



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1501—2015
代替 SN/T 1501—2004

野兔热检疫技术规范

Quarantine protocol for tularemia

2015-05-26 发布

2016-01-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1501—2004《野兔热病原分离鉴定操作规程》。

本标准与 SN/T 1501 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- 增加临床诊断;
- 增加聚合酶链反应(PCR)和荧光聚合酶链反应(荧光 PCR);
- 删除了细菌生化试验,具体内容在附录 A 中介绍。

本标准修改采用 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2008 版)(Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals)中第 2.1.18 章。

本标准与 OIE 第 2.1.18 章相比,主要技术差异如下:

- 本标准等同采用 OIE 规定的病原分离鉴定和试管凝集试验;
- 本标准增加了 OIE 中提及但没有详细操作规程的聚合酶链反应(PCR)和荧光聚合酶链反应(荧光 PCR)的具体试验步骤;
- 本标准未采纳 OIE 中提及但没有详细操作规程的免疫荧光(FAT)和酶联免疫吸附试验(ELISA)。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国山西出入境检验检疫局、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国烟台出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:唐泰山、高峰、廉慧锋、张吉红、黄素文、方绍庆、张常印、张睿、王凯民、姜焱、陈国强、祝长青。

野兔热检疫技术规范

1 范围

本标准规定了野兔热(土拉杆菌病)的临床诊断、土拉杆菌的显微镜检查、细菌培养、聚合酶链反应、试管凝集试验和动物试验等技术要求。

本标准适用于进出口动物及其产品中野兔热的检疫。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 1088 布氏杆菌检疫技术规范

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 2025 动物检疫实验室生物安全操作规范

3 生物安全和防污染措施

野兔热是农业部规定的二类动物疫病,其病原为土拉杆菌,该菌的大量活菌操作和动物感染试验需在生物安全3级实验室进行,样本的病原菌分离纯化、生化试验、免疫学试验、PCR的核酸提取、涂片、显微镜观察等的样本检测操作需在生物安全2级实验室进行,非感染材料的实验可在生物安全1级实验室进行。检验过程的生物安全措施应符合GB 19489和SN/T 2025,检验过程的基因防污染措施应符合SN/T 1193。

4 临床诊断

野兔热简介参见附录A,野兔热的发病症状与病理变化参见附录B。

5 实验室诊断

5.1 样品采集

5.1.1 对死亡或濒死动物,无菌采取病变器官内外炎性、纤维素性或出血性渗出物、全血及肝、脾、骨髓、肾、肺、淋巴结等样品。对活动物,采集全血、淋巴结或淋巴液、穿刺液等样品。对动物产品,可采集内脏组织、淋巴结、骨髓、肉或皮毛等样品。

5.1.2 疑似样本的采集需要做好生物安全防护,样品的采集和包装应采用无菌器具,样本采集后应密封、冷藏并立即用最快的方式运送到实验室。

5.1.3 以细菌培养诊断动物感染土拉杆菌时,样品的选择应以观察到的临床症状或剖检观察到病理变化为依据,最有用的样品包括肝、脾、骨髓、肾、肺、淋巴结和血液。土拉杆菌在低温条件下存活时间较

长,阳光直射、紫外线、60℃高温和常规消毒剂可很快将其杀死,它们在产品不同部位的分布与特殊加工工艺造成的物理化学条件、包装运输保存条件等有关。

5.1.4 严重污染或含菌量少的样本,进行动物接种可提高检出率,但除非绝对必要,尽量避免使用动物试验。

5.2 显微镜检查

5.2.1 试剂

3%盐酸酒精、结晶紫染色液、革兰氏碘液、沙黄复染液,配制方法见附录C。

5.2.2 主要设备和材料

显微镜、酒精灯、载玻片、盖玻片。

5.2.3 试验程序

5.2.3.1 涂片制备

肝、脾、骨髓、肾、肺等组织样本压片,渗出液、血液等液体样本直接涂片,细菌培养物直接涂片。

5.2.3.2 革兰氏染色

涂片自然干燥后用3%盐酸酒精固定5 min,水洗、干燥后作革兰氏染色镜检。

滴加结晶紫染色液,染1 min,水洗。滴加革兰氏碘液,作用1 min,水洗。滴加95%乙醇脱色,约15 s~30 s,直至染液被洗掉,不要过分脱色,水洗。滴加沙黄复染液,复染1 min。水洗,风干,镜检。

5.2.4 结果判定

土拉杆菌为革兰氏阴性菌,革兰氏染色后菌体染成红色。若发现到革兰氏染色阴性,无芽胞、无鞭毛、大小 $0.2\ \mu\text{m}\sim 0.7\ \mu\text{m}$,以椭圆形为主的多形态球杆菌,可作出疑似土拉杆菌阳性诊断,否则判为显微镜检查阴性。

