ICS 11.220
CCS B 41

团　　　　体　　　　标　　　　准

T/CVMA 271—2025

牛源疣状毛癣菌检验技术规范

Technical specifications for testing *Trichophyton verrucosum* in *Bovine*

2025 - 7 - 10 发布　　　　2025 - 7 - 10 实施

中国兽医协会　　发布

前　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由四川农业大学动物医学院提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：四川农业大学、四川省动物疫病预防控制中心、四川省畜牧科学研究院、广元市动物疫病预防控制中心、四川水利职业技术学院、宁夏农林科学院、四川省阳平种牛场、华中农业大学。

本文件主要起草人：马晓平、李志国、王娅、左之才、谢跃、陈冬、王之盛、易军、王巍、侯志乾、张坤、苟丽萍、姜尧章、杨超、郭亚男、郭红瑞、曾伟、谭雄、李青、李健、孙思莉、唐都、庞权、杨彪、蒋丽春、冯莹、胡长敏。

牛源疣状毛癣菌检验技术规范

1 范围

本文件规定了牛源疣状毛癣菌临床诊断、实验室诊断及综合判定的技术要求。

本文件适用于牛源疣状毛癣菌皮肤真菌病的检测和诊断。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

疣状毛癣菌皮肤癣病 *Trichophyton verrucosum* for bovine dermatophytosis

疣状毛癣菌（*Trichophyton verrucosum*）侵入牛皮肤、黏膜及其附属物器（毛发、爪等），引起牛的一种感染性疾病，其感染具有人畜共患，小规模流行的特征。患病动物是本病的传染源，主要因接触而传染，也可通过被污染的用具或饲养管理人员等间接接触途径传染，一年四季均可发生，尤其集中在秋冬季节。

3.2

初步诊断 preliminary diagnosis

根据患病家畜出现临床症状或病征，通过初步观察、检查和分析，快速判断可能的疾病类型，需通过病原学检测等科学手段验证。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BPC：溴甲芬紫酪蛋白牛奶肌醇（Bromophenol Purple Casein Milk Inositol）

DMSO：二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide）

DTM：皮癣菌鉴别培养基（Dermatophyte Test Medium）

SDA：沙氏葡萄糖琼脂（Sabouraud Dextrose Agar）

5 仪器、材料、试剂和培养基

5.1 仪器

5.1.1 超净工作台。

5.1.2　PCR 仪。

5.1.3　光学显微镜。

5.1.4　高压蒸汽灭菌锅。

5.1.5　电泳仪。

5.1.6　全自动凝胶成像系统。

5.1.7　 培养箱。

5.1.8　微量移液器。

5.1.9　6.00 mm 圆形打孔器。

5.1.10　直径 2 cm，高 0.5 cm 环壁带有小孔的铜环。

5.2　材料

5.2.1　离心管。

5.2.2　手术刀片。

5.2.3　棉球。

5.2.4　培养皿。

5.2.5　载玻片。

5.2.6　盖玻片。

5.2.7　1 mL 滴管。

5.2.8　酒精灯。

5.2.9　石蜡。

5.2.10　0.5 mL、1 mL 注射器。

5.3　试剂

5.3.1　75 %酒精。

5.3.2　生理盐水。

5.3.3　蒸馏水。

5.3.4　甘油。

5.3.5　改良复方 KOH 溶液制备见附录 A.1。

5.3.6　Goldview 染色剂。

5.3.7　琼脂糖。

5.3.8　棉兰染液。

5.4 培养基

5.4.1 SDA 培养基配制见附录 A.2。

5.4.2 改良的 SDA 培养基配制见附录 A.3。

5.4.3 DTM 培养基配制见附录 A.4。

6 临床诊断

6.1 临床症状

牛感染疣状毛癣菌后，病牛表现为瘙痒、环形脱毛及皮肤炎症，病灶多见于头部和躯干侧面。成年牛和犊均可感染疣状毛癣菌，重症病例可见全身弥漫性脱毛结痂。

6.2 初步诊断

若患病牛只呈现附录B中规定的局部或全身性感染典型临床症状，应作为初步诊断的判定依据。

7 实验室诊断

7.1 常规检测

7.1.1 样品采集

从发病的牛场选择有典型皮肤真菌病的牛，使用75%酒精棉球涂擦患部消毒，取无菌手术刀片刮取病变与健康皮肤组织交界处的皮屑、痂皮和被毛等病料，放入无菌的离心管中于4 ℃～8 ℃运输与保存。

