

JIEHEBING ZHENDUAN YU FANGZHI JISHU

结核病诊断 与防治技术

付少刚◎主编



黄河出版传媒集团
阳光出版社



付少刚，男，汉族，中共党员，1963年11月出生，1985年7月毕业于宁夏农学院畜牧兽医系兽医专业，大学学历，农学学士，高级兽医师。现任银川市防治重大动物疫病指挥部办公室副主任、银川市奶产业协会副秘书长、银川市畜牧兽医工作站站长。主要研究领域为动物疾病的防控、奶牛结核病的防治、兽医畜牧新技术的推广和管理。先后主持、承担了国家、自治区和银川市“人畜共患病—结核病的研究”、“奶牛副结核病的诊断研究”、“奶牛结核检疫中酶联免疫吸附试验研究与诊断”、“银川市重大动物疫病防控规划”、“结核病的防控规划”等十多个项目课题。发表各类论文及撰写重要科技学术报告三十余篇，主编了《生鲜乳检验监管指南》，参编了《奶牛疾病诊断与防治》。多年来一直从事基层动物疫病防控工作，特别是在奶牛结核病的诊断、防治技术上有丰富的实践经验。

图书在版编目(CIP)数据

结核病诊断与防治技术 / 付少刚主编. — 银川: 阳光出版社, 2010.12

ISBN 978-7-80620-763-5

I. ①结… II. ①付… III. ①牛病: 结核病—诊疗
IV. ①S858.235.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 ②010 第 255636 号

结核病诊断与防治技术

付少刚 主编

责任编辑 景 岚

封面设计 王 莉

责任印制 郭迅生

黄河出版传媒集团 出版发行
阳光出版社

地 址 银川市北京东路 139 号出版大厦(750001)

网 址 www.yrpubm.com

网上书店 www.hh-book.com

电子信箱 nxhhsz@yahoo.cn

邮购电话 0951-5044614

经 销 全国新华书店

印刷装订 宁夏捷诚彩色印务有限公司

印刷委托书号(宁)0006135

开 本	880mm × 1230mm	1/32	印 张	7.75
字 数	220 千		印 数	1000 册
版 次	2010 年 12 月第 1 版		印 次	2010 年 12 月第 1 次印刷
书 号	ISBN 978-7-80620-763-5/S·20			

定 价 28.00 元

版权所有 翻印必究

前言 | QIANYAN |

近年来，全球结核病形势持续恶化，世界上三分之一的人口（约 20 亿）已感染了结核菌，其中有 2000 万属于活动性结核病患者，全球每天有 8000 人死于结核病，每年则达 300 万人。其中，发展中国家占到 98%。中国是全球 22 个结核病高负担的国家之一，结核病人位居世界第二，仅次于印度。全国约有 4 亿人感染结核菌，其中 10% 的人发生了结核病。结核病严重影响到人民的身体健康，已成为严重的公共卫生问题和社会问题。

为使广大畜牧兽医工作者更加了解和准确掌握结核病的相关知识，进一步加强对牛结核病的预防和控制，我们组织编写了《结核病诊断与防治技术》一书，目的是提高兽医工作者对结核病的认识，促进畜牧业健康稳定发展。

全书分为 5 部分：第一部分为结核分枝杆菌研究进展；第二部分为牛结核病病原学与流行病学；第三部分为牛结核病诊断方法与检测技术；第四部分为牛结核病防控措施；第五部分为附录，收录了《牛结核病防治技术规范》《畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程》等法规。



本书在编写过程中,得到各方面的大力支持,阳光出版社及时安排出版并进行精心编辑和设计,我们在此一并表示诚挚的谢意。

由于实际工作经验不足,编写水平有限,书中难免有疏漏和不足之处,敬请专家和广大读者批评指正。

编 者

2010年8月

目录 | CONTENTS |

第一部分 结核分枝杆菌研究进展

第一章 结核分枝杆菌的生物学特点

- 第一节 结核分枝杆菌的分类
- 第二节 结核分枝杆菌的形态
- 第三节 结核分枝杆菌的微细结构及基因组结构
- 第四节 结核分枝杆菌菌体成分与生物活性
- 第五节 结核分枝杆菌的生长代谢
- 第六节 结核分枝杆菌的毒力
- 第七节 结核分枝杆菌的变异性
- 第八节 结核分枝杆菌的抵抗力与消毒
- 第九节 结核分枝杆菌感染实验模型

