

奶牛结核病防治技术规范

2018 - 03 - 13 发布

2018 - 04 - 13 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由唐山市质量技术监督局提出。

本标准起草单位：唐山市动物疫病预防控制中心。

本标准主要起草人：张 军、路广计、刘志勇、张子佳、刘乃强、李 颖、陶茂辉、周忠良、张晓利、姜得英、王爱军、李玉文、冒银祥、周建颖、董长兴、齐 彪、张 芳。

奶牛结核病防治技术规范

1 范围

本标准规定了奶牛结核病的诊断、检测、预防、控制等。
本标准适用于奶牛结核病防治，其他牛参照执行。

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 18645-2002 动物结核病诊断技术

GB/T 27639 结核病病原菌实时荧光 PCR 检测方法

NY/T 1169 畜禽场环境污染控制技术规范

NY/T 1567 标准化奶牛场建设规范

NY 5047 无公害食品 奶牛饲养兽医防疫准则

农医发〔2017〕25号 《病死及病害动物无害化处理技术规范》

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

奶牛结核病污染场

指奶牛结核病阳性检出率在1%以上或有临床病例的奶牛养殖场。

3.2

奶牛结核病控制场

指连续2年以上奶牛结核病个体阳性检出率在1%以下，所有阳性牛均已扑杀，且无临床病例发生的奶牛养殖场。

3.3

奶牛结核病稳定控制场

指连续2年以上奶牛结核病个体阳性检出率在0.2%以下，所有阳性牛均已扑杀，且无临床病例发生的奶牛养殖场。

3.4

奶牛结核病净化场

指连续2年以上未检出奶牛结核病阳性病例，且无临床病例发生的奶牛养殖场。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AvPPD：禽型结核菌素；

BPPD：牛型结核菌素；

PPD：提纯蛋白衍生物，提纯结核菌素；

PCR：聚合酶链式反应；

PBS：磷酸盐缓冲液；

Elisa：酶联免疫吸附试验。

5 诊断

5.1 流行特点

结核病奶牛最易感染，其次为黄牛、牦牛。结核病病牛是本病的主要传染源。牛型结核分枝杆菌随鼻汁、痰液、粪便和乳汁等排出体外，健康牛可通过被污染的空气、饲料、饮水等经呼吸道、消化道等途径感染。

5.2 临床症状

潜伏期一般为10 d~45 d，有的可长达数月或数年，以肺结核、乳房结核和肠结核最为常见，主要症状如下：

- a) 肺结核：以长期顽固性干咳为特征，且以清晨最为明显。患畜容易疲劳，逐渐消瘦，病情严重者可见呼吸困难。
- b) 乳房结核：一般先是乳房淋巴结肿大，继而后方乳腺区发生局限性或弥漫性硬结，硬结无热无痛，表面凹凸不平。泌乳量下降，乳汁变稀，严重时乳腺萎缩，泌乳停止。
- c) 肠结核：消瘦，持续下痢与便秘交替出现，粪便常带血或脓汁。

5.3 剖检变化

在肺脏、乳房和胃肠粘膜等处形成特异性白色或黄白色结节。结节大小不一，切面干酪样坏死或钙化，有时坏死组织溶解和软化，排出后形成空洞。胸膜和肺膜可发生密集的结核结节，形如珍珠状。