7.1.2 病料显微镜检查（改良的 KOH 法）

取少量病料（皮屑、被毛等），放在清洗干净的载玻片上，用1 mL滴管滴加改良复方KOH溶液1～2滴，加盖玻片，用滤纸吸净周边溢液，在显微镜下镜检。

结果判断：对同一病料样本进行连续三次重复检测，按照附录C中C.1的结果，若任一次显微观察中检出特征性菌丝及孢子形态结构，则判定为阳性；三次重复检测均未观察到上述形态特征者，则判定为阴性。

7.1.3 病原菌的分离纯化与形态观察

将采集的病料接种于改良的SDA培养基或皮癣菌鉴别培养基，放入28 ℃真菌培养箱培养7 d。对生长出的真菌菌落，挑取单个菌落于SDA分离纯化。将分离纯化后得到的菌株置于SDA培养基28 ℃培养7 d～14 d，然后使用直径为6.00 mm的圆形打孔器经火焰灼烧除菌冷却后对纯化后培养得到的菌落进行打孔取菌苔，并将其置于另一个SDA培养基平板中心，28 ℃培养7 d～14 d，观察菌落的表型。

挑取分离株菌落于生理盐水配制成1×10^{6} CFU/mL的菌悬液。准备无菌培养皿，放入火焰灼烧灭菌的载破片，将铜环于酒精灯外焰上灼烧后放入石蜡，利用石蜡融化产生的粘性将载玻片和铜环固定在一起，立即取干净盖玻片火焰灼烧灭菌后覆盖，形成密闭空间。用1 mL的注射器将温度约50 ℃的SDA培养基0.5 mL从小孔中注入后略倾斜，待其冷却凝固后，使用0.5 mL的注射器将孢子悬液0.1 mL注入铜环内的培养基表面，石蜡封铜环侧面小孔。盖上无菌的培养皿盖，放入28 ℃培养箱中培养，7 d后小心取盖玻片上长满的菌丝和孢子经棉兰染色后，镜检观察微孢子和菌丝形态。

结果判断：当待测菌落呈现附录C中C.2～C.3规定的典型菌落形态特征及对应菌体形态学特征时，判定为阳性；未观察到符合上述形态学特征者，则判定为阴性。

7.1.4 理化特性检测

将分离株菌落转种在BPC培养基上。

结果判断：当出现附录C中C.4的清楚宽阔的水解带，判定为阳性；未观察到符合上述现象，则判定为阴性。

7.2 分子生物学检测技术

7.2.1 基因组 DNA 提取

使用真菌基因组DNA快速抽提试剂盒提取。

7.2.2 引物合成

参照GenBank中疣状毛癣菌天冬酰胺酶家族蛋白基因序列设计特异性引物（预期扩增片段大小581bp）：

上游引物F：5’-CAGGGGGGTCCAGGTGTAT-3’

下游引物R：5’-CGTTGAGATGGCAAGTGTT-3’

7.2.3 PCR 反应体系和反应程序

PCR反应总体系为25 μL，其中包括Premix Taq （Ex Taq Version 2.0）12.5 μL，上下游引物各1 μL，ddH_2O 8.5 μL，DNA模板2 μL。PCR反应程序：94℃ 10 min，94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 70 s 30次循环后72℃延伸5 min。取5 μL PCR产物及5 μL DNA标准Marker，加入1.2%琼脂糖凝胶板的孔内，经120 V电泳，电泳20 min，于紫外凝胶成像仪或凝胶成像系统中观察结果。

7.2.4 结果判断

待检样本PCR扩增产物经电泳分析后，显示附录D中的581 bp特征性目的条带，则判定为阳性；未观察到该特异性条带，则判定为阴性。

8 综合判定

根据6～7的临床诊断、常规检测和分子生物学检测结果，可综合判定为牛疣状毛癣菌病。

附 录 A
（资料性）
标准中涉及的试剂和培养基配制

A.1 改良复方KOH溶液

称取15 g KOH溶于30 mL蒸馏水后，依次加入40 mL DMSO、20 mL甘油，摇匀后加入蒸馏水至1000 mL，混匀后配制而成。

A.2 SDA培养基

称取40 g葡萄糖、10 g蛋白胨、15 g琼脂溶于1 L蒸馏水，121℃高压灭菌15min。

A.3 改良的SDA培养基

称取40 g葡萄糖、10 g蛋白胨、15 g琼脂溶于1 L蒸馏水，121 ℃高压灭菌15 min，冷却至50 ℃时，加入0.2 mg/mL氯霉素、0.25 mg/mL放线菌酮。

