% formaldehyde could be used to prepare *Brucella* inactivated antigen and did not change the immunogenicity of *Brucella*.

Keywords: *Brucella*, Inactivation, Heat, Formaldehyde, Parameters

布鲁氏菌病(Brucellosis)简称布病,是由布鲁氏菌属细菌引起的以感染家畜为主的人畜共患传染病。世界动物卫生组织(OIE)将其列为多种动物疫病,我国将其列为二类动物疫病。据统计资料表明,全世界每年因布鲁氏菌病造成的经济损失近 30 亿美元。对于布病防控,我国主要采取检疫淘汰与免疫相结合的策略^[1]。

由于布鲁氏菌能引起严重的生物安全问题,菌体灭活是进行抗原生产和开展研究的重要一步,如制造补体结合试验抗原、平板/试管凝集试验抗原,

制备溶血素、布鲁氏菌阳性血清及提取脂多糖等。灭活可分为物理灭活和化学灭活两类。热灭活是常用的一种物理灭活方法,其机理在于高热处理微生物时,可对菌体蛋白质、核酸、酶系统等产生直接破坏作用,热力可使蛋白质中的氢键破坏使之变性或凝固,使双股 DNA 分开为单股,受热而活化的核酸酶使单股 DNA 断裂,导致菌体死亡^[2]。它最早由 Smith 等研制猪霍乱灭活菌苗时提出,后在研制淋球菌苗时(56 °C 灭活 1 h)发现热灭活容易发生菌体蛋白变性,一般很少用^[3-4]。甲醛灭活是最传统的

化学灭活方法,我国《兽用生物制品规程》(2000年版)(以下简称《规程》)^[5]中 26 种灭活疫苗,均以甲醛为灭活剂。其主要作用机理在于甲醛的醛基能与蛋白质的 ε 氨基交联产生羟甲基胺,作用于羧基形成亚甲基二醇单酯,作用于羟基形成羟基甲酚,作用于巯基形成亚甲基二醇,上述反应生成的羟甲基等代替敏感的氢原子,破坏生命的基本结构,导致微生物死亡^[6]。

而我国现有的布鲁氏菌生物制品仍采用热灭活进行,但热灭活温度及时间与 OIE 不统一^[5,7-8]。如:制备布鲁氏菌病补体结合试验抗原、试管及平板凝集试验抗原等通常采用 70–80 °C 水浴灭活 1 h;而 OIE 标准中制备抗原时通常采用 80 °C 灭活 1.5 h。对于甲醛灭活布鲁氏菌,未见系统报道^[9-10]。

关于布鲁氏菌抗体(抗血清)制备进展,在国内外几无相关研究报道,主要原因在于布病的抗血清主要用途在于作为诊断用的阳性参照,均有由专门/法定的供应单位提供^[5,7-8]。作为布病诊断用的各种抗原(如试管凝集试验抗原,虎红平板凝集抗原,乳环抗原等)有不少生产单位,另外众多布病的研究单位,往往也涉及布鲁氏菌(抗原)的培养,当然也不可避免地遇到抗原的灭活问题。为明确布鲁氏菌灭活参数,我们选择 4 种布鲁氏菌参考强毒株进行灭活比较,并进一步研究了不同灭活抗原的免疫原性,为研究单位和生产企业制备灭活抗原及阳性血清提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株及来源:牛种布鲁氏菌 2308 株(CVCC788)、羊种布鲁氏菌 M28 株(CVCC70003)、猪种布鲁氏菌 S1330 株(CVCC70524)、羊种布鲁氏菌 16M 株(CVCC70002)均来自国家兽医微生物菌种保藏中心。

1.1.2 培养基:蛋白胨水、生理盐水等由中国兽医药品监察所参照《规程》^[5]制备。大豆酶消化蛋白胨汤(Tryptic soy broth, TSB)及大豆酶消化蛋白胨琼

