

团 体 标 准

T/CVMA 89—2021

规模化牛场牛结核病检测方法联用指南

Application guideline of multiple tests for detection of bovine tuberculosis in large scale cattle farm

2021 - 12 - 23 发布

2021 - 12 - 23 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

中国兽医协会
CVMA

目 次

前言.....	IV
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 缩略语.....	2
5 平行检测.....	2
5.1 适用对象.....	2
5.2 单皮内变态反应和 IFN- γ 体外释放法联用.....	2
5.3 单皮内变态反应和 IFN- γ 体外释放法联用结果判定.....	2
6 系列检测.....	3
6.1 适用对象.....	3
6.2 单皮内变态反应和比较皮内变态反应联用.....	3
6.3 单皮内变态反应和比较皮内变态反应联用结果判定.....	3
6.4 单皮内变态反应和 IFN- γ 体外释放法联用.....	4
6.5 单皮内变态反应和 IFN- γ 体外释放法联用结果判定.....	4
7 临床剖检和/或细菌培养和 PCR 检测分型法联用.....	4
7.1 临床剖检.....	5
7.2 牛分枝杆菌分离培养.....	5
7.3 PCR 检测和分型法.....	5
8 生物安全操作要求.....	7
附录 A（规范性） 多重 PCR 检测牛结核分枝杆菌复合群的特异性引物序列.....	8

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件不涉及专利。

本文件由华中农业大学提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：华中农业大学、湖北劲牛牧业有限公司、高安市裕丰农牧有限公司。

本文件主要起草人：陈颖钰、郭爱珍、章恺伦、闫钰、李翔、陈焕春、曾稳兵、杨建军。

中国兽医协会
CVMA

规模化牛场牛结核病检测方法联用指南

1 范围

本文件规定了规模化牛场牛结核病检测方法联用指南，包括牛结核病的平行检测、系列检测、临床剖检和/或细菌培养和PCR检测分型法联用以及生物安全要求等。

本文件适用于规模化牛场中牛结核病的检测、监测、控制及净化，以及实验室牛分枝杆菌的核酸检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 18645 动物结核病诊断技术
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 27639 结核病病原菌实时荧光PCR检测方法
- GB/T 32945 牛结核病诊断 体外检测 γ 干扰素法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

平行检测 parallel test

也叫平行试验或并联试验，指同时利用两种或多种诊断试验进行检测，只要有任何一个试验结果为阳性就可定为阳性，只有全部试验结果均为阴性时才将结果判定为阴性。该方法可以提高灵敏度，降低特异度。

3.2

个体流行率 individual prevalence

特定时间内一定动物群体中患某病新旧病例数占同期观察动物数的比例。

3.3

系列检测 series test

又叫系列试验或串联试验，指依次利用两种或多种诊断试验进行检测，全部试验结果均为阳性，才将最终结果判断为阳性，任何一个试验结果为阴性就可定为最终结果阴性。该方法可以提高特异度，降低灵敏度。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DMSO：二甲基亚砜（Dimethylsulfoxide）

ELISA：酶联免疫吸附测定（Enzyme linked immunosorbent assay）

IFN- γ ：伽马干扰素（Interferon- γ ）

PCR：多聚酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

5 平行检测

5.1 适用对象

当牛群结核病处于低流行率水平（如个体流行率 $<3\%$ ；也可根据实际情况取更低或更高流行率水平）时，对该牛群进行平行检测。

5.2 单皮内变态反应和 IFN- γ 体外释放法联用

按照GB/T 18645中牛分枝杆菌PPD皮内变态反应的操作方法对牛进行单皮内变态反应（以下简称单皮试法）检测，同时依据GB/T 32945进行牛结核IFN- γ 体外释放法检测，并联合判定最终检测结果。实际操作中，只对皮试法检测为阴性的个体，再使用IFN- γ 体外释放法进行牛结核病的检测，并联合判定最终检测结果。

5.3 单皮内变态反应和 IFN- γ 体外释放法联用结果判定

单皮试法与IFN- γ 体外释放法两种方法中任何一种检测方法结果为阳性的个体，判为牛结核阳性个体，两种方法均为阴性的个体，才判断为阴性个体。

单皮试法和IFN- γ 体外释放法联用流程如图1所示。

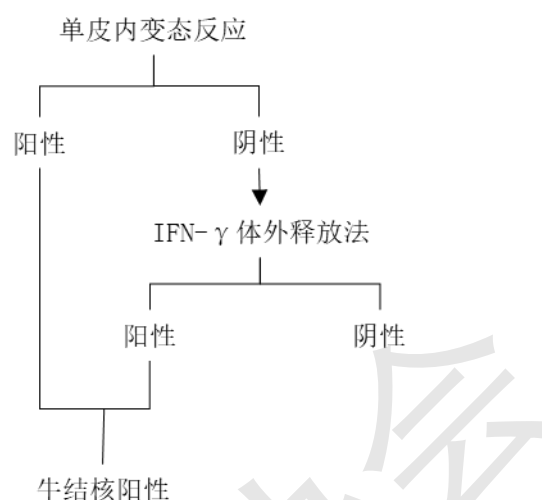


图1 牛结核病单皮内变态反应与 IFN- γ 体外释放法联用流程图

6 系列检测

6.1 适用对象

当牛群处于高流行率水平（如个体流行率 $\geq 3\%$ ；也可根据实际情况取更低或更高流行率水平）时，对该牛群进行牛结核病系列检测。

6.2 单皮内变态反应和比较皮内变态反应联用

当牛场不具备实验室检测操作条件时，按照GB/T 18645进行单皮试法并判定结果。对检测阳性的个体，间隔42天后按照GB/T 18645中比较皮内变态反应（以下简称比较皮试法）进行检测，并联合判断最终结果。

