

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 570—2002

马流产沙门氏菌病诊断技术

Diagnostic techniques for equine abortus salmonellosis

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

马流产沙门氏菌病(equine abortus salmonellosis)是由沙门氏菌或鼠伤寒沙门氏菌等引起的一种以孕马流产为主要特征的马属动物传染病,又名马副伤寒或马沙门氏菌性流产。幼驹感染后表现腹泻、关节肿大、支气管炎或败血症,公马、公驴表现睾丸炎、髻甲肿,在成年马中偶尔发生急性败血性胃肠炎。

马流产沙门氏菌病在世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health (英),Office International des Epizooties (法),OIE]编著的《哺乳动物、禽和蜜蜂 A 类和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册》中虽未单列本病,但在沙门氏菌病一章中规定了诊断试验方法。本标准与上述手册中沙门氏菌病的主要诊断技术病原鉴定和血清学试验基本一致。

本标准的附录 A 为资料性附录。

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、梁焕春、江文正。

马流产沙门氏菌病诊断技术

1 范围

本标准规定了马流产沙门氏菌病的病原学检查及血清学检查的技术要求。
本标准适用于马属动物马流产沙门氏菌病的诊断及检疫。

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—1994 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 细菌学检查

3.1 器材

恒温箱、高压灭菌器、显微镜、灭菌试管、5 mL 灭菌注射器、煮沸消毒器、外科剪、棉棒、镊、载玻片、铂金耳、酒精灯等。

3.2 培养基及试剂

3.2.1 四硫磺酸钠煌绿增菌液(TTB)，见 GB 4789.28—1994 中 4.14,4.15。

3.2.2 沙门-志贺(SS)琼脂，见 GB 4789.28—1994 中 4.22。

3.2.3 尿素琼脂，见 GB 4789.28—1994 中 3.15。

3.2.4 糖发酵管，见 GB 4789.28—1994 中 3.2。

3.2.5 蛋白胨水及靛基质试剂，见 GB 4789.28—1994 中 3.13。

3.2.6 缓冲葡萄糖蛋白胨水、甲基红(MR)试剂及维培(VP)试剂，见 GB 4789.28—1994 中 3.4。

3.2.7 三糖铁琼脂(TSI)，见 GB 4789.28—1994 中 4.26,4.27。

3.2.8 革兰氏染色液，见 GB 4789.28—1994 中 2.2。

3.2.9 沙门氏菌属因子血清(26种，分型用)。

3.2.10 昆明系小鼠，清洁级，体重 17 g~20 g。

3.3 检验程序

马流产沙门氏菌检验流程见附录 A(资料性附录)。

3.3.1 病料标本采集

3.3.1.1 孕马流产胎儿，用外科剪无菌打开腹腔，用注射器吸取腹水或胃内容物注入灭菌试管中；或用外科剪取肝、脾、肾、心等置培养皿中。

3.3.1.2 流产母马胎衣，用灭菌棉棒蘸取黏液或刮取胎衣病变组织置于试管中。

3.3.1.3 公畜精液应于采精后，立即用注射器等吸取，注入试管中。

3.3.1.4 幼驹关节病变局部用碘酒及酒精消毒后，以注射器吸取关节液或肿胀部渗出液，注入试管中待检。

3.3.2 显微镜检查

3.3.2.1 操作方法

将病料标本涂于载玻片上，革兰氏染色，镜检。

3.3.2.2 结果观察

沙门氏菌为两端钝圆的中等大杆菌,有时近似球杆形,单独散在,着色良好,偶见菌体两端着色较深,革兰氏阴性。

3.3.3 分离培养

3.3.3.1 操作方法

用铂金耳钩取病料标本,接种于TTB增菌液中做增菌培养,同时接种于普通琼脂、SS琼脂做分离培养,于37℃恒温箱中孵育18h~24h。

3.3.3.2 培养特性观察

见到下述培养特性时,符合沙门氏菌特性。

3.3.3.2.1 TTB增菌液

生长良好,均匀混浊,管底有黏稠沉淀物。

3.3.3.2.2 普通琼脂

正圆形、表面光滑、微隆起、闪光、半透明、边缘整齐的中等大菌落(直径2mm~4mm)。

3.3.3.2.3 SS琼脂

正圆形、淡桔红色、半透明中等大菌落,产生硫化氢(H₂S)的菌株,有时使菌落中心带黑色。

3.3.4 生化特性鉴定

3.3.4.1 操作方法

3.3.4.1.1 初筛培养

用铂金耳选取上述可疑菌落,先接种于TSI培养基的斜面上,再穿刺接种于底层内,于37℃孵育18h~24h做初筛培养,如果下层培养基变黄色、混浊,并产生气体,上层斜面颜色不变仍为红色,有些菌株产生硫化氢时,则使培养基呈黑色。以上符合沙门氏菌的特征。

