



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108037277 A

(43)申请公布日 2018.05.15

(21)申请号 201711281982.6

(22)申请日 2017.12.07

(71)申请人 中国兽医药品监察所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街8号

(72)发明人 丁家波 冯宇 蒋卉 朱良全

彭小微 许冠龙 王芳 范学政

秦玉明 王楠 毛开荣 徐磊

(74)专利代理机构 北京君智知识产权代理事务所(普通合伙) 11305

代理人 郑明

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

### (54)发明名称

一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法

### (57)摘要

本发明涉及一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法。本方法建立在对布鲁氏菌IgG和IgM抗体亚型检测方法的基础上,构建易感动物模型,获得我国常用布鲁氏菌弱毒疫苗(猪种S2株和牛种A19株)疫苗免疫及标准强毒株(牛种2308株)作为自然感染的抗体消长规律。并根据自然感染组与疫苗免疫组的特点,确定5种状态,建立了区分自然感染与疫苗免疫的方法;并对本方法进行验证,确认其可靠性。本法只需对一个样本同时检测其IgG和IgM就可对自然感染和疫苗免疫进行区分,方法简单方便、准确性高、操作时间短和价格低廉,适用于各类实验室操作,满足规模检测的要求,本方法填补了国内外在此领域的技术空白,为布病防控提供了技术支撑。

1. 一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法,其特征在于通过分析牛体内针对布鲁氏菌特异性IgG和IgM亚型抗体水平,确定被检测牛的感染/免疫状态,实现对牛布鲁氏菌疫苗免疫或自然感染的区分,满足布鲁氏菌病流行病学调查,本方法为非疾病诊断性的。

2. 权利要求1所述的一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法,其特征就在于布鲁氏菌特异性IgG和IgM亚型抗体水平的检测,是基于特定的牛布鲁氏菌IgG抗体检测试剂盒和牛布鲁氏菌IgM抗体检测试剂盒进行的。

3. 权利要求1所述的一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法,其特征就在于确定被检测牛的感染/免疫状态是通过构建布鲁氏菌疫苗免疫和模拟布鲁氏菌自然感染的牛体内IgG和IgM消长规律,并划分判定范围来实现的,即判断被检动物的感染/免疫状态的指标定为:

当血清样本的P%值 $\geq 20\%$ 时,为牛布鲁氏菌IgG亚型抗体阳性,当血清样本的P%值 $< 20\%$ 时,为牛布鲁氏菌IgG亚型抗体阴性;

当血清样本的P%值 $\geq 85\%$ 时,为牛布鲁氏菌IgM亚型抗体阳性,当血清样本的P%值 $< 85\%$ 时,为牛布鲁氏菌IgM亚型抗体阴性。

4. 权利要求1、3所述的一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法,其特征就在于判断被检动物的感染/免疫状态的指标是建立是来自以下的试验结果:

当检验结果为: IgG, S/P $\geq 60\%$ ; IgM, S/P $\leq 85\%$ 时,标识为状态1,为自然感染;检验结果为IgG, S/P $\geq 60\%$ ; IgM, S/P $\geq 85\%$ ,标识为状态2,为自然感染或A19免疫初期;检验结果为IgG, S/P介于 $20\% \sim 60\%$ ; IgM, S/P $\geq 85\%$ ,标识为状态3,为A19免疫;检验结果为IgG, S/P介于 $20\% \sim 60\%$ ; IgM, S/P $\leq 85\%$ ,标识为状态4,为A19免疫后期或感染后期;检验结果为: IgG, S/P $< 20\%$ ; IgM, S/P $\geq 85\%$ ,标识为状态5,为S2免疫或急性感染。

5. 权利要求1所述一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法,其特征就在于其中的数据处理可以使用计算机处理完成。

## 一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法——属生物制品检测技术领域。

### 技术背景

[0002] 布鲁氏菌病作为重要人畜共患病之一,严重威胁公共安全和养殖业健康发展。对于家畜来说,布病的主要症状有波状热、体重降低、消瘦、产奶性能下降,对于怀孕母畜则引起流产、死胎、久配不孕等症状,给国际贸易带来严重威胁,也影响相关动物制品的出口,被世界动物卫生组织(OIE)列为B类传染病,我国也将其列为二类传染病之一。除少数发达国家外,布病在世界170多个国家均有发生,其中以中亚、中东等流行情况最为严重。

[0003] 我国布病曾在上世纪60~80年代得到有效控制,但近年来,动物布病的发病数量和群体发病率却呈现逐年升高的趋势。作为一种严重影响公共卫生安全和养殖业健康发展的人畜共患病,预防和控制布病显得迫在眉睫。布病已被纳入《国家中长期动物疫病防治规划(2012~2020年)》。在消灭布病的国家或地区,通常采取疫苗免疫和检疫扑杀相结合的措施以达到净化群体的目的。

[0004] 疫苗免疫是在动物上最为有效控制和预防布病的措施之一。牛种布鲁氏菌S19株和猪种布鲁氏菌S2株对于我国布病的防控起到了重要作用,尤其是S2株,其有我国在上世纪60年代开发,对各种布病易感动物均具有良好的保护效果,且毒力较低,免疫后产生的副反应和对公共卫生的安全威胁较低。但是上述两种疫苗均为光滑型菌株,其产生的抗体与自然感染难以区分,给疫苗的使用带来了极大困扰。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于建立了一种能够区分动物牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染的技术方法,本发明通过前期建立的针对牛布鲁氏菌IgG和IgM亚型抗体的间接ELISA方法(CN05067812A和CN06771182A),分别对皮下接种免疫牛布鲁氏菌活疫苗(A19株)、口服免疫牛布鲁氏菌活疫苗(S2株),以及注射牛布鲁氏菌2308株强毒活菌人工()感染的成年牛血液中的IgG和IgM亚型进行持续追踪其消长规律,确定不同状态(免疫/感染)临界值,以建立牛布鲁氏菌免疫/自然感染的抗体亚型消长模型,并通过抗体亚型对布鲁氏菌疫苗免疫或自然感染进行鉴别诊断提供技术方法,满足我国布病流行病学调查的需要。

