

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/

团 体 标 准

T/CPMA XXXX—XXXX

布鲁氏菌病血清学鉴别诊断及病原学核酸检测法

Serological differential diagnosis of Brucellosis and etiological nucleic acid detection of Brucella

(送审稿)

(本草案完成时间：)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

— XX — XX 发布

XXXX — XX — XX 实施

中华预防医学会 发 布

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。

本文件由中华预防医学会提出并归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、军事科学院军事医学研究院、辽宁省疾病预防控制中心、甘肃省疾病预防控制中心、山西省疾病预防控制中心、河北省疾病预防控制中心、内蒙古综合疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心、青海省地方病预防控制所、首都医科大学附属北京地坛医院。

本文件主要起草人：姜海、赵鸿雁、李兰玉、刘琪琦、毛玲玲、席进孝、杨红霞、刘晓丽、塔娜、谈忠鸣、李积权、蒋荣猛。

引 言

本文件补充了WS 269-2019《布鲁氏菌病诊断》，将为今后布鲁氏菌病的监测及突发公共卫生事件处置提供更全面的技术支撑。

本文件与WS 269-2019相比，主要技术指标变化如下：

- 增加了布鲁氏菌病标本采集、保存和运输（见第4部分）；
- 增加了半胱氨酸盐酸盐处理血清后的凝集试验（见第5部分）；
- 增加了临床和外环境标本实时荧光PCR核酸检测（见第6部分）。

布鲁氏菌病血清学鉴别诊断及病原学核酸检测法

1 范围

本文件规定了布鲁氏菌病自然感染与疫苗免疫后血清学鉴别诊断及病原学核酸检测方法。

本文件适用于各级疾病预防控制中心和医疗机构对布鲁氏菌(包括疫苗株)感染的鉴别诊断及临床、外环境标本布鲁氏菌属的核酸检测,其他机构可参照本文件。

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 19489 实验室生物安全通用要求

WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

WS269-2019 布鲁氏菌病诊断

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 布鲁氏菌 *Bruceella*

适宜在偶蹄类哺乳类动物体内生存,也可以转移宿主进入人类及多种动物机体,并造成感染-变态反应,从而引起机体发生布鲁氏菌病的一组微小的球状或短杆状细菌。布鲁氏菌分类见附录A。

4 标本采集、保存和运输

4.1 标本采集

4.1.1 总体要求

4.1.1.1 用于布鲁氏菌的分离培养和核酸检测的标本宜在抗菌药物治疗开始前采集。

4.1.2 患者标本

4.1.2.1 全血标本

用真空负压采血管采集血液标本3mL~5mL。用于核酸检测的血液标本应使用含EDTA抗凝剂的真空负压采血管。

4.1.2.2 血清标本

用无抗凝剂真空负压采血管采集血液标本3mL~5mL,室温静置,待自然凝固后2000rpm~3000rpm离心8min;如果无离心机,血标本应于4℃冷藏放置,直到血清完全析出。在无菌条件下,吸取血清至无菌螺口管中,不应吸到红血球。

4.1.2.3 脑脊液标本

行腰椎穿刺法留取脑脊液1mL~2mL,放入无菌容器中。

4.1.2.4 粪便标本

采样管加入含30%甘油的磷酸盐缓冲液保护液的采样液，用灭菌拭子采集黄豆大小的粪便，放入无菌采样管中。

4.1.2.5 其它体液标本

有关节积液、局灶性脓肿等的疑似病例，可无菌操作抽取关节液或脓汁1mL~2mL放入无菌容器中。

4.1.3 动物标本

动物脾脏、肝脏、淋巴结、血液、奶样、精液、阴道分泌物、流产胎儿胃内容物等疑似感染布鲁氏菌病的动物体液或组织样品采集按照 GB/T 18646 或 NY/T 1467 执行。

