

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 566-2019

代替 NY/T 566—2002

猪丹毒诊断技术

Diagnostic techniques for swine erysipelas



2019-08-01 发布

2019-11-01 实施

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 566—2002《猪丹毒诊断技术》。与 NY/T 566—2002 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

- ——"临床症状"参照《兽医传染病学》(陈溥言,第六版)和 *DISEASES OF SWINE* (10th Edition)进行了修订(见 3. 1);
- ——增加了病理变化(见 3.2);
- ——生化试验按照 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(2nd Edition)进行了修订(见 4. 2. 3);
- ----"4.2 病原鉴定"增加了猪丹毒杆菌的鉴别 PCR 方法(见 4.2.4);
- ——附录 A 中培养基按照《中国兽药典》(2015年版,三部)进行了修订。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

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:中国兽医药品监察所。

本标准起草人:李伟杰、蒋桃珍、魏财文、岂晓鑫、田野、蒋颖、王团结、彭国瑞。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

---NY/T 566-2002。

引言

猪丹毒(swine erysipelas)是由红斑丹毒丝菌(Erysipelothrix rhusipathiae),也称为猪丹毒杆菌或猪丹毒丝菌,引起的一种急性、热性传染病。

该病呈世界性分布,包括我国许多地区,我国通过疫苗普遍接种,该病得以全面控制,但近年来又在多地重现。该病主要通过消化道传播,还可借助吸血昆虫、鼠类和鸟类传播。主要侵害架子猪(3月龄~6月龄),临床表现主要为急性败血型、亚急性的疹块型和慢性心内膜炎型,病死率可达80%。世界动物卫生组织尚未将该病列人动物疫病名录,且未推荐诊断技术。我国定为三类动物疫病。

人也可感染猪丹毒杆菌,称为"类丹毒"。人的病例多由损伤皮肤感染,一般经 2 周~3 周自愈。类丹毒是一种职业病,多发生于兽医、屠宰人员以及渔业工作者、迄今未见人因感染猪丹毒杆菌而死亡的报告。

猪丹毒杆菌的型特异性抗原,对热稳定,是血清学分型的基础。这些抗原由细胞壁的肽聚糖组成,采用高压浸出抗原和琼脂双扩散试验,可将猪丹毒杆菌分为 16 个血清型(1a、1b、2、4、5、6、8、9、11、12、15、16、17、19、21 和 N),临床分离的猪丹毒杆菌主要为 1a 和 2 两个血清型



猪丹毒诊断技术

1 范围

本标准规定了猪丹毒诊断的技术要求。

本标准所规定的临床诊断和病原鉴定,适用于猪丹毒的诊断;试管凝集试验适用于流行病学调查和 SPF 猪群的监测。

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。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存和运输技术规范

3 临床诊断

- 3.1 临床症状
- 3.1.1 急性型
- 3.1.1.1 急性经过,突然死亡。
- 3.1.1.2 病猪体温升高达 42℃以上,呈稽留热。精神沉郁,喜卧,不愿走动,厌食,有的呕吐。感染后2 d~3 d 在猪的耳后、颈部、胸腹部等部位出现各种形状的暗红色或暗紫色丘疹,用手指按压褪色。
- 3.1.2 亚急性型

病猪食欲减退,体温升高至 41℃以上,精神不振,不愿走动。发病 1 d~3 d 后在胸、腹、背、肩、四肢外侧等部位的皮肤出现方形、菱形或圆形的紫红色疹块,稍突起于皮肤表面,用手指按压褪色。

- 3.1.3 慢性型
- 3.1.3.1 浆液性纤维素性关节炎:四肢关节肿胀、变形,肢体僵硬,出现跛行,严重者卧地不起。
- 3.1.3.2 心内膜炎:精神萎靡,消瘦,不愿走动,呼吸急促。听诊心脏有杂音,心律不齐。
- 3.1.3.3 皮肤坏死:背、肩、耳、蹄和尾等部位皮肤坏死,可能出现皮肤坏疽、结痂。
- 3.2 病理变化
- 3.2.1 急性型

肾脏肿大,呈花斑状,外观呈暗红色,皮质出血,切面外翻,肾包膜易剥离。脾脏肿大充血,呈樱桃红色,切面外翻,用刀背轻刮有血粥样物,脾切面的白髓周围有"红晕"现象。淋巴结肿大,紫红色,切面有斑点状出血。