[0006] 本发明的技术方案

[0007] 1.本发明所述一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法,在于通过分析牛体内针对布鲁氏菌特异性IgG和IgM亚型抗体水平,确定被检测牛的感染/免疫状态,实现对牛布鲁氏菌疫苗免疫或自然感染的区分,满足布鲁氏菌病(布病)流行病学调查,本方法为非疾病诊断性的。

[0008] 2.本发明所述一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法,还在于布鲁氏菌特异性IgG和IgM亚型抗体水平的检测,是基于特定的牛布鲁氏菌IgG抗体检测试剂盒

和牛布鲁氏菌IgM抗体检测试剂盒进行的。

[0009] 3. 本发明所述的一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法, 还在于确定被检测牛的感染/免疫状态是通过构建布鲁氏菌疫苗免疫和模拟布鲁氏菌自然感染的牛体内IgG和IgM消长规律, 并划分判定范围来实现的, 即判断被检动物的感染/免疫状态的指标定为:

[0010] 当血清样本的P%值 $\geq 20\%$ 时, 为牛布鲁氏菌IgG亚型抗体阳性, 当血清样本的P%值 $< 20\%$ 时, 为牛布鲁氏菌IgG亚型抗体阴性;

[0011] 当血清样本的P%值 $\geq 85\%$ 时, 为牛布鲁氏菌IgM亚型抗体阳性, 当血清样本的P%值 $< 85\%$ 时, 为牛布鲁氏菌IgM亚型抗体阴性。

[0012] 4. 本发明所述的一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法, 还在于其中判断被检动物的感染/免疫状态的指标是建立是来自以下的试验结果:

[0013] 当检验结果为: IgG, S/P $\geq 60\%$ ; IgM, S/P $\leq 85\%$ 时, 标识为状态1, 为自然感染; 检验结果为IgG, S/P $\geq 60\%$ ; IgM, S/P $\geq 85\%$ , 标识为状态2, 为自然感染或A19免疫初期; 检验结果为IgG, S/P介于 $20\% \sim 60\%$ ; IgM, S/P $\geq 85\%$ , 标识为状态3, 为A19免疫; 检验结果为IgG, S/P介于 $20\% \sim 60\%$ ; IgM, S/P $\leq 85\%$ , 标识为状态4, 为A19免疫后期或感染后期; 检验结果为: IgG, S/P $< 20\%$ ; IgM, S/P $\geq 85\%$ , 标识为状态5, 为S2免疫或急性感染。

[0014] 5. 本发明所述一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法, 其中的数据处理适合使用计算机处理完成。

[0015] 本发明具体实施方式

[0016] 本发明分别用针对IgG和IgM的牛布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒(CN05067812A和CN06771182A)测定抗体效价, 其方法见附注1。

[0017] 1. 本申请建立了布鲁氏菌病活疫苗(A19株)(以下简称:A19疫苗)免疫牛体内的抗体变化规律,

[0018] 选择布病阴性牛50头以上, 按A19株疫苗的使用说明进行注射免疫, 并在不同的时间点采集血样, 分离血清。分别用针对IgG和IgM的牛布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒(CN05067812A和CN06771182A)测定抗体效价, 记录各阶段测定的P值:

[0019] 本发明分别用A19疫苗注射免疫92头布鲁氏菌抗体阴性的成年牛, 并于免疫后7天、15天、30天、60天、90天、120天和150天分别采集血清样本进行抗体检测, 以描绘A19疫苗免疫后, 免疫牛体内IgG和IgM的变化规律。研究结果发现(见图1), A19疫苗免疫后第7天, 其体内IgG和IgM抗体就开始出现, 并同时在第15天达到高峰, 之后开始逐步下降。对于IgG, 在免疫15天后, A19疫苗免疫组抗体水平明显下降, 到90天时IgG的平均数已接近临界值, 其群体内不同时间段阳性率分别为62.64%(第7天)、84.78%(第15天)、78.26%(第30天)、75%(第60天)、36.95%(第90天)、27.17%(第120天)和14.22%(第150天)。不同时间段抗体水平存在着统计学差异, 其中第60天与第90天之间差异显著( $p < 0.01$ ), 说明动物在免疫60天之后, 其体内IgG的含量明显下降。与IgG相比, A19疫苗免疫组其IgM的变化更为明显, 免疫15天后IgM抗体水平达到高峰, 之后快速下降, 在第60天时, 其平均值已接近临界值, 到120天后则完全消失。不同时间段内, IgM的含量变化十分明显, 第15天与第30天, 第30天与第60天, 第90天与第120天之间, 抗体效价均有显著性差异( $p < 0.01$ )。根据群体在免疫后不同时期抗体水平的算术平均数绘制抗体趋势规律图(见图2), 图中可以发现, A19免疫后15天, 其

IgG水平高于临界值,之后逐步下降,到90天时基本低于临界值;IgM第15天达到高峰,其后持续下降,60天后,低于临界值。

[0020] 2.本申请建立了布鲁氏菌病活疫苗(S2株)(以下简称:S2疫苗)免疫牛体内的抗体变化规律

[0021] S2疫苗是我国使用最为广泛的布鲁氏菌活疫苗,研究其不同亚型抗体的变化趋势,寻找区分不同免疫状态的重要标识更为具有意义。

[0022] 选择布病阴性牛50头以上,按S2疫苗的使用说明进行口服免疫,并在不同的时间点采集血样,分离血清。分别用针对IgG和IgM的牛布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒(CN05067812A和CN06771182A)测定抗体效价,记录各阶段测定的P值:

