ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 564—2002

猪巴氏杆菌病诊断技术

Diagnostic techniques for swine 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

猪巴氏杆菌病，又称猪肺疫，是危害我国养猪业的重要疫病之一，我国将之定为二类动物疫病。世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英)，Office Intentional des Epizootic(法)，OIE]虽无本病的诊断标准，但对牛和禽的巴氏杆菌病的诊断有技术规定。各国多年研究和实践经验表明，由多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)引起的多种动物疫病其实验室诊断技术基本上是一致的。本标准是参照OIE有关多杀性巴氏杆菌引起的疫病之诊断技术规定和国内外通用方法、依据我国的实践经验制定的。

本标准的附录A、附录B、附录C是规范性附录。

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：关孚时、毛开荣、钱心元、魏财文、夏业才。

猪巴氏杆菌病诊断技术

1 范围

本标准规定了猪巴氏杆菌病诊断的技术要求。

本标准所规定的临床诊断、病理剖检和病原分离鉴定，适用于猪巴氏杆菌病的诊断，间接血凝试验技术和琼脂扩散沉淀试验技术适用于病原血清学分群和定型鉴定。

2 临床诊断

猪巴氏杆菌病分流行性和散发性两类。

2.1 流行性

特点是病程很短，发病快，体温可高达41℃以上。分最急性型和急性型两种。

最急性型：多发生在流行初期，呼吸困难，心跳加快，于数小时内死亡。

急性型：病状主要分两种，一种表现为咽炎症状，咽喉部皮肤发红、热痛肿胀、坚硬，延伸可达到耳根及颈部。常呈犬坐式伸长头颈呼吸。腹侧、耳根和四肢内侧可发现红色斑点。口、眼等可视粘膜呈暗红色。一经出现呼吸症状，病情即迅速恶化，口、鼻流出泡沫状分泌物，死亡率达到100%。另一种为急性胸膜炎病状，表现为呼吸困难，痉挛性干咳，触诊胸部有疼痛感，鼻流稠粘液。初便秘后腹泻，病后期皮肤有紫斑或血点。病程约4 d～6 d。

2.2 散发性

常年都有发生，病程初期体温升高到41℃左右。呈现呼吸困难，偶尔表现急促腹式呼吸。间有咳嗽。口、鼻和肛门粘膜及四肢皮肤呈暗紫色，颈部无红肿病状，由于病程长，诸多病例逐渐消瘦死亡。

3 病理剖检

3.1 最急性型

病理变化不明显，常见皮肤、皮下、浆膜、黏膜有大量出血点。

3.2 急性型

主要表现咽喉部的结缔组织呈出血性浆液性炎。口腔和鼻孔流出红色泡沫状液体。皮下组织有大量出血点，全身淋巴结出血，断面呈红色，颈部淋巴结肿大，有渗出液，全身各脏器浆膜和黏膜及皮肤呈现点状出血，脾不肿大。

3.3 散发性

颈部不肿胀，喉头充血、出血，气管有大量泡沫，肺脏呈现水肿、气肿、充血、出血，纤维素性胸膜肺炎病变，局部出现红色和灰色肝变，肺叶切面呈大理石状。胸膜常有纤维素状附着物，胸腔及心包时有积液。

4 病原分离鉴定

4.1 材料

4.1.1 改良马丁氏琼脂。

4.1.2 马丁氏肉汤。

4.1.3 糖发酵培养基。

4.1.4 1%蛋白胨水。

4.1.5 吲哚试验试剂(靛基质试验试剂)(Ehelich-Boehme 二氏试剂)。

4.1.6 氧化酶试验用试剂(1%盐酸四甲基对苯二胺溶液)。

4.1.7 运动性试验用培养基(半固体培养基)。

4.1.8 麦康凯琼脂培养基。

以上各种培养基配制方法见附录 A。

4.2 病原分离

将濒死前或死后数小时内以无菌手术采取病死猪的心血、肝脏组织,接种于改良马丁氏琼脂(见第 A.4 章)斜面,麦康凯琼脂(见第 A.11 章)平皿,含 10%绵羊全血的改良马丁琼脂平皿,含有 0.1%裂解健康动物红细胞的全血、4%健康动物血清的改良马丁氏琼脂平皿及马丁氏肉汤(见第 A.5 章)小管培养基,置 36℃～37℃培养。