3.2.2 亚急性型

疹块内血管扩张,皮肤和皮下结缔组织水肿。

- 3.2.3 慢性型
- 3.2.3.1 心内膜炎:心内膜上有灰白色菜花样血栓性增生物,主要发生在二尖瓣,其次是主动脉瓣、三尖瓣和肺动脉瓣上。
- 3.2.3.2 多发性增生性关节炎:四肢关节肿胀、变形,有大量浆液性纤维素性渗出液。

4 实验室诊断

4.1 病原分离

NY/T 566-2019

- 4.1.1 仪器与耗材
- 4.1.1.1 [[级生物安全柜。
- 4.1.1.2 恒温培养箱(37℃)。
- 4.1.1.3 高压灭菌锅。
- 4.1.1.4 手术刀。
- 4.1.1.5 镊子。
- 4.1.1.6 接种环。
- 4.1.1.7 平皿(直径 60 mm~90 mm)。
- 4.1.2 培养基与试剂
- 4.1.2.1 马丁琼脂(配制见附录 A 中的 A. L 也可用商品化培养基)
- 4.1.2.2 健康新生牛血清。
- 4.1.3 采集病料。

按照 NY/T 541 进行样品采集、保存与运输。急性病例可采集耳静脉血,死后取心血、肝、脾、淋巴结 等;亚急性病例可采集皮肤疹块病料:慢性病例可采集关节液和心内膜的增生物

4.1.4 分离培养

h·挑取单菌落传代接种含 将病料划线接种于含 10%新生牛血清马丁琼脂平皿、37℃培养 36 上 10%健康新生牛血清马丁琼脂平皿,37℃培养24 h~36 h,获得纯培养

- 4.2 病原鉴定
- 4.2.1 培养特性及菌体形态
- 4.2.1.1 仪器与耗材
- 4. 2. 1. 1. 1 Ⅱ级生物安全柜
- 4.2.1.1.2 恒温培养箱(37°C)。
- 4.2.1.1.3 显微镜。
- 4. 2. 1. 1. 4 高压灭菌锅
- 4.2.1.1.5 接种环
- 4. 2. 1. 1. 6 载玻片
- 4.2.1.2 培养基与试剂
- 4. 2. 1. 2. 1 马丁琼脂(配制见人 1,也可用商品化培养基)
 4. 2. 1. 2. 2 新生牛血清。
 4. 2. 1. 2. 3 革兰染色试剂盒。
 4. 2. 1. 3 操作

取分离菌株纯培养物划线接种于含10%新生牛血清马丁琼脂,37℃培养24 h~36 h,肉眼观察;取菌 落制备涂片,革兰氏染色镜检。

4.2.1.4 结果判定

在含10%新生牛血清马丁琼脂平皿上形成表面光滑、边缘整齐、有蓝绿色荧光的小菌落,革兰氏染色 镜检为阳性细杆菌,符合以上特征判为可疑菌落。

- 4.2.2 动物试验
- 4. 2. 2. 1 仪器与耗材
- 4.2.2.1.1 Ⅱ级生物安全柜。
- 4.2.2.1.2 恒温培养箱(37℃)。
- 4.2.2.1.3 高压灭菌锅。
- 4.2.2.1.4 一次性注射器(1 mL)。

- 4.2.2.2 培养基与试剂
- 4.2.2.2.1 马丁肉汤(配制见 A.2,也可用商品化培养基)。
- 4.2.2.2.2 生理盐水。
- 4.2.2.3 试验动物
- 4.2.2.3.1 小鼠(18 g~22 g,SPF级)。
- 4.2.2.3.2 鸽子(30日龄~60日龄)。
- 4.2.2.3.3 豚鼠(350g~450g,清洁级)

4.2.2.4 操作

取分离菌株纯培养物接种马丁肉汤,37℃培养 24 h,菌液用生理盐水进行 5 倍~10 倍稀释,取稀释的菌液分别注射小鼠 3 只(皮下 0.2 mL)、鸽子 2 只(肌肉 1.0 mL)、和豚鼠 2 只(肌肉 1.0 mL),连续观察 5 d。