5.4 实验室诊断

5.4.1 诊断方法

5.4.1.1 细菌学检查

按GB/T 18645-2002第3章规定执行。

5.4.1.2 结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验

按GB/T 18645-2002第4章规定执行。

5.4.1.3 实时荧光 PCR 检测

按GB/T 27639规定执行。

5.4.1.4 牛结核病 γ -干扰素 Elisa 试验

按附录A进行。

5.4.2 结果判定

5.4.2.1 临床判定

根据5.1、5.2和5.3做出初步判定。

5.4.2.2 实验室判定

5.4中任一诊断方法结果为阳性的判为奶牛结核病阳性。

5.5 检测

5.5.1 检测比例

5.5.1.1 净化场按发现疫病的抽样方式确定检测比例。

5.5.1.2 稳定控制场、控制场、污染场 100 %检测。

5.5.2 检测频率

5.5.2.1 奶牛结核病净化场和稳定控制场，每年至少监测一次。

5.5.2.2 奶牛结核病控制场每年至少监测二次，间隔至少 5 个月以上。

5.5.2.3 奶牛结核病污染场每季度监测一次。

5.5.2.4 初生犊牛应于 20 日龄时进行第一次监测。

6 预防

6.1 防疫条件

6.1.1 奶牛场建设、布局等按 NY /T 1567 执行。

6.1.2 奶牛场环境控制按 NY/T 1169 执行。

6.1.3 奶牛饲养、兽医防疫按 NY 5047 执行。

6.2 生物安全

6.2.1 奶牛繁育使用的精液、胚胎来源于结核病净化种群，附有官方出具的检测阴性证明。

6.2.2 场内禁止屠宰或解剖牛只；粪便、污水及其他污物及时清理并进行无害化处理。

6.2.3 定期杀灭吸血昆虫和鼠类等啮齿动物。

6.2.4 限制外来车辆、人员入场，必需进入时应经消毒，但禁止进入生产区。

6.2.5 禁止人畜混居，不得混养其他畜禽，并防止周围其他畜禽进入。

6.3 人员要求

直接从事奶牛场工作的人员应取得卫生部门发放的健康证明。

7 控制

7.1 疫情报告

任何单位和个人发现疑似病牛，应当及时向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或者动物疫病预防控制机构报告。

7.2 阳性牛处理

按《病死及病害动物无害化处理技术规范》规定执行。

附录 A

(规范性附录)

牛结核病 γ -干扰素 Elisa 试验

A.1 试验材料

A.1.1 牛结核分枝杆菌 γ -干扰素检测试剂盒；

A.1.2 肝素钠真空采血管；

A.1.3 牛型提纯结核菌素 (PPD) 和禽型提纯结核菌素 (PPD)；

A.1.4 常用化学试剂：95%乙醇、88%磷酸；

A.1.5 仪器设备：酶标仪、洗板机、微量移液器、低温离心机、培养箱、微量振荡器。

A.2 试验方法

A.2.1 全血采集及培养

A.2.1.1 采血

无菌采集至少5ml血液放入肝素抗凝管中，轻轻颠倒几次混合血液，使肝素溶解。室温（22℃±5℃，避免温度过高或过低）下运送到实验室并在采血后24h内进行培养。避免血液冷冻和冷藏。

A.2.1.2 血液分装

分装应在无菌条件下进行操作。分装前轻轻颠倒试管，充分混匀血液样品。由于本试验需要活的淋巴细胞，因此需要将细胞损伤降至最低。将抗凝血加入24孔组织培养板，每头动物加三管1.5mL分装的抗凝血，见表A.1。

表 A.1 吸取血液或抗原至 24 孔培养板的推荐操作

动物编号	试剂		
1 号动物	bPPD 1	AvPPD 1	PBS 1
2 号动物	bPPD 2	AvPPD 2	PBS 2
3 号动物	bPPD 3	AvPPD 3	PBS 3
4 号动物	bPPD 4	AvPPD 4	PBS 4
5 号动物	bPPD 5	AvPPD 5	PBS 5
6 号动物	bPPD 6	AvPPD 6	PBS 6
7 号动物	bPPD 7	AvPPD 7	PBS 7
8 号动物	bPPD 8	AvPPD 8	PBS 8

A.2.1.3 加入刺激抗原

在无菌条件下，加入100 μ L PBS、bPPD和 AvPPD至相应的孔。抗原必须与分装的血液充分混匀，最好用一个微量振荡器高速振荡1min。如无合适的仪器，将细胞培养板及其盖紧紧固定在一起，在光滑的表面上顺时针和逆时针各旋转10次。小心操作不要引起交叉污染，也不要让血液附在盖上。避免血液起泡。只有刺激抗原与血液完全混合，试验才能达到最佳效果。

A. 2. 1. 4 孵育

将含有血液和抗原的组织培养板在37 $^{\circ}$ C湿温培养箱中孵育16h~24h。

A. 2. 1. 5 血浆样品的收获

用可调移液器小心吸取约400 μ L的上层血浆，转入独立的1.5mL离心管中。吸取血浆时应尽量避免吸入细胞。污染极少量红细胞不会影响 γ -干扰素酶免疫试验。

A. 2. 1. 6 血浆的贮存

血浆可在2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C贮存7天，在-20 $^{\circ}$ C可贮存几个月。贮存前，每个贮存管应用合适的盖子密封。在样品架上标记日期、操作者的首字母、管内容物、动物编号和牛群细节等相关信息。检测前，样品应恢复至室温并充分混匀。

A. 2. 2 检测

A. 2. 2. 1 试剂准备

A. 2. 2. 1. 1 ELISA 板

未开封前，在室温平衡至少1h。

A. 2. 2. 1. 2 阴阳性对照

用无菌蒸馏水或去离子水溶解，确保完全溶解，溶解后的阴阳性对照可在2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存3个月。使用前恢复至室温，并充分混匀。

