

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 545—2023

代替 NY/T 545—2002

猪痢疾诊断技术

Diagnostic techniques for swine dysentery

2023-02-17 发布

2023-06-01 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 NY/T 545—2002《猪痢疾诊断技术》，与 NY/T 545—2002《猪痢疾诊断技术》相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 修改了猪痢疾的病原名称(见 2002 年版的前言)；
- b) 增加了术语和定义(见第 3 章)；
- c) 增加了生物安全要求(见第 5 章)；
- d) 增加了猪痢疾短螺旋体的 PCR 检测方法(见第 10 章)；
- e) 增加了综合判定(见第 11 章)；
- f) 增加了鉴别诊断(见第 12 章)；
- g) 增加了生理盐水、磷酸盐缓冲液、15 g/L 琼脂凝胶的配制方法(见附录 A 中的 A.1、A.2、A.4)；
- h) 增加了病原、组织病理、平板培养及 PCR 电泳图片(分别见附录 B 中的 B.1、B.2、B.3 和附录 D 中的 D.1)；
- i) 增加了厌氧产气包说明的附录(见附录 C)；
- j) 删除了肠致病性实验操作部分(见 2002 年版的 7.3.3.2)；
- k) 删除了厌氧培养装置及使用方法(见 2002 年版的附录 A)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本文件起草单位：山东农业大学、上海市动物疫病预防控制中心、赤峰市农牧业综合行政执法支队。

本文件主要起草人：李建亮、张维谊、王一新、王晓旭、崔言顺、徐锋、王建、马志强、徐瑞雪、杨萍萍、衣婷婷。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2002 年首次发布为 NY/T 545—2002；

——本次为第一次修订。

猪痢疾诊断技术

1 范围

本文件规定了猪痢疾的临床诊断、粪便和大肠组织中猪痢疾短螺旋体显微镜检查、分离培养,以及PCR检测的技术要求、综合判定及鉴别诊断。

本文件适用于猪痢疾的诊断。本文件所规定的粪便中猪痢疾短螺旋体显微镜检查不适用于急性病例后期、慢性及投药后病例。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款,其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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
- GB/T 27401 实验室质量控制规范 动物检疫
- NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
- SN/T 1207 猪痢疾检疫技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

猪痢疾 swine dysentery

曾称为猪密螺旋体痢疾、血痢、黏液出血性腹泻或弧菌性痢疾,是由猪痢疾短螺旋体(*Brachyspira hyodysenteriae*, B. h)引起猪的一种严重的肠道传染病。其特征是黏液性或黏液出血性腹泻,大肠黏膜发生卡他性出血性炎症,有的发展为纤维索性坏死性炎症。

3.2

猪痢疾短螺旋体 *Brachyspira hyodysenteriae*

猪痢疾短螺旋体是猪痢疾的病原,存在于猪的病变肠段黏膜、肠内容物及粪便中,对外界环境有较强的抵抗力,过去常称为猪痢疾密螺旋体或猪痢疾蛇形螺旋体。

3.3

投药后病例 diseased pig of taking medication

已被投喂泰乐菌素、杆菌肽等对猪痢疾短螺旋体敏感的药物猪只。

3.4

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction

用于扩增位于两端已知序列之间 DNA(deoxyribonucleic acid,脱氧核糖核酸)的方法。模板 DNA 经过高温变性成单链,在 DNA 聚合酶和适宜的温度下,两条互不相补的寡核苷酸片段即引物分别与模板 DNA 两条链上的一段互补序列发生退火,接着在 DNA 聚合酶的催化下以 4 种 dNTP(deoxyribonucleoside triphosphate,脱氧核苷三磷酸)为底物,使退火引物得以延伸,如此反复变性、退火和 DNA 合成这一循环,使位于两端已知序列之间的 DNA 片段呈几何倍数扩增,经 25 个~30 个扩增循环,扩增倍数达到约 10⁶。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

dNTP:脱氧核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside triphosphate)