4.2.2.5 结果判定

小鼠和鸽子应全部死亡,豚鼠应全部健康成活。

- 4.2.3 生化试验
- 4.2.3.1 仪器与耗材
- 4.2.3.1.1 Ⅱ级生物安全柜。
- 4.2.3.1.2 恒温培养箱(37℃)。
- 4.2.3.1.3 高压灭菌锅。
- 4.2.3.1.4 接种环。
- 4.2.3.2 培养基与试剂
- 4.2.3.2.1 马丁琼脂(配制见 A.1,也可用商品化培养基)。
- 4.2.3.2.2 新生牛血清。
- 4.2.3.2.3 生化试验小管。

4.2.3.3 操作

取分离菌株纯培养物划线接种含 10%新生牛血清马丁琼脂,37℃培养 24 h~36 h,挑取菌落接种生化试验小管进行培养。

4.2.3.4 结果判定

猪丹毒杆菌生化试验结果应符合表1的规定。

表 1 猪丹毒杆菌生化试验

生化试验	结果
β-葡萄糖苷酶(β-Glucosidase)	<u></u>
碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase)	-
N-乙酰-β-葡萄糖胺酶(N-Acetyl-β-glucosamidase)	+(v)
β-甘露糖苷酶(β-Mannosidase)	_
L-阿拉伯糖(L-Arabinose)	+
N-乙酰-D-甘露糖胺(N-Acetyl-D-mannosamine)	+
熊果苷(Arbutin)	_
纤维二糖(Cellobiose)	<u></u>
D-果糖(D-Fructose)	+
D-半乳糖(D-Galactose)	+
龙胆二糖(Gentiobiose)	=

表 1 (续)

生化试验	结果
丙三醇(Glycerol)	
α-D-乳糖(α-D-Lactose)	+(v)
D-甘露糖(D-Mannose)	+(v)
3-甲基葡萄糖(3-Methyl glucose)	—(v)
D-阿洛酮糖(D-Psicose)	+
D-核糖(D-Ribose)	-(y)
水杨苷(Sallicin)	
D-海藻糖(12 rehalose)	
木槽 (Xylose)	
注:十为阳性;一为阳性; 为可变,	N D

- 4.2.4 PCR 鉴定
- 4.2.4.1 仪器与耗材
- 4. 2. 4. 1. 1 Ⅱ级生物安
- 4.2.4.1.2 冰箱(-20°C)
- 4.2.4.1.3 台式高速离心机。
- 4. 2. 4. 1. 4 PCR (X)
- 4. 2. 4. 1. 5
- 4.2.4.1.6 凝胶成像系
- 4. 2. 4. 2 培养基与试剂
 4. 2. 4. 2. 1 马丁琼脂(配制见 A. I. 也可用商品化培养基).
 4. 2. 4. 2. 2 新生牛血清。
 4. 2. 4. 2. 3 10×PCR Buffer。
 4. 2. 4. 2. 4 dNTP。
 1. 2. 4. 2. 5 Taq 酶。
 1. 2. 4. 2. 6 DY

- 4. 2. 4. 2. 6 DL 2 000 DNA Marker.
- 4.2.4.2.7 Tris-乙酸(TAE)电泳缓冲液。
- 4.2.4.2.8 1.5%琼脂糖凝胶。
- 4.2.4.2.9 Goldview 或其他等效核酸染料。
- 4.2.4.2.10 无菌超纯水。
- 4.2.4.3 引物

猪丹毒杆菌 PCR 鉴定引物见表 2。

4

表 2 PCR 鉴定引物

检测目的基因	引物序列(5'-3')	扩增片段大小,bp	
16S rDNA . AGATGCCCATAGAAACTGGTA		510	
103 IDNA -	CTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCG	719	
荚膜多肽生 CGATTATATTCTTAGCACGCAACG			
物合成基因	TGCTTGTGTTGTGATTTCTTGACG	937	

4.2.4.4 DNA 模板的制备

取分离菌株纯培养物划线接种含 10%新生牛血清马丁琼脂,37%培养 24~h~36~h,挑取单菌落加入 $100~\mu$ L 无菌超纯水中,混匀,沸水浴 $10~\min$,冰浴 $5~\min$, $12~000~r/\min$ 离心 $1~\min$,上清作为基因扩增的 DNA 模板,也可购置市售的 DNA 试剂盒,并按说明提出核酸。阳性对照按相同方法制备 DNA 模板。也可直接用单菌落作为 DNA 模板,取培养的单菌溶直接加入 PCR 反应体系中。

