

## 研究报告

# 牛布鲁氏菌病阳性血清国家标准品的研制

李翠, 关孚时, 戴志红, 蒋卉, 温芳, 陆连寿, 王在时

中国兽医药品监察所, 北京 100081

**摘要:** 为制备标定凝集试验用的牛布鲁氏菌病阳性血清国家标准品, 采集 4 份田间自然感染牛布鲁氏菌病的阳性血清作为候选物, 经过筛选后, 选择了 3#血清用于标准品制备。对该标准品进行了物理性状、无菌检验、真空度测定、剩余水分检验、均匀性检测和稳定性试验, 检测结果均符合要求。以国际标准品为参比, 测定了该标准品的 RBT、SAT 和 CFT 效价, 结果分别为 1:160 “+”、1:2 400 “++”、1:800 “++”, 与协作标定结果完全一致。该标准品以国际标准品溯源的国际单位含量为 4 000 IU/mL。

**关键词:** 牛布鲁氏菌病, 阳性血清, 国家标准品, 效价测定, 均匀性, 稳定性

## Preparation and characterization of following the national standard anti-*Brucella abortus* serum, bovine

Cui Li, Fushi Guan, Zhihong Dai, Hui Jiang, Fang Wen, Lianshou Lu, and Zaishi Wang

China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

**Abstract:** To prepare anti-*Brucella abortus* serum used for calibrate the agglutination test following the national standard, 4 anti-*Brucella abortus* sera were obtained from 4 cows infected with *Brucella abortus* naturally. By potency testing, the third serum was selected. Sterility, vaccum degree, residual moisture, uniformity and stability of this standard material were tested and proved to meet the national standard. Referring to the international standard, RBT (Rose-Bengal plate agglutination test), SAT (standard tube agglutination) and CFT (complement fixation test) titers of this standard material were measured to be 1:160 “+”, 1:2 400 “++” and 1:800 “++”, which are identical with the collaborative assay results. International unit of the standard material is 4 000 IU/mL.

**Keywords:** *Brucella abortus*, anti-serum, the national standard, potency standardization, homogeneity, stability

牛布鲁氏菌病通常由牛型布鲁氏菌 (前称流产布鲁氏菌) 引起, 其感染呈全球趋势, 给世界上很多国家和地区带来了严重经济损失<sup>[1-2]</sup>。世界动物卫生组织 (Office International Des Epizooties, OIE) 将

**Received:** January 20, 2011; **Accepted:** April 8, 2010

**Supported by:** Key Projects in the National Science and Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period (No. 2006BAD06A10).

**Corresponding author:** Zaishi Wang. Tel: +86-10-62103670; Fax: +86-10-62103671; E-mail: wangzaishi@ivdc.gov.cn

“十一五”国家科技支撑计划 (No. 2006BAD06A10) 资助。

其列为 B 类动物传染病。

目前, 血清学检查是牛布鲁氏菌病诊断的常用方法<sup>[3-6]</sup>, 为了促进其诊断试验的国际一体化和抗原标准化, 世界卫生组织 (World health organization, WHO) 生物学标准化专家委员会于 1952 年建立了第一批牛布鲁氏菌病阳性血清国际标准品<sup>[7]</sup>(可从 OIE 的布鲁氏菌参考实验室即英国卫桥 Veterinary Laboratories Agency, VLA 获得), 该国际标准品得到国际上的普遍认可, 广泛用于标化布鲁氏菌病的凝集试验。因此, 以该国际标准品为溯源制备一批国家标准品, 对解决我国布鲁氏菌病血清学诊断中的实际问题具有重要意义。本实验即是以 VLA 获得的牛布鲁氏菌病阳性血清国际标准品<sup>[8]</sup>为溯源, 建立一批国家级标准品, 用于标定牛布鲁氏菌病凝集试验。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和耗材

牛布鲁氏菌病阳性血清国际标准品: 从英国卫桥 VLA-OIE 布鲁氏菌病参考实验室获得, 批号为 N/A, 1 000 IU/mL, 标化虎红平板凝集试验 (RBT)、试管凝集试验 (SAT) 和补体结合试验 (CFT) 预期滴度分别为 1/47.5、2/650 和 2/200; 牛布鲁氏菌病虎红平板凝集试验用抗原: 购自英国 Central Veterinary Laboratory (CVL), 产品编号为 PA0060, 批号为 270; 牛布鲁氏菌病试管凝集试验用抗原: 由中国兽医药品监察所制备, 产品编号为 200801, 工作浓度为 1:20; 牛布鲁氏菌病补体结合试验用抗原: 购自英国 CVL, 产品编号为 0066/03, 批号为 10, 工作浓度 1:10; 96 孔 U 型底微量反应板: 购自 GREINER 公司。

