



中华人民共和国国家标准

GB/T 18645—2020
代替 GB/T 18645—2002

动物结核病诊断技术

Diagnostic techniques for animal tuberculosis

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 缩略语 1

4 临床诊断 1

 4.1 流行特点 1

 4.2 临床症状 2

 4.3 病理变化 2

5 细菌学检查 2

 5.1 器材 2

 5.2 试剂 2

 5.3 病料的采集、运送与处理 2

 5.4 染色镜检 3

 5.5 分离培养和生化鉴定 4

6 结核菌素皮内变态反应试验 5

 6.1 器材 5

 6.2 试剂 5

 6.3 牛分枝杆菌 PPD 皮内变态反应 5

 6.4 禽分枝杆菌 PPD 皮内变态反应 6

 6.5 其他动物结核皮内变态反应 6

7 PCR 检测 6

 7.1 器材 6

 7.2 试剂 6

 7.3 采样及样品处理 7

 7.4 PCR 扩增反应 7

 7.5 电泳检测 PCR 扩增产物 8

 7.6 质控 8

 7.7 结果分析及判定 8

 7.8 PCR 检测结果的确证 8

8 γ -干扰素 (IFN- γ) 体外检测法 (体外 IFN- γ 释放试验检测法) 8

 8.1 器材 8

 8.2 试剂 8

 8.3 操作方法 8

9 诊断结果判定 10

附录 A (资料性附录) 试剂的配方 11

附录 B (资料性附录) 标本消化浓缩法 17

附录 C (规范性附录) 采样及样品处理(PCR 检测用) 18

附录 D (资料性附录) DNA 提取液 20

附录 E (资料性附录) 常规 PCR 扩增产物核酸序列 21

附录 F (规范性附录) 样品采集、包装和运输的要求 22



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18645—2002《动物结核病诊断技术》。与 GB/T 18645—2002 相比,主要技术内容变化如下:

- 增加了引言;
- 增加了规范性引用文件(见第 2 章);
- 增加了缩略语(见第 3 章);
- 增加了临床诊断方法,包括流行特点、临床症状和病理变化(见 4.1、4.2 和 4.3);
- 增加了警示内容,对于剖检、采样及实验室开展相关病原检测部分及实验室接触有毒物质部分给以警示(见 4.3);
- 增加了其他动物皮内变态反应(见 6.5);
- 增加了 PCR 检测(见第 7 章);
- 增加了 γ -干扰素(IFN- γ)体外检测法(见第 8 章);
- 增加了诊断结果判定(见第 9 章);
- 删除了动物接种试验的内容(见 2002 年版的 2.3.1);
- 增加了常规 PCR 扩增产物核酸序列(见附录 E);
- 增加了样品采集、包装和运输要求(见附录 F)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国兽医药品监察所、中国动物卫生与流行病学研究中心。

本标准主要起草人:朱良全、丁家波、沈青春、孙明军、毛开荣、魏荣、许冠龙、冯宇。

本标准所代替标准的历次发布版本情况为:

- GB/T 18645—2002。

引 言

动物结核病是由分枝杆菌属的细菌引起的一种慢性、人兽共患性传染病,在全世界范围内严重威胁人类健康并影响畜牧业发展。分枝杆菌属主要由结核分枝杆菌复合群、麻风分枝杆菌以及非结核分枝杆菌所组成。而牛分枝杆菌、结核分枝杆菌是结核分枝杆菌复合群的成员,禽分枝杆菌属于非结核分枝杆菌成员。牛结核病是国家二类动物疫病,也是《国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020年)》中16种优先防治的国内动物疫病之一,其病原主要为牛分枝杆菌。牛分枝杆菌的宿主谱广,几乎包括所有的温血脊椎动物。除牛最易感外,还可感染鹿、猪等多种动物;结核分枝杆菌主要导致人结核病,但也可感染牛;禽分枝杆菌禽亚种主要引起禽结核病。

动物结核病主要通过呼吸道和消化道感染,可侵害多种动物,家畜中奶牛最易感,其次为黄牛、牦牛、水牛、猪和家禽,野生动物中以鹿较为常见。该病临床上主要特征是病程缓慢、渐进性消瘦、咳嗽、衰竭,并在多种组织器官(如肺、肝、脾和肠道等)形成肉芽肿和干酪样钙化结节。

近年来国内外对动物结核病防控十分重视,如发病率高、危害较为严重的牛结核病被世界动物卫生组织(OIE)列为必须通报疫病,也是国际贸易必检对象。随着国际贸易的蓬勃发展,动物结核病可在人及多种动物间传播,对畜牧业及公共卫生安全危害严重。目前我国采用的动物结核病的诊断技术标准,其受当时知识和技术条件所限,内容已不能满足当前动物结核病诊断、检疫检测需求。主要存在以下突出问题:1)对于人兽共患性动物结核病诊断的国家标准,缺少必要的生物安全要求,以及流行病学、临床症状和病理变化等临床诊断的相关内容。2)诊断方法涉及动物接种实验内容,因确诊时间长(至少1个月)和动物福利的因素,国际上现已很少使用。3)诊断方法缺少新的通用成熟技术(如PCR、体外检测 γ 干扰素法等)。4)需要对标准中涉及的烟酸试验或硝基苯甲酸试验的生化方法进行规范统一。如GB/T 18645—2002《动物结核病诊断技术》与SN/T 1310—2011《动物结核病检验检疫技术规范》中涉及生化试验方法不统一。前者采用烟酸试验毒性较大,而后者采用对硝基苯甲酸试验相对安全。5)需要增加适用范围,以满足出入境检验检疫工作发展的需要。因此,修订完善适用于我国动物结核病诊断的国家标准,对于临床兽医、检验检疫等科研工作者及时、准确做好诊断,从而对疫病防控和疫情处置采取快速、合理有效的应对措施,意义重大。



动物结核病诊断技术

1 范围

本标准规定了动物结核病的临床诊断、细菌学检查、皮内变态反应、PCR 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 体外检测的技术方法、操作程序和判定标准。

本标准适用于动物结核病的诊断,其中流行特点、临床症状、病理变化以及皮内变态反应适用于动物结核病的临床诊断;细菌学检查中染色镜检适用于动物结核病病原学初步诊断,细菌学检查中分离培养和生化鉴定、病原分离和 PCR 试验适用于动物结核病病原学确诊; γ -干扰素 (IFN- γ) 体外检测法适用于牛结核病的辅助诊断。

2 规范性引用文件



下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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/T 18088 出入境动物检疫采样

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

OIE:世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health)

PPD:提纯蛋白衍生物(Purified Protein Derivative)

IU:国际单位(International Unit)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay)

TCH:噻吩-2-羧酸肼培养基(Thiophen-2-carboxylic Acid Hydrazide)

IFN- γ :伽马干扰素(Gamma Interferon)

PNB:对硝基苯甲酸(P-nitrobenzoic Acid)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

dNTPs:脱氧核苷三磷酸(Deoxy-Ribonucleoside Triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

4 临床诊断

4.1 流行特点

多种动物对牛分枝杆菌、结核分枝杆菌、禽分枝杆菌等易感,动物中奶牛最易感,其次为黄牛、牦牛、水牛、猪和家禽,野生动物中以鹿较为常见。结核分枝杆菌主要侵害人,少见牛、猪;牛分枝杆菌主要侵害牛,亦可感染人、绵羊、山羊、猪及犬;禽分枝杆菌主要侵害家禽和水禽,其中鸡和鸽最易感染,鹅和鸭次之,牛、猪和人也可感染。实验动物中,豚鼠对牛分枝杆菌和结核分枝杆菌敏感,对禽分枝杆菌有抵抗力,通常只能形成局部病灶;家兔对禽分枝杆菌高度敏感,对牛分枝杆菌敏感,结核分枝杆菌虽可使家

