

· 特约专稿 ·

牛结核病对人类健康的影响及其诊断方法

贾红*, 鑫婷*, 郭晓宇, 袁维峰, 侯绍华, 朱鸿飞

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100081

摘要:牛结核病是一种非常重要的人畜共患病,其流行不但对畜牧业的发展产生直接影响,而且会通过各种途径感染人类,给公共卫生带来严重威胁。本文主要就牛结核病的发现、与人结核病之间的关系、对人类健康的影响及其目前的诊断方法等进行介绍。

关键词:牛结核病;人结核病;诊断

Bovine tuberculosis and its impact on human health

JIA Hong*, XIN Ting*, GUO Xiao-Yu, YUAN Wei-Feng, HOU Shao-Hua, ZHU Hong-Fei

Institute of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Bovine tuberculosis is a zoonosis with significant impacts on both animal husbandry and public health. The critical events, such as the discovery of bovine tuberculosis, the relationship between human tuberculosis and bovine tuberculosis and the diagnostic methods of bovine tuberculosis, are reviewed.

Key words: Bovine tuberculosis; Human tuberculosis; Diagnosis

牛结核病 (bovine tuberculosis) 主要由结核分枝杆菌复合群 (*Mycobacterium tuberculosis complex*, MTBC) 成员——牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*, *M. bovis*) 引起, 是一种非常重要的人畜共患病, 其特征主要是渐进性消瘦和在患病组织和器官形成结核结节、干酪样病灶和钙化病变^[1]。牛分枝杆菌最易感染牛, 给养牛业带来巨大损失。这不仅影响动物生产性能, 还波及食品供给、国际贸易、收入及社会稳定^[2-4], 而且人吸入含菌气溶胶或食用未经巴氏消毒的牛奶后, 动物结核病可传染给人, 从而威胁人类健康。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 统计资料显示, 虽然目前牛结核病在许多发展中国家得到很好控制, 但仍严重威胁人类健康。WHO、联合国粮农组织 (Food and

Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 和世界动物卫生组织 (Office International des Epizooties, OIE) 将牛结核病划分为被忽视的人畜共患病, 特别是在发展中国家。早在 WHO 专家委员会第 7 次会议报告分析影响结核病流行状况因素时就指出: “除非消灭牛结核病, 否则人结核病的控制将不会成功”, 表明牛结核病是影响人结核病流行的重要因素。本文就牛结核病的发现、与人结核病的关系、对人类健康的影响及其目前诊断方法等进行介绍。

1 牛结核病的发现

1882 年, Robert Koch 在结核病病变组织中分离到致病菌, 并认为世界上只有一种“结核病病菌”;

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (2012AA101302)

通信作者: 朱鸿飞

Corresponding author. ZHU Hong-Fei, E-mail: bioclub@vip.sina.com

* 同为第一作者

但 Theobald Smith 在随后的研究工作中发现,从患结核病的牛和人中分离到的病原菌存在细微差异,可能是 2 种不同的病原菌。最初人们认为从患结核病的人中分离到的结核分枝杆菌对牛的致病性较低,而从患结核病的牛中分离到的牛分枝杆菌对人的致病性也较低。但英国皇家结核病学学会于 1911 年报道指出:牛分枝杆菌不仅可从牛传染给人,还能引起有临床症状的人结核病;牛奶是将结核病传染给人的主要传染源,特别容易经结核病奶牛所产的奶(结核奶)传染给儿童;结核病牛的肉制品传播牛分枝杆菌的危险比预计的小。根据这项研究报道,包括英国在内的发达国家开始重视牛结核病,并着手制定牛结核病根除计划^[5]。

2 牛分枝杆菌感染途径

2.1 牛分枝杆菌感染牛的途径及剂量

牛分枝杆菌主要影响牛的呼吸系统,因此细菌主要从患病动物的肺部以气溶胶形式排泄到体外,含有牛分枝杆菌的气溶胶附着在草场、水槽等地方,健康动物吸入即可能引起感染。研究显示,大多数(60%皮内变态反应阳性)的牛是吸入带菌气溶胶而自然感染的,6~10 个病菌即可引起感染^[6,7]。而消化道感染仅在偶然情况下发生,因为经消化道感染所需的菌量远超过气溶胶感染途径^[8]。

2.2 牛分枝杆菌感染人的途径及剂量

人吸入含菌气溶胶或黏膜和皮肤伤口接触患病动物是牛分枝杆菌感染人的主要途径,而人因食入污染的牛奶、肉制品等而感染牛分枝杆菌的概率主要与当地牛结核病的防控效果、食品卫生措施及人群所处环境有关^[9]。在发达国家,如英国、爱尔兰等,巴氏灭菌法广泛应用于牛奶的消毒,尽管部分牛场的结核病阳性率仍较高,但牛结核病已不再成为威胁城市人健康的主要凶手^[5]。然而,发达国家的家畜养殖业工作人员和农村居民由于经常食用生牛奶或其奶制品,经常接触感染牛,仍受牛结核病的威胁。无论哪种感染途径,牛分枝杆菌感染人的感染剂量还不十分清楚,研究人员估计数十至数百个病原菌即可经呼吸道感染人,而经消化道感染则需上百万个病原菌^[10]。

