

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 566—2002

猪丹毒诊断技术

Diagnostic techniques for swine erysipelas

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

猪丹毒是丹毒丝菌引起的严重传染病,为我国“三大猪传染病之一”。世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizootic(法),OIE]尚未将本病列入三大类动物疫病名录,未推荐诊断技术。但某些国家如日本、澳大利亚将猪丹毒列入动物疫病诊断标准中。某些国家如日本、丹麦将猪丹毒列为无特定病原(SPF)猪监测疫病之一。本标准是依据我国长期的研究成果和诊断的实践经验,参考国际通用方法制定的。

猪丹毒(swine erysipelas)是由猪丹毒杆菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)引起的一种急性、热性传染病。死亡率可达80%~90%,病程多为急性败血型或亚急性的疹块型,转为慢性的多发生关节炎和心内膜炎,主要侵害架子猪,猪丹毒广泛流行于世界各地,对养猪业危害很大。

人也可感染猪丹毒杆菌,称为“类丹毒”,人的病例多是由损伤皮肤感染,一般经2~3周而自愈,类丹毒是一种职业病,多发生于兽医、屠宰人员以及渔业工作者等,迄今未见人感染猪丹毒杆菌而死亡的报告。

猪丹毒杆菌是一种纤细的革兰氏阳性小杆菌,不产生芽胞和荚膜,猪丹毒杆菌的抗原结构比较简单,有一种或多种不耐热的共同抗原,它们是蛋白质或蛋白质-糖-脂复合物,另外一种抗原为型特异性抗原,对热稳定,是血清型分类的基础,这些抗原由细胞壁的肽糖组成,采用高压浸出抗原和琼脂双扩散试验,可将猪丹毒杆菌分为1~25型,大量资料证明80%的猪源猪丹毒杆菌属于1型和2型。

本标准的附录A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。

本标准起草人:夏业才、钱心元、罗玉峰、姚文生。

猪丹毒诊断技术

1 范围

本标准规定了猪丹毒的诊断技术。

本标准规定的临床症状观察和病原分离鉴定适用于猪丹毒的诊断；血清培养凝集试验用于流行病学调查和 SPF 猪群的监测。

2 临床症状观察

根据症状观察可作出怀疑性诊断。临床症状一般表现为以下几种类型：

- a) 急性败血型：此型最为常见，以突然爆发，急性经过和高的致死率为特征，病猪体温升高达 $42^{\circ}\text{C}\sim 43^{\circ}\text{C}$ 。高烧不退，卧地，不食，病程短，可突然死亡。
- b) 亚急性皮肤疹块型：病猪食欲减退，体温升高 $41^{\circ}\text{C}\sim 42^{\circ}\text{C}$ ，精神不振，不愿走动，发病 2 d~3 d 后在胸、腹、背、肩、四肢的皮肤上发生疹块，呈方形或菱形，稍凸起于皮肤表面，具有特殊诊断意义。
- c) 慢性关节炎型：病猪一般由败血型或皮肤疹块型转变而来，也有原发性，主要表现为慢性关节炎，病猪出现皮肤大块坏死，四肢关节肿胀、疼痛、跛行。
- d) 青霉素对本病有明显疗效，也有一定诊断意义。

3 病原分离和鉴定

根据病原分离鉴定 3.3~3.6 即可作出确切诊断。

3.1 所需材料

3.1.1 培养基：马丁琼脂、马丁肉汤，配制方法见附录 A。

3.1.2 定型血清：1~2 型定型血清和 1~2 型阳性抗原。

3.2 采集病料

急性病例可采集被检猪的心血、肝、脾、淋巴结等脏器，亚急性疹块病例可采集皮肤疹块病料；慢性病例可采集关节液和心内膜的增生物。

3.3 菌体形态

用采集到的心血及脏器制备抹片，染色镜检，为革兰氏阳性细小杆菌。

3.4 动物试验

用病料制成 1:10 悬液，接种小白鼠(0.2 mL)或鸽(大胸肌接种 1 mL，经 3 d~5d 死亡，取心血、肝、脾等病料进行分离培养。同时接种豚鼠(1 mL)则不死亡。

3.5 分离培养

将病料划线接种于加 10%健康马血清马丁琼脂(见第 A.1 章)平皿， 37°C 培养 36 h~48 h，肉眼观察，若菌落较小，表面圆整光滑，呈微蓝灰色露珠状，判为可疑菌落，进一步做血清型鉴定。

3.6 生化试验

生化试验见表 1。

表 1 丹毒丝菌生化反应

葡萄糖	果糖	乳糖	山和木醇	肌醇	水杨素苷	鼠李糖	蔗糖	海藻糖	柿实糖	菊糖	硫化氢 (H ₂ S) 试验	吲哚试验	分解尿素	甲基红	维培 (VP) 试验	氧化酶	过氧化氢酶	牛奶培养基	马铃薯培养基	明胶穿刺	液化明胶	运动性	新生酶素	溶血型
产酸不产气	产酸不产气	产酸不产气	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	凝固产酸	—	试管刷状生长	—	—	抵抗	α

