



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4230—2015

副猪嗜血杆菌病检疫技术规范

Quarantine protocol for haemophilus parasuis disease

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、中华人民共和国重庆出入境检验检疫局、南通大学、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人：仇保丰、王昱、宋鸿雁、王春来、高峰、司微、顾炳泉、高逢结、刘文斌、李应国。

副猪嗜血杆菌病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了副猪嗜血杆菌病的临床诊断和实验室检测方法。

本标准适用于副猪嗜血杆菌病的诊断和检疫。

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 4789.28 食品微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 培养基及试剂

3.1 水:符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

3.2 无菌脱纤维绵羊血。

3.3 无菌犊牛血清。

3.4 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)。

3.5 胰蛋白大豆琼脂(TSA):见 A.1。

3.6 胰蛋白大豆肉汤(TSB):见 A.2。

3.7 巧克力琼脂平板:见 A.3。

3.8 鲜血琼脂平板:见 A.4。

3.9 革兰氏染色液:见 A.5。

3.10 生化用培养基:按 GB/T 4789.28 的规定配制。

3.11 电泳级琼脂糖粉。

3.12 *Taq* DNA 聚合酶:5 U/ μ L。

3.13 100 bp DNA ladder Marker(脱氧核糖核酸分子量标准)。

3.14 10 倍浓度 *Taq* DNA 聚合酶缓冲液(10 \times *Taq* Buffer):含 15 mmol/L 氯化镁。

3.15 dNTP 混合物:脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胸苷三磷酸(dTTP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)各 2.5 mmol/L。

3.16 引物(HPS-F:5'-GTGATGAGGAAGGGTGGTGT-3'; HPS-R:5'-GGCTTCGTCACCCTCTGT-3')。

3.17 50 \times TAE 电泳缓冲液:见 A.6。

3.18 6 \times 加样缓冲液:见 A.7。

3.19 溴化乙锭溶液:见 A.8。

3.20 副猪嗜血杆菌标准菌株(1~15 型):由指定单位提供。

3.21 金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)。

3.22 猪胸膜肺炎放线杆菌(ATCC 27088)。

- 3.23 副猪嗜血杆菌阳性血清:由指定单位提供。
- 3.24 副猪嗜血杆菌阴性血清:由指定单位提供。
- 3.25 牛血清白蛋白(BSA)。
- 3.26 辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG。
- 3.27 邻苯二胺(OPD)。
- 3.28 吐温-20。
- 3.29 0.1 mol/L PBS 缓冲液:见 A.9。
- 3.30 包被液:见 A.10。
- 3.31 洗涤液:见 A.11。
- 3.32 封闭液:见 A.12。
- 3.33 底物溶液:见 A.13。
- 3.34 终止液:见 A.14。

4 设备与材料

- 4.1 电热恒温水槽。
- 4.2 恒温培养箱。
- 4.3 二氧化碳培养箱。
- 4.4 高压灭菌器。
- 4.5 生物显微镜。
- 4.6 微量加样器。
- 4.7 高速冷冻离心机。
- 4.8 PCR 仪。
- 4.9 水平凝胶电泳槽。
- 4.10 电泳仪。
- 4.11 凝胶成像系统。
- 4.12 API NH 鉴定条或类似产品¹⁾。
- 4.13 16S rDNA 细菌鉴定 PCR 试剂盒。
- 4.14 酶标仪。
- 4.15 空白酶标板。

5 临床诊断

5.1 临床症状及病理变化

5.1.1 临床症状

副猪嗜血杆菌病又称猪的革拉氏病(Glasser's Disease),临床表现以呼吸道症状、跛行、胸膜炎、心包炎、腹膜炎、关节炎和脑膜炎等为特征。主要在断奶前后和保育阶段发病,通常见于 5~8 周龄的仔猪,发病率一般为 10%~15%,死亡率可达 50%。急性病例:往往发生于膘情良好的猪,病猪发热(40℃~

1) 由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

42℃),精神沉郁,厌食消瘦;气喘咳嗽,呼吸困难,鼻孔有黏液性及浆液性分泌物;个别猪腕关节、跗关节肿大、疼痛,跛行,运动不协调;可视粘膜发绀,眼睑下水肿,2 d~3 d死亡;急性感染病例存活后可留下后遗症,如母猪流产,公猪慢性跛行等,仔猪和育肥猪可遗留呼吸道症状和神经症状。慢性病例:多见于保育猪,病猪体温稍高,食欲下降,被毛粗乱,咳嗽,呼吸困难和生长迟滞;四肢无力或肿胀跛行;严重时衰竭死亡。