4.1.4 环境标本

4.1.4.1 物表拭子

采样管加入含30%甘油的磷酸盐缓冲液保护液的采样液。用灭菌拭子充分浸润采样液，在管壁上反复挤压几下，挤出多余液体，在不同环境部位擦拭，每个部位擦拭至少5次。将拭子头浸入采样液中，把拭子头部与管壁接触几下，使样品尽量多的保存在采样液中。

4.1.4.2 土壤标本

采集可能被污染的表层土壤（10cm 内）不少于5 份，每份约150g，放入无菌自封袋中。

4.1.4.3 水标本

采集可能被污染的牲畜饮水处水样3 份（每份500mL）放入无菌容器中。

4.2 标本保存

用于核酸检测的标本应当尽快进行检测，可在24h内检测的标本可置于2℃~8℃保存；24h内无法检测的标本则应置于-20℃及以下保存。血清标本可在4℃存放3天，-20℃以下可长期保存。

4.3 标本运输

标本或菌株运输要求按卫生部2005年第45号令执行。

5 半胱氨酸盐酸盐处理血清后的凝集试验（具体操作方法见附录 B）

5.1 器材及试剂

5.1.1 器材

1mL、10mL 吸管（或加样器）、洁净玻璃试管（12mm×100mm 或 13mm×100mm）、试管架、配制试剂用的洁净容器、37℃培养箱。

5.1.2 试剂

NaOH、L-半胱氨酸盐酸盐、布鲁氏菌试管凝集抗原、半胱氨酸盐酸盐试验专用阳性血清、布鲁氏菌阴性血清、生理盐水或 0.5%的石炭酸生理盐水。

5.2 结果判定

5.2.1 对照判定要求

血清对照为清亮透明无沉淀，抗原对照为均匀混浊。阳性对照、阴性对照均出现正确结果，在四种对照都成立的情况下，才可判定试验管，否则应重新实验。

5.2.2 结果判读

结果分为5类，按照以下的情况进行判读。以产生 50%凝集的（++）血清最终稀释倍数为被检血清的效价。1:40（++）（含）以上为阳性：

- a) 液体完全透明，管底呈伞状或片状凝集，为 100%凝集，可判定为“++++”；
- b) 液体近于完全透明，管底呈伞状或片状凝集，为 75%凝集，可判定为“+++”；
- c) 液体略微透明，管底呈较薄伞状或片状凝集，为 50%凝集，可判定为“++”；
- d) 液体不透明，管底有不很明显的凝集，为 25%凝集，可判定为“+”；
- e) 液体不透明，无凝集现象，可判定为“-”。

5.3 鉴别诊断

此试验主要反映的是IgG抗体的凝集活性，做鉴别诊断时应与试管凝集试验（SAT）同时进行，当SAT效价为半胱氨酸盐酸盐处理血清后的凝集试验效价4倍及以上且具有群体趋势时有鉴别群体自然感染和疫苗免疫的意义。但对于个体的鉴别诊断，应结合流行病学调查及临床特征进行综合判断。

6 布鲁氏菌临床和外环境标本实时荧光 PCR 核酸检测

6.1 目标基因

检测布鲁氏菌属核酸时，以布鲁氏菌细胞表面蛋白Bscp31作为目标基因，参考引物和探针序列见表1。

6.2 试剂选择

可使用商品化布鲁氏菌核酸检测试剂盒，按相应操作说明书操作，也可自行合成引物探针，进行Real-Time PCR检测。

选择合适的内参基因，当待测标本为人源性时，可选择人源性内参或外源性内参；当待测标本为非人源性时，应选择非人源性内参。选择非人源性内参时，应在核酸提取过程中加入相应的内参模板，以监测核酸提取过程。合成的引物和探针通常为冻干产品，开盖前应进行短暂离心，使用时需要溶解并稀释成储存液。配制100 μM储存液，用时取少量稀释10倍即为工作浓度（10 μM）。

