



中华人民共和国国家标准

GB/T 27530—2011

牛出血性败血症诊断技术

Diagnostic techniques for bovine haemorrhagic septicaemia

2011-11-21 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：甘肃农业大学。

本标准主要起草人：胡永浩、包世俊、伏小平、曾巧英、温峰琴、杨学山、邢小勇、郝宝成、项海涛。

牛出血性败血症诊断技术

1 范围

本标准规定了牛出血性败血症(bovine haemorrhagic septicaemia, HS)的临床与病理学诊断及病原学诊断的方法和技术要求。

本标准适用于口岸、产地及集散地牛出血性败血症的诊断、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/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂。

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

AGID:琼脂凝胶扩散试验(agar gel immunodiffusion test)

CIEP:对流免疫电泳试验(counter immunoelectrophoresis test)

CSY:酪蛋白-蔗糖-酵母琼脂(casein/sucrose/yeast agar)

HS:出血性败血症(haemorrhagic septicaemia)

IHA:间接血凝试验(indirect haemagglutination test)

PB:磷酸盐缓冲液(phosphate buffer)

RBCs:红细胞(red blood cells)

4 临床与病理学诊断

4.1 流行特征

黄牛、水牛、牦牛和奶牛均可感染发病。患病动物、带菌动物为传染来源。有时,健康畜禽的口腔、扁桃体和上呼吸道带菌。畜群中发生巴氏杆菌病而查不出传染源时,一般认为家畜在发病前已经带菌。病畜由其排泄物、分泌物排出有毒力的病菌,污染饲料、饮水、用具和外界环境,经消化道而传染给健康家畜。或由咳嗽、喷嚏排出病菌,通过飞沫经呼吸道发生传染。也可通过有伤口的皮肤、黏膜发生传染。吸血昆虫叮咬也可传播病菌。

本病的发生一般无明显的季节性。通常呈散发性流行,在畜群中少数几头动物先后发病。水牛、牦牛有时可呈地方性流行。发病率、病死率均高。寒冷、闷热、潮湿、拥挤、气候剧变、阴雨连绵、圈舍通风不良、营养缺乏、饲料突变、过度疲劳、长途运输以及其他疾病、感染等是诱发因素。

4.2 临床症状

4.2.1 败血型:病牛病初体温高达 $41^{\circ}\text{C}\sim 42^{\circ}\text{C}$,呼吸及心跳加快,鼻镜干裂,皮温不整,食欲减退甚至废绝。病初便秘,后腹泻,粪便始呈粥样,后为液状并混有黏液、黏膜片及血液,恶臭。有时出现鼻漏和血尿。腹泻开始后体温下降,不久即死亡。病程多为 $12\text{ h}\sim 24\text{ h}$ 。

4.2.2 浮腫型:除呈现体温升高等一般性全身症状外,病牛颈部、咽喉部及胸前部皮下出现迅速扩展的炎性水肿,同时伴有舌及周围组织的高度肿胀,舌多伸出齿外,呈暗红色。呼吸高度困难,皮肤和黏膜发绀,常因窒息或下痢而死。病程多为 $12\text{ h}\sim 36\text{ h}$ 。

4.2.3 肺炎型:除呈现体温升高等一般性全身症状外,病牛主要表现为急性纤维索性胸膜肺炎的症状。体温升高,呼吸困难,干咳,流泡沫样鼻液,后鼻液呈脓性。胸部叩诊有痛感。病初便秘,后腹泻,粪便恶臭并混有血液。病程一般3 d~7 d左右。

4.3 病理剖检

4.3.1 败血型:皮下、各部位黏膜、浆膜、肌肉等均有出血点。胸腹腔有大量渗出液。真胃、小肠及大肠常见出血性炎症,肠内容物稀薄且多混有血液。淋巴结显著水肿。脾点状出血但不肿大。肺淤血、水肿。

4.3.2 浮肿型:咽喉部、颈部及肢体部皮下水肿,切开水肿部位流出深黄色透明液体,间或杂有出血。咽周围组织及会厌软骨韧带呈黄色胶样浸润,咽淋巴结和颈淋巴结肿胀。上呼吸道黏膜卡他性炎症。