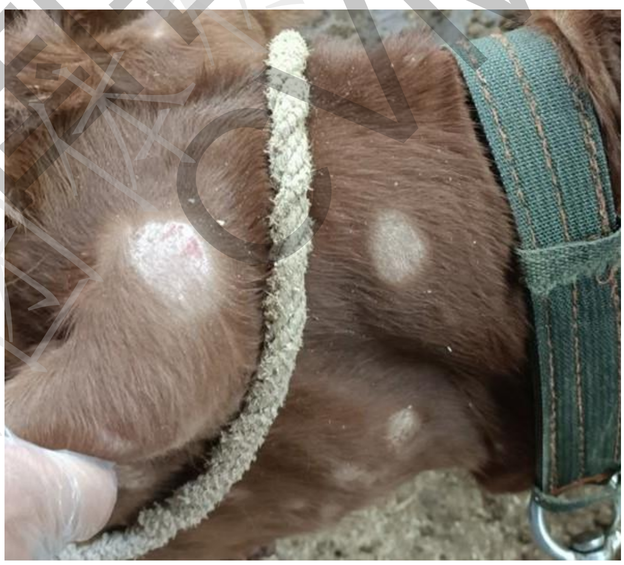
A.4 DTM培养基

称取10 g葡萄糖、10 g蛋白胨、15 g琼脂、6 g 0.8 mol/L盐酸溶于1 L蒸馏水，121℃高压灭菌15 min，冷却至50 ℃时，0.2 g酚红、0.5 g放线菌酮、0.1 g庆大霉、0.125 g氯霉素。