5.3 毛细管沉淀试验

5.3.1 试剂和材料

5.3.1.1 除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

5.3.1.2 生理盐水(配制方法见附录C),乙醚。

5.3.1.3 土拉杆菌标准菌株(由指定单位提供)。

5.3.1.4 土拉杆菌阳性血清(由指定单位提供)。

5.3.1.5 无菌石英砂,无菌研钵,毛细管,无菌玻璃试管。

5.3.2 主要设备

微量可调移液器,离心机,37℃恒温箱。

5.3.3 试验方法

取脾、肝和骨髓等组织,按照1:3~1:5的量(质量比)加入生理盐水,并加入适量无菌石英砂,在研钵内充分研磨,然后将组织混悬液转移至无菌玻璃试管中,加入2倍量(体积比)的乙醚,充分振摇,室温静置4 h~5 h,再次振摇,室温静置过夜。吸取水相于2 000 r/min离心30 min,取上清100 μL ,加入

到预加有 100 μ L 土拉杆菌阳性血清的毛细管中,37 $^{\circ}$ C 下静置 3 h 后,4 $^{\circ}$ C 过夜,观察是否出现沉淀环。同时用土拉杆菌标准菌株和生理盐水分别做阳性对照和阴性对照。

5.3.4 结果判定

结果判定如下:

- a) 土拉杆菌标准菌株的阳性对照出现沉淀环,生理盐水的阴性对照不出现沉淀环,结果成立。
- b) 被检样本不出现沉淀环的,判为病理样品毛细管沉淀试验阴性。
- c) 被检样本出现沉淀环的,判为病理样品毛细管沉淀试验阳性。可用细菌分离鉴定、PCR 或荧光 PCR 方法对结果进一步确认。

5.4 细菌培养

5.4.1 试剂

弗朗西斯培养基、麦康凯和查平氏(McCoy and Chapin)培养基、改良 Thayer-Marin 琼脂、GBCA 培养基,配制方法见附录 C。

5.4.2 主要设备

显微镜、普通培养箱或二氧化碳培养箱等。

5.4.3 样品培养

无菌采取样本,接种于弗朗西斯培养基、McCoy and Chapin 培养基、改良 Thayer-Marin 琼脂或 GBCA 培养基,置于普通培养箱或二氧化碳培养箱(5%二氧化碳)37 $^{\circ}$ C 培养。污染样本还可采用选择性培养基,即在胱氨酸心肌琼脂(DIFCO)中加入 5% 脱纤兔血、青霉素至终浓度 100 U/mL、硫酸多粘菌素 B 至终浓度 100 U/mL、环己酰亚胺(每升培养基中加入 1% 的贮藏溶液 0.1 mL)。

注:胱氨酸心肌琼脂(DIFCO)为商品化培养基,也可采用其他等效产品。

5.4.4 培养物形态观察

土拉杆菌在弗朗西斯培养基和改良 Thayer-Martin 琼脂上生长良好,形成粘稠、乳白色、融合的菌落,在 McCoy and Chapin 培养基上形成细小、凸起、圆形的透明菌落。

土拉杆菌在普通培养基上不生长,只有极个别的菌株在初次分离时能在血琼脂上生长,只有在加入胱氨酸、半胱氨酸血液或卵黄的培养基中生长。样本培养 48 h 后取出,观察菌落形态,并作革兰氏染色和生化试验。该菌不运动,无芽孢,两极着色,培养 24 h 后菌体形态均匀一致,老龄培养菌则具多形性。

5.4.5 结果判定

对具有土拉杆菌形态的菌落进行革兰氏染色,革兰氏染色阴性且细菌形态与土拉杆菌相似的,判定为土拉杆菌细菌培养疑似阳性。分离细菌进一步用 PCR 或荧光 PCR、凝集试验或动物接种试验鉴定为阳性的,判定为土拉杆菌细菌分离培养阳性。否则,判定为土拉杆菌细菌分离培养阴性。

分离培养物培养 3 周后如无可疑菌落生长,判定为土拉杆菌细菌分离培养阴性。

5.5 聚合酶链反应(PCR)

5.5.1 试剂

5.5.1.1 除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

5.5.1.2 实验用水(应符合 GB/T 6682 中一级水的规格),Taq 酶,PCR 缓冲液(与 Taq 酶匹配),氯化

镁(MgCl_2 , 25 mmol/L), dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 各 2.5 mmol/L), 酚/三氯甲烷/异戊醇(体积比 25 : 24 : 1), 三氯甲烷, 异丙醇($-20\text{ }^\circ\text{C}$ 预冷), 琼脂糖, DNA 相对分子量标准物 Marker DL 2 000。

5.5.1.3 生理盐水、DNA 提取液、75%乙醇、TE 溶液(pH 8.0)、电泳缓冲液($1\times\text{TBE}$ 或 $1\times\text{TAE}$)、溴化乙锭溶液(10 mg/mL)、上样缓冲液, 配制方法见附录 C。

5.5.1.4 土拉杆菌标准菌株或其 DNA(由指定单位提供)。

5.5.1.5 引物。

上游引物: 5'-TACCAGTTGGAAACGACTGT-3'

下游引物: 5'-CCTTTTGTGAGTTTCGGTCC-3'

