

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 546—2015  
代替 NY/T 546—2002

---

## 猪传染性萎缩性鼻炎诊断技术

Detection of infectious atrophic rhinitis for  
swine

2015-05-21 发布

2015-08-01 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。

本标准代替 NY/T 546—2002《猪传染性萎缩性鼻炎诊断技术》。

本标准与 NY/T 546—2002 相比,病原部分增加了病原菌的 PCR 诊断方法。

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:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:彭发泉、杨旭夫、苑士祥、王春来。

本标准的历次版本发布情况为:

——NY/T 546—2002。

## 猪传染性萎缩性鼻炎诊断技术

### 1 范围

本标准规定了猪传染性萎缩性鼻炎的诊断标准及技术方法。

本标准适用于猪传染性萎缩性鼻炎的诊断和检疫。

### 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 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**支气管败血波氏杆菌** *bordetella bronchiseptica*

波代杆菌属。

#### 3.2

**产毒素性多杀巴氏杆菌** *toxigenic pasteurella multocida*

巴氏杆菌属。

### 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AR: atrophic rhinitis 萎缩性鼻炎。

DNA: deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸。

NLHMA: 新霉素洁霉素血液马丁琼脂。

HFMA: 血红素呋喃唑酮改良麦康凯琼脂。

PBS: phosphate buffer solution 磷酸盐缓冲液。

PCR: polymerase chain reaction 聚合酶链式反应。

Taq 酶: taq DNA polymerase Taq DNA 聚合酶。

### 5 临床诊断

#### 5.1 流行特点

猪传染性萎缩性鼻炎是由于仔猪生后早期在鼻腔感染支气管败血波氏杆菌 I 相菌或其后重复感染产毒素性多杀巴氏杆菌(主要为荚膜 D 型,也有荚膜 A 型)引起的。这两种致病菌均产生细胞内皮肤坏死毒素,在感染过程中释放,穿透被破坏的鼻黏膜屏障,作用于生长迅速的仔猪鼻甲骨及鼻中隔骨组织,引起骨吸收、骨坏死及骨再造障碍变化,并可引起全身骨骼钙代谢障碍和淋巴免疫系统抑制。致病力不同的菌株产生毒素的能力也不同;毒素的致病作用具有明显的年龄和剂量依赖性。病菌通常通过病猪和带菌猪的鼻汁,经直接或间接接触而传播。支气管败血波氏杆菌越在生后早龄感染,病变越重。1 月

龄以后感染时,多为中等或轻症病例,且鼻甲骨容易再生修复;2月龄~3月龄时感染,仅呈组织学的轻症经过,不引起肉眼的鼻甲骨萎缩病变。支气管败血波氏杆菌引起的鼻甲骨萎缩,只在少数严重病例伴有鼻部变形变化。多杀巴氏杆菌的鼻腔感染在猪的日龄上晚于支气管败血波氏杆菌。产毒素性多杀巴氏杆菌菌株尽管在实验室人工感染证明在辅助刺激下可单独引起猪的萎缩性鼻炎,但至今在疫群仍发现是支气管败血波氏杆菌Ⅰ相菌的重复或继发感染病原菌。产毒素性多杀巴氏杆菌菌株与支气管败血波氏杆菌Ⅰ相菌菌株重复或继发感染,可在更年长的仔猪引起不可逆的持续的鼻甲骨萎缩病变[即所谓“进行性萎缩性鼻炎”(progressive atrophic rhinitis)],在疫群中产生较多的鼻部变形病猪,尤以早龄感染两种菌的强毒力株时为严重。饲养管理和环境应激因素及其他继发病原,均可影响仔猪的发病程度。

## 5.2 临床症状

### 5.2.1 仔猪群

有一定数目的仔猪流鼻涕、流泪、经常喷嚏、鼻塞或咳嗽,但无热,个别鼻涕混有血液。一些仔猪发育迟滞,犬齿部位的上唇侧方肿胀。

### 5.2.2 育成猪群和成猪群

- a) 鼻塞,不能长时间将鼻端留在粉料中采食;衄血,饲槽沿染有血液。
- b) 两侧内眼角下方颊部形成“泪斑”。
- c) 鼻部和颜面变形:
  - 1) 上颌短缩,前齿咬合不齐(评定标准:下中切齿在上中切齿之后为阴性,反之为阳性);
  - 2) 鼻端向一侧弯曲或鼻部向一侧歪斜;
  - 3) 鼻背部横皱褶逐渐增加;
  - 4) 眼上缘水平上的鼻梁变平变宽。
- d) 伴有生长欠佳。

### 5.2.3 检疫对象猪群

发现有上述征候群,可以临床上初步诊断猪群有支气管败血波氏杆菌Ⅰ相菌的传染或与产毒素性多杀巴氏杆菌的混合感染,特别是5.2.2中c)具有本病临床指征意义,需进行检菌、血清学试验及病理解剖检查,予以确诊。

## 5.3 病理变化

### 5.3.1 尸体外观检查

主要检查有无鼻部和颜面变形及发育迟顿,记录其状态和程度。对上颌短缩可以做定性,下中切齿在上中切齿之后判为“-”,反之判定为“+”;测量上中切齿与下中切齿的离开程度,如-3 mm或+12 mm分别判定为正常或阳性。