兔肺部形成少量病灶,但可趋于痊愈而不致死。

本病主要通过呼吸道和消化道感染,也可通过交配感染。污染的饲草饲料通过消化道感染也是一个重要的途径。该病可发生在动物的任何年龄,雌性动物感染率高于雄性。

4.2 临床症状

感染通常呈慢性经过,病初症状不明显,当病程逐渐延长,则症状逐渐显露。由于患病器官不同,症状亦不一致:

- a) 牛结核病常表现为肺结核、乳房结核、淋巴结核,有时可见肠结核、生殖器结核、脑结核、浆膜结核及全身性结核。
- b) 禽结核病常表现贫血、消瘦,鸡冠萎缩以及产蛋停止等。病禽可因衰竭或肝变性破裂而突然死亡。
- c) 鹿结核病症状与牛结核病基本相同。
- d) 猪结核病多表现为淋巴结核,最常发病部位为颌下、咽、颈及肠系膜淋巴结;肺、肝、肠、胃等结核时主要表现消瘦、咳嗽、气喘等症状。肠道有病灶时则可能发生下痢。
- e) 绵羊及山羊结核病常不表现明显的临床症状,往往在屠宰后才被发现,体内淋巴结可见结核病灶。

4.3 病理变化

警示——对本病剖检采样过程中应防止病原微生物扩散和感染。相关操作应符合 GB/T 18088 和 GB 19489 的规定。

根据结核病引起动物机体病理变化的差异,可将其分为增生性和渗出性结核两种,有时两种病灶同时存在。当机体抵抗力强时,对结核菌的反应常以细胞增生为主,形成增生性结核结节,即由类上皮细胞和巨细胞集结在结核菌周围形成特异性的肉芽肿,外周是一层密集的淋巴细胞和成纤维细胞从而形成非特异性肉芽组织。当机体抵抗力低时,则以渗出性炎症为主,即在组织中有纤维蛋白和淋巴细胞的弥漫性沉积,随后发生干酪样坏死、化脓或钙化,这种变化主要见于肺和淋巴结。

5 细菌学检查

5.1 器材

Ⅱ级生物安全柜、恒温培养箱、冰箱(2℃~8℃, -15℃以下)、离心机(离心力可达2 000 g)、显微镜。

5.2 试剂

除特别规定外,所用化学试剂均为分析纯。

溶液与培养基:4%硫酸、3%或4%氢氧化钠溶液、5%~10%盐酸溶液、氢氧化钠消化液、0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液、安替福民(antiformin)溶液、甘油蛋白、萁-尼氏(Ziehl-Neelsen)抗酸染色液、对硝基苯甲酸(PNB)培养基、PBS(1/15 mol/L)缓冲液、改良罗氏(Lowenstein-Jensen, L-J)培养基、吐温-80(Tween-80)水解试验溶液、硝酸盐还原试验溶液、0.12%尿素溶液、0.1%酚红指示剂、噻吩-2-羧酸胍(TCH)培养基。配制方法参见附录A。

5.3 病料的采集、运送与处理

5.3.1 病料的采集

病料的采集,包括以下内容:

- 对于病、死动物,应采集其淋巴结及病变组织器官(如:肺、肝、脾等)作为细菌学检查材料。
- 对于怀疑有呼吸道结核、乳房结核、泌尿生殖道结核、肠结核的活畜,应相应采集其痰、乳、精液、子宫分泌物、尿和粪便作为细菌学检查材料。
- 对于皮内变态反应试验阳性,但尸检无病理学变化的动物,应采集其下颌、咽后、支气管、肺(特别是肺门淋巴结)、纵隔及一些肠系膜的淋巴结作为细菌学检查材料。

5.3.2 病料的运送

样品应封装在无菌的洁净容器或样品袋内冷藏运送。如当天无法送达实验室的,应予冷冻后运送。当无法提供冷冻条件时,可在病料中加入硼酸,使其终浓度为 0.5%,但样品处理保存时间不超过 1 周。

样品采集、包装和运输详细要求应按附录 F 的规定执行。

5.3.3 病料的处理

5.3.3.1 硫酸消化法

此法适用于痰、尿、粪和病变组织等的处理。处理前,病变组织先按常规方法研磨或匀浆制成乳剂。将痰、尿、粪或病变组织等按 1:5(样品:溶液,质量浓度)加入 4%硫酸溶液充分混合,然后置 37℃作用 1 h~2 h,经 1 000 g 离心 30 min,弃上清液,取沉淀物涂片镜检、培养;也可用硫酸处理后,在沉淀物中滴加 3%氢氧化钠溶液中和,然后涂片镜检或培养。硫酸消化法具体操作参见附录 B 的 B.2。

5.3.3.2 氢氧化钠消化法

此法适用于痰、尿、粪和病变组织等的处理。消化处理前,病变组织先按常规方法制成乳剂。将被检的痰、尿、粪便或病变组织按 1:5(样品:溶液,质量浓度)的比例加入氢氧化钠消化液中,混匀后,37℃作用 2 h~3 h,然后无菌滴加 5%盐酸溶液(参见 A.3)进行中和,将样本的 pH 值调到 6.8 左右(此时显淡黄绿色),以 1 000 g 离心 15 min~20 min,弃上清液,取沉淀物涂片镜检或培养。

对痰液的消化浓缩还可采用以下处理方法:取 4%氢氧化钠溶液 50 mL、0.1 mol/L 柠檬酸钠 50 mL、N-乙酰-L-半胱氨酸 0.5 g 混合。将上述混合液与痰液按 1:2 的比例加入,作用 24 h~48 h,以 1 000 g 离心 15 min,取沉淀物涂片镜检或培养。氢氧化钠消化法具体操作参见 B.3。

5.3.3.3 安替福民(antiformin)沉淀浓缩法

此法适用于痰、乳、精液和子宫分泌液等处理。将被检样品置于试管中,加入 3 倍~4 倍量的 15%~20%安替福民溶液,充分摇匀后 37℃作用 1 h,加 1 倍~2 倍量的灭菌蒸馏水,摇匀,1 000 g 离心 20 min~30 min,弃上清液,沉淀物加蒸馏水恢复量后再离心一次,取沉淀物涂片镜检、培养。安替福民(antiformin)沉淀浓缩法具体操作参见 B.4。



5.4 染色镜检

5.4.1 涂片

先在玻片上涂布一层薄甘油蛋白,然后吸取处理好的样品滴加其上,涂布均匀。如被检样品为乳汁等含脂肪较多的材料,在涂片制成后,滴加二甲苯或乙醚,使其覆盖整个涂片,摇动 1 min~2 min 脱脂后倾去,再滴加 95%酒精,以除去二甲苯,待酒精挥发后即可染色。甘油蛋白的配制方法参见 A.4。

5.4.2 萼-尼氏(Ziehl-Neelsen)抗酸染色

涂片经火焰固定后,滴加苯酚复红染色液,使其覆盖整个涂片。之后,将玻片置于火焰上加热至出现蒸汽但不产生气泡,保持热染色 5 min。如热染过程出现染色液干涸,应及时添加,适量补充。充分水洗后滴加 3%盐酸酒精脱色液,脱色 30 s~60 s,至无色素脱下为止。充分水洗,以骆氏美蓝染色液复

染 1 min。水洗,吹干,镜检。萁-尼氏(Ziehl-Neelsen)抗酸染色配制方法参见 A.5。

5.4.3 结果判定

在显微镜下,可见细长平直或微弯曲的红色杆菌,长 $1.5\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$,宽 $0.2\ \mu\text{m}\sim 0.5\ \mu\text{m}$,即为阳性。在陈旧培养基或干酪性淋巴结内,偶尔可见长达 $10\ \mu\text{m}$ 或更长菌体。否则判为阴性。

5.5 分离培养和生化鉴定

5.5.1 分离培养

将经过处理的病料接种到配氏培养基(参见 A.6)或改良 L-J 培养基(参见 A.7)上,每份样品同时接种 2 管~4 管,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 1 d 后,以熔化的石蜡封口,继续培养至少 8 周(一般 10 周~12 周)。

