

布鲁氏菌超快速荧光 PCR 检测技术规范

编制说明

一、任务来源（包括目的意义）

布鲁氏菌病（以下简称“布病”）是由布鲁氏菌属细菌感染引起的人畜共患传染病，被列为二类动物疫病，是当前我国重点防治的人畜共患病之一。自 2006 年始，我国布病的报告发病数稳居甲乙类传染病前 10 位，甘肃、河南、湖北、湖南、广东等地也相继报道人感染布鲁氏菌的病例。而布病疫情呈现由北向南从传统牧区、半牧区向农区扩散，严重威胁居民身体健康和公共卫生安全。为了落实农业农村部关于的全面监测排查布鲁氏菌病的要求，和“关口前移，人病兽防”的部署，快速、准确的检测方法至关重要。

为了解决布鲁氏菌病快速、准确诊断的难题，东莞市动物疫病预防控制中心于 2025 年 3 月向广东省畜牧兽医学会提出了《布鲁氏菌超快速荧光 PCR 检测技术规范》的团体标准立项申请，广东省畜牧兽医学会组织了对该标准进行了预研，并于 2025 年 5 月 30 日组织专家对该标准进行了立项审查。经过专家充分的研讨论证，专家们一致认为，该项目所提供的资料基本齐全，立项标准符合国家产业政策，所申报的团体标准满足立项条件，同意该标准立项。目前，本标准研究团队已经完成了标准参数指标的验证，形成了标准文本初稿，并在行业内进行了征求意见，根据征求意见进行了修改，形成了送审稿。

二、起草工作简要过程（含主要参加单位及工作组成员）

1. 标准起草阶段

为制定本标准，本项目组织有关技术人员参阅技术专著、国家、地方标准等大量文献，并进行了预讨论工作。本项目主要开展布鲁氏菌超快速荧光 PCR 试验方法各项参数的验证，包括了方法的特异性、敏感性、稳定性和临床样品的验证。本研究使用的试剂均为同批次制品或者产品，尽可能确保了各要素效价的稳定性和一致性，保证了试验体系的稳定。2025 年 7 月，我们初步完成了标准的修订并送交同行专家审定。

2. 标准参与单位和参与人员

文件起草单位包括东莞市动物疫病预防控制中心、广东省疾病预防控制中心、广东省动物疫病预防控制中心、广州市番禺区动物疫病预防控制中心、超快生物技术（广州）有限公司、海南省动物疫病预防控制中心、广西区动物疫病预防控制中心、深圳市动植物疫病预防控制中心、海南省疾病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、广州国家实验室、深圳海关动植物检验检疫技术中心、华润五丰肉类食品（河南）有限公司深圳分公司、东莞市洪梅镇农业技术服务中心、东莞市南城农业技术服务中心等多家单位联合起草。

本文件起草人为张险朋、李柏生、徐振娜、胡辛凯、李彩虹、管知深、迟庆安、韦正吉、李秋剑、李丹丹、邹丽容、张欣、孙长云、吴新伟、曹兰、徐强、韩霄、阮周曦、王婉君、林仰孝、李小军、张远龙、卢受昇、黄伟平、谭铭光、林梦哲等。

文件起草的具体分工如下：

张险朋：项目负责人，负责标准的立项、整体方案确立及宣贯，负责标准的审阅、项目申报建议及相关技术文件的校订。

李柏生：负责标准中方法建立、实验数据分析起草，负责各版本标准稿的讨论和修订工作及征求意见后的修改工作；

徐振娜：负责标准中部分实验室方法的建立、优化及验证

胡辛凯、李彩红：负责标准中部分方法的起草、验证；
管知深、谭铭光、林梦哲：负责仪器设备的验证、负责耗材的选择；
迟庆安、韦正吉、李秋剑、李丹丹、邹丽容、张欣、孙长云、吴新伟、曹兰、徐强、韩霄、阮周曦、王婉君、林仰孝、黄伟平：负责部分标准方法的验证及检测方法的推广应用。
李小军、张远龙、卢受昇：负责标准文本质量的整体把握。