表1 布鲁氏菌属 Real-Time PCR 参考引物和探针序列

引物探针名称	序列 (5' to 3')
<i>Bscp31</i> 上游引物	GCTCGGTTGCCAATATCAATGC
<i>Bscp31</i> 下游引物	GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG
目标基因探针	FAM-AAATCTTCCACCTTGCCCTTGCCATCA-BHQ1
人源内参上游引物	AGATTGACCTGCGAGCG
人源内参下游引物	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT
人源内参探针	ROX-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ2
非人源内参上游引物	ACCCTATTTTCATTCTTCGCC
非人源内参下游引物	GGTATCCAGATCCACAACCTT
非人源内参探针	ROX-CGCTTCCATCTTCCAGGGATACGACA-BHQ2

6.3 模板制备

6.3.1 标本前处理

6.3.1.1 动物标本

动物标本的处理按照GB/T 18646和NY/T 1467 执行。

6.3.1.2 粪便标本

取黄豆大小的粪便，用1ml~2ml生理盐水或无核酸酶水重悬，低速离心去掉大沉淀物，取全部上清12,000rpm离心10min；去除部分上清，剩余200μL液体重悬沉淀备用。

6.3.1.3 物表拭子

将物表拭子用一定量的生理盐水浸洗（生理盐水的量根据样品的多少而定，要完全浸没标本），并用力振摇数十次，然后取1.5mL浸洗液转移至离心管中，12,000rpm离心10min；去除部分上清，剩余200μL液体重悬沉淀备用。

6.3.1.4 土壤标本

向标本管中加入适量（示标本量而定，应超过标本的5倍体积）无菌生理盐水浸泡，然后剧烈振荡搅拌使其充分混匀，低速离心去掉大沉淀物后，吸取上清转移至1.5mL离心管中，12,000rpm离心10min；去除部分上清，剩余200μL液体重悬沉淀备用。

6.3.1.5 可疑水样

取1.5mL水样转移至离心管中，低速离心去掉大沉淀物，取全部上清12,000rpm离心10min；去除部分上清，剩余200μL液体重悬沉淀备用。

6.4 DNA 提取

6.4.1 试剂盒法提取 DNA

根据标本类型选择相应商品化离心柱法或磁珠法基因组DNA提取试剂盒，具体操作方法按试剂盒说明书进行。选择非人源性内参时，应在待核酸提取的标本中加入相应的内参模板，以监测核酸提取过程。

6.4.2 煮沸法提取 DNA

纯培养的细菌菌落可使用煮沸法进行简易模板制备。细菌接种于布鲁氏菌营养琼脂平板，37℃培养24h~48h；刮取菌苔1接种环（约2μL~5μL）放入装有800μL纯水或TE的1.5mL离心管内，混匀；100℃加热10min；12,000rpm离心10min；吸取上清即为PCR模板。选择非人源性内参时，应在待核酸提取的标本中加入相应的内参模板，以监测核酸提取过程。

6.5 Real-Time PCR 反应体系

30μL的反应体系包含：适用于PCR-荧光探针法的DNA扩增buffer（终浓度1×），适用于PCR-荧光探针法的DNA聚合酶（终浓度1×），目标基因上游引物和下游引物（终浓度为400nM），目标基因探针（终浓度为200nM），内参基因上游引物和下游引物（终浓度为167nM），内参基因探针（终浓度为67nM），待测模板15μL，用无DNA/RNA酶去离子水补足体积至30μL；也可根据实际需要，参考上述引物探针终浓度，等比放大体系体积。

反应设立质控程序：使用纯水作为阴性对照；用已知布鲁氏菌模板（或阳性质粒）作为阳性对照。加样顺序为：先加阴性对照，然后加待测模板，最后加阳性对照。

6.6 Real-Time PCR 扩增

一般使用两步法进行扩增，参考程序如下：50℃ 2min；95℃预变性5min；扩增反应95℃ 10s，55℃ 30s，并收集荧光信号，40个循环；25℃ 10s。不同的荧光定量PCR仪扩增的程序会有一些差异，可根据所使用的仪器对反应程序进行适当调整。