[0023] 与A19相比,S2疫苗对牛的推荐免疫途径为口服,其免疫组动物体内抗体效价整体呈现效价低、下降快的特点(见图3)。具体来说,大部分试验牛体内IgM亚型抗体在免疫后7天开始产生,到15天时达到高峰。在高峰期,其抗体水平(P%值)为临界值的3倍左右,大部分样本其P%值处于100~200之间。15天后其抗体水平迅速下降,到第60天时,群体平均值在处于临界值以下,到第90天时,群体中大部分样本(55/56)已低于临界值。与A19明显不同的是,S2疫苗免疫群体其IgG亚型抗体含量很低,除在免疫后30天个别样本(4/56)其抗体水平稍高与临界值之外,大部分在整个监测周期内均低于临界值,这是S2免疫牛最重要的特点之一。相对于A19疫苗免疫组,S2疫苗组不同时间段IgM亚型抗体水平变化更加剧烈。S2疫苗免疫后其IgM亚型抗体在第7天与第15天,第15天与第30天,第30天与第60天,第60天与第90天,以及90与第120天之间均有显著差异( $p<0.05$ );对于IgG,虽然大部分样本在整个监测期之内抗体均低于临界值,但在第30天与第60天、以及第60天与第90天也存在显著差异( $p<0.05$ )。根据群体在免疫后不同时期抗体水平的算术平均数绘制抗体趋势规律图(见图4),由图2和图4相比较可以看出,S2疫苗组免疫的牛,其IgG平均抗体水平要明显低于A19疫苗免疫组,而IgM,虽然其最高值低于A19疫苗组,但第15天后,其水平和下级幅度与A19疫苗组比较接近。

[0024] 3.本申请建立了布鲁氏菌参考强毒(2308株)感染牛体内IgG和IgM消长规律测定的抗体变化规律

[0025] 2308感染牛的抗体。选择布病阴性牛4头在P3实验室进行人工感染,并在不同的时间点采集血样,分离血清。分别用针对IgG和IgM的牛布鲁氏菌间接ELISA抗体检测试剂盒(CN05067812A和CN06771182A)测定抗体效价,记录各阶段测定的P值:

[0026] 本申请中,我们采用布鲁氏菌参考强毒牛种布鲁氏菌2308株对试验牛进行模拟自然感染的试验,并跟踪了其抗体消长的趋势规律(见图5)。结果发现,与疫苗免疫组(包括A19疫苗组和S2疫苗组)相比,感染组具有抗体产生晚、持续时间长的特点。IgM亚型抗体在感染后两周才开始检测到,到第30天时达到高峰,之后快速下降,到第90天时低于临界值,IgM抗体效价最高时也仅为临界值的2倍,不同感染个体之间的抗体水平差异较小。相对于IgM,IgG抗体虽然产生时间更晚,但其后持续上升,并在整个监测期内均一直保持稳定。

[0027] 4.本申请建立了不同亚型的抗体规律趋势图和确定了不同感染状态的划分范围

[0028] 为了更加直观地掌握不同组别之间的差异,我们根据感染组(2308株)和免疫组(包括A19和S2)抗体亚型的变化规律,合并了IgG和IgM抗体变化的趋势,得到了用于对布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染进行区分的分析曲线(见图6)。图中,1号和2号线条代表人工感染

2308株菌后的抗体趋势,3、4号线代表免疫A19疫苗后的抗体趋势,4、5号线代表免疫S2疫苗后的变化趋势;有箭头1、3、5号的代表IgM,无箭头的2、4、6实线代表IgG。根据各模型下的抗体水平,将合并的抗体规律曲线在纵轴(Y轴,S/P值,表示抗体水平)和横轴(X轴,天,表示感染/免疫后的时间)上各分为三个区域。纵轴上,S/P低于20%的为IgG抗体阴性区域,高于20%以上的为IgG抗体阳性区域;S/P低于85%的为IgM抗体阴性区域,高于85%的为IgM抗体阳性区域。趋势图显示,S2疫苗组IgG一直处于阴性区域内,而A19其IgG从第15天开始,其平均值一直维持在35%左右,在60天之后下降,到第90天时开始低于临界值。2308株菌感染组其平均值在30天后高于临界值后一直上升并保持较高水平。根据不同组别抗体规律差异,可人为将X轴的时间划分为三个阶段,第一阶段为感染/免疫后15天内,该阶段可以称为抗体上升阶段,其中A19疫苗免疫组IgG和IgM,S2疫苗组IgM亚型抗体均在此阶段增长,并在15天达到高峰;而2308株菌感染组其IgM则滞后到下个阶段才达到顶峰,在此阶段,其抗体虽在上升,但仍低于临界值。第二阶段即感染/免疫后15~90天,被称为抗体下降阶段,在该阶段,A19疫苗免疫组和S2疫苗免疫组其抗体均呈现下降趋势,两者的IgM亚型抗体平均值均在第60天处于临界值附近,90天后均低于临界值。A19疫苗免疫组其IgG抗体与IgM下降趋势基本相同,均较为缓慢;感染组在此阶段则呈现完全不同的趋势,其IgM呈现峰状,以30天为界限,抗体在15天快速上升后又快速下降,其平均值在该阶段均高于临界值;而IgG则在30天后开始出现并一直保持较高水平。第三阶段,即免疫/感染90天后被称为抗体消失阶段,该阶段除2308株菌感染组IgG抗体仍在临界值之上,其余组别的各亚型抗体均已检测不到。分析图6,可以发现在第二阶段,尤其是60~90天时。2308株菌感染组与A19疫苗免疫组存在一定的交叉,这种情况会对准确判断强毒菌感染或疫苗免疫的真实状况存在一定的干扰,遇到这种情况,可以通过再次采集(与第一次样本采集间隔2周以上)样本进行检测,以规避处于特定阶段的误判。

[0029] 根据建立的感染/免疫模型,并结合大量临床样品的检测结果,将IgG和IgM抗体水平划分成5个感染/免疫的状态(结果见附表1):①自然感染(IgG,S/P $\geq$ 60%;IgM,S/P $\leq$ 85%。标识为状态1)、②自然感染或A19疫苗免疫初期(IgG,S/P $\geq$ 60%;IgM,S/P $\geq$ 85%。标识为状态2)、③A19疫苗免疫(IgG,S/P介于20%~60%;IgM,S/P $\geq$ 85%。标识为状态3)、④A19疫苗免疫后期或2308株菌感染后期(IgG,S/P介于20%~60%;IgM,S/P $\leq$ 85%。标识为状态4)、⑤S2疫苗免疫或急性感染(IgG,S/P $<$ 20%;IgM,S/P $\geq$ 85%。标识为状态5)。对于状态2和状态4,为了确保结果真实可靠,需要在15天后再次采集样本进行检测,再次检测的结果能比较准确地判断被检动物的感染/免疫状态,其判断被检动物的感染/免疫状态的指标定为:

