

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3190—2018

猪副伤寒诊断技术

Diagnostic techniques of swine paratyphoid

2018-03-15 发布

2018-06-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部兽医局提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:扬州大学、中国动物卫生与流行病学中心。

本标准主要起草人:吴艳涛、张小荣、陈健皓、姜雯、王岩、高崧、陈素娟、彭大新、焦新安。

引 言

猪副伤寒即猪沙门氏菌病,主要包括由猪霍乱沙门氏菌所导致的仔猪急性败血症、亚急性和慢性坏死性肠炎,以及由鼠伤寒沙门氏菌引起的仔猪小肠结肠炎。虽然猪霍乱沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌以外的其他沙门氏菌亦有可能感染猪,但仅偶尔引起临床疾病。猪副伤寒对养猪业危害很大,我国将其列为二类动物疫病。此外,沙门氏菌也是人类食物中毒的常见病原菌。除了依据临床诊断外,猪副伤寒的诊断依赖于对沙门氏菌的分离和鉴定,尤其是对猪霍乱沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的分离和鉴定。制定猪副伤寒诊断技术标准对于有效防控该病以及保障人类食品安全具有重要的意义。

猪副伤寒诊断技术

1 范围

本标准规定了猪副伤寒临床诊断和实验室诊断的技术要求。
本标准适用于猪副伤寒的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 4789.4—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

3 缩略语

DMSO: 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide)

dNTP: 三磷酸脱氧核苷酸(deoxynucleoside triphosphate)

EB: 溴化乙锭(etidium bromide)

TBE: 三羟甲基氨基甲烷-硼酸-乙二胺四乙酸缓冲液(tris-boracic acid-EDTA buffer)

4 设备和材料

4.1 仪器设备及耗材

4.1.1 37℃培养箱和42℃培养箱。

4.1.2 玻璃研磨器或组织匀浆机。

4.1.3 台式高速离心机。

4.1.4 生物安全柜。

4.1.5 PCR扩增仪。

4.1.6 电泳仪。

4.1.7 电泳槽。

4.1.8 紫外凝胶成像系统。

4.1.9 冰箱(2℃~4℃、-20℃和-70℃三种)。

4.1.10 微量移液器(5 μL, 10 μL, 20 μL, 100 μL, 1 000 μL)及配套的吸头。

4.2 试剂

4.2.1 普通营养琼脂、鲜血琼脂、电泳缓冲液(0.5×TBE)的配制,参见附录A。

4.2.2 麦康凯琼脂、亚硫酸铋(BS)琼脂、Hektoen Enteric(HE)琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、沙门氏菌属显色培养基、亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液、四硫磺酸钠煌绿(TTB)增菌液、缓冲蛋白胨水(BPW)、三糖铁(TSI)琼脂、蛋白胨水及胍基质试剂、尿素琼脂(pH 7.2)、氰化钾(KCN)培养基、赖氨酸脱羧酶试验培养基、糖发酵管的配制见GB 4789.4—2016附录A。

4.2.3 生化鉴定试剂盒。

4.2.4 沙门氏菌O和H诊断血清。

4.2.5 *Taq* DNA聚合酶。

4.2.6 DNA 分子量标准品。

4.2.7 PCR 引物, 参见附录 B。

5 临床诊断

5.1 流行病学

猪副伤寒散发于 6 月龄以下的猪群(尤其是 1 月龄 ~ 4 月龄的仔猪群), 在饲养管理条件较差的猪群中可呈地方流行性。

5.2 临床症状

5.2.1 败血症

病猪体温突然升高(41℃~42℃), 精神不振, 不食; 随后腹泻, 呼吸困难, 耳根、胸前和腹下皮肤有紫红色斑点。病程 2 d~4 d, 病死率高。

5.2.2 坏死性肠炎

病猪体温升高(40.5℃~41.5℃), 畏寒, 食欲不振, 眼有黏性或脓性分泌物。初便秘后腹泻, 粪便淡黄色或灰绿色, 恶臭。部分病猪出现弥漫性皮肤湿疹和溃疡, 特别在腹部皮肤。病程 2 周~3 周或更长, 最后极度消瘦, 衰竭而死亡。

