

团 体 标 准

T/CVMA X20—2020

牛结核病多方法联用诊断规程

Multiple diagnostic technical guideline for bovine tuberculosis

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

目 次

前言	III
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
3.1 牛结核病.....	1
4 缩略语.....	1
5 结核菌素皮内变态反应.....	1
5.1 操作方法及判定.....	2
5.2 结果记录.....	2
6 抗体检测.....	2
6.1 操作方法及判定.....	2
6.2 结果记录.....	2
7 IFN- γ 体外释放试验	2
7.1 操作方法及判定.....	2
7.2 结果记录.....	2
8 病理学检测.....	2
8.1 病理学诊断.....	2
8.2 结果记录.....	3
9 PCR 检测	3
9.1 主要仪器与耗材.....	3
9.1.1 仪器.....	3
9.1.2 耗材.....	3
9.2 样本采集.....	3
9.3 样本处理及核酸提取	3
9.4 PCR 模板	3
9.5 PCR 引物	3
9.6 PCR 反应体系	4
9.7 PCR 反应程序	4
9.8 PCR 反应产物检测及结果判定.....	4
9.9 结果记录.....	5

10 样品结果的判定	5
附录 A (资料性) 牛结核病诊断结果记录表	7
附录 B (资料性) PCR 结果记录表	8

中国兽医协会
CVMA

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。

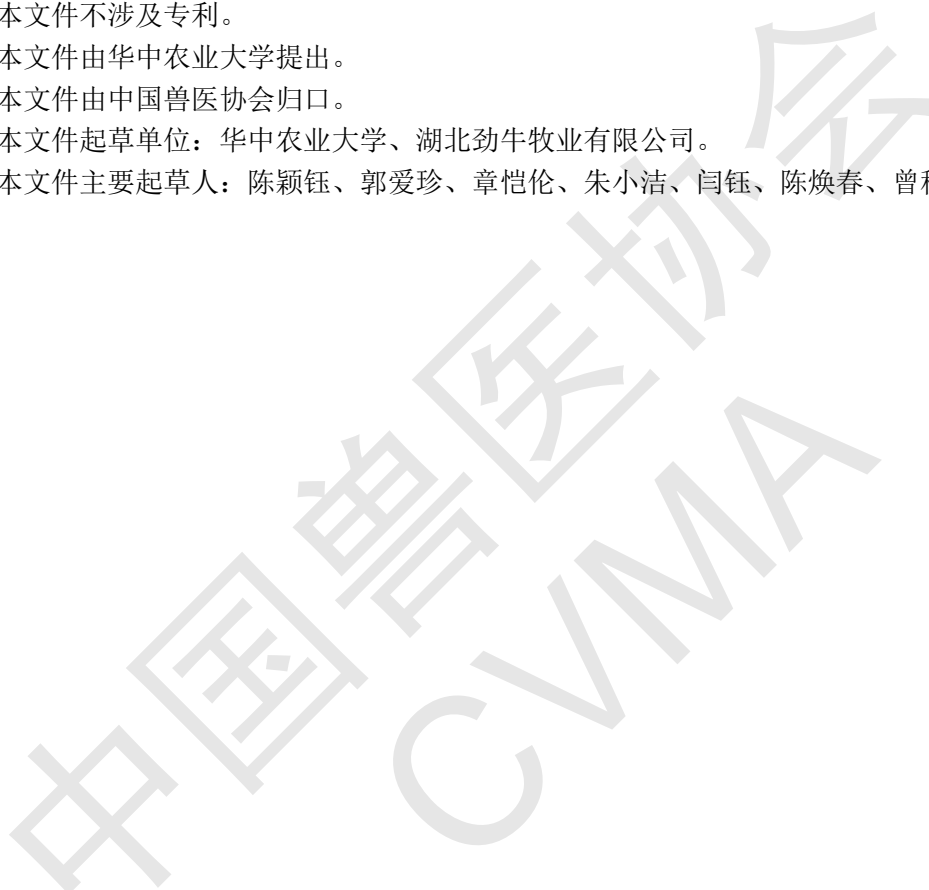
本文件不涉及专利。

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。

本文件主要起草人：陈颖钰、郭爱珍、章恺伦、朱小洁、闫钰、陈焕春、曾稳兵。



牛结核病多方法联用诊断规程

1 范围

本文件规定了牛结核病实验室诊断所需条件、操作方法和结果判断的技术要求。

本文件适用于牛结核病的诊断、检疫与监测。

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，仅所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 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 牛结核病 (Bovine tuberculosis)

牛结核病是一种慢性细菌性疾病，主要由结核分枝杆菌复合群成员中的牛分枝杆菌、结核分枝杆菌及山羊分枝杆菌感染所引起

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer saline)

DMSO: 二甲基亚砷 (Dimethylsulfoxide)