5.1.2 病理变化

浆液性纤维素性胸膜炎、心包炎、腹膜炎和多发性关节炎;渗出于浆膜表面的浆液性纤维素性渗出物,有时可形成一种假膜;胸腔内有大量的淡红色液体、纤维性渗出物及凝块,肺脏呈纤维素性胸膜肺炎,肺脏水肿,部分有对称性肉样变;化脓性或纤维性腹膜炎,腹腔积液或内脏粘连;心包积液,心包膜上有奶酪样坏死,并与心脏粘连;全身淋巴结肿大,呈浆液性卡他性炎,暗红色;关节肿大,有浆液性渗出性炎症。

5.2 结果判定

根据特征性临床症状和病理变化可以作出初步诊断。进一步确诊应采集样品进行实验室检测。

6 实验室检测

6.1 样品的采集与处理

6.1.1 活猪的样品采集

用无菌棉拭子采集鼻腔分泌物,放入无菌试管中;无菌采血并用注射器穿刺采取胸腔液。

6.1.2 死猪的样品采集

病猪死亡或扑杀后12 h以内,尽早无菌采集死亡猪肺脏、扁桃体、心血、胸水、脑脊液、气管和关节积液等病料。

6.1.3 样品处理

采集样品应保存在0℃~4℃条件下,12 h以内送到实验室。

6.2 细菌的分离鉴定

6.2.1 细菌培养

无菌操作从疑似病猪的肺脏、胸腔积液、心血、关节液、鼻腔分泌物和脑组织等病料中取样,在含NAD的巧克力琼脂平板或TSA琼脂平板分别划线接种,置5%的二氧化碳(CO₂)培养箱,37℃培养24 h~48 h。在巧克力琼脂平板或TSA琼脂平板上,副猪嗜血杆菌呈光滑型、灰白色透明、直径大约0.5 mm菌落。

6.2.2 革兰氏染色

将典型菌落制备涂片,火焰固定。结晶紫染色1 min,水洗,革兰氏碘液染色1 min,水洗,95%酒精脱色30 s,水洗,沙黄复染30 s,水洗,干燥,镜检。副猪嗜血杆菌为革兰氏阴性杆菌,具有多种不同形态,一般呈短小杆菌,也有曾球形、短链或丝状等,大小不等,约0.5 μm×1.5 μm~0.5 μm×2.0 μm。

SN/T 4230—2015

6.2.3 生化试验

将可疑的单菌落进一步纯化后,与金黄色葡萄球菌垂直划线于绵羊鲜血琼脂平板,37℃培养24 h~48 h。副猪嗜血杆菌在葡萄球菌条状菌苔附近呈现“卫星生长现象”,即金黄色葡萄球菌菌苔附近有较大的菌落生长,而远侧菌落生长较小或无菌生长。同时,观察到菌落具有不溶血现象。

接下来将可疑单菌落接种微量生化管,置于5%的二氧化碳(CO₂)培养箱中37℃培养24 h~48 h;或用等效的 API NH 鉴定条等进行细菌生化鉴定。副猪嗜血杆菌的主要生化特征见表 B.1。

6.2.4 结果判定

对具有副猪嗜血杆菌特征的菌落进行革兰氏染色,结果为革兰氏阴性。生化试验结果与副猪嗜血杆菌生化特性完全符合时,判定为副猪嗜血杆菌细菌培养阳性;否则,判定为副猪嗜血杆菌培养阴性。

6.3 聚合酶链式反应(PCR)

6.3.1 DNA 的提取

从琼脂平板上挑取副猪嗜血杆菌可疑单菌落,接种到5 mL TSB 培养液中,置37℃摇床中160 r/min 振荡培养约12 h,取1.5 mL 加入到无菌小离心管中,12 000 r/min 离心5 min,弃去上清液,再用25 μL 灭菌水重悬沉淀,于沸水中作用5 min,然后于冰浴中冷却至4℃左右,12 000r /min 离心10 min,取上清液作为 PCR 反应模板。或者用商品化等效 DNA 提取试剂盒进行提取。

6.3.2 PCR 扩增

PCR 扩增的目的片段为副猪嗜血杆菌 16S rDNA 序列的一段。按照表 1 进行 PCR 反应体系的配制。

表 1 PCR 反应体系(50 μL 体系)