NADH:还原型辅酶 I (Nicotinamide adenine dinucleotide)

nox:NADH 氧化酶(NADH oxidase)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

SD:猪痢疾(Swine Dysentery)

TAE:Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液(Tris Acetate-EDTA buffer)

Taq 酶:DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase)

TSA:胰蛋白胨大豆琼脂(Trypticase Soy Agar)

5 生物安全要求

样品采集、处理及检测过程中涉及的实验操作应符合 GB 19489、GB/T 27401、NY/T 541、SN/T 1207 的相关规定。

6 临床诊断

6.1 流行病学

6.1.1 猪痢疾在自然流行中只发生于猪。各种年龄、品种、性别的猪均易感,但保育后期至育肥前期猪(1.5月龄~4月龄)发生较多,而哺乳仔猪、成年猪发病率低。

6.1.2 本病主要通过粪便污染而经消化道感染。阴雨潮湿、气候多变等各种应激因素,均可促进本病的发生。

6.1.3 本病无明显季节性,流行经过比较缓慢,持续期较长,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,很难根除。

6.2 临床症状

6.2.1 潜伏期

2 d至2个月不等,自然感染一般为1周~2周。

6.2.2 临床症状

6.2.2.1 最急性型

多见于暴发本病之初,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12 h~24 h。

6.2.2.2 急性型

病初多排软粪或稀粪。随后,粪便中出现大量黏液和血液(凝块),呈油脂样、蛋清样或胶冻状。粪色为棕色、红色或黑红色不一。病猪迅速消瘦,常转为慢性或死亡。病程1周~2周。

6.2.2.3 亚急性或慢性型

黏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复发。病程4周以上。

6.3 病理变化

6.3.1 主要病变见于大肠,其他组织器官均无特征性病变。

6.3.2 早期病变常出现在结肠旋襻顶部,随病情进一步发展可蔓延至盲肠、整个结肠和直肠前段。急性病例表现为黏液性、出血性和纤维素性渗出,肉眼可见大肠黏膜充血、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,黏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。

6.3.3 组织病理学检查,早期病例的肠黏膜上皮与固有层分离,微血管外露而发生灶性坏死。当病理变化进一步发展时,肠黏膜表层细胞坏死,黏膜完整性受到不同程度的破坏,并形成伪膜。在固有层内有多量炎性细胞浸润,肠腺上皮细胞不同程度变性、萎缩和坏死。黏膜表面及腺窝内可见数量不一的猪痢疾短螺旋体,但以急性期数量较多,有时密集呈网状。病理变化局限于黏膜层,一般不超过黏膜下层,其他各层保持相对完整性。

7 粪便及肛拭子中猪痢疾短螺旋体显微镜检查

7.1 主要仪器与试剂

7.1.1 光学显微镜。

7.1.2 暗视野镜头。

7.1.3 载玻片。

7.1.4 盖玻片。

7.1.5 酒精灯。

7.1.6 草酸铵结晶紫染色液(革兰氏染色第一液)或10倍稀释的石炭酸复红。

7.1.7 生理盐水。

7.1.8 样品

7.1.8.1 待测样品

猪新鲜粪便(含黏液)或直肠拭子或大肠内容物及黏膜。

7.1.8.2 阳性对照

含猪痢疾短螺旋体的菌苔或菌液。

7.1.8.3 阴性对照

不含猪痢疾短螺旋体的生理盐水。

7.2 操作步骤

7.2.1 悬滴样品制作

取待测样品少许悬于少量生理盐水(配制方法附录A.1规定执行)中,做成悬滴样品后镜检。同时,制作阳性对照、阴性对照悬滴样品。

7.2.2 染色样品制作

取少许待测样品抹片,干燥,火焰固定,以草酸铵结晶紫液或稀释的石炭酸复红染色2 min~3 min,水洗,吸干后待检。每份样品最少制片2张。同时,制作阳性对照、阴性对照抹片。