6.3 单皮内变态反应和比较皮内变态反应联用结果判定

当比较皮试法为阳性结果时，该牛被判定为结核阳性牛。任何一种方法判断为阴性时则为阴性。单皮试法和比较皮试法联用流程如图2所示。

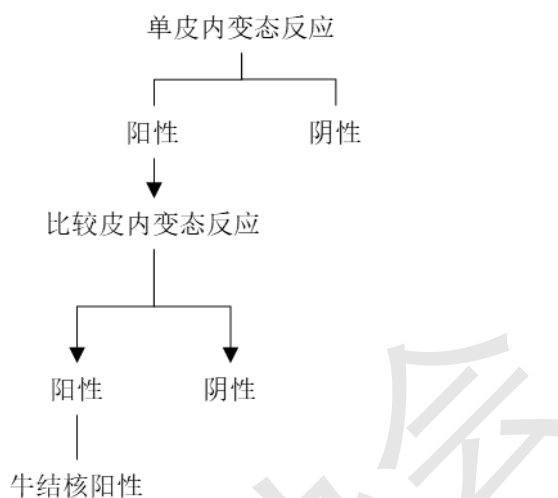


图2 牛结核病单皮内变态反应和比较皮内变态反应联用流程图

6.4 单皮内变态反应和 IFN- γ 体外释放法联用

当牛场具备实验室检测操作条件时，先按照GB/T 18645进行单皮试法并进行结果判定。对检测阳性的个体，间隔42天后依据GB/T 32945进行IFN- γ 体外释放法检测，并综合判定最终结果。

6.5 单皮内变态反应和 IFN- γ 体外释放法联用结果判定

当IFN- γ 体外释放法检测结果为阳性时，该牛被判定为牛结核阳性。两种方法任何一种判断为阴性时，则为阴性。

单皮试法结合IFN- γ 体外释放法联用流程如图3所示。

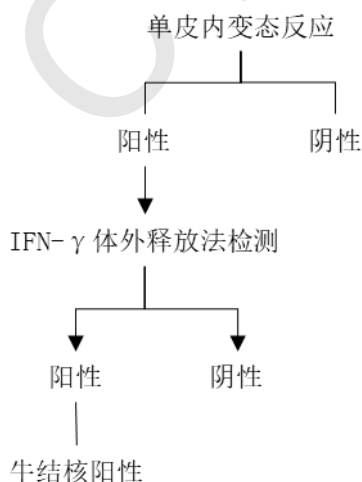


图3 牛结核病单皮内变态反应结合 IFN- γ 体外释放法联用流程图

7 临床剖检和/或细菌培养和 PCR 检测分型法联用

7.1 临床剖检

对屠宰场宰杀牛或病死牛进行解剖，对牛的头、肺、肝、脾、肠、乳房、以及纵隔淋巴结、肝门淋巴结、肠系膜淋巴结、肺门淋巴结、乳房上淋巴结进行观察和触诊，检查是否存在疑似结核结节。对有结节处切开检查其是否存在化脓性病变和干酪样坏死病变。

组织出现疑似结核结节时，则依照GB/T 27639中采样方法采集病变组织，直接进行PCR检测和分型；或进行牛结核菌细菌分离培养和PCR检测分型。

7.2 牛分枝杆菌分离培养

按照GB/T 18645中分枝杆菌分离培养和生化鉴定操作步骤进行。

7.3 PCR 检测和分型法

7.3.1 样本处理及核酸提取

依照商品化核酸提取试剂盒的使用说明进行样本的处理，并提取组织内核酸，直接用于PCR检测或储存于-80℃条件下备用。

7.3.2 PCR 模板

PCR模板为7.3.1步骤中提取的待检测样品的核酸样本。同时取灭活的结核分枝杆菌或结核分枝杆菌核酸为阳性对照。以灭菌双蒸水作为模板设置空白对照。

7.3.3 PCR 引物

针对结核分枝杆菌复合群16SrRNA、Rv0577、IS1561、Rv1510、Rv1970、Rv3877/8和Rv3120等七个基因序列设计特异性引物并合成。引物序列见附录A 结核分枝杆菌复合群特异性引物序列。