脂(Tryptic soy agar, TSA)培养基,购自 BD 公司;甲醛溶液,分析纯,购自广东汕头市西陇化工厂。

1.1.3 试剂:布鲁氏菌病虎红平板凝集试验抗原(规格:15 mL/瓶;批号:201301);布鲁氏菌病试管凝集试验抗原参考品(规格:5 mL/瓶;批号:S0100220130312)。布鲁氏菌病阳性血清(规格:1 mL/瓶;批号:2001-5);布鲁氏菌病试管凝集试验阴性血清(规格:1 mL/瓶;批号:2001-5)。均由中国兽医药品监察所人畜共患病实验室提供。

1.1.4 家兔:大耳白,体重 1.5–2.0 kg,普通级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.2 方 法

1.2.1 种子制备:取 2308、M28、S1330、16M 菌株冻干用菌种各 1 支,分别启封后,用 1 mL 蛋白胨水稀释,参考 OIE 方法^[8]划线接种 TSA 琼脂平板各 2 块,37 °C 培养 72 h,低倍显微镜观察各平板菌落形态,各典型菌落分别选取 10 个划线接种 TSA 琼脂斜面 3 支,置 2–8 °C 保存不超过 1 月,备用。

1.2.2 细菌悬液的制备:分别将各布鲁氏菌菌株密集划线接种于 TSA 琼脂扁瓶,置 37 °C 培养 48–72 h,按每块扁瓶用 3–5 mL 生理盐水冲洗培养物制成悬液,经 4 层灭菌纱布过滤,去除残留琼脂,充分混匀后,取出 2 mL 菌液按现行《中国兽药典》^[7]进行活菌计数,其余菌液平均分成两等份,分别进行热灭活及甲醛灭活试验。

1.2.3 热灭活试验:取 4 组培养后待灭活菌液 100 mL 以 80 °C 水浴分别灭活 5、10、20、40、60、90 及 120 min,在上述间隔时间点,分别取适量灭活菌液,用 TSA 琼脂依照《规程》^[5]进行灭活检验。另取 0.2 mL 灭活菌液接种 10 mL TSB 中,以 37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 后,再取适量培养液参考 OIE 法^[7]接种 TSA 琼脂,37 °C 培养 2 周,观察是否有菌落生长。

1.2.4 甲醛灭活试验:取 4 组培养后待灭活菌液 100 mL,分别加入 10%甲醛溶液,使其终浓度分别达 0.2%、0.4%及 0.6%,37 °C 灭活 7 d,每隔 12 h

振摇一次,分别于 12、24、48、72、96、120、144 及 168 h 取适量灭活菌液,用 TSA 琼脂依照《规程》^[5]进行灭活检验。另取 0.2 mL 灭活菌液接种 10 mL TSB 中,以 37 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 后,再取适量培养液参考 OIE 法^[7]接种 TSA 琼脂,37 °C 培养 2 周,观察是否有菌落生长。

1.2.5 动物免疫及血清抗体消长规律监测: (1) 种子及细菌悬液制备。选取 16M 菌株为代表,其种子、细菌悬液制备及活菌计数按 1.2.1 和 1.2.2 进行。(2) 灭活。将上述菌液均分成两份,为保证灭活效果,一份以 80 °C 灭活 2 h;另一份以 0.6%甲醛灭活 120 h,分别取样按 1.2.3 和 1.2.4 项进行灭活检验。灭活后样品置 2–8 °C 保存备用。(3) 动物免疫及血清分离。将灭活检验合格的 16M 两种抗原,分别用生理盐水稀释至 1×10^{10} CFU/mL 的菌液浓度,颈背部皮下注射 1.5–2.0 kg 家兔 2 只,1 mL/只。免疫后 6 周内,每周兔耳缘静脉采血 1 次,2 mL/次,常规方法分离血清。(4) 血清效价测定。采用虎红平板凝集试验和微量试管凝集试验进行。1) 虎红平板凝集试验。将待检血清用生理盐水做 5 倍稀释,然后进行倍比稀释至 640 倍,取各被检血清 0.03 mL 与布鲁氏菌病虎红平板凝集试验抗原 0.03 mL 混合,于 4 min 内观察结果。结果判定参照《规程》^[5]进行。并设立同条件下阴阳性血清对照。2) 微量试管凝集试验。参照 OIE 法^[8]进行,将待检血清用 0.5%苯酚生理盐水做 10 倍稀释,然后进行倍比稀

