

前 言

本标准主要是根据世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizootic(法),OIE]1996年颁布的《诊断试验和疫苗标准手册》(Manual of standards for diagnostic tests & vaccines)中3.2.3、3.2.3.b的牛结核病和3.6.8的禽结核病部分的内容制定的。考虑到我国的实际情况,对其中一些在我国还无法进行的检验技术作了删减(如:淋巴细胞增生试验; γ -干扰素试验)。

这样,一方面通过与国际同类要求尽可能一致,以使我国适应国际贸易、技术和经济交流。另一方面,又考虑到我国的实际情况,使得技术方法具有可行性。

本标准中的生物制品应符合中华人民共和国《兽用生物制品质量标准》(1992)的要求。

本标准的附录A、附录B、附录C都是标准的附录,附录D是提示的附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:毛开荣、陈向经、关孚时、罗玉峰。

中华人民共和国国家标准

动物结核病诊断技术

GB/T 18645-2002

Diagnostic techniques for tuberculosis of animal

1 范围

本标准规定了动物结核病的检测方法和要求。

本标准适用于动物结核病检测。

2 定义、符号和缩略语

本标准采用下列符号和缩略语：

PPD：提纯蛋白衍生物(purified protein derivative)。

IU：国际单位(international unit)。

3 细菌学检查

3.1 病料的采集和处理

用于细菌学检查的材料采自淋巴结及其他组织。当活畜有可疑的呼吸道结核、乳房结核、泌尿生殖道结核、肠结核时，其痰、乳、精液、子宫分泌物、尿和粪便可作为细菌学检查的材料。

对那些结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验阳性，但尸检时无病理学病变的动物，可从下颌、咽后、支气管、肺(特别是肺门及肺门淋巴结)、纵膈及一些肠系膜的淋巴结采集样品送检。

样品应封装在无菌的容器内冷藏运送。

为了提高检出结果，样品可采取消化浓缩法处理，处理方法见附录 A(标准的附录)。

3.1.1 痰

对牛常可用痰进行细菌学检验。牛咯痰极少，宜在清晨采集。用硬橡胶管自口腔伸入至气管内，外端连接注射器吸取痰液。亦可取牛咳出的痰块进行检验。

痰样品稀薄时，可加入等量的 4%~6% 硫酸(见附录 A 中 A1)处理，如痰样品粘稠时，则加入 5 倍量的 4% 硫酸处理。充分摇匀后置 37℃ 作用 20 min，以 3 000 r/min~4 000 r/min 离心，沉淀物作染色镜检、培养和动物试验。

也可用 2 倍量 15%~20% 安替福民(antiformin)溶液(见附录 A 中 A3)处理痰液，将混合物置 37℃ 作用 1 h~2 h 后离心。以灭菌生理盐水冲洗沉淀物几次后，取沉淀物染色镜检、培养和动物试验。

3.1.2 乳

怀疑有乳房结核时，可无菌采集乳汁进行检验(一般以挤出之最后乳汁含菌量较多，早晨挤出的乳中含菌量最高)。

将乳汁分置 4~6 支离心管中，每管 10 mL，以 3 000 r/min~4 000 r/min 离心 20 min~30 min，吸取上层乳脂和管底的沉淀物作染色镜检、培养和动物试验。

乳汁 10 mL 加酒精和乙醚各 10 mL 及 15%~20% 安替福民溶液 30 mL，摇匀置 37℃ 恒温箱内 1 h~2 h，取出加等量灭菌蒸馏水混匀，离心沉淀后弃去上清，取沉淀物作染色镜检、培养和动物试验。

3.1.3 精液和子宫分泌物

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 2002-02-19 批准

2002-05-01 实施

有生殖道结核可疑时,可采集公畜精液、母畜子宫分泌物进行细菌学检查。

处理子宫分泌物,可用15%~20%安替福民溶液,混匀后静置2 h~3 h,3 000 r/min~4 000 r/min离心20 min,弃上清,加10 mL蒸馏水于沉淀物中。即可作动物试验,经1.5~2个月剖检。