[0030] 当血清样本的P%值 $\geq$ 20%时,为牛布鲁氏菌IgG亚型抗体阳性,当血清样本的P%值 $<$ 20%时,为牛布鲁氏菌IgG亚型抗体阴性;

[0031] 当血清样本的P%值 $\geq$ 85%时,为牛布鲁氏菌IgM亚型抗体阳性,当血清样本的P%值 $<$ 85%时,为牛布鲁氏菌IgM亚型抗体阴性。

[0032] 表1不同状态的划定范围

[0033]

| 状态 | IgG (S/P*100%) | IgM (S/P*100%) | 状态                                   |
|----|----------------|----------------|--------------------------------------|
| 1  | ≥60%           | ≤85%           | 自然感染                                 |
| 2  | ≥60%           | ≥85%           | 自然感染或 A19 疫苗免疫初期                     |
| 3  | 20%~60%        | ≥85%           | A19 疫苗免疫                             |
| 4  | 20%~60%        | ≤85%           | A19 疫苗免疫后期或感染后期<br>(需 15~30 天重新采样检测) |
| 5  | <20%           | ≥85%           | S2 疫苗免疫或急性感染                         |

[0034] 5. 对背景清晰的临床样本进行检测,确证了本发明的可靠性。

[0035] 按照本发明建立的方法,我们对背景清晰的50份临床样本进行了状态判断,结果92% (46/50)的判断结果与实际情况一致(详细结果见实施例1表2)。状态2和状态4存在两种可能,验证结果发现,共有6个样本判断为处于状态2,其中5个样本为自然感染,1个样本为A19疫苗免疫,说明此阶段处于自然感染状态的情况居多。对于状态4,共检测了6个样本,其中2个为A19疫苗免疫,占到总数的33%,在此界定条件下,比较难以区分自然感染或A19疫苗免疫,需要结合第二次采用检测的结果进行判断。上述结果证明,本发明所建立的方法,能比较可靠地对布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态进行识别。

## 附图说明

[0036] 图1 A19疫苗免疫牛后抗体滴度与免疫时间(天)关系图其中:图A为IgG抗体滴度(P%)与免疫时间(天)关系;图B为IgM抗体滴度(P%)与免疫时间(天)关系(\*\*\*表示差异极显著 $p<0.001$ ,\*\*表示 $p<0.01$ ,\*表示 $p<0.05$ )。

[0037] 图2 A19疫苗免疫牛后IgG抗体和IgM抗体的消长规律。

[0038] 图3 S2疫苗免疫牛后抗体滴度与免疫时间(天)关系图其中:图A为IgG抗体滴度(P%)与免疫时间(天)关系;图B为IgM抗体滴度(P%)与免疫时间(天)关系(\*\*\*表示差异极显著 $p<0.001$ ,\*\*表示 $p<0.01$ ,\*表示 $p<0.05$ )。

[0039] 图4 S2疫苗免疫牛后IgG抗体和IgM抗体的消长规律。

[0040] 图5用2308强毒菌人工感染5头牛后抗体滴度与感染时间(天)关系图图A为感染后牛体内的IgG抗体滴度(P%)与感染时间(天)关系;图B为感染后IgM滴度(P%)与感染时间(天)关系。

[0041] 图6疫苗免疫与自然感染状态下,IgG和IgM抗体消长规律图中1和2分别为2308菌株感染后的IgG和IgM的抗体消长规律;3和4分别为A19疫苗免疫后的IgG和IgM的抗体消长规律;5和6分别为S2疫苗免疫后的IgG IgM的抗体消长规律。

[0042] 本发明微生物资源信息

[0043] 本发明所涉及的微生物为:猪种布鲁氏菌(*Brucella suis*) S2株(CVCC70502),系猪种布鲁氏菌生物2型,是布鲁氏菌病弱毒活疫苗参考株;牛种布鲁氏菌(*Brucella abortus*) A19株(或称S19株,CVCC 70202),系牛种布鲁氏菌生物1型,是布鲁氏菌病弱毒活疫苗参考株;牛种布鲁氏菌2308(CVCC 788)是强毒株,以上3株均由北京市海淀区中关村南大街8号中国兽医药品监察所中国兽医微生物菌种保藏管理中心鉴定、保管和供应(请见中国兽医药品监察所、中国兽医微生物菌种保藏管理中心编著,中国兽医菌种目录(第二版),

中国农业科学技术出版社,2002年,p35,p25,p24)。

[0044] 本发明的优点

[0045] 本发明涉及一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法。本方法建立在对布鲁氏菌IgG和IgM抗体亚型检测方法的基础上,构建易感动物模型,获得我国常用布鲁氏菌弱毒疫苗(猪种S2株和牛种A19株)以及标准强毒株(牛种2308株)的抗体规律。而后根据自然感染组与疫苗免疫组的特点,确定了5种状态,建立了区分自然感染与疫苗免疫的方法;并对建立的方法进行验证,确认其可靠性。本法只需要对一个样本同时检测其IgG和IgM就可对自然感染和疫苗免疫进行区分,方法简单方便、准确性高、操作时间短和价格低廉,适用于各类实验室操作,满足大规模检测的要求,本方法弥补了国内外在此领域的技术空白,为布病防控提供了技术支撑。