附 录 B
（资料性）
肉牛皮肤癣菌病临床症状示意图

肉牛面部、颈部、耳部、颊部、躯干部皮肤癣临床症状示意图依次见图B.1～图B.4。

图B.1 面部及眼周感染



图B.2 耳根部、颈部感染

图B.3 耳部、颊部感染

图B.4 肩部感染

附 录 C
（资料性）
常规检测

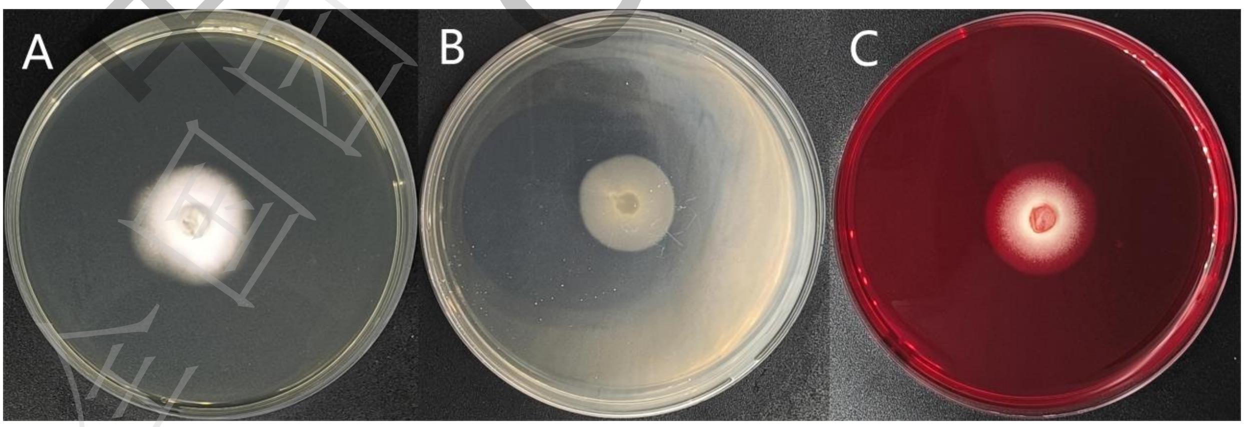
C.1 病料显微镜检查

可直接显微镜下观察到毛发上形成疣状毛癣菌的菌丝见图C.1。

图 C.1 在显微镜下毛发上形成疣毛癣菌的菌丝形态

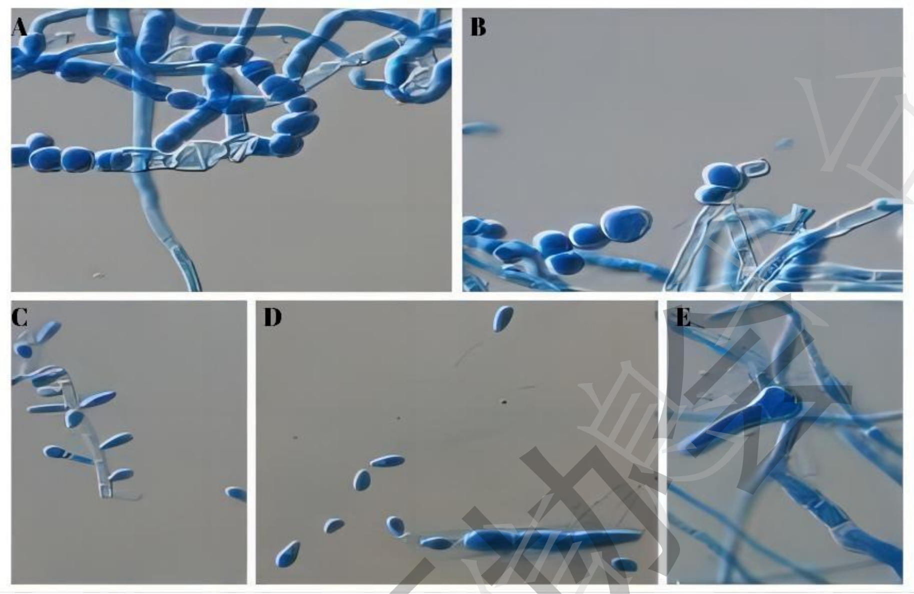
C.2 形态学鉴定

疣状毛癣菌在SDA培养基上生长非常缓慢，培养14 d，可见中心隆起、外围扁平的纽扣状白色蜡状菌落，菌丝浸没生长见图C.2 A，背面无色素见图C.2 B；疣状毛癣菌在DTM培养基上生长，会导致培养基由橙黄色变为玫红色见图C.2 C。通过铜环培养法可在光学显微镜观察到链状孢子结构见图C.3 A/B、粘附在分枝菌丝上呈卵球形的小孢子见图C.3 C和表面光滑呈棍棒状的大孢子见图C.3 D/E。



A：疣状毛癣菌菌落正面；B：疣状毛癣菌菌落背面；C：疣状毛癣菌在DTM培养基菌落

图C.2 疣状毛癣菌菌落形态



A/B：典型链状孢子结构；C：微分生孢子；D/E：大分生孢子

图 C.3 疣状毛癣菌微观结构

C.3 理化特性检测

可在菌落周围观察到清楚宽阔的水解带见图C.4。

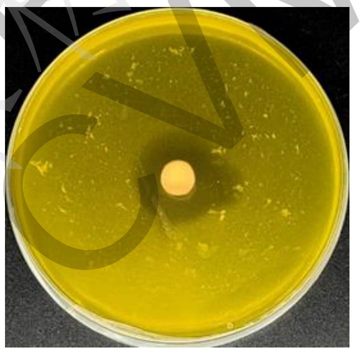
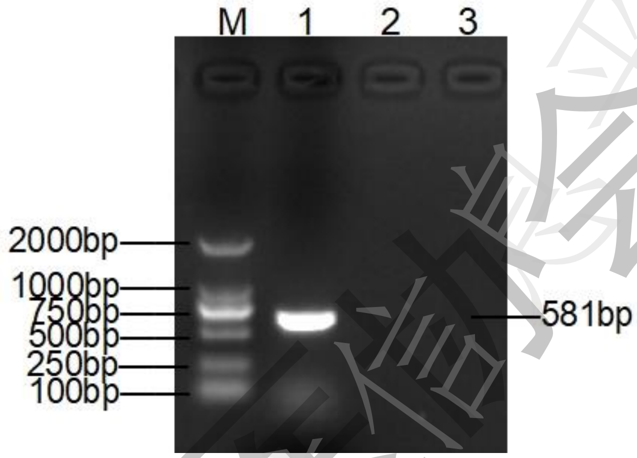


图 C.4 理化特性检测示意图

附 录 D
（规范性）
PCR 检测结果示意图

阳性对照出现581 bp扩增条带，阴性对照和空白对照未出现目的条带。



标引序号说明：

M——DL2000 标准分子量（TakaRa）;

1——标准阳性扩增结果；

2——阴性对照；

3——空白对照。

图 D.1 PCR方法标准阳性扩增结果示意图