



中华人民共和国农业行业标准

NY/T 536—2017
代替 NY/T 536—2002

鸡伤寒和鸡白痢诊断技术

Diagnostic techniques for fowl typhoid and pullorum disease

2017-06-12 发布

2017-10-01 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 536—2002《鸡伤寒和鸡白痢诊断技术》。与 NY/T 536—2002 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

——增加了鸡伤寒和鸡白痢的临床诊断和病理变化(见第 2 章);

——增加了鸡沙门菌和雏沙门菌鉴别 PCR(见 3.1.3.4)。

本标准由农业部兽医局提出。

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。

本标准主要起草人:康凯、李伟杰、陈小云、赵耘、岂晓鑫、张敏。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——NY/T 536—2002。

引 言

鸡伤寒和鸡白痢(fowl typhoid and pullorum disease)分别是由鸡沙门菌(*Salmonella gallinarum*)和雏沙门菌(*Salmonella pullorum*)引起的鸡和火鸡等的传染病,是危害我国养鸡业的重要疾病。我国将鸡白痢列为二类动物疫病,世界动物组织[World Organization for Animal Health (英), Office International des Epizooties(法), OIE]在“*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2016”中规定了鸡伤寒和鸡白痢诊断标准和相应生物制品(多价抗原)的制造、标定和使用的国际标准。

本标准主要参考 OIE“*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 2016”中的 2.3.11 章“FOWL TYPHOID AND PULLORUM DISEASE”以及相关文献,建立了鸡沙门菌和雏沙门菌的鉴别 PCR 方法,并在复核验证的基础上,对《鸡伤寒和鸡白痢诊断技术》(NY/T 536—2002)进行了修订,增加了鸡沙门菌和雏沙门菌鉴别的双重 PCR 方法。同时,参考《兽医传染病学》(第五版,陈溥言主编),增加了鸡伤寒和鸡白痢的临床诊断和病理变化等内容。

鸡伤寒和鸡白痢诊断技术

1 范围

本标准规定了鸡伤寒和鸡白痢诊断的技术要求。

本标准所规定的临床诊断和实验室诊断适用于各种日龄鸡的鸡沙门菌和雏沙门菌感染的诊断。其中,PCR方法可用于鸡沙门菌和雏沙门菌的鉴别,全血平板凝集试验适用于成年鸡的鸡沙门菌和雏沙门菌抗体的检测。本标准也可用于鸡伤寒和鸡白痢的流行病学调查和健康鸡群监测。

2 临床诊断

2.1 临床症状

2.1.1 鸡伤寒临床症状

成年鸡易感,一般呈散发性。潜伏期一般为4 d~5 d。在年龄较大的鸡和成年鸡,急性经过者突然停食,排黄绿色稀粪,体温上升1℃~3℃。病鸡可迅速死亡,通常经5 d~10 d死亡。雏鸡发病时,临床症状与鸡白痢相似。

2.1.2 鸡白痢临床症状

各品种鸡对本病均易感,以2周龄~3周龄雏鸡的发病率和死亡率为最高,呈流行性。本病在雏鸡和成年鸡中所表现的症状和经过有显著的差异。

- a) 雏鸡潜伏期4 d~5 d,出壳后感染的雏鸡,多在孵出后几天才出现明显临床症状,在第2周~第3周内达到高峰。发病雏鸡呈最急性者,无临床症状迅速死亡。稍缓者表现精神委顿,绒毛松乱,两翼下垂,缩颈闭眼,昏睡,不愿走动,拥挤在一起。病初食欲减少,后停食,多数出现软嗦临床症状。腹泻,排稀薄如糞糊状粪便。有的病雏出现眼盲或肢关节肿胀,呈跛行临床症状。
- b) 成年鸡感染后常无临床症状,母鸡产蛋量与受精率降低。有的因卵黄囊炎引起腹膜炎,腹膜增生而呈“垂腹”现象。

2.2 病理变化

2.2.1 鸡伤寒病理变化

死于鸡伤寒的雏鸡病理变化与鸡白痢相似。成年鸡,最急性者眼观病理变化轻微或不明显,急性者常见肝、脾、肾充血肿大。亚急性和慢性病例,特征病理变化是肝肿大呈青铜色,肝和心肌有灰白色粟粒大坏死灶,卵子及腹腔病理变化与鸡白痢相同。

2.2.2 鸡白痢病理变化

- a) 雏鸡急性死亡,病理变化不明显。病期长者,在心肌、肺、肝、盲肠、大肠及肌胃肌肉中有坏死灶或结节,胆囊肿大。输尿管扩张。盲肠中有干酪样物,常有腹膜炎。稍大的病雏有出血性肺炎,肺有灰黄色结节和灰色肝变。育成阶段的鸡肝肿大,呈暗红色至深紫色,有的略带土黄色,表面可见散在或弥散性的小红色或黄白色大小不一的坏死灶,质地极脆,易破裂,常见有内出血变化。
- b) 成年母鸡最常见的病理变化为卵子变形、变色,呈囊状。有腹膜炎及腹腔脏器粘连。常有心包炎。成年公鸡睾丸极度萎缩,有小肿胀,输精管管腔增大,充满稠密的均质渗出物。