7.3.4 PCR 反应体系

每个样品准备7个PCR反应管，依次标记为1~7号。将PCR预混液（2×Taq Mixture）12.5μL，模板1μL，去离子水8 μL，DMSO 1.5μL，引物1~7的上下游引物（浓度为10 μm/μL）各1μL分别加入1~7号PCR反应管中，总体积为25 μL，充分混合。

7.3.5 PCR 反应程序

将本文件7.3.4中7个PCR反应管放置于PCR仪中，设定反应程序。反应条件设定如下：第一阶段：94℃ 10 min；第二阶段：94℃ 1 min，60℃ 1 min，72℃ 1 min，30个循环；第三阶段：72℃ 10 min。

7.3.6 PCR 反应产物检测

将PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，120 V，100 mA条件下电泳30 min。紫外灯下观察扩增产物，阳性对照的1~7号管PCR产物大小分别为543，786，943，1033，1116，999和404 bp，空白对照的1~7号管PCR产物均无条带时，反应成立。待检样本的1号PCR管出现阳性条带时，判定为分枝杆菌属感染，

并依据表2进行结核分枝杆菌、牛分枝杆菌及山羊分枝杆菌三个种的判定；若1号管为阴性，则不含有分枝杆菌属。

7.3.7 结果判定

当样本为结核分枝杆菌、牛分枝杆菌或山羊分枝杆菌阳性时，该牛被判定为牛结核病阳性。PCR检测结果判定见表1。

表1 PCR 检测结果判定

PCR 产物	PCR 结果记录							结果记录
	引物 1	引物 2	引物 3	引物 4	引物 5	引物 6	引物 7	
	+	-	-	-	-	-	-	分枝杆菌属
	+	+	+	+	+	+	+	结核分枝杆菌
	+	+	+	-	-	+	-	牛分枝杆菌
	+	+	+	+	-	+	-	山羊分枝杆菌
	+	+	+	-	-	-	-	牛分枝杆菌卡介苗
	-	-	-	-	-	-	-	分枝杆菌属阴性

7.3.8 临床剖检和/或细菌培养诊断结合 PCR 检测分型法联用流程图

临床剖检和/或细菌培养和诊断结合 PCR 检测分型法联用流程如图 4 所示。

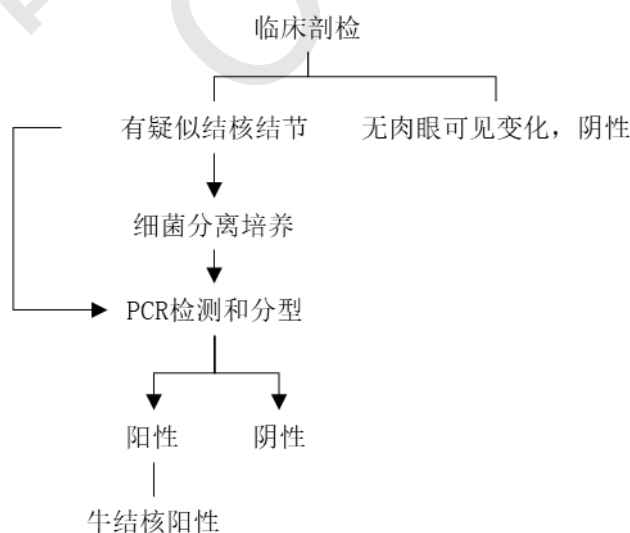


图4 牛结核病临床剖检和/或细菌培养和 PCR 检测分型法联用流程

8 生物安全操作要求

现场生物安全操作应符合GB/T 18088、GB/T 18645-2020和GB 19489的规定。
实验室生物安全操作应符合GB 19489的规定。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A
(规范性)

多重 PCR 检测牛结核分枝杆菌复合群的特异性引物序列

多重PCR检测牛结核分枝杆菌复合群的特异性引物序列见表A. 1。

表A.1 多重PCR检测牛结核分枝杆菌复合群的特异性引物序列

引物名 (基因名)	核酸序列
引物1 (16SrRNA)	上游引物 5' -ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C-3'
	下游引物 5' -TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A-3'
引物2 (Rv0577)	上游引物 5' -ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA-3'
	下游引物 5' -CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA-3'
引物3 (IS1561)	上游引物 5' -GCT GGG TGG GCC CTG GAA TAC GTG AAC TCT-3'
	下游引物 5' -AAC TGC TCA CCC TGG CCA CCA CCA TTG ACT-3'
引物4 (Rv1510)	上游引物 5' -GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC-3'
	下游引物 5' -TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C-3'
引物5 (Rv1970)	上游引物 5' -GCG CAG CTG CCG GAT GTC AAC-3'
	下游引物 5' -CGC CGG CAG CCT CAC GAA ATG-3'
引物6 (Rv3877/8)	上游引物 5' -CGA CGG GTC TGA CGG CCA AAC TCA TC-3' ;
	下游引物 5' -CTT GCT CGG TGG CCG GTT TTT CAG C-3'
引物7 (Rv3120)	上游引物 5' -GTC GGC GAT AGA CCA TGA GTC CGT CTC CAT-3'
	下游引物 5' -GCG AAA AGT GGG CGG ATG CCA GAA TAG T-3'