

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 545—2002

猪痢疾诊断技术

Diagnostic techniques for swine dysentery

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

猪痢疾是危害严重的猪疫病。猪痢疾(swine dysentery 简称 SD)是一种严重的粘液性出血性腹泻病,是猪特有的一种慢性或急性肠道传染病。厌氧性猪痢疾蛇样螺旋体(*Serpulina hyodysenteriae* 简写 Sh)为 SD 病原,而肠道其他厌氧菌可加剧病情。

本病在流行病学、临床症状、病理变化等方面具有一定的特征性,是综合性诊断不可缺少的部分。但本病的确实诊断应依据从大肠或粪便中分离出 Sh 才能进行定性。在取得培养结果前,新鲜粪便或大肠粘膜及其内容物抹片镜检 Sh 也是一种实用的辅助手段。

本标准的附录 A、附录 B 均为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫化技术委员会归口。

本标准起草单位:山东农业大学、农业部动物检疫所。

本标准主要起草人:崔言顺、尹燕博、徐海花、蒋正军、郭福生、肖传发。

猪痢疾诊断技术

1 范围

本标准规定了猪痢疾(SD)诊断的技术要求。

本标准适用于猪痢疾的诊断。

本标准所规定的粪便中猪痢疾蛇样螺旋体(Sh)显微镜检查不适用于急性病例后期、慢性或隐性及投药后病例。

本标准肠致病性试验中结肠结扎试验可根据条件选做。

2 流行病学

2.1 猪痢疾在自然流行中只发生于猪。各种年龄、品种、性别的猪皆可发病,但幼猪(1.5~4月龄)最多见,而哺乳仔猪、成年猪发病较少。

2.2 本病主要经消化道感染。各种应激因素、阴雨潮湿、气候多变,均可促进本病发生。

2.3 本病无季节性,常呈缓慢传播,且流行持续期长,多数病猪转为慢性,康复后(自然康复或治疗后)可复发或多次复发。

3 临床症状

3.1 潜伏期:2日至2个月以上,一般为1~2周。

3.2 最急性:多见于爆发本病之初,表现急性剧烈腹泻,排便失禁,呈高度脱水状态而迅速死亡。病程12h~24h。

3.3 急性:病开始多为排软粪或稀粪,随即粪中出现大量粘液和血液(凝块),呈油脂样、蛋清样或胶冻状,粪色为棕色、红色或黑红色不等,病猪迅速消瘦,常转为慢性或死亡。病程1~2周。

3.4 亚急性或慢性:粘液出血性下痢时轻时重,生长发育停滞,常呈恶病质状态。部分康复猪经一定时间可以复发。病程4周以上。

3.5 本病用抗菌药物和对症治疗,可获临床治愈效果,亦为诊断本病的一个佐证。

4 病理变化

4.1 主要病变见于大肠,其他组织器官均无特征性病变。

4.2 早期病变常出现在结肠襻顶部,随病情进一步发展可以蔓延至盲肠、整个结肠和直肠前段。急性病例表现为粘液性、出血性和纤维素性渗出,肉眼可见大肠粘膜充血、肿胀和出血,并有胶冻样附着物,常混有血液和纤维素。严重时,粘膜表面有散在性或弥散性糠麸样或干酪样坏死物覆盖,刮去后露出不规则糜烂出血溃疡面。