3.1.4 尿

有肾结核可疑时,可采集尿液,一般采集中段尿液,以早晨第一次尿为宜。

如仅作染色镜检,可将尿液以3 000 r/min~4 000 r/min离心20 min后,取沉淀物涂片。

如作培养或动物试验,则应将尿液进行消化浓缩处理,再进行检验以免杂菌生长而影响检验结果。

3.1.5 粪便

有肠结核可疑时,可采集粪便进行细菌学检查,患肺结核的牛只,有时在粪便中亦可检出结核分枝杆菌。因牛常将痰液吞咽至消化道内,随粪便排出。尽量采集混有粘液或脓血的粪便。

取粪便30 g,加15%~20%安替福民溶液15 mL和蒸馏水55 mL,混合,经2 h~3 h后,3 000 r/min~4 000 r/min离心30 min,倾去上清液,加10 mL蒸馏水于沉淀物中,将此液用纱布过滤后接种于豚鼠皮下,经1.5~2个月后剖检。

或将粪便加2倍量灭菌蒸馏水磨碎,然后加氯化钠至饱和。当液体中残渣沉淀后(液体完全澄清),浮起的薄膜含有大量的结核分枝杆菌。取出薄膜,用等量的4%氢氧化钠(见附录A中A2)充分混合,置37℃中3 h,然后离心,取沉淀物用8%盐酸中和后,即可作染色镜检、培养和动物试验。

粪便中如有粘液或脓血,可挑取粘液脓血选用任何一种消化液处理后检验。

如系纯粪便,取5 g~10 g,加生理盐水约3~4倍混合后,用细铜纱网过滤,取滤液置室温中自然沉淀,然后取上层悬液置于另一大离心管或烧杯内,加消化液约3~4倍量,置37℃温箱1 h~2 h,同上法处理后检验。

3.1.6 组织器官

尽量采集有结节病灶的部位。猪易患颈部淋巴结结核,亦易患肠系膜淋巴结结核,且常呈钙化或干酪样病变。家禽常在肠、脾、肝发生结核病灶,有时亦可见于肺或卵巢。

病变组织需先研磨,制成乳剂,通常取组织乳剂或其他液状病料2 mL~4 mL,加入等量的5%氢氧化钠溶液,充分振摇5 min~10 min,或摇至发生液化为止,液化后经3 000 r/min~4 000 r/min离心15 min~30 min,沉淀物加1滴酚红作指示剂,以2 mol/L盐酸中和至淡红色后,作染色镜检、培养和动物试验。

如病料为脓状或干酪状或钙化的结节病灶组织,可直接作染色镜检,往往可以检出众多的结核分枝杆菌。但得到阴性结果时,应浓缩处理后检验。

3.2 检验方法

3.2.1 染色镜检

3.2.1.1 涂片

先在玻片上涂布一层薄甘油蛋白(鸡蛋白20 mL,甘油20 mL,水杨酸钠0.4 g,混匀),然后吸取标本滴加其上,涂布均匀。

如检验标本为乳汁等含脂肪较多的材料,在涂片制成后,可先用二甲苯或乙醚滴加覆盖于涂片之上,经摇动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。

3.2.1.2 染色

染色液配制方法见附录B(标准的附录)。

萋-尼氏抗酸染色:处理过的被检材料涂片后,经火焰固定,加苯酚复红染色液(见附录B中B1)覆盖,将玻片在火焰上加热至出现蒸汽(不能产生气泡),如此热染5 min(如染色液干涸,须加适量补充)。水洗后滴加3%盐酸酒精(见附录B中B2)脱色30 s~60 s(至无色素脱下为止)。水洗后,以骆氏美蓝染色液(见附录B中B3)复染1 min。水洗,吸干,镜检。抗酸菌应不被盐酸酒精脱色而染成红色,其他细菌与动物细胞可被盐酸酒精脱色而均被染成蓝色。

3.2.1.3 镜检

结核分枝杆菌在显微镜下呈细长平直或微弯曲的杆菌,长 $1.5\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$,宽 $0.2\ \mu\text{m}\sim 0.5\ \mu\text{m}$,在陈旧培养基上或干酪性淋巴结内的菌体,偶尔可见长达 $10\ \mu\text{m}$ 或更长。