### 1.2 候选物的制备

黑龙江省某农场田间自然感染牛布鲁氏菌病的奶牛 4 头, 以颈动脉采血法采血于无菌的大量筒中, 置 20 °C 左右 4 h, 待血液凝固后每个盛血量筒

无菌操作加压铜。静置, 待血清析出后, 取上清, 4 000 r/min 离心 20 min 分离血清。

### 1.3 候选物筛选

以英国卫桥 (VLA) 牛布鲁氏菌病阳性血清国际标准品为参比, 按文献方法<sup>[9-11]</sup>分别测定 RBT、SAT 和 CFT 效价。

### 1.4 分装、冻干、熔封

将符合要求的候选物先经 0.4 μm 无菌滤膜加压过滤, 再经 0.22 μm 无菌滤膜加压过滤; 随后用瓶颈分液器 (分装精度为±0.01 mL) 无菌分装至 1 mL 灭菌长安瓶, 按常规方法冻干后抽真空、熔封。

### 1.5 成品检验

#### 1.5.1 物理性状

随机抽取 5 支样品, 观察颜色和形状, 再打开安瓶加去离子水 (可以低速涡旋或用移液器轻轻吹打), 记录溶解情况。

#### 1.5.2 无菌检验、真空度测定、剩余水分测定

随机抽取规定数量的样品, 按文献方法<sup>[9-10]</sup>进行。

#### 1.5.3 效价测定

随机抽取规定数量的样品以英国卫桥 (VLA) 牛布鲁氏菌病阳性血清国际标准品为参比, 按文献方法<sup>[9-11]</sup>分别测定 RBT、SAT 和 CFT 效价。

#### 1.5.4 均匀性检验

随机抽取规定<sup>[12]</sup>数量的样品, 用国际标准品为参比按文献方法<sup>[9-11]</sup>分别测定 RBT、SAT 和 CFT 效价。

#### 1.5.5 稳定性试验<sup>[13]</sup>

随机选取规定数量的样品分别放 56 °C、37 °C 和 25 °C 温箱在规定时间内取样品分别进行 CFT 和 SAT 试验测定其效价。

#### 1.5.6 协作标定

组织 4 家协作标定单位按统一的协作标定方案, 以国际标准品为参比测定其 RBT、SAT 和 CFT 效价, 试验完成后统计数据<sup>[14]</sup>, 确定待检国家标准品国际单位含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 候选物筛选

实验结果表明, 4份血清的RBT效价、SAT效价(表1)和CFT效价(表2)均为牛布鲁氏菌病阳性, 而且3#血清的效价最高。所以选择3#血清作为制备牛布鲁氏菌病阳性血清国家标准品的原材料。

表1 候选物筛选试管凝集效价测定结果

Table 1 SAT titers of the selected candidates

No. of sera	Positive sera	Negative sera	Dilution factors of mixed sera				
			1:300	1:400	1:500	1:600	1:700
1#	1 mL+1.2 mL	-	+	++	+++	#	
2#	1 mL+0.1 mL	-	+	++	+++	#	
3#	1 mL+2.8 mL	-	+	++	+++	#	
4#	1 mL+2.0 mL	-	+	++	+++	#	
int.sera	-	-	+	++	+++	#	

#: complete agglutination; +++: 75% agglutination; ++: 50% agglutination; +: 25% agglutination; -: incomplete agglutination.

表2 候选物筛选补体结合试验效价测定结果

Table 2 CFT titers of the selected candidates

No. of sera	Positive sera	Negative sera	Dilution factors of mixed sera				
			1:120	1:160	1:200	1:240	1:280
1#	1 mL+2 mL	-	+	++	+++	#	
2#	1 mL+0.5 mL	-	+	++	+++	#	
3#	1 mL+5 mL	-	+	++	+++	#	
4#	1 mL+4 mL	-	+	++	+++	#	
int.sera	-	-	+	++	+++	#	

#: incomplete hemolysis; +++: 25% hemolysis; ++: 50% hemolysis; +: 75% hemolysis; -: complete hemolysis.