5 粪便中 Sh 显微镜检查

5.1 材料准备

5.1.1 器材:显微镜,暗视野镜头,玻片及盖玻片,酒精灯等。

5.1.2 染色液:结晶紫染色液(革兰氏染色第一液)或稀释的石炭酸复红。

5.1.3 样品:病猪新鲜粪便(含粘液)或直肠拭子或大肠内容物及粘膜。

5.2 操作方法

5.2.1 染色样品制作:取样品少许直接抹片,干燥,火焰固定,以结晶紫液或稀释复红染色 2 min~3 min,水洗,吸干后待检。

5.2.2 悬滴样品制作:取样品少许悬于少量生理盐水中,作成悬滴样品后待检。

5.2.3 每份样品最少制片 2 张。

5.2.4 显微镜检查:染色样品以油镜直接观察,悬滴样品在暗视野(或暗光)400 倍~1 000 倍镜头下观察。

5.2.5 每片样品至少观察 10 个视野。

5.3 结果判定

典型 Sh 菌体长 $6\mu\text{m}\sim 8.5\mu\text{m}$,呈 2 个~5 个疏螺旋状,两端尖锐,呈蛇样活泼运动(暗视野)。当视野中有数量较多(3 条~5 条以上)Sh 样菌体时(见图 1),在获培养结果前,可作为诊断的重要参考依据。



注:图中小弯曲菌为弯杆菌。

图 1 病猪粪便中的猪痢疾蛇样螺旋体

6 大肠组织中 Sh 显微镜检查

6.1 材料准备

6.1.1 器材:切片机,显微镜,染色缸,盖玻片,水浴锅,温箱等。

6.1.2 试剂:福尔马林,95%及 100%酒精,二甲苯,切片石蜡,结晶紫染色液,姬姆萨氏染色液,蛋清等。

6.1.3 样品:有病变大肠。

6.2 操作方法

6.2.1 大肠组织切片样品制作

6.2.1.1 分别切取小块(1cm^2)样品(盲肠、结肠和直肠前段)置 10%福尔马林中至少固定 3 h~4 h。

6.2.1.2 取出样品用流水冲洗 1 h。

6.2.1.3 置样品于 39℃的 95%酒精(三缸)及无水酒精中,各脱水 30 min。

6.2.1.4 将脱水后样品放入 38℃二甲苯中(二缸),各 10 min~15 min 透明。

6.2.1.5 取透明样品放入等量 56℃二甲苯石蜡 10 min;再放入 56℃1:3 二甲苯石蜡 20 min;然后放入 56℃石蜡,30 min~60 min 进行浸蜡;包埋。

6.2.1.6 切片,贴片,置 56℃2 h~3 h 或 38℃温箱中过夜烘干,备染。

6.2.2 切片样品染色

6.2.2.1 切片样品放入二甲苯(二缸)各 3 min~5 min 脱蜡。

6.2.2.2 先置入纯酒精,再依次置入 95%酒精、70%酒精各 2 min~3 min,水洗。

6.2.2.3 以结晶紫液浸染脱蜡后的切片样品 3 min~5 min,水洗,干燥,二甲苯透明,封片,备检。

或以 10 倍稀释的姬姆萨染液浸染脱蜡切片样品 8 h~24 h,再迅速通过两缸纯酒精,干燥,二甲苯透明,封片,备检。

6.3 结果判定



图 2 病猪结肠腺窝内猪痢疾蛇样螺旋体

以 400 倍~1 000 倍镜头观察,可在粘膜表面特别是在腺窝内可见到聚集不同数量的 Sh 样菌体,多时密集如网状(见图 2),具有重要诊断价值。

7 猪痢疾蛇样螺旋体分离培养和鉴定

7.1 材料准备

7.1.1 器材:厌氧培养装置及使用方法见附录 A,细菌学实验常规器材,外科手术器材,微孔滤器和 0.65 μm 滤膜。

7.1.2 试验动物:幼猪(15 kg~25 kg)或豚鼠(3 周~4 周龄)或幼小鼠(20 g 左右)。

7.1.3 试剂:磷酸盐缓冲液(PBS)0.01 mol/L,pH7.2,生理盐水,多粘菌素,培养基胰酪胨血琼脂(TSA)(配制方法见附录 B)。

7.1.4 样品:病猪新鲜粪便或大肠粘膜刮取物(含粘液)。对死猪或扑杀猪大肠(盲肠、结肠及直肠前段)分段结扎(每段 10 cm),分离取出。样品应尽早作分离培养,也可在 0℃~4℃保存 4 d~7 d。