3. 标准征求意见阶段

文本初稿在于 2025 年 8 月 6 日广东省畜牧兽医学会网站公开征求意见，未收到反馈意见。向中国兽医药品监察所、广东省农业科学院动物卫生研究所（动物疫病诊断中心）、珠海科艺普检测科技有限公司、广东金维度生命科学技术有限公司、中山市动物疫病预防控制中心、拱北海关技术中心、肇庆市动物疫病预防控制中心、广州市动物卫生监督所（广州市动物疫病预防控制中心）、黄埔海关技术中心、珠海市动物疫病预防控制中心、东莞市万江动物卫生监督所、江门动物疫病预防控制中心、广西璞缔恩威生物技术有限公司等 13 家单位进行了征求意见，收到反馈意见 44 条，其中采纳 43 条，不采纳 1 条。

三、编写原则和确定标准主要内容的依据

（一）框架的确定

根据布鲁氏菌超快速荧光 PCR 检测技术规范的要求，结合标准撰写格式确定标准的框架为适用范围、规范性引用文件、术语和定义、缩略语、试剂和耗材、仪器设备、样品采集与处理、操作方法、结果判定。

（二）标准的编写原则

1 标准引用

检测样品的采集和用水方面引用了已经发布的国家标准 GB 19489-2008 《实验室 生物安全通用要求》、GB/T 18088 《出入境动物检疫采样》、GB/T 6682 《分析实验室用水规格和试验方法》和行业标准 NY/T 541-2016 《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》

2 实际科研和检测工作经验

标准编写人为张险朋、李柏生、徐振娜、胡辛凯、李彩红、管知深、迟庆安、韦正吉、李秋剑、李丹丹、邹丽容、张欣、孙长云、吴新伟、徐强、韩霄、阮周曦、王婉君、林仰孝、李小军、张远龙、卢受昇、黄伟平、谭铭光、林梦哲等，多年来一直从事人畜共患病的流行病学研究和疫病防控工作，在本标准的编写过程中，结合实验室的实际工作经验，对试验操作的具体细节进行编写。

项目组在人畜共患病检测方面具有丰富的经验，在布鲁氏菌病诊断方面开展了大量的研究工作，东莞市动物疫病预防控制中心在 2003 年通过了中国合格评定国家认可委员会（CNAS）认可，2023 年被认定为“东莞市人兽共患病重点实验室”，连续 5 年通过了全国水产技术推广总站组织的水生动物防疫系统实验室检测能力验证，每年平均检测动物样品近 10 万份，监测项目 70 多个。目前已建立了布鲁氏菌超快速荧光 PCR 检测技术，并应用于临床样品的检测，在布鲁氏菌病快速诊断方面发挥了重要作用。论文《布鲁氏菌超快速荧光 PCR 方法建立与临床应用》在 2025 年 3 月发表于《中国人兽共患病学报》（北大核心，CSCD 收录）。

（二）主要内容及其确定依据

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器设备

核酸提取仪（广州达安基因股份有限公司）；超快速荧光 PCR 仪（超快生物技术（广州）有限公司）；生物安全柜（ESCO，广州合众生物科技股份有限公司）。

1.1.2 试剂材料与菌株

10×PCR Buffer、快速启动酶、dNTP、核酸提取试剂购自珠海宝锐生物科技有限公司；核酸提取试剂购自广州达安基因股份有限公司；布鲁氏菌荧光 PCR 试剂盒购自百狮园动物保健科技（广州）有限公司；布鲁氏菌虎红平板凝集抗原购自哈药集团股份有限公司；大肠杆菌 0157、猪链球菌、无乳链球菌、猪伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌均由本实验室分离鉴定保存；140 份布鲁氏菌临床阴性样本由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物、探针设计

选择布鲁氏菌重要毒力因子 T4SS 分泌系统 *virB10* 蛋白基因序列（GenBank 登录号：AF226278.1）设计引物、探针，探针 5' 端标记 FAM 荧光报告基团，3' 端标记 MGB 淬灭基团，详见表 1；内参引物、探针参考以哺乳动物 *beta-actin* 基因设计引物、探针序列，探针 5' 端标记 Cy5 荧光报告基团，3' 端标记 BHQ1 淬灭基团，详见表 1。所有引物、探针均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