4.3.3 肺炎型:胸腔中有大量浆液性纤维索性渗出液,肺脏和胸膜表面有小出血点并覆有纤维素膜,肺脏切面呈大理石状。心包与胸膜粘连,内有干酪样坏死物。胃肠道急性卡他性炎症和出血性炎症。淋巴结肿大,呈紫色,布满出血点,尤以支气管淋巴结与纵膈淋巴结最为明显。

4.3.4 依据流行特征、临床症状以及病理变化可作出初步诊断,确诊要进行病原学诊断。

5 病原学诊断

5.1 病料采集及处理

无菌采集病死动物的体腔渗出液、血液、肝脏、脾脏、淋巴结等新鲜病料,及时送检或置冷暗处保存备用。死亡时间较长的病例可采集长骨骨髓作为病料。可现场制作病料涂片或触片,供染色镜检。

5.2 染色镜检

采集病料涂片或触片,染色后置显微镜下观察。革兰氏染色(按 GB/T 4789.28—2003 中 2.2 规定操作)可见革兰氏阴性的短杆菌或球杆菌,菌体大小为 $(0.2\ \mu\text{m}\sim 0.4\ \mu\text{m})\times(0.6\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \mu\text{m})$ 。瑞氏染色(按 GB/T 4789.28—2003 中 2.6 规定操作)和美蓝染色(按 GB/T 4789.28—2003 中 2.1 规定操作)时菌体两极浓染,印度墨汁染色(见附录 A)可见明显的荚膜。

慢性病例或腐败材料常不易发现典型细菌,应该经分离培养后再行染色镜检。

镜检观察到典型菌体,结合流行特点、症状和病变,可初步诊断为本病。进一步进行病原分离鉴定以作出确切诊断。

5.3 病原分离鉴定

5.3.1 病原分离

病料分别接种麦康凯琼脂培养基(见附录 B)、酪蛋白-蔗糖-酵母(CSY)琼脂培养基(见附录 B)和鲜血琼脂培养基(见附录 B),置 37℃ 条件下培养 18 h~24 h 后,挑选可疑菌落进行鉴定。当病料中细菌含量小时,可用 5% 血清肉汤(按照 GB/T 4789.28—2003)于 37℃ 进行增菌培养。

5.3.2 病原鉴定

5.3.2.1 培养特性

多杀性巴氏杆菌在麦康凯琼脂培养基上不生长。在血液琼脂培养基上经 18 h~24 h 后可长成圆形、光滑、湿润、有灰白色光泽的半透明菌落,直径约 1 mm,菌落周围无溶血现象。在 CSY 琼脂培养基上菌落通常大于血液琼脂培养基上的菌落。老龄培养物,特别是在无血培养基上的老龄培养物,形成的菌落小于血液琼脂培养基上的菌落。

5.3.2.2 菌体形态

取血液琼脂培养基上生长 18 h~24 h 的典型菌落涂片,革兰氏染色镜检可见革兰氏阴性的球杆菌,菌体大小为 $(0.2\ \mu\text{m}\sim 0.4\ \mu\text{m})\times(0.6\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \mu\text{m})$ 。

5.3.2.3 生化试验

5.3.2.3.1 取纯培养的待检菌少许接种发酵管(见附录 B),置 37℃ 培养,每天观察并记录结果。多杀性巴氏杆菌可分解葡萄糖、果糖、半乳糖、单奶糖、蔗糖和甘露糖,产酸不产气;不发酵棉子糖、乳糖、鼠李

糖、菊糖、水杨苷、肌醇。

5.3.2.3.2 MR、VP 试验(按 GB/T 4789.28—2003 中 3.4 规定操作)阴性。

5.3.2.3.3 吲哚试验(按 GB/T 4789.28—2003 中 3.13 规定操作)阳性。

5.3.2.3.4 氧化酶试验(按 GB/T 4789.28—2003 中 3.18 规定操作)、过氧化氢酶试验(按 GB/T 4789.28—2003 中 3.20 规定操作)阳性、 β -半乳糖苷酶试验(按 GB/T 4789.28—2003 中 3.3 规定操作)、脲酶试验(按 GB/T 4789.28—2003 中 3.15 规定操作)阴性。