5.5.2 设备和材料

PCR 扩增仪, 生物安全柜, 凝胶成像系统, 消毒灭菌锅, 制冰机, 核酸蛋白分析仪, 高速冷冻离心机(转速 $\geq 8\,000\text{ r/min}$), 台式小型离心机(转速 $\geq 13\,000\text{ r/min}$), 低温冰箱, 超纯水器(或双蒸水器), 旋涡振荡器, 微量可调移液器, PCR 反应管。

5.5.3 样品前处理

组织等固体状样本加入少量生理盐水后, 充分匀浆, 制成 10%~20%(质量浓度)的悬浮液备用; 液体样本充分混匀后直接取用; 样本的细菌分离培养液充分混匀后, 取 1 mL 加到 1.5 mL 离心管中, $10\,000\text{ r/min}$ 离心 3 min, 弃去上清, 加入 200 μL 生理盐水, 充分悬浮后备用。

5.5.4 模板 DNA 制备

5.5.4.1 样本模板 DNA 的制备

取以上制备的样本悬浮液 200 μL , 加入 750 μL DNA 提取液, $65\text{ }^\circ\text{C}$ 温浴 30 min, 加酚/三氯甲烷/异戊醇 500 μL , 振荡混匀, $13\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 吸取上清液加入等体积的三氯甲烷, 振荡混匀, $13\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 吸取 500 μL 上清液与 400 μL 的异丙醇充分混合, $13\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 75%乙醇冲洗沉淀一次, $13\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 弃去上清, 沉淀干燥后溶于 30 μL TE 溶液中, 立即用于检测或短期保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 。

也可使用其他经验证的 DNA 提取方法或等效的商品化细菌 DNA 提取试剂盒, 按照其使用说明操作。

5.5.4.2 细菌模板 DNA 的制备

用一次性器具从分离平板上挑取 5 个菌落, 转入盛有 30 μL 灭菌超纯水的离心管中, 煮沸 5 min, 转入冰水浴中 5 min, $13\,000\text{ r/min}$ 离心 3 min, 吸取上清液备用。

5.5.4.3 对照设立

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照与空白对照。阳性对照为土拉杆菌标准菌株 DNA, 阴性对照为没有交叉反应的非阳性菌株, 空白对照为无菌水。

由于操作土拉杆菌培养物的生物安全级别较高, 不易获得其土拉杆菌标准菌株及其 DNA, 阳性对照可采用扩增基因的阳性克隆分子 DNA 或含目标核酸序列的人工合成的 DNA。样本出现阳性结果时, 需对样本的扩增产物进行测序分析。

5.5.5 反应体系

$10\times\text{PCR}$ 缓冲液 2.5 μL 、dNTPs(10 mmol/L) 2 μL 、氯化镁(25 mmol/L) 2 μL 、引物(20 $\mu\text{mol/L}$)

各 0.5 μL 、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)0.25 μL 、模板 DNA 5 μL ~10 μL (约 50 ng~100 ng),用灭菌的超纯水补足反应体积至 25 μL 。也可使用等效商品化 PCR 反应预混液。

5.5.6 反应条件

95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 7 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,进行 40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存反应产物。反应体系与条件可以根据仪器型号或反应预混液类型进行等效评估,并作适当的参数调整。

5.5.7 PCR 产物电泳

称取 1.5 g 琼脂糖,加入 100 mL 电泳缓冲液加热溶解,加入溴化乙锭溶液至终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,制胶,PCR 扩增产物与适量加样缓冲液混合,点样,同时加 Marker、阴性对照和阳性对照,5 V/cm 电压电泳 30 min~40 min,凝胶成像系统观察并记录结果。

5.5.8 结果判定

结果判定如下:

- 阳性对照出现 1 124 bp 目的条带,阴性对照和空白对照均未出现目的条带,试验成立;
- 被检样本出现 1 124 bp 目的条带,判为 PCR 阳性;
- 被检样本未出现 1 124 bp 目的条带,判为 PCR 阴性;
- 为进一步确证该样品中含有土拉杆菌病原,须对 PCR 产物进行测序,PCR 产物参考序列参见附录 D。

5.6 荧光聚合酶链反应(荧光 PCR)

5.6.1 试剂

5.6.1.1 除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

5.6.1.2 实验用水(应符合 GB/T 6682 中一级水的规格),*Taq* 酶,PCR 缓冲液(与 *Taq* 酶匹配),氯化镁(MgCl_2 ,25 mmol/L),dNTPs(dATP,dCTP,dGTP,dTTP,各 2.5 mmol/L),酚/三氯甲烷/异戊醇(体积比 25:24:1),三氯甲烷,异丙醇(-20°C 预冷)。

5.6.1.3 生理盐水、DNA 提取液、75%乙醇、TE 溶液(pH 8.0),配制方法见附录 C。

5.6.1.4 土拉杆菌标准菌株或其 DNA(由指定单位提供)。

5.6.1.5 引物和探针。

上游引物:5'-TTGGTAGATCAGTTGGTGGGATAAC-3'

下游引物:5'-TGAGTTTTACCTTCTGACAACAATATTTC-3'