表 1 设计的引物和探针

第一组布鲁氏菌引物、探针		第二组内参引物、探针	
引物 1、探针 1	序列 (5' - 3')	引物 2、探针 2	序列 (5' - 3')
上游引物	GGGGTTCAAATCAGATCAACCTC	上游引物	AGTCCGCCTAGAAGCATTTG
下游引物	GCGGAATGTTGATCGTATCCTTC	下游引物	TGTCCACCTTCCAGCAGATG
探针	FAM- CTCGTCGATTCACCTCCGCCGTA-MGB	探针	Cy5- AGTCCGGCCCCTCCATCGTC CA-BHQ2

1.2.2 重组质粒制备

根据布鲁氏菌 *virB10* 特异性基因构建 pUC57-*VirB10* 重组质粒，同时构建外源性内参重组质粒，质粒由生工生物工程（上海）股份有限公司构建、纯化，质粒浓度约为 3.3×10^{10} copies/ μL （由于质粒浓度过高，防止污染实验室环境，故将其稀释为工作浓度，约 10^6 copies/ μL ）。

1.2.3 核酸提取

本研究所用核酸均使用达安基因核酸提取仪提取，提取时，加入 5 μL 内参一同提取。

1.2.4 超快速荧光 PCR 反应条件和体系

优化后的超快速荧光 PCR 反应体系 100 μL ：5×PCR Buffer 20 μL ；上下游引物各 8 μL （800 nmol/L）；探针 4 μL （400 nmol/L）；内参上下游引物各 6 μL （600 nmol/L），探针 3 μL （300 nmol/L）；dNTP 1.6 μL ；快速启动酶 8 μL ；模板 20 μL ；补充 ddH₂O 至 100 μL 。反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 1 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 6 s（收集荧光信号），45 个循环。

1.2.5 灵敏度试验和标准曲线绘制

将布鲁氏菌重组质粒 10 倍比稀释，稀释 6 个梯度，每个梯度重复检测 5 次，以 100% 检出作为最低检出限，并绘制标准曲线。

1.2.6 特异性试验

提取大肠杆菌 0157、猪源链球菌、无乳链球菌、猪伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌核酸、布

鲁氏菌虎红平板凝集抗原核酸，使用超快速荧光 PCR 方法进行扩增，评价特异性。

1.2.7 重复性试验

将布鲁氏菌重组质粒分别稀释 10 倍，1 000 倍，100 000 倍进行检测，每个梯度重复检测 5 次，根据 CT 值计算变异系数，评价重复性。

1.2.8 临床样本检测

140 份临床阴性样本，包括 50 份全血样本、50 份阴道拭子、40 份环境拭子。每种样本各取 10 份加入布鲁氏菌虎红平板凝集抗原，使其终浓度为 1:100，加入 5 μ L 内参提取核酸分别用超快速荧光 PCR 方法与荧光 PCR 方法检测，比较两种方法的符合率。

2 结果

2.1 标准曲线绘制

将布鲁氏菌重组质粒稀释 10 倍比稀释，浓度分别为 10^5 – 10^1 copies/ μ L，根据 Ct 值平均值绘制标准曲线，结果见图 1。循环阈值与质粒浓度拷贝数的常用对数关系为 $Y = -3.4107x + 38.357$ ，标准曲线 $R^2 = 0.9985$ ，大于 0.98，说明该方法具有较好的线性关系。