分枝杆菌耐热,但巴氏消毒法能彻底灭活牛分枝杆菌^[11]。因此,食用未经巴氏消毒的牛奶有被感染的风险^[12]。尽管牛分枝杆菌在牛奶中不会增殖或增殖缓慢,但一头患结核性乳腺炎的奶牛产奶时会释放大量的牛分枝杆菌,足以污染 100 头健康奶牛

的总产奶量^[13,14]。如今,典型的结核结节在乳腺或淋巴结中并不常见。在英国屠宰的全部结核菌素皮内变态反应阳性牛中,仅 0.5%~1.0% 的牛中可见到典型的结核结节^[15]。亚临床感染的结核病牛所产的奶液中每毫升含菌量最高可达 10^3 CFU。另外,挤奶器中的外源性牛分枝杆菌也可污染牛奶。牛分枝杆菌可在由未经巴氏消毒牛奶制成的酸奶和奶油中生存 14 d,在黄油中生存 100 d,也能长期存在于多种由未经巴氏消毒牛奶制成的奶酪中^[16],因此用生奶生产奶油和其他奶制品不安全^[5,16]。牛分枝杆菌对化学消毒剂有较强的抵抗力,耐酸、耐碱,奶酪中 pH 的变化并不会影响其生存。

理论上,食用来自结核病动物的未熟透的肉或生肉及其肉制品也是人感染牛分枝杆菌的途径之一^[5]。早期的动物结核病研究者提倡进行肉品检验、牛的屠宰检验,以淘汰结核病阳性动物的肉产品。如 1893 年有研究发现,人结核病与食用结核病阳性牛的牛肉有关^[5]。然而,食用结核病动物的肉而使人感染牛分枝杆菌的证据并不充分,绝大多数研究都没能从感染动物的肌肉组织分离、培养到牛分枝杆菌,将感染动物的肌肉处理后注射给实验动物也未能引起实验动物发生结核病^[5]。牛分枝杆菌生长非常缓慢,且不能在动物体外增殖(在选择培养基 37 °C 长时间培养方可增殖),而生肉制品的保存期短,且在低温下存放,因此牛分枝杆菌几乎不可能在生肉中增殖;另外,长时间蒸煮也足以杀灭生肉中的牛分枝杆菌,且消化道不是结核病传播的主要途径,需呼吸道感染的千倍剂量方可感染人。这种感染剂量在牛奶中可能存在,但在无结核结节的肌肉中非常少见^[10]。

人经皮肤和黏膜感染牛分枝杆菌非常罕见,主要是挤奶工人、兽医和屠宰场工人在接触结核病阳性牛或其病料过程中,经皮肤、淋巴结或结膜感染牛分枝杆菌^[17,18]。

3 牛分枝杆菌对人类健康的威胁

与结核分枝杆菌相比,牛分枝杆菌有更广泛的宿主,可在自然情况下感染家畜和野生动物,并在相同或不同物种之间传染,但感染人的概率要小一些,也可在人与动物、人与人之间传播^[19-22]。近年来的研究成果显示,相对于结核分枝杆菌而言,人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染患者更易共感染牛分枝杆菌,且发展为活动性结核病,从而将牛分枝杆菌传染给与其密切接触

者^[2,18,23]。另外,发展中国家的绝大部分 HIV 感染患者更易接触到牛分枝杆菌感染牛,在这些国家和地区,结核病已成为 HIV 感染患者最重要的杀手^[2,10,24,25]。

在采用巴氏灭菌法消毒牛奶前,美国 10%~30% 的人结核病病例是由牛分枝杆菌感染所致。1934 年英国奶牛结核状况评估结果表明,40% 以上奶牛感染牛分枝杆菌,其中 0.5% 为结核性乳腺炎,且每年有 2 500 人死于牛结核病,占结核病死亡人数的 6%。

我国 1979、1985、1990 年 3 次全国结核病流行病学调查显示,由牛分枝杆菌引起的结核病占结核病发病总数的 3.8%、4.2% 和 6.4%。国际上一般认为,约 10% 的人结核病由牛分枝杆菌引起,而从儿童患者中分离出的牛分枝杆菌占 33%。我国华中农业大学和哈尔滨兽医研究所都从牛体内分离到人型结核分枝杆菌。1996 年,张高迪等发现牛结核病中有 7% 为结核分枝杆菌感染,而人结核病中 10.6% 为牛分枝杆菌感染。全世界人结核病中有 15% 因饮用结核病牛的奶而导致。