Taq Man 探针:5'-FAM-AAAATCCATGCTATGACTGATGCTTTAGGTAATCCA-TAMRA-3'

5.6.2 设备和材料

荧光 PCR 扩增仪,生物安全柜,凝胶成像系统,消毒灭菌锅,制冰机,核酸蛋白分析仪,高速冷冻离心机(转速 $\geq 8\,000\text{ r/min}$),台式小型离心机(转速 $\geq 13\,000\text{ r/min}$),低温冰箱,超纯水器(或双蒸水器),旋涡振荡器,微量可调移液器,无 DNase/RNase 的光学 PCR 反应管(板)或 PCR 玻璃毛细管。

5.6.3 样品前处理

样品前处理同 5.5.3。

5.6.4 模板 DNA 制备

样本模板 DNA 的制备、细菌模板 DNA 的制备、对照设立同 5.5.4。

5.6.5 反应体系

10×PCR 缓冲液 2.5 μL、dNTPs (各 2.5 mmol/L) 3 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 5.5 μL、引物 (20 μmol/L) 各 0.5 μL、TaqMan 探针 (10 μmol/L) 0.6 μL、TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL、DNA 5 μL~10 μL (约 50 ng~100 μg), 用灭菌的超纯水补足反应体积至 25 μL。如果使用 PCR 玻璃毛细管进行荧光 PCR 反应, 则需要在反应体系中加入牛血清白蛋白 (BSA, 5 μg/μL) 1 μL。也可使用等效商品化荧光 PCR 反应预混液。

5.6.6 反应条件

95℃预变性 10 min; 95℃变性 10 s, 60℃退火延伸 1 min, 同时收集荧光信号, 进行 45 个循环。反应体系与条件可以根据仪器型号或反应预混液类型进行等效评估, 进行适当的参数调整。

5.6.7 结果判定

读取检测结果时, 阈值设定以刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点, 不同仪器可根据设备噪音情况进行调整:

- 阳性对照出现典型的扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 30; 阴性对照和空白对照无扩增曲线, Ct 值 ≥ 40 或未检出; 试验成立;
- 被检样本 Ct 值 ≥ 40 或无扩增曲线, 判为荧光 PCR 阴性;
- 被检样本 Ct 值 ≤ 35, 判为荧光 PCR 阳性;
- 被检样本 Ct 值 > 35, 且 < 40, 则样品应重复检测; 重测结果 Ct 值 ≥ 40 或无扩增曲线的判为阴性, Ct 值 < 40 的判为荧光 PCR 阳性;
- 为进一步确证该样品中含有土拉杆菌病原, 须对 PCR 产物进行测序, PCR 产物参考序列参见附录 D。

5.7 试管凝集试验

5.7.1 试剂和材料

5.7.1.1 生理盐水、96%乙醇、结晶紫染色液, 配制方法见附录 C。

5.7.1.2 甲醛: 分析纯。

5.7.1.3 土拉杆菌标准菌株或标准土拉杆菌试管凝集抗原 (由指定单位提供)。

5.7.1.4 土拉杆菌阳性血清和阴性血清 (由指定单位提供)。

5.7.1.5 玻璃管: 规格为 13 mm×100 mm, 圆底, 洁净。

5.7.1.6 载玻片: 洁净。

5.7.2 主要设备

微量移液器、37℃恒温箱、4℃冰箱、振摇器。

5.7.3 抗原制备

将土拉杆菌在弗朗西斯培养基上培养 5 d~6 d 后 (幼龄培养物的抗原性差), 收获的细菌悬浮于 96% 酒精中, 细菌悬液于室温下保存 1 d~7 d; 细菌沉淀物用生理盐水洗涤 3 次后, 用等体积的生理盐

水悬浮,加入结晶紫染色液至结晶紫终浓度为0.25%,37℃染色24 h以上,最长不超过7 d。抗原沉淀物用生理盐水悬浮,制成初始的抗原悬液。用生理盐水将初始的抗原悬液做2倍倍比稀释,每个梯度的稀释液分别与土拉杆菌阳性血清和阴性血清在载玻片做凝集试验,快速出现肉眼清晰可见的凝集反应的抗原稀释度为最佳抗原浓度。将初始的抗原悬液用生理盐水稀释至最佳抗原浓度,加甲醛至终浓度为0.5%,制成试管凝集抗原,于4℃冰箱备用。

如有标准土拉杆菌试管凝集抗原,则不需要制备抗原,可直接进行试管凝集试验。

5.7.4 试验程序

每份被检血清用4支试管,标记检验编号后,在第2~4管各加入生理盐水0.1 mL,然后在第1~2管各加入被检血清0.1 mL;将第2管中的液体充分均匀后,从第2管吸取0.1 mL加入到第3管;混合均匀后,从第3管吸取0.1 mL加入到第4管;混合均匀后,从第4管弃去0.1 mL;分别在第1~4管各加入抗原0.9 mL,第1~4管的最终血清的稀释度依次为1:10、1:20、1:40、1:80。振摇20 min或37℃水浴1 h后,于室温下过夜,用肉眼或放大镜观察。以下为试管凝集试验,见表1。