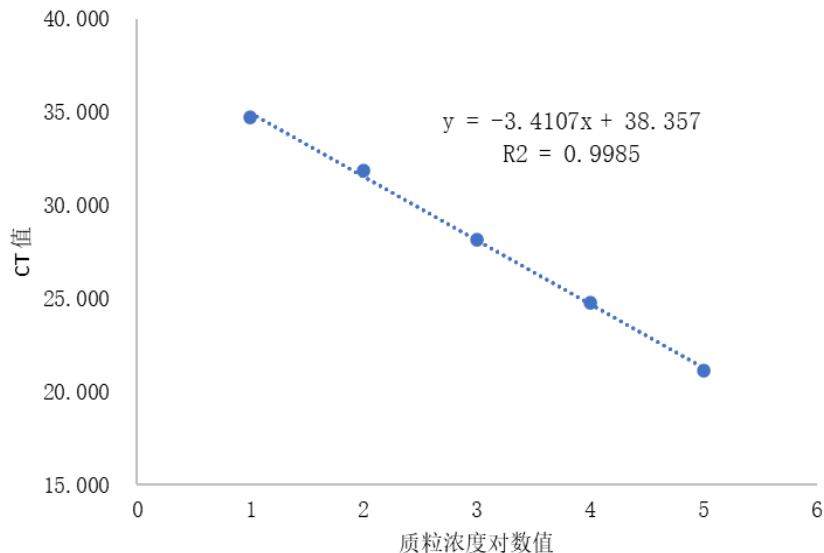


图 1 布鲁氏菌超快速荧光 PCR 标准曲线图

2.2 灵敏度试验结果

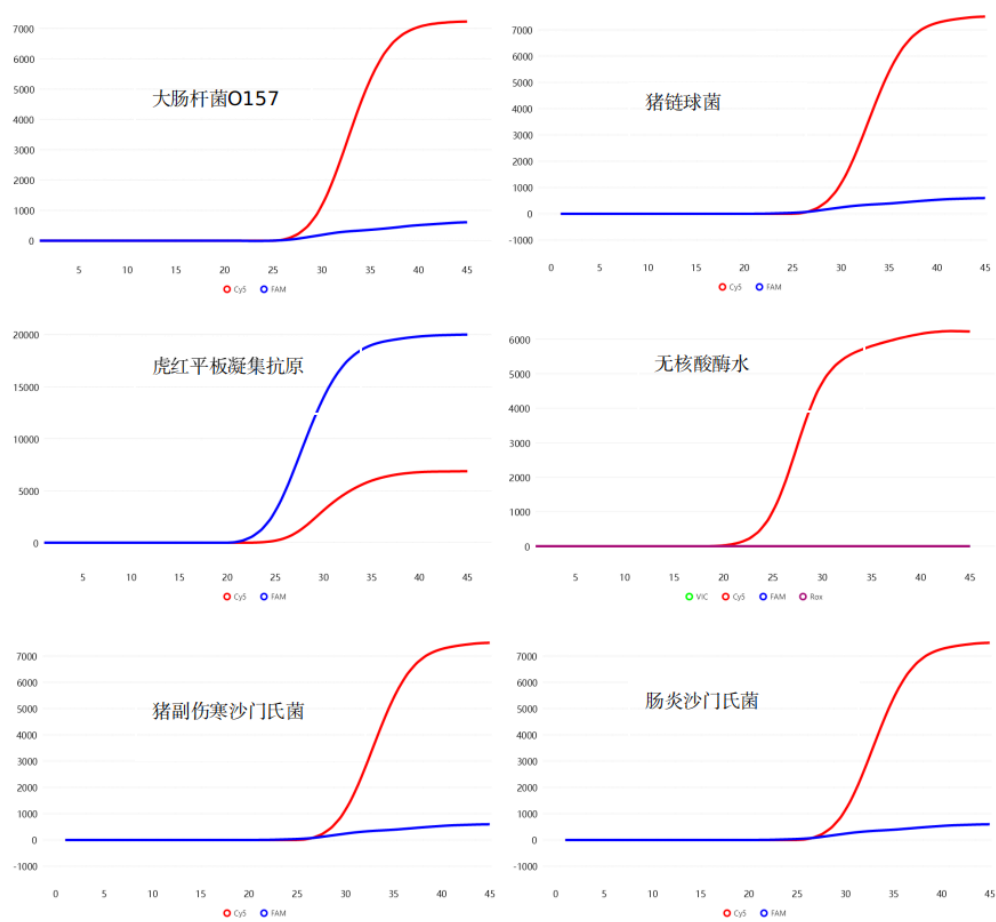
将布鲁氏菌重组质粒 10 倍比稀释 6 个梯度后，浓度分别为 10^5 – 10^1 copies/ μ L，扩增结果见表 2。扩增曲线见图 2。在布鲁氏菌重组质粒浓度为 10 copies/ μ L 时，能够 100% 检出，将该方法的灵敏度定为 10 copies/ μ L。

表 2 布鲁氏菌超快速荧光 PCR 灵敏度试验结果

质粒浓度 (copies/ μ L)	Ct 平均值		检出率
	布鲁氏菌 重组质粒	内参	
10^5	21.159	24.558	100%
10^4	24.797	25.226	100%
10^3	28.142	25.378	100%