4 牛结核病的防控

4.1 发达国家牛结核病的防控经验

1925 年,英国政府决定淘汰长期咳嗽、消瘦等有结核病临床症状的牛,并对养殖户进行政府补贴。在这项措施下,英国于该年淘汰(宰杀)15 000 头牛,其中 2 500 头产结核奶^[5]。1934 年英国官方报道,超过 40% 的牛感染牛分枝杆菌,0.5% 的牛有结核性乳腺炎,排结核奶,且估计 15%~20% 牛结核病流行地区每年有 2 500 人死于结核病。这表示在 20 世纪 30 年代,英国 6% 的死亡人口是由结核病引起的,因此牛病研究会提出彻底扑杀牛分枝杆菌感染牛是清除牛结核病的唯一正确途径^[5,26]。

1935 年,英国建议牧场自愿参与牛结核病检测和根除计划。1950 年开始,在牛结核病高阳性率的牧场强制执行控制和根除计划,通过每年进行结核菌素皮内变态反应检测、及时淘汰检测阳性牛、政府补贴等手段控制牛结核病。从 1960 年 10 月起,在英国全国范围内推行。结核菌素皮内变态反应阳性牛年淘汰数从 1961 年的 16 984 头(3.5%)降低至 1979 年的 633 头(0.49%)^[5]。

牛分枝杆菌的感染宿主范围广,1970 年发现带菌的獾会将结核病传染给牛。尽管英国政府也采取检测并淘汰结核病阳性獾,但奶牛的结核病新发病

率从 1986 年开始稳步上升^[19-22]。2004 年,英国有 20 000 头牛的结核菌素皮内变态反应呈阳性,占总检测数的 0.43%,比 2000 年增加了 7 072 头^[5]。

虽然英国的牛结核病发病率从 20 世纪 80 年代中期开始升高,但人年均感染率持续下降,这主要得益于英国从 19 世纪 30 年代开始在全国范围内推行牛奶的巴氏灭菌和牧场牛结核病常规检测政策。1938 年,英国伦敦 98% 的牛奶经巴氏灭菌法消毒,5 岁以下儿童因牛分枝杆菌感染的病死率明显降低^[5]。

英国等发达国家通过动物结核病控制和根除计划成功降低了牛结核病的发病率,但根除计划也带来了沉重的经济负担,越来越多的养殖户和纳税人开始质疑根除计划,而且野生动物感染也使彻底根除该病显得尤为困难。

4.2 我国牛结核病的防控现状

20 世纪 40 年代,大量患有结核病的奶牛从国外输入我国,我国牛结核病迅速流行。20 世纪 50 年代,我国曾出现过牛结核病大暴发,1955 年牛结核病阳性率达 36.4%。20 世纪 50~70 年代,牛结核病发病率一直呈缓慢上升的趋势。但随着奶牛业不断发展、养殖规模不断扩大,牛结核病的流行在 70 年代达到了历史最高峰,个别地区阳性检出率高达 67.4%。我国将牛结核病列为法定检疫对象,并且执行牛结核病的控制和根除计划。但由于检测技术耗时费力、财政补偿标准太低、地方与个人承担比例过高、检测人员配置及补贴太低等原因,各地不检或盲报现象比较严重,使得不同机构进行的牛结核病流行病学调查数据有差异,且基本上不公开调查结果,以致我国缺少牛结核病流行现状的准确数据。可以肯定的是,近年来我国牛结核病尤其是奶牛结核病呈上升与蔓延趋势。

5 牛结核病的诊断方法

准确检测牛结核病是根除牛结核病的前提,目前主要依靠以下方法进行诊断:一是基于细菌学的检测方法,如细菌染色涂片镜检、细菌培养和细菌接种易感动物实验等;二是基于免疫学的检测方法,如结核菌素皮内变态反应试验、 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)释放试验和胶体金检测等。这两类诊断方法各有利弊,需综合应用。

5.1 细菌学检测方法

细菌学检测方法主要检测病料中的致病性分枝杆菌,采集结核病阳性牛的肺、肺门淋巴结、肝、脾等

组织,重点采集有典型结核结节的病变区域及病变与健康组织交界区域。将病料涂片后进行齐-尼抗酸染色,光学显微镜检查组织中是否有抗酸杆菌,如果组织内可见抗酸杆菌,并具有典型的结核结节,即可作出初步判断。

无菌采集结核病阳性牛的肺、肺门淋巴结、肝、脾等组织,重点采集有典型结核结节的病变区域及病变与健康组织交界区域;如果没有病变,则重点采集肺门淋巴结、纵隔淋巴结,酸或碱处理并中和后离心,取沉淀物接种于固体选择培养基和液体培养基(改良罗氏培养基或罗氏培养基),37℃连续培养5~7周,见黄色、菜花样的牛分枝杆菌疑似菌落生长时,进行抗酸染色、镜检。