3.2.2 培养

3.2.2.1 培养基配制方法见附录C(标准的附录)。

3.2.2.2 被检标本经消化浓缩后吸取其沉淀物作为培养材料。初次分离,可用配氏培养基(见附录C中C1)、L-J培养基(见附录C中C2)或青霉素血液琼脂培养基(见附录C中C3)。

3.2.2.3 将经过处理的标本接种到培养基上(同时作2~4份),培养一天后,以熔化的石蜡封口,继续培养。

3.2.2.4 牛型结核分枝杆菌比人型结核分枝杆菌生长要缓慢得多。初次培养牛型结核分枝杆菌时,需 $36\ \text{C}\sim 37\ \text{C}$ 培养5~8周方可出现菌落。在固定培养基上不产生任何颜色,菌落湿润、略显粗糙并发脆。加1%的丙酮酸钠能促进生长,但在噻吩-2-酸肼(T_2H)培养基(见附录C中C4)上不生长。

3.2.2.5 禽型结核分枝杆菌生长需要2~3周。形成湿润、弥漫状,光滑及星光状菌落。最适生长温度为 $40\ \text{C}\sim 42\ \text{C}$ 。在 T_2H 培养基上生长。

3.2.2.6 人型结核分枝杆菌生长需要 $36\ \text{C}\sim 37\ \text{C}$ 培养3~4周。该菌落干燥、粗糙,呈白色、黄色或橙色。牢牢附着于培养基。在 T_2H 培养基上生长。

3.2.2.7 非典型分枝杆菌生长快速,大部分(但不是全部)产生白色或具有橙色或黄色色素,常形成黄色或橙色菌落。某些种类的色素只有在亮处才显出。大多数非典型种类的生长速度比牛或人型结核分枝杆菌快。

3.2.3 动物试验

本试验是确诊结核病的重要依据,如能与涂片镜检和培养同时进行,则结果更为可靠。

3.2.3.1 试验动物在试验前,应进行牛型结核分枝杆菌PPD和禽型结核分枝杆菌PPD皮内变态反应试验。

3.2.3.2 豚鼠对牛型和人型结核分枝杆菌敏感,对禽型结核分枝杆菌有抵抗力,常只能形成局部病灶。

3.2.3.3 家兔对禽型结核分枝杆菌高度敏感。对牛型结核分枝杆菌敏感。人型结核分枝杆菌虽可使其肺部形成少量病灶,但可趋于痊愈而不致死。

3.2.3.4 处理过的病料约 $1\ \text{mL}\sim 3\ \text{mL}$,皮下或肌肉或腹腔内注射,每份病料至少接种2只同种动物。接种后30d左右,进行禽型结核分枝杆菌PPD和牛型结核分枝杆菌PPD皮内变态反应试验,如有阳性反应,可剖检其中的半数动物进行病理学观察、细菌培养和涂片镜检。另一半继续观察至3个月再剖检观察。如果为阴性反应,可于40d左右剖检其中的半数,观察病理学变化、细菌培养和涂片镜检,另一半继续观察至3个月再剖检观察。

3.2.4 牛型、禽型和人型结核分枝杆菌鉴定方法见附录D(提示的附录)。

4 结核分枝杆菌PPD皮内变态反应试验

4.1 牛型结核分枝杆菌PPD皮内变态反应试验

用结核分枝杆菌PPD进行的皮内变态反应试验对检查活畜结核病是很有用的。该试验用牛型结核分枝杆菌PPD进行。

4.1.1 牛的牛型结核分枝杆菌PPD皮内变态反应试验

出生后20d的牛即可用本试验进行检疫。

4.1.1.1 操作方法

a) 注射部位及术前处理:将牛只编号后在颈侧中部上三分之一处剪毛(或提前一天剃毛),三个月以内的犊牛,也可在肩胛部进行,直径约 $10\ \text{cm}$ 。用卡尺测量术部中央皮皱厚度,作好记录。注意,术部应无明显的病变。

b) 注射剂量:不论大小牛只,一律皮内注射 0.1 mL(含 2000IU)。即将牛型结核分枝杆菌 PPD 稀释成每毫升含 2 万 IU 后,皮内注射 0.1 mL。冻干 PPD 稀释后当天用完。

c) 注射方法:先以 75%酒精消毒术部,然后皮内注射定量的牛型结核分枝杆菌 PPD,注射后局部应出现小疱,如对注射有疑问时,应另选 15 cm 以外的部位或对侧重作。

d) 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,作好详细记录。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。