7.2.3 显微镜检查

悬滴样品在暗视野(或暗光)显微镜下观察,染色样品以油镜直接观察。每片样品至少观察10个视野。

7.3 结果判定

7.3.1 若悬滴样品在暗视野下可观察到同阳性对照中相似的长 $6\mu\text{m}\sim 8.5\mu\text{m}$ 、呈2个~5个疏螺旋状、两端尖锐、呈蛇样活泼运动的菌体,同时阴性对照中无此菌体时,判为样品猪痢疾短螺旋体阳性。

7.3.2 染色观察当阳性对照为染色阳性、阴性对照为染色阴性时,试验结果成立。染色样品中,若无螺旋体着色,则判为阴性。检测样本中有1个以上的重复切片中呈染色阳性时(见附录B.1),即判该样本为猪痢疾短螺旋体阳性;否则判为阴性。

7.3.3 当视野中有数量较多(3条~5条或以上)猪痢疾短螺旋体时,在获菌落、溶血性等培养结果前,可作为诊断的重要参考依据。

8 大肠组织中猪痢疾短螺旋体显微镜检查(组织病理学观察)

8.1 材料准备

8.1.1 主要仪器设备

- 8.1.1.1 切片机。
- 8.1.1.2 光学显微镜。
- 8.1.1.3 染色缸。
- 8.1.1.4 载玻片。
- 8.1.1.5 盖玻片。
- 8.1.1.6 水浴锅。
- 8.1.1.7 恒温培养箱。

8.1.2 试剂

- 8.1.2.1 除特别规定外,在检测中使用的试剂均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682 的规定。
- 8.1.2.2 10%中性福尔马林。
- 8.1.2.3 70%酒精。
- 8.1.2.4 95%酒精。
- 8.1.2.5 无水乙醇。
- 8.1.2.6 二甲苯。
- 8.1.2.7 切片石蜡
- 8.1.2.8 草酸铵结晶紫染色液。
- 8.1.2.9 姬姆萨染色液。

8.1.3 样品

有病变的大肠(盲肠、结肠和直肠前段)组织。

8.2 操作步骤

8.2.1 组织切片样品制作

- 8.2.1.1 切取小块(1 cm³)样品置于 10%中性福尔马林(V/V)中固定 12 h~24 h;取出样品用流水冲洗 1 h;先后置样品于 39℃ 的 95%酒精及无水乙醇中,各脱水 30 min。
- 8.2.1.2 将脱水后的样品放入 38℃ 二甲苯中,10 min~15 min 透明;取透明样品放入 56℃ 二甲苯石蜡(体积比 1:1)10 min,再放入 56℃ 二甲苯石蜡(体积比 1:3)20 min,然后放入 56℃ 石蜡,30 min~60 min 进行浸蜡,包埋。
- 8.2.1.3 切片,贴片,每个样品制作 3 个玻片,置于 56℃ 条件下 2 h~3 h 或 38℃ 温箱中过夜烘干,备染。

8.2.2 组织切片样品染色

- 8.2.2.1 切片样品放入二甲苯 3 min~5 min 脱蜡;先置于无水乙醇,再依次置于 95%酒精、70%酒精中各 2 min~3 min,水洗。
- 8.2.2.2 以草酸铵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,再迅速通过两缸无水乙醇,干燥,二甲苯透明,封片,高倍视野镜检。

8.3 结果判定

在黏膜表面,特别是在腺窝内如见到聚集不同数量的两端尖锐、螺旋状菌体,则判定为组织中含猪痢疾短螺旋体菌体(见 B.2)。

9 病原分离培养

9.1 材料准备

9.1.1 主要仪器设备

- 9.1.1.1 厌氧培养装置。
- 9.1.1.2 厌氧指示剂。
- 9.1.1.3 细菌学实验常规设备。
- 9.1.1.4 高压灭菌锅。
- 9.1.1.5 培养皿(90 mm)。
- 9.1.1.6 离心机。
- 9.1.1.7 剖检用器材。