结核分枝杆菌在固体培养基上生长,菌落干燥、粗糙,呈白色、黄色或橙色。牛分枝杆菌在固体培养基上菌落湿润、略显粗糙,加入 1% 的丙酮酸钠可促进其生长。禽分枝杆菌在固体培养基上形成湿润、弥漫状、光滑菌落。结核分枝杆菌和牛分枝杆菌在 $42\ ^\circ\text{C}$ 不生长,禽分枝杆菌可在 $42\ ^\circ\text{C}$ 生长。

5.5.2 生化鉴定

5.5.2.1 对硝基苯甲酸(PNB)试验

准备 PNB 培养基(参见 A.8)1 支,改良 L-J 培养基 1 支,每支培养基接种 $1\ \mu\text{g}$ 细菌; $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 4 周,每周观察一次结果并记录两种培养基上菌落的生长情况。牛分枝杆菌、结核分枝杆菌在 PNB 培养基上不生长,禽分枝杆菌可在 PNB 培养基上生长;三种菌均可在改良 L-J 培养基生长。

5.5.2.2 噻吩-2-羧酸肼(TCH)抗性试验

将细菌接种 TCH 培养基(参见 A.9)和改良 L-J 培养基, $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 8 周,1 周后开始观察,每周观察一次结果并记录两种培养基上菌落的生长情况。禽分枝杆菌、结核分枝杆菌可在 TCH 培养基上生长,牛分枝杆菌在 TCH 培养基上不生长;三种菌均可在改良 L-J 培养基生长。

5.5.2.3 尿素酶试验

准备两支试管,试管 A 加入 3 mL PBS(pH 6.7, $1/15\ \text{mol/L}$) (参见 A.10) 和 1 滴 0.1% 酚红指示剂(参见 A.11);试管 B 加入用 PBS(pH 6.7, $1/15\ \text{mol/L}$) 配制的 0.12% 尿素溶液(参见 A.12) 和 1 滴 0.1% 酚红指示剂。挑取细菌约 5 mg 移置于试管 B 中。两支试管均置 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 3 d 后观察结果。A 管(空白对照)不变色,B 管菌液生长使培养基变成红色判为阳性,培养基不变色者判为阴性。

5.5.2.4 硝酸盐还原试验



取细菌约 5 mg,置于装有 2 mL 硝酸盐还原试验溶液(参见 A.13)的试管中,充分混匀,置 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴 2 h,滴加 1 滴 2 倍稀释的盐酸,2 滴 0.2% 氨基苯磺胺(参见 A.14),2 滴 0.1% N-甲基盐酸二氨基乙烯(参见 A.15),混匀后观察结果,1 min 内呈红色判为阳性,颜色无变化判为阴性。

5.5.2.5 耐热接触酶试验

用生理盐水配制含菌量为 $10\ \text{mg/mL}$ 的菌液,分装试管,每管 0.5 mL,分别置于 $68\ ^\circ\text{C}$ 水浴 20 min,冷却后缓缓加入 0.5 mL 过氧化氢(H_2O_2)和吐温-80 混合液(10% 吐温-80 加等量 30% H_2O_2),观察结果。如有小气泡持续从管底升起判为阳性,否则为阴性。

5.5.2.6 吐温-80 水解试验

向吐温-80 水解试验培养基(参见 A.16)试管中加入含菌量为 $10\ \text{mg/mL}$ 的菌液 0.5 mL。3 d~5 d

后观察结果。如试管内溶液由原来的琥珀色变为桃红色或红色判为阳性,无颜色变化判为阴性。

5.5.2.7 生化鉴定

动物结核病涉及的分枝杆菌生化试验的判定结果见表 1。

表 1 分枝杆菌生化鉴定判定结果

生化试剂类型	对硝基苯甲酸 试验	TCH 抗性 试验	尿素酶试验	硝酸盐还原 试验	耐热接触酶 试验	吐温-80 水解 试验
牛分枝杆菌	—	—	+	—	—	—
禽分枝杆菌	+	+	—	—	+	—
结核分枝杆菌	—	+	+	+	—	±
注：“+”表示阳性反应；“—”表示阴性反应；“±”表示多数菌株阳性反应，少数菌株阴性反应。						

6 结核菌素皮内变态反应试验

6.1 器材

剪毛剪或剃毛器、游标卡尺、一次性无菌注射器(0.5 mm×10 mm)或其他适用的商品化注射器。

6.2 试剂

6.2.1 牛型 PPD

根据使用说明将原液用灭菌生理盐水或稀释用水稀释至使用浓度(20 000 IU/mL)。PPD 冻干粉稀释:在无菌状态下吸取一定量的灭菌生理盐水或稀释用水,注入冻干粉玻璃瓶中,充分摇匀后使用,应现配现用)。

6.2.2 禽型 PPD

配制方法同 6.2.1,使用浓度(25 000 IU/mL)。

6.3 牛分枝杆菌 PPD 皮内变态反应

6.3.1 操作方法

出生后 20 d 的牛即可用本试验,可单独采用牛型 PPD(PPD-B),也可同时采用牛型 PPD 和禽型 PPD(PPD-A)进行试验。皮内变态反应具体操作和观察步骤为:

- a) 注射部位及术前处理:将牛只进行编号,采用颈侧中部上 1/3 处或尾根部进行皮内注射,3 个月以内的犊牛也可在肩胛部进行。对注射部位剪毛,直径约 10 cm,用卡尺测量术部中央皮肤厚度,做好记录。注意,注射部位应无明显的病变。
- b) 注射方法及剂量:牛型和禽型 PPD 的注射部位应间隔开,在颈部同侧、肩胛部同侧应间隔约 12 cm~15 cm,或在不同侧进行。尾根部采用不同侧(左侧或右侧)无毛的褶皱部进行注射,用 75%酒精消毒注射部位,在皮内注入牛型 PPD 或禽型 PPD 0.1 mL,牛型 PPD 不低于 2 000 IU/0.1 mL,禽型 PPD 不低于 2 500 IU/0.1 mL,或按试剂说明书配制的剂量。
- c) 注射次数和观察反应:皮内注射后经 72 h 判定,仔细观察局部有无热痛、肿胀等炎性反应,并以卡尺测量皮肤厚度,做好详细记录。对疑似反应牛应立即在另一侧以同一批 PPD 同一剂量进行第二回皮内注射,再经 72 h 观察反应结果。对阴性牛和疑似反应牛,于注射后 96 h 和

120 h 再分别观察一次,以防个别牛出现较晚的迟发型变态反应。

6.3.2 结果判定

牛型 PPD 单皮内变态反应及牛型 PPD 和禽型 PPD 比较皮内变态反应具体结果判定如下:

a) 牛型 PPD 单皮内变态反应

牛型 PPD 单皮内变态反应包括颈部注射和尾根部注射:

——颈部注射:注射部位前后出现明显的炎性反应,皮皱厚差值大于或等于 4 mm,判为阳性;无明显炎性反应,且皮皱厚差值为 2 mm~4 mm,判为可疑;无明显炎性反应,皮皱厚值小于或等于 2 mm,判为阴性。对于已确认感染的牛群,皮试出现任何可触摸或可见的肿胀反应均判为阳性。

——尾根部注射:出现可触摸或可见的炎性反应(当出现两侧褶皱部时,注射一侧的褶皱部与对侧的褶皱部厚度差达 4 mm 及以上;当仅出现一侧褶皱部时,其尾褶厚度达 8 mm 及以上)判为阳性,未出现可触摸或可见的炎性反应判为阴性。

b) 牛型 PPD 和禽型 PPD 比较皮内变态反应

注射牛型 PPD 部位的皮皱厚差大于注射禽型 PPD 部位的皮皱厚差值大于 4 mm,判为阳性;注射牛型 PPD 部位的皮皱厚差大于注射禽型 PPD 部位的皮皱厚差值在 4 mm 以下,判为可疑;注射牛型 PPD 部位的皮皱厚值等于或小于注射禽型 PPD 部位的皮皱厚,判为阴性。

