



# 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	$\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 体外检测法 (体外 IFN- $\gamma$ 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  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )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。

## 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为国家标准为GB/T 18645—2002《动物结核病诊断技术》，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 $\gamma$ 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  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )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； $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )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。

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

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

U: 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)

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

IFN- $\gamma$ : 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 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，少见于牛、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、萋-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 °C 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 °C 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、精液和子宫分泌物等处理。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 °C 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 萇-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。萼-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  $\mu\text{m}$ ~5  $\mu\text{m}$ ，宽 0.2  $\mu\text{m}$ ~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 6.7/15 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 6.7/15 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 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( $\text{H}_2\text{O}_2$ )和吐温-80 混合液(10% 吐温-80 加等量 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ )，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 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皱厚度，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，并以卡尺测量皮皱厚度，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

72.1 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'-TTCCGAATCCCCTTGTGA-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'-GAGTTGACCGGTTTCATCG-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	125 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  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ ;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  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ ;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  $\mu\text{mol/L}$ )、IS1245 上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )、IS901 上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ 。

#### 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  $\mu\text{L}$ ,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  $^{\circ}\text{C}$ ，3 min;第二步，94  $^{\circ}\text{C}$ ，20 s,牛分枝杆菌

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/635032101244011300>