4.3 病原鉴定

4.3.1 病原形态

病原为多杀性巴氏杆菌,用肝脏组织或心血抹片可见革兰氏染色阴性,瑞氏染色呈两极浓染的球杆菌。

4.3.2 培养特性

培养 18 h～24 h 后,改良马丁琼脂斜面生长纯粹的培养物,呈微蓝色菌苔或菌落。马丁肉汤培养物生长为均匀混浊,不产生菌膜。麦康凯琼脂平皿上不生长。10%的血琼脂平皿上生长的菌落不出现溶血。在含有 0.1%裂解血球全血、4%健康动物血清的改良马丁氏琼脂平皿上的单个菌落,肉眼观察光滑圆整,直径 2 mm～3 mm,半透明,呈微蓝色。在低倍显微镜 45°折光下观察,应有虹彩,为蓝绿色荧光(Fg 菌落型),或桔红色荧光(Fo 菌落型)。

4.3.3 生化特性

4.3.3.1 糖发酵试验:用 1%蛋白胨水(见第 A.7 章),将改良马丁氏琼脂 18 h～24 h 的培养物洗下,接种糖发酵管(见第 A.6 章),置 36℃～37℃培养 7 d～10 d,每天记录反应结果。本菌应发酵葡萄糖、果糖、半乳糖,多数发酵蔗糖,不发酵乳糖、肌醇、菊糖、水杨素及鼠李糖。

4.3.3.2 吲哚试验:用 1%蛋白胨培养基的 48 h 培养物加入吲哚试验试剂(见第 A.8 章)0.5 mL,沿管壁流下,覆盖于培养液表面,液面接触处呈玫瑰红色,为阳性反应。

4.3.3.3 氧化酶试验:取白色洁净滤纸一角,蘸取菌落少许,加试剂(见第 A.9 章)1 滴,立即呈粉红色,为阳性反应,并于 5 s～10 s 内呈现深紫色。

4.3.3.4 运动性试验:用铂金耳钩取固体培养物接种运动性培养基(见第 A.10 章)倒置小试管的套管内,36℃～37℃ 3 d,在套管内生长,无运动性。

4.4 毒力

4.4.1 材料

4.4.1.1 8 g～22 g 健康小白鼠 4 只。

4.4.1.2 马丁氏肉汤。

4.4.2 方法

取马丁肉汤 24 h 的培养物,用马丁肉汤稀释约为 1 000 个菌体/mL,皮下接种 18 g～22 g 健康小白鼠 4 只,应死亡。

4.5 血清学试验

用以确定血清群和血清型。

4.5.1 间接血凝试验(Carter 氏荚膜分群法)

4.5.1.1 材料

所需材料如下:

a) 多杀性巴氏杆菌 A、B、D 分群血清；

b) 新鲜红细胞；

c) 致敏红细胞；

d) 生理盐水、pH6.0 磷酸盐缓冲盐水。

a)、b)、c)试剂配制方法见附录 B。

4.5.1.2 操作方法

4.5.1.2.1 分群血清于 56℃水浴 30 min(除去非特异性的凝聚因子)，用生理盐水作 10 倍稀释后再进行连续对倍稀释至第 8 管，取每个稀释度 0.2 mL 加到小圆底试管。

4.5.1.2.2 每支小圆底试管加入致敏红细胞(见第 B.4 章)0.2 mL。

4.5.1.2.3 设对照组：

血清对照：血清(5 倍稀释)0.2 mL＋加新鲜红细胞(见第 B.3 章)0.2 mL。

新鲜红细胞对照：新鲜红细胞 0.2 mL＋生理盐水 0.2 mL。

抗原对照：致敏红细胞 0.2 mL＋生理盐水 0.2 mL。

间接血凝试验程序见表 1。

表 1 间接血凝试验程序 液体量单位为毫升

反应物	血清对照	1	2	3	4	5	6	7	8	抗原对照	血球对照
血清稀释倍数		5	10	20	40	80	160	320	640		
血清最终稀释倍数		10	20	40	80	160	320	640	1 280		
血清加量	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	(0.2)弃去	
第一次加 0.3% 甲醛生理盐水量	(0.4 弃去)	0.8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		0.2
第二次加 0.3% 甲醛生理盐水量		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
1%致敏红细胞量	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
1%新鲜红细胞量	0.2										0.2