牛分枝杆菌分离和培养是牛结核病诊断的金标准,特异性非常好,但缺乏敏感性,特别是从结核菌素皮内变态反应呈阳性但解剖检查无典型结核结节的个体采集的病料中难以成功分离和培养出牛分枝杆菌。对于有典型结核结节的感染个体,牛分枝杆菌的分离率非常高,可达90%;但对于无结核结节的个体,分离率仅为5%~12%^[27]。因此,无结节、牛分枝杆菌分离和培养结果为阴性时并不能说明结核菌素皮内变态反应阳性(或IFN- γ 释放试验阳性)的个体未感染牛分枝杆菌。在大多数发展中国家及发达国家,细菌培养只在特殊条件下开展,如菌株分型、耐药菌株的流行病学调查等。

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)主要用于对病料中分离、培养的致病性分枝杆菌进行分型等研究。1998年,Ritacco等针对分枝杆菌基因组插入序列IS1311和IS1245中的高度保守区域设计引物,对其限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)进行PCR分析,以鉴别分枝杆菌种属^[28-33]。2011年,Kaur等针对IS900和IS1311基因序列设计引物,对禽分枝杆菌群进行分型鉴定^[34]。2000年Niemann等针对gyrB设计引物,对结核分枝杆菌复合群的菌株进行分型鉴定^[35-38]。针对耐药基因和菌株特异性基因设计引物建立多重PCR方法,可用于耐药菌株的快速诊断和纯培养菌株的分型。针对结核分枝杆菌mpb70特异性基因片段设计的套式PCR能有效检测牛鼻拭子中的牛分枝杆菌,检测率达60%以上,被OIE推荐^[39]。但PCR检测方法技术要求很高,对检测环境要求也较高,且在从病料或痰液中提取基因组过程中可能会造成因PCR扩增效率低和人为污染等分别导致的假阴性和假

阳性。

5.2 免疫学诊断方法

5.2.1 结核菌素皮内变态反应检测

结核菌素皮内变态反应是最早用于诊断牛结核病的方法,是目前OIE推荐、世界上应用最广泛的牛结核病检测的标准方法,也是国际贸易的指定方法。该方法操作简单,易在田间操作。主要操作步骤:在牛颈部上1/3处剃毛,皮内注射纯化牛分枝杆菌结核菌素(purified protein derivative from *Mycobacterium bovis*, PPD-B),通常为2 000 IU/头,由同一工作人员分别在注射前及注射后72 h测量注射部位皮厚,计算皮厚差。皮厚差 >4 mm,判定为结核病阳性;皮厚差 <2 mm,判定为阴性;皮厚为2~4 mm,需在间隔45~60 d后进行第2次皮内变态反应检测,如果第2次检测皮厚差 >2 mm,则判定为结核病阳性。但PPD-B与环境分枝杆菌、禽分枝杆菌有交叉抗原,当牛感染环境分枝杆菌时,皮内注射PPD-B也易出现迟发型变态反应,发生误判。为减少环境分枝杆菌对检测的干扰,欧洲联盟国家采用比较皮内变态反应检测方法,即在牛颈部2个点分别注射PPD-B和纯化禽分枝杆菌结核菌素(purified protein derivative from *Mycobacterium avium*, PPD-A)。PPD-B引起的皮厚差比PPD-A引起的皮厚差 >2 mm,判定为牛结核病阳性。英国就是依靠比较皮内变态反应检测方法从而控制了牛结核病的蔓延^[5]。

虽然结核菌素皮内变态反应检测方法的技术要求不高,可检测出大部分感染病畜,美国、英国采用扑杀结核菌素试验阳性牛的方法控制了牛结核病,但该方法仍存在以下不足之处:①皮肤试验阳性只能表明在过去某一时间曾经发生过致病性分枝杆菌感染(主要是牛分枝杆菌),无法检测是活动性结核还是潜伏期感染。②该方法只能进行活体试验,工作量大,不利于开展大规模的流行病学调查。③该方法重复性不佳,检测结果受主观因素影响较多。④检测人员必须与牛群密切接触,增加了人感染牛分枝杆菌的风险。⑤检测敏感度不够高,免疫力低下病牛易出现假阴性。⑥PPD-B来源于牛分枝杆菌强毒株的培养物,是多种蛋白、脂类、糖的混合物,与环境分枝杆菌存在共同抗原,会在环境分枝杆菌感染个体中引起迟发型变态反应,易引起误判,特别是在副结核病流行的牛场难以准确诊断牛结核病;PPD-B的生产过程中需培养毒力牛分枝杆菌,存在散毒的风险;PPD-B是多种蛋白的混合物,难