9.1.2 试剂

- 9.1.2.1 除特别规定外,在检测中使用的试剂均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682 的规定。
- 9.1.2.2 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)(配制方法 A.2 的规定执行)或灭菌生理盐水。
- 9.1.2.3 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)。
- 9.1.2.4 含抗生素的胰蛋白胨大豆琼脂血培养基(配制方法 A.3 的规定执行)。

9.1.3 样品

疑似猪痢疾病例或患有出血性肠炎且未投放相关治疗药物的猪活体可采集新鲜的粪便和直肠拭子。剖检时采集其结肠、盲肠及直肠前段,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。

9.2 操作步骤

9.2.1 样本处理

取粪便、直肠拭子或剖检肠段内容物,以灭菌生理盐水或 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,取沉淀物划线以备接种。如污染严重,可将沉淀物作 10 倍倍比稀释,取各梯度稀释液分别划线接种。

9.2.2 分离培养和移植纯化

9.2.2.1 用接种环蘸取 2 环~3 环样本划线接种含有抗生素的 TSA 血琼脂平板,迅速放置于含厌氧指示剂的厌氧袋(罐)或其他厌氧装置中,充 99% N₂、1% O₂,或加入厌氧产气袋(包)(见附录 C),(37±1)℃ 培养。

9.2.2.2 每隔 2 d 打开厌氧装置观察一次,观察有无溶血区或溶血菌落。

9.2.2.3 先做溶血区内物质涂片,染色镜检。如见猪痢疾短螺旋体样菌体,可在无菌落溶血区内移取小块琼脂划线于 TSA 血琼脂平板若干皿。如此每隔 2 d 移植一次,一般 2 次~4 次后即可纯化保存。

9.2.3 溶血观察

生长于 TSA 血琼脂平板的致病性猪痢疾短螺旋体是完全溶血(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(见 B.3)。溶血区内物质涂片的染色镜检及判定同 7.2.3、7.3。

10 PCR 检测

10.1 材料准备

10.1.1 主要仪器设备

- 10.1.1.1 PCR 扩增仪。
- 10.1.1.2 电泳仪。
- 10.1.1.3 凝胶成像系统。
- 10.1.1.4 冷冻离心机。
- 10.1.1.5 水浴锅。
- 10.1.1.6 单泳道微量可调移液器。

10.1.2 试剂材料

10.1.2.1 PCR 配套试剂(10×PCR 缓冲液、dNTPs、*Taq* 酶)。

10.1.2.2 细菌基因组提取试剂。

10.1.2.3 灭菌双蒸水。

10.1.2.4 DNA Marker。

10.1.2.5 电泳缓冲液,按照 A.4.1 的方法配制。

10.1.2.6 琼脂糖凝胶,按照 A.4.2 的方法配制。

10.1.2.7 Goldview 核酸染料或其他 DNA 染色剂。

10.1.3 待检样品

从病料中分离的细菌培养物或者疑似患病猪粪便或肛拭子。

10.1.4 引物

扩增猪痢疾短螺旋体 NADH 氧化酶基因(*nox*)序列上下游引物如下:

上游引物(BHF):5'-ACT AAA GAT CCT GAT GTA TTT G-3';

下游引物(BHR):5'-CTA ATA AAC GTC TGC TGC C-3'。

10.1.5 阳性对照

猪痢疾短螺旋体。

10.2 操作

10.2.1 DNA 的提取

刮取云雾状菌苔或溶血区内物质或 100 mg 疑似患病猪粪便于离心管,加入 100 μ L 灭菌双蒸水,混匀,沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液以细菌基因组提取试剂提取 DNA。