5.3.2.3.5 硝酸盐还原试验(按 GB/T 4789.28—2003 中 3.17 规定操作)阳性、柠檬酸盐利用试验(按 GB/T 4789.28—2003 中 3.5 规定操作)阴性。

5.3.2.3.6 硫化氢试验(按 GB/T 4789.28—2003 中 3.14 规定操作)阴性、明胶液化试验(按 GB/T 4789.28—2003 中 3.10 规定操作)阴性。

5.3.2.3.7 依据病原培养特性、菌体形态、生化试验,符合多杀性巴氏杆菌特征者可作出确定诊断。必要时进行血清分型试验和动物接种试验。

5.3.2.4 血清分型试验

5.3.2.4.1 间接血凝试验

5.3.2.4.1.1 材料

所用材料如下所示:

- a) 标准菌及待检菌荚膜抗原(见附录 C)。
- b) 特异性抗血清(见附录 C)。
- c) 1%新鲜绵羊红细胞(见附录 C)。
- d) 致敏绵羊红细胞(见附录 C)。
- e) 阿氏液(Alsever's 液)(见附录 A)。
- f) 80 孔血凝反应板(大孔板)。

5.3.2.4.1.2 方法

间接血凝试验方法步骤如下所示:

- a) 反应板每排第 1 孔加入 0.85% NaCl 溶液 0.72 mL,自第 2 孔起各孔分别加入 0.85% NaCl 溶液 0.4 mL。
- b) 各型特异性抗血清各自单独一排稀释,第 1 孔加入血清 0.08 mL,混匀,移取 0.4 mL 到下一孔。同样方法稀释至第 7 孔。
- c) 每孔加入 0.4 mL 致敏绵羊红细胞。
- d) 同时设如下对照:
 - 血清对照:血清(10 倍稀释)0.4 mL+加 1%新鲜绵羊红细胞 0.4 mL。
 - 绵羊红细胞对照:1%新鲜绵羊红细胞 0.4 mL+0.85%NaCl 溶液 0.4 mL。
 - 抗原对照:1%致敏绵羊红细胞 0.4 mL+0.85%NaCl 溶液 0.4 mL。
 - 反应程序见表 1。

表 1 间接血凝试验(荚膜分型)反应程序

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8(抗体对照)	9(抗原对照)	10(绵羊红细胞对照)
血清稀释倍数	20	40	80	160	320	640	1 280	—	—	—
含 0.3% 甲醛的 0.85%NaCl/mL	0.72	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.36	0.4	0.4
型特异性抗血清加量/mL	0.08	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4 (弃去)	—	—
1%致敏红细胞/mL	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	—	0.4	—
1%新鲜红细胞/mL	—	—	—	—	—	—	—	0.4	—	0.4

加样后,轻微震荡,置室温,分别于 2 h~18 h 判读并记录结果。

e) 结果判定:绵羊红细胞沿着凹孔坡面呈絮块状凝集为阳性,在孔中央形成钮扣状为阴性。依据凝集范围的大小判定凝集程度为以下几级:

——“++++”:凝集颗粒细密并均匀地分布在整個孔底,边缘不整齐,示 100%凝集。

——“+++”:凝集的绵羊红细胞平铺孔底,但有卷边或缺口,示 75%凝集。

——“++”:凝集的红细胞平铺孔底,呈片层或沙撒布样,分布不均匀,边缘不整齐,示 50%凝集。

——“+”:绵羊红细胞凝集面积较小,凝集程度轻微,边缘稍增厚,示 25%凝集。

——“-”:绵羊红细胞沉积在孔中央,如小圆盘或钮扣状,示无凝集。

以“++”为样品的滴度终点。当抗原与抗血清之间出现明显 50%或 50%以上凝集者,判读为阳性,抗原与抗血清之间出现 25%或无凝集者,判读为阴性。未知菌株用具有凝集性的抗血清进行鉴定,若与所有血清都没有发生凝集反应,则用该方法对菌株无法分型。