5 结核菌素皮内变态反

5.1 操作方法及判定

按照GB/T 1864中4.1及4.2.2中所规定的步骤进行结核菌素皮内变态反应和结果判定。

5.2 结果记录

当结核菌素皮内变态反应结果为阴性时，该牛被认定为未患牛结核病，填写牛结核病诊断结果记录表，相关示例见附录A，并在“结核菌素皮内变态反应”的“结果记录”栏中记为“-”；当结核菌素皮内变态反应结果为阳性时，填写附录A，并在“结核菌素皮内变态反应”的“结果记录”栏中记为“+”，并按照6抗体检测或7IFN- γ 体外释放试验进行检测。

6 抗体检测

6.1 操作方法及判定

使用商业化ELISA抗体检测试剂盒进行牛结核病抗体检测并进行结果判定。

6.2 结果记录

填写附录A。当抗体检测结果为阴性时，在“抗体检测”栏中记为“-”；当抗体检测结果为阳性时，在“抗体检测”的“结果记录”栏中记为“+”并进入操作步骤7。

7 IFN- γ 体外释放试验

7.1 操作方法及判定

依据GB/T 32945中4.3所规定步骤进行检测和判定。

7.2 结果记录

填写附录A。当IFN- γ 体外释放试验结果为阴性时，在“IFN- γ 体外释放试验”栏中记为“-”；当IFN- γ 体外释放试验结果为阳性时，在“IFN- γ 体外释放试验”的“结果记录”栏中记为“+”并进入操作步骤8。

8 病理学检测

8.1 病理学诊断

按照相关规定对步骤7中检测阳性牛进行扑杀、屠宰。对屠宰牛的肺，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，触诊并观察是否存在有明显结节。对有结节处切开检查其是否存在干酪样病变。

8.2 结果记录

填写附录A。若无明显病理变化，在“病理学检测”的“结果记录”栏中记为“-”，若有明显干酪样结节，在“病理学检测”的“结果记录”栏中记为“+”并进入操作步骤9。

9 PCR 检测

9.1 主要仪器与耗材

9.1.1 仪器

PCR仪
核酸电泳仪
紫外灯
高压消毒锅
超净工作台或生物安全柜
离心机

9.1.2 耗材

商业化核酸提取试剂盒
PCR反应管
无菌离心管

9.2 样本采集

依照GB/T27639中7所规定方法采集步骤8中检测阳性牛的病变组织及肺淋巴结，检测阴性牛的肺淋巴结。

9.3 样本处理及核酸提取

依照商业化核酸提取试剂盒的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℃备用。

9.4 PCR 模板

PCR模板为9.3步骤中提取的待检测样品的核酸产物。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。

9.5 PCR 引物

本文件提供了针对结核分支杆菌复合群的特异性引物序列（表1）。分别以16SrRNA、Rv0577、IS1561、Rv1510、Rv1970、Rv3877/8和Rv3120基因序列为模板设计特异性引物。依照提供的序列进行引物合成。

表1 结核分支杆菌复合群特异性引物序列

	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';