4. 2. 4. 5 PCR 反应体系及反应条件

反应体系见表 3。PCR 反应条件为:95℃预变性 5 min;95℃变性 1 min,60℃退火 40 s,72℃延伸 1 min, 30 个循环;72℃延伸 10 min。同时,设置阳性对照(已知猪丹毒杆菌)及阴性对照(无菌超纯水)。

表 3 PCR 反应体系

4.2.4.6 电泳观察

PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳 .5 V/cm~8 V/cm 电泳 30 min~40 min.置于凝胶成像系统观察结果。

4.2.4.7 结果判定

阳性对照扩增出约719 bp 和937 bp 的片段。阴性对照未扩增出片段。试验成立。符合试验成立的条件,若被检样品扩增出约719 bp 和937 bp 的片段。判定为猪丹垂杯菌、若被检样品只扩增出约719 bp 的片段,判定为丹毒杆菌属的其他种。结果判定电泳图参见附录B.

4.2.5 琼脂扩散试验

4.2.5.1 仪器与耗材

- 4.2.5.1.1 [[级生物安全柜。
- 4.2.5.1.2 恒温培养箱(37℃)。
- 4.2.5.1.3 台式高速离心机。
- 4.2.5.1.4 高压灭菌锅。
- 4.2.5.1.5 离心管(15 mL、50 mL)。
- 4.2.5.1.6 平皿(直径 60 mm~90 mm)。
- 4.2.5.1.7 移液管(10 mL)。

4.2.5.2 培养基与试剂

4.2.5.2.1 马丁琼脂(配制见 A.1,也可用商品化培养基)。

NY/T 566-2019

- 4.2.5.2.2 马丁肉汤(配制见 A.2,也可用商品化培养基)。
- 4.2.5.2.3 新生牛血清。
- 4.2.5.2.4 甲醛溶液。
- 4.2.5.2.5 磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2)。
- 4.2.5.2.6 琼脂糖。
- 4.2.5.2.7 定型血清。
- 4.2.5.2.8 阳性对照抗原。
- 4.2.5.2.9 蒸馏水。

4.2.5.3 抗原的制备

取分离菌株纯培养物划线接种含 10%新生牛血清马丁琼脂,37%培养 24~h~36~h,挑取单菌落接种马丁肉汤 100~mL(加 10%新生牛血清),37%培养 36~h,加 0.5%甲醛溶液灭活 24~h,用 0.5%甲醛磷酸盐缓冲液离心(5~000~g~6~000~g,15~min)洗涤 2次,在沉淀物中加 3~mL蒸馏水,重悬,混匀,经 121%高压 1~h,离心(5~000~g~6~000~g,15~min),上清液为被检抗原。

4.2.5.4 琼脂双扩散试验

- 4. 2. 5. 4. 1 用 pH 7. 2 的 PBS 配制 1. 0%琼脂糖凝胶,加热熔化后,吸取 10~mL 加入直径 90~mm 平皿,冷却后打六角梅花形孔,孔径 3~mm,孔间距离 4~mm。在酒精灯火焰上加热封底。
- 4.2.5.4.2 加定型血清 30 μL 在中央孔。
- 4.2.5.4.3 周围孔各加 30 μL 阳性对照抗原和被检抗原及 PBS。
- 4.2.5.4.4 置于 37℃湿盒中孵育 2 h~24 h。

4.2.5.5 结果判定

定型血清与阳性对照抗原出现沉淀线,与 PBS 不出现沉淀线,试验成立。若被检菌株抗原与定型血清孔之间出现沉淀线,则判定被检菌株为此血清型。

- 4.3 试管凝集试验
- 4.3.1 仪器与耗材
- 4.3.1.1 Ⅱ级生物安全柜。
- 4.3.1.2 恒温培养箱(37℃)。
- 4.3.1.3 水浴锅。
- 4.3.1.4 高压灭菌锅。
- 4.3.1.5 麦氏比浊仪。
- 4.3.1.6 试管。
- 4.3.1.7 一次性注射器(10 mL)。
- 4.3.2 培养基及试剂