5.3.2.4.2 琼脂凝胶免疫扩散试验

5.3.2.4.2.1 材料

所用材料如下所示:

a) 琼脂。

b) 0.85%NaCl 溶液。

c) 1%硫柳汞溶液。

d) 菌体抗原(见附录 C)。

e) 多杀性巴氏杆菌菌体分型血清,1~16 个血清型(见附录 C)。

5.3.2.4.2.2 方法

琼脂凝胶免疫扩散试验方法步骤如下所示:

a) 琼脂凝胶平板的制备:取 0.9 g 优质琼脂加入 90 mL 0.85%NaCl 溶液中,加热溶化后再加入 1%硫柳汞溶液 1 mL,最后加入适量 0.85%NaCl 溶液定容至 100 mL。冷却至 45℃~50℃,倾注水平放置的洁净载玻片、玻璃片或平皿(凝胶厚度为 2.5 mm~3 mm)。

b) 打孔:琼脂冷凝后打孔,孔径 4 mm,孔距 6 mm,每组 7 孔,如图 1 所示。孔内琼脂小心用针头挑出,以防破坏周围琼脂,随后用酒精灯加热封底。

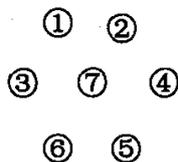


图 1 免疫琼脂双向扩散打孔示意图

c) 加样:中央孔加待检抗原(见附录 C 中 C.5),不同菌体型特异的抗血清加入周边孔内(以加满不溢出为度)。

d) 感作:加样完毕后,静置 10 min,然后置带盖湿盒中,在 37℃恒温培养箱中反应。24 h~48 h 后观察并判定结果,72 h 为最终判定时间。

e) 结果判定:将琼脂板置于暗背景的自然光下或强光照射下观察。抗原孔与抗血清孔之间出现清晰沉淀线者为阳性,未出现沉淀线者为阴性。所有能引起出血性败血病的血清型菌株均能与 2 型抗血清反应,与 5 型抗血清也可能发生交叉反应。琼脂凝胶免疫扩散试验也可用于荚膜分型。荚膜分型所用的抗原及抗血清与间接血凝法相同(见附录 C)。所用琼脂凝胶配成 1%浓度(见附录 A 中 A.5)。

5.3.2.4.3 对流免疫电泳试验

5.3.2.4.3.1 材料

所用材料如下所示：

- 荚膜抗原(见附录 C)。
- 荚膜型特异性抗血清(见附录 C)。
- 巴比妥缓冲液(见附录 A)。
- 对流免疫电泳介质(见附录 A)。
- 0.85%NaCl 溶液。
- 电泳仪、打孔器、微量加样器。

5.3.2.4.3.2 方法

对流免疫电泳试验方法步骤如下所示：

- 琼脂玻片的制备：将 12 mL 电泳介质倾注玻板(57 mm×70 mm)，制成厚度为 2 mm~3 mm 电泳板。
- 打孔：琼脂冷却后打孔，一排 7 孔，孔径 4 mm，孔间距 7 mm，按图 2 所示。另外设一排对照组，其组内各孔中心之间的距离为 6 mm。挑去孔内琼脂，封底。

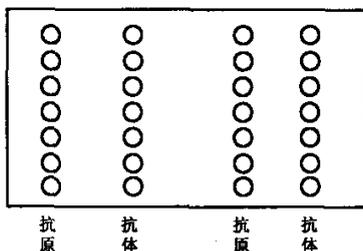


图 2 对流免疫电泳试验抗原、抗体加样孔位置图

- 加样：同一组加样孔中，阴极端的孔中加入 20 μ L 荚膜抗原，同时在阳极端的孔中加等量的抗血清。对照组分别用 0.85%NaCl 溶液与阳性抗血清配对和荚膜抗原与阴性兔血清配对。
- 电泳：电泳槽加入适量 pH8.8 巴比妥缓冲液，150 V(25 V/cm)电泳 30 min，观察电泳出现的沉淀线。
- 结果判定：抗原和抗血清孔之间出现明显的沉淀线者判为阳性，不出现沉淀线者判为阴性。