第二章 结核分枝杆菌耐药性分子机制研究进展

- 第一节 耐利福平与 *rpoB* 基因突变
- 第二节 耐异烟肼与 *katG*、*inhA* 和 *ahpC* 基因突变
- 第三节 耐链霉素与 *rpsL* 和 *rrs* 基因突变
- 第四节 耐乙胺丁醇与 *embB* 突变
- 第五节 耐吡嗪酰胺与 *pncA* 突变
- 第六节 耐喹诺酮类药物与 *gyrA* 和 *gyrB* 基因突变
- 第七节 耐多药结核病的分子基础



第三章 结核分枝杆菌耐药性检测方法的研究进展

第一节 BACTEC 液体培养基法

第二节 噬菌体生物扩增法

第三节 DNA 测序法

第四节 焦磷酸测序技术

第五节 基因芯片技术

第六节 反向系列探针杂交技术

第四章 分枝杆菌菌种鉴定技术的研究进展

第一节 色谱技术

第二节 BACTEC 液体培养基法

第三节 DNA 测序法

第四节 PCR-限制性片段长度多态性分析

第五节 基因芯片技术

第六节 反向系列探针杂交法

第二部分 牛结核病病原学与流行病学

第一章 牛结核病概况

第一节 牛结核病概念

第二节 牛结核病的发生与流行现状

第三节 牛结核与人结核的关系

第二章 牛结核病病原学与免疫机制

第一节 病原形态特征与培养特征

第二节 病原分类

第三节 病原理化特性

第四节 牛结核病免疫机制

第五节 牛结核病发病机理的研究进展

第三章 牛结核病流行病学

第一节 牛结核病传染源

第二节 结核病易感动物

第三节 牛结核病流行特征

第四节 牛结核病的发生与分布

第五节 牛结核病分子病原学分型方法

第三部分 牛结核病诊断方法与检测技术

第一章 牛结核病临床症状及病理变化和初筛

第一节 牛结核病的临床症状

第二节 牛结核病的病理变化

第三节 牛结核病的初筛

第二章 牛结核分枝杆菌实验室操作技术要求

第一节 牛结核分枝杆菌培养技术要求

第二节 牛结核分枝杆菌抗酸染色法技术要求

第三节 牛结核分枝杆菌菌种鉴定试验技术要求

第四节 牛结核分枝杆菌的动物接种试验技术要求

第五节 牛结核分枝杆菌的实验室消毒技术要求

第三章 牛结核病病原学检查

第一节 结核阳性牛病料采集和保存

第二节 显微镜检查

第三节 牛结核分枝杆菌的培养

第四节 分离物的鉴定



第四章 牛结核病血清学检测方法

第一节 酶联免疫吸附试验

第二节 淋巴细胞转化试验

第三节 γ -干扰素试验

第四部分 牛结核病防控措施

第一章 牛结核病防治技术

第一节 牛结核病防控现状

第二节 牛结核病防治技术

第二章 疫情处置

第一节 疫情报告

第二节 疫情处理

附 录

附录一 牛结核病防治技术规范

附录二 实验室生物安全通用要求

附录三 畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程



第一部分

结核分枝杆菌研究进展

第一章 结核分枝杆菌的生物学特点

第一节 结核分枝杆菌的分类

从最早有关结核病的记载到结核杆菌的最终被发现,再到认识的逐渐加深,人类经历了一个漫长的历史过程。

依据生物分类学系统,结核杆菌属于细菌界、厚壁菌门、裂殖菌纲、放线菌目、分枝杆菌科、分枝杆菌属。

自结核杆菌被发现以来,新发现的分枝杆菌属的成员已增加到 100 多种。

根据新版《伯杰细菌鉴定手册》,又将分枝杆菌属菌种分为两大类:一类是在营养丰富的培养基内,在适宜培养温度条件下,接种很稀的新鲜培养物,在 7 天以内,肉眼可见单个菌落者,称为快速生长分枝杆菌;另一类是在 7 天以上者,则为缓慢生长分枝杆菌。麻风分枝杆菌虽然也属于后一类,但在体外不能生长,尚难以用人工方法加以培养。

第二节 结核分枝杆菌的形态

结核分枝杆菌,俗称结核杆菌,杆菌一般多是细长杆菌,形状稍弯曲,两端钝圆,长为 $1\sim 5\mu\text{m}$,宽(厚度)为 $0.2\sim 0.6\mu\text{m}$,呈单个或分枝状排列,无荚膜、无鞭毛、无芽孢。显微镜下可观察到结核