马丁肉汤(配制见 A. 2,也可用商品化培养基)。

4.3.3 菌种

已知血清型猪丹毒杆菌。

- 4.3.4 操作步骤
- 4.3.4.1 无菌采集被检猪血液 5 mL,分离血清。
- 4.3.4.2 将被检血清用马丁肉汤分别稀释成1:10和1:20两个稀释度。
- 4.3.4.3 每个稀释度的血清分别取 5 mL,各分装 3 支小试管,56℃灭活 30 min。
- 4.3.4.4 猪丹毒杆菌接种马丁肉汤,37℃培养18 h后,将菌液稀释成0.5 个麦氏浊度。
- 4. 3. 4. 5 取冷却至 37℃以下的灭活血清,每支小试管加菌液 0.1 mL(0.5) 个麦氏浊度),标记为被检管, 37℃静置培养 18 h,再取出室温放置 2 h。

- 4.3.4.6 本试验同时设置马丁肉汤和马丁肉汤培养的猪丹毒杆菌菌液作为对照管。
- 4.3.5 判定标准
- 4.3.5.1 被检管与菌液对照管比较观察,被检管和对照管一样均匀一致浑浊,管底无凝集物者为阴性 (-)
- 4.3.5.2 被检管上层液体稍浑浊,管底有凝集物沉淀者为弱阳性(+或++)。
- 4.3.5.3 被检管澄清,无浑浊状,管底有大量凝集物沉淀者为阳性(+++或+++)。
- 4.3.6 结果判定

根据血清 1:10 和 1:20 两个稀释度出现的凝集程度进行判定:

- a) 两个稀释度出现凝集程度的总和≥5个(+)者,判为阳性;
- b) 两个稀释度出现凝集程度的总和 4个(+)者, 判为可疑, 血清需重新制备;
- c) 两个稀释度出现凝集程度的总和≤3个(+)者,判为阴性

5 综合判定

5.1 疑似

符合下列其中之一,利分疑似:

- a) 符合 3.1.1和 3.4/1。
- b) 符合 3. 1. 3 和 3. 2, 3

5.2 确诊

符合下列其中之一可確認

- a) 符合 3.1.2 和 3.2.2
- b) 符合 5.1, 且符合 4.2.1.4, 4.2.2.5, 4.2.3.4.
- c) 符合 5.1,且符合 4.2.1.4,4.2.2.5,4.2.4.7。

5.3 血清型鉴定



附录 A (规范性附录) 培养基制备

A.1 马丁琼脂

A. 1. 1 成分

牛肉汤500 mL猪胃消化汤500 mL氯化钠2.5 g琼脂13 g

A. 1.2 制法

- A. 1.2.1 除琼脂外,将上述成分混合,调节 pH 至 7.6~7.8,加入琼脂,加热溶解。
- A.1.2.2 以卵白澄清法除去沉淀,分装。
- A. 1. 2. 3 116℃灭菌 30 min~40 min,灭菌后培养基的 pH 应为 7. 2~7. 6。

注:卵白澄清法

- a) 取鸡蛋白 2 个,加等量纯水,充分搅拌,加至 1 000 mL 50℃的培养基中,搅匀;
- b) 置于流通蒸汽锅内,加热 1 h,使蛋白充分凝固:
- c) 取出,在蒸汽加温下以脱脂棉或滤纸滤过。

A. 2 马丁肉汤

A. 2.1 成分

牛肉汤500 mL猪胃消化汤500 mL氯化钠2.5 g

A. 2. 2 制法

- **A. 2. 2. 1** 将上述成分混合,调节 pH 至 7. 6~7. 8,煮沸 20 min 后,加入纯化水恢复至原体积,滤清,分装。
- A. 2. 2. 2 116℃灭菌 30 min~40 min,灭菌后培养基的 pH 应为 7. 2~7. 6。

附 录 B (资料性附录) 猪丹毒杆菌 PCR 鉴定结果判定

B. 1 猪丹毒杆菌 16S rDNA 及荚膜多肽生物合成基因 PCR 鉴定电泳例图 见图 B. 1。



THE STATE OF THE S

B. 2 16S rDNA 基因参考序列

B. 3 荚膜多肽生物合成基因参考序列

中华人民共和国农业行业标准 猪丹毒诊断技术

NY/T 566—2019 * * *

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—厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

> 版权专有 侵权必究 举报电话: (010) 59194261



NY/T 566-2019