

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 571—2002

马腺疫诊断技术

Diagnostic techniques for strangles

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

马腺疫是马、骡、驴的一种急性传染病,典型症状为发热、上呼吸道及咽喉黏膜呈现卡他性炎症,颌下淋巴结表现急性化脓性炎症。

农业部(1999)规定马腺疫为二类动物疫病,本标准采用的诊断技术系我国多年来行之有效,且为国际公认的方法。

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:中国人民解放军军需大学。

本标准主要起草人:王世若、王兴龙、沈广、雷连成。

马腺疫诊断技术

1 范围

本标准规定了马腺疫临床检查及病原菌分离培养鉴定的技术要求。

本标准适用于马属动物产地、集散地、国境口岸、饲养及使用单位(含个体)马腺疫的诊断及检疫。

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 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 临床检查

3.1 检查前准备

检查用主要药械有体温计、听诊器、保定器、胶手套、线手套、3%来苏儿、0.1%新洁尔灭等。术者穿全套工作服,戴胶手套及线手套;助手穿工作服。

3.2 检查方法

由助手保定被检马,术者按常规方法做临床检查,重点检查鼻腔和颌下淋巴结。

3.3 临床特征

3.3.1 一过型腺疫

鼻腔黏膜潮红,流出浆液性或黏液性鼻液,颌下淋巴结轻度肿胀。

3.3.2 典型腺疫

体温 39℃~41℃,鼻腔流出黏性至脓性鼻液,颌下淋巴结肿大,表面凹凸不平,触之硬实,界限清楚,如鸡蛋大甚至拳头大,周围发生炎症时,肿胀加剧,充满于整个下颌间隙,界限不清,热痛明显,以后随着炎症的发展,局部组织肿胀化脓,肿胀完全成熟,自行破溃,流出大量黄白色黏稠脓汁,体温恢复正常,随后,创内肉芽组织新生,逐渐愈合。病程约 2 周~3 周。

3.3.3 恶性型腺疫

如果病马抵抗力很弱,则马腺疫链球菌可由颌下淋巴结的化脓灶转移到其他淋巴结,形成化脓灶,甚至转移至肺和脑等器官,发生脓肿,体温多稽留不降,常因极度衰弱或继发脓毒败血症死亡。

3.3.4 临床诊断结果

根据 3.3.1~3.3.3 项描述的临床症状,初步确定患马是否发生了马腺疫及其型别。

4 细菌学检查

4.1 器材

恒温箱、高压蒸汽灭菌器、显微镜、试管架、灭菌小试管、5 mL 灭菌注射器、煮沸消毒器、外科剪、棉棒、镊子、载玻片、铂金耳、酒精灯等。

4.2 培养基及实验动物

4.2.1 培养基:10%血清肉汤、5%~10%血清琼脂平板、5%绵羊血液琼脂平板及美蓝牛乳培养基,配

制方法见附录 A(规范性附录)。

4.2.2 昆明系小鼠,体重 17 g~20 g,清洁级。

4.3 病料标本采集

病马颌下淋巴结未破溃脓肿以碘酒及酒精消毒后,用注射器吸取脓汁注入灭菌小试管中;已破溃的脓肿,以灭菌生理盐水浸湿的棉棒蘸取脓汁或鼻腔分泌液放于灭菌小试管中,立即检查,或放 4℃ 冰箱中保存待检。

4.4 直接镜检

4.4.1 操作方法

将病料标本涂于载玻片上,干燥、固定按 GB 4789.28—1994 中 2.2 条规定进行革兰氏染色。

4.4.2 结果观察

马腺疫链球菌的形态及染色特征是:在脓球间散布着由几个甚至上百个球菌组成的波浪状弯曲的长链条,各菌大小不等,多呈扁球状,直径约 1 μm,菌体着色不均,革兰氏阳性。

4.5 分离培养

4.5.1 操作方法

用铂金耳钩取病料,接种于 10% 血清肉汤(见第 A.1 章)做增菌培养,接种于 5%~10% 血清琼脂平板(见第 A.2 章)及 5% 绵羊血液琼脂平板(见第 A.3 章)做分离培养,于 37℃ 恒温箱中孵育 24 h~72 h。

4.5.2 结果观察

观察到下述结果,符合马腺疫链球菌培养特征:

- a) 10% 血清肉汤:培养后,生成长链条状,24 h 肉汤轻度混浊,48 h 后长成长链条状的菌体缠绕一起,呈棉絮状沉于试管底,72 h 以后上清液清朗。
- b) 5%~10% 血清琼脂:形成圆形、透明、闪光、中央微隆起、表面光滑的露珠样小菌落。强毒株的菌落表面常呈颗粒状结构,用放大镜观察更为明显。
- c) 5% 绵羊血液琼脂:发生 β 型溶血,即在露珠状小菌落周围形成界限分明、完全透明的溶血带,该带的宽度可达 2 mm~3 mm 以上。

4.6 生物化学特性

4.6.1 操作方法

选可疑菌落,接种于 GB 4789.28—1994 中 3.2 条规定的糖发酵管和 GB 4789.28—1994 中 3.9 以及 GB 4789.28—1994 中 3.17 中规定的生化培养基,于 37℃ 孵育 72 h。

4.6.2 结果观察

分别于孵育的第 24 h、48 h 及 72 h 观察记录结果。符合以下特性,确定为马腺疫链球菌:

- a) 糖发酵试验:发酵葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘露糖、单奶糖、杨苷等,产酸不产气;不发酵蕈糖、山梨醇、甘露醇、乳糖。
- b) 生化试验:不分解马尿酸钠,不还原硝酸盐,不还原美蓝牛乳(见第 A.4 章),在胆汁中不被溶解¹⁾。

4.7 小鼠感染试验

4.7.1 操作方法

用灭菌注射器吸取 10% 血清肉汤 0.1 mL~0.2 mL 或以灭菌的 pH 为 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)稀释成 1:2~3 的脓汁 0.3 mL~0.5 mL,分别注于 3 只小鼠(见 4.2.2)皮下,观察 3 d~5 d。

4.7.2 观察结果

- 1) 往加有 10% 血清肉汤 24 h 培养物 1.8 mL 试管中加入灭菌的牛胆汁 0.2 mL,混匀,置 37℃ 恒温箱中作用 15 min,培养物仍混浊,说明被检细菌不被胆汁溶解,否则培养物透明。

小鼠在 24 h~36 h 发生败血症或脓毒败血症死亡。剖检时,在腹腔液、心血、肝、脾等中检出呈短链条或双球菌状链球菌,可确定为有毒力的马腺疫链球菌。

4.8 细菌学检查结果

根据 4.4~4.7 项的检查结果,确定病料标本中是否有有毒力的马腺疫链球菌。

5 综合判定

幼驹体温升高(39℃~41℃)、颌下淋巴结肿大,随着炎症的发展,肿胀的淋巴结化脓破溃。采取脓汁,分离出链球菌,该菌不发酵草糖、山梨醇、甘露醇和乳糖,即可诊断为马腺疫。

6 鉴别诊断

6.1 马传染性贫血病

恶性型腺疫患畜,体温呈稽留热、贫血、黄疸,用抗生素及解热药治疗效果不佳,易与马传染性贫血病混淆,但有典型的腺疫病史,白细胞总数及中性粒细胞数明显增多。马传染性贫血病病马的粘膜可能有出血点,心脏机能紊乱,白细胞数接近正常或略减少,马传染性贫血抗体检测阳性。

6.2 马鼻疽

颌下淋巴结硬固肿胀,无热痛,不化脓,往往不能移动,且鼻疽有特征性的鼻疽结节和溃疡,或放射状疤痕。鼻疽菌素点眼试验呈阳性反应。

附 录 A
(规范性附录)
培养基的配制

A.1 10%血清肉汤

成分:

普通营养肉汤	100 mL
健康马(兔)血清	10 mL

制法:将血清无菌加入装有普通营养肉汤的中试管中,混匀。

A.2 5%~10%血清琼脂平板

成分:

普通营养琼脂	100 mL
健康马(兔)血清	5 mL~10 mL

制法:将普通琼脂加热熔化,冷至 53℃左右,无菌加入血清,混匀后,倾入平皿,制成平板。

A.3 5%绵羊血液琼脂平板

成分:

普通营养琼脂	100 mL
脱纤维绵羊(马、兔)血液	5 mL

制法:将普通琼脂加热熔化,冷至 53℃左右,无菌加入血液,混匀后,倾入平皿,制成平板。

A.4 美蓝牛乳培养基

成分:

脱脂牛乳	100 mL
1%美蓝水溶液	5 mL

制法:往脱脂后的牛乳中加入 1%美蓝水溶液,混匀,分装于小试管中,以 55 kPa 高压蒸汽灭菌 20 min。