4.1.1.2 结果判定

a) 阳性反应:局部有明显的炎性反应,皮厚差大于或等于 4.0 mm。

b) 疑似反应:局部炎性反应不明显,皮厚差大于或等于 2.0 mm、小于 4.0 mm。

c) 阴性反应:无炎性反应。皮厚差在 2.0 mm 以下。

凡判定为疑似反应的牛只,于第一次检疫 60 d 后进行复检,其结果仍为疑似反应时,经 60 d 再复检,如仍为疑似反应,应判为阳性。

4.1.2 其他动物牛型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验

参照牛的牛型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验进行。

4.2 禽型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验

禽型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验是最广泛使用于家禽的试验。牛及其他哺乳动物也可用牛型结核分枝杆菌 PPD 和禽型结核分枝杆菌 PPD 同时在不同的部位进行,以区分特异性和非特异性变态反应。

4.2.1 禽的禽型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验

4.2.1.1 操作方法

用 10 mm×0.5 mm 针头肉垂皮内注射 0.1 mL(0.25 万 IU)禽型结核分枝杆菌 PPD,48 h 后观察结果。

4.2.1.2 结果判定

阳性反应为接种部位肿胀,从 5.0 mm 直径的小硬结到扩展至其他肉垂与颈部的广泛性水肿。火鸡肉垂的结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验,没有家禽的试验那样可靠。其他禽类也可用翼蹼作试验,但结果一般不理想。水禽可接种脚蹼,但试验不敏感并经常与接种部位的感染相混淆。

4.2.2 牛的禽型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验

4.2.2.1 操作方法

与牛型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验相同,只是禽型结核分枝杆菌 PPD 的剂量为每头 0.1 mL,含 0.25 万 IU。即将禽型结核分枝杆菌 PPD 稀释成每毫升含 2.5 万 IU 后,皮内注射 0.1 mL。

4.2.2.2 结果判定

a) 对牛型结核分枝杆菌 PPD 的反应为阳性(局部有明显的炎性反应,皮厚差大于或等于 4.0 mm),并且对牛型结核分枝杆菌 PPD 的反应大于对禽型结核分枝杆菌 PPD 的反应,二者皮差在 2.0 mm 以上,判为牛型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验阳性。

对已经定性为牛型结核分枝杆菌感染的牛群。其中即使少数牛的皮差在 2.0 mm 以下,甚至对牛型结核分枝杆菌 PPD 的反应略小于对禽型结核分枝杆菌 PPD 的反应(反应差小于或等于 2.0 mm),只要对牛型结核分枝杆菌 PPD 的反应在 2.0 mm 以上,也应判定为牛型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验阳性牛。

b) 对禽型结核分枝杆菌 PPD 的反应大于对牛型结核分枝杆菌 PPD 的反应,两者的皮差在 2.0 mm 以上,判为禽型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验阳性。

对已经定性为副结核分枝杆菌或禽型结核分枝杆菌感染的牛群。其中即使少数牛的皮差在2.0 mm以下,甚至对禽型结核分枝杆菌 PPD 的反应略小于对牛型结核分枝杆菌 PPD 的反应(不超过2.0 mm),只要对禽型结核分枝杆菌 PPD 的反应在2.0 mm以上,也应判为禽型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验阳性牛。

附录 A

(标准的附录)

标本消化浓缩法

痰液或乳汁等样品,由于含菌量较少,如直接涂片镜检往往是阴性结果。此外,在培养或作动物试验时,常因污染杂菌生长较快,使病原结核分枝杆菌被抑制。下列几种消化浓缩方法可使检验标本中蛋白质溶解、杀灭污染杂菌,而结核分枝杆菌因有蜡质外膜而不死亡,并得到浓缩。