以保持成分均一、稳定,只能通过豚鼠实验检测、标定其活性单位来进行质量控制,不同批次的 PPD 可能在抗原含量、种类上存在差异,难以保持不同批次产品质量的稳定性^[40,41]。

为克服结核菌素皮内变态反应检测方法的缺点、提高检测的特异性,科研工作者尝试筛选具有良好 T 细胞刺激活性的牛分枝杆菌特异性抗原,如培养滤过蛋白 10(culture filtrate protein 10, CFP-10) 和 6 kDa 早期分泌抗原靶分子(early secreted antigenic target of 6 kDa, ESAT-6)等,并用其替代 PPD-B 进行皮内变态反应试验。Flores-Villalva 等发现,用 CFP-10 和 ESAT-6 的多肽混合物作为皮内变态反应刺激原检测牛结核病时,特异度可达 97%,但敏感度仅为 76%^[42]。随后研究发现,当用 Rv3615c、Rv2346c 或 Rv3020c 作为 CFP-10 和 ESAT-6 补充抗原进行皮内变态反应试验时,检测敏感度可提高至 87%,且可区分牛分枝杆菌感染牛与卡介苗(bacillus Calmette-Guérin, BCG)免疫牛^[43-45]。由于国际上报道的、基于重组蛋白的皮内变态反应检测方法仅处于实验室研究阶段,实验动物基数偏小,为进一步评价该方法在临床上的检测效果,本课题组建立了基于重组蛋白混合物 CFP-10/ESAT-6/TB10.4 和 CFP-10/ESAT-6/Rv3872/MPT63 的皮内变态检测方法,检测了 1 097 头牛。结果表明,基于重组蛋白的皮内变态检测方法可有效区分副结核病牛与牛分枝杆菌感染牛,且具有良好的敏感度(92%)和特异度(97%),有临床应用的潜力^[46]。

5.2.2 IFN- γ 释放试验 1990 年,Wood 等发现牛分枝杆菌致敏的外周血 T 细胞在体外培养条件下再次被牛分枝杆菌抗原刺激时会释放大量的 IFN- γ ,从而创建了牛 IFN- γ 释放试验的检测方法^[47,48]。1989~1990 年,研究工作者在新西兰、澳大利亚和西班牙等国家通过大规模临床试验证实,IFN- γ 释放试验可作为 PPD 皮肤试验的补充,1991 年这些国家批准了 IFN- γ 释放试验用于牛结核病检测^[49]。

该方法的主要操作步骤:采集牛的肝素锂抗凝血,分装至 24 孔细胞培养板,分别加入 PPD-B、PPD-A 和磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS),孵育 24 h 后收集血浆,用 IFN- γ 定量试剂盒检测血浆样品中 IFN- γ 含量。如果 PPD-B 与 PPD-A 刺激孔的光密度(optical density, OD)差值 >0.1 ,同时 PPD-B 与 PBS 刺激孔的 OD 差值也 >0.1 ,表明该动物结核病检测为阳性。

该方法与结核菌素皮肤试验都以 PPD-B 为刺激原,并不能区分牛分枝杆菌感染牛与 BCG 免疫牛。虽然 PPD-A 作为检测对照的刺激原,可排除部分禽分枝杆菌感染牛,但在牛分枝杆菌和禽分枝杆菌共感染的流行地区,PPD-B 与 PPD-A 刺激后的血浆样品中 IFN- γ 含量均很高,其差值很可能 <0.1 ,从而导致漏检与误判,不能有效诊断牛结核病。另外,目前商品化试剂盒检测阈值(cutoff)的设定主要是根据西班牙、澳大利亚和新西兰大规模临床试验的检测数据,这些地区的牛结核病控制较好,发病率较低,与高发病率地区的阈值可能不同。因此,在应用该试剂盒进行牛结核病诊断时,应在检测地范围内进行大规模的临床试验,以获得适宜检测地的阈值。

为提高检测的特异性,科研工作者利用 RD1 区的 CFP-10/ESAT-6 蛋白或多肽作为刺激原^[50],检测特异度可达 100%,但有 15%~30% IFN- γ 释放试验检测为阳性的个体呈阴性反应,因此需进一步筛选重组蛋白刺激原以提高检测的敏感度。总之,IFN- γ 释放试验的数据客观、特异性好、对牛刺激小,是很有应用前景的牛结核病诊断方法。但基于结核菌素或重组蛋白的 IFN- γ 释放试验在发展中国家难以大规模应用,因为该方法需在专业的实验室环境中操作,血样必须在 16 h 内送至实验室进行检测,进口检测试剂盒价格昂贵,包括中国在内的很多发展中国家的中小型养殖企业、养殖户难以承担,目前仅局限于实验室检测使用。我国也有很多单位在研制具有自主知识产权的牛 IFN- γ 检测试剂盒,但目前尚无产品上市。