分枝杆菌形态常不典型,可呈多态性。在生长发育时可呈分枝状,排列成V、Y、X等形态。化学药物治疗后,可增加结核分枝杆菌形态多样性出现的机会。

结核分枝杆菌各种形态可进一步归纳为杆状型(基本形态)、球状型(L型)、滤过型、颗粒型四种类型。

一、杆状型(基本形态)

在对临床标本镜检时,除观察到典型杆菌形态外,往往会发现长度、弯曲度各异的结核分枝杆菌的多种形态,甚至出现串珠状、棒状和丝状形态。

二、球状型(L型)

结核杆菌在体内外物理、化学和免疫等多种因素的压力下,维持菌体基本形态的细胞壁会缺陷或丢失,造成发育不全的球状型形态。细胞壁缺陷程度可以是不同的,细胞壁改变最小的是分枝杆菌缺乏型,又称诺卡氏菌样变异型,最早由Steenken氏于1936年在一结核分枝杆菌陈旧性菌落中心发现。对结核杆菌球状型研究较多的是L型菌。这是一种细胞壁成分全部或大部分缺失的细胞壁缺陷型。L型菌一般呈圆球状,同时也存在多种形态。

三、滤过型

1901年,Foutes最早在经细菌滤器过滤的结核杆菌培养液中检查到结核杆菌的滤过型菌。1926年,Calmette等提出结核菌的滤过形式有传染性。研究结果显示,抗痨治疗6个月后可引起结核杆菌菌群性质的变化。此时,病变组织中可出现滤过型。而这些滤过型保持了结核杆菌的遗传信息,能够进行复制,可再次引起结核病。

四、颗粒型

1907年,莫赫(Much)在结核性囊性脓肿、浆液性渗出液、淋巴结等脓液中观察到革兰氏阳性颗粒,称为莫赫颗粒。推测莫赫颗粒是结核分枝杆菌非抗酸性非细胞型体,有感染豚鼠并发育成正常杆菌的能力。

第三节 结核分枝杆菌的微细结构及基因组结构

结核分枝杆菌的细胞结构由细胞壁、细胞膜、细胞质组成。细胞壁骨架由肽聚糖和类脂质连接而成,因此也可认为是革兰氏阳性菌。在电子显微镜下可进一步观察到菌体微细结构。

近年来,发现结核分枝杆菌细胞壁外尚有一层荚膜。一般因制作切片时遭受破坏而不易看到。若在制备电镜标本固定前用明胶处理,可防止荚膜脱水收缩。在电镜下可看到菌体外有一层较厚的透明区,即荚膜,荚膜对结核分枝杆菌有一定的保护作用。

结核分枝杆菌的细胞膜的外层为坚硬的肽聚糖(PG)层。在PG层的外侧,PG与阿拉伯半乳糖(AG)连接。在AG的外侧为分枝菌酸。菌体表面结构的最外层为糖脂,多与分枝菌酸相连。海藻二糖的PCT、AG和分枝菌酸盐复合物(索状因子)也与细胞壁结构相连接。核菌体细胞壁的酰化海藻糖-2'-硫酸盐可能在细菌的毒力上起重要的作用,因为多数有毒力的结核分枝杆菌能产生酸性硫脂,与细菌灭活巨噬细胞中吞噬体的作用有关系。

结核分枝杆菌细胞壁成分之一的阿拉伯甘露糖脂(lipoarabinomannan, LAM),从细胞膜开始一直延伸贯穿整个细胞壁,乃至细菌表面。结核分枝杆菌的LAM的阿拉伯糖末端连接有数个甘



露糖残基。而快速生长的非致病性分枝杆菌 LAM 的阿拉伯糖末端则连接肌醇磷酸盐。末端结构的差异也反映了细菌对巨噬细胞反应上的不同。

1998 年,英国 Sanger 中心和法国 Pasteur 研究所联合报告了结核杆菌 H37Rv 全基因组序列图。该研究表明,结核杆菌基因组大小为 4.4Mbp,包含 4000 多个基因,约 3995 个开放阅读框架,占整个基因组编码容量的 91%,大多数用于编码脂类代谢酶;其中,蛋白质编码基因有 3924 个开发读码框,90%具有潜在编码能力。牛分枝杆菌的全基因组序列于 2003 年完成。基因组序列 4345492bp,平均 G+C 含量为 65.63%,共有 3951 个基因编码蛋白质,包括一个原噬菌体和 42 个插入序列(IS)。令人惊讶的是,基因组在核苷酸水平上的组成排列 99.95%与肺结核分枝杆菌相同,但是遗传信息的缺失已经引起基因组的减小。此外,牛分枝杆菌没有独一无二的基因暗示不同的基因表达可能对人和牛分枝杆菌的宿主取向有重要意义。基因组测序表明牛分枝杆菌有 11 个缺失区,大小从 1kb 到 12.7kb,这些已经通过测序被证实。值得注意的是,在牛分枝杆菌基因序列中包含一个基因座 TbD1,现有的肺结核分枝杆菌菌株的大多数都不含有该基因座。因此,总体上讲,缺失是修整牛分枝杆菌基因组的主要机制。