4.5.1.2.4 充分振荡小圆底试管后，置室温 20℃左右 1 h～2 h 判定结果。

4.5.1.3 判定

判定标准：每个试管按其管底红细胞的凝集现象分别记以“#”、“＋＋＋”、“＋＋”、“＋”、“±”及“—”。

“#” 红细胞凝集形成坚实的凝块，边缘不整齐。

“＋＋＋” 凝集的红细胞平铺管底，但有卷边或缺口。

“＋＋” 凝集的红细胞平铺管底。

“＋” 红血球凝集面积较小，有狭窄的增厚边缘或中心的红细胞凝集。

“±” 红细胞形成小的光滑圆盘，中心有不明显的红细胞凝集。

“—” 红细胞形成小的光滑圆盘。

以“＋＋”作为样品的滴度。

4.5.2 琼脂扩散沉淀试验(Heddleston 氏菌体分型法)

4.5.2.1 材料

4.5.2.1.1 优级琼脂(DIFCO)粉(或同质量的产品)1.0 g。

4.5.2.1.2 8.5%氯化钠溶液 100 mL。

4.5.2.1.3　1%硫柳汞溶液 1 mL。

4.5.2.1.4　多杀性巴氏杆菌菌体分型血清，1～16 个血清型。

4.5.2.1.5　抗原。制备方法见附录 C。

4.5.2.2　**方法**

用 8.5%氯化钠溶液 100 mL＋琼脂 1.0 g 加热溶化后再加入 1 mL 1%硫柳汞，混合凉至 60℃左右，倒入平皿内，琼脂厚度 2.5 mm～3 mm，琼脂冷凝后，打孔，孔径 4 mm，孔与孔中心距离为 6 mm，每组 5 孔，中央孔加待检抗原（见第 C.2 章），滴满为度（约 0.03 mL），四周孔加分型血清（见第 C.1 章）分别加入到四周孔。置 36℃～37℃，24 h～48 h 后判定结果。

4.5.2.3　**判定**

在抗原与血清孔之间出现明显的沉淀线为阳性。

5　诊断判定

根据临床症状和病理变化，加上涂片染色镜检，可对本病进行初步诊断，但确诊要靠病原分离鉴定，其中血清分群和血清分型鉴定系对病原的精确鉴定，作为选做项目。

附 录 A
（规范性附录）
培 养 基 制 备

A.1 牛肉汤

A.1.1 成分

牛肉	500 g
水（去离子水）	1 000 mL

A.1.2 制法

A.1.2.1 将牛肉除去脂肪、筋膜，用绞肉机绞碎，按肉、水 1∶2 比例混合，搅拌均匀。

A.1.2.2 用不锈钢或耐酸陶瓷双层锅，加温至 65℃～75℃，保持 45 min，继续加热至沸腾，保持 1 h，全部过程均应不断搅拌。

A.1.2.3 煮沸完成后，捞出肉渣，沉淀 30 min，抽上清液，经绒布滤过，将滤过的肉汤与从肉渣中压榨出的肉汤混合即成。

A.1.2.4 制成的肉汤，即可与猪胃消化液（见第 A.3 章）混合配制成马丁氏肉汤；或分装经 103.7 kPa 灭菌 30 min～40 min，贮存备用。

A.1.2.5 制备少量肉汤时，也可采用将绞碎的牛肉在 2 倍 4℃～8℃水中浸泡 12 h～24 h，再煮沸 30 min，分装灭菌后备用。

A.2 改良猪胃消化液

A.2.1 成分

猪胃（清洗时保护胃膜）	350 g
盐酸	8.5 mL
去离子水	1 000 mL

A.2.2 制法

A.2.2.1 将猪胃除去脂肪，用绞肉机绞碎。

A.2.2.2 碎猪胃 350 g 加 65℃左右温水 1 000 mL，并加盐酸 8.5 mL，放置 51℃～55℃中消化 18 h～22 h，前 12 h 至少搅拌 6～10 次，待胃组织溶解，液体澄清，即表示消化良好；否则，可酌情予以延长消化时间。