3.3.4.1.2 鉴别培养

从符合沙门氏菌特征的上述斜面培养物上钩菌,分别接种于生化试验用培养基,37℃恒温箱孵育24h~96h。

3.3.4.2 生化特性

生化特性见表1。

表1 细菌生化特性

细菌名称	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	蔗糖	卫矛醇	鼠李糖	山梨醇	木胶糖	伯胶糖	鞣糖	肌醇	杨苷	侧金盏花醇	胨基质	硫化氢	尿素	MR试验	VP试验	动力
马流产沙门氏菌	⊕	-	⊕	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-	-	-	√	-	+	-	+
鼠伤寒沙门氏菌	⊕	-	⊕	⊕	-	⊕	√	⊕	√	⊕	√	-	-	-	-	√	-	+	-	+
肠炎沙门氏菌	⊕	-	⊕	⊕	-	√	⊕	⊕	⊕	√	⊕	-	-	-	-	√	-	+	-	+
都柏林沙门氏菌	⊕	-	⊕	⊕	-	-	√	⊕	√	√	⊕	-	-	-	-	√	-	+	-	+

注: - 阴性, + 阳性, ⊕ 产酸产气, √ 不定。

3.3.5 抗原构造分析

3.3.5.1 操作方法

用铂金耳自上述的TSI斜面上钩取培养物,于滴有生理盐水的载玻片上轻磨成乳剂,如无凝集现象,即认为鉴定的细菌无自凝性;此时,将钩取的细菌按以下顺序与滴加在载玻片上的沙门氏菌属因子血清(见3.2.9)混合,做定性凝集试验,在2min内根据凝集情况,判定结果。

首先用沙门氏菌属A-F群混合因子血清确定被检细菌是否沙门氏菌。在确定为沙门氏菌的基础上,再用具有代表意义的主要O抗原因子血清如2、4、7、8、9、3、10、11等8种分别做反应,确定其属于

哪一个血清群；确定了血清群后，再根据 H 抗原的不同，选用第一相和第二相 H 因子血清做反应，进行分型。

3.3.5.2 结果判定

如与 A-F 群 O 因子血清凝集，定为沙门氏菌；与 O 因子血清 4 凝集定为 B 群；第一相缺，与第二相 H 因子血清 e,n,x 凝集，则 H 抗原定为 e,n,x；抗原式为 4,12-e,n,x，血清型定为马流产沙门氏菌。

3.3.6 小鼠接种试验

3.3.6.1 操作方法

用注射器吸取流产胎儿胃内容物等标本 0.1 mL~0.2 mL，给小鼠腹腔注射，观察 3 d~5 d。

3.3.6.2 试验结果

小鼠在接种后的 1 d~3 d 内死亡。根据需要可剖检，取脾脏等按 3.3.2 做显微镜检查，按 3.3.3 分离培养，按 3.3.4 做生化特性鉴定和按 3.3.5 做抗原构造分析，然后根据上述试验的阳性结果，可报告检出的是马流产沙门氏菌强毒株。

应当注意的是，在极个别情况下，可能检出沙门氏菌的其他血清型，此时，可根据表 1 和表 2 的内容予以鉴别。

表 2 细菌抗原构造

群 别	血 清 型	O 抗原	H 抗原	
			第一相	第二相
B	马流产沙门氏菌	1,4,5,12	—	e,n,x
B	鼠伤寒沙门氏菌	1,4,5,12	i	1,2
D	肠炎沙门氏菌	1,9,12	g,m	—
D	都柏林沙门氏菌	1,9,12	g,p	—

