

牛结核病的诊断

王君英

浙江省义乌市畜牧兽医局,浙江义乌 322000

摘要 牛结核病是一种人兽共患病,其传播和流行影响着养牛业的发展和人类的健康。要想控制和消灭该病,必须依赖于有效的牛结核病诊断方法。本文从病原学、分子生物学、血清学等 6 个方面对该病的诊断方法进行了综述。

关键词 牛;牛分枝杆菌;诊断

牛结核病(Bovine tuberculosis, BT)是一种由牛分枝杆菌引起的人兽共患传染病,主要能够感染牛和其它家畜和野生动物。其特征是持续整个病程的消瘦,多种器官可以形成结节,进而在结节的中心出现干酪样坏死、空洞等症状。牛结核病的传播和流行对我国养牛的发展来说是个巨大的威胁,而且由于牛分枝杆菌几乎可以感染所有的温血脊椎动物,所以对人和其它动物的健康也具有极大威胁。世界动物卫生组织(OIE)将其列为 B 类动物疫病,而我国将其列为二类动物疫病。分枝杆菌复杂的致病机制及早期以细胞免疫为主的现实情况,使得结核病的控制不能依赖于传统的疫苗,国际上的惯例是诊断并淘汰病畜。因此要想防控牛结核病,该病的诊断将起到至关重要的作用。

临床上牛结核病检测倾向于使用一些快速、准确、可靠的检测方法,现在各国都在努力开发牛结核病可靠的检测方法以便用于临床。牛结核病的诊断方法主要有:第一类是临床诊断;第二类为组织病理学诊断;第三类为病原学诊断;第四类为分子生物学诊断;第五类为免疫学诊断。

1 临床诊断

牛结核病一般呈慢性经过,潜伏期大多数为

4 周,最多为十几年。因此该病一般潜伏于动物体内不引起症状,有的动物在感染几个月或者几年后才出现明显的临床症状,发展为活动性结核。牛分枝杆菌可以侵袭所有器官,动物会表现出明显的食欲不振,逐渐消瘦,间歇性咳嗽,腹泻等症状。肺结核、肠结核和乳房结核是牛结核病的常见类型,也可见淋巴结核、胸膜结核和腹膜结核等类型。

1)肺型结核。肺型结核主要症状为渐进性的消瘦、并伴有长期的干咳,且清晨时干咳最为明显。随着病情的越发严重,咳嗽加重、咳嗽频率增加,干咳转为湿咳,声音变弱,且患牛咳嗽时表现痛苦,呼吸急促、困难。

2)肠型结核。犍牛最容易表现出此型症状,食欲不振、消瘦、下痢。当波及到肝、肠系膜淋巴结等腹腔器官组织时,直肠检查可以辨认^[1]。

3)乳房型结核。常见症状是乳房淋巴结肿大,随着疾病的发展后方乳腺区出现局限性或者弥散性硬结,乳房表面凸凹不平。当患牛出现上述症状时,泌乳量会下降,初期乳汁正常,严重时乳汁变得稀薄如水。由于肿块形成所导致的占位现象和乳腺的逐渐萎缩,乳头会发生变形、位置异常、破溃流脓,进而泌乳停止。

收稿日期:2016-01-20

王君英,女,1983 年生。

变薄、失去弹性、小肠绒毛开始萎缩、隐窝变浅或消失等病理现象。

4)血清学鉴别诊断。血清学诊断在条件一般的养殖户中难以开展,主要集中于具备科研能力的高

校和科研单位。一般主要通过检测血清中特异性抗体或抗原的方法,分析出最终致病原。检测方法主要包括酶联免疫吸附试验、补体结合试验、中和试验、荧光抗体法等。

2 组织病理学诊断

牛结核病又称为“珍珠病”，特征性的病变是形成白色的结核结节，最容易发生在肺及肺门淋巴结、纵隔膜淋巴结，又可见腹腔的肠系膜淋巴结，头颈部的淋巴结和全身。从针头大小到鸡蛋大小不等，切开后中间有干酪样坏死或钙化。组织病理学检查可见大量的结核分枝杆菌，有时坏死组织溶解和软化，排出后形成空洞。当支气管出现患病时，支气管内部会出现结节，进一步变为溃疡。支气管淋巴结肿大达鸡蛋大小，横切面有时可见结核性干酪样病灶和钙化的病灶。胸膜腔浆膜结核时，在浆膜上形成数目众多的密集的小结节，同时可见结缔组织增生。肠结核时，在黏膜上发生小结节，坏死崩溃后在结节中央发生溃疡^[2]。