A.2.2.3 取出后全部倒入中性容器，并加氢氧化钠溶液，调成弱酸性，然后煮沸 10 min，使其停止消化。

A.2.2.4 以粗布过滤后，即成。

A.3 猪胃消化液

A.3.1 成分

猪胃（清洗时保护胃膜）	300 g
盐酸（HCl）	10 mL
去离子水	1 000 mL

A.3.2 制法

A.3.2.1 将猪胃除去脂肪，用绞肉机绞碎。

A.3.2.2 按胃、水比例加入 65℃左右温水混合均匀，再加入盐酸，使 pH 为 1.6～2.0，保持消化液

51℃～55℃，消化 18 h～24 h。

A.3.2.3 在消化过程的前 12 h 至少搅拌 6～10 次，然后静置。至胃组织溶解、液体澄清，表示消化完全，如消化不完全，可酌情延长消化时间。

A.3.2.4 除去脂肪和浮物，抽清液煮沸 10 min～20 min，放缸内静置沉淀 48 h 或冷却到 80℃～90℃，加氢氧化钠使成弱酸性，经灭菌贮存备用。

A.4 改良马丁氏琼脂

A.4.1 成分

牛肉汤	500 mL
改良猪胃消化液(见第 A.2 章)	500 mL
氯化钠(NaCl)	2.5 g
琼脂(条状)	20 g～30 g

A.4.2 制法

A.4.2.1 将牛肉汤、改良猪胃消化液、氯化钠和琼脂条混合(琼脂条须以水充分冲洗拧干)，加热溶解。

A.4.2.2 待琼脂完全溶化后，以氢氧化钠溶液调整 pH 为 7.4～7.6。

A.4.2.3 以卵白澄清或凝固沉淀法沉淀。

A.4.2.4 分装于试管或中性玻璃瓶中，以 103.7 kPa 灭菌 30 min～40 min。

A.5 马丁氏肉汤

A.5.1 成分

牛肉汤(见第 A.1 章)	500 mL
猪胃消化液(见第 A.3 章)	500 mL
氯化钠(NaCl)	2.5 g

A.5.2 制法

A.5.2.1 将上列材料混合后，以氢氧化钠溶液调 pH7.6～7.8 煮沸 20 min～40 min，补足失去的水分。

A.5.2.2 冷却沉淀，抽取上清，经滤纸或绒布滤过，滤液应为澄清，淡黄色，按需要分装，经 103.7 kPa 灭菌 30 min～40 min。

A.5.2.3 pH 应为 7.2～7.6。

A.6 糖发酵培养基制备

A.6.1 材料

A.6.1.1 小试管(内装有倒置小管)灭菌后备用。

A.6.1.2 糖、醇等(分析纯)(按所需种类准备)。

A.6.1.3 指示剂：1.6%的溴甲酚紫。

A.6.1.4 1%蛋白胨水(见第 A.7 章)。

A.6.2 制法

每种糖(或醇)按质量浓度为 1%比例分别加入到装有 1%蛋白胨水的瓶中，加热溶解后，按 0.1%的比例加入 1.6%溴甲酚紫指示剂，摇匀后，分装小试管，每支大约 6 mL，流通蒸汽灭菌 3 次，每天 1 次，每次 30 min。