7.2 操作方法

7.2.1 样品中 Sh 镜检

将样品少许抹片染色或作成悬滴标本,镜检,观察 Sh 有无活力。含菌量少且无活力者,则难以分离成功。

7.2.2 分离培养

7.2.2.1 直接划线分离法:即取样品直接在 TSA(见附录 B)上划线接种若干皿。

7.2.2.2 集菌法:先将样品以生理盐水或 PBS 作 1:5 稀释,2 000 r/min 离心 10 min,弃去沉淀。将上清液再以 6 000 r/min~8 000 r/min 离心 20 min。取沉淀物划线接种 TSA 若干皿。

7.2.2.3 稀释法:将样品或集菌法的沉淀物作 10 倍梯度稀释至 10^{-6} ~ 10^{-8} 。取各梯度稀释液各 1 滴,分别划线接种于 TSA 上(每梯度稀释液最少接种 3 皿)。接种后的培养皿置厌氧罐内进行厌氧培养(见附录 A)。若在上述稀释液中加入多粘菌素 200 单位/mL~300 单位/mL,可提高分离率。

7.3 结果判定

7.3.1 观察

每隔 2 d~4 d 开罐检查一次,共 2 次~4 次,观察有无溶血区及溶血菌落。

致病性 Sh 是完全溶血(强 β 溶血),一般看不见菌落。当培养条件适宜时,在溶血区可见到云雾状菌苔。无害蛇样螺旋体等呈弱 β 溶血。

7.3.2 移植纯化

先作溶血区内物质涂片,染色镜检。如见 Sh 样菌体,可在无菌落溶血区内移取小块琼脂划线于

TSA 若干皿。如此每隔 2 天移植一次,一般 2 次~4 次后即可纯化和保存¹⁾。

7.3.3 猪痢疾蛇样螺旋体鉴定

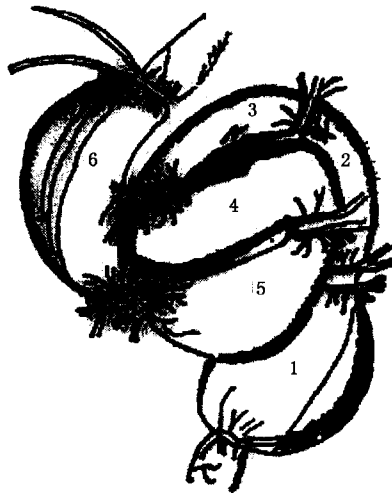
7.3.3.1 溶血试验

将猪痢疾蛇样螺旋体、无害蛇样螺旋体(*S. innocens*)或毛肠蛇样螺旋体(*S. pilosicoli*)及被检菌株,分别划线于同一 TSA 上不同区内,经 48 h 培养后,观察比较其溶血程度。

7.3.3.2 肠致病性试验操作

7.3.3.2.1 口服感染试验:试验猪 2 头,先饥饿 24 h~48 h,然后每天一次胃管投服分离菌株 50 mL (含菌 1 亿/mL)或直接饲喂 TSA 培养物每次 10 皿/头~20 皿/头,连投两次,观察 30 d。如有一头发病,即表示分离株为致病性 Sh。若以小鼠试验,停饲 24 h 后,每只每次灌服 1 mL (含菌 3 亿~5 亿),次日再灌服一次,15 d 后剖检观察盲肠病变。也可用豚鼠试验,先停饲 36 h~72 h,每只每次灌服 5 亿菌体(悬于 5 mL~10 mL 水中),连服 2 d,观察 15 d。上述两种试验小动物,每个菌株至少用 6 只,感染后 50% 出现腹泻和病变者,则为致病性 Sh。

7.3.3.2.2 结肠结扎试验:试验猪 2 头,停食 48 h。以外科手术的方法露出结肠襻,排空肠内容物后,每隔 5 cm~10 cm,间距 2 cm,进行双重结扎。结肠一般可结扎 8 段~12 段,每段内可注射入一种待检菌株悬液 5 mL (约 5 亿),其中一段为生理盐水对照。另一头猪肠段作反方向注射,最后闭合腹壁。经 48 h~72 h 扑杀试验猪,检查发现各肠腔内渗出液增多(3 mL~7 mL),内含有粘液、纤维素或血液,粘膜肿胀,充(出)血,株片镜检有多量 Sh 菌体,为致病性菌株。无害蛇样螺旋体等和对照肠段无上述变化(见图 3)。