## 实施例

[0046] 以下实施例为进一步说明本发明的技术方案,不对本发明构成限制。

[0047] 实施例1

[0048] 一一对背景清晰的临床样本进行检测,确证了本发明的可靠性。

[0049] 按照本发明建立的方法,我们对背景清晰的50份临床样本进行了状态判断,结果92%(46/50)的判断结果与实际情况一致(结果见表2)。状态2和状态4存在两种可能,验证结果发现,共有6个样本判断为处于状态2,其中5个样本为自然感染,1个样本为A19免疫,说明此阶段处于自然感染状态的情况居多。对于状态4,共检测了6个样本,其中2个为A19免疫,占到总数的33%,在此界定条件下,比较难以区分自然感染或A19疫苗免疫,需要结合第二次采用检测的结果进行判断。上述结果证明,本发明所建立的方法,能比较可靠地对布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态进行识别。

[0050] 表2临床样本结果验证

[0051]

| 血清编号      | IgG(S/P*100%)  | IgM(S/P*100%)   | 判断结果        | 真实情况          |
|-----------|----------------|-----------------|-------------|---------------|
| 1         | 35.695         | 132.12          | 状态 3        | A19 免疫        |
| 2         | 97.7803        | 88.37395        | 状态 2        | 自然感染          |
| 3         | 15.2121        | 172.3887        | 状态 5        | S2 免疫         |
| 4         | 27.7576        | 191.2862        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 5         | 47.803         | 145.5244        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 6         | 23.3939        | 111.609         | 状态 3        | A19 免疫        |
| 7         | 45.4621        | 59.52626        | 状态 4        | 自然感染          |
| 8         | 35.7349        | 132.2636        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 9         | 40.3485        | 119.3555        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 10        | 18.1818        | 182.2514        | 状态 5        | S2 免疫         |
| 11        | 21.2803        | 152.8153        | 状态 3        | A19 免疫        |
| <b>12</b> | <b>63.6894</b> | <b>45.2027</b>  | <b>状态 1</b> | <b>A19 免疫</b> |
| 13        | 60.9924        | 149.9164        | 状态 2        | 自然感染          |
| 14        | 34.3636        | 156.5207        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 15        | 29.9621        | 136.1519        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 16        | 53.3258        | 121.1886        | 状态 3        | A19 免疫        |
| <b>17</b> | <b>70.5758</b> | <b>184.5183</b> | <b>状态 3</b> | <b>自然感染</b>   |
| 18        | 52.7576        | 232.0784        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 19        | 40.2857        | 160.3134        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 20        | 59.0214        | 80.22535        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 21        | 27             | 97.30986        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 22        | 35.3143        | 109.8592        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 23        | 16.0143        | 105.507         | 状态 5        | S2 免疫         |
| 24        | 47.7571        | 135.6197        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 25        | 61.9357        | 91.90141        | 状态 2        | A19 免疫        |
| 26        | 41.4429        | 83.59155        | 状态 4        | 自然感染          |
| 27        | 43.0929        | 130.9437        | 状态 3        | A19 免疫        |
| 28        | 44.0143        | 15.37576        | 状态 4        | 自然感染          |
| 29        | 41.7357        | 17.55758        | 状态 4        | A19 免疫        |
| 30        | 98.3654        | 22.14545        | 状态 1        | 自然感染          |
| 31        | 105.369        | 18.81818        | 状态 1        | 自然感染          |
| 32        | 78.9625        | 41.58788        | 状态 1        | 自然感染          |
| 33        | 80.3335        | 29.99394        | 状态 1        | 自然感染          |
| <b>34</b> | <b>64.3382</b> | <b>11.84848</b> | <b>状态 1</b> | <b>A19 免疫</b> |
| 35        | 3.3365         | 116.6016        | 状态 5        | S2 免疫         |

[0052]

|           |               |                |             |               |
|-----------|---------------|----------------|-------------|---------------|
| 36        | 4.3987        | 121.7383       | 状态 5        | 自然感染          |
| 37        | 11.6985       | 105.8959       | 状态 5        | 自然感染          |
| 38        | 4.3697        | 94.2578        | 状态 5        | S2 免疫         |
| 39        | 88.625        | 143.5142       | 状态 2        | 自然感染          |
| 40        | 120.669       | 180.5054       | 状态 2        | 自然感染          |
| 41        | 68.331        | 124.6882       | 状态 2        | 自然感染          |
| 42        | 77.125        | 33.641         | 状态 1        | 自然感染          |
| <b>43</b> | <b>16.336</b> | <b>163.221</b> | <b>状态 5</b> | <b>A19 免疫</b> |
| 44        | 8.369         | 36.952         | 阴性          | 阴性            |
| 45        | 12.345        | 148.672        | 状态 5        | S2 免疫         |
| 46        | 77.366        | 33.664         | 状态 1        | 自然感染          |
| 47        | 100.111       | 20.741         | 状态 1        | 自然感染          |
| 48        | 12.987        | 62.341         | 阴性          | 阴性            |
| 49        | 21.336        | 55.227         | 状态 4        | 自然感染          |
| 50        | 30.125        | 34.6521        | 状态 4        | A19 免疫        |

[0053] 附注1

[0054] iELISA方法使用说明

[0055] 1. 用法

[0056] (1) 样品处理:取动物全血,待血液凝固后,以4000r/min离心10min,收集上清,血清应清亮,无溶血。

[0057] (2) 1×洗涤液的配制:使用前,将20×洗涤液恢复至室温(20~25℃),并摇动,使结晶溶解(可在37℃水浴中加热5~10min),然后用去离子水作1:20稀释,充分混匀。

[0058] (3) 待检血清和对照血清的稀释在血清稀释板中将待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清用样品稀释液作1:50稀释。

[0059] (4) 操作步骤

[0060] 1) 加样:取抗原包被板(根据样品多少,可拆开分次使用),以1×洗涤液300μl/孔洗板1次,弃去洗涤液。将稀释好的待检血清、阳性对照血清和阴性对照血清分别加入到ELISA板中,100μl/孔,其中阳性对照血清和阴性对照血清各加2孔(孔1、孔2)。加样结束后,37℃作用30min。取出反应板,弃去反应液,每孔加入300μl 1×洗涤液,洗涤3次,最后1次甩干或拍干。