3.3.7 综合判定

根据以上所检细菌的形态特征及培养性状，初步报告检出了沙门氏菌。根据细菌的生化特性和抗原构造，报告检出了马流产沙门氏菌。根据小鼠接种试验的结果，报告检出的马流产沙门氏菌为强毒株。

4 血清学检查

4.1 试管凝集试验

4.1.1 器材

恒温箱、试管架、酒精灯、铂金耳、剪毛剪、采血针、煮沸消毒器、13 mm×110 mm 反应管、120 mm×150 mm 玻璃板、0.1 mL、1.0 mL、2.0 mL 及 5.0 mL 吸管、微量加样器、牙签、火柴杆等。

4.1.2 诊断液

马流产凝集试验抗原与阴性、阳性血清。

4.1.3 稀释液

0.5% 苯酚(俗称石炭酸)生理盐水，称取 0.85 g 氯化钠(化学级)、0.5 g 石炭酸(化学级)，加蒸馏水至 100 mL，溶解、过滤，以 103.41 kPa 高压蒸汽灭菌。

4.1.4 消毒液

3% 来苏儿、5% 石炭酸、0.1% 新洁尔灭、2% 碘酒、75% 酒精。

4.1.5 被检血清

在被检马左侧颈沟三分之一处剪毛，用 3% 来苏儿、5% 碘酒和 75% 酒精依次消毒后，自颈静脉采血约 5 mL，注入试管中，凝固后，分离血清，待检。

4.1.6 操作方法

4.1.6.1 试验步骤

取小反应管 6 支，按表 1 排成一列，除第一支用作被检血清的稀释外，其余 5 支分别标明 1:200、

1:400、1:800、1:1600 及对照(每次检验只做一管)字样,置于试管架上,然后用吸管吸取 0.5%石炭酸生理盐水,除第一管和第二管各加 1.8 mL 外,其余 4 管均加 1 mL,再用 1 mL 吸管吸取被检马血清 0.2 mL 加至第一管中,混合后,即为 1:10 稀释,由此管吸取稀释的血清 0.2 mL 加至第二管中,混合后,即为 1:100 稀释,以后由第二管吸取 1 mL 加入第三管,混合后吸出 1 mL 加至第四管,依此逐次至第五管,混合后,吸出 1 mL 弃去。其稀释度分别为 1:200、1:400、1:800。第六管为对照,不加血清。然后在第二、三、四、五、六各管内分别滴加 1:20 稀释的抗原 1 mL,充分振荡混合后,各管的血清稀释度即分别提高一倍,成为 1:200、1:400、1:800 及 1:1600。最后将反应管置 37℃ 恒温箱内感作 24 h,取出,判定反应强度(见表 3)。

表 3 马流产沙门氏菌病试管凝集试验操作方法

要素/mL		被检马血清最终稀释倍数					对 照
		1:10	1:200	1:400	1:800	1:1600	
0.5%石炭酸生理盐水		1.8	1.8	1.0	1.0	1.0	1.0
被检血清	→0.2		0.2	1.0	1.0	1.0	
1:20 抗原			1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
振摇混匀后,置 37℃ 恒温箱中感作 24 h,判定结果							
结果	阴性反应		+++	++	+	-	-
	疑似反应		++++	+++	++	+	-
(例)	阳性反应		++++	++++	+++	++	-
注:凝集强度的判定见 4.1.6.2。							

4.1.6.2 凝集强度判定标准

按凝集的有无及凝集强度,分别用++++、+++、++、+、-等记号作记录,具体是:

“++++”管底有多量紧密边缘整齐或不整齐的凝集物沉淀,上部液体完全透明(即 100%的菌体凝集)。振荡后,管底沉淀呈颗粒状分散于液体中。

“+++”管底有较多凝集物沉淀,唯上部液体微混浊(即 75%的菌体凝集)。

“++”管底有中等量凝集物沉淀,呈颗粒状,液体呈中等程度混浊(即 50%的菌体凝集)。振荡时,沉淀极易摇碎。

“+”管底有少许沉淀,颗粒微细,液体混浊,不透明(即 25%的菌体凝集)。

“-”管底无任何沉淀,液体完全混浊,不透明。

4.1.6.3 对照试验

按 4.1.6.1 的操作方法分别对标准阳性、阴性血清做检查。如阳性血清的凝集价在 1:1600(+++)以上,阴性血清不凝集,说明实施反应的条件正常,可对被检血清呈现的结果作判定。