1、4、5、6——致病菌株反应(肠段积液膨胀);

2、3——生理盐水对照。

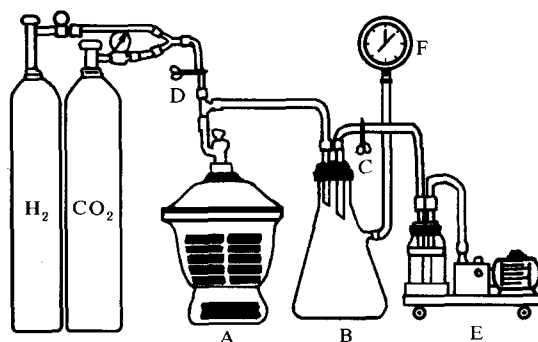
图 3 猪结肠结扎试验

1) 将 Sh 菌株 4 d~6 d 培养物置玻璃真空干燥器内,通入 10% 二氧化碳(CO₂),90% 氢(H₂)(钯为催化剂),然后置于 4℃~12℃ 条件下保存,一般 1 个月继代一次。

附 录 A
(规范性附录)
厌氧培养装置及使用方法

A.1 装置

将冷钯 5 g~20 g (钯商品名为 105 催化剂, 每次使用后经 160℃ 干烤 2 h~4 h, 可反复使用) 和接种后的 TSA 培养皿一同放入厌氧罐内 (可用玻璃干燥器代替), 以凡士林薄涂罐盖周边, 盖严后以文具夹夹牢罐盖, 以防漏气。然后按图 A.1 厌氧培养装置各部件。



- A——厌氧罐;
B、C——铁夹;
D——缓冲瓶;
E——抽气泵;
F——负压表(真空表)。

图 A.1 氢(H₂)和二氧化碳(CO₂)厌氧培养装置

A.2 操作

打开 A 罐的活塞及 B、C 夹, 抽气至真空度约 -10^5 Pa 时 (-750 mmHg ~ -760 mmHg 高), 将 C 夹紧。扭开二氧化碳(CO₂)瓶旋钮, 放出二氧化碳(CO₂)至 A 罐, 使真空度达 -0.8×10^5 Pa (即 -760 mmHg $\times 80\%$ H₂ = -608 mmHg), 关上二氧化碳(CO₂)瓶旋钮。再扭开氢(H₂)瓶旋钮, 放氢(H₂)使真空度达 700 Pa (约 -5 mmHg 高), 关好氢(H₂)瓶钮。此时罐内即达二氧化碳(CO₂)20%, (H₂)80%。关闭 A 罐活塞, 即可将 A 罐置 37℃~42℃ 温箱中培养。

附录 B

(规范性附录)

胰酪胨血液琼脂(trypticase soy blood agar, TSA)

B.1 成分:

胰酶消化蛋白胨(trypticase)	15.0 g
大豆蛋白胨(phytone)	5.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
琼脂粉	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

B.2 校正 pH7.3,加热溶解,分装于三角瓶内,灭菌(112 kPa 15 min~20 min),冷至 45℃~50℃。以无菌法加入牛、绵羊、马或兔抗凝血或脱纤血,使之含量为 5%~10%。同时加入壮观霉素 400 μg/mL 或多粘菌素 B 或 E200 μg/mL,或壮观霉素(400 μg/mL)多粘菌素及万古霉素(各 50 μg/mL)制成选择性培养基,以提高分离效果。

B.3 若无胰酶消化蛋白胨(trypticase)及大豆蛋白胨(phytone),可用胰蛋白胨(tryptose)0.5%,胰蛋白胨(trytone)0.15%,水解乳蛋白(lactalbumin hydrolysate)1.5%等代替。

B.4 新配制的 TSA 应置 38℃温箱 12 h,以除去表面水分。保存于 0℃~8℃冰箱内,可以在 1 周~2 周内使用。