ICS 11.220
B 41

NY

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 563—2002

# 禽霍乱(禽巴氏杆菌病)诊断技术

**Diagnostic techniques for fowl cholera (avian pasteurellosis)**

2002-08-27 发布　　2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

# 前　言

禽霍乱(fowl cholera)，又名禽巴氏杆菌病(avian pasteurellosis)，是由多杀性巴氏杆菌引起的家畜和野禽的接触传染性疫病。本病呈现急性败血症变化，其发病率和死亡率很高，对养禽业危害严重，被世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英)，Office Intentional des Epizootic(法)，OIE]定为B类动物疫病，我国列为二类动物疫病。

本标准在主要诊断技术方面与OIE《诊断试验和疫苗手册》(2000年版)第2.7.11条的规定是一致的。但也有以下差异：

- OIE《手册》2.7.11条对具体操作程序未作详细描述，本标准则根据实践经验规定了具体操作程序；
- 本标准未完全采用其他推荐性技术。

本标准的附录A、附录B为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化委员会归口。

本标准起草单位：中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人：曲连东、吴东来。

# 禽霍乱(禽巴氏杆菌病)诊断技术

## 1 范围

本标准规定了禽霍乱的诊断技术要求。

本标准适用于鸡、鸭、鹅等禽霍乱的诊断和检疫。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB 4789.28—1994 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

## 3 初步诊断

根据典型症状和病变，以及在显微镜下检查组织涂片发现的两极染色的杆菌，可初步诊断本病。但确诊应依靠病原分离鉴定。

### 3.1 症状

#### 3.1.1 急性型症状

最初出现禽群中一些禽只突然死亡，随后即出现另外禽只发热、厌食、抑郁、流涎、腹泻、羽毛粗乱、呼吸困难，临死前出现发绀。

#### 3.1.2 慢性症状

急性型耐过的或由弱毒菌株感染的禽只可呈慢性型病程，其特征为局部感染，在关节、趾垫、腱鞘、胸骨粘液囊、眼结膜、肉垂、喉肺、气囊、中耳、骨髓、脑膜等部位呈现纤维素性化脓性渗出、坏死或不同程度的纤维化。

### 3.2 病理变化

急性型的病变主要是被动性充血、出血，肝、脾肿大和局灶性坏死，肺炎、腹腔和心包液增多。慢性型主要是局灶部纤维素化脓性渗出、坏死和纤维化。

### 3.3 病料涂片检菌

#### 3.3.1 抹片的制备

用镊子夹持病变组织肝或脾，然后以灭菌剪刀剪取小块，夹出后将其新鲜切面在载玻片上压印或涂抹成薄层；若取血液，用灭菌剪刀剪开心脏进行蘸取或剪取凝血块，用新鲜切面在载玻片上压印或涂抹成薄层。

#### 3.3.2 干燥

自然干燥。

#### 3.3.3 固定

将干燥好的抹片，涂抹面向上，以其背面在酒精火焰上来回通过数次，略作加热进行固定。

#### 3.3.4 革兰氏染色法

固定好的抹片上滴加草酸铵结晶紫色液，染色 2min→水洗→加革兰氏碘溶液于抹片上媒染 2 min→水洗→加 95%酒精于抹片上脱色 1 min→水洗→加稀释碳酸复红复染 30 s→水洗→吸干→镜检。本

病原体为革兰氏阴性球杆菌或短杆菌，菌体大小为 0.2 μm～0.4 μm×0.6 μm～2.5 μm，单个或成对存在，常有荚膜。

3.3.5 其他染色法

甲醇固定，按 GB 4789.28—1994 中 2.6 或 2.1 规定进行，瑞特氏或美蓝染色呈两极浓染的菌体。

## 4 病原分离和鉴定

### 4.1 病原分离

#### 4.1.1 病料的采集

4.1.1.1 最急性和急性病例可采集死亡禽只的肝、脾、心血；慢性病例一般采集局部病灶组织；对不新鲜或已被污染的样品，可自骨髓中采取病料。采病料时用烧红的刀片烧烙组织，而后用灭菌棉拭子或接种环通过烧烙表面插入组织或心血内取样。

