

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3188—2018

鸭浆膜炎诊断技术

Diagnostic techniques for duck serositis

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:中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:郑福英、刘永生、陈启伟、宫晓炜。

引 言

鸭浆膜炎是由鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*)引起的一种鸭的接触性传染病,又称为新鸭病、鸭败血症、鸭疫综合征、鸭疫巴氏杆菌病等。该病多见于1周龄~8周龄的雏鸭,呈急性或慢性败血症,临床上主要表现为精神沉郁,采食量下降,眼和鼻分泌物增多,头颈震颤或歪斜,共济失调。剖检眼观病变为纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎,部分病例出现关节炎,常引起雏鸭大批发病和死亡,目前已成为危害鸭养殖业的一种最常见的细菌病。

鉴于目前我国关于鸭传染性浆膜炎的标准化诊断技术还是空白,因此我们制定了该标准,以便有效地诊断和监控该病。

鸭浆膜炎诊断技术

1 范围

本标准规定了鸭浆膜炎的临床诊断和实验室诊断技术要求。
本标准适用于鸭浆膜炎的诊断。

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 19489 实验室 生物安全通用要求。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范。

3 生物安全措施

进行鸭浆膜炎实验室诊断时,如细菌分离、核酸提取等,按照 GB/T 19489 的规定执行;样品采集、保存与运输按照 NY/T 541 的规定执行。

4 临床诊断

4.1 流行特点

4.1.1 1 周龄~8 周龄的鸭均易感,但以 2 周龄~3 周龄的雏鸭最易感。

4.1.2 本病主要经呼吸道或通过皮肤伤口感染而发病。

4.1.3 饲养管理不良,如密度过大,空气不流通,潮湿,过冷或过热,饲料中缺乏维生素、微量元素或蛋白质等均可诱发该病。

4.1.4 本病的感染率有时可达 90% 以上,患病鸭的死亡率从 5% 至 75% 不等。

4.2 临床症状

4.2.1 急性病例

4.2.1.1 多见于 2 周龄~3 周龄雏鸭。

4.2.1.2 病鸭表现为倦怠,缩颈,不愿走动或行动迟缓,采食量下降。

4.2.1.3 眼、鼻有分泌物。

4.2.1.4 濒死前出现神经症状,头颈震颤,角弓反张,不久抽搐而死。

4.2.1.5 病程一般 1 d~3 d。

4.2.2 慢性病例

4.2.2.1 多见于 4 周龄~7 周龄的鸭。

4.2.2.2 病鸭精神沉郁,食欲降低。

4.2.2.3 病鸭共济失调,痉挛性点头或摇头摆尾,前仰后翻,呈仰卧姿态,有时头颈歪斜,做转圈或倒退运动,最后衰竭死亡。

4.2.2.4 病程达 1 周或 1 周以上。

4.3 剖检病变

4.3.1 纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎。

4.3.2 慢性病例常见跗跖关节及跗关节肿胀,切开见关节液增多。

4.4 结果判定

符合 4.1 中的某些流行特点,病鸭出现 4.2 中的临床症状和 4.3 中的眼观病变,可判断为疑似鸭浆膜炎。

5 实验室诊断

5.1 样品采集与运输

5.1.1 样品采集

5.1.1.1 样品数量

每个发病鸭群最少选择 5 只病鸭采集样品。

5.1.1.2 血清

选择具有临床症状的活鸭,从颈静脉或翅静脉无菌采集血液 1 mL~2 mL,用常规方法分离血清。

5.1.1.3 组织

若为活鸭,从颈动脉放血处死,无菌采集其脑、心脏和肝脏组织,分别放入无菌带有螺旋盖的离心管中。若为死亡鸭,则直接无菌采集其脑、心脏和肝脏组织。

5.1.2 样品的运输与储存

5.1.2.1 样品采集后,置于冰上冷藏送至实验室。

5.1.2.2 血清和病料组织冻存于 -20°C 以下。

5.2 鸭疫里默氏杆菌分离鉴定

5.2.1 仪器

电子天平,光学显微镜,组织破碎仪,低温高速离心机,恒温培养箱。

5.2.2 耗材

载玻片,枪头,无菌 2 mL 和 5 mL 离心管,一次性培养皿。

5.2.3 试剂

灭菌双蒸水或去离子水,胰蛋白胨大豆培养基,胰蛋白胨大豆琼脂培养基,绵羊抗凝血,小牛血清,商品化细菌生化鉴定管,磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L,pH 7.2)。相关试剂配制方法见附录 A。