名 称	体积(1 个反应)
10×Taq 缓冲液	5 μL
dNTP 混合物(各 2.5 mmol/L)	4 μL
引物 HPS-F(25 pmol/μL)	1 μL
引物 HPS-R(25 pmol/μL)	1 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.5 μL
灭菌水	33.5 μL
模板 DNA	5 μL

同时设立阳性对照、阴性对照和空白对照,用副猪嗜血杆菌标准菌株的模板 DNA 作为阳性对照,用猪胸膜肺炎放线杆菌标准菌株的模板 DNA 作为阴性对照,用水作为空白对照。循环条件为:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,56℃~60℃退火60 s,72℃延伸90 s,共35个循环;最后72℃延伸10 min,4℃下保存。

6.3.3 电泳

取1.5 g 琼脂糖,加入100 mL 电泳缓冲液加热溶解,加入溴化乙锭至终浓度为1 μg/mL,制胶,待胶凝固后加入 PCR 扩增产物进行电泳,并用 DNA ladder Marker 作对照。电泳完毕后用凝胶成像系统

观察、记录结果。

6.3.4 结果判定

阴性对照和空白对照未扩增出目的片段,阳性对照扩增出大小为 822 bp 的清晰条带,DNA 分子量标准成立时;被检样品扩增出大小为 822 bp 的条带,判定为副猪嗜血杆菌阳性;被检样品未扩增出大小为 822 bp 的条带,判定为副猪嗜血杆菌阴性。

6.4 间接酶联免疫吸附试验(I-ELISA)

6.4.1 包被抗原的制备

将副猪嗜血杆菌 5 型标准株挑取单菌落接种 50 mL TSB 液体培养基,置 37 °C 摇床中 160 r/min 振荡培养约 12 h,将菌液移入无菌离心管中,6 000 r/min 离心 10 min,如此反复用 0.1 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液清洗 3 次。用 PBS 缓冲液按菌体体积比 1 : 10 重悬,在冰浴中进行超声波破碎(时间 20 min,振幅 20%,超声 3 s 停 3 s)。然后用紫外吸收法测定蛋白含量,确定其浓度,-20 °C 保存备用。

6.4.2 操作步骤

6.4.2.1 抗原包被:将裂解抗原用包被液稀释至 40 μg/mL,每孔 100 μL 加入酶标板各孔中,置于湿盒中 37 °C 作用 2 h 后转入 4 °C 包被过夜。

6.4.2.2 洗涤:甩净孔内抗原溶液,用洗涤液 PBST 加满各孔,放置 3 min,然后甩净液体,并在洁净的吸水纸上拍干,如此重复 3 次。

6.4.2.3 封闭:每孔加入 1% BSA 封闭液 100 μL,37 °C 作用 1 h 后,按 6.4.2.2 的方法洗涤 3 次。

6.4.2.4 加待检血清:用封闭液稀释待检血清,按 1 : 200 稀释,每孔 50 μL,同时设立标准阴性血清对照孔两个、阳性血清对照孔和空白对照孔各一个,37 °C 作用 1 h 后,按 6.4.2.2 的方法洗涤 3 次。

6.4.2.5 加酶标二抗:将兔抗猪 IgG-辣根过氧化物酶结合物按 1 : 15 000 稀释,每孔 50 μL,37 °C 作用 1 h 后,按步骤 6.4.2.2 的方法洗涤 3 次。

6.4.2.6 显色:加入现配制的 OPD 底物显色液 100 μL,37 °C 避光显色 15 min。

6.4.2.7 终止及读数:加入 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止液,每孔 50 μL,然后在酶标仪上检测 490 nm 处的 OD 值。

6.4.3 结果判定

将样品的 OD 值代入式(1)计算:

$$S/N = \frac{\text{被检血清样品 OD 值}}{\text{阴性对照平均 OD 值}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

S——被检血清样品 OD 值;

N——阴性对照平均 OD 值。

若 $S/N \geq 2.5$ 则结果判定为副猪嗜血杆菌抗体阳性,否则判定为副猪嗜血杆菌抗体阴性。

6.5 琼脂凝胶免疫扩散试验(AGID)

6.5.1 琼脂凝胶平板的制备

称取琼脂糖 1.0 g,氯化钠 0.85 g,加水至 100 mL,经煮沸溶解后,冷却至 45 °C,加入 0.01 g 叠氮钠。每个平皿加融化琼脂,使琼脂板厚度约为 4 mm,待凝固后倒置 4 °C 冰箱保存备用。