5.2.3 小肠结肠炎

病猪腹泻, 排黄色水样稀粪, 持续 3 d~7 d。有时反复腹泻 2 次~3 次, 病程长达数周, 粪便中可见少量血液。大多数病猪可康复, 少数生长发育不良。

5.3 病理变化

5.3.1 败血症

病猪的脾脏肿大, 色暗, 坚实似橡皮, 脾髓质不软化; 肝和肾也有不同程度的肿大、充血和出血, 肝脏上有灰黄色坏死点; 肠系膜淋巴结索状肿大; 全身黏膜、浆膜均有不同程度的出血斑点, 胃肠黏膜有急性卡他性炎症。

5.3.2 坏死性肠炎

病猪盲肠、结肠或回肠后段的肠壁增厚, 黏膜表面覆盖糠麸状伪膜, 伪膜剥开后可见不规则的溃疡面; 少数病例的淋巴滤泡周围黏膜坏死, 有纤维蛋白渗出物积聚, 呈隐约可见的轮环状。肠系膜淋巴结索状肿胀, 脾脏肿大, 肝脏上有灰黄色坏死点。

5.3.3 小肠结肠炎

病猪出现局灶性或弥散性的坏死性小肠炎、结肠炎或盲肠炎。肠黏膜粗糙, 表面黏附有灰黄色的组织残骸, 结肠和盲肠内容物被胆汁所染色, 混有黑色、沙子样坚硬物质。

5.4 结果判定

符合 5.1 和 5.2.1、5.2.2、5.2.3、5.3.1、5.3.2、5.3.3 中的任一条, 判为猪副伤寒疑似病例。

6 实验室诊断

6.1 细菌分离与生化、血清型鉴定

6.1.1 样品的采集

无菌采集存活猪的新鲜粪便、肛拭子, 以及病死猪或剖检猪的肝脏、脾脏、肾脏、淋巴结、胆囊内容物和肠内容物。组织样品可剪碎或制成匀浆。

6.1.2 样品保存与运输

样品于 4℃ 冰箱内保存, 并在 24 h 内送到实验室。如果在 24 h 内不能送达的, 应将样品放入 50% 甘油生理盐水或 15% 二甲基亚砷 PBS 中, 混匀, 置于 -20℃ 或 -70℃ 冰箱内保存。

6.1.3 培养方法

6.1.3.1 非污染样品

取组织样品或胆囊内容物,无菌条件下在非选择性琼脂(普通营养琼脂或鲜血琼脂)平板和选择性琼脂(麦康凯琼脂、HE琼脂、XLD琼脂、BS琼脂或沙门氏菌显色培养基等)平板上三区划线接种,置于37℃培养24 h~48 h。同时,将组织匀浆按1:10的体积接种缓冲蛋白胨水(BPW),置于37℃培养4 h~8 h;按1:10的体积转接种SC增菌液或TTB增菌液,分别置于37℃(SC增菌液)或42℃(TTB增菌液)培养24 h;接种选择性琼脂平板,置于37℃培养24 h~48 h。

6.1.3.2 污染样品

将肛拭子、新鲜粪便、肠内容物等样品按1:10的体积接种SC增菌液或TTB增菌液,置于37℃(SC增菌液)或42℃(TTB增菌液)培养24 h;接种选择性琼脂平板,置于37℃培养24 h~48 h。