释至 5 120 倍,在 96 孔微量凝集板中加入待检血清 50 μ L,然后加入用 0.5%苯酚生理盐水作 1:20 稀释的布鲁氏菌病试管凝集试验抗原参考品,37 °C 孵育 22 h,观察结果,并设立同条件下阴阳性血清对照。

2 结果与分析

2.1 细菌悬液制备

牛种 2308、羊种 16M 和猪种 S1330 为国际上常用的布鲁氏菌强毒参考株^[11],而我国一直使用自行分离的 M28 作为羊种布鲁氏菌强毒株^[5]。布鲁氏菌 2308、M28、S1330、16M 在接种 TSA 琼脂培养 48 h 均出现可见菌落,但 S1330 菌落个体较大,2308、M28、16M 个体基本一致。经冲洗计数后菌体悬液均在 1×10^{11} CFU/mL 以上。

2.2 热灭活

本实验参考《规程》^[5]中菌液浓度,如制备试管凝集试验抗原的菌体浓度约为 4×10^{10} CFU/mL,制备补体结合试验抗原的菌体浓度约为 8×10^{10} CFU/mL。通过对 2308、M28、S1330 及 16M 等 4 株不同参考菌株进行灭活,从表 1 结果看出,4 种布鲁氏菌菌液浓度约为 $(4-8)\times10^{10}$ CFU/mL 时,80 °C 灭活 5 min,有 3 株菌(2308、S1330、16M)灭活,而 80 °C 灭活 10 min,4 种菌株全部灭活。采用 2 个浓度菌液进行热灭活,两者结果一致,可能由于菌体浓度处于同一数量级,两者之间差别小的缘故。

表 1 热灭活试验结果 Table 1 The results of heat inactivation									
试验次数 Test number	菌株 Strain	活菌数 Viable bacterial count ($\times10^{10}$ CFU/mL)	80 °C 灭活时间 Time at 80 °C (min)						
			5	10	20	40	60	90	120
第一次 No. 1	2308	3.7	–	–	–	–	–	–	–
	M28	3.9	+	–	–	–	–	–	–
	S1330	3.6	–	–	–	–	–	–	–
	16M	4.6	–	–	–	–	–	–	–
第二次 No. 2	2308	8.1	–	–	–	–	–	–	–
	M28	8.5	+	–	–	–	–	–	–
	S1330	8.2	–	–	–	–	–	–	–
	16M	8.8	–	–	–	–	–	–	–

注: +: 代表灭活不完全,有菌生长; –: 代表灭活完全,无菌生长。
Note: +: The incomplete inactivation, and some bacteria growth; –: The complete inactivation, and no bacteria growth.

2.3 甲醛灭活

适当浓度甲醛可使微生物丧失增殖力或毒性，而保持抗原性和免疫原性；高浓度会破坏、杀死微生物。甲醛用于疫苗灭活的浓度为 0.1%–0.8%^[1,4]。从表 2 看出，4 种布鲁氏菌菌液浓度约为 (4–8)×10¹⁰ CFU/mL 时，采用 0.2%甲醛灭活 7 d，均不能完全灭活菌体。而采用 0.4%甲醛，16M 在 12 h 即能灭活，M28 需 72 h；但 2308 及 S1330 在两个浓度下运用 0.4%甲醛灭活结果差异大，在 4×10¹⁰ CFU/mL

时，2308 采用 0.4%甲醛灭活需 12 h，S1330 需 96 h，而 8×10¹⁰ CFU/mL 时，2308 采用 0.6%甲醛灭活需 48 h，S1330 需 72 h。因此，0.6%甲醛可在 72 h 内灭活 4 种试验菌。