表1 土拉杆菌试管凝集试验

孔号	1	2	3	4
抗原滴度	1:10	1:20	1:40	1:80
生理盐水/ μL		100	100	100
被检血清/ μL	100	100	100	100
抗原/ μL	900	900	900	900
振摇20 min 或37℃水浴1 h 后,于室温下过夜。				
判定举例	+++	++	+	-

弃去100

5.7.5 对照设立

阴性血清的稀释方法与被检血清相同,阳性血清的最高稀释度应超过其效价滴度,抗原的加入方法与被检血清相同。

5.7.6 判定

5.7.6.1 判定方法

一:菌体抗原不被凝集,液体混浊,无透明度,管底无伞状沉淀,但由于菌体自然下沉,出现圆点状沉淀,振荡时复呈均匀混浊状态。

+:有凝集,液体透明不明显(25%清亮),管底有少许不明显的伞状沉淀。

++:凝集显著,液体透明中等(50%清亮),管底有中等量的伞状沉淀。

+++ :几乎完全凝集,液体几乎透明(75%清亮),管底有明显的伞状沉淀,振荡时呈小或大的絮片状。

++++ :完全凝集,液体完全透明(100%清亮),管底出现大片的伞状沉淀,振荡时呈大絮片状,但可打成小絮片状。

出现++以上凝集现象的最高血清稀释度为血清凝集价。

5.7.6.2 结果判定

结果判定如下:

- a) 阴性对照和抗原对照不出现凝集,阳性血清均出现凝集或其凝集价达到其标准效价 ± 1 个滴度,试验成立;否者,应重做试验;
- b) 样本不出现凝集的判为试管凝集试验阴性;
- c) 样本出现凝集的,按照 SN/T 1088 中的布氏杆菌试管凝集试验排除布氏杆菌交叉反应后,判为试管凝集试验阳性。

5.8 动物试验

5.8.1 主要试剂与材料

5.8.1.1 生理盐水,配制方法见附录 C。

5.8.1.2 试验用小鼠:清洁级青年小鼠或以上级别。

5.8.1.3 医用剪刀、镊子、手术刀等解剖器具。

5.8.1.4 手套、生物安全防护服等。

5.8.1.5 注射器:洁净、无菌。

5.8.2 主要设备

高速冷冻离心机(转速 $\geq 10\,000$ r/min),振荡器,生物安全柜,生物安全笼具。

5.8.3 动物接种

严重污染的病料样本加入少量生理盐水,充分匀浆,制成 10%~20%(质量浓度)的悬浮液,灭菌纱布过滤后,以 0.2 mL/只剂量腹腔或皮下注射接种小鼠,每个样本至少接种 3 只,连续观察 14 d,如实验小鼠出现死亡或临床症状,按照 5.1 的方法采取病料后,按照 5.2、5.4 的方法进行涂片染色镜检和细菌分离鉴定。

5.8.4 细菌接种

分离细菌培养 18 h~24 h 后,于 10 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,加入等体积生理盐水,充分悬浮后,腹腔或皮下注射接种小鼠,0.2 mL/只,每个样本至少接种 3 只,连续观察 14 d。

5.8.5 结果判定

小鼠不出现死亡的,判为土拉杆菌动物试验阴性。

小鼠出现死亡的,特别是在 2 d~10 d 内死亡的,同时做解剖检查、涂片染色镜检和病理学检查。解剖检查可见接种部位水肿,有时伴有出血现象,局部淋巴结肿大且出现脉周炎,脾肿大并有散在小结节,肝脏肿大,但无坏死灶;用肝、脾和心血涂片染色镜检,可见大量成堆排列、形态典型的疑似土拉杆菌;病理学检查可见局部淋巴结发炎、淋巴结囊性水肿,淋巴细胞浸润,周边微小脓肿,血管充血,形成血栓,坏死区融合形成多处脓肿灶,脓肿内可能有巨浆细胞、巨噬细胞。

如果解剖检查、涂片染色镜检和病理学检查发现以上特征性指标,判定为土拉杆菌动物试验阳性,否者判为土拉杆菌动物试验阴性。

6 综合判定

6.1 临床诊断符合第 4 章的规定发病症状和病理变化,按 5.4 进行细菌分离鉴定为阳性的,可判定为土

拉杆菌感染。

6.2 临床诊断符合第4章的规定发病症状和病理变化,按5.5进行PCR或按5.6进行荧光PCR检测结果阳性且经过序列分析证明为土拉杆菌特征性序列的,可判定为土拉杆菌感染。

6.3 患畜没有明显发病症状和病理变化,但病原学检测符合5.4或5.5或5.6的、或血清学检测符合5.7的,可判定为土拉杆菌感染。

附 录 A
(资料性附录)
野兔热简介

A.1 野兔热(Tularemia),又称土拉杆菌病,是一种由土拉弗朗西斯氏菌(*Francisella tularensis*,常称为土拉杆菌)引起的人畜共患病,主要感染兔(家兔和野兔)和啮齿类动物(特别是田鼠、松鼠、香鼠等小型啮齿动物)以及河狸。多种哺乳动物、鸟类、两栖动物和无脊椎动物有感染的报道。家养动物中,猫可能带菌。家禽自然发病的报道以火鸡较多,鸡、鸭、鹅很少,但可成为传染源。人也可受到感染。