### 5.3.2 鼻部横断检查

5.3.2.1 查鼻腔是在鼻部做1个~3个横断,检查横断面。鼻部的标准横断水平在上颌第二前臼齿的前缘(此部鼻甲骨卷曲发育最充分)。先除去术部皮肉,然后用锐利的细齿手锯或钢锯以垂直方向横断鼻部。可再向前(通过上颌犬齿)或向后做第二和第三新的横断,其距离大猪为1.5 cm~2 cm,哺乳仔猪约0.5 cm。

5.3.2.2 为便于检查断面,先用脱脂棉轻轻除去锯屑。如果拍照,应将鼻道内的凝血块等填物除去,使断面构造清晰完整。必要时,可用吸水纸吸除液体。

5.3.2.3 检查鼻道内分泌物的性状和数量及黏膜的变化(水肿、发炎、出血、腐烂等)。

5.3.2.4 主要检查鼻甲骨、鼻中隔和鼻腔周围骨的对称性、完整性、形态和质地(变形、骨质软化或疏松、萎缩以至消失)以及两侧鼻腔的容积。如果需要,可以测量鼻中隔的倾斜或弯曲程度、鼻腔纵径及两侧鼻腔的最大横径。除肉眼检查外,应对鼻甲骨进行触诊,以确定卷曲及其基础部骨板的质地(正常骨板坚硬,萎缩者软化以至消失)。鼻甲骨萎缩主要发生于下鼻甲骨,特别是腹卷曲。鼻腔标准横断面的

萎缩性鼻炎分级标准见附录 A。

### 5.3.3 肺部检查

少数病仔猪伴有波氏杆菌性支气管肺炎。肺炎区主要散在于肺前叶及后叶的腹面部分,特别是肺门部附近,也可能散在于肺的背面部分。病变呈斑块状或条状发生。急性死亡病例均为红色肺炎灶。

### 5.3.4 具有鼻甲骨萎缩病变的病猪

不论有或无临床鼻部弯曲等颜面变形症状,判定为萎缩性鼻炎病猪。

## 6 实验室诊断

### 6.1 仪器、材料与试剂

除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 的灭菌双蒸水或超纯水。

#### 6.1.1 试剂

蛋白胨、琼脂粉、氯化钠、氯化钾、葡萄糖、乳糖、三号胆盐、中性红、呋喃唑酮二甲基甲酰胺、牛或绵羊红细胞裂解液、马丁琼脂、脱纤牛血、硫酸新霉素、盐酸洁霉素、多型蛋白胨、牛肉膏、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、硫代硫酸钠、硫酸亚铁铵、混合指示剂、尿素、酸性品红、马铃薯、甘油、盐酸、dNTPs、Taq 酶。

#### 6.1.2 材料

无菌棉拭子、无菌 1.5 mL 离心管、无菌试管、PCR 管、一次性培养皿。

### 6.2 病原分离

由猪鼻腔采取鼻黏液,同时进行支气管败血波氏杆菌 I 相菌及产毒素性多杀巴氏杆菌的分离。猪群检疫以 4 周龄~16 周龄特别是 4 周龄~8 周龄猪的检菌率最高。

#### 6.2.1 鼻黏液的采取

6.2.1.1 由两侧鼻腔采取鼻黏液,可用一根棉头拭子同时采取两侧鼻黏液,或每侧鼻黏液分别用一根棉头拭子采取。

6.2.1.2 拭子的长度和粗细视猪的大小而定,应光滑可弯曲,由竹皮等材料削成,前部钝圆,缠包脱脂棉,装入容器,高压灭菌。

6.2.1.3 小猪可仰卧保定,大猪用鼻拧子保定。用拧去多余酒精的酒精棉先将鼻孔内缘清拭,然后清拭鼻孔周围。

6.2.1.4 拭子插入鼻孔后,先通过前庭弯曲部,然后直达鼻道中部,旋转拭子将鼻分泌物取出。将拭子插入灭菌空试管中(不要贴壁推进),用试管棉塞将拭子杆上端固定。

6.2.1.5 夏天不能立即涂抹培养基时,应将拭子试管立即放入冰箱或冰瓶内。鼻黏液应在当天最好在几小时内涂抹培养基,拭子仍保存于 4℃ 冰箱备复检。

6.2.1.6 采取鼻汁时病猪往往喷嚏,术者应注意消毒手,防止材料交叉污染。

6.2.1.7 解剖猪时,应采取鼻腔后部(至筛板前壁)和气管的分泌物及肺组织进行培养。鼻锯开术部及鼻锯应火焰消毒,由鼻断端插入拭子直达筛板,采取两侧鼻腔后部的分泌物。气管由声门插入拭子达气管下部,在气管壁旋转拭子取出气管上下部的分泌物。肺在肺门部采取肺组织,如有肺炎并在病变部采取组织块;也可以用拭子插入肺断面采取肺汁和碎组织。

#### 6.2.2 分离培养

所有病料都直接涂抹在已干燥的分离平板上。分离支气管败血波氏杆菌使用血红素呋喃唑酮改良麦康凯琼脂(HFMA)平板(配方见附录 B),分离多杀巴氏杆菌使用新霉素洁霉素血液马丁琼脂(NLH-MA)平板(配方见附录 C)。棉拭子应尽量将全部分泌物浓厚涂抹于平板表面,组织块则将各断面同样浓厚涂抹。重要的检疫,如种猪检疫对每份鼻腔病料应涂抹每种分离平板 2 个。不同种分离平板不能混涂同一拭子(因抑菌剂不同)。对伴有肠道感染(腹泻)的或环境严重污染的猪群,每份鼻腔病料可用