2.4 两种灭活抗原免疫兔血清抗体消长规律的变化

通过经甲醛和热灭活的 16M 抗原免疫家兔，监测其产生的血清抗体消长情况。从虎红平板凝集试验结果(表 3 和图 1)，以及试管凝集试验结果(图 2 和表 4)

表 2 甲醛灭活试验结果											
Table 2 The results of formaldehyde inactivation											
试验次数 Test number	甲醛终浓度 Formaldehyde final concentration (%)	菌株 Strain	活菌数 Viable bacterial count ($\times 10^{10}$ CFU/mL)	甲醛灭活时间 Time of formaldehyde inactivation (h)							
				12	24	48	72	96	120	144	168
第一次 No. 1	0.2	2308	3.7	+	+	+	+	+	+	+	+
		M28	3.9	+	+	+	+	+	+	+	+
		S1330	3.6	+	+	+	+	+	+	+	+
		16M	4.6	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.4	2308	3.7	—	—	—	—	—	—	—	—
		M28	3.9	+	+	+	—	—	—	—	—
		S1330	3.6	+	+	+	+	—	—	—	—
		16M	4.6	—	—	—	—	—	—	—	—
第二次 No. 2	0.2	2308	8.1	+	+	+	+	+	+	+	+
		M28	8.5	+	+	+	+	+	+	+	+
		S1330	8.2	+	+	+	+	+	+	+	+
		16M	8.8	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.4	2308	8.1	+	+	+	+	+	+	+	+
		M28	8.5	+	+	+	—	—	—	—	—
		S1330	8.2	+	+	+	+	+	+	+	+
		16M	8.8	—	—	—	—	—	—	—	—
	0.6	2308	8.1	+	+	—	—	—	—	—	—
		S1330	8.2	+	+	+	—	—	—	—	—

注：+：代表灭活不完全，有菌生长；–：代表灭活完全，无菌生长。
Note: +: Represents the incompleted inactivation, and some bacteria growth; –: Represents the completed inactivation, and no bacteria growth.

表 3 两种 16M 灭活抗原免疫兔不同时间血清抗体虎红平板凝集效价							
Table 3 The change of rabbit antibody titer with time against two inactivated 16M antigen detected by RBT							
试验次数 Test number	分组 Group	时间(周) Time (weeks)					
		1	2	3	4	5	6
第一次 No. 1	甲醛灭活 Formaldehyde inactivation	80	640	320	160	160	20
	热灭活 Heat inactivation	160	320	160	20	20	10
第二次 No. 2	甲醛灭活 Formaldehyde inactivation	80	640	320	160	160	20
	热灭活 Heat inactivation	160	320	160	20	20	10
第三次 No. 3	甲醛灭活 Formaldehyde inactivation	160	320	640	320	160	40
	热灭活 Heat inactivation	160	320	160	40	40	10

注：表中数值为产生凝集反应“+”的血清最小稀释度。
Note: The number of Table 3 represents the lowest dilution fold at the reaction “+”.

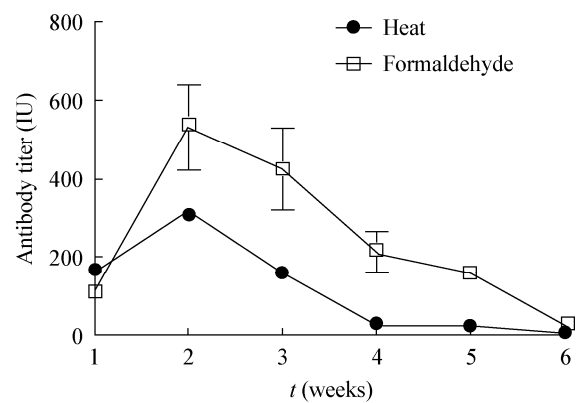


图 1 两种 16M 灭活抗原免疫兔血清虎红平板凝集效价变化图

Figure 1 The change of rabbit antibody titer against two inactivated 16M antigen detected by RBT