5.2.3 抗体检测方法 尽管许多疾病可依靠检测血液中的抗原或抗体得到有效诊断,但结核病的血清学诊断仍是难点。最常用的血清学检测方法是建立在侧向迁移或穿透迁移的快速免疫层析法(immunochromatographic assay, ICA)或酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。

1946 年,Raffel 等陆续报道了体液免疫在结核病进程中的作用及其在诊断中的意义^[51]。近年来,应用 ELISA 检测抗体也比较广泛,尤其是在具有结核病病史的牛场,对感染中、后期的牛具有检测意义。目前,世界上用于结核病血清学检测的抗原主要有 PPD、MPB64、Ag85 复合物、MPB70、38 kDa 蛋白、蛋白多肽等^[52-57]。Redchuk 等用 MPB63 和 MPB83 建立的间接 ELISA 检测方法可鉴别诊断牛

分枝杆菌感染与环境分枝杆菌感染,与皮内变态反应试验和 IFN- γ 释放试验相比,ELISA 成本更低、检测速度更快、操作更方便,适用于大规模检测。我国也有类似的抗体检测试剂盒和胶体金检测试纸条上市。

血清学诊断方法的优点是方便、简单、高阴性预测值及经济适用。然而,由于机体会产生针对环境分枝杆菌的抗体,抗体检测易出现假阳性,且难以区分结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌感染。由于以上原因,尽管血清学检测方法非常方便,但尚未被国际结核病研究组织推荐使用,且目前已建立的血清学检测方法不能提供足够的敏感度和特异度数据,不建议作为一线检测手段^[58-61]。比较感染实验(包括禽分枝杆菌、牛分枝杆菌、副结核分枝杆菌和假结核棒状杆菌的感染动物)证实,MPB70 ELISA 的特异度为96.1%,而以 MPB70 进行的 IFN- γ 释放试验的特异度和敏感度分别达99.1%和81.8%^[62],显示了 ELISA 检测的高敏感度和高特异度特点。

6 结语

牛结核病是一种非常重要的人畜共患传染病,严重威胁人类健康,特别是对发展中国家产生重大危害。消灭人结核病首先要控制牛结核病。世界各国牛结核病防控的基本策略都是“检测-扑杀”,大多数国家仍沿用结核菌素皮内变态反应进行检测。目前世界各国都在致力于研究和开发灵敏度高、特异度好的检测新技术和新方法,有的已在生产实践中试用和推广,但仍缺少敏感、快速、特异、简便和适合大规模使用的方法,特别是缺少能区分结核病不同感染时期的检测方法。因此,应加大对牛结核病防控的研究,不但对推动养牛业的健康发展具有重大作用,而且对保障全人类的健康也具有重大意义。

参考文献

- [1] Smith NH, Kremer K, Inwald J, Dale J, Driscoll JR, Gordon SV, van Soolingen D, Hewinson RG, Smith JM. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex [J]. *J Theor Biol*, 2006, 239(2): 220-225.
- [2] Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries [J]. *Emerg Infect Dis*, 1998, 4(1): 59-70.
- [3] Renwick AR, White PC, Bengis RG. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host-pathogen system [J]. *Epidemiol Infect*, 2007, 135 (4): 529-40.
- [4] Davies PD. Tuberculosis in humans and animals: are we a threat to each other [J]? *J R Soc Med*, 2006, 99 (10): 539-540.
- [5] de la Rúa-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2006, 86 (2): 77-109.
- [6] Phillips CJ, Foster CR, Morris PA, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle [J]. *Res Vet Sci*, 2003, 74 (1): 1-15.
- [7] Dean GS, Rhodes SG, Coad M, Whelan AO, Cockle PJ, Clifford DJ, Hewinson RG, Vordermeier HM. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle [J]. *Infect Immun*, 2005, 73 (10): 6467-6471.
- [8] Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2001, 81 (1-2): 79-86.
- [9] Grange JM, Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection [J]. *Vet Microbiol*, 1994, 40 (1-2): 137-151.
- [10] O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review [J]. *Tuber Lung Dis*, 1995, 76(Suppl 1): 1-46.
- [11] Stabel JR, Steadham EM, Bolin CA. Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective [J]? *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63 (12): 4975-4977.
- [12] Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. in milk by pasteurization [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1996, 22 (3): 253-256.
- [13] Palmer MV, Waters WR, Whipple DL. Milk containing *Mycobacterium bovis* as a source of infection for white-tailed deer fawns (*Odocoileus virginianus*) [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2002, 82 (4-5): 161-165.
- [14] Pérez A, Reniero A, Fortois A, Meregalli S, López B, Ritacco V. Study of *Mycobacterium bovis* in milk using bacteriological methods and the polymerase chain reaction [J]. *Rev Argent Microbiol*, 2002, 34 (1): 45-51.
- [15] Goodchild AV, Clifton-Hadley RS. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* [J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2001, 81 (1-2): 23-41.
- [16] Spahr U, Schafroth K. Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67 (9): 4199-4205.
- [17] Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis* [J]. *Tuber Lung Dis*, 1996, 77 (2): 103-108.
- [18] Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals [J]. *Rev Sci Tech*, 2001, 20 (1): 325-337.
- [19] Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in