6.7 结果判定

当阴性对照、阳性对照结果、内参（如有）成立时，再进行判断结果。Ct值≤38时判断为阳性，38<Ct<40时为灰度区需重复检测（若复检结果仍处于38<Ct<40范围内则判为阳性），Ct值没有峰值时判断为阴性。当对照结果不成立时，需重新采样检测。患者标本检测为阳性结果，需要结合流行病学接触史和临床表现综合判断临床意义。

7 实验室生物安全要求

实验室生物安全管理相关要求按 GB 19489和WS 233的规定执行。

附 录 A

(资料性)

布鲁氏菌分类

A.1 布鲁氏菌

布鲁氏菌在系统分类学属于变形菌门， α -变形菌纲，根瘤菌目，布鲁氏菌科，布鲁氏菌属。根据布鲁氏菌的宿主偏好、致病性以及生化特征不同，布鲁氏菌属目前包括12个种：羊种布鲁氏菌

(*B. melitensis*)、牛种布鲁氏菌 (*B. abortus*)、猪种布鲁氏菌 (*B. suis*)、犬种布鲁氏菌 (*B. canis*)、沙林鼠种布鲁氏菌 (*B. neotomae*)、绵羊附睾种布鲁氏菌 (*B. ovis*)、鲸种布鲁氏菌 (*B. ceti*)、鳍种布鲁氏菌 (*B. pinnipediae*)、田鼠种布鲁氏菌 (*B. microti*)、人源布鲁氏菌 (*B. inopinata*)、狒狒种布鲁氏菌 (*B. papionis*) 和赤狐种布鲁氏菌 (*B. vulpis*)。

附录 B

(规范性)

半胱氨酸盐酸盐处理血清后的凝集试验

B.1 操作方法

B.1.1 试剂配制

B.1.1.1 0.4M NaOH 称取 1.6g NaOH 加蒸馏水至 100mL，具体用量可按比例增减。

B.1.1.2 0.2M 半胱氨酸盐酸盐 由于品牌及批号不同，L-半胱氨酸盐酸盐分子式会略有差别，如分子式为 $(C_3H_7NO_2SHClH_2O)$ ，分子量为 175.64，则称取 351.28mg 溶于 10mL 0.4M NaOH 溶液中，即为 0.2M 半胱氨酸盐酸盐溶液，具体用量可按比例增减。

B.1.2 试验操作

B.1.2.1 每份被检血清取 9 支小试管，放于试管架上。

B.1.2.2 第一支管加生理盐水 0.8mL，加被检血清 0.2mL，再加入 1mL 0.2M 半胱氨酸盐酸盐溶液混匀，置 37°C 培养箱 30min。第二支管不加，第三支管到第九支管各加 0.5mL 生理盐水。

B.1.2.3 取出处理后的第一支管的血清吸 1mL 加入第二、三管各 0.5mL，第三管混匀后再吸 0.5mL 加入第四管，以此类推到第八管吸 0.5mL 弃掉。此时血清的稀释倍数从第二管开始到第八管分别为 1:10、1:20、1:40、1:80、……1:640。

B.1.2.4 将试管凝集抗原充分混匀，按试剂说明稀释，然后从第二管至第九管每管加入 0.5mL，加入抗原之后，血清的最终稀释倍数为从第二管开始 1:20、1:40、1:80、1:160……1:1280。第一管为血清对照，最后一管为抗原对照，充分混匀。见图 B.1。