6.1.4 可疑菌落特征

沙门氏菌在不同培养基上的菌落特征见表1。

表1 沙门氏菌属在不同培养基上的菌落特征

培养基种类	沙门氏菌的菌落特征
普通营养琼脂	菌落无色、透明或半透明,圆形、光滑、较扁平,直径2 mm~4 mm。但猪伤寒沙门氏菌的菌落细小、生长贫瘠
血琼脂	菌落常为灰白色、不溶血
麦康凯琼脂	菌落无色至浅橙色,透明或半透明,中心有时为暗色
HE琼脂	菌落呈蓝绿色或蓝色,多数菌落中心黑色或全黑色;有些菌株为黄色,中心黑色或几乎全黑色。其中,猪霍乱沙门氏菌的菌落呈蓝绿色或蓝色,鼠伤寒沙门氏菌的菌落呈蓝绿色或蓝色且菌落中心黑色或全黑色
BS琼脂	菌落为黑色有金属光泽、棕褐色或灰色,菌落周围培养基可呈现黑色或棕色,有些菌株形成灰绿色的菌落,周围培养基颜色不变。其中,猪霍乱沙门氏菌的菌落呈棕色或灰绿色,周围培养基颜色不变;鼠伤寒沙门氏菌的菌落呈黑色,有金属光泽,菌落周围培养基可呈黑色或棕色
XLD琼脂	菌落呈粉红色,带或不带黑色中心,有些菌株可呈现大的带光泽的黑色中心,或呈现全部黑色的菌落;有些菌株为黄色菌落,带或不带黑色中心。其中,猪霍乱沙门氏菌的菌落呈粉红色,不带黑色中心;鼠伤寒沙门氏菌呈现大的带光泽的黑色中心,或呈现全部黑色的菌落
沙门氏菌属显色培养基	菌落呈紫红色,突起、边缘整齐,湿润,直径1 mm~2 mm

6.1.5 细菌生化鉴定

按照GB 4789.4—2016中5.4的规定执行。

猪霍乱沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌使三糖铁(TSD)琼脂斜面呈碱性(红色)、底层呈酸性(黄色)。

猪霍乱沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的吲哚试验为阴性,甲基红试验为阳性,V-P试验为阴性,不用柠檬酸盐;赖氨酸脱羧酶阳性,尿素酶阴性,氰化钾(KCN)试验阴性;分解葡萄糖、麦芽糖,产酸产气;不分解乳糖。

6.1.6 细菌血清型鉴定

按照GB 4789.4—2016中5.5的规定执行。

猪霍乱沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的抗原组分见表2。

表2 猪霍乱沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的抗原组分

菌名	血清群	O抗原	H抗原	
			第I相	第II相
猪霍乱沙门氏菌	C ₁	6,7	c	1,5
鼠伤寒沙门氏菌	B	1,4,5,12	i	1,2

6.1.7 结果判定

同时符合 6.1.4、6.1.5 和 6.1.6 的结果,可判定样品中检出猪霍乱沙门氏菌或鼠伤寒沙门氏菌。

6.2 沙门氏菌多重 PCR 检测方法

适用于临床样品中沙门氏菌的快速鉴定,也适用于对 6.1.4 的可疑菌落鉴定。

6.2.1 样品的采集、保存与运输

同 6.1.1 和 6.1.2。

6.2.2 样品的增菌

将样品按照 1:10 的体积(或单个菌落)接入 SC 增菌液或 TTB 增菌液,置于 37℃(SC 增菌液)或 42℃(TTB 增菌液)培养 4 h~6 h。

6.2.3 基因组 DNA 的提取

有关生物安全和防止交叉污染的措施见附录 C。

取出 1 mL 增菌培养物,12 000 g 离心 1 min,弃去上清液。加入 1 mL 无菌超纯水,重悬沉淀,12 000 g 离心 1 min,弃去上清液;重复操作 3 次。再加入 100 μL 无菌超纯水,混匀;沸水浴 10 min,冰浴 5 min;12 000 g 离心 1 min,取上清液备用。

亦可使用市售的 DNA 提取试剂盒,具体操作步骤参照说明书。

6.2.4 PCR 引物

多重 PCR 引物由沙门氏菌属特异引物(invAF、invAR)、猪霍乱沙门氏菌特异引物(CSR2F、CSR2R)和鼠伤寒沙门氏菌特异引物(TSR3F、TSR3R)组成,引物的序列及特异性参见附录 B。各引物的终浓度为 10 μmol/L。

6.2.5 对照样品

PCR 试验中对照分别为猪霍乱沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、德尔卑沙门氏菌、都柏林沙门氏菌的液体培养物。阴性对照为灭菌超纯水。

6.2.6 PCR 反应体系及反应条件

采用 25 μL 反应体系,在 PCR 管中按顺序加入以下成分:

10×缓冲液(含 1.5 mmol/L MgCl ₂)	2.5 μL
超纯水	15.25 μL
2.5 mmol/L dNTPs	2.0 μL
5 U/μL Taq DNA 聚合酶	0.25 μL
10 μmol/L 引物	3.0 μL
模板 DNA	2.0 μL

瞬时离心混匀后,置于 PCR 仪中扩增。同时设阳性对照、阴性对照。反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,60℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,35 个循环,72℃延伸 10 min。

6.2.7 PCR 产物检测

6.2.7.1 琼脂糖凝胶电泳

PCR 产物使用含 0.5 μg/mL EB 的 1%琼脂糖凝胶电泳,在 5 V/cm 的电场强度的 TBE 缓冲液中电泳 30 min~40 min。在紫外灯下观察结果。

6.2.7.2 质量控制

如果猪霍乱沙门氏菌阳性对照、鼠伤寒沙门氏菌阳性对照和其他沙门氏菌对照均扩增出大小约 605 bp 的特异性条带,猪霍乱沙门氏菌阳性对照扩增出大小约 198 bp 的特异性条带,鼠伤寒沙门氏菌对照扩增出大小约 303 bp 的特异性条带,而阴性对照未扩增出相应大小的条带,则 PCR 试验有效(参见附录 D)。

6.2.8 结果判定

在 PCR 试验有效的前提下,如扩增出大小约 605 bp 和 198 bp 的特异性条带,判为样品中检出猪霍乱沙门氏菌;如扩增出大小约 605 bp 和 303 bp 的特异性条带,判为样品中检出鼠伤寒沙门氏菌(参见附录 D)。

7 诊断结果判定

猪副伤寒疑似病例:同 5.4。

猪副伤寒确诊病例:5.4 判定的疑似病例按 6.1 或 6.2 的方法检出猪霍乱沙门氏菌或鼠伤寒沙门氏菌。

附 录 A
(资料性附录)
培养基的配方和制法

A.1 普通营养琼脂

A.1.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内,加入 15%氢氧化钠溶液约 2 mL,调 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化。分装,121℃高压灭菌 15 min。

A.2 鲜血琼脂

A.2.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g~20 g
蒸馏水	1 000 mL
灭菌脱纤维羊血或兔血	50~100 mL

A.2.2 制法

取高压好的普通营养琼脂待冷至 45℃~50℃(调 pH 至 7.2~7.4),用无菌操作于每 100 mL 营养琼脂中加灭菌脱纤维羊血或兔血 5 mL~10 mL,轻轻摇匀,立即倾注于平板或分装试管,制成斜面备用。

A.3 0.5×TBE 溶液

A.3.1 成分

硼酸	2.75 g
Tris 碱	5.4 g
0.5 mol/L EDTA pH8.0	2 mL
蒸馏水	1 000 mL
pH	7.3±0.2

A.3.2 制法

0.5 mol/L EDTA pH8.0 的配制:在 800 mL 水中加入 186.1 g 二水乙二胺四乙酸二钠,在磁力搅拌器上剧烈搅拌,用 NaOH 调节溶液的 pH 至 8.0,然后定容至 1 L,分装后 121℃高压灭菌 15 min 备用。

称取 2.75 g 硼酸,5.4 g Tris 碱溶解在少量蒸馏水中,摇匀,再加入 2 mL pH8.0 0.5 mol/L EDTA 混匀到 1 000 mL,备用。

附 录 B
(资料性附录)
引物及 PCR 产物大小

引物及 PCR 产物大小见表 B.1。

表 B.1 引物及 PCR 产物大小

基因	引物名称	引物序列	目的片段大小 bp	引物特异性
CSR2	CSR2F	5'-GGCGAAAGAGCTTAACGTGA-3'	198	猪霍乱沙门氏菌
	CSR2R	5'-TTACCATCGGGACCAAATGT-3'		
TSR3	TSR3F	5'-TTTACCTCAATGGCGGAACC-3'	303	鼠伤寒沙门氏菌
	TSR3R	5'-CCCAAAGCTGGGTAGCAA-3'		
invA	invAF	5'-AAACCTAAAACCAGCAAAGG-3'	605	沙门氏菌属
	invAR	5'-TGTACCGTGGCATGTCTGAG-3'		