A.2 土拉杆菌为革兰氏阴性菌,无芽胞、无鞭毛、不能运动,大小 $0.2\ \mu\text{m}\sim 0.7\ \mu\text{m}$,以椭圆形为主的多形态球杆菌。细菌涂片呈现为非常细小的点状革兰氏阴性杆菌,由于太小常难以确定为病原菌,也可采用 May-Grunwald-Giemsa 或酚硫堇染色法染色观察,美蓝染色时呈两极着色。该菌最适生长温度为 $37\ ^\circ\text{C}$,严格需氧,生长时需要胱氨酸,分解葡萄糖、果糖、甘露糖迟缓产酸不产气,可由半胱氨酸或胱氨酸产生 H_2S 。在石蕊牛乳中培养 2 周生长微弱并呈弱酸性反应,触酶弱阳性,氧化酶阴性,不水解明胶,不产生吲哚。甲基红和 VP 试验阴性,不还原硝酸盐,可还原美蓝。

A.3 根据土拉杆菌的培养特性、流行病学特征、毒力和是否发酵甘油,临床上可以将其分为 A 和 B 两个型。A 型,即土拉热弗朗西斯杆菌土拉热型,与北美地区的兔类发病有关,主要通过蜱、蝇的叮咬或直接接触感染动物而传播,该菌对人和家兔具有极强的致病性,能发酵甘油。B 型,即土拉热弗朗西斯杆菌古北型,主要发于水生啮齿动物(海狸、麝鼠),北美北部的野鼠以及欧亚大陆北部的兔类(野兔)和啮齿类动物,主要通过直接接触和蚊虫叮咬传播,也能通过食入污染水、食物而传播,该菌对人和家兔的致病性较小,不能发酵甘油。除媒介传播外,土拉杆菌也可经接触感染的动物及污染的物品或食入未煮熟的病畜肉以及污染的水而引起传播。

A.4 土拉杆菌致人感染的剂量很低,加之感染动物后从粪尿中排菌,且该菌在气溶胶状态存活率极高,人接触本菌后发生感染的风险很高,极易发生细菌扩散和实验室感染。因此,当处理感染性病料、操作活菌和动物试验时,应注意采取特别生物安全防护措施,包括配戴手套、眼罩、口罩等,设施应满足有关生物安全要求。卫生部规定土拉杆菌的大量活菌操作和动物感染试验需在生物安全 3 级实验室进行,常规样本检测需在生物安全 2 级实验室进行,非感染材料的实验可在生物安全 1 级实验室进行。

A.5 野兔热的诊断方法包括病原鉴定和血清学试验。病原鉴定有显微镜检查、免疫荧光(FAT)、细菌分离、动物试验、聚合酶链反应(PCR)和荧光聚合酶链反应(荧光 PCR)等方法;血清学方法主要是凝集试验和酶联免疫吸附试验(ELISA)等,必要时,血清学阳性结果需排除与流产布氏杆菌(*Brucella abortus*)、马耳他布氏杆菌(*Brucella melitensis*)以及军团菌(*Legionella* sp.)的交叉反应。易感动物感染土拉杆菌后常在产生抗体前已经死亡,血清学方法对其的诊断价值有限。对土拉杆菌有较强抵抗力的动物(如绵羊、牛、猪、狗、驼鹿或鸟类)感染后能产生特异性抗体,可用血清学方法进行检测,特别是对野生动物的血清学监测。野兔热的实验室诊断主要还是依靠病原鉴定,病理材料直接涂片染色镜检时,病料中菌数很多,可能因其太小而难以与沉淀的染料区分开,免疫荧光(FAT)方法可以对目标菌进行特异性鉴别,但其诊断试剂不易获得。

A.6 细菌分离时常常会出现杂菌大量繁殖的现象,从死亡的动物和尸体内分离到土拉杆菌有一定难度,可以通过将感染性组织或培养物接种小鼠或豚鼠进行动物试验,但动物接种危险性极大,需要在具有符合要求的生物安全装置及生物安全笼具的条件下进行。因此,PCR 和荧光 PCR 方法对野兔热诊断是一种较好的选择,其可用于病料的直接检测或分离到的可疑菌株的鉴定,当出现阳性结果后,可向 OIE 参考实验室等机构购买特异性试剂做进一步诊断或将样本送国家指定实验室进一步复核。

附 录 B
(资料性附录)
发病症状与病理变化

B.1 发病症状

动物感染土拉杆菌后以发热、沉郁和败血症为特征。易感动物临床症状主要表现为体温升高,精神沉郁,而后出现致死性败血症,体表淋巴结肿大,病程约为2 d~10 d,诊断时动物往往已经死亡。多数家畜感染后不表现野兔热的临床症状,但却能产生其特异性抗体,绵羊曾暴发过死亡率极高的A型野兔热,家养动物中,猫能成为细菌携带者并偶尔传染给人。