5.2.4 样品处理

5.2.4.1 无菌取鸭的脑、心脏、肝脏组织 0.5 g~1 g,分别放入 5 mL 容量的无菌离心管中,在天平上称量所取病料组织的重量(离心管的重量在加入组织前已经称量)。

5.2.4.2 以 2 mL/管加入 PBS(0.01 mol/L,pH 7.2),以 50 Hz 在组织破碎仪内研磨 3 min。

5.2.4.3 吸取 100 μL 组织混悬液,放入 2 mL 容量的无菌离心管中,用适量 PBS(0.01 mol/L,pH 7.2)稀释至 1:10(w/v),混匀后取 100 μL 作为接种材料。

5.2.5 细菌分离

5.2.5.1 将 100 μL 组织混悬液涂布于胰蛋白胨大豆琼脂(含 5%绵羊血)平板上,倒置放于 5% CO_2 培养箱中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h~24 h。

5.2.5.2 挑取疑似鸭疫里默氏杆菌的单菌落接种到 3 mL 胰蛋白胨大豆肉汤(含 5%小牛血清)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 8 h~10 h。

5.2.5.3 用接种环蘸取少量菌液,划线接种于胰蛋白胨大豆琼脂(含 5%小牛血清)平板上,再置于 5% CO_2 培养箱中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h~24 h。

5.2.5.4 挑取符合鸭疫里默氏杆菌菌落特征的单菌落,再次接种到 3 mL 胰蛋白胨大豆肉汤(含 5%小牛血清)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 8 h~10 h。

- 5.2.5.5 如 5.2.5.3,再次划线接种于胰蛋白胨大豆琼脂(含 5%小牛血清)平板上并培养。
5.2.5.6 得到的菌落形态眼观一致,用革兰氏染色后观察到的菌体形态一致,视为得到纯化菌株。

5.2.6 细菌形态观察

5.2.6.1 菌落特征

无色、半透明、光滑、湿润、微隆起、呈露珠状、直径 0.5 mm~1 mm。

5.2.6.2 革兰氏染色镜检

革兰氏阴性小杆菌,多单个存在,少数成双,偶尔呈链状排列,可形成荚膜,无芽孢,无鞭毛。

5.2.7 细菌生化鉴定

- 5.2.7.1 细菌生化鉴定管中提前添加 5%小牛血清,保证鸭疫里默氏杆菌良好的生长状态。
5.2.7.2 一般菌株不分解葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖、蔗糖、草糖、乳糖、半乳糖和棉子糖;少数菌株发酵甘露糖和麦芽糖。不能利用山梨醇、肌醇、卫茅醇、甘露醇。
5.2.7.3 不能利用水杨苷和西蒙氏枸橼酸盐。
5.2.7.4 明胶液化试验、鸟氨酸脱羧酶活性试验、硝酸盐还原试验、甲基红试验、V-P 试验均为阴性。
5.2.7.5 不产生吲哚和硫化氢。
5.2.7.6 氧化酶、触酶试验阳性。

5.2.8 细菌鉴定

符合菌落特征,革兰氏染色阴性,并且符合生化反应特性的菌株,按照 5.3 做进一步鉴定。

5.2.9 结果判定

菌落特征明显,革兰氏染色阴性,符合生化反应特性的菌株,如果 5.3 鉴定结果阳性,则判定为鸭疫里默氏杆菌分离阳性。否则,判定为未检出鸭疫里默氏杆菌。

5.3 PCR 检测方法

5.3.1 仪器

PCR 热循环仪,核酸电泳仪和电泳槽,全自动凝胶成像系统。

5.3.2 耗材

PCR 反应管,移液器,枪头。

5.3.3 试剂

灭菌双蒸水或去离子水,组织 DNA 提取试剂盒,2×PCR 反应预混酶,DL2000 DNA 分子质量标准,琼脂糖,1 倍 TAE 缓冲液,引物(PAGE 纯化,上下游引物浓度分别配成 20 pmol/μL)。相关溶液的配制方法见附录 B。

可以采用引物 1119F/1119R 用于鸭疫里默氏杆菌核酸的检测,引物的靶基因、序列和扩增产物的大小见表 1。

表 1 PCR 检测鸭疫里默氏杆菌核酸的引物

引物	目的	靶基因	序列(5'-3')	产物大小
1119F	正向引物	外膜蛋白 A(OmpA)基因	ATGTTGATGACTGGACTTGGT	1 119 bp
1119R	反向引物	外膜蛋白 A(OmpA)基因	CTTCACTACTGGAAGATCAGA	