一个平板做浓厚涂抹,另一个平板做划线接种,即先将棉拭子病料在平板的一角做浓厚涂抹,然后以铂圈做划线稀释接种。

#### 6.2.2.1 猪支气管败血波氏杆菌的分离培养

将接种的 FHMA 平板于 37℃ 培养 40 h~72 h,猪支气管败血波氏杆菌集落不变红,直径为 1 mm~2 mm,圆整、光滑、隆起、透明,略呈茶色。较大的集落中心较厚,呈茶黄色,对光观察呈浅蓝色。用支气管败血波氏杆菌 OK 抗血清做活菌平板凝集反应呈迅速的典型凝集。有些例集落黏稠或干韧,在玻片上不能做成均匀菌液,须移植一代才能正常进行活菌平板凝集试验。未发现典型集落时,对所有可疑集落,均需做活菌平板凝集试验,以防遗漏。如菌落小,可移植增菌后进行检查。如平板上有大肠杆菌类细菌(变红、粉红或不变红)或绿脓杆菌类细菌(产生或不产生绿色素但不变红)覆盖,应将冰箱保存的棉拭子再进行较稀的涂抹或划线培养检查,或重新采取鼻汁培养检查。

平板目的菌集落计数分级见附录 D。

#### 6.2.2.2 产毒素性多杀巴氏杆菌的分离培养

将接种的 NLHMA 平板于 37℃ 培养 18 h~24 h,根据菌落形态和荧光结构,挑取可疑集落移植鉴定。多杀巴氏杆菌集落直径约 1 mm~2 mm,圆整、光滑、隆起、透明,集落或呈黏液状融合;对光观察有明显荧光;以 45° 折射光线于暗室内在实体显微镜下扩大约 10 倍观察,呈特征的橘红或灰红色光泽,结构均质,即 FO 虹光型或 FO 类似菌落。间有变异型菌落,光泽变浅或无光泽,有粗纹或结构发粗,或夹有浅色分化扇状区等。

平板目的菌集落计数分级见附录 D。

### 6.3 分离物的特性鉴定

#### 6.3.1 猪支气管败血波氏杆菌分离物的特性鉴定

##### 6.3.1.1 一般特性鉴定

革兰氏阴性小杆菌,氧化和发酵(O/F)试验阴性,即非氧化非发酵严格好氧菌。具有以下生化特性(一般 37℃ 培养 3 d~5 d 记录最后结果):

- a) 糖管:包括乳糖、葡萄糖、蔗糖在内的所有糖类不氧化、不发酵(不产酸、不产气),迅速分解蛋白胨明显产碱,液面有厚菌膜;
- b) 不产生靛基质;
- c) 不产生硫化氢或轻微产生;
- d) MR 试验及 VP 试验均阴性;
- e) 还原硝酸盐;
- f) 分解尿素及利用枸橼酸,均呈明显的阳性反应;
- g) 不液化明胶;
- h) 石蕊牛乳产碱不消化;
- i) 有运动性,在半固体平板表面呈明显的膜状扩散生长,扩散膜边沿比较光滑;但 0.05%~0.1% 琼脂半固体高层穿刺 37℃ 培养,只在表面或表层生长,不呈扩散生长。

##### 6.3.1.2 菌相鉴定

将分离平板上的典型单个菌落划种于绵羊血改良鲍姜氏琼脂(配方见附录 E)平板(凝结水已干燥)上,于 37℃ 潮湿温箱中培养 40 h~45 h。I 相菌落小,光滑,乳白色,不透明,边沿整齐,隆起呈半圆形或珠状,钩取时质地致密柔软,易制成均匀菌液。菌落周围有明显的  $\beta$  溶血环。菌体呈整齐的革兰氏阴性球杆状或球状。活菌玻片凝集定相试验,对 K 抗血清呈迅速的典型凝集,对 O 抗血清完全不凝集。I 相菌感染病例在平板上,应不出现中间相和 III 相菌落。III 相菌落扁平,光滑,透明度大,呈灰白色,比 I 相菌落大数倍,质地较稀软,不溶血。活菌玻片凝集定相试验,对 O 抗血清呈明显凝集,对 K 抗血清完全不凝集。中间相菌落形态在 I 相及 III 相之间,对 K 及 O 抗血清都凝集。中间相及 III 相菌,以杆状为

主。

### 6.3.2 产毒素性多杀巴氏杆菌分离物的特性鉴定

#### 6.3.2.1 一般特性鉴定

6.3.2.1.1 革兰氏阴性小杆菌呈两极染色,不溶血,无运动性。具有以下生化特性:

- a) 糖管:对蔗糖、葡萄糖、木糖、甘露醇及果糖产酸;对乳糖、麦芽糖、阿拉伯糖及杨甘不产酸;
- b) VP、MR、尿素酶、枸橼酸盐利用、明胶液化、石蕊牛乳均为阴性;
- c) 不产生硫化氢;
- d) 硝酸还原及胨基质产生均为阳性。

6.3.2.1.2 对分离平板上的可疑菌落,也可先根据三糖铁胨半固体高层(配方见附录 F)小管穿刺生长特点进行筛选:

将单个集落以接种针由斜面中心直插入底层,轻轻由原位抽出,再在斜面上轻轻涂抹,37℃斜放培养 18 h。多杀巴氏杆菌生长特点:

- a) 沿穿刺线呈不扩散生长,高层变橘黄色;
- b) 斜面呈薄苔生长,变橘红或橘红黄色;
- c) 凝结水变橘红色,轻浊生长,无菌膜;
- d) 不产气、不变黑。

#### 6.3.2.2 皮肤坏死毒素产生能力检查

体重 350 g~400 g 健康豚鼠,背部两侧注射部剪毛(注意不要损伤皮肤),使用 1 mL 注射器及 4 号~6 号针头,皮内注射分离株马丁肉汤 37℃ 36 h(或 36 h~72 h)培养物 0.1 mL。注射点距背中线上 1.5 cm,各注射点相距 2 cm 以上。设阳性及阴性参考菌株和同批马丁肉汤注射点为对照。并在大腿内侧肌内注射硫酸庆大霉素 4 万 IU(1 mL)。注射后 24 h、48 h 及 72 h 观察并测量注射点皮肤红肿及坏死区的大小。坏死区直径 1.0 cm 左右为皮肤坏死毒素产生(DNT)阳性; <0.5 cm 为可疑;无反应或仅红肿为阴性。可疑须复试。阳性株对照坏死区直径应 >1.0 cm,阴性株及马丁汤对照应均为阴性。阳性结果记为 DNT<sup>+</sup>,阴性结果记为 DNT<sup>-</sup>。

#### 6.3.2.3 荚膜型简易鉴定法

##### 6.3.2.3.1 透明质酸产生试验(改良 Carter 氏法)

在 0.2%脱纤牛血马丁琼脂平板上于中线以直径 2mm 铂圈均匀横划一条已知产生透明质酸酶的金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)或等效的链球菌新鲜血斜培养物,将每株多杀巴氏杆菌分离物的血斜过夜培养物,与该线呈直角于两侧划线,各均匀划种一条同样宽的直线。并设荚膜 A 型及 D 型多杀巴氏杆菌参考株做对照。37℃培养 20 h,A 型株临接葡萄球菌菌苔应产生生长抑制区。此段菌苔明显薄于远端未抑制区,荧光消失,长度可达 1 cm,远端菌苔生长丰厚,特征虹光型(FO 型)不变,两段差别明显。D 型株则不产生生长抑制区,FO 型虹光不变。个别 A 型分离物不产生明显多量的透明质酸。本法及吡啶黄试验时判定为 D 型,间接血凝试验(Sawada 氏法)则判定为 A 型。

##### 6.3.2.3.2 吡啶黄试验(改良 Carter 氏法)

分离株的 0.2%脱纤牛血马丁琼脂 18 h~24 h 培养物,刮取菌苔,均匀悬浮于 pH 7.0 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水中。取 0.5 mL 细菌悬液加入小试管中,与等容量 0.1%中性吡啶黄蒸馏水溶液振荡混合,室温静置。D 型菌可在 5 min 后自凝,出现大块絮状物,30 min 后絮状物下沉,上清透明。其他型菌不出现或仅有细小的颗粒沉淀,上清浑浊。

### 6.4 PCR 检测

#### 6.4.1 样品处理

##### 6.4.1.1 鼻或气管拭子

将鼻或气管拭子浸入 1 mL 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)缓冲液中(配方见附录 G),反复挤压,将混悬

液作为聚合酶链式反应(PCR)的模板。

#### 6.4.1.2 肺组织

将肺组织样品剪碎,取1 g加入1 mL 0.01 mol/L PBS缓冲液中研磨后,用双层灭菌纱布过滤。收集过滤液于2 mL灭菌离心管,4℃ 7 500 g离心15 min。弃上清,收集沉淀,用0.1 mL PBS缓冲液重悬。

#### 6.4.2 PCR检测

##### 6.4.2.1 反应体系(50 μL)

10×PCR buffer(含 $Mg^{2+}$ )	5 μL
脱氧三磷酸核苷酸混合液(dNTPs,各 200 μmol/L)	4 μL
上游引物(10 μmol/L)	1 μL
下游引物(10 μmol/L)	1 μL
模板(上述制备样品)	1 μL
无菌超纯水	37.5 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.5 μL

样品检测时,同时要设阳性对照和阴性对照。阳性对照模板为细菌的基因组,阴性对照为不含模板的反应体系。检测所用引物序列见附件 H。

##### 6.4.2.2 PCR反应程序

所有程序均95℃预变性5 min,然后扩增35个循环,如下:

- 鉴定支气管败血波氏杆菌:(94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 20 s)35个循环,72℃ 5 min;
- 鉴定多杀巴氏杆菌:(94℃ 30 s,55℃ 1 min,72℃ 30 s)35个循环,72℃ 7 min;
- 鉴定产毒素多杀巴氏杆菌:(94℃ 30 s,50℃ 1 min,72℃ 1 min)35个循环,72℃ 7 min;
- 鉴定A、D型多杀巴氏杆菌:(94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min)35个循环,72℃ 10 min。

##### 6.4.2.3 电泳检测

PCR反应结束,取扩增产物5 μL(包括被检样品、阳性对照、阴性对照)与1 μL上样缓冲液混合,同时取DL-2000 DNA分子质量标准5 μL,点样于1%琼脂糖凝胶中,100 V电泳30 min。