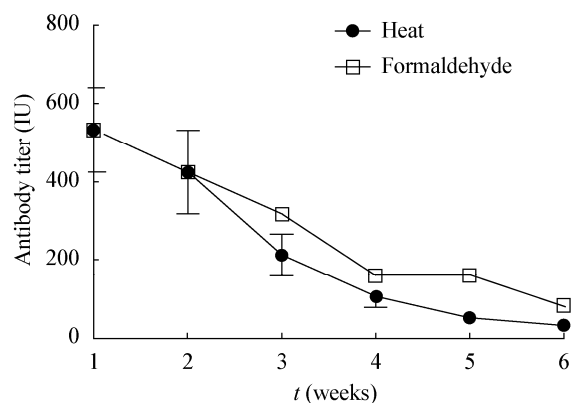


图 2 两种 16M 灭活抗原免疫家兔血清试管凝集效价变化图

Figure 2 The change of rabbit antibody titer against two inactivated 16M antigen detected by SAT

表 4 两种 16M 灭活抗原免疫兔不同时间血清抗体试管凝集效价							
Table 4 The change of rabbit antibody titer with time against two inactivated 16M antigen detected by SAT							
试验次数 Test number	分组 Group	时间(周) Time (weeks)					
		1	2	3	4	5	6
第一次 No. 1	甲醛灭活 Formaldehyde inactivation	640	320	320	160	160	80
	热灭活 Heat inactivation	640	320	160	80	40	40
第二次 No. 2	甲醛灭活 Formaldehyde inactivation	640	320	320	160	160	80
	热灭活 Heat inactivation	640	320	160	80	40	40
第三次 No. 3	甲醛灭活 Formaldehyde inactivation	320	640	320	160	160	80
	热灭活 Heat inactivation	320	640	320	160	80	20

注：表中数值为产生凝集反应(++)的血清最小稀释度。

Note: The number of Table 4 represents the lowest dilution fold at the reaction “++”.

可以看出，两种灭活方式制备的抗原均能有效产生抗体应答，其免疫兔后产生的血清抗体效价消长趋势基本一致，而且甲醛灭活抗原产生抗体水平略优于热灭活抗原。另外由于虎红平板凝集试验与试管凝集试验检测血清抗体效价机理不一致^[2]，因而同样的血清两者抗体效价呈不完全正相关，第 1 周热灭活抗原产生的虎红平板凝集抗体效价高于甲醛灭活，而两者试管凝集抗体效价一致。上述结果说明两种灭活方式不影响菌体的免疫原性，甲醛灭活略优于热灭活。

3 讨论

(1) 因布鲁氏菌是需氧胞内寄生菌，增长速度

慢^[2]。将灭活菌液直接接入适宜培养基斜面(胰蛋白胨琼脂或 TSA)^[5,8]，观察是否灭活完全，与经适宜液体培养基(胰蛋白胨汤或 TSB)扩增培养后，再接入适宜培养基斜面进行检验相比，虽然最终结果相同，但发现将灭活菌液直接接入 TSA 斜面，通常需 37℃ 培养 10 d 才能观察到是否有布鲁氏菌菌落生长，这与 OIE 报道基本一致^[8]；而通过扩增培养后再检验，一般 5 d 就能获得直接结果。

(2) 热力灭菌通常分干热和湿热灭菌两大类，在同一温度下，后者的效力比前者大^[2]。另蛋白质含水量愈高，凝固所需温度越低，如蛋白质含水量为 25%，蛋白质在 30 min 内凝固需要 74–80℃；而

含水量为 50% 时, 仅需要 56 °C^[2]。本实验室热灭活试验结果是在含有密封盖的 80 °C 水浴锅中获得, 从而保证了流通蒸汽条件下灭活菌液处于 80 °C 绝对恒温, 结论中 80 °C 灭活无论 1 h 还是 1.5 h, 均可使菌体灭活。有趣的是, 我们课题组曾经发现, 如水浴锅盖打开, 盛装菌液虽然浸泡在 80 °C 水浴锅中, S1330 及 16M 灭活 1 h, 菌体不能灭活完全, 而需要 1.5 h 才能灭活完全(未发表数据)。而甲醛灭活时, 虽然两次试验结果有差异, 但对于 8×10^{10} CFU/mL 的 2308 和 S1330 在 0.4% 甲醛灭活 120 h, 尽管仍有菌生长, 但 TSA 平板表面菌落很少, 已从 10^{10} 数量级的菌落降至 3–5 个。因此采用热灭活时, 为确保生物安全, 建议采用 80 °C 水浴灭活 2 h。而对于甲醛灭活, 采用 0.6% 甲醛灭活 120 h。