表3 成品检验稳定性试验结果

Table 3 Product test results of stability test

Preserving temperature	Test methods	Time of preserving (weeks)							
		1	2	3	4	6	8	10	
56 °C	CFT	1:800	1:800	1:600	1:600	1:400	1:400	-	
	SAT	1:2 400	1:2 400	1:1 600-1:2 400	1:1 600	1:1 600	1:1 200	-	
37 °C	CFT	-	-	1:800	1:800	1:800	1:600	-	
	SAT	-	-	1:2 400	1:2 400	1:2 400	1:1 600-1:2 400	1:1 600	
25 °C	CFT	-	-	-	-	-	1:800	1:600	
	SAT	-	-	-	-	-	1:2 400	1:1 600-1:2 400	

-: no test.

### 2.2 成品检验结果

#### 2.2.1 物理性状

所有冻干阳性血清为淡黄色疏松团块, 易与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解, 溶解后为淡黄色澄明液体。

#### 2.2.2 无菌检验、真空度测定和剩余水分测定

无菌检验和真空度测定结果均符合规定, 剩余水分测定结果分别为2.8%、2.9%、2.4%和2.4%, 均低于4%, 符合要求。

#### 2.2.3 效价测定

随机选取5支冻干血清测定其RBT、SAT和CFT效价分别为1:160“+”、1:2 400“++”、1:800“++”。

#### 2.2.4 均匀性检验

随机选取15支冻干血清测定其RBT、SAT和CFT效价分别为1:160“+”、1:2 400“++”、1:800“++”, 说明该冻干血清的均匀性良好。

#### 2.2.5 稳定性试验

稳定性试验结果见表3, 冻干血清56 °C温箱保存3周时其CFT和SAT效价开始逐渐下降, 37 °C温箱保存8周时其CFT和SAT效价开始逐渐下降, 25 °C温箱保存9周时其CFT和SAT效价开始逐渐下降。

### 2.2.6 协作标定

汇总四家协作标定单位的实验结果表明, 以国际标准品为参比测得该牛布鲁氏菌病阳性血清国家标准品的 CFT 效价均为 1:800 “++”、SAT 效价均为 1:2 400 “++”、RBT 效价均为 1:160 “+”, 该标定结果与研制该国家标准品时标定的结果一致。

本实验按照 WHO 的要求<sup>[15]</sup>和国家一级标准物质技术规范<sup>[16]</sup>中标准物质的制备程序以国际标准血清为参比研制国家标准品。为提高产品质量, 本实验采取了以下措施: 一是对国家标准品的候选物进行筛选, 尽量保证候选物的质量; 二是以国际标准血清为参比测定冻干血清的 RBT、SAT 和 CFT 效价, 尽量准确测定血清的效价; 三是对冻干血清进行了均匀性检验, 保证了冻干血清的均匀性; 四是对冻干血清进行稳定性试验, 提供了其保存期监测数据; 五是组织协作标定, 对不同协作标定单位的试验结果进行统计, 最终以国际标准品为溯源确定了国家标准品的国际单位为 4 000 IU/mL, 保证了其实际使用中的国际统一性。

该国家标准血清可用于以下方式来标化牛布鲁氏菌病凝集试验, 即标化抗原: 由于该标准血清在当地试验条件下补体结合效价、虎红平板凝集和试管凝集效价均已明确。随后批次的牛布鲁氏菌病补体结合试验用抗原、虎红平板凝集试验用抗原和试管凝集试验用抗原的最终滴度应当以该国家标准阳性血清来检测; 常规试验的对照: 为了检测结果可信, 试验条件保持不变, 每批牛布鲁氏菌病凝集试验都应以该标准品为参比进行滴度测定; 结果表达: 由于试验体系中各种变量同时影响标准血清和被检血清的效价, 所以以国际单位表达结果不依赖于所采用的特殊试验体系。因此在每个不同实验室进行牛布鲁氏菌病凝集试验获得的结果可以以一种有效的方式进行比较。