9.6 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25μL，充分混合。

9.7 PCR 反应程序

将9.5中7个PCR反应管放置于PCR仪中，设定反应程序进行扩增：94°C 10 min，进入循环扩增阶段：94°C 1min，60°C 1min，72°C 1min，循环30次，72°C 10min。

9.8 PCR 反应产物检测及结果判定

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404bp，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。

表 2 PCR 检测结果判定

	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	
PCR 产物	+	-	-	-	-	-	-	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

9.9 结果记录

根据9.8中结果，填写附录B。待检样品1-7号PCR管结果分别对应引物1-7所在列，当出现正确阳性条带时在“样品”行所对应的引物栏填写“+”，反之则填写“-”。当引物1-7均扩增出阳性条带时判定为结核分枝杆菌感染，在“样品”行“结果记录”栏中填写“结核分枝杆菌”；当引物1、2、3、6均扩增阳性条带时，判定为牛分枝杆菌感染，在“结果记录”栏中填写“牛分枝杆菌”；当引物1、2、3、4、6均扩增出来阳性条带时，判定为山羊分枝杆菌感染，在“结果记录”栏中填写“山羊分枝杆菌”；当引物1、2、3扩增出阳性条带时，判定为牛分枝杆菌卡介苗感染或免疫，在“结果记录”栏中填写“牛分枝杆菌卡介苗”；当引物1扩增出阳性条带，但未出现以上情况时，判定为分枝杆菌属其它种感染，在“结果记录”栏中填写“分枝杆菌属”；当引物1未扩增出阳性条带时，判定为非分枝杆菌属，在“结果记录”栏中填写“分枝杆菌属阴性”。

依据附录B结果填写附录A中“PCR检测”的“结果记录”栏。出现“结核分枝杆菌”、“牛分枝杆菌”、“山羊分枝杆菌”任意一种情况时，则在“结果记录”栏中记录为“+”。否则则记录为“-”。

10 样品结果的判定

牛结核病的诊断可以依据流程图（图1）进行操作。

依据附录A中所记录的结果进行样品的判定。

当“IFN- γ 体外释放试验”或“抗体检测”或“PCR检测”有任意一种及以上方法的结果为“+”时，该牛判为感染牛。

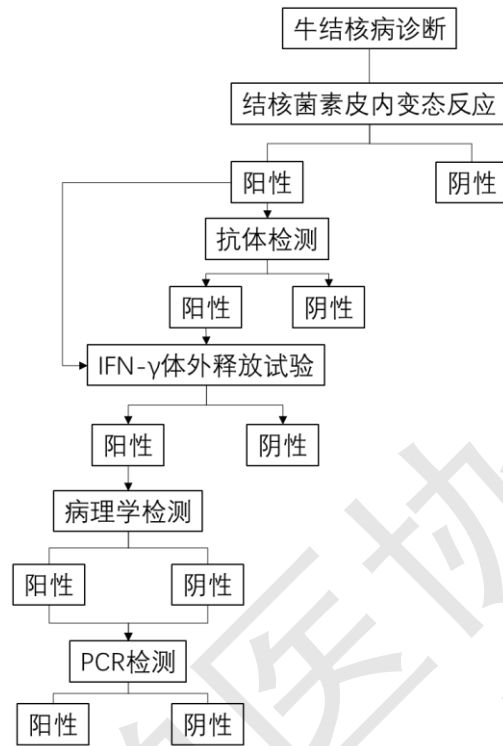


图1 牛结核病诊断流程图

附 录 A

(资料性)

牛结核病诊断结果记录表

	结果记录	
结核菌素皮内变态反应		
抗体检测		
IFN- γ 体外释放试验		
病理学检测		
PCR 检测		

中国兽医协会
CVMA

附 录 B
 (资料性)
 PCR结果记录表

菌型	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	
对照	+	-	-	-	-	-	-	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
样品 1								
样品 2								
样品 3								
...								
样品 n								