5.3.2.5 动物接种试验

将 5.1 采集的病料用灭菌 0.85%NaCl 溶液制成 1:10 悬液(体腔渗出液可直接用于接种)，或用 5%血清肉汤(按照 GB/T 4789.28—2003 中 4.74)24 h 的培养液，皮下或腹腔接种 18 g~22 g 健康小鼠 4 只~8 只，每只 0.2 mL。同时取 4 只~8 只清洁级小鼠注射等量无菌 0.85%NaCl 溶液作为对照。隔离饲养观察。多杀性巴氏杆菌强毒株多于 12 h~72 h 内致死小鼠。采集死亡小鼠心血和实质脏器，按 5.2 染色镜检，按 5.3 进行病原分离鉴定。

6 确诊

当病原学诊断检出多杀性巴氏杆菌时，依据致病特性，结合临床症状和病理变化，即可作出确定诊断。

附录 A
(规范性附录)
溶液及电泳介质的配制

A.1 印度墨汁染色

A.1.1 试剂:印度墨汁。

A.1.2 操作:将标本与一滴印度墨汁染色液在载玻片上混合,加盖玻片,轻压一下,使标本混合液变薄,在显微镜下观察。

A.2 阿氏液(Alsever's 液)

A.2.1 成分

葡萄糖	2.05 g
柠檬酸钠($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5H_2O$)	0.80 g
柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	0.05 g
NaCl	0.42 g

A.2.2 制法

上述成分加蒸馏水至 100 mL,混合过滤,116 °C 灭菌 15 min 备用。

A.3 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(PB)

A.3.1 成分

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$

A.3.2 制法

先配制 0.2 mol/L 的 NaH_2PO_4 (A 液) 和 0.2 mol/L 的 Na_2HPO_4 (B 液),两者按一定比例混和即成 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液。

A 液:称取 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 31.2 g,加双蒸水充分溶解定容至 1 000 mL。

B 液:称取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.632 g,加双蒸水充分溶解定容至 1 000 mL。

取 A 液 19.0 mL, B 液 81.0 mL 混合后摇匀即得 0.2 mol/L, pH7.4 的 PB。

A.4 巴比妥醋酸盐缓冲液(巴比妥缓冲液)

巴比妥钠 29.24 g,无水醋酸钠 11.70 g,0.1 mol/L 盐酸 180 mL,加蒸馏水到 3 L,调整 pH 为 8.8。

A.5 对流免疫电泳介质

对流免疫电泳介质成分:琼脂糖 2.0 g,巴比妥钠 2.06 g,二乙基巴比妥酸 0.37 g,蒸馏水 180 mL 及 0.01% 的硫柳汞 20 mL。

附录 B
(规范性附录)
培养基的配制

B.1 麦康凯琼脂培养基

称取适量干粉麦康凯琼脂培养基,按使用说明制作培养平板。

B.2 酪蛋白-蔗糖-酵母(CSY)琼脂培养基**B.2.1 成分**

水解酪蛋白	3 g
蔗糖	3 g
酵母浸膏	5 g
氯化钠	5 g
无水磷酸氢二钾	3 g

B.2.2 制法

加蒸馏水至 1 L,完全溶解后调 pH 值至 7.3~7.4 后加入 1.5% 琼脂,116 °C 高压灭菌 15 min。冷却至 45 °C~50 °C 时加入 5% 的犊牛血清并倾注平皿制成平板培养基。

B.3 鲜血琼脂培养基**B.3.1 成分**

牛肉膏	5 g
蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
磷酸氢二钾	1.0 g
琼脂粉	25 g
蒸馏水	1 000 mL