6.3.3 复检



判为可疑反应的,于 42 d 后进行复检。结果仍为可疑或阳性的,判为阳性。

6.4 禽分枝杆菌 PPD 皮内变态反应

6.4.1 操作方法

家禽可在肉髯皮内注射禽型 PPD,剂量为每羽 0.1 mL,约 2 500 IU 或按试剂说明书配制的剂量。

6.4.2 结果判定

注射后 24 h 观察判定结果。注射部位肿胀,出现硬结、扩展至对侧肉髯和颈部的广泛性水肿等炎性反应,判为阳性;注射部位无肿胀等炎性反应,判为阴性。

6.5 其他动物结核皮内变态反应

鹿、猪、羊等其他中大动物的皮内变态反应试验参照牛的皮内变态反应试验进行判定。其中鹿的注射部位为颈侧中部;猪、绵羊在耳根外侧注射;山羊在肩胛部注射。

7 PCR 检测

7.1 器材

PCR 仪、PCR 反应管、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统或紫外透射仪、恒温水浴箱、烘箱、台式冷冻离心机(离心力可达 15 000 g)、旋涡混匀器、冰箱(2 °C~8 °C, -20 °C, -80 °C)、微量可调移液器(10 μL, 100 μL, 1 000 μL)及配套带滤芯吸嘴。

7.2 试剂

7.2.1 2×PCR 反应液:含 Taq Polymerase 0.1 U/μL, dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 各 500 μmol/L, 20 mmol/L Tris-HCL(pH 8.3), 100 mmol/L 氯化钾, 3 mmol/L 氯化镁。也可采用等效商品化试剂。

7.2.2 PCR 扩增引物序列：动物结核病中涉及的分枝杆菌 PCR 扩增引物及序列信息见表 2。

表 2 分枝杆菌引物名称及序列

目标菌名称	引物名称	引物序列
牛分枝杆菌	MBF	上游引物：5'-ACGCGACGACCTCATATTCC-3'
	MBR	下游引物：5'-CACCCAGAAGGCGAACAGAT-3'
结核分枝杆菌	CSB1	上游引物：5'-TTCCGAATCCCTTGTGA-3'
	CSB3	下游引物：5'-AGTCGCCGTGGCTTCTCTTTTA-3'
禽分枝杆菌	DnaJ1	上游引物：5'-GACTTCTACAAGGAGCTGGG-3'
	DnaJ2	下游引物：5'-GAGACCGCCTTGAATCGTTC-3'
	IS1245-1	上游引物：5'-GAGTTGACCGCGTTCATCG-3'
	IS1245-2	下游引物：5'-CGTCGAGGAAGACATACGG-3'
	IS901-1	上游引物：5'-GGATTGCTAACCACGTGGTG-3'
	IS901-2	下游引物：5'-GCGAGTTGCTTGATGAGCG-3'

7.2.3 灭菌双蒸水。

7.2.4 电泳试剂：Goldview 或其他等效核酸染料，DNA 标准相对分子质量（100 bp～1 kb）、Tris-乙酸（TAE）电泳缓冲液，2% 琼脂糖凝胶，配制方法参见附录 A。

7.3 采样及样品处理

采样及样品处理按附录 C 的规定执行。其涉及的样品采集、包装和运输按附录 F 的规定执行。

7.4 PCR 扩增反应

7.4.1 PCR 扩增试剂准备

取出 2×PCR 反应液、引物，在室温下融化，瞬时离心 5 s 后置冰上。或采用其他等效商品化 PCR 反应试剂。PCR 反应混合液的试剂及用量见表 3。

表 3 PCR 反应混合液的成分及用量

试剂	2×PCR 反应液	PCR 引物（10 μmol/L）	灭菌双蒸水
用量	12.5 μL	每种引物 1 μL	补充反应体系至 24 μL

可根据需要选择牛分枝杆菌、结核分枝杆菌以及禽分枝杆菌进行 PCR 检测。对于牛分枝杆菌，每个 PCR 反应混合液中加 MB 上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL；对于结核分枝杆菌，每个 PCR 反应混合液中加 CSB 上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL；对于禽分枝杆菌，每个 PCR 反应混合液中加入 DnaJ 上下游引物（10 μmol/L）、IS1245 上下游引物（10 μmol/L）、IS901 上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL。

7.4.2 加模板

在上述 PCR 反应混合液中分别加入已提取好的样品或对照核酸 1 μL，充分混匀。

7.4.3 PCR 扩增检测

牛分枝杆菌或结核分枝杆菌 PCR 反应条件：第一步，94 ℃，3 min；第二步，94 ℃，20 s，牛分枝杆菌

60℃或结核分枝杆菌 55℃, 20 s, 72℃, 30 s, 35 个循环; 第三步, 72℃, 1 min。

禽分枝杆菌 PCR 反应条件: 第一步, 96℃, 2 min; 第二步, 96℃, 10 s, 58℃, 10 s, 72℃, 1 min, 35 个循环; 第三步, 72℃, 2 min。

7.5 电泳检测 PCR 扩增产物

采用 1% 琼脂糖凝胶、Goldview 或其他等效核酸染料。设 DNA 标准分子量对照, 5 V/cm~8 V/cm 电泳 1 h, 置紫外透射仪或凝胶成像系统仪上观察, 拍照记录检测结果。

7.6 质控

阴性对照无特异性扩增产物, 阳性对照有与分子量相符的特异性扩增产物, 实验成立。

7.7 结果分析及判定



牛分枝杆菌 PCR 特异扩增产物分子量为 406 bp, 结核分枝杆菌 PCR 特异扩增产物分子量为 263 bp, 禽分枝杆菌 3 条特异 PCR 扩增产物分子量分别为 577 bp (IS901 基因片段)、385 bp (IS1245 基因片段)、140 bp (DnaJ 基因片段)。

对于牛分枝杆菌 PCR 检测, 样品呈现 406 bp 特异扩增产物, 判为牛分枝杆菌阳性; 样品呈现 263 bp 特异扩增产物, 判为结核分枝杆菌阳性; 对于禽分枝杆菌 PCR 检测, 样品同时呈现 577 bp、385 bp 和 140 bp 三条目的条带, 则判为禽分枝杆菌阳性。样品无特异扩增产物, 判为阴性。

7.8 PCR 检测结果的确证

必要时, 对 PCR 扩增产物进行测序确证。将所测得的序列与标准序列 (参见附录 E) 进行比对, 序列吻合 (扩增区全序列比对同源性达 95% 以上) 表明确证为阳性。

8 γ -干扰素 (IFN- γ) 体外检测法 (体外 IFN- γ 释放试验检测法)

8.1 器材

酶标仪 (波长 450 nm)、II 级生物安全柜、二氧化碳培养箱或生化培养箱、混匀仪、冰箱 (2℃~8℃, -15℃以下)、电子天平、高压消毒锅、微量可调移液器及吸头、一次性无菌离心管 (2 mL 或 1.5 mL)、一次性肝素锂或肝素钠抗凝采血管、一次性注射器 (5 mL, 10 mL, 20 mL) 或一次性采血针、一次性无菌 24 孔细胞培养板。

8.2 试剂

PPD-B (20 000 IU/mL)、PPD-A (25 000 IU/mL)、无菌 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2~7.4)、鼠抗牛 IFN- γ 单克隆抗体 1D4、100 $\times$ HRP 标记鼠抗牛 IFN- γ 单克隆抗体 4B5、包被缓冲液、封闭液、样品稀释液、酶标抗体稀释液、洗涤液、TMB 底物显色溶液、终止液或等效商品化试剂。

8.3 操作方法

8.3.1 样品准备

用采血针或注射器无菌采集全血 4 mL 以上, 立刻转移至肝素锂或肝素钠抗凝采血管中, 轻轻颠倒混匀 3 次~5 次, 18℃~25℃保存, 30 h 内送达实验室进行刺激培养。