#### 6.4.3 PCR试验结果判定

6.4.3.1 将扩增产物电泳后用凝胶成像仪观察,DNA分子质量标准、阳性对照、阴性对照为如下结果时试验方成立,否则应重新试验。

- DL-2000 DNA分子质量标准电泳道,从上到下依次出现2 000 bp、1 000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp共6条清晰的条带;
- 阳性样品泳道出现一条约187 bp清晰的条带(猪支气管败血波氏杆菌),457 bp的条带(多杀巴氏杆菌),812 bp条带(产毒素多杀巴氏杆菌),1 050 bp(A型多杀巴氏杆菌)或648 bp条带(D型多杀巴氏杆菌);
- 阴性对照泳道不出现条带。

##### 6.4.3.2 被检样品结果判定

在同一块凝胶板上电泳后,当DNA分子质量标准、各组对照同时成立时,被检样品电泳道出现一条187 bp的条带,判为猪支气管败血波氏杆菌阳性(+);被检样品电泳道出现一条457 bp的条带,判为多杀巴氏杆菌阳性(+);被检样品电泳道出现一条812 bp的条带,判为产毒素多杀巴氏杆菌阳性(+);被检样品电泳道出现一条1 050 bp的条带,判为A型多杀巴氏杆菌阳性(+);被检样品电泳道出现一条648 bp的条带,判为D型多杀巴氏杆菌阳性(+);被检样品泳道没有出现以上任一条带,判为阴性(-)。阳性和阴性对照结果不成立时,应检查试剂是否过期、污染等,试验需重做。结果判定参见附录 I。



## 6.5 血清学检测

### 6.5.1 使用范围

6.5.1.1 本试验是使用猪支气管败血波氏杆菌Ⅰ相菌福尔马林死菌抗原,进行试管或平板凝集反应检测感染猪血清中的特异性K凝集抗体。其中,平板凝集反应适用于对本病进行大批量筛选试验,试管凝集反应作为定性试验。

6.5.1.2 哺乳早期感染的仔猪群,自1月龄左右逐渐出现可检出的K抗体,到5月龄~8月龄期间,阳性率可达90%以上,以后继续保持阳性。最高K抗体价可达1:320~640或更高,3周龄以上的猪一般可在感染后10d~14d出现K抗体。

6.5.1.3 感染母猪通过初乳传递给仔猪的K抗体,一般在出生后1个月~2个月内消失;注射过猪支气管败血波氏杆菌菌苗的母猪生下的仔猪,则被动抗体价延缓消失。

### 6.5.2 试验材料

6.5.2.1 抗原按说明书要求使用。

6.5.2.2 标准阳性和阴性对照血清按说明书要求使用。

6.5.2.3 被检血清必须新鲜,无明显蛋白凝固,无溶血现象和无腐败气味。

6.5.2.4 稀释液为pH 7.0磷酸盐缓冲盐水。配方为: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.4 g(或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.2 g), $\text{NaCl}$  6.8 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.7 g,蒸馏水 1 000 mL,加温溶解,两层滤纸滤过,分装,高压灭菌。

### 6.5.3 操作方法及结果判定

#### 6.5.3.1 试管凝集试验

6.5.3.1.1 被检血清和阴、阳性对照血清同时置于56℃水浴箱中灭能30 min。

6.5.3.1.2 血清稀释方法:每份血清用一系列小试管(口径8 mm~10 mm),第一管加入缓冲盐水0.8 mL,以后各管均加入0.5 mL,加被检血清0.2 mL于第一管中。换另一支吸管,将第一管稀释血清充分混匀,吸取0.5 mL加入第二管,如此用同一吸管稀释,直至最后一管,取出0.5 mL弃去。每管为稀释血清0.5 mL。一般稀释到1:80,大批检疫时可稀释到1:40。阳性对照血清稀释到1:160~1:320;阴性对照血清至少稀释到1:10。

6.5.3.1.3 向上述各管内添加工作抗原0.5 mL,振荡,使血清和抗原充分混匀。

6.5.3.1.4 放入37℃温箱18 h~20 h。然后,取出在室温静置2 h,记录每管的反应。

6.5.3.1.5 每批试验均应设有阴、阳性血清对照和抗原缓冲盐水对照(抗原加缓冲盐水0.5 mL)。

6.5.3.1.6 结果判定:

“++++”:表示100%菌体被凝集。液体完全透明,管底覆盖明显的伞状凝集沉淀物。

“+++”:表示75%菌体被凝集。液体略呈混浊,管底伞状凝集沉淀物明显。

“++”:表示50%菌体被凝集。液体呈中等程度混浊,管底有中等量伞状凝集沉淀物。

“+”:表示25%菌体被凝集。液体不透明或透明度不明显,有不太显著的伞状凝集沉淀物。

“-”:表示菌体无凝集。液体不透明,无任何凝集沉淀物。细菌可能沉于管底,但呈光滑圆坨状,振荡时呈均匀混浊。

当抗原缓冲盐水对照管、阴性血清对照管均呈阴性反应,阳性血清对照管反应达到原有滴度时,被检血清稀释度 $\geq 10$ 出现“++”以上,判定为猪支气管败血波氏杆菌阳性反应血清。

#### 6.5.3.2 平板凝集试验

6.5.3.2.1 被检血清和阴、阳性对照血清均不稀释,可以不加热灭能。

6.5.3.2.2 于清洁的玻璃板或玻璃平皿上,用玻璃笔划成约2 cm<sup>2</sup>的小方格。以1 mL吸管在格内加一小滴血清(约0.03 mL),再充分混合一铂圈(直径8 mm)抗原原液,轻轻摇动玻璃板或玻璃平皿,于室温(20℃~25℃)放置2 min。室温在20℃以下时,适当延长至5 min。