在牛分枝杆菌和肺结核分支杆菌 H37Rv 间存在着 2437 个单核苷酸多态性 (SNPs),与结核分枝杆菌 CDC1551 间存在着 2423 个单核苷酸多态性 (SNPs)。3 个分枝杆菌同一长度的基因组编码 2504 个蛋白 (CDS) 的比较揭示出,牛分枝杆菌有 1629 个编码序列与结核分枝杆菌 H37Rv 是相同的,1656 个蛋白编码序列与 CDC1551 是相同的。通过对编码 2082 个蛋白序列的比较显示,H37Rv 和 CDC1551 两种结核分枝杆菌菌株没有区别。在所选的编码序列中,与结核分枝杆菌 H37Rv 相比,牛分枝杆菌有 506

个同义和 769 个非同义单核苷酸多态性。与结核分枝杆菌 CDC1551 相比,牛分枝杆菌有 506 个同义和 800 个非同义单核苷酸多态性。这个分析不仅强调了肺结核分枝杆菌复合物成员的基因序列的守恒,也说明牛分枝杆菌与结核分枝杆菌的差异。

在牛分枝杆菌 AF2122/97 和肺结核分枝杆菌 H37Rv 中,存在编码 29 种 PE-PGRS 和 28 种 PPE 蛋白基因的广泛多样性,即一部分基因可能会发生插入或缺失,另一部分基因则会发生移码。因为这些蛋白中有 60% 不同,很明显,大部分基因相同的基因组的剩余部分是不一致的,表明这些基因家族序列具有广泛的多态性,变异来源于选择压力。对牛结核分枝杆菌基因组序列的比较分析说明,牛结核分枝杆菌主要表型特点的遗传依据、遗传信息的缺失是修整基因组的主要方式。

第四节 结核分枝杆菌菌体成分与生物活性

一、脂类

脂质占菌体干重的 20%~40%,占胞壁干重的 60%,主要是磷脂、脂肪酸和蜡质,它们大多与蛋白质或多糖物质结合成复合物而存在。结核菌体脂类含量比其他细菌高,是引起结核病特征性变化与表现的物质基础。脂质含量与细菌毒力相关,毒力强的结核分枝杆菌含脂量最高。

二、多糖

多糖由阿拉伯半乳聚糖、阿拉伯甘露聚糖、甘露聚糖和葡聚糖等组成,多以脂类、蛋白质和核酸等结合形式存在,是免疫反应的重要抗原物质。



三、蛋白质

结核分枝杆菌含多种蛋白质组分,由不同菌体蛋白及活菌在生长过程中分泌于细胞外的多种蛋白组成,是结核菌的主要抗原性物质。结核菌素(OT)、纯蛋白衍生物(PPD)为多种蛋白的复合抗原,可刺激机体免疫应答。

四、核酸

核糖核酸(RNA)含量比脱氧核糖核酸(DNA)高4~5倍。RNA分布于细胞质内,DNA存在于细胞核中。DNA是遗传物质,将遗传信息传给子代,并指导RNA的合成。RNA是蛋白质和其他细胞成分合成所必须的物质。

五、盐类

盐类由钙、钾、镁、铁、磷等构成,约占菌体成分的6%。

第五节 结核分枝杆菌的生长代谢

结核杆菌为专性需氧菌,在体外培养时营养要求高,须在含有蛋黄、马铃薯、甘油和天门冬素等的固体培养基上才能生长。最适pH值为6.5~6.8,最适温度为37℃。在固体培养基上生长缓慢,接种后培养3~4周才出现肉眼可见的菌落。菌落干燥、坚硬,表面呈颗粒状,呈乳酪色或黄色,形似菜花样。在液体培养内呈粗糙皱纹状菌膜生长,若在液体培养基内加入水溶性脂肪酸,如Tween-80,可降低结核杆菌表面的疏水性,使其均匀分散生长,此法有利于做药物敏感实验等。

结核分枝杆菌的新陈代谢包括结核分枝杆菌如何获得营养、如何转化这些营养成分为低分子量的代谢中间产物,然后如何组