A.7 1%蛋白胨水

蛋白胨	10 g
氯化钠(NaCl)	5 g

蒸馏水　　1 000 mL

将以上材料混合，加热溶解，调整 pH7.4。煮沸滤过，分装于中性容器中。103.7 kPa 灭菌 20 min。

A.8　靛基质试验用试剂　　吲哚试验试剂(欧-波 Ehrlich-Boehme 二氏试剂)的配制

对二甲氨基苯甲醛　　1.0 g

95%乙醇　　95 mL

纯浓盐酸　　20 mL

将对二甲基氨苯甲醛溶于乙醇中，然后慢慢加进盐酸。此试剂应如量配制，并保存于冰箱内。

A.9　氧化酶试剂(1%盐酸四甲基对苯二胺溶液)的配制

盐酸四甲基对苯二胺　　1.0 g

去离子水　　100 mL

将 1.0 g 的盐酸四甲基对苯二胺溶于 100 mL 的去离子水中。

A.10　运动性培养基的制备

A.10.1　材料

A.10.1.1　马丁氏肉汤(见第 A.5 章)1 000 mL。

A.10.1.2　琼脂 3.5 g～4 g。

A.10.1.3　内装有套管的试管。

A.10.2　制法

A.10.2.1　将马丁氏肉汤、琼脂混合加热溶解。103.7 kPa 灭菌 40 min，置室温保存备用。

A.10.2.2　加热溶解琼脂，分装到试管中，以 103.7 kPa 灭 30 min～40 min。

A.11　麦康凯琼脂培养基

A.11.1　成分

蛋白胨	17 g
脲胨	3 g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5 g
氯化钠	5 g
琼脂	17 g
蒸馏水(或去离子水)	100 mL
乳糖	10 g
0.01%结晶紫水溶液[1]	10 mL
0.5%中性红水溶液[2]	5 mL

A.11.2　制法

A.11.2.1　将蛋白胨、脲胨、胆盐和氧化钠溶解于 400 mL 蒸馏水中，校正 pH 值为 7.2。将琼脂加入 600 mL蒸馏水中，加热溶解。将两液合并，分装于烧瓶内，103 kPa 高压灭菌 15 min，备用。

A.11.2.2　临用时加热熔化琼脂，趁热加乳糖，冷至 50℃～55℃时，加入结晶紫和中性红水溶液，摇匀后倾注平板。

---

1) 结晶紫及中性红水溶液配好后须高压灭菌。

2) 中性红水溶液配好后须高压灭菌。

附 录 B
（规范性附录）
多杀性巴氏杆菌荚膜分群抗原及致敏红细胞的制备方法

B.1 多杀性巴氏杆菌荚膜抗原的制备

B.1.1 材料

B.1.1.1 改良马丁氏琼脂。

B.1.1.2 生理盐水、pH6.0 磷酸盐缓冲盐水。

B.1.1.3 透明质酸酶。

B.1.2 方法

B.1.2.1 1 支改良马丁氏琼脂斜面中管(30 mm×230 mm)的 7 h～24 h 融合生长的培养物，用 3 mL 灭菌生理盐水洗下，置 56℃水浴加热 30 min，离心 8 000 r/min，15 min，取上清液，即为荚膜抗原。

B.1.2.2 由于有些粘液型菌株的外层被无抗原性的透明质酸所包被，不能被定群，需经透明质酸酶处理。制备方法如下：1 支改良马丁氏琼脂斜面中管 7 h～24 h 的培养物，用 3 mL pH6.0 磷酸盐缓冲盐水洗下，加入 1 mL（含 15 IU）的透明质酸酶溶液（透明质酸酶是用 pH6.0 的磷酸盐缓冲盐水稀释）。混匀后置 36℃～37℃水浴作用 3 h～4 h，再用 8 000 r/min 离心 15 min，取上清液即为荚膜抗原。

B.2 新鲜红细胞的制备

B.2.1 材料

绵羊脱纤红细胞。

B.2.2 方法

绵羊脱纤血液（采集后 4 周内使用）用 6～8 倍的生理盐水洗 3 次，每次皆用离心法收集红细胞（2 000 r/min），最后一次收集的红细胞，应恢复到原血量的一半。置 2℃～8℃保存，2 d 内使用。

B.3 致敏红细胞的制备

B.3.1 材料

B.3.1.1 荚膜抗原（见第 B.1 章）。

B.3.1.2 新鲜红细胞（见第 B.2 章）。

B.3.1.3 生理盐水。

B.3.2 方法

取荚膜抗原 3 mL，加入 0.2 mL 洗净的红细胞，混合均匀后置 36℃～37℃作用 2 h，离心弃上清，再用 10 mL 生理盐水洗 1 次，最后悬浮于 20 mL 生理盐水中，配制成 1%的致敏红细胞悬液。

附 录 C
（标准的附录）
多杀性巴氏杆菌菌体分型抗原的制备方法

取 1 支改良马丁氏琼脂中管斜面 24 h 培养物，用 3 mL 8.5%氯化钠溶液洗下，置 100℃水浴中加热 1 h，4 000 r/min 离心 30 min，取其上清液即为琼脂凝胶免疫扩散试验抗原。