6.5.3.2.3 每次平板试验均应设有阴、阳性血清对照和抗原缓冲盐水对照。

6.5.3.2.4 结果判定:

“++++”:表示 100%菌体被凝集。抗原和血清混合后,2 min 内液滴中出现大凝集块或颗粒状凝集物,液体完全清亮。

“+++”:表示约 75%菌体被凝集。在 2 min 内液滴有明显凝集块,液体几乎完全透明。

“++”:表示约 50%菌体被凝集。液滴中有少量可见的颗粒状凝集物,出现较迟缓,液体不透明。

“+”:表示 25%以下菌体被凝集。液滴中有很少量仅仅可以看出的粒状物,出现迟缓,液体混浊。

“-”:表示菌体无任何凝集。液滴均匀混浊。

当阳性血清对照呈“++++”反应,阴性血清和抗原缓冲盐水对照呈“-”反应时,被检血清加抗原出现“++++”到“++”反应,判定为猪支气管败血波氏杆菌阳性反应血清。“++”反应判定为疑似,“+”至“-”反应判定为阴性。

## 7 结果判定

对猪群的检疫应综合应用临床检查、细菌检查及血清学检查,并选择样品病猪作病理解剖检查。检疫猪群诊断有鼻漏带血、泪斑、鼻塞、喷嚏,特别有鼻部弯曲等颜面变形的临床指征病状,鼻腔检出支气管败血波氏杆菌 I 相菌及/或产毒素性多杀巴氏杆菌,判定该猪群为传染性萎缩性鼻炎疫群。具有鼻甲骨萎缩病变,无论有或无鼻部弯曲等症状的猪,诊断为典型病变猪。检出支气管败血波氏杆菌 I 相菌及/或产毒素性多杀巴氏杆菌的猪,诊断为病原菌感染、排菌猪。检出猪支气管败血波氏杆菌 K 凝集抗体的猪,判定为猪支气管败血波氏杆菌感染血清阳转猪。疫群中的检菌及血清阴性的外观健康猪,需隔离多次复检,才能做最后阴性判定。

## 附 录 A (规范性附录)

### 鼻腔标准横断面的萎缩性鼻炎(AR)分级标准

#### A.1 正常(“—”)

两侧鼻甲骨对称,骨板坚硬,正常占有鼻腔容积(间腔正常),鼻中隔正直。两侧鼻腔容积对称,鼻腔纵径大于横径。

#### A.2 可疑(“?”)

鼻甲骨形态异常(变形)、不对称,不完全占有鼻腔容积。卷曲特别是腹卷曲疑有萎缩,但肉眼不能判定,鼻中隔或有轻度倾斜。

#### A.3 轻度萎缩(“+”)

一侧或两侧卷曲主要是腹卷曲轻度或部分萎缩,相应间腔加大;或卷曲变小,卷度变短,骨板变粗,相应间腔增大。也有轻度萎缩和变粗同时存在的病例。或伴有鼻中隔轻度倾斜或弯曲。表现出两侧或背、腹卷曲及其相应间腔的轻度不对称。

#### A.4 中等萎缩(“++”)

腹卷曲基本萎缩,背卷曲部分萎缩。

#### A.5 重度萎缩(“+++”)

腹卷曲完全萎缩,背卷曲大部分萎缩。

#### A.6 完全萎缩(“++++”)

背卷曲及腹卷曲均完全萎缩。

鼻甲骨中等到完全萎缩的病例,间或伴有鼻中隔不同程度的歪斜和弯曲,两侧鼻腔容积不对称或鼻腔的横径大于纵径。严重者鼻腔周围骨(鼻骨、上颌骨)可能萎缩变形。

卷曲萎缩明显以至消失者不难判定,但是腹卷曲的轻度萎缩有时难以判定,且易与发育不全混淆。卷曲往往只有变形而看不到萎缩。

鼻甲骨轻度萎缩与发育不全的鉴别:腹鼻甲骨发育不全是腹卷曲小,卷曲不全,甚至呈鱼钩状,但骨板坚硬,几乎正常占据鼻腔容积,两侧对称,其他鼻腔结构正常。如背卷曲同时变形,疑有萎缩,鼻中隔倾斜,则分级为“?”。

**附 录 B**  
(规范性附录)

**血色素呋喃唑酮改良麦康凯琼脂(HFMA)培养基配制方法**

**B.1 成分**

**B.1.1 基础琼脂(改良麦康凯琼脂)**

蛋白胨[日本大五牌多型蛋白胨(Polypeptone) 或 Oxoid 牌胰蛋白胨(Tryptone)]	2%
氯化钠	0.5%
琼脂粉(青岛)	1.2%
葡萄糖	1.0%
乳糖	1.0%
三号胆盐(Oxoid)	0.15%
中性红	0.003%(1%水溶液 3 mL/L)
蒸馏水加至	1 000 mL
加热溶化,分装。110℃ 20 min,pH 7.0~7.2。培养基呈淡红色。贮存室温或 4℃冰箱备用。	

**B.1.2 添加物**

1%呋喃唑酮二甲基甲酰胺溶液	0.05 mL/100 mL(呋喃唑酮最后浓度为 5 μg/mL)
10%牛或绵羊红细胞裂解液	1 mL(最后浓度为 1:1 000)
4℃冰箱保存备用。呋喃唑酮二甲基甲酰胺溶液临用时加热溶解。	