4.1.7 结果判定

按凝集强度,根据以下规定作出诊断:

阳性反应:1:1600 凝集强度达++或以上时。

疑似反应:1:800 凝集强度达++或以上时。

阴性反应:1:800 凝集强度只达+或以下时。

初检疑似的马,间隔一周复检。复检一次后呈阳性或呈疑似反应者,判为阳性反应。复检一次后,呈阴性反应,再复检一次,仍呈阴性反应,又无临床症状者判为阴性马。

4.2 平板凝集试验

检疫时可用以代替试管凝集试验。

4.2.1 操作方法

以 0.1 mL 吸管或微量加样器吸取事先以 0.5% 石炭酸生理盐水做 1:10 稀释的被检马血清,分别往 120 mm×150 mm 玻璃板上事先已用玻璃笔画有横四纵四线构成的方格内,分别滴加 0.05 mL、0.03 mL、0.02 mL、0.01 mL,再用另一支 1.0 mL 吸管吸取抗原,往每滴血清中加 0.05 mL 后,用火柴杆或牙签自血清量少的一侧开始向血清量多的一侧搅拌混匀,置室温下,于 15 min 内判定结果。与此同时,滴加阳性血清、阴性血清及 0.5% 石炭酸生理盐水各 0.05 mL 于玻璃板上的另外三个方格内,各加抗原 0.05 mL 混匀,做对照。

4.2.2 结果判定

如阳性、阴性血清及石炭酸生理盐水对照均正确,则试验成立。被检出清 0.05 mL 滴度不凝集或微有凝集为阴性反应,0.05 mL~0.03 mL 血清滴度凝集为疑似反应,0.02 mL 血清滴度以下凝集的为阳性反应。呈现疑似反应者,须用试管凝集试验复检,并依该结果做判定。

5 综合判定

细菌学的检查结果是确诊马流产沙门氏菌病的依据。至于临床症状和血清学的检查结果只是诊断本病的一种辅助手段。但血清学检查对马群的检疫是有意义的。

附录 A
(资料性附录)
马流产沙门氏菌检验流程图

马流产沙门氏菌检验流程见图 A.1。

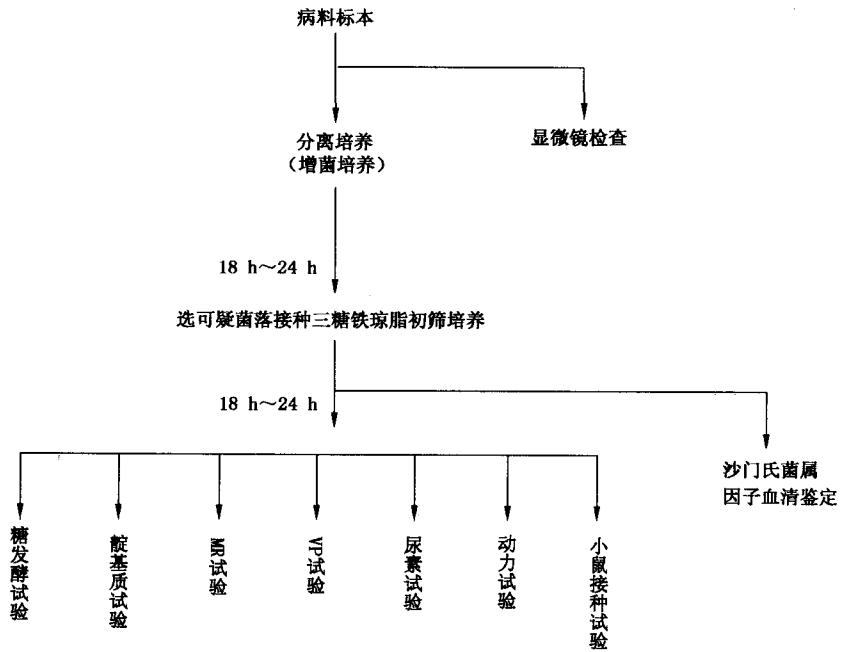


图 A.1 马流产沙门氏菌检验流程图