附录 C
(规范性附录)

检测过程中生物安全和防止交叉污染的措施

C.1 样品处理和核酸制备

按照《兽医系统实验室考核管理办法》中要求,样品处理过程中必须在符合要求的分子生物学检测室中进行,并且严格执行有关的生物安全要求,穿实验服,戴一次性手套、口罩和帽子,一次性手套要经常更换。提取 DNA 过程或 PCR 反应液配制过程应分别在专用的超净工作台上进行;若没有专用超净工作台时可选取一个相对洁净的专用区域。

C.2 PCR 检测过程

C.2.1 使用 75% 的酒精或 0.1% 的新洁尔灭擦拭工作台面,注意保持工作台面和环境的清洁干净。

C.2.2 使用紫外灯对超净工作台进行照射,消除 DNA 交叉污染。

C.2.3 抽样和制样工具必须清洁干净,经无菌处理,PCR 试验的器皿、离心管和 PCR 管等必须经过 121℃,15 min 高压灭菌后才可使用。

C.2.4 扩增前应检查各 PCR 管盖是否盖紧,对于采用热盖加热(PCR 管中不加石蜡油)的 PCR 扩增仪除要注意检查各 PCR 管盖是否盖紧外,还要注意检查不同 PCR 管放入加热槽后高度是否一致,以保证热盖压紧所有 PCR 反应管。

C.2.5 PCR 反应混合液配制、DNA 提取、PCR 扩增、电泳和结果观察等应分区或分室进行,实验室运作应从洁净区到污染区单方向进行。

C.2.6 所有的试剂、器材、仪器都应专用,不得交叉互用。

C.3 培养物等废弃物无害化处理

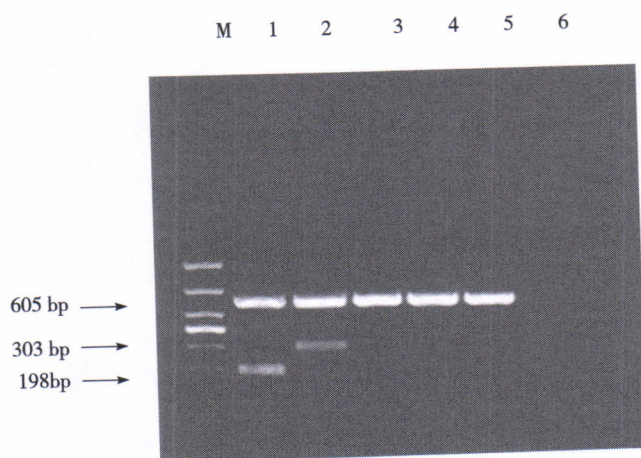
将细菌培养物及相关已污染的器械用可高压灭菌袋分装,封口,贴灭菌指示带,置于高压锅中 121℃ 高压灭菌 20 min,按《兽医系统实验室考核管理办法》中要求处理。

附录 D
(资料性附录)

沙门氏菌多重 PCR 检测对照样品电泳图

D.1 沙门氏菌多重 PCR 检测对照样品电泳图

见图 D.1。



说明：

M—DL1000 DNA Marker；

1——猪霍乱沙门氏菌阳性对照；

2——鼠伤寒沙门氏菌阳性对照；

3——德尔卑沙门氏菌对照；

4——都柏林沙门氏菌对照；

5——肠炎沙门氏菌对照；

6——阴性对照。

图 D.1 沙门氏菌多重 PCR 检测对照样品电泳图

D.2 说明

琼脂糖凝胶的浓度为 1%。

中华人民共和国
农业行业标准
猪副伤寒诊断技术

NY/T 3190—2018

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)

(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

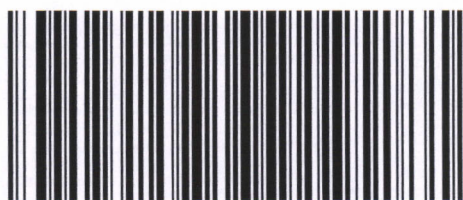
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20千字

2018年5月第1版 2018年5月北京第1次印刷

书号: 16109·4460

定价: 24.00元



NY/T 3190—2018

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 65005894