SN/T 4230—2015

6.5.2 打孔

中间 1 孔,周围 6 孔为一组。孔径 4 mm,孔间距 3 mm。用针挑出或吸出孔内琼脂,用火焰封底。孔的布局参见图 1。

6.5.3 加样

检测血清:用微量移液器加样,周边孔加副猪嗜血杆菌 1~15 型标准菌株抗原,中间加入待检血清,待检血清加样孔两边分别设立阴性血清对照孔和阳性血清对照孔,同时要保证一对标准抗原能与其相应的阳性血清对照孔相邻,加样量以加满为宜。加样完毕后,将凝胶板放入湿盒置 37 ℃温箱中孵育。

6.5.4 结果判定

加样后 24 h 开始观察,每天观察并记录,连续观察 3 d,当标准抗原与相应标准阳性血清间出现沉淀线时,被检血清与标准菌株抗原间也出现明显清晰的沉淀线,即可判定待检血清为阳性;否则判定为阴性。见图 1。

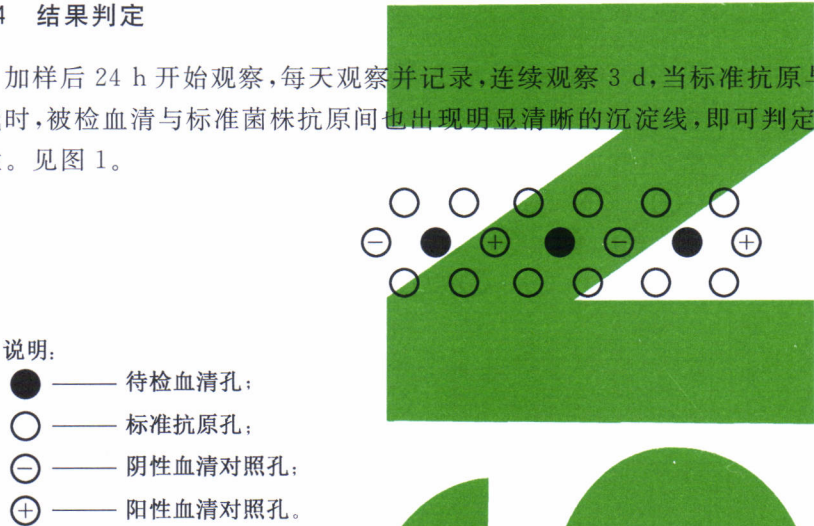


图 1 琼脂凝胶免疫扩散试验加样示意图

7 综合判定

- 7.1 当猪出现特征性的临床症状和病理变化,若细菌分离鉴定和 PCR 的结果均为阳性时,判定为副猪嗜血杆菌病阳性;若细菌分离鉴定和 PCR 的结果均为阴性时,判定为副猪嗜血杆菌病阴性。
- 7.2 当猪出现的特征性临床症状和病理变化,若细菌分离鉴定和 PCR 的结果不一致时,可用 6.3 PCR 或 16S rDNA 细菌鉴定 PCR 试剂盒对细菌 16S rDNA 进行扩增并测序,根据 DNA 测序和分析结果做出准确判定。
- 7.3 当非免疫猪出现特征性的临床症状和病理变化,且实验室 I-ELISA 或 AGID 检测出副猪嗜血杆菌抗体时,判定为副猪嗜血杆菌病阳性,否则判定为阴性。

附 录 A
(规范性附录)
培养基与试剂配制

A.1 胰蛋白大豆琼脂(TSA)

胰酶消化酪蛋白	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水加至	1 000 mL

将以上各成分溶解于蒸馏水中,调 pH 至 7.1~7.5,加热煮沸溶解。于 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min,冷却至 50 ℃,加入 50 mL 灭活的新生牛血清和 10 mL 经过滤除菌的 1% NAD,充分摇匀后倾注平板。

A.2 胰蛋白大豆肉汤(TSB)

胰酶消化酪蛋白	17.0 g
大豆蛋白胨	3.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水加至	1 000 mL

将以上各成分溶解于蒸馏水中,调 pH 至 7.1~7.5,加热煮沸溶解。于 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。使用前,加入 50 mL 灭活的新生牛血清和 10 mL 过滤除菌的 1%NAD,充分摇匀后使用。

A.3 巧克力琼脂平板

配制 TSA 培养基 1 000 mL,于 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min,冷却至 50 ℃,加入 50 mL~100 mL 无菌脱纤维羊鲜血,充分混匀后于 80 ℃ 水浴,待培养基颜色完全变成巧克力色(约需 5 min~10 min)后,冷却至 50 ℃,加入 50 mL 灭活的新生牛血清和 10 mL 过滤除菌的 1%NAD,充分摇匀后倾注平板。