**B.2 配制方法**

基础琼脂水浴加热充分溶化,凉至 55℃~60℃,加入呋喃唑酮二甲基甲酰胺溶液及红细胞裂解液,立即充分摇匀,倒平板,每个平皿 20 mL(平皿直径 90 cm)。干燥后使用,或置于 4℃冰箱 1 周内使用。防霉生长可加入两性霉素 B 10 μg/mL 或放线酮 30 μg/mL~50 μg/mL。对污染较重的鼻腔拭子,可再加入壮观霉素 5 μg/mL~10 μg/mL(活性成分)。

**B.3 用途**

用于鼻腔黏液分离支气管败血波氏杆菌。

## 附 录 C

## (规范性附录)

## 新霉素洁霉素血液马丁琼脂(NLHMA)培养基配制方法

## C.1 成分

马丁琼脂	pH 7.2~7.4
脱纤牛血	0.2%
硫酸新霉素	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
盐酸洁霉素(林可霉素)	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

## C.2 配制方法

马丁琼脂水浴加热充分溶化,凉至约 55℃加入脱纤牛血、新霉素及洁霉素,立即充分摇匀,倒平板,每个平皿 15 mL~20 mL(平皿直径 90 cm)。干燥后使用,或保存 4℃冰箱 1 周内使用。

## C.3 用途

用于鼻腔黏液分离多杀巴氏杆菌。

**附 录 D**  
**(规范性附录)**  
**分离平板目的菌落计数分级**

- D.1** 一目的菌落阴性。
- D.2** +目的菌落 1 个~10 个。
- D.3** ++目的菌落 11 个~50 个。
- D.4** +++目的菌落 51 个~100 个。
- D.5** ++++目的菌落 100 个以上。
- D.6** 目的菌落密集成片不能计数。
- D.7** ×非目的菌(如大肠杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌等)生长成片,复盖平板,不能判定有无目的菌落。

**附 录 E**  
**(规范性附录)**

**绵羊血改良鲍姜氏琼脂培养基的配制方法**

**E.1 成分**

**E.1.1 基础琼脂(改良鲍姜氏琼脂)**

**E.1.1.1 马铃薯浸出液**

白皮马铃薯(去芽,去皮,切长条)500 g,甘油蒸馏水(热蒸馏水 1 000 mL,甘油 40 mL,甘油最后浓度 1%),洗净去水的马铃薯条加入甘油蒸馏水,119℃~120℃加热 30 min,不要振荡,倾出上清液使用。

**E.1.1.2 琼脂液**

氯化钠 16.8 g(最后浓度 0.6%),蛋白胨(大五牌多型蛋白胨或 Oxoid 牌胰蛋白胨)14 g(最后浓度 0.5%),琼脂粉(青岛)33.6 g(最后浓度 1.2%),蒸馏水加至 2 100 mL。120℃加热溶解 30 min,加入马铃薯浸出液的上清液 700 mL(即两液比例为 75%:25%)。混合,继续加热溶化,4 层纱布滤过,分装,116℃ 30 min。不调 pH,高压灭菌后 pH 一般为 6.4~6.7,贮于 4℃冰箱或室温备用。备做斜面的基础琼脂加蛋白胨,备做平板的不加蛋白胨。

**E.1.2 脱纤绵羊血**

无菌新采取,支气管败血波氏杆菌 K 和 O 凝集价均 $<1:10$ ,10%。

**E.2 配制方法**

基础琼脂溶化后凉至 55℃,加入脱纤绵羊血,立即充分混合,勿起泡沫,制斜面管或倒平板(直径 90 cm,平皿每皿 20 mL),放 4℃冰箱约 1 周后使用为佳。

**E.3 用途**

用于支气管败血波氏杆菌的纯菌培养及菌相鉴定。

附 录 F  
(规范性附录)  
三糖铁胨半固体高层培养基配制方法

F.1 成分

多型蛋白胨(Polypeptone)	1.0%
牛肉膏	0.5%
氯化钠	0.3%
磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.1%
琼脂粉	0.3%
硫代硫酸钠	0.03%
硫酸亚铁铵	0.03%
混合指示剂	5 mL
葡萄糖	0.1%
乳糖	1.0%
尿素	2.0%

注:混合指示剂配制:0.2% BTB水溶液(0.2 g BTB溶于50 mL酒精中,加蒸馏水50 mL)2.0 mL,0.2% TB水溶液(0.4 g TB溶于17.2 mL N/20 NaOH,加蒸馏水100 mL,再加水稀释1倍)1.0 mL,0.5%酸性品红水溶液2.0 mL。

F.2 配制方法

将前7种成分充分溶解于蒸馏水后,修正pH为6.9。再加入混合指示剂、葡萄糖、乳糖及尿素,充分溶解。每支小试管分装2 mL~2.5 mL,流动蒸气灭菌100 min,冷却放成半斜面,无菌检验,4℃冰箱保存备用。

F.3 用途

用于筛检鼻腔黏液分离平板上的可疑多杀巴氏杆菌集落。



**附 录 G**  
**(规范性附录)**

**0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.4)的配制**

**G.1 成分**

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g

**G.2 配制方法**

将以上 4 种成分溶于 800 mL 蒸馏水中,用 HCl 调节溶液的 pH 至 7.4,最后加蒸馏水定容至 1 L。  
115℃ 高压灭菌 10 min~15 min,常温保存备用。