A1 硫酸消化法

用4%~6%硫酸溶液将痰、尿、粪或病灶组织等按1:5之比例加入混合,然后置37℃作用1h~2h,经3 000 r/min~4 000 r/min离心30 min,弃上清,取沉淀物涂片镜检、培养和接种动物。也可用硫酸消化浓缩后,在沉淀物中加入3%氢氧化钠中和,然后抹片镜检、培养和接种动物。

A2 氢氧化钠消化法

取氢氧化钠35 g~40 g,钾明矾2 g,溴麝香草酚蓝20 mg(预先用60%酒精配制成0.4%浓度,应用时按比例加入),蒸馏水1 000 mL混合,即为氢氧化钠消化液。

将被检的痰、尿、粪便或病灶组织按1:5的比例加入氢氧化钠消化液中,混匀后,37℃作用2h~3h,然后无菌滴加5%~10%盐酸溶液进行中和,使标本的pH调到6.8左右(此时显淡黄绿色),以3 000 r/min~4 000 r/min离心15 min~20 min,弃上清,取沉淀物涂片镜检、培养和接种动物。

在病料中加入等量的4%氢氧化钠溶液,充分摇荡5 min~10 min,然后用3 000 r/min离心15 min~20 min,弃上清,加1滴酚红指示剂于沉淀物中,用2 mol/L盐酸中和至淡红色,然后取沉淀物涂片镜检、培养和接种动物。

在痰液或小脓块中加入等量的1%氢氧化钠溶液,充分振摇15 min,然后用3 000 r/min离心30 min,取沉淀物涂片镜检、培养和接种动物。

对痰液的消化浓缩也可采用以下较温和的处理方法:取1 mol/L(或4%)氢氧化钠水溶液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。取痰一份,加上述溶液2份,作用24 h~48 h,以3 000 r/min离心15 min,取沉淀物涂片镜检、培养和接种动物。

A3 安替福民(antiformin)沉淀浓缩法

溶液A:碳酸钠12 g、漂白粉8 g、蒸馏水80 mL。

溶液B:氢氧化钠15 g、蒸馏水85 mL。

应用时A、B两液等量混合,再用蒸馏水稀释成15%~20%后使用,该溶液须存放于棕色瓶内。

将被检样品置于试管中,加入3~4倍量的15%~20%安替福民溶液,充分摇匀后37℃作用1h,加1~2倍量的灭菌蒸馏水,摇匀,3 000 r/min~4 000 r/min离心20 min~30 min,弃上清沉淀物加蒸馏水恢复原量后再离心一次,取沉淀物涂片镜检、培养和接种动物。

附录 B

(标准的附录)

萘-尼氏抗酸染色液配制方法

B1 苯酚复红染色液

碱性复红饱和酒精溶液(每100 mL 95%酒精加3 g碱性复红)10 mL,5%苯酚溶液90 mL,二者混

合后用滤纸滤过。

B2 3%盐酸酒精脱色液

浓盐酸 3 mL, 95%酒精 97 mL, 混匀。

B3 骆氏美蓝染色液

甲液: 美蓝 0.3 g, 95%酒精 30 mL。

乙液: 0.01%氢氧化钾溶液 100 mL。

将甲乙两液相混合。

附录 C

(标准的附录)

培养基配制方法

C1 配氏(Petragnane)培养基

C1.1 成分

新鲜脱脂牛奶 450 mL, 马铃薯淀粉 18 g, 天门冬素(或蛋白胨) 2.6 g, 去皮马铃薯 225 g, 鸡蛋 15 个(除去 3 个蛋清), 甘油 40 g, 2%孔雀绿水溶液 30 mL。

C1.2 制法

将马铃薯去皮擦成丝, 加入马铃薯淀粉、天门冬素(或蛋白胨)、脱脂牛奶置烧杯中水浴煮沸 40 min~60 min, 并不时搅拌均匀, 使成糊状。待冷却至 50℃时加入打碎的鸡蛋(蛋壳先用 75%酒精消毒洗净), 混匀后用四层纱布过滤除渣。最后加入甘油和孔雀绿水溶液搅拌均匀, 分装于灭菌的试管中。

将分装培养基的试管置血清凝固器(或流通蒸汽锅)内, 间歇灭菌 3 次, 每天一次, 第一天 65℃灭菌 30 min, 第二、三天 75℃~80℃灭菌 30 min。