(3) 甲醛灭活布鲁氏菌抗原与热灭活布鲁氏菌抗原, 两者免疫产生血清抗体效价无显著差别。甲醛是化学灭活方法, 热灭活是物理灭活方法, 两者作用机理不一致^[2,6], 但对于布鲁氏菌灭活均是有效的方法, 这是对布鲁氏菌灭活方式的补充。这项工作表明布鲁氏菌灭活不同于其他菌, 其他常用菌一般均采用甲醛灭活为主, 而热灭活因产生蛋白变性而影响其免疫原性^[3-5]。

(4) 由于目前尚未发现关于 2308、M28、S1330、16M 热灭活及甲醛灭活试验系统报道, 本研究将为今后科学灭活以上 4 种参考菌株提供依据, 为研发单位生产大规模灭活抗原和布鲁氏菌病阳性血清提供便利。

参 考 文 献

- [1] Shi XT, Gu SP, Zheng MX, et al. The prevalence and control of brucellosis disease[J]. China Animal Husbandry & Veterinary

Medicine, 2010, 37(3): 204-207 (in Chinese)

史新涛, 古少鹏, 郑明学, 等. 布鲁氏菌病的流行及防控研究概况[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(3): 204-207

- [2] Lu CP. Veterinary Microbiology[M]. 4th Edition. Beijing, China Agriculture Press, 2006: 38-39 (in Chinese)

陆承平. 兽医微生物学[M]. 第4版. 北京: 中国农业出版社, 2006: 38-39

- [3] Zhang ZX, Jiang P. Technology for practical veterinary biological product[M]. Nanjing: Jiangsu Association of Animal Science and Veterinary Medicine, 1994, 53-56 (in Chinese)

张振兴, 姜平. 实用兽医生物制品技术[M]. 南京: 江苏省畜牧兽医学会, 1994: 53-56

- [4] Zhu SY. Production and inspection of veterinary biological product[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2006: 82-87 (in Chinese)

朱善元. 兽医生物制品生产与检验[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2006: 82-87

- [5] Committee for Veterinary Biological Product Rule, Ministry of Agriculture, China. Veterinary Biological Product Rule 2000, People's Republic of China[S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 167-170, 399-411 (in Chinese)

农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程2000版[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 167-170, 399-411

- [6] Jiang P. Veterinary Biological Products[M]. 2nd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2009: 44-45 (in Chinese)

姜平. 兽医生物制品学[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 2009: 44-45

- [7] China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia (2010 Edition) Three[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 68-69, Appendix 26 (in Chinese)

中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2010版)三部[S]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 68-69, 附录26

- [8] Office International Des Epizooties. OIE terrestrial Manual[M]. Paris: World Organization for Animal Health, 2009: 15-16

[9] Meisel S, Stöckel S, Elschner M, et al. Raman spectroscopy as a potential tool for detection of *Brucella* spp. in milk[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5575-5583. DOI: 10.1128/AEM.00637-12

- [10] Celebi B, Kılıç S. Development of a novel *Francisella tularensis* antigen stained with tetrazolium-blue for tularemia microagglutination test[J]. Mikrobiyoloji Bulteni, 2013, 47(3): 514-522. [Article in Turkish]

- [11] International Office of Epizootics. Manual for terrestrial animal diagnostic tests and vaccines (mammals, birds and bees)[S]. Translated by Veterinary Bureau, Ministry of Agriculture, People's Republic of China/China Animal Health and Epidemiology Center, 2010 (in Chinese)

世界动物卫生组织. 陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)[S]. 农业部兽医局/中国动物卫生与流行病学中心译, 2010