将抗凝血轻轻颠倒混匀, 无菌分装于 24 孔细胞培养板, 每份血液样品分装 3 孔, 每孔加入 1.5 mL 全血, 分别加入 0.1 mL 的 PPD-B (使用工作浓度为: 3 000 IU/mL)、PPD-A (使用工作浓度为: 2 500 IU/mL) 和 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2~7.4), 轻轻振荡混匀, 置 37℃、含 5% CO₂ 培养 24 h, 收集

上清,立即用于检测,或保存于 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下备用或按等效商品化试剂盒要求准备样品。

8.3.2 包被

用碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L , $\text{pH } 9.6$)稀释鼠抗牛 IFN- γ 单克隆抗体 1D4 至 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$, $100\text{ }\mu\text{L/孔}$,包被酶标板, $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h 。

8.3.3 包被后洗涤

倾去 ELISA 板中液体,加入 $1\times$ PBST 洗涤液, $250\text{ }\mu\text{L/孔}$,振荡洗涤 30 s ,倾去液体,重复洗涤 6 次,最后一次轻轻拍干 ELISA 板。

8.3.4 封闭

加入含有 3% BSA 的 PBS 溶液, $200\text{ }\mu\text{L/孔}$, $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 12 h 。

8.3.5 封闭后洗涤

同 8.3.3。洗涤后的单克隆抗体包被板可立即使用或用铝箔袋包装,置 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

8.3.6 加样前准备

将试剂盒中溶液($100\times$ HRP-抗牛 IFN- γ 单抗、阳性对照和阴性对照除外)从 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 取出后恢复至室温;将 $20\times$ 洗涤液恢复至室温(可在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 $5\text{ min}\sim 10\text{ min}$ 使结晶溶解),然后用双蒸水作 20 倍稀释($10\text{ mL } 20\times$ 浓缩洗涤液加入 190 mL 双蒸水),充分混匀。

8.3.7 加样

取单抗包被板(根据样品多少,可拆开分次使用),每孔先加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 样品稀释液,再分别加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 检测样品(包括 PPD-B、PPD-A 和 PBS 刺激样品,及阴、阳性对照)充分混匀,封板, $22\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光反应 60 min 。取出反应板,弃去反应液,每孔加入 $250\text{ }\mu\text{L } 1\times$ 洗涤液,洗涤 6 次,最后 1 次轻轻拍干。

8.3.8 加入酶标抗体

用酶标抗体稀释液 100 倍稀释 $100\times$ HRP-抗牛 IFN- γ 单抗 4B5(现配现用, $1\text{ mL } 100\times$ HRP-抗牛 IFN- γ 单抗 4B5 加入 99 mL 酶标抗体稀释液), $100\text{ }\mu\text{L/孔}$, $22\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光反应 60 min 。取出反应板,弃去反应液,每孔加入 $250\text{ }\mu\text{L } 1\times$ 洗涤液,洗涤 6 次,最后 1 次轻轻拍干。

8.3.9 显色与终止

加入底物显色液, $100\text{ }\mu\text{L/孔}$,从加入第 1 孔即开始计时, $22\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光反应 30 min 。按底物显色液加入顺序,向各孔依次加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 终止液,轻轻混匀, 10 min 内用酶标仪测定 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值。

8.3.10 结果判定

实验成立条件:阴性对照 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值 ≤ 0.15 ,阳性对照 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值 ≥ 1.0 。

判定方法:PPD-B、PPD-A 和 PBS 刺激样品的 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值分别记作 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PPD-B)、 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PPD-A)、 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PBS)。当 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PPD-B) - $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PBS) ≥ 0.1 ,且 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PPD-B) - $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PPD-A) ≥ 0.1 时,判为牛结核病阳性;当 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PPD-B) - $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PBS) < 0.1 ,或 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PPD-B) - $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 值_(PPD-A) < 0.1 时,判为牛结核病阴性。

9 诊断结果判定

9.1 对于牛,符合第4章,可判为疑似牛结核病;符合第4章,并且第5章、6.3、第7章、第8章四种方法中任何一种牛分枝杆菌结果为阳性,可诊断为牛结核病;符合5.5.1中牛分枝杆菌分离培养并且生化鉴定阳性,或符合5.5.1中牛分枝杆菌分离培养并且第7章PCR检测阳性,可诊断为牛结核病。符合6.3.2 a)和b)试验结果阳性,或符合6.3.2 a)和第8章试验结果阳性,可按牛结核病处理。

9.2 对于禽,符合第4章,可判为疑似禽结核病;符合第4章,并且第5章、6.4、第7章三种方法中任何一种禽分枝杆菌结果为阳性,可诊断为禽结核病;符合5.5.1中禽分枝杆菌分离培养并且生化鉴定阳性,或符合5.5.1中禽分枝杆菌分离培养并且第7章PCR检测为阳性,可诊断为禽结核病。符合6.4试验结果阳性,可按禽结核病处理。

9.3 对于鹿、猪、羊,符合第4章中各自特征,可判为疑似鹿、猪、羊结核病;符合第4章中各自特征,并且6.5结果阳性,可诊断为鹿、猪、羊结核病。



附 录 A
(资料性附录)
试剂的配方

A.1 4% H₂SO₄ 溶液配制方法

先取水 350 mL,然后取 98%的浓硫酸 10 mL(含 H₂SO₄ $10 \times 98\% \times 1.84 = 18.03$ g),最后加水定容至 450 mL,混匀,即配制好的 H₂SO₄ 溶液浓度为 $18/450 = 4\%$ 。

A.2 3%和 4% NaOH 溶液配制方法

称取 NaOH 3 g 或 4 g 溶于 100 mL 无菌去离子水中,混匀。

A.3 5% 盐酸溶液配制方法

量取 37%的浓盐酸 105.6 mL,溶于 864.9 mL 无菌去离子水中,混匀。

A.4 甘油蛋白配制方法

A.4.1 成分

鸡蛋白 20 mL
甘油 20 mL
水杨酸钠 0.4 g

A.4.2 配制

取 1 个~2 个鸡蛋,用自来水清洁蛋壳,并用 75%酒精消毒蛋壳表面后,打开气室处,弃蛋黄,取蛋白 20 mL,置烧杯中;另取甘油 20 mL,称取水杨酸钠 0.4 g 于含有鸡蛋白烧杯中,充分搅拌混匀即可。

A.5 萁-尼氏(Ziehl-Neelsen)抗酸染色液配制方法

A.5.1 苯酚复红染色液

碱性复红饱和酒精溶液(每 100 mL 95%酒精加 3 g 碱性复红)10 mL,5%苯酚溶液 90 mL,两者混合后用滤纸滤过。

A.5.2 3%盐酸酒精脱色液

浓盐酸 3 mL,95%酒精 97 mL,混匀。

A.5.3 骆氏美蓝染色液

甲液:0.3 g 美蓝溶于 30 mL 95%酒精
乙液:0.01% KOH 溶液 100 mL

将甲乙两液相混合。

A.6 配氏(Petragnane)培养基配制方法

A.6.1 成分

新鲜脱脂牛奶 450 mL,马铃薯淀粉 18 g,天门冬素(或蛋白胨)2.6 g,去皮马铃薯 225 g,鸡蛋 15 个(弃去 3 个蛋清即含蛋黄 15 个和蛋清 12 个),甘油 40 g,2%孔雀绿水溶液 30 mL。

A.6.2 配制

将马铃薯去皮擦成丝,加入马铃薯淀粉、天门冬素(或蛋白胨)、脱脂牛奶置烧杯中水浴煮沸 40 min~60 min,并不时搅拌均匀,使成糊状。待冷却至 50 ℃时加入打碎的鸡蛋(蛋壳先用 75%酒精消毒洗净),混匀后用四层纱布过滤除渣。最后加入甘油和孔雀绿水溶液搅拌均匀,分装于灭菌的试管中。将分装培养基的试管置血清凝固器(或流通蒸汽锅)内,间歇灭菌 3 次,每日 1 次,第 1 日 65 ℃灭菌 30 min,第 2 日、第 3 日 75 ℃~80 ℃灭菌 30 min。