[0061] 2) 加酶标抗体:将HRP-兔抗牛IgG酶标抗体或HRP-羊抗牛IgM酶标抗体用稀释液作1:200稀释后,每孔加入100μl,37℃作用30min。取出反应板,弃去反应液,每孔加入300μl 1×洗涤液,洗涤3次,最后1次甩干或拍干。。

[0062] 3) 显色与终止:将底物溶液A和B按1:1 (V/V) 混合后,立即加入到ELISA反应板中,100μl/孔,室温避光显色15min后,每孔加50μl终止液终止反应。

[0063] 2. 结果判定:反应终止后,15min内用酶标仪测定OD<sub>450nm</sub>值。

[0064] (1) 计算方法:

$$[0065] \quad \text{阳性对照平均 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值} = \frac{(\text{孔 1} + \text{孔 2}) \text{ OD}_{450\text{nm}}}{2}$$

$$[0066] \quad \text{阴性对照平均 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值} = \frac{(\text{孔 1} + \text{孔 2}) \text{ OD}_{450\text{nm}}}{2}$$

$$[0067] \quad \text{阳性百分比 P\%} = \frac{\text{样本 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值}}{\text{阳性对照平均 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值}} \times 100\%$$

[0068] (2) 实验成立条件:

[0069] 当阳性对照平均 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 0.8$ , 阴性对照平均 $\text{OD}_{450\text{nm}} < 0.2$ 且 $\text{P\%} < 20\%$  (IgG) 或 $85\%$  (IgM) 时, 实验成立。

[0070] (3) 结果判定:

[0071] 当血清样本的 $\text{P\%}$ 值 $\geq 20\%$ 时, 为牛布鲁氏菌IgG亚型抗体阳性; 当血清样本的 $\text{P\%}$ 值 $< 20\%$ 时, 为牛布鲁氏菌IgG亚型抗体阴性。

[0072] 当血清样本的 $\text{P\%}$ 值 $\geq 85\%$ 时, 为牛布鲁氏菌IgM亚型抗体阳性; 当血清样本的 $\text{P\%}$ 值 $< 85\%$ 时, 为牛布鲁氏菌IgM亚型抗体阴性。