在提取 DNA 时,设立阳性对照样品(猪痢疾短螺旋体)和阴性对照样品(灭菌蒸馏水),按同样的方法提取 DNA。

10.2.2 PCR 扩增

PCR 反应体系按照表 1 的规定执行。

表 1 PCR 反应体系

组分	体积, μ L
10×PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})	5
dNTP(2.5 mmol/L)	4
<i>Taq</i> 酶(5 U/ μ L)	0.5
上游引物(10 μ mol/L)	1
下游引物(10 μ mol/L)	1
模板 DNA	0.5~1
灭菌双蒸水	补至 50

PCR 扩增参数:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

10.2.3 凝胶电泳

用电泳缓冲液制备 15 g/L 琼脂糖凝胶,加入 Goldview 核酸染料或其他 DNA 染色剂至终浓度为 1.5 μ g/mL(也可在电泳后进行染色)。取 5 μ L PCR 扩增产物与 2 μ L 上样缓冲液混合后加入点样孔进行电泳,电场强度 5 V/cm~9 V/cm,20 min~30 min。用凝胶成像仪观察分析电泳结果。

10.2.4 结果判定

当阳性对照(猪痢疾短螺旋体)的 DNA 模板扩增出 352 bp 的片段、阴性对照(灭菌蒸馏水)未见有 PCR 扩增条带时,试验成立。

试验成立时,样品孔泳道如见有 352 bp 大小的扩增条带(见附录 D 中的 D.1),需将 PCR 产物进行测序。序列经 BLAST 分析,如序列同猪痢疾短螺旋体 *nox* 基因序列(*nox* 基因序列见 D.2)一致性达

99.7%以上,则判定检样中含猪痢疾短螺旋体;否则,判为阴性。

11 综合判定

符合第6章临床诊断特征的病例,且在7.3粪便及肛拭子中猪痢疾短螺旋体镜检及8.3大肠组织切片镜检判为阳性的前提下,9.2.3或10.2.4中任何1项阳性者,判定其发生猪痢疾。

12 鉴别诊断

本病应注意与下列几种病进行鉴别。

- a) 猪沙门菌病:为败血症变化,在实质器官和淋巴结有出血或坏死,小肠内可发现黏膜病理变化,肠道糠麸样溃疡。确诊应根据大肠内有无猪痢疾短螺旋体和从小肠内或其他实质器官中分离出沙门菌来确定。
- b) 猪增生性肠炎:病理变化主要见于小肠,确诊在于增生性肠炎病理变化特点和肠上皮细胞内有胞内劳森菌的存在。
- c) 猪结肠炎:由结肠菌毛样短螺旋体引起,临床症状与慢性型猪痢疾相似,但剖检病理变化局限于结肠,确诊依靠结肠菌毛样短螺旋体的分离鉴定。

附录 A

(规范性)

试剂及培养基的配制方法

A.1 生理盐水的配制

称取 8.5 g (精确度 1 mg,下同)氯化钠(NaCl)溶于 1 L 蒸馏水中,121 ℃高压灭菌 15 min。

A.2 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液(PBS)的配制

称取氯化钠(NaCl)8.0 g、氯化钾(KCl)0.2 g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)1.44 g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.24 g,加蒸馏水至 800 mL。将上述成分依次溶解,用 HCl 调 pH 至 7.2 ± 0.1 ,灭菌双蒸水加至 1 000 mL 定容,121 ℃高压灭菌 15 min。

A.3 含抗生素胰蛋白胨大豆琼脂血液培养基的配制

称取胰酶消化蛋白胨(trypticase)15.0 g、大豆蛋白胨(Peptone from Soybean Meal)5.0 g、氯化钠(NaCl)5.0 g、琼脂粉 15.0 g,量取蒸馏水 1 000 mL,将以上材料混合。使用浓度约为 40 g/L(约 1 mol/L)的氢氧化钠溶液或浓度约为 36.5 g/L(约 1 mol/L)的盐酸溶液调整 pH 至 7.1~7.5,加热溶解,过滤分装于中性容器中,121 ℃高压灭菌 15 min~20 min 备用。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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和多黏菌素 B (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),或壮观霉素(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、多黏菌素 B (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及万古霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)制成含抗生素的 TSA 选择性培养基,以提高分离效果。