4.1.1.2 如果为活禽，可通过鼻孔挤出粘液，或将棉拭子插入鼻裂中取样。

#### 4.1.2 培养基制备

5%鸡血清葡萄糖淀粉琼脂、鲜血琼脂培养基，配制方法见附录 A。

#### 4.1.3 动物接种

如果病料污染严重，则可将 0.2 mL 碾碎的病料，经皮下或腹腔内接种家兔、小鼠或易感鸡，接种动物在 24 h～48 h 内死亡，可以从肝脏、心血中分离到多杀性巴氏杆菌。

#### 4.1.4 培养

将病料接种于 5%鸡血清的葡萄糖淀粉琼脂（见第 A.1 章）、鲜血琼脂培养基（见第 A.2 章）在 35℃～37℃下培养，经 18 h～24 h 培养后菌落直径为 1 mm～3 mm，菌落呈散在、圆形，表面凸起呈奶滴状。

### 4.2 病原鉴定

#### 4.2.1 培养特性

为兼性厌气菌，生长最适温度为 35℃～37℃，经 18 h～24 h 培养后，菌落直径为 1 mm～3 mm，呈散在的圆形凸起和奶油状，有荚膜菌落稍大。

#### 4.2.2 镜检

从菌落上挑取少量涂片，干燥、固定、染色、镜检同 3.3.2～3.3.5。

#### 4.2.3 生化鉴定

鉴定方法如下：

a) 接种于葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖和甘露醇发酵管产酸而不产气，接种于鼠李糖、戊醛糖、纤维二糖、绵子糖、菊糖、赤藓糖、戊五醇、M-肌醇、水杨苷发酵管不发酵。糖发酵管按 GB 4789.28—1994中 3.2 规定配制。

b) 接种于蛋白胨水培养基中，可产生吲哚。试验按 GB 4789.28—1994 中 3.13 规定的方法操作。

c) 鲜血液琼脂上不产生溶血。操作方法按 GB 4789.28—1994 中 4.6 规定进行。

d) 麦康凯琼脂上不生长。麦康凯琼脂按 GB 4789.28—1994 中 4.24 规定配制。

e) 能产生过氧化氢酶（方法按 GB 4789.28—1994 中 3.20 规定进行）、氧化酶（方法按 GB 4789.28—1994中 3.18 规定进行），但不能产生尿素酶（方法按 GB 4789.28—1994 中 3.15 规定进行）、β-半乳糖苷酶（方法按 GB 4789.28—1994 中 3.3 规定进行）。

f) 维培（VP）试验为阴性。试验按 GB 4789.28—1994 中 3.4 规定方法进行。

#### 4.2.4 动物接种试验

细菌纯培养物稀释后，以 100 个细菌经皮下或腹腔内接种家兔、小鼠或易感鸡，接种动物在 24 h～48 h 内死亡，并可以从肝脏、心血中分离到多杀性巴氏杆菌。

### 4.3 结果判定

依据病原分离培养特性、生化鉴定、动物接种试验可作出确切诊断。

## 5 琼脂扩散试验(用于监测免疫效果和追溯性诊断)

### 5.1 材料准备

5.1.1 禽霍乱琼脂扩散抗原、标准阳性血清和标准阴性血清,按说明书使用。

5.1.2 溶液配制:1%硫柳汞溶液、pH6.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲(PBS)溶液和生理盐水,配制方法见附录 B。

5.1.3 琼脂板的制备:取 pH6.4 的 0.01 mol/L PBS 溶液 100 mL 放于三角瓶中,加入 0.8g ～1.0 g 琼脂糖,8 g 氯化钠。三角瓶在水浴中煮沸使琼脂糖等熔化,再加 1%硫柳汞 1 mL 冷至 45℃～50℃时,将洁净干热灭菌直径为 90 mm 的平皿置于平台上,每个平皿加入 18 mL～20 mL。加盖待凝固后,把平皿倒置以防水分蒸发,放普通冰箱中保存备用(时间不超过 2 周)。

### 5.2 操作方法

#### 5.2.1 打孔

在制备的琼脂板上,用直径 4 mm 的打孔器按六角形图案打孔,或用梅花形打孔器打孔。中心孔与外周孔距离为 3 mm。将孔中的琼脂用 8 号针头斜面向上从右侧边缘插入,轻轻向左侧方向将琼脂挑出,勿伤边缘,避免琼脂层脱离平皿底部。