A.4 鲜血琼脂平板

配制 TSA 培养基 1 000 mL,于 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min,冷却至 50 ℃,加入 50 mL~100 mL 无菌脱纤维羊鲜血,充分摇匀后倾注平板。

A.5 革兰氏染色液

A.5.1 结晶紫染色液

结晶紫	1.0 g
-----	-------

95%乙醇	20 mL
-------	-------

1%草酸铵水溶液	80 mL
----------	-------

将结晶紫溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.5.2 革兰氏碘液

碘	1.0 g
---	-------

碘化钾(KI)	2.0 g
---------	-------

蒸馏水加至	300 mL
-------	--------

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,完全溶解后,再加蒸馏水 300 mL。

A.5.3 复染液

沙黄	0.25 g
----	--------

95%乙醇	10 mL
-------	-------

蒸馏水	90 mL
-----	-------

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.6 50×TAE 电泳缓冲液

Tris 碱	242.0 g
--------	---------

冰乙酸	57.1 mL
-----	---------

0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	100 mL
------------------------	--------

蒸馏水加至	1 000 mL
-------	----------

将以上各成分混合,再加蒸馏水至 1 000 mL。应用前用蒸馏水将 50×TAE 电泳缓冲液作 50 倍稀释。

A.7 6×加样缓冲液

氢氧化钠	300 mmol/L
------	------------

EDTA	6 mmol/L
------	----------

聚糖体	18%
-----	-----

溴甲酚绿	0.15%
------	-------

二甲苯青	0.25%
------	-------

A.8 溴化乙锭溶液

将 1.0 g 溴化乙锭加入到 100 mL 蒸馏水中,磁力搅拌器搅拌数小时直至完全溶解,避光保存备用。

A.9 PBS 液(0.1 mol/L PBS,pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	80.0 g
-----------	--------

氯化钾(KCl)	2.0 g
----------	-------

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	29.0 g
---	--------

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	2.0 g
-----------------------------------	-------

蒸馏水加至 1 000 mL

将上述成分依次溶解,混匀,调节 pH 为 7.4,分装后于 121 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

A.10 包被液(0.05 mol/L, pH 9.6 碳酸盐缓冲液)

碳酸氢钠(NaHCO_3) 1.46 g

无水碳酸钠(Na_2CO_3) 0.97 g

蒸馏水 500 mL

溶解后置于 4 °C 冰箱,1 周内使用。

A.11 洗涤液(0.01 mol/L, pH 7.4 的 PBST)

氯化钠(NaCl) 8.0 g

氯化钾(KCl) 0.2 g

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.9 g

磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.2 g

吐温-20 0.5 mL

蒸馏水加至 1 000 mL

将上述溶液依次溶解后置于 4 °C 冰箱,1 周内使用。

A.12 封闭液

1%牛血清白蛋白的 PBST。

A.13 底物溶液

A.13.1 柠檬酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 5.0)

甲液:0.2 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)溶液

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 71.6 g

蒸馏水加至 1 000 mL

乙液:0.1 mol/L 柠檬酸液

柠檬酸 21.0 g

蒸馏水加至 1 000 mL

取乙液 24.3 mL,甲液 25.7 mL,混匀,pH 5.0。

A.13.2 底物溶液

柠檬酸缓冲液 20 mL

邻苯二胺(OPD) 20.0 mg

临用前加 30% H_2O_2 0.075 mL(75 μL),现配现用。底物溶液对光敏感,应避免强光直射。

A.14 终止液(2 mol/L 硫酸)

将 22.2 mL 硫酸(H_2SO_4)缓缓加入到 177.8 mL 蒸馏水中混匀。

附 录 B
(规范性附录)
副猪嗜血杆菌主要生化反应

表 B.1 副猪嗜血杆菌主要生化反应特征

项目	生化特性	项目	生化特性
V 因子依赖	+	L-阿拉伯糖	—
溶血性	—	甘露醇	—
CAMP	—	蔗糖	+
过氧化氢酶	+	木糖	—
氧化酶	—	半乳糖	+
尿素酶	—	果糖	+
鸟氨酸脱羧酶	—	棉籽糖	—
靛基质	—	山梨醇	—
葡萄糖产酸	+	麦芽糖	+
注：“+”表示阳性，“—”表示阴性。			