A.4 15 g/L 琼脂糖凝胶的配制

A.4.1 50×TAE 缓冲液的配制(pH 8.0)

称取三羟甲基氨基甲烷(Tris)242 g、乙二胺四乙酸钠盐($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)37.2 g,将以上 2 种试剂按次序溶于 900 mL 去离子水中,充分溶解,加入 57.1 mL 的醋酸,充分搅拌,加去离子水将溶液定容至 1 L,室温保存。

A.4.2 15 g/L 琼脂糖凝胶的配制

量取 50×TAE 缓冲液 2 mL,加入 98 mL 去离子水,配成 100 mL 1×TAE 缓冲液,加入三角烧瓶,加入琼脂糖 1.5 g,加热充分溶解,当温度降至 50 ℃左右,加入 3 μL ~5 μL DNA 染料,混匀后倒入制胶模具内,插入齿梳,等待凝胶凝固。

附录 B

(资料性)

猪痢疾短螺旋体染色形态、病理组织切片及培养图片

B.1 猪痢疾短螺旋体草酸铵结晶紫染色形态

猪痢疾短螺旋体染色镜检可见菌体长 $6\ \mu\text{m}\sim 8.5\ \mu\text{m}$ ，呈 2 个~5 个疏螺旋状，如图 B.1 所示。

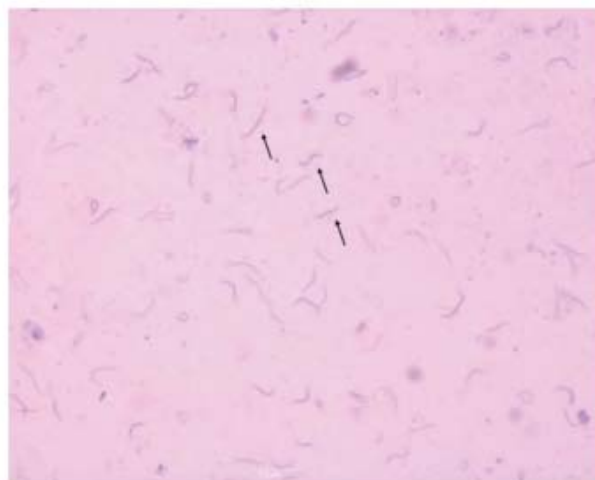


图 B.1 猪痢疾短螺旋体草酸铵结晶紫染色形态

B.2 大肠组织切片姬姆萨染色显微镜检

患病猪大肠组织切片腺窝内可见聚集不同数量的两端尖锐、螺旋状菌体，如图 B.2 所示。

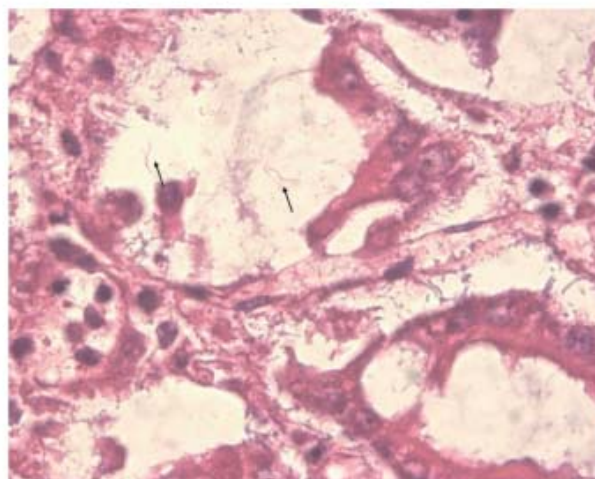


图 B.2 大肠组织切片姬姆萨染色显微镜检

B.3 猪痢疾短螺旋体云雾状菌苔

猪痢疾短螺旋体在 TSA 血琼脂平板上培养的溶血区可见到云雾状菌苔,如图 B.3 所示。

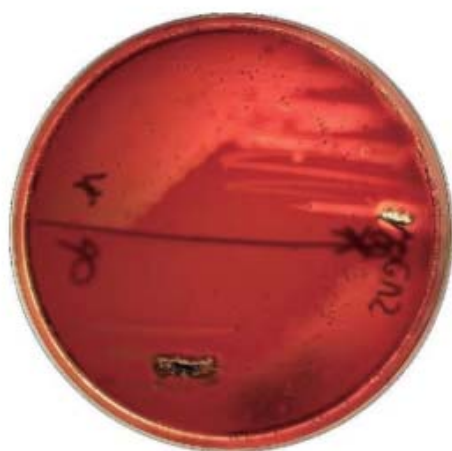


图 B.3 猪痢疾短螺旋体云雾状菌苔

附 录 C
(资料性)
厌氧产气袋(包)