- domestic livestock [J]. *Rev Sci Tech*, 2001, 20(1): 71-85.
- [20] de Lisle GW, Mackintosh CG, Bengis RG. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer [J]. *Rev Sci Tech*, 2001, 20 (1): 86-111.
- [21] Delahay RJ, De Leeuw AN, Barlow AM, Clifton-Hadley RS, Cheeseman CL. The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK wild mammals; a review [J]. *Vet J*, 2002, 164 (2): 90-105.
- [22] Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections [J]. *Vet Microbiol*, 1994, 40 (1-2): 153-177.
- [23] Grange JM, Daborn C, Cosivi O. HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* [J]. *Eur Respir J*, 1994, 7(9): 1564-1566.
- [24] Kovalyov G. On human tuberculosis due to *M. bovis*. A review [J]. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, 1989, 33 (2): 199-206.
- [25] Collins CH. The bovine tubercle bacillus [J]. *Br J Biomed Sci*, 2000, 57 (3): 234-240.
- [26] Hardie RM, Watson JM. *Mycobacterium bovis* in England and Wales; past, present and future [J]. *Epidemiol Infect*, 1992, 109 (1): 23-33.
- [27] Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The growing burden of tuberculosis; global trends and interactions with the HIV epidemic [J]. *Arch Intern Med*, 2003, 163 (9): 1009-1021.
- [28] Johansen TB, Djonje B, Jensen MR, Olsen I. Distribution of IS1311 and IS1245 in *Mycobacterium avium* subspecies revisited [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (5): 2500-2502.
- [29] Dvorska L, Bartos M, Ostadal O, Kaustova J, Matlova L, Pavlik I. IS1311 and IS1245 restriction fragment length polymorphism analyses, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium* complex isolates obtained from a human immunodeficiency virus-negative patient [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40 (10): 3712-3719.
- [30] Keller AP, Beggs ML, Amthor B, Bruns F, Meissner P, Haas WH. Evidence of the presence of IS1245 and IS1311 or closely related insertion elements in nontuberculous mycobacteria outside of the *Mycobacterium avium* complex [J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40 (5): 1869-1872.
- [31] Tirkkonen T, Pakarinen J, Rintala E, Ali-Vehmas T, Marttila H, Peltoniemi OA, Mäkinen J. Comparison of variable-number tandem-repeat markers typing and IS1245 restriction fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* from human and porcine origins [J]. *Acta Vet Scand*, 2010, 52: 21.
- [32] Thibault VC, Grayon M, Boschioli ML, Hubbans C, Overduin P, Stevenson K, Gutierrez MC, Supply P, Biet F. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45 (8): 2404-2410.
- [33] Ritacco V, Kremer K, van der Laan T, Pijnenburg JE, de Haas PE, van Soolingen D. Use of IS901 and IS1245 in RFLP typing of *Mycobacterium avium* complex: relatedness among serovar reference strains, human and animal isolates [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1998, 2 (3): 242-251.
- [34] Kaur P, Folia G, Singh SV, Patil PK, Ravi Kumar GV, Sandhu KS. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: IS900 PCR identification and IS1311 polymorphism analysis from ruminants in the Punjab region of India [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2011, 34 (2): 163-169.
- [35] Goh KS, Fabre M, Huard RC, Schmid S, Sola C, Rastogi N. Study of the *gyrB* gene polymorphism as a tool to differentiate among *Mycobacterium tuberculosis* complex subspecies further underlines the older evolutionary age of '*Mycobacterium canettii*' [J]. *Mol Cell Probes*, 2006, 20 (3-4): 182-190.
- [36] Abass NA, Suleiman KM, El Jalii IM. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by their *GyrB* polymorphism [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2010, 28 (1): 26-29.
- [37] Niemann S, Harmsen D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38 (9): 3231-3234.
- [38] Chimara E, Ferrazoli L, Leão SC. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004, 99 (7): 745-748.
- [39] Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30 (1): 255-258.
- [40] Hope JC, Thom ML, Villarreal-Ramos B, Vordermeier HM, Hewinson RG, Howard CJ. Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle [J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 141 (3): 432-439.
- [41] von Reyn CF, Horsburgh CR, Olivier KN, Barnes PF, Waddell R, Warren C, Tvaroha S, Jaeger AS, Lein AD, Alexander LN, Weber DJ, Tosteson AN. Skin test reactions to *Mycobacterium tuberculosis* purified protein derivative and *Mycobacterium avium* sensitin among health care workers and medical students in the United States [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2001, 5 (12): 1122-1128.
- [42] Flores-Villalva S, Suárez-Güemes F, Espitia C, Whelan AO, Vordermeier M, Gutiérrez-Pabello JA. Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19 (5): 797-803.
- [43] Jones GJ, Whelan A, Clifford D, Coad M, Vordermeier HM. Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19 (4): 620-622.
- [44] Casal C, Bezos J, Díez-Guerrier A, Álvarez J, Romero B, de Juan L, Rodríguez-Campos S, Vordermeier M, Whelan