A.6.3 用途

分离培养分枝杆菌用。

A.7 改良 L-J 培养基配制方法

A.7.1 成分

无水磷酸二氢钾	2.4 g
硫酸镁	0.24 g
柠檬酸镁	0.6 g
DL-天门冬素(DL-Asparagin)	3.6 g
甘油(丙三醇)	12 g
马铃薯淀粉	30 g
新鲜鸡卵液	1 000 mL(约 30 个鸡蛋)
2%孔雀绿水溶液	20 mL
蒸馏水	600 mL

A.7.2 配制

将磷酸二氢钾、硫酸镁、柠檬酸镁、甘油和蒸馏水混合,加热溶解。将马铃薯粉加入上述溶液内,随加随搅拌,水浴煮沸 1 h。鸡蛋用 75%酒精消毒外壳后,打开,将蛋清和蛋黄充分搅匀,四层纱布过滤。将上述加马铃薯粉的盐溶液冷却至 50 ℃时,加入鸡蛋液和 2%孔雀绿溶液,并充分搅匀。分装于试管中,80 ℃灭菌 30 min 后,37 ℃培养 48 h,若无杂菌污染即可使用。配好的培养基,可在 4 ℃保存 4 周。

A.7.3 用途

分离培养分枝杆菌用。

A.8 对硝基苯甲酸(PNB)培养基

称取 500 mg 对硝基苯甲酸,用 10 mL 二甲基亚砷溶解;配制 L-J 培养基时,按每升培养基添加 500 mg

对硝基苯甲酸的比例添加到培养基溶液中。

PNB 培养基有商品化培养基,可按其使用说明配制。

A.9 TCH 培养基

L-J 培养基 100 mL

TCH 1 mg

将改良 L-J 培养基水浴煮沸,加入 TCH 后,充分搅匀。分装于试管中。80 ℃灭菌 30 min 后,37 ℃培养 48 h,若无杂菌污染即可使用。

A.10 PBS 缓冲液(1/15 mol/L)

甲液(1/15 mol/L 磷酸二氢钠溶液):称取磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)23.87 g,加双蒸水溶解,定容至 1 000 mL。121 ℃灭菌 20 min,4 ℃保存。

乙液(15 mol/L 磷酸氢二钾溶液):称取磷酸氢二钾(K_2HPO_4) 9.07 g,加双蒸水溶解,定容至 1 000 mL。

121 ℃灭菌 20 min,4 ℃保存。

将甲液和乙液按 3 : 2 的比例混合,即为 pH 7.0 的 PBS 缓冲液。

将甲液和乙液按 2 : 3 的比例混合,即为 pH 6.7 的 PBS 缓冲液。

A.11 0.1% 酚红指示剂配制方法

A.11.1 成分

酚红	0.1 g
0.1 mol/L(0.4%)NaOH	15 mL
去离子水	85 mL

A.11.2 配制

称取 0.1 g 酚红置研钵中,缓慢滴加 0.1 mol/L NaOH 溶液 15 mL 边加边磨,并不断吸出已溶解的酚红液,直至全部溶解,然后加入 85 mL 双蒸水,颜色为深红,经粗滤纸过滤后使用,室温保存。

A.12 0.12% 尿素溶液

尿素	0.12 g
蒸馏水	100 mL

将尿素溶于水中,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,4 ℃保存。

A.13 硝酸盐还原试验溶液

1/15 mol/L,pH 7.0 磷酸盐缓冲液	100 mL
硝酸钠	85 mg

将硝酸钠加入磷酸盐缓冲液中,溶解后 112 kPa 灭菌 20 min,分装于试管,每管 2 mL。

A.14 0.2%氨基苯磺胺

称取 0.2 g 的氨基苯磺胺,用蒸馏水溶解,定容至 100 mL。

A.15 0.1% N-甲基盐酸二氨基乙烯

称取 0.1 g 的 N-甲基盐酸二氨基乙烯,用蒸馏水溶解,定容至 100 mL。

A.16 吐温-80 水解试验培养基

1/15 mol/L, pH 7.0 磷酸盐缓冲液	100 mL
吐温-80	0.5 mL
0.2%中性红溶液	2 mL

将吐温-80 和 0.2% (质量浓度) 中性红溶液加入磷酸盐缓冲液中,混匀,112 kPa 灭菌 20 min。分装于试管中,每管 2 mL。冷却后存放于 4 ℃可保存 2 周。

A.17 柠檬酸钠—磷酸缓冲液

先配制 pH 6.8 磷酸缓冲液:

A 液 (0.2 mol/L NaH_2PO_4 溶液): 称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.61 g, 加蒸馏水溶解, 定容至 500 mL。

B 液 (0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液): 称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.82 g, 加蒸馏水溶解, 定容至 500 mL。

分别量取 51 mL A 液, 49 mL B 液, 混合即成 100 mL pH 6.8 磷酸缓冲液。

称取 2.94 g 柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 加入到 100 mL pH 6.8 磷酸缓冲液中, 充分溶解。121 ℃ ± 2 ℃ 高压灭菌 15 min, 贮存于 4 ℃。

A.18 柠檬酸钠缓冲液

柠檬酸	5.3 g
柠檬酸钠	15 g
葡萄糖	16.2 g

称取上述试剂, 溶解于蒸馏水, 定容至 1 000 mL, 混匀。121 ℃ ± 2 ℃ 高压灭菌 15 min, 贮存于 4 ℃。

A.19 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)

称取 186.1 g EDTA, 加入到 800 mL 蒸馏水中, 磁力搅拌器上剧烈搅拌, 用氢氧化钠调 pH 值至 8.0 定容至 1 000 mL, 分装后 121 ℃ ± 2 ℃ 高压灭菌 15 min, 室温贮存。

A.20 0.01 mol/L pH 7.6 PBS

先配制 A 液、B 液:

A 液(0.2 mol/L NaH_2PO_4 溶液):称取一水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)27.6 g,或二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)31.2 g,溶于蒸馏水中,定容至 1 000 mL。

B 液(0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液):称取十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.6 g,或二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)35.6 g 溶于蒸馏水中,定容至 1 000 mL。

称取 17 g 氯化钠,用适量蒸馏水溶解,量取 13 mL A 液加 87 mL B 液,用蒸馏水定容至 2 000 mL。

A.21 TAE 电泳缓冲液

10 × TAE 的配制:

Tris	48.4 g
冰乙酸	11.4 mL
0.5 mol/L EDTA	20 mL 或 EDTA 3.72 g

加水定容至 1 000 mL。使用时,用蒸馏水稀释 10 倍即为 1 × TAE 电泳缓冲液。

A.22 1%琼脂糖凝胶

称取 1 g 琼脂糖粉,加入 100 mL 1×TAE 电泳缓冲液,加热溶解,冷却至 60 ℃,加 5 μL Goldview 或其他等效核酸染料,混匀。

A.23 0.01 mol/L 无菌 PBS(pH 7.2~7.4)

称取 Na_2HPO_4 1.42 g, KCl 0.2 g, NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.27 g,加双蒸水至 800 mL,调 pH 值 7.2~7.4,定容至 1 000 mL,高压灭菌或过滤除菌。

A.24 包被缓冲液(pH 9.6)

称取 Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g 加双蒸水至 800 mL,调 pH 9.6,定容至 1 000 mL。

A.25 20× 浓缩洗涤液

称取 Na_2HPO_4 28.4 g, KCl 4 g, NaCl 160 g, KH_2PO_4 5.4 g 溶于 900 mL 的去离子水中,加入吐温-20 10 mL, proclin300 0.5 mL,待完全溶解后用浓盐酸调节 pH 值至 7.4,定容至 1 000 mL,使用时用双蒸水稀释成 1×洗涤液,过滤除菌。