B.2 病理变化

野兔热主要病理变化表现为淋巴结肿大、脾和其他内脏的坏死等。

兔感染后,淋巴结肿大,有坏死结节;肝、脾、骨髓等实质器官有不规则分布的灰白色小坏死灶;脾脏明显肿大,坏死灶大小不一,有时肉眼很难发现;肺充血、水肿,有局灶性纤维素性肺炎变化,腹水中含纤维蛋白。

绵羊体表淋巴结肿大,有时化脓,肝、脾可能肿大,有坏死结节,心内外膜有小点出血;山羊脾肿大,肝有坏死灶,心外膜和肾上腺有小点出血。

牛肝脏变性和坏死。

猪淋巴结肿大发炎和化脓,肝实质变性,支气管肺炎。

鸡仅见脾、肝充血。

人在感染部位出现溃疡或脓肿,局部淋巴结肿大,死后剖检可见淋巴结有干酪样坏死,脾脏、肝脏、骨髓和肺脏有大量浅灰白色坏死灶,脾脏明显肿大。

附 录 C
(规范性附录)
试剂的配制

C.1 3%盐酸酒精

取浓盐酸 3 mL,加入 95%乙醇 97 mL,混合均匀。

C.2 结晶紫染色液

取 1 g 结晶紫溶于 20 mL 95%乙醇中,然后与 80 mL 1%的草酸铵水溶液混合。

C.3 革兰氏碘液

将 1 g 碘与 2 g 碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

C.4 沙黄复染液

将 0.25 g 沙黄溶解于 10 mL 95%乙醇中,然后加入 90 mL 蒸馏水。

C.5 弗朗西斯培养基

蛋白胨	1.0 g
牛肉膏	0.5 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	2.0 g
蒸馏水	100 mL
胱氨酸(或半胱氨酸)	0.1 g
葡萄糖	1.0 g
脱纤兔、马或人血	10.0 mL
pH 7.2~7.4	

先将胱氨酸(或半胱氨酸)用少量蒸馏水溶解,并加入少量 NaOH 或 NaOH 溶液助溶,待胱氨酸(或半胱氨酸)充分溶解后,加入以上除新鲜脱纤血以外的其他成分,加热溶化,调节 pH 值,121 °C 高压灭菌 15 min,冷到 50 °C,以无菌操作加入新鲜的无菌脱纤血,摇匀,倾注平板。配置好的培养基可于 4 °C 保存至 8 d~10 d。

也可用商品化的蛋白胨琼脂培养基,按照说明书要求配制后,加入 0.1%胱氨酸(或半胱氨酸)和 1%葡萄糖,加热溶化,调节 pH 值,121 °C 高压灭菌 15 min,冷到 50 °C,以无菌操作加入新鲜的无菌脱纤兔、马或人血,摇匀,倾注平板。

C.6 麦康凯和查平氏(McCoy and Chapin)培养基

鸡蛋黄	60 g
生理盐水	40 mL

以无菌操作,采取新鲜蛋黄 60 g,加入生理盐水 40 mL,充分混匀,倾注平板或分装试管,加热至 75 ℃使其凝固(约 1 h)即可。必要时,可在使用前做无菌检测。配制好的培养基可于 4 ℃保存至 8 d~10 d。

C.7 改良 Thayer-Marin 琼脂

特殊蛋白胨	15.0 g
玉米淀粉	1.0 g
磷酸氢二钾	4.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	10.0 g
蒸馏水	1 000 mL
胱氨酸(或半胱氨酸)	1.0 g
葡萄糖	10.0 g
血红蛋白	10.0 g
IsoVitalex 增补液	10.0 mL
pH 7.2~7.4	

先将胱氨酸(或半胱氨酸)用少量蒸馏水溶解,并加入少量 NaOH 或 NaOH 溶液助溶,待胱氨酸(或半胱氨酸)充分溶解后,加入以上除血红蛋白和 IsoVitalex 增补液以外的其他成分,加热溶化,调节 pH 值,121 ℃高压灭菌 15 min(即为 GCA 培养基),冷到 50 ℃,以无菌操作加入血红蛋白和 IsoVitalex 增补液,摇匀,倾注平板。其中血红蛋白可用少量蒸馏水溶解,用无菌滤器过滤除菌后使用。配制好的培养基可于 4 ℃保存至 8 d~10 d。

也可用商品化的 GC 基础培养基(配方中的前 7 种成分),按照说明书要求配制后,加入 0.1%胱氨酸(或半胱氨酸)和 1%葡萄糖,加热溶化,调节 pH 值,121 ℃高压灭菌 15 min,冷到 50 ℃,以无菌操作加入血红蛋白和 IsoVitalex 增补液,摇匀,倾注平板。

C.8 GBCA 培养基

配制好 GCA 培养基后,121 ℃高压灭菌 15 min,冷到 50 ℃,以无菌操作加入 2.5%人红细胞泥或 5%新鲜的无菌脱纤兔、马或人血,摇匀,倾注平板。