3.7 血清型鉴定

3.7.1 被检抗原制备

将可疑菌落接种马丁肉汤(见第 A.2 章)100 mL(加 10%健康马血清),37℃培养 36 h,纯粹检验合格加 0.5%甲醛溶液灭活 24 h,用 0.5%甲醛磷酸盐缓冲液(PBS)溶液离心(8 000 r/min,15 min)洗涤 2 次,在沉淀物中加 3 mL 蒸馏水,经 112 kPa 高压 1 h,离心(8 000 r/min,15 min),上清液为被检抗原。

3.7.2 琼脂双相扩散试验

3.7.2.1 用 pH7.2 的 PBS 配制 1.2%琼脂凝胶,加热融化后,在平皿中铺制成 3 mm 厚的胶板,打六角梅花型孔,孔径 3 mm,孔间距离 4 mm。在酒精灯火焰之上加热封底。

3.7.2.2 定型血清加满中央孔。

3.7.2.3 周围孔加满阳性对照抗原和被检抗原及 PBS。

3.7.2.4 置 37℃湿盒扩散 24 h 判定,定型血清与相对应的阳性抗原应出现沉淀线,与 PBS 不出现沉淀线,被检抗原与定型血清孔之间出现沉淀线为阳性。无沉淀线为阴性。

4 猪丹毒血清培养凝集试验

此试验为测抗体用。

4.1 所需材料

4.1.1 培养基:马丁氏肉汤(见第 A.2 章)。

4.1.2 菌种:猪丹毒杆菌 C43-8 强毒菌种。

4.2 操作步骤

4.2.1 无菌采被检猪血 5 mL,分离血清。

4.2.2 将被检血清用马丁肉汤分别稀释成 1:10 和 1:20。

4.2.3 每个稀释度的血清分别取 5 mL,56℃灭活 30 min。

判为可疑的血清应重做。

4.2.4 待灭活血清冷至 37℃以下时,每管加入猪丹毒 C43-8,经 18 h 培养的马丁肉汤菌液 0.1 mL,置 36℃~37℃静置培养 18 h,再取出放室温 2 h 后判定结果。

4.2.5 本试验同时设马丁肉汤和马丁肉汤培养的猪丹毒菌液作为对照管。

4.3 判定标准

4.3.1 被检血清培养物与菌液对照管比较观察,被检管和对照管一样均匀一致混浊,管底无凝集块者为阴性(—)。

4.3.2 被检管培养物上层液体稍混浊,管底有凝集物沉淀者为弱阳性(+或++)。

4.3.3 被检管培养物澄清,无混浊状,管底有大量凝集物沉淀者为阳性(+++或++++)。

4.4 定性判定根据血清 1:10 和 1:20 两个稀释度出现的凝集程度综合判定

4.4.1 两个稀释度出现凝集程度的总和 ≥ 5 个(+)者,判为阳性。

4.4.2 两个稀释度出现凝集程度的总和=4个(+)者,判为可疑。

4.4.3 两个稀释度出现凝集程度的总和 ≤ 3 个(+)者,判为阴性。

附录 A
(规范性附录)
培养基配制

A.1 马丁琼脂

A.1.1 成分

牛肉汤	500 mL
猪胃消化液	500 mL
氯化钠(NaCl)	2.5 g
琼脂	13 g

A.1.2 制法

A.1.2.1 将上述成分混合加热溶解。

A.1.2.2 待琼脂完全溶化后,以氢氧化钠溶液调整 pH 为 7.4~7.6。

A.1.2.3 以卵白澄清法或凝固沉淀法除去沉淀。

A.1.2.4 分装于中性玻璃瓶中,经 103.7 kPa 灭菌 30 min~40 min。

A.1.2.5 灭菌完毕,pH 应为 7.2~7.6。

A.1.2.6 按 10% 加入健康动物血清,充分混合,分装于平皿中,制成 10% 血清马丁琼脂。

A.2 马丁肉汤

A.2.1 成分

牛肉汤	500 mL
猪胃消化液	500 mL
氯化钠(NaCl)	2.5 g

A.2.2 制法

A.2.2.1 将上述成分混合,以氢氧化钠溶液调整 pH 为 7.6~7.8,煮沸 20 min~40 min,补足失去的水分。

A.2.2.2 冷却沉淀,抽取上清液,经滤纸或绒布滤过,滤液应为澄清、淡黄色,按需要量分装,经 103.7 kPa 灭菌 30 min~40 min。

A.2.2.3 灭菌完毕,pH 应为 7.2~7.6。