A. 2. 2. 1. 3 洗液

使用前恢复至室温，用蒸馏水或去离子水 20 倍稀释。

A. 2. 2. 1. 4 稀释液

直接使用，使用前恢复至室温，主要用于稀释酶标结合物。

A. 2. 2. 1. 5 结合物

用稀释液 50 倍稀释，现用现配，适量配制。见表 A. 2。

表 A. 2 结合物和稀释液体积

ELISA 板	结合物体积	稀释液体积
1	200 μ l	9.8ml
2	400 μ l	19.6ml
3	600 μ l	29.4ml
4	800 μ l	39.2ml
5	1000 μ l	49ml

A. 2. 2. 1. 6 TMB

直接使用，使用前恢复至室温。

A.2.2.1.7 终止液

直接使用，使用前恢复至室温。

A.2.2.2 注意事项

A.2.2.2.1 实验前除结合物外，其它试剂与试验样品必须恢复至室温。

A.2.2.2.2 试剂盒所有试剂需 2℃~8℃ 保存，用完后应立即放回 2℃~8℃ 保存。

A.2.2.2.3 用无菌蒸馏水或去离子水充分溶解冻干物质，溶解后平衡至少 15min，使用前混匀。

A.2.2.2.4 待检上清应先加到稀释板，然后用 8 道或 12 道的移液器转到 ELISA 板上，保证加入的上清孵育时间一致。

A.2.2.2.5 阴性和阳性 γ -干扰素对照品和空白对照每次应加入到固定孔中，在第 H 行的 10, 11 和 12 孔。

A.2.2.2.6 每个板条应做好标记，并适当固定板条，以防板条从板框中脱落，或防止脱落后板条顺序混乱不清，对检测造成不必要的麻烦。

A.2.2.2.7 未用完的板条应放入含干燥剂的自封袋中 2℃~8℃ 保存。如保存得当可保存至有效期止。不可混用不同批次试剂盒的板条。

A.2.2.3 操作步骤

A.2.2.3.1 试验前将所有试剂（除结合物）恢复至 21℃±3℃。

A.2.2.3.2 溶解冻干试剂，并平衡 15 min。

A.2.2.3.3 每孔加入 100 μ L 待检样品（不需稀释）和对照品（阳性、阴性和空白对照各一孔，阴性对照加入到 H10 孔，阳性对照加入到 H11 孔，空白对照 H12 孔）至相应孔中。在微量振荡器上振荡 1min，彻底混匀。

A.2.2.3.4 封板，室温 21℃±3℃ 孵育 1h。

A.2.2.3.5 洗涤 4 次。洗液按配制方法制备，洗涤方法如下：迅速翻转 ELISA 板以倒空其内液体，避免孔与孔之间的液体混合，每孔中添加 300 μ l 的洗液，轻摇微孔板，避免造成不同孔间的污染，迅速翻转 ELISA 板以倒空其内液体，重复操作 3 次。第 4 次洗涤完毕后，将酶标板放在干净的滤纸上拍打几次，尽量除去残留的洗液。

A.2.2.3.6 每孔加入 100 μ L 新鲜配制的酶标结合物，充分振荡混匀。按表 A.1 稀释液稀释酶标结合物。

A.2.2.3.7 封板，室温 21℃±3℃ 孵育 1 h。

A.2.2.3.8 洗涤 4 次。洗涤方法同 4.3.5。

A.2.2.3.9 每孔加入 100 μ L 底物溶液（TMB），充分振荡混合。

A.2.2.3.10 封板，21℃±3℃ 避光孵育 10min。注释：可根据颜色反应的强度延长或缩短孵育时间。

A. 2. 2. 3. 11 每孔加入 50 μ L 终止液，轻轻摇动混匀。

A. 2. 2. 3. 12 终止后 5min 内读取 450nm 的 OD 值。

A. 2. 2. 4 结果

A. 2. 2. 4. 1 试验有效性

阳性对照OD值大于0.700为试验有效，否则试验视为失败，需重新检测。

阴性对照OD值小于0.150为试验有效，否则试验视为失败，需重新检测。

A. 2. 2. 4. 2 结果解释

当进行重复孔时, OD值的计算需取平均值。阳性和阴性的表示方法为:

a) 阳性: $BPPD-PBS \geq 0.1$ (OD值) 且 $BPPD-AvPPD \geq 0.1$ (OD值)。

b) 阴性: $BPPD-PBS < 0.1$ (OD值) 或 $BPPD-AvPPD < 0.1$ (OD值)。