3 病原学诊断

1) 涂片镜检。细菌学检测方法主要是检测患病牛病料中是否存在牛分枝杆菌，牛结核病阳性牛的肺、肺门淋巴结、肝、分泌的乳汁等样本是重点检测的样本，主要采集有典型结核结节的病变区域。然后将病料涂片或者是集菌后涂片，使用齐-尼二氏抗酸染色方法染色，在光学显微镜下检测是否存在抗酸性杆菌，即可做出初步的判断。

2) 细菌分离。采集病变牛的典型结节区域病变组织使用选择性的培养基分离分枝杆菌，通过观察菌落形态、生化实验、齐-尼二氏抗酸染色来鉴定。用来选择性分离培养的培养基主要有罗杰二氏(Lowenstein-Jensen)培养基、改良罗杰二氏培养基、丙酮酸培养基等。牛结核分枝杆菌在上述选择培养基中需要分裂生长 1 个月左右，在培养基上菌落呈颗粒、结节、花菜状，乳白或米黄，不透明。研究表明牛分枝杆菌不能合成烟酸并还原硝酸盐，这一特点可以用来区分结核分枝杆菌和牛分枝杆菌。另外还可以通过热触酶试验区别牛型分枝杆菌与结核分枝杆菌，因为在热触酶试验中，结核分枝杆菌呈现阴性，而牛型分枝杆菌呈现阳性。

4 分子生物学诊断

1) PCR 检测。聚合酶链式反应(PCR)是一种以病原微生物 DNA 上的目标核酸片段为检测标识的分子生物学诊断方法，是临床疾病诊断中最有价值

的研究手段之一。结核分枝杆菌复合群中 IS6110 重复序列特异性最强、敏感性较高，可以作为结核分枝杆菌 PCR 检测的首选基因^[3]。目前 IS6100 序列已经被用来进行牛结核分枝杆菌的诊断和流行病学调查，如利用牛分枝杆菌的该特异性片段对 103 份患病动物的有结核结节的组织进行检测，检测结果阳性率可达 92.23%(95/103)，对其他分枝杆菌和非分枝杆菌的组织样本进行检测，检测结果全部为阴性。

2) RFLP 图谱。RFLP(restriction fragment length polymorphism) 是基于分枝杆菌插入序列 IS6110 建立的方法，基因组 DNA 经过 *PvuII* 酶切、电泳、转膜后利用 IS6110 探针进行 Southern 杂交，形成 IS6110 序列长短不一的片段，即 RFLP 图谱。IS6110 被广泛用于分枝杆菌的分子标记，但对于人型菌分辨能力较高。目前牛结核分枝杆菌分辨能力最高的为 PGRS-RFLP，与 IS6110-RFLP 类似是基于 PGRS 的探针来进行杂交产生图谱。

5 免疫学诊断

免疫学检测方法具有快速、简单、高效、样本检测量大、敏感性和特异性高的特点，并且可以实现自动化。这种高效的方法在诊断牛结核分枝杆菌中有可以预见的光明前景。现有方法以结核菌素皮内变态反应(PPD)、IFN- γ 体外释放试验、抗体检测法(酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫胶体金诊断等)为主。

1) 结核菌素皮内变态反应(PPD)。结核菌素导致的皮内变态反应是 OIE 推荐的牛结核病检测方法，变态反应皮厚度差是决定其特异性的关键因素。为了提高该检测方法的特异性和排除环境分枝杆菌、禽分枝杆菌的污染，比较皮试法是一种不错的方法。即在牛颈部两点间隔 12~15 cm 分别注射 PPD-B(牛结核菌素)和 PPD-A(禽结核菌素)，(PPD-B 皮皱厚-PPD-A 皮皱厚) ≥ 4 mm 时判为阳性；2 mm < (PPD-B 皮皱厚-PPD-A 皮皱厚) < 4 mm 时判为可疑，(PPD-B 皮皱厚-PPD-A 皮皱厚) ≤ 2 mm 时判为阴性。

2) IFN- γ 体外释放试验。许多国家采用直接检测病牛血清中干扰素(IFN)的方法，作为皮试反应后 8~28 d 内复查的辅助诊断方法，以剔除假阳性^[4]。该方法是基于牛分枝杆菌感染的 T 细胞在体外培养