10^2	31.826	25.158	100%
10^1	34.699	25.039	100%
10^0	—	24.579	60%

注：“—”代表未完全检测到布鲁氏菌重组质粒，故无法计算该结果。



注：蓝色曲线 (Fam) 为布鲁氏菌重组质粒扩增曲线，红色曲线 (Cy5) 为内参扩增曲线。

图 2 布鲁氏菌超快速荧光 PCR 扩增曲线图

2.3 特异性试验结果

对提取的核酸进行扩增，以无核酸酶水为阴性对照，结果如图 3 所示。仅内参和布鲁氏菌抗原原有扩增曲线，其余样本均未检出，说明该方法对布鲁氏菌具有较好的特异性。

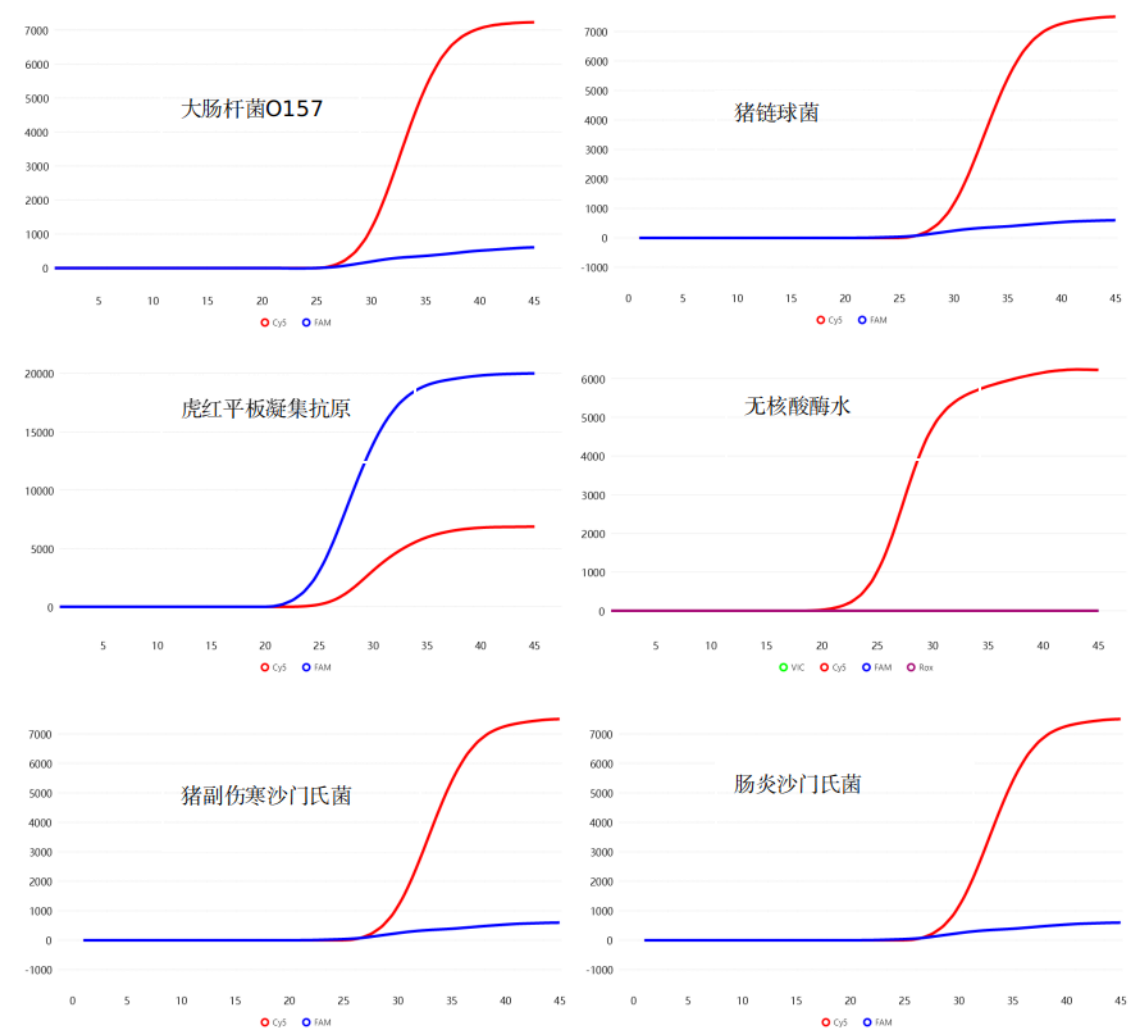


图 3 布鲁氏菌超快速荧光 PCR 特异性试验

2.4 重复性试验结果

分别计算质粒稀释 10 倍、1 000 倍、100 000 倍检测结果的 CV 值，结果如表 3 所示。CV 值分别为 0.23%、0.28%、0.91%，内参结果的 CV 值分别为 0.11%、0.16%、0.26%。所有结果的 CV 值均小于 1%(组内 F=0.689,P=0.62>0.05,差异不显著;组间 F=5568.424,P=2.47×10⁻¹³<0.01,差异极显著)，说明该方法具有非常好的重复性。