C1.3 用途

分离培养结核分枝杆菌用。

C2 L-J(Lowenstein-Jensen)培养基

C2.1 成分

无水磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 2.4 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.24 g, 枸橼酸镁 0.6 g, DL-天门冬素(DL-Asparagin) 3.6 g, 甘油 12 g, 蒸馏水 600 mL, 马铃薯粉 30 g, 鸡蛋(约 30 个) 1 000 mL, 2%孔雀绿水溶液 20 mL。

C2.2 制法

将磷酸二氢钾、硫酸镁、枸橼酸镁、甘油和蒸馏水混合, 加热使溶解。取马铃薯粉加入上述溶液内, 随加随搅拌, 水浴煮沸 1 h。鸡蛋用 75%酒精消毒外壳后, 打开, 将蛋清和蛋黄充分搅匀, 4 层纱布过滤。待上述加马铃薯粉的盐溶液冷却至 50℃时, 加入鸡蛋液和孔雀绿, 并充分搅匀。

分装, 80℃灭菌 30 min 后, 37℃培养 48 h, 若无杂菌污染即可使用。

C2.3 用途

供培养结核分枝杆菌用。

C3 青霉素血液琼脂培养基

C3.1 成分

琼脂 1.5 g,中性甘油 1 mL,蒸馏水 74 mL,兔全血(或牛全血)25 mL,青霉素(2 000 IU/mL) 1.85 mL。

C3.2 制法

将琼脂、中性甘油及蒸馏水混合,经 103.4 kPa 15 min 灭菌。待冷却到 50℃时加入兔全血(或牛全血)与青霉素,混合后分装,经 37℃培养 48 h,无杂菌污染即可使用。

C3.3 用途

供培养结核分枝杆菌用。

C4 噻吩-2 酸肼(T₂H)培养基

C4.1 成分

L-J 培养基, T₂H。

C4.2 制法

取 L-J 培养基(见 C2)100 mL,水浴煮沸,加 T₂H 1 mg,充分搅匀。分装;80℃灭菌 30 min 后,37℃培养 48 h,若无杂菌污染即可使用。

C4.3 用途

供结核分枝杆菌生化鉴定用。

附 录 D

(提示的附录)

牛型、禽型和人型结核分枝杆菌鉴定

牛型、禽型和人型结核分枝杆菌的鉴定,主要依据生化试验和动物试验。

D1 生化试验

牛型、禽型和人型结核分枝杆菌的生化试验特性见表 D1。

表 D1

生化试验类型	烟酸试验	Tween-80 水解试验	耐热接触酶试验	硝酸盐还原试验	尿素酶试验	T ₂ H 抗性试验
牛型结核分枝杆菌	—	—	—	—	+	—
禽型结核分枝杆菌	—	—	+	—	—	+
人型结核分枝杆菌	+	±	—	+	+	+

D1.1 烟酸试验

D1.1.1 试验方法

以热蒸馏水浸泡固体培养基上的培养物 15 min~30 min,洗下。每个培养物分装入 2 支试管中,每管 0.4 mL,再加入 3%联苯胺乙醇溶液 0.2 mL。然后向其中一管加入 10%溴化氰溶液(此液剧毒,应在通风橱内操作)0.2 mL。

D1.1.2 结果判定

凡含 10%溴化氰溶液的试管出现桃红色沉淀,另一管只产生无色沉淀者判为阳性;两支试管都为产生无色沉淀者判为阴性。

D1.2 吐温-80(Tween-80)水解试验**D1.2.1 试验方法**

向 100 mL 磷酸缓冲液(1/15 mol/L, pH 7.0)中加入 0.5 mL Tween-80、2 mL 0.2% 中性红溶液。经 112 kPa 灭菌 20 min, 分装于试管中, 每管 2 mL。在 4℃~10℃ 可保存 2 周。