5.3.4 样品处理

- 5.3.4.1 胰蛋白胨大豆琼脂(含 5%绵羊血)平板上的单克隆菌落,胰蛋白胨大豆肉汤菌液,均可以直接作为 DNA 模板。
5.3.4.2 用组织 DNA 提取试剂盒从鸭的脑、心脏、肝脏组织中提取总 DNA,提取步骤按照说明书进行。提取到的 DNA 冻存于-20℃,作为模板备用。

5.3.5 PCR 反应

5.3.5.1 对照设置

每次进行 PCR 反应时均设置阳性对照和阴性对照。以鸭疫里默氏杆菌 CVCC3966 株作为阳性对照菌株,多杀性巴氏杆菌 CVCC453 株作为阴性对照菌株。

5.3.5.2 反应体系

50 μL /管,包括 2 \times PCR 反应预混酶 25 μL ,1119F 和 1119R 引物各 1 μL (引物终浓度为 0.4 pmol/ μL),无菌去离子水 18 μL ,模板 5 μL 。

5.3.5.3 PCR 扩增程序

94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,35 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,51 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s),最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

5.3.6 PCR 产物的电泳

PCR 反应结束后,PCR 产物各 5 μL ,再取 DL2000-DNA 分子质量标准 5 μL ,用 1%琼脂糖凝胶进行电泳,以 100 mA 电泳 20 min,然后用凝胶成像系统观察结果并拍照保存。

5.3.7 结果判定

阳性对照出现一条 1119 bp 的扩增条带,阴性对照无 1119 bp 的扩增条带,说明试验成立。被检样品出现一条 1119 bp 的扩增条带,判为 PCR 结果阳性,表述为检出鸭疫里默氏杆菌核酸。被检样品无 1119 bp 的扩增条带,判为 PCR 结果阴性,表述为未检出鸭疫里默氏杆菌。

6 综合判定

凡具有 5.2.9、5.3.7 中任何一项阳性者,均判为鸭疫里默氏杆菌阳性。

附录 A

(规范性附录)

鸭疫里默氏杆菌分离鉴定溶液的配制

A.1 胰蛋白胨大豆琼脂(含 5% 绵羊血)平板

胰蛋白胨	15.00 g
植物蛋白胨	5.00 g
氯化钠	5.00 g
琼脂	15.00 g

加 950 mL 蒸馏水溶解,用 HCl 或 NaOH 调 pH 至 7.3 ± 0.2 ,再加蒸馏水定容至 1 000 mL,121℃、15 min 高压灭菌。取出后室温冷却至 45℃~50℃,每 1 000 mL 培养液加无菌抗凝绵羊血 50 mL,轻轻摇匀,立即倾倒入直径 90 mm 的细菌培养皿内,每个培养皿倒入 15 mL~20 mL,待其凝固并冷却至室温后,用封口胶封边,倒置 4℃ 保存,1 周内使用。

A.2 胰蛋白胨大豆肉汤(含 5% 绵羊血)

胰蛋白胨	15.00 g
植物蛋白胨	5.00 g
氯化钠	5.00 g

加 950 mL 蒸馏水溶解,用 HCl 或 NaOH 调 pH 至 7.3 ± 0.2 ,再加蒸馏水定容至 1 000 mL,121℃、15 min 高压灭菌,4℃ 保存,1 月内使用。临用前加入 5% 的绵羊抗凝血。

A.3 PBS(0.01 mol/L, pH 7.2)

氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.20 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2.90 g

加入去离子水 800 mL,待固体试剂全部溶解后,定容至 1 000 mL,用 HCl 或 NaOH 调节 pH 至 7.2,121℃、30 min 高压灭菌,4℃ 保存。

附 录 B
(规范性附录)
PCR 试验溶液的配制

B.1 50 倍 TAE 电泳缓冲液

Tris 碱	242.00 g
EDTA	37.20 g
冰乙酸	57.1 mL

加入去离子水 800 mL,待固体试剂全部溶解后,定容至 1 000 mL。

使用前用去离子水将 50 倍 TAE 电泳缓冲液稀释至 1 倍使用浓度。

B.2 1%琼脂糖电泳凝胶板的配方和制备

琼脂糖	1 g
1×TAE 电泳缓冲液	100 mL

将琼脂糖放入 1×TAE 电泳缓冲液中,加热溶化,温度降至 60℃左右时加入 10 mg/mL 溴化乙锭 (EB) 3 μ L~5 μ L,混匀后均匀铺板,厚度为 3 mm~5 mm。

中华人民共和国
农业行业标准
鸭浆膜炎诊断技术
NY/T 3188—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 0.75 字数 15千字
2018年5月第1版 2018年5月北京第1次印刷
书号: 16109·4458
定价: 18.00元



NY/T 3188—2018

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 65005894