A.26 样品稀释液

称取 Na_2HPO_4 1.42 g, KCl 0.2 g, NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.27 g, BSA 10 g, proclin300 0.5 mL,加双蒸水至 800 mL,调 pH 7.2~7.4,定容至 1 000 mL,过滤除菌。

A.27 酶标抗体稀释液

称取 Na_2HPO_4 1.42 g, KCl 0.2 g, NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.27 g, BSA 10 g, proclin300 0.5 mL,加双蒸水至 800 mL,调 pH 7.2~7.4,定容至 1 000 mL,过滤除菌。

A.28 封闭液

称取 Na_2HPO_4 1.42 g, KCl 0.2 g, NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.27 g, BSA 30 g, proclin300 0.5 mL, 加双蒸水至 800 mL, 调 pH 7.2~7.4, 定容至 1 000 mL, 过滤除菌。

A.29 TMB 底物显色溶液

A 液: 醋酸钠 13.6 g, 柠檬酸 1.6 g, 30% H_2O_2 0.3 mL, 加双蒸水至 500 mL, 避光保存于 2℃~8℃。

B 液: EDTA- Na_2 0.2 g, 柠檬酸 0.95 g, 甘油 50 mL, TMB-2HCl(用 DMSO 溶解为 10 mg/mL) 0.2 g, 加双蒸水定容至 500 mL, 避光保存于 2℃~8℃。

使用前, 将 A 液和 B 液等体积混合, 立即使用。

亦可用商品化 TMB 底物显色溶液。

A.30 终止液

取 37% 浓盐酸 82.8 mL 加入 917.2 mL 双蒸水中, 混匀, 室温保存。



附 录 B
(资料性附录)
标本消化浓缩法

B.1 概述

在培养或进行动物试验时,常因污染的杂菌生长较快,使结核分枝杆菌被抑制。下列几种消化浓缩方法可使检验标本中蛋白质溶解、杀灭污染杂菌,而结核分枝杆菌因有蜡质外膜而不死亡,并得到浓缩。

B.2 H₂SO₄ 消化法

用 4% H₂SO₄ 溶液和病灶组织等按质量比约 5 : 1 之比例加入混合,然后置 37 °C 作用 1 h~2 h,经 3 000 g~4 000 g 离心 30 min,弃上清,取沉淀物涂片镜检、培养和接种动物。也可用 H₂SO₄ 消化浓缩后,在沉淀物中加入 3% NaOH 中和,然后抹片镜检、培养。

B.3 NaOH 消化法

NaOH 消化液配置及标本处理方法如下:

- a) 取 NaOH 35 g~40 g,钾明矾 2 g,溴麝香草酚蓝 20 mg(预先用 60%酒精配制成 0.4%浓度,应用时按比例加入)、蒸馏水 1 000 mL 混合,即为 NaOH 消化液。
- b) 将被检病灶组织与 NaOH 消化液按量(质量浓度)之比约 1 : 5 混合均匀后,37 °C 作用 2 h~3 h,然后无菌滴加 5%~10% HCl 溶液进行中和,调标本的 pH 值到 6.8 左右(此时显淡黄绿色),以 3 000 g~4 000 g 离心 15 min~20 min,弃上清,取沉淀物涂片镜检、培养和接种动物。
- c) 在病料中加入等量(质量浓度)的 4% NaOH 溶液,充分摇荡 5 min~10 min,然后以 3 000 g 离心 15 min~20 min,弃上清,加 1 滴酚红指示剂于沉淀物中,用 2 mol/L 盐酸中和至淡红色,然后取沉淀物涂片镜检、培养。

B.4 安替福民(antiformin)沉淀浓缩法

溶液 A:Na₂CO₃ 12 g、漂白粉 8 g、蒸馏水 80 mL

溶液 B:NaOH 15 g、蒸馏水 85 mL

应用时,将 A、B 两液等量混合,再用蒸馏水稀释成 15%~20%后使用,该溶液应存放于棕色瓶内。

将被检样品置于试管中,加入 3 倍~4 倍量(质量浓度)的 15%~20%安替福民溶液,充分摇匀后 37 °C 作用 1 h,加 1 倍~2 倍量(体积分数)的灭菌蒸馏水,摇匀,3 000 g~4 000 g 离心 20 min~30 min,弃上清,沉淀物加蒸馏水恢复原量后再离心一次,取沉淀物涂片镜检、培养。

附 录 C
(规范性附录)
采样及样品处理(PCR 检测用)

C.1 采样工具

采样工具需采用 $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min 并烘干,或经 $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干烤 2 h 灭菌;或采用一次性无菌用等效工具。

C.2 采样

C.2.1 血样

用无菌注射器或真空采血管,自动物静脉采血,无菌分离血清。

用无菌注射器或真空采血管,自动物静脉采血,将血液直接滴入抗凝剂中,并立即连续摇动,充分混合。抗凝剂采用柠檬酸钠缓冲液,或 0.5 mol/L EDTA。每 6 mL 血液加 1 mL 抗凝剂。条件允许时,应优先采集全血,以更有利于富集菌体。

C.2.2 奶样

无菌采集奶液于灭菌的容器中。一般以挤出的后段奶液含菌量较多,早晨挤出的奶液含菌量最高。

C.2.3 痰液

动物痰液采集:动物咯痰极少,宜在清晨采集,用橡胶管自口腔伸入至气管内,外接注射器吸取痰液。亦可取咳出的痰块。

C.2.4 组织器官

采集动物下颌、咽后、支气管、肺(特别是肺门淋巴结)、纵隔和肠系膜淋巴结,以及病变组织器官(如:肝、脾等)。

C.2.5 粪便

采集混有黏液、血液、黏膜的粪便,或用刮匙从动物直肠深部(约 30 cm)取少量黏液粪便,盛于灭菌容器中。

C.2.6 样品的保存和运输

待检样品在 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存应不超过 24 h; $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 3 个月; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下长期保存。样品应置于低温、密封的容器内运输。

C.3 样品处理

C.3.1 血样前处理

取 1 mL~2 mL 全血样品, $15\text{ }000\text{ g}$ 离心 10 min,弃上清液;加等体积灭菌双蒸水充分振荡, $15\text{ }000\text{ g}$

离心 10 min;弃上清液,若红细胞裂解不完全,应采用灭菌双蒸水重复洗涤;收集沉淀物,继续进行核酸提取,或置 -20°C 贮存备用。

取 1 mL~2 mL 血清样品,15 000 g 离心 10 min;弃上清液,加 1 mL 0.01 mol/L pH 7.6 PBS,充分振荡混匀,15 000 g 离心 10 min;弃上清液,收集沉淀物,继续进行核酸提取,或置 -20°C 贮存备用。

C.3.2 奶样前处理

取 10 mL 奶液,加 100 mL Triton X-100,振荡混匀,2 500 g 离心 20 min;弃上清液,取沉淀,加 1 mL 0.01 mol/L pH 7.6 PBS,充分振荡混匀;将沉淀悬浮液移入微量离心管,15 000 g 离心 10 min;弃上清液,收集沉淀物,继续进行核酸提取,或置 -20°C 贮存备用。

C.3.3 痰液的前处理

在痰液样品中加入 2 倍~4 倍体积 4%氢氧化钠溶液,振荡混匀,室温放置 30 min,间或振荡混匀,使其充分液化(无明显固状物并且吸出时无拖丝现象即为液化完全;若液化不完全,可适当再加入少量 4%氢氧化钠溶液直至液化完全);15 000 g 离心 10 min;弃上清液,加 1 mL 0.01 mol/L pH 7.6 PBS,充分振荡混匀,15 000 g 离心 10 min,弃上清液,重复本步骤 1 次;收集沉淀物,继续进行核酸提取,或置 -20°C 贮存备用。