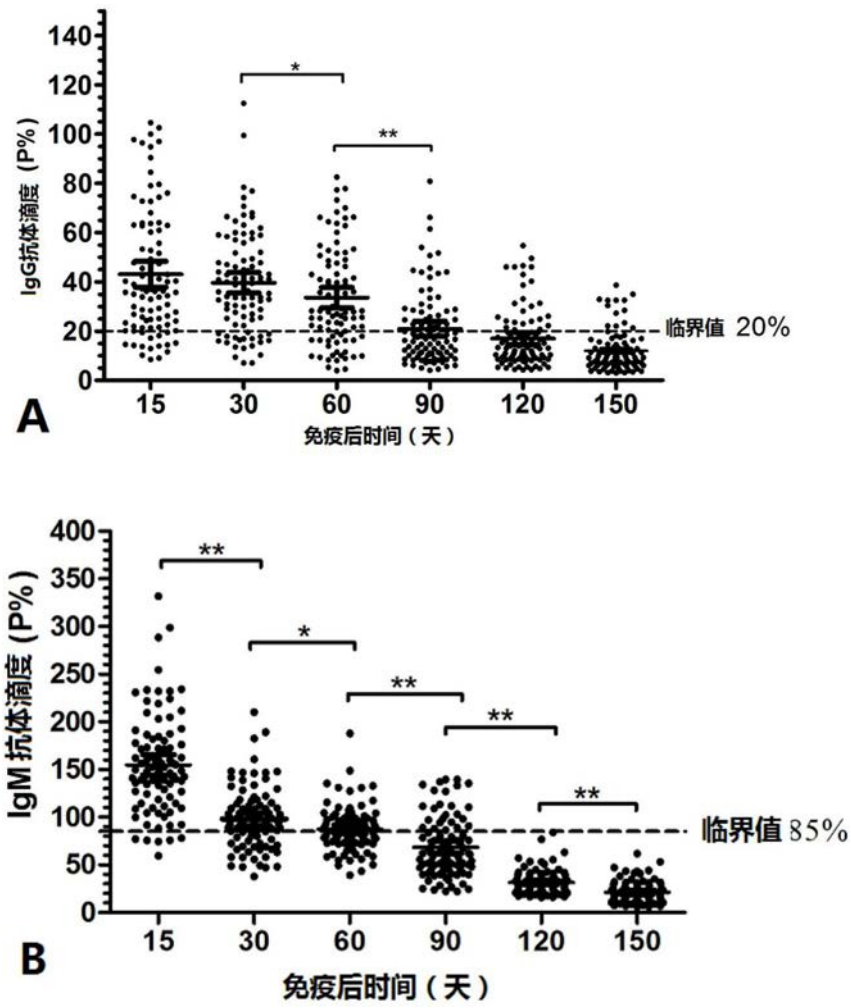


图1

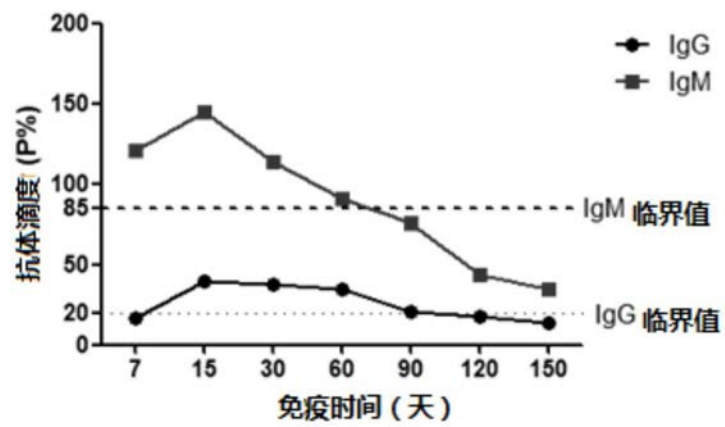


图2

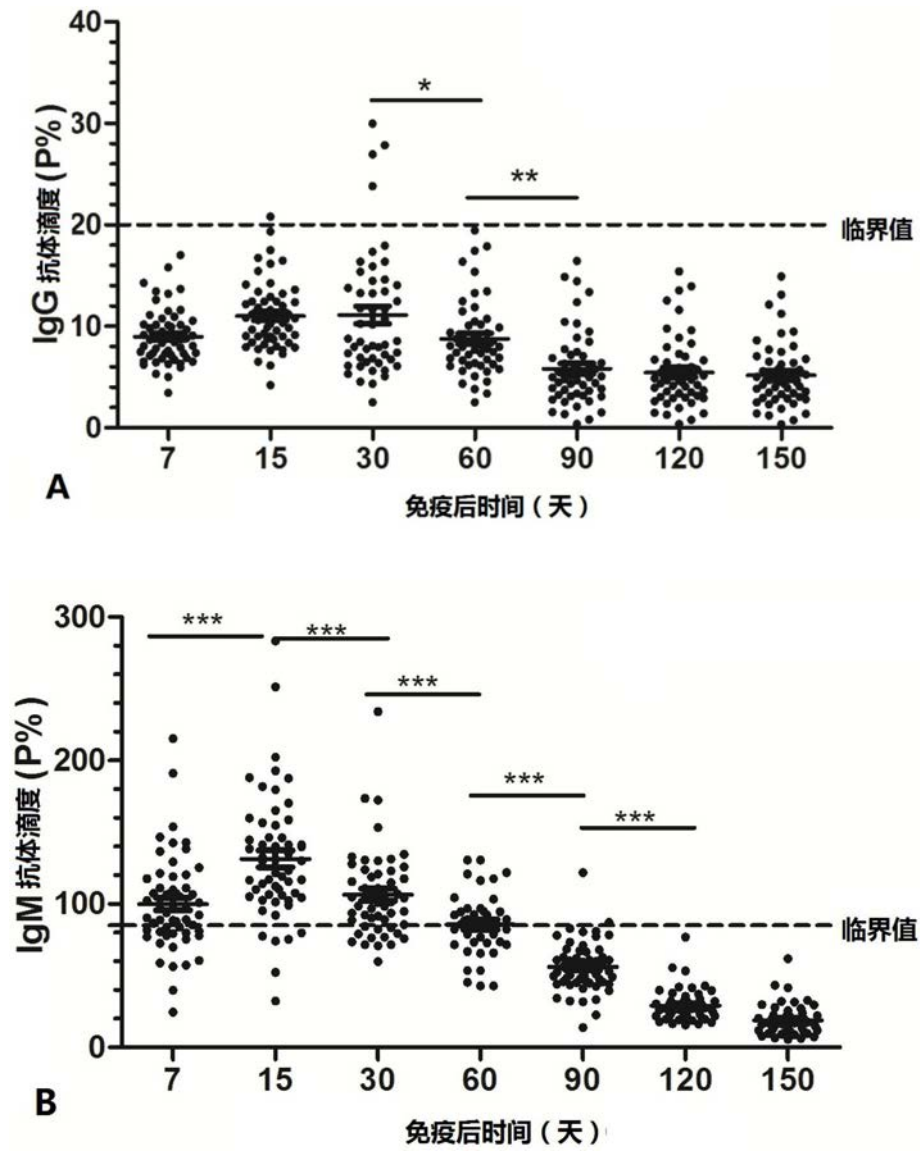


图3

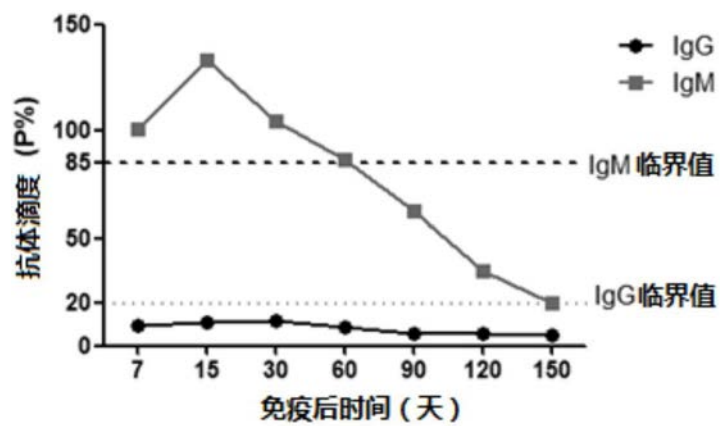


图4

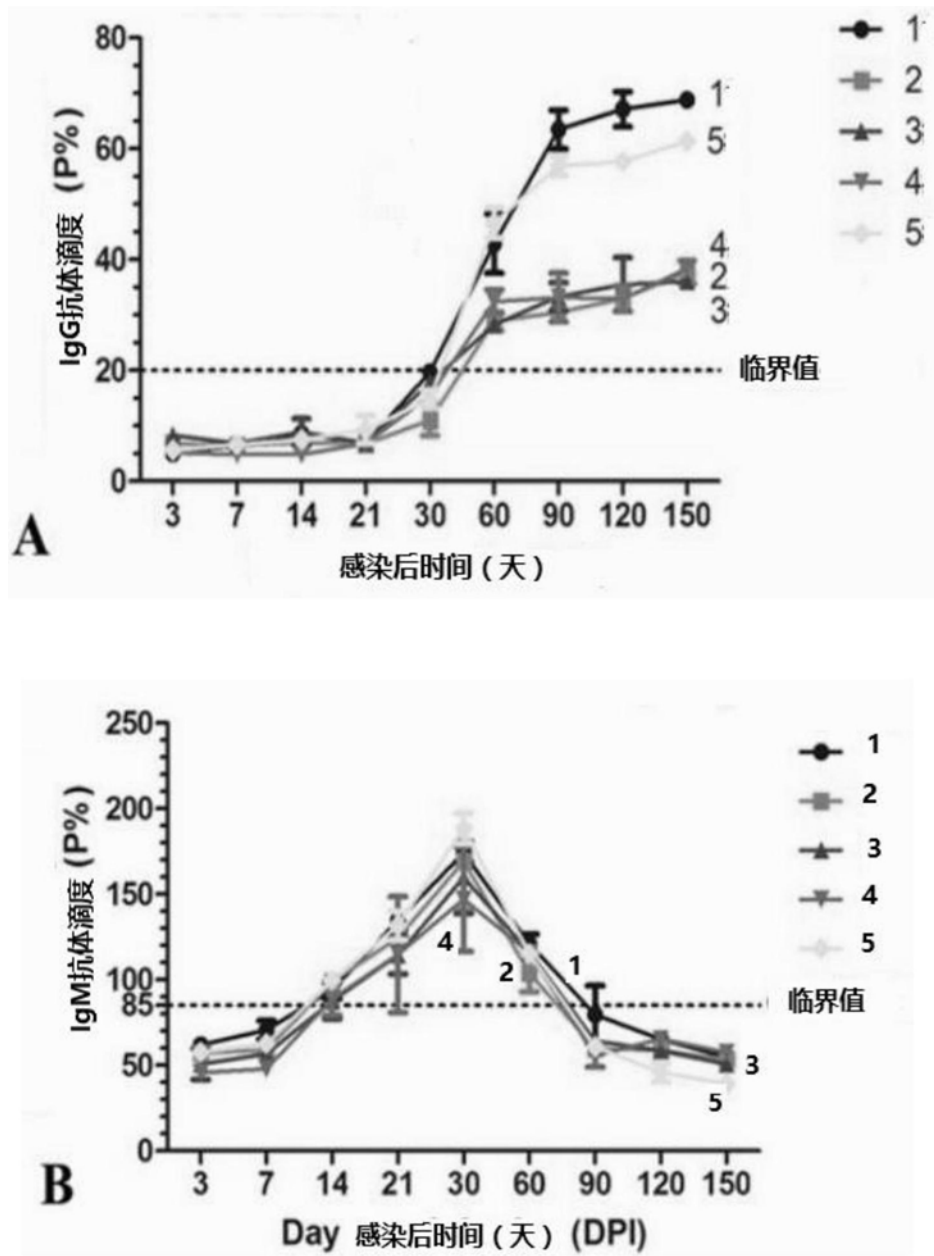


图5

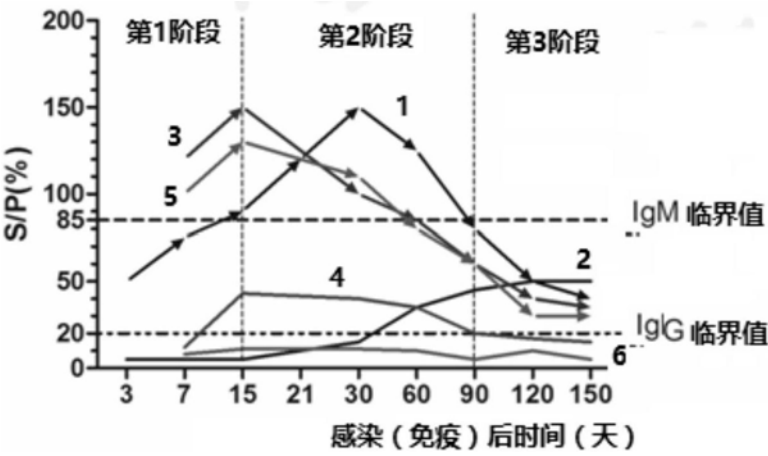


图6

|                |                                                                             |         |            |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法                                                     |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN108037277A</a>                                                | 公开(公告)日 | 2018-05-15 |
| 申请号            | CN201711281982.6                                                            | 申请日     | 2017-12-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国兽医药品监察所                                                                   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 中国兽医药品监察所                                                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 中国兽医药品监察所                                                                   |         |            |
| [标]发明人         | 丁家波<br>冯宇<br>蒋卉<br>朱良全<br>彭小微<br>许冠龙<br>王芳<br>范学政<br>秦玉明<br>王楠<br>毛开荣<br>徐磊 |         |            |