3 实验室诊断

3.1 病原分离和鉴定

3.1.1 采集病料

可采集被检鸡的肝、脾、肺、卵巢等脏器,无菌取每种组织 5 g~10 g,研碎后进行病原分离培养。

3.1.2 分离培养

3.1.2.1 培养基

增菌培养基:亚硒酸盐煌绿增菌培养基、四硫磺酸钠煌绿增菌培养基。

鉴别培养基:SS 琼脂和麦康凯琼脂。

以上各培养基配制方法见附录 A。

3.1.2.2 操作

将研碎的病料分别接种亚硒酸盐煌绿增菌培养基或四硫磺酸钠煌绿增菌培养基和 SS 琼脂平皿或麦康凯琼脂平皿,37℃培养 24 h~48 h,在 SS 琼脂或麦康凯平皿上若出现细小无色透明或半透明、圆形的光滑菌落,判为可疑菌落。若在鉴别培养基上无可疑菌落出现时,应从增菌培养基中取菌液在鉴别培养基上划线分离,37℃培养 24 h~48 h,若有可疑菌落出现,则进一步做鉴定。

3.1.3 病原鉴定

3.1.3.1 生化试验和运动性检查

3.1.3.1.1 生化反应试剂

三糖铁琼脂和半固体琼脂。

3.1.3.1.2 操作

将可疑菌落穿刺接种三糖铁琼脂斜面,并在斜面上划线,同时接种半固体培养基,37℃培养 24 h 后观察。

3.1.3.1.3 结果判定

若无运动性,并且在三糖铁琼脂上出现阳性反应时,则进一步做血清学鉴定;若有运动性,说明不是鸡沙门菌或雏沙门菌感染。三糖铁琼脂典型阳性反应为斜面产碱、变红,底层产酸、变黄;部分菌株斜面和底层均产酸、变黄。半固体琼脂阳性反应为穿刺线呈毛刷状。

3.1.3.2 血清型鉴定

3.1.3.2.1 沙门菌属诊断血清

沙门菌 A-F 多价 O 血清、O9 因子血清、O12 因子血清、H-a 因子血清、H-d 因子血清、H-g. m 因子血清和 H-g. p 因子血清。

3.1.3.2.2 操作

对初步判为沙门菌的培养物做血清型鉴定。取可疑培养物接种三糖铁琼脂斜面,37℃培养 18 h~24 h,先用 A-F 多价 O 血清与培养物进行平板凝集试验,若呈阳性反应,再分别用 O9、O12、H-a、H-d、H-g. m 和 H-g. p 因子血清做平板凝集试验。

具体操作如下:用接种环取两环因子血清于洁净玻璃板上,然后再用接种环取少量被检菌苔与血清混匀,轻轻摇动玻璃板,于 1 min 内呈明显凝集反应者为阳性,不出现凝集反应者为阴性。试验同时设生理盐水对照,应无凝集反应。

3.1.3.2.3 结果判定

如果培养物与 O9、O12 因子血清均呈阳性反应,而与 H-a、H-d、H-g. m 和 H-g. p 因子血清均呈阴性反应,则鉴定为鸡沙门菌或雏沙门菌。

3.1.3.3 鸡沙门菌和雏沙门菌初步鉴别生化试验

3.1.3.3.1 生化反应试剂

鸟氨酸脱羧酶试验小管、卫茅醇试验小管和葡萄糖(产气)小管。

3.1.3.3.2 操作

对鉴定为鸡沙门菌或雏沙门菌的菌株接种鸟氨酸脱羧酶、卫茅醇和葡萄糖(产气)生化小管,37℃培养 24 h 后观察。

3.1.3.3.3 结果判定

鸟氨酸脱羧酶和葡萄糖(产气)为阴性,卫茅醇为阳性的为鸡沙门菌;鸟氨酸脱羧酶和葡萄糖(产气)为阳性,卫茅醇为阴性的为雏沙门菌。

3.1.3.4 鸡沙门菌和雏沙门菌鉴别 PCR

3.1.3.4.1 PCR 试剂

10×PCR Buffer、dNTP、*Taq* 酶、DL2000 DNA Marker、TAE、琼脂糖、阳性对照(已鉴定的鸡沙门菌和雏沙门菌)和阴性对照。

3.1.3.4.2 引物

见表 1。

表 1 鸡沙门菌和雏沙门菌鉴别 PCR 引物

检测目的基因	引物序列(5'-3')	扩增大小(bp)
<i>glgC</i> 基因	<i>glgC</i> 上游引物:GATCTGCTGCCAGCTCAA	174
	<i>glgC</i> 下游引物:GCGCCCTTTTCAAAACATA	
<i>speC</i> 基因	<i>speC</i> 上游引物:CGGTGTACTGCCCGCTAT	252
	<i>speC</i> 下游引物:CTGGGCATTGACGCAAA	