附 录 H  
(规范性附录)  
引 物 序 列

**H.1 检测猪支气管败血波氏杆菌的引物序列**

Bb - F: 5'- CAGGAACATGCCCTTTG - 3' ;

Bb - R: 5'- TCCCAAGAGAGAAAGGCT - 3' 。

**H.2 检测多杀巴氏杆菌的引物序列**

Pm - F: 5'- ATCCGCTATTTACCCAGTGG - 3' ;

Pm - R: 5'- GCTGTAAACGAACTCGCCAC - 3' 。

**H.3 检测产毒素多杀巴氏杆菌的引物序列**

T+Pm - F: 5'- CTTAGATGAGCGACAAGG - 3' ;

T+Pm - R: 5'- ACATTGCAGCAAATTGTT - 3' 。

**H.4 检测 A 型多杀巴氏杆菌的引物序列**

Pm A - F: 5'- TGCCAAAATCGCAGTCAG - 3' ;

Pm A - R: 5'- TTGCCATCATTGTCAGTG - 3' 。

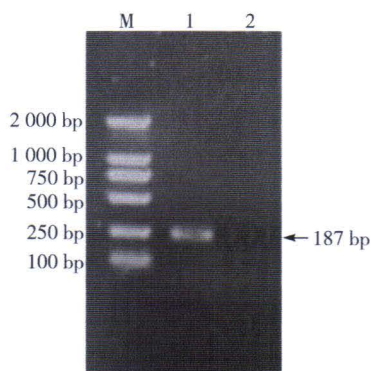
**H.5 检测 D 型多杀巴氏杆菌的引物序列**

Pm D - F: 5'- TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC - 3' ;

Pm D - R: 5'- CATCTACCCACTCAACCATATCAG - 3' 。

# 附 录 I (资料性附录)

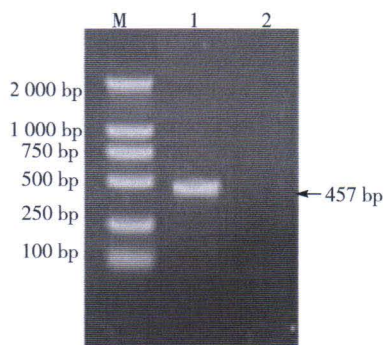
I.1 猪支气管败血波氏杆菌 PCR 检测结果判定图见图 I.1。



说明：  
M ——DL-2 000 DNA 分子质量标准； 泳道 2——阴性。  
泳道 1——阳性；

图 I.1 猪支气管败血波氏杆菌 PCR 检测结果电泳图

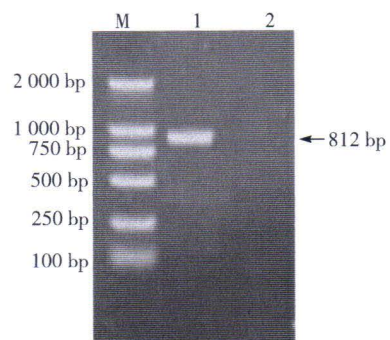
I.2 多杀巴氏杆菌 PCR 检测结果判定图见图 I.2。



说明：  
M ——DL-2 000 DNA 分子质量标准； 泳道 2——阴性。  
泳道 1——阳性；

图 I.2 多杀巴氏杆菌 PCR 检测结果电泳图

I.3 产毒素多杀巴氏杆菌 PCR 检测结果判定图见图 I.3。



说明：

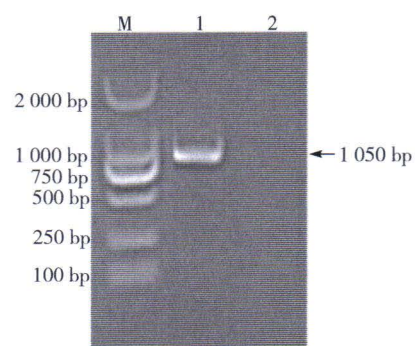
M ——DL-2 000 DNA 分子质量标准；

泳道 2——阴性。

泳道 1——阳性；

图 I. 3 产毒素多杀巴氏杆菌 PCR 检测结果电泳图

I. 4 A 型多杀巴氏杆菌 PCR 检测结果判定图见图 I. 4。



说明：

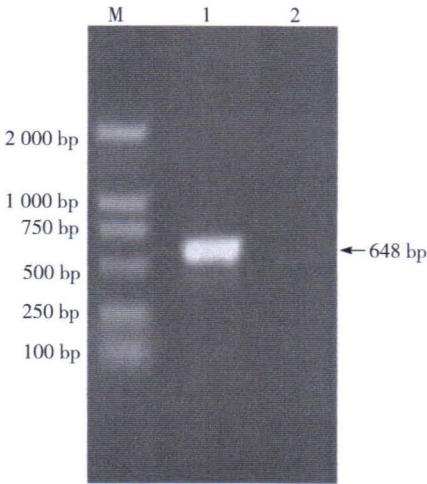
M ——DL-2 000 DNA 分子质量标准；

泳道 2——阴性。

泳道 1——阳性；

图 I. 4 A 型多杀巴氏杆菌 PCR 检测结果电泳图

I. 5 D 型多杀巴氏杆菌 PCR 检测结果判定图见图 I. 5。



说明：  
M ——DL-2 000 DNA 分子质量标准； 泳道 2——阴性。  
泳道 1——阳性；

图 I.5 D 型多杀巴氏杆菌 PCR 检测结果电泳图