| 发明人            | 丁家波<br>冯宇<br>蒋卉<br>朱良全<br>彭小微<br>许冠龙<br>王芳<br>范学政<br>秦玉明<br>王楠<br>毛开荣<br>徐磊 |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53                                                                   |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/53                                                                   |         |            |
| 代理人(译)         | 郑明                                                                          |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                              |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种区分牛布鲁氏菌疫苗免疫与自然感染状态的方法。本方法建立在对布鲁氏菌IgG和IgM抗体亚型检测方法的基础上，构建易感动物模型，获得我国常用布鲁氏菌弱毒疫苗(猪种S2株和牛种A19株)疫苗免疫及标准强毒株(牛种2308株)作为自然感染的抗体消长规律。并根据自然感染组与疫苗免疫组的特点，确定5种状态，建立了区分自然感染与疫苗免疫的方法；并对本方法进行验证，确认其可靠性。本法只需对一个样本同时检测其IgG和IgM就可对自然感染和疫苗免疫进行区分，方法简单方便、准确性高、操作时间短和价格低廉，适用于各类实验室操作，满足规模检测的要求，本方法填补了国内外在此领域的技术空白，为布病防控提供了技术支撑。

| 状态 | IgG (S/P*100%) | IgM (S/P*100%) | 状态                                   |
|----|----------------|----------------|--------------------------------------|
| 1  | ≥60%           | ≤85%           | 自然感染                                 |
| 2  | ≥60%           | ≥85%           | 自然感染或 A19 疫苗免疫初期                     |
| 3  | 20%-60%        | ≥85%           | A19 疫苗免疫                             |
| 4  | 20%-60%        | ≤85%           | A19 疫苗免疫后期或感染后期<br>(需 15-30 天重新采样检测) |
| 5  | <20%           | ≥85%           | S2 疫苗免疫或急性感染                         |