B.3.2 制法

先将牛肉膏、蛋白胨、氯化钠和磷酸氢二钾溶于蒸馏水,调 pH 至 7.4~7.6,再加入琼脂粉,混匀并高压灭菌后,冷却至 50 °C 时加入无菌脱纤家兔鲜血 5%,充分混合后倾注平皿制成平板培养基。

B.4 糖发酵管**B.4.1 成分**

蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
糖(醇、苷)	10 g
0.2% 的溴香草酚蓝溶液	12 mL
蒸馏水	1 000 mL

B.4.2 制法

各成分加热溶于水并调 pH 至 7.4,分装试管,116 °C 高压灭菌 15 min。

附录 C
(规范性附录)

多系性巴氏杆菌分型抗原及致敏绵羊红细胞的制备方法

C.1 荚膜抗原制备

将参考菌株(待检菌株)6 h~8 h 肉汤培养物 1 mL 均匀涂布到 CSY 血液琼脂平皿上(直径 90 mm),37 ℃ 培养过夜。用 3 mL 含 0.3% 甲醛的 0.85% NaCl 溶液将生长物洗下,56 ℃ 加热 30 min 后,4 ℃ 3 000g 离心 15 min,收集上清液保存在-20 ℃ 备用。若没有冷冻离心机,则 1 500g 离心 30 min,上清液作为抗原提取物。

C.2 不同荚膜型特异性抗血清的制备和处理

C.2.1 制备

将 Cartor A、B、D、E 标准菌株分别接种于 CSY 血液琼脂培养基上,37 ℃ 培养 18 h~20 h,用含 0.3% 甲醛 NaCl 溶液将生长物洗下,将菌体悬液的浊度调到与布朗氏比浊管的第 4 管相同。每间隔 3 d~4 d 给兔静脉内注射菌液一次,注射量分别为 0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL 及 2.0 mL。最后一次注射后 1 周,取 0.5 mL 相同的活菌悬液,给兔皮下或肌肉接种。10 d 后采血收集血清,血清保存于-20 ℃,而常用的少量血清可加入硫柳汞至 0.01%,4 ℃ 保存。

C.2.2 处理

用前将 1 份压积绵羊红细胞加入 3 份血清中,室温作用 30 min,离心除去绵羊红细胞,经 56 ℃ 灭活 30 min 即可。

C.3 新鲜绵羊红细胞的制备

无菌采取绵羊血液,脱纤后,用 6 倍~8 倍的 0.85% NaCl 溶液洗涤 3 次,每次皆用离心法收集绵羊红细胞(500 g),最后一次收集的绵羊红细胞,应恢复到原血量的一半。置 2 ℃~8 ℃ 保存,2 d 内使用。

C.4 致敏绵羊红细胞的制备

取 3 mL 荚膜抗原(见附录 C 中 C.1),加入 0.2 mL 洗净的绵羊红细胞(见附录 C 中 C.3),充分混匀,37 ℃ 振荡作用 2 h,离心去上清,再用 10 mL 0.85% NaCl 溶液洗涤一次,离心悬浮于 20 mL 0.85% NaCl 溶液,即为 1% 的致敏绵羊红细胞悬液。

C.5 菌体抗原制备

将细菌接种血液琼脂平板培养 24 h 后,用 1 mL 含 0.3% 甲醛的 8.5% NaCl 溶液冲洗并收获生长物。悬浮液 100 ℃ 水浴中加热 1 h,离心弃沉淀,取上清液即为琼脂凝胶免疫扩散试验抗原。

C.6 菌体分型抗血清的制备

12 周龄~16 周龄公鸡颈中部皮下接种 1 mL 油乳菌苗(油乳菌苗制苗菌株选用分离自牛的 6 : B

型多杀性巴氏杆菌,制备方法参见《中华人民共和国兽药典》(2005年版 三部)“禽多杀性巴氏杆菌病油乳剂灭活疫苗”,3周后胸部肌肉内再接种1 mL(在胸骨的两侧各接种0.5 mL)。1周后采血,分离血清,并加0.01%硫柳汞或0.06%石炭酸防腐保存。出现交叉反应的血清应弃去。