C.9 生理盐水

氯化钠 8.5 g,蒸馏水 1 000 mL,充分溶解后,121 ℃高压灭菌 15 min。

C.10 96%乙醇

无水乙醇 96 mL,蒸馏水 4 mL,充分混匀后,备用。

C.11 75%乙醇

无水乙醇 75 mL,蒸馏水 25 mL,充分混匀后, -20 °C 预冷备用。

C.12 DNA 提取液

50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 100 mmol/L EDTA(pH 8.0), 100 mmol/L NaCl, 1% SDS。

C.13 TE 溶液(pH 8.0)

10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol/L EDTA(pH 8.0), 高压灭菌。

C.14 电泳缓冲液(1×TBE 或 1×TAE)

Tris 54.0 g, 硼酸 27.5 g, 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0) 20.0 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL, 充分溶解后即
为 5×TBE, 4 °C 保存备用; 使用前用蒸馏水做 5 倍稀释后使用(即为 1×TBE)。

Tris 242.0 g, 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0) 100.0 mL 或 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 18.6 g, 冰乙酸 57.1 mL,
加蒸馏水至 1 000 mL, 充分溶解后即为 50×TAE, 4 °C 保存备用; 使用前用蒸馏水做 50 倍稀释后使用
(即为 1×TAE)。

C.15 上样缓冲液(6×)

0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青 FF, 40% 蔗糖; 4 °C 保存备用。

也可使用商品化的核酸凝胶电泳上样缓冲液, 按照说明书要求进行操作。

C.16 溴化乙锭溶液(10 mg/mL)

溴化乙锭 0.1 g, 蒸馏水 10.0 mL, 充分溶解后即为 10 mg/mL 溴化乙锭溶液。

也可使用商品化的溴化乙锭浓溶液或其他等效商品化的核酸电泳染料, 按照说明书要求进行操作。

附 录 D

(资料性附录)

土拉杆菌 PCR 和荧光 PCR 产物参考序列

D.1 土拉杆菌 PCR 产物参考序列

TACCAGTTGGAAACGACTGTTAATACCGCATAATATCTGTGGATTAAAGGTGGCTTT
CGGGCTGTCGCAGATGGATGAGCCTGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCCA
CCAAGGCTACGATCCATAGCTGATTTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATC
CAGCAATGCCATGTGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCACTTTAGTTGGGGAGGA
AAGCCTCAAGGTTAATAGCCTTGGGGGAGGACGTTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA
AAGGGTCTGTAGGTGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTTGGAAC
GCATTTGATACTGGCAAACCTAGAGTACGGTAGAGGAATGGGGAATTTCTGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATCAGAAGGAACACCAATGGCGAAGGCAACATTCTGGACCGATACTG
ACACTGAGGGACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTG
TAAACGATGAGTACTAGCTGTTGGAGTCGGTGTAAGGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCG
ATAAGTACTCCGCCTGGGGACTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGAC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCT
TGACATCCTGCGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACGCAGTGACAGGTGCT
GCACGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CCTATTGATAGTTACCATCATTAAGTTGGGTACTCTATTAAGACTGCCGCTGACAAGGCG
GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGC
TACAATGGGTATTACAGAGGGCTGCGAAGGTGCGAGCTGGAGCGAAACTCAAAAAGG

D.2 土拉杆菌荧光 PCR 产物参考序列

TTGGTAGATCAGTTGGTGGGATAACCACTAAAATCCATGCTATGACTGATGCTTTAG
GTAATCCAATAGAAATATTGTTGTCAGAAGGTAAAACCTCA

中华人民共和国出入境检验检疫

行 业 标 准

野兔热检疫技术规范

SN/T 1501—2015

*

中国标准出版社出版

北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)

北京市西城区三里河北街16号(100045)

总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

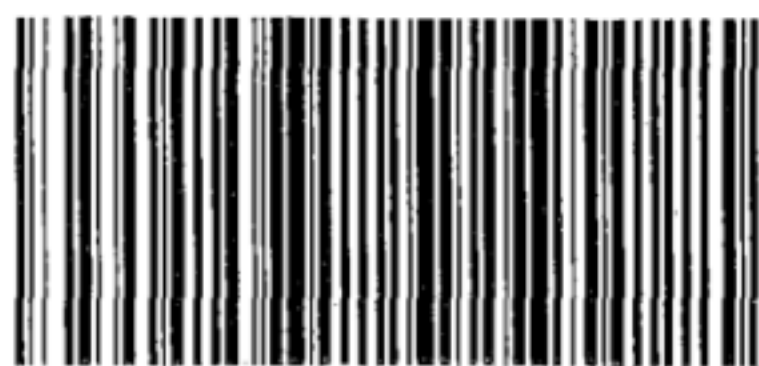
开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 32 千字

2016年2月第一版 2016年2月第一次印刷

印数 1—1 100

*

书号: 155066·2-29522 定价 21.00 元



SN/T 1501-2015