时再次被牛分枝杆菌抗原刺激时, T 细胞会产生 IFN- γ 。该方法与 PPD 变态反应相同, 都是利用 PPD-B, PPD-A 刺激体外培养的 T 细胞, 可以排除禽分枝杆菌和环境分枝杆菌干扰。已有研究使用干扰素检测法对西班牙 85 个牛群进行检测并于颈部 PPD 皮试变态反应相比较, 结果发现干扰素检测敏感性(84.9%)高于皮试反应(80.2%), 使用 ESAT6 联合 PPD 刺激可以增加灵敏度⁹。另外有学者提出使用 RD1 区的 CFP10/ESAT6 蛋白或者多肽作为抗原代替 PPD 刺激 T 细胞, 由于 RD1 区仅存于结核分枝杆菌复合群, 因此可以区分 BCG 免疫牛和牛结核阳性牛, 并且排除禽分枝杆菌、环境分枝杆菌干扰。

3) 抗体检测法。尽管牛结核分枝杆菌在感染初期血清中的抗体水平低, 且这时发挥作用的主要是细胞免疫。但是当病程深入发展后, 牛分枝杆菌也可以引起机体的体液免疫, 那么血清学检测方法便可以作为牛结核病诊断的重要检测方法。目前的诊断方法主要是酶联免疫吸附法(ELISA)、免疫斑点测定法、斑点金免疫渗滤试验(DIGFA)、荧光偏振检测法(FPA)等。

①酶联免疫吸附试验。最早的 ELISA 检测使用的抗原为 PPD, 许多国家利用 PPD-ELISA 检测方法诊断牛分枝杆菌感染, 在试验中得出了 PPD-ELISA 敏感性和特异性分别为 70%~90% 和 70%~95% 的结论。由于 PPD 抗原含量、种类存在差异, 难以保持稳定等原因, 人们试图寻找新的目标蛋白来作为血清学检测抗原。随着研究对于结核分枝杆菌基因组的研究深入, 许多结核分枝杆菌分泌蛋白被用来构建 ELISA 检测方法, 如结核分枝杆菌早期分泌蛋白 CFP10 和 ESAT6、MPT64 蛋白和 MPT63 蛋白、MPB70 蛋白、MPB83 蛋白、Ag85 复合物等。研究发现以这些蛋白构建的 ELISA 检测方法特异性和敏感性都在 90% 左右, 并且血清中针对这些蛋白的抗体滴度会随着病程的发展而升高⁶。

②胶体金检测。胶体金检测方法具有快速、敏感性高、特异性好、肉眼可读、不依赖仪器和试剂等优点, 在临床疾病诊断和检疫中得到广泛应用。牛分枝杆菌的分泌蛋白主要是 MPB 系列蛋白, 被认为是一种良好的血清学诊断抗原。吉林农大、哈尔滨兽医研究所、华中农业大学动物医学院动物病毒室利用原核表达的 MPB83 作为胶体金标记抗原和原核表达的 MPB70 作为检测线上的捕获抗原, 制备牛结核病抗体检测试纸条, 实验表明该试纸条有良好的特异性和敏感性, 可以作为牛结核病的普查和检疫方法。

6 小 结

结核菌素皮内变态反应已经通过实践证明在畜群水平上是有效的诊断工具, 多个国家使用这个方法根除了牛结核病, 并且在感染的畜群内使用干扰素检测方法来最大限度提高感染牛的检出率也是最有效的检测方法。牛结核病检测方法的发展将依赖于分枝杆菌致病机理和对分枝杆菌比较基因组的研究。

参 考 文 献

- [1] 张占龙. 对牛结核病的诊断与防治的探讨 [J]. 中国畜禽种业, 2009(7):95-97.
- [2] 侯俊峰. 牛结核病的诊断与防治 [J]. 动物科学与动物医学, 2003(4):69-70.
- [3] 刘增再, 彭运潮, 胡述光. 牛结核病诊断研究进展 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(5):13-16.
- [4] 朱建国, 华修国. 牛结核病研究进展 [J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(5):423-426.
- [5] 郭爱珍, 陈焕春. 牛结核病流行特点及防控措施 [J]. 中国奶牛, 2010(11):38-45.
- [6] RAMOS D F, SILVA P, DELLAGOSTIN O. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques [J]. Braz J Biol, 2015(75): 830-837.