表 3 布鲁氏菌超快速荧光 PCR 重复性试验

稀释 倍数	Ct 值	内参 Ct 值	稀释 倍数	Ct 值	内参 Ct 值	稀释 倍数	Ct 值	内参 Ct 值
10 倍	21.118	24.561	1000 倍	28.112	25.369	100000 倍	34.901	24.963
	21.219	24.530		28.028	25.444		34.804	25.086
	21.196	24.524		28.150	25.335		34.202	25.096
	21.109	24.590		28.244	25.398		34.589	25.095
	21.154	24.587		28.175	25.345		34.998	24.955
平均值	21.159	24.558		28.142	25.378		34.699	25.039

标准差	0.048	0.028	0.080	0.039	0.316	0.065
CV 值	0.23%	0.11%	0.28%	0.16%	0.91%	0.26%

2.5 临床样品检测结果

用本实验室常用的布鲁氏菌荧光 PCR 试剂盒，与超快速荧光 PCR 方法同时检测 110 份临床阴性样本和 30 份加入布鲁氏菌虎红平板凝集抗原的阴性样本，两者检测结果完全一致，符合率 100%。说明该方法适用于临床常规样本检测。

四、技术经济分析论证和预期的经济效益

本项目建立的布鲁氏菌超快速荧光 PCR 方法，可以在 15min 内完成布鲁氏菌核酸检测，为预警和防控布鲁氏菌病提供了新的技术手段。文本的发布将对畜牧业健康发展起到很大作用，同时也可以降低人感染的风险，保障公共卫生安全。

五、采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比

本文本所建立的布鲁氏菌超快速荧光 PCR 方法为国内、外首创，未采用国际标准。

六、与现行法律、法规、政策及相关标准的协调性

与现行法律法规、强制性标准等上位标准关系没有冲突。布鲁氏菌病的检测方法被列入 WOA 动物卫生法典、WOAH 诊断手册（2022-3.1.4），德国标准化学会发布了 1 项标准《Animal health analysis methods - Detection of antibodies against Brucellosis by the Complement Fixation Test》（NF U47-004）。国内发布了 1 项国家标准《动物布鲁氏菌病诊断技术》（GB/T 18646-2025），团体标准 1 项《乳肉兼用牛布鲁氏菌病诊断技术规范》（T/DALN 026-2022），地方标准 3 项《梅花鹿布鲁氏菌病胶体金免疫层析检测方法》（DB2201/T 64-2024）、《牛羊布鲁氏菌病荧光偏振（FPA）检测技术规程》（DB21/T 3785-2023）、《牛羊布鲁氏菌病荧光偏振（FPA）检测方法》（DB65/T 4292-2020）。GB/T 18646-2018、T/DALN 026-2022、DB2201/T 64-2024、DB21/T 3785-2023、DB65/T 4292-2020 主要规定了布鲁氏菌分离培养鉴定方法、PCR 方法、布鲁氏菌分型方法和血清学检测方法，基本上能够满足布鲁氏菌病的诊断和检测，但只有 GB/T 18646-2018 包括布鲁氏菌的核酸检测，且时间长，不能做到快速诊断，不能满足临床诊断的需求。

本标准建立的布鲁氏菌超快速荧光 PCR 方法，荧光 PCR 反应仅需 15min，加上样品前处理和核酸提取，可以在 30min 内完成检测，并且敏感性高、特异性强、重复性好，适合于临床快速诊断的需求。

七、贯彻实施标准的措施和建议

本标准发布后，可以通过相关部门组织宣贯，推荐给有相应检测设施和检测项目的实验室使用，也可以委托项目起草单位或其他相关单位组织技术培训的方式推广应用本检测标准。

八、其它应予说明的事项

无。