## REFERENCES

- control of brucellosis disease. *China Ani Hus Vet Med*, 2010, 37(3): 204-207.
- 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. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(3): 204-207.
- [2] Davis DS, Elzer PH. *Brucella* vaccines in wildlife. *Vet Microbiol*, 2002, 90(1/4): 533-544.
- [3] Morgan WJB, MacKinnon DJ, Lawson JR, et al. The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet Rec*, 1969, 85(23): 636-641.
- [4] Nicoletti P. An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Trop Anim Health Prod*, 1992, 24(1): 40-44.
- [5] Mateu-de-Antonio EM, Martín M, Casal J. Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. *J Vet Diagn Invest*, 1994, 6(2): 257-259.
- [6] Song CP, Xu H, Wang ZL, et al. Comparison of four serological methods for testing brucellosis by applying of international standard. *Chin J Ani Quarant*, 2003, 20(2): 25-27.
- 宋翠平, 徐辉, 王志亮, 等. 检测布氏杆菌病的四种血清学方法比较及国际标准单位的应用. *中国动物检疫*, 2003, 20(2): 25-27.
- [7] WHO Expert Committee on Biological Standardization. *World Health Organization Technical Report Series*, No. 86. Geneva: World Health Organization, 1953.
- [8] WHO Expert Committee on Biological Standardization. *World Health Organization Technical Report Series*, No. 329. Geneva: World Health Organization, 1966.
- [9] China Veterinary Pharmacopoeia Commission. *Republic of China Veterinary Pharmacopoeia*. 2005 ed (three). Beijing: China Agriculture Press, 2006.
- 中国兽药典委员会. *中华人民共和国兽药典*. 2005 年版 (三部). 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [10] Fourth Department of Agriculture Veterinary Biological Products Committee. *People's Republic of Veterinary Biological Products*. 2000 ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- 农业部第四届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 年版. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [11] OIE Biological Standards Commission. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*. 5th ed. Paris: Office International Des Epizooties, 2004.

[1] Shi XT, Gu SP, Zheng MX, et al. The prevalence and

世界动物卫生组织著. 农业部兽医局/中国动物卫生与流行病学中心译. 陆生动物诊断试验和疫苗手册 (哺乳动物、禽鸟与蜜蜂). 5 版. 巴黎: 国际兽医局, 2007.

- [12] Hu XY. Inspection and judgement of the homogeneity of the certified reference materials. *Chem Anal Met*, 1999, 8(1): 5-7.

胡晓燕. 标准样品的均匀性检验及判断. *化学分析计量*, 1999, 8(1): 5-7.

- [13] World Health Organization. Recommendations for the preparation characterization and establishment of international and other biological standards. The 55th Meeting of the WHO Expert Committee on Biological Standardization, 2004.

- [14] Davidson I, Hebert CN, Morgan WJ. The second

international standard for anti-Brucella abortus serum. *Bull World Health Organ*, 1969, 40(1): 129-140.

- [15] World Health Organization. Recommendations for the preparation characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004). WHO Technical Report Series, No. 932, 2006.

- [16] National Standard Material Management Committee. Technical norm of primary standard material (JJG 1006-94). [EB/OL]. [2010-12-15]. <http://www.nacrm.org/news info.aspx?id=462>.

国家标准物质管理委员会. 一级标准物质技术规范 (JJG 1006-94). [EB/OL]. [2010-12-15]. <http://www.nacrm.org/news info.aspx?id=462>.



## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 小麦染色体工程

现代农业高技术丛书

李集临, 曲敏, 张延明译

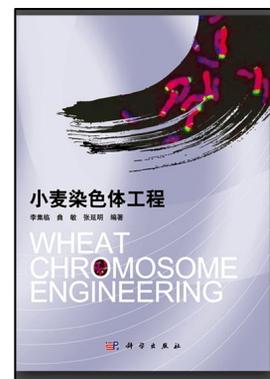
开本: 16 开 营销分类: 农业 装帧: 平装

ISBN 978-7-03-030688-3/Q-2671 ¥48.00 2011 年 4 月出版

### 内容简介

本书以小麦的染色体工程与分子标记育种为主要内容, 目的是为小麦育种提供一些现代染色体工程和分子标记方面的理论与应用基础。全书共分 5 章, 第一章是小麦的分类, 第二章是小麦的远缘杂交, 第三章是小麦的染色体工程, 第四章是小麦的细胞质工程, 第五章是小麦分子标记与育种, 主要介绍一些分子标记基础理论知识与方法和小麦转基因研究的进展。

**读者对象:** 本书文字简练, 引用大量图表, 深入浅出, 注意理论与实际结合, 可读性强, 适合遗传育种专业的本科生、研究生、教师及小麦育种工作者参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: [www.dangdang.com](http://www.dangdang.com) [www.joy.com](http://www.joy.com) [www.amazon.cn](http://www.amazon.cn) [www.beifabook.com](http://www.beifabook.com)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目