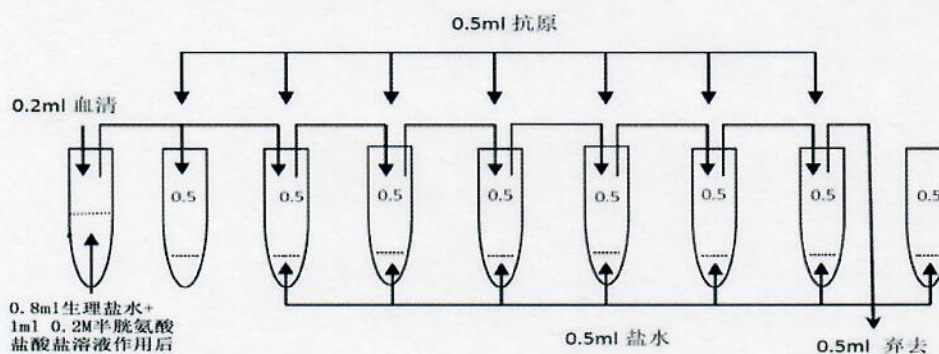


图 B.1 操作步骤示意图

B.1.2.5 除上述血清对照和抗原对照外，同时还需做布鲁氏菌半胱氨酸盐酸盐试验专用阳性血清对照、布鲁氏菌阴性血清对照。操作方法同被检血清。

B.1.2.6 将试管全部放于 37°C 温箱中孵育 18h~20h，取出，室温放置 1h~2h 后观察结果。



中华预防医学会团体标准编制说明

一、工作简况：包括任务来源、协作单位、主要工作过程、起草组成员及其所做的主要工作等；

1. 本任务来源于中华预防医学会2019年度第二批团体标准立项项目（预会发〔2020〕42号）。

2. 协作单位：军事科学院军事医学研究院、辽宁省疾病预防控制中心、甘肃省疾病预防控制中心、山西省疾病预防控制中心、河北省疾病预防控制中心、内蒙古综合疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心、青海省地方病预防控制所和首都医科大学附属北京地坛医院。

3. 主要工作过程：2021年4月组织11位专家对本标准进行线上征求意见，搜集修改建议49条，其中采纳或部分采纳47条，未采纳2条；2021年5月召开团体标准现场评审会，并邀请了标准委员会专家刘海波现场审评，形成了预审上报稿。2021年7月再次召开团体标准现场预审会，并邀请了标准委员会卢金星和冯兰两位专家现场审评，形成上报最终版，准备上报中华预防医学会。

4. 起草组成员及其所做的主要工作：李兰玉、赵鸿雁、席进孝、刘晓丽、李积全主要负责编写半胱氨酸盐酸盐处理血清后的凝集试验；姜海、刘琪琦、毛玲玲、杨红霞、谈忠鸣、蒋荣猛主要负责编写临床和外环境标本布鲁氏菌核酸检测。

二、标准编制原则和确定标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）的论据；标准修订项目还应当列出新、旧标准水平的对比；

本标准主要参考世界卫生组织（WHO，2005）布鲁氏菌诊断及国内现行布鲁氏菌诊断标准（WS269-2019）。但该标准尚未包括现已成熟的血清学鉴别诊断及临床、外环境标本核酸检测方法。2019年11月，轰动全国的中国农科院兰州兽研所布鲁氏菌抗体阳性事件，采用此两种方法成功完成调查处理。该团体标准的制定，将为今后布病的防控及应急处置提供更有效的技术支撑。

三、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果；

1. 发表一篇综述：我国布鲁氏菌病诊断方法应用及思考（中华流行病学杂志，2021,42(1)）
2. 发表一篇中文核心期刊：外周血淋巴细胞布鲁氏菌核酸DNA 检测的实验研究（疾病监测，2020,35（5））
3. 预计经济效果：该标准的实施，将加快企业三类体外诊断试剂注册申报，既满足临床检测所需，又为企业提供新的利润增长点，具有十分广阔的应用前景。

四、标准涉及的相关知识产权说明；

无。

五、采用国际标准的程度与水平的简要说明；

世界卫生组织（WHO）诊断方法中包括半胱氨酸盐酸盐处理血清后的凝集试验和临床标本PCR检测布鲁氏菌DNA方法，本标准与国际标准接轨。

六、重大意见分歧的处理经过和依据；

无重大意见分歧。

七、其他应予说明的事项。

无。