取上述试管, 加入 10 mg/mL 的菌液 0.5 mL, 37℃ 培养, 3 d~5 d 观察结果。

D1.2.2 结果判定

试管内由原来的琥珀色变为桃红色或红色者判为阳性。无颜色变化为阴性。

D1.3 耐热接触酶试验**D1.3.1 试验方法**

用生理盐水配制出 5 mg/mL~10 mg/mL 的菌液, 分装试管, 每管 0.5 mL, 以 68℃ 水浴 20 min, 冷却后加入 0.5 mL 过氧化氢(H₂O₂)和 Tween-80 混合液(10% Tween-80 加等量 30% H₂O₂)。观察结果。

D1.3.2 结果判断

肉眼观察, 如有多量小气泡自管底升起, 即为阳性。否则为阴性。

D1.4 硝酸盐还原试验**D1.4.1 试验方法**

在 100 mL pH7.0 的磷酸盐缓冲液中, 加入硝酸钠(NaNO₃·H₂O)85 mg, 经 112 kPa 灭菌 20 min 后分装, 每管 2 mL。

向上述溶液中加入 10 mg/mL 的菌液, 经 37℃ 水浴 2 h 后, 加入 1 滴 2 倍稀释的盐酸, 2 滴 0.2% 氨苯磺胺, 2 滴 0.1% N-甲基盐酸二氨基乙烯。在 4℃~10℃ 存放 2 周后判断结果。

D1.4.2 结果判定

呈粉红色至紫红色者为阳性。无色或淡粉色为阴性。

D1.5 尿素酶试验**D1.5.1 试验方法**

将被检材料接种尿素培养基。37℃ 培养。

D1.5.2 结果判定

在尿素培养基上长出结核分枝杆菌菌苔(或菌落), 并且使培养基变成红色, 即为阳性。培养基不变色为阴性。

D1.6 T₂H 抗性试验**D1.6.1 试验方法**

将被检材料接种 T₂H 培养基和 L-J 培养基。37℃ 培养。

D1.6.2 结果判定

在上述两种培养基上长出结核分枝杆菌菌苔(或菌落)即为阳性。若在 L-J 培养基上生长, 而在 T₂H 培养基上不生长, 则为阴性。

D2 动物试验

牛型、禽型和人型结核分枝杆菌的动物试验特性见表 D2。

表 D2

试验动物	豚鼠	兔	鸡
牛型结核分枝杆菌	易感	易感	不易感
禽型结核分枝杆菌	不易感	易感	易感
人型结核分枝杆菌	易感	不易感	不易感

D2.1 试验方法

试验动物在试验前,应进行结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验。豚鼠用牛型结核分枝杆菌 PPD 检测;鸡用禽型结核分枝杆菌 PPD 检测;兔用牛型和禽型结核分枝杆菌 PPD 检测。

将处理过的病料约 1 mL~3 mL,选用皮下、肌肉或腹腔内途径注射试验动物,每份病料至少接种 2 只同种试验动物。

接种后 30 d 左右,对豚鼠用牛型结核分枝杆菌 PPD 检测;对鸡用禽型结核分枝杆菌 PPD 检测;对兔用牛型结核和禽型结核分枝杆菌 PPD 检测。如有阳性反应,可剖检其中的半数动物进行病理学观察、细菌培养和涂片镜检。另一半继续观察至 3 个月再剖检观察。如果为阴性反应,可于 40 d 左右剖检其中的半数,观察病理学变化、细菌培养和涂片镜检,另一半继续观察至 3 个月再剖检观察。

D2.2 结果判定

D2.2.1 牛型结核分枝杆菌感染

鸡用禽型结核分枝杆菌 PPD 检测阴性,无任何病变,细菌培养和涂片镜检都未见到结核分枝杆菌。同时从豚鼠和兔检测到结核分枝杆菌。或豚鼠和兔的牛型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验阳性并观察到典型病理变化。

D2.2.2 禽型结核分枝杆菌感染

豚鼠用牛型结核分枝杆菌 PPD 检测阴性,无任何病变,细菌培养和涂片镜检都未见到结核分枝杆菌。同时,从兔和鸡检测到结核分枝杆菌。或兔或鸡的禽型结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验阳性并观察到典型病理变化。

D2.2.3 人型结核分枝杆菌感染

仅从豚鼠检测到结核分枝杆菌。或仅豚鼠的牛结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验阳性并观察到典型病理变化。