C.3.4 组织样品前处理

取适量组织样品(剔除脂肪、被膜),剪碎,按 1:5 的比例加入柠檬酸钠-磷酸缓冲液(例,1 g 组织样品加入 5 mL 缓冲液),充分研磨;加等量 4%氢氧化钠溶液,继续研磨 5 min~10 min,使组织液化;移入离心管,充分振荡,75 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 0.5 h~1 h;取上清液(避免吸取粗渣),15 000 g 离心 10 min;弃上清液,加等量 0.01 mol/L pH 7.6 PBS 振荡混匀,使沉淀充分悬浮,15 000 g 离心 10 min,弃上清液,重复本步骤 1 次;收集沉淀物,继续进行核酸提取,或置 -20°C 贮存备用。

C.3.5 粪样前处理

取粪样 1 g~2 g,按 1:5 的比例加入 4%硫酸溶液(例,1 g 粪样加 5 mL 液体)充分振荡混匀,室温静置 0.5 h~1 h;取上层约 3 mL 液体(避免吸取粗渣),5 000 g 离心 1 min,取上清液,15 000 g 离心 10 min;弃上清液,加等量 0.01 mol/L pH 7.6 PBS,振荡混匀,使沉淀充分悬浮,15 000 g 离心 10 min,弃上清液,重复本步骤 1 次;收集沉淀物,继续进行核酸提取,或置 -20°C 贮存备用。

C.4 核酸提取

在上述已完成前处理的样品(沉淀物)中加入 50 μL ~100 μL DNA 提取液(参见附录 D),充分振荡混匀,56 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min,98 $^{\circ}\text{C}$ ~100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min,瞬时离心使液滴聚集管底,加等体积三氯甲烷,振荡混匀,12 000 g 离心 5 min,取上清液,直接用于 PCR 或贮存于 -80°C 备用(适用于除粪样外的其他样品)。其中粪样样品还应进行以下步骤:加入等体积异丙醇(-20°C 预冷),颠倒混匀,放置 5 min~10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 g 离心 10 min,弃上清液,加 3 倍体积 70%乙醇(4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷),振荡洗涤;4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 g 离心 10 min,弃上清液,室温干燥 5 min;加入 50 μL 、无 DNA 酶、无 RNA 酶水,混匀、溶解核酸,直接用于 PCR 或贮存于 -80°C 备用。或采用等效的商品化核酸提取试剂盒或核酸提取设备。

附 录 D
(资料性附录)
DNA 提取液

含 100 mmol/L Tris-HCL(pH8.0), 0.01% Triton X-100 , 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 蛋白酶 K。可采用等效商品化试剂。



附录 E

(资料性附录)

常规 PCR 扩增产物核酸序列

E.1 牛分枝杆菌 PCR 扩增产物序列

扩增区域为 Mb1543c 和 Mb1544 基因

ACGCGACGACCTCATATTCCGAATCCCTTGTGAAGTAGTAATGTGCGAGCTGAGCGATGTCGCCGCTCCCAAAAATTACCAATGG
TTTGGTCATGACGCCTTCTAACCAGAATTGTGAATTCATACAAGCCGTAGTCGTGCAGAAGCGCAACACTCTTGGAGTGGCTACAAC
GGCGCTCTCCGCGGCGCGGGCGTACCGGATATCTTAGCTGGTCAATAGCCATTTTTCAGCAATTTCTCAGTAACGCTACGGGGCGCGCC
GTGCCGTAGTAGCGTCCCACTGATGTGGACGATGGTGTCTCTTTTGGGGTTGGGGATGGCGATTGACCCGGCGCGTCTGGGACTCGCG
GTCGTCATGCTGTGCGGGCGTGGCCCATGCTGAATCTGTTCGCCTTCTGGGTG

E.2 结核分枝杆菌 PCR 扩增产物序列

扩增区域为 Rv1505c 和 Rv1506 基因

TTCCGAATCCCTTGTGAAGTAGTAATGTGCGAGCTGAGCGATGTCGCCGCTCCCAAAAATTACCAATGGTTTGGTCATGACGCCT
TCTAACCAGAATTGTGAATTCATACAAGCCGTAGTCGTGCAGAAGCGCAACACTCTTGGAGTACCTGCGCTTGCAGAGATCAAAATAGG
GCGCATGGGTCAGCATAGTACAGGTCGTGCGCATCTTTGATGCATCGGAATAAGATGTCAGGCAATTAAAAGAGAAGCCACGGCGACT

E.3 禽分枝杆菌 PCR 扩增产物序列

E.3.1 引物对 DnaJ 对应的扩增产物序列

GACTTCTACAAGGAGCTGGGCGTCTCCTCTGACGCCAGTCCCGAAGAGATCAAACGCGCCTACCGCAAGCTGGCGCGGATCTAC
ACCCGGATGCCAACCCGACAATCCCGCCGCGGCGAACGATTCAAGGCGGTCTC

E.3.2 引物对 IS1245 对应的扩增产物序列

GAGTTGACCGGCTTCATCGGGGCTTCTCCCCATGAGCGCACCGAGACCGCTCCAATCAGCGCAACGGCTCGCGTCCGCGCACGC
TGTCACGGTCGAGGGGACCTGGAATGCGGATTCCCAAGCTGCGCACCGGGTCATTTTCCCGCGTTGTTGGAGCGGCGTCCGCGG
GTCGATCAGTGCTTGTTCGCGGTGGTGTGAGGCCTACCTGCACGGCACCTCCACCGCAAGGTCGACGATCTGGTCAAGGCACTGGG
TACCGATACCGGGATCTCCAAAGCGAGGTCAGCCGATCTGCAAAGACCTCGACACCGAGGTCGCGGCTTCCGGGACCGGCGTTGG
GTGATCAGCGCTTTCGATGTCTTCTCGACG

E.3.3 引物对 IS901 序列对应的扩增产物序列

GGATTGCTAACACGTGGTGTGGGCGATCGATTTGACCTCGCCGCCGGCGCGCTGCCGATCGCCGTACTGCTGAGCGCGAAAGC
CGAGGTGGTGTATGTGCCGGGCCGACGGTTAACACGATGAGTCATGCGTTCCGCGGCGAAGCAAGACCGACGCCAAAGACGCGCGG
TAATCGCCGAAACCGCTCGGCACCGACGAGATCTGTCCCGGTGCTACCCGGCGAAGACCTGGTTGCCGAATTGCGGTGCTGACCGCA
TACCGGTGCGATCTGATGGCTGACTGGGTGCGAGGCGTGAACCGGCTGCGCTCGATGCTCACCGCCATCTTCCCTGCTCTGGAAGCTGC
GTTGCGACTACTCCACCCGCGCGCGTTGATCCTGGTATCCGCTATGTGCACTCCGGGCGAAATCCGGTCGGCAAAAAGAGCTGGCGTGA
TCAAGCACCTTCGGA AAAACCGGGCATGGCCCAACAACATCGACACGATCGCCGACAAGGCGCTCGCCGCGGCGAGCAGGCCAGATAATC
ACCCTTCCCGGCGAAGCCGGAACCGCGCGCTCATCAAGCAACTCGC

附 录 F
(规范性附录)
样品采集、包装和运输的要求

F.1 样品采集

需要由了解相关专业知识和操作技能的工作人员操作,并配备生物安全防护措施,包括个人防护用品(隔离衣、帽、口罩、鞋套、手套、防护眼镜等)和消毒设施。

F.2 样品包装

应使用无菌容器,一个样品一个容器。容器选耐用材料制成,防渗漏,可盛容量低于 500 mL,能承受运输过程中可能发生的温度和压力变化。应随附样品信息,包括样品类型(如淋巴结、肺脏或结核结节等)、宿主种类、采样时间、采样地点、采样人名称及联系方式等信息。

F.3 样品运输

应按照《高致病性动物病原微生物菌(毒)种或者样本运输包装规范》的规定,实行三层包装。在原始容器与第二层包装之间放置有吸附作用的材料,第二层包装使用防漏材料,最外层包装可使用纸质或泡沫材料包装盒。运输标本的外包装应有明确的标签,标明寄送人和接收人的详细联系方式、包装日期和运输日期。