#### 5.2.2 封底

用酒精灯轻烤平皿底部到琼脂微熔化为止,封闭孔的底部,以防侧漏。

#### 5.2.3 加样

用微量移液器吸取用灭菌生理盐水(见第 B.3 章)稀释的抗原悬液滴入中间孔,标准阳性血清分别加入外周的 1、4 孔中,标准阴性血清(每批样品仅做一次)和受检血清按顺序分别加入外周的 2、3、5、6 孔中。每孔均以加满不溢出为度,每加一个样品应换一个吸头。

#### 5.2.4 感作

加样完毕后,静止 5 min～10 min,将平皿轻轻倒置,放入湿盒内置 37℃温箱中反应,分别在 24 h 和 48 h 观察结果。

### 5.3 结果判定

#### 5.3.1 判定方法

将琼脂板置日光灯或侧强光下观察,标准阳性血清与抗原孔之间出现一条清晰的白色沉淀线,标准阴性血清与抗原孔之间不出沉淀线,则试验可成立。

#### 5.3.2 判定标准

5.3.2.1 若被检血清孔与中心孔之间出现清晰沉淀线,并与阳性血清孔与中心孔之间沉淀线的末端相吻合,则被检血清判为阳性。

5.3.2.2 若被检血清孔与中心孔之间不出现沉淀线,但阳性血清孔与中心孔之间的沉淀线一端在被检血清孔处向抗原孔方向弯曲,则此孔的被检样品判为弱阳性,应重复试验,如仍为可疑,则判为阳性。

5.3.2.3 若被检血清孔与中心孔之间不出现沉淀线,阳性血清孔与中心孔之间的沉淀线直向被检血清孔,则被检血清判为阴性。

5.3.2.4 若被检血清孔与中心抗原孔之间沉淀线粗而混浊和标准阳性血清孔与中心孔之间的沉淀线交叉并直伸,待检血清孔为非特异性反应,应重复试验,若仍出现非特异性反应则判为阴性。判阳性者视为禽体内存在禽霍乱抗体。

# 附 录 A
（规范性附录）
培养基的配制

## A.1 5%鸡血清葡萄糖淀粉琼脂培养基制备

| | |
|---|---|
| 营养琼脂(按 GB 4789.28 -1994 中 4.7 规定配制) | 85 mL |
| 3%淀粉溶液 | 10 mL |
| 葡萄糖 | 10 g |
| 鸡血清 | 5 mL |

将灭菌的营养琼脂加热熔化，使冷却到 50℃，加入灭菌的淀粉溶液、葡萄糖及鸡血清，混匀后，倾注平板。

## A.2 鲜血琼脂培养基制备

| | |
|---|---|
| 肉浸液肉汤(按 GB 4789.28 1994 中 4.1 规定配制) | 1 000 mL |
| 蛋白胨 | 10 g |
| 磷酸氢二钾($K_2HPO_4$) | 1.0 g |
| 氯化钠(NaCl) | 5 g |
| 琼脂 | 25 g |

灭菌加热熔化，使冷却到 50℃，加入无菌鸡鲜血达 10%，混匀后，倾注平板。

# 附 录 B
（规范性附录）
溶液配制

## B.1 1%硫柳汞溶液的配制

| | |
|---|---|
| 硫柳汞 | 0.1 g |
| 蒸馏水 | 100 mL |

溶解后，存放备用。

## B.2 pH6.4 的 0.01 mol/L PBS 溶液的配制

| | |
|---|---|
| 甲液： | 3.58 g |
| 磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) | |
| 加蒸馏水至 | 1 000 mL |
| 乙液： | 1.36 g |
| 磷酸二氢钾($KH_2PO_4$) | |
| 加蒸馏水至 | 1 000 mL |

待溶解后分别保存。

用时取甲液 24 mL、乙液 76 mL 混合即为 100 mL pH6.4 的 0.01 mol/LPBS 溶液。

## B.3 生理盐水的配制

| | |
|---|---|
| 氯化钠(NaCl) | 8.5 g |
| 蒸馏水 | 1 000 mL |

溶解后，置中性瓶中灭菌后存放备用