- A, Hewinson RG, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon-gamma assay for diagnosis of bovine tuberculosis [J]. *Prev Vet Med*, 2012, 105 (1-2): 149-154.
- [45] Lyashchenko K, Manca C, Colangeli R, Heijbel A, Williams A, Gennaro ML. Use of Mycobacterium tuberculosis complex-specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis [J]. *Infect Immun*, 1998, 66 (8): 3606-3610.
- [46] Xin T, Jia H, Ding J, Li P, Yang H, Hou S, Yuan W, Guo X, Wang H, Liang Q, Li M, Wang B, Zhu H. Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(4): 482-490.
- [47] Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon [J]. *Res Vet Sci*, 1990, 49 (1): 46-49.
- [48] Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle [J]. *Aust Vet J*, 1990, 67 (4): 134-137.
- [49] Lilenbaum W, Schettini JC, Souza GN, Ribeiro ER, Moreira EC, Fonseca LS. Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil [J]. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1999, 46 (5): 353-358.
- [50] Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A, Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10 [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2001, 5 (5): 462-467.
- [51] Chambers MA, Waterhouse S, Lyashchenko K, Delahay R, Sayers R, Hewinson RG. Performance of TB immunodiagnostic tests in Eurasian badgers (*Meles meles*) of different ages and the influence of duration of infection on serological sensitivity [J]. *BMC Vet Res*, 2009, 5: 42.
- [52] Boadella M, Lyashchenko K, Greenwald R, Esfandiari J, Jaroso R, Carta T, Garrido JM, Vicente J, de la Fuente J, Gortázar C. Serologic tests for detecting antibodies against Mycobacterium bovis and Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Eurasian wild boar (*Sus scrofa scrofa*) [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2011, 23(1): 77-83.
- [53] Lin M, Sugden EA, Jolley ME, Stilwell K. Modification of the Mycobacterium bovis extracellular protein MPB70 with fluorescein for rapid detection of specific serum antibodies by fluorescence polarization [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1996, 3 (4): 438-443.
- [54] Wang BL, Xu Y, Li ZM, Xu YM, Weng XH, Wang HH. Antibody response to four secretory proteins from Mycobacterium tuberculosis and their complex antigen in TB patients [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2005, 9 (12): 1327-1334.
- [55] López Y, Yero D, Falero-Diaz G, Olivares N, Sarmiento ME, Sifontes S, Solis RL, Barrios JA, Aguilar D, Hernández-Pando R, Acosta A. Induction of a protective response with an IgA monoclonal antibody against Mycobacterium tuberculosis 16kDa protein in a model of progressive pulmonary infection [J]. *Int J Med Microbiol*, 2009, 299(6): 447-452.
- [56] Raju R, Suneetha S, Sagili K, Meher VC, Saraswathi V, Satyanarayana AV, Suneetha LM. Diagnostic role of the antibody response to the 38kDa, 16kDa proteins and lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis [J]. *Indian J Clin Biochem*, 2005, 20(1): 123-128.
- [57] Uma Devi KR, Ramalingam B, Raja A. Antibody response to Mycobacterium tuberculosis 30 and 16kDa antigens in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003, 46 (3): 205-209.
- [58] Deng S, Yuan T, Xia J, Huang H, Cheng X, Chen M. Clinical utility of a combination of lipoarabinomannan, 38-kDa, and 16-kDa antigens as a diagnosis tool for tuberculosis [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 71 (1): 46-50.
- [59] Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, Schiller I, Laal S, Ramsay A, Hopewell PC, Pai M. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS Med*, 2011, 8(8): e1001062.
- [60] Steingart KR, Ramsay A, Pai M. Commercial serological tests for the diagnosis of tuberculosis: do they work [J]? *Future Microbiol*, 2007, 2 (4): 355-359.
- [61] Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, Cunningham J, Weldingh K, Pai M. A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis [J]. *Postgrad Med J*, 2007, 83(985): 705-712.
- [62] Chambers MA, Pressling WA, Cheeseman CL, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG. Value of existing serological tests for identifying badgers that shed Mycobacterium bovis [J]. *Vet Microbiol*, 2002, 86 (3): 183-189.

(收稿日期:2013-11-15)