厌氧产气袋(包)(AnaeroPack)是由日本三菱瓦斯化学株式会社发明并拥有专利的一类产品,其基本原理是将密闭空间中的氧气完全或者部分吸收掉,然后产生二氧化碳。根据实验室培养厌氧微生物的不同需要,开发出完全厌氧培养(AneroPack-Anaero,30 min 反应后氧气浓度降为 0)、微需氧培养(AnaeroPack-MicroAero,氧气浓度 8%~9%,二氧化碳浓度 7%~8%)和嗜二氧化碳培养(AnaeroPack-CO₂,氧气浓度 15% 左右,二氧化碳浓度 6% 左右)三种类型,350 mL、2.5 L 和 3.5 L 三个系列及配套密封容器,以便于实现最经济的使用要求。在猪痢疾短螺旋体分离培养中,选用完全厌氧培养型,密封容器可根据培养平板的数量合理选用。

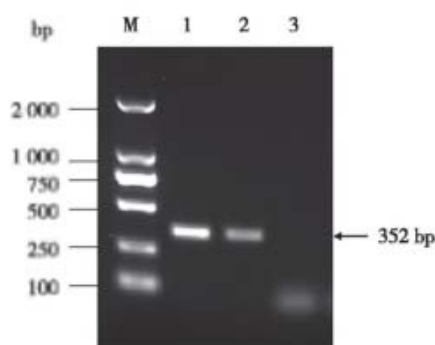
附录 D

(资料性)

猪痢疾短螺旋体引物扩增结果示例图及 NADH oxidase(*nox*) 基因序列

D.1 猪痢疾短螺旋体引物扩增结果示例图

大小为 352 bp 的猪痢疾短螺旋体引物扩增的条带如图 D.1 所示。



标记序号说明:

M ——DL 2 000 DNA Markers;

1 ——样品;

2 ——阳性对照;

3 ——阴性对照。

图 D.1 猪痢疾短螺旋体引物扩增的条带检测示例图

D.2 猪痢疾短螺旋体 NADH oxidase (*nox*) 基因序列 (352 bp)

```

ACTAAAGATC CTGATGTATT TGCTATAGGT GACTGTGCTA CTGTATATTC
AAGAGCTTCT GAAAAACAAG AATATATTGC TTTAGCTACT AATGCTGTAA
GAATGGGTAT TGTGCTGCT AATAATGCTT TAGGAAAACA TGTTGAATAT
TGCGGT(N)ACTC AAGGTTCTAA TGCTATTTGT GTATTTGGAT ACAATATGGC
TTCTACTGGT TGGTCTGAAG AACTGCTAA GAAAAAAGGA TTAAGAGTAA
AATCTAACTT CTTCAAAGAT TCTGAAAGAC CAGAATTTAT GCCTACTAAT
GAAGATGTTT TAGTAAAAAT CATTATGAA GAAGGCAGCA GACGTTTATT
AG
    
```

注: N 代表 4 种并碱基(ATGC)中的任意一个。