3.1.3.4.3 DNA 的提取

取纯培养细菌一接种环加入 100 μL 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模板。

3.1.3.4.4 PCR 反应体系(50 μL)

见表 2。

表 2 鸡沙门菌和雏沙门菌鉴别 PCR 反应体系

组 分	体积,μL
无菌超纯水	34.75
10×PCR Buffer(含 Mg ²⁺)	5
dNTP(2.5 mmol/L)	4
<i>glgC</i> 上游引物(10 μmol/L)	1
<i>glgC</i> 下游引物(10 μmol/L)	1
<i>speC</i> 上游引物(10 μmol/L)	1
<i>speC</i> 下游引物(10 μmol/L)	1
<i>Taq</i> 酶(5 U/μL)	0.25
DNA 模板	2

同时设置阳性对照和阴性对照。PCR 反应条件为:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环,72℃延伸 7 min。

3.1.3.4.5 PCR 产物的检测

PCR 产物用 1.5%~2.0%琼脂糖凝胶进行电泳,观察扩增产物条带大小。

3.1.3.4.6 结果判定

阳性对照扩增出约 174 bp 和 252 bp 的片段,阴性对照未扩增出片段,试验成立。若被检样品扩增出约 174 bp 和 252 bp 的片段,判定为鸡沙门菌;若被检样品只扩增出约 252 bp 的片段,判定为雏沙门菌。结果判定电泳图参见附录 B。

3.2 全血平板凝集试验

3.2.1 材料

3.2.1.1 鸡伤寒和鸡白痢多价染色平板抗原、强阳性血清(500 IU/mL)、弱阳性血清(10 IU/mL)、阴性血清。

3.2.1.2 玻璃板、吸管、金属丝环(内径 7.5 mm~8.0 mm)、反应盒、酒精灯、针头、消毒盘和酒精棉等。

3.2.2 操作

在 20℃~25℃环境条件下,用定量滴管或吸管吸取抗原,垂直滴于玻璃板上 1 滴(约 0.05 mL),然后用消毒的针头刺破鸡的翅静脉或冠尖,取血 0.05 mL(相当于内径 7.5 mm~8.0 mm 金属丝环的两滴血液),与抗原混合均匀,并使其散开至直径约为 2 cm,计时判定结果。同时,设强阳性血清、弱阳性血清和阴性血清对照。

3.2.3 结果判定

3.2.3.1 凝集试验判定标准如下:

100%凝集(++++) : 紫色凝集块大而明显,反应液清亮;

75%凝集(+++) : 紫色凝集块较明显,反应液有轻度浑浊;

50%凝集(++) : 出现明显的紫色凝集颗粒,反应液较为浑浊;

25%凝集(+) : 仅出现少量的细小颗粒,反应液浑浊;

0%凝集(-) : 无凝集颗粒出现,反应液浑浊。

3.2.3.2 在 2 min 内,抗原与强阳性血清应呈 100%凝集(++++) ,弱阳性血清应呈 50%凝集(++),阴性血清不凝集(-),则判试验有效。

3.2.3.3 在 2 min 内,被检全血与抗原出现 50%(++) 以上凝集者为阳性,不发生凝集则为阴性,介于两者之间为可疑反应。将可疑鸡隔离饲养 1 个月后再做检测,若仍为可疑反应,按阳性判定。

4 综合判定

4.1 符合 2.1.1 和 2.2.1,可判为疑似鸡伤寒;符合 2.1.2 和 2.2.2,可判为疑似鸡白痢。

4.2 符合 2.1.1、2.2.1、3.1.3.1、3.1.3.2、3.1.3.4 中扩增出约 174 bp 和 252 bp 的片段和/或 3.1.3.3 中鸟氨酸脱羧酶和葡萄糖(产气)为阴性,卫茅醇为阳性,判为鸡伤寒。符合 2.1.2、2.2.2、3.1.3.1、3.1.3.2、3.1.3.4 中只扩增出约 252 bp 的片段和/或 3.1.3.3 中鸟氨酸脱羧酶和葡萄糖(产气)为阳性,卫茅醇为阴性,判为鸡白痢。

4.3 符合 2.1.1、2.2.1 和 3.2,判为鸡伤寒;符合 2.1.2、2.2.2 和 3.2,判为鸡白痢。

附录 A
(规范性附录)
培养基的制备

A.1 亚硒酸盐煌绿增菌培养基**A.1.1 成分**

酵母浸出粉	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
甘露醇	5.0 g
牛磺胆酸钠	1.0 g
K ₂ HPO ₄	2.65 g
KH ₂ PO ₄	1.02 g
NaHSeO ₃	4.0 g
新鲜 0.1%煌绿水溶液	5.0 mL
去离子水	加至 1 000 mL

A.1.2 制法

A.1.2.1 除 NaHSeO₃ 和煌绿溶液外,其他成分混合于 800 mL 去离子水中,加热煮沸溶解,冷至 60℃ 以下,待用。

A.1.2.2 将 NaHSeO₃ 加入,再加 200 mL 去离子水,加热煮沸溶解,冷至 60℃ 以下,待用。

A.1.2.3 将煌绿溶液加入,调整 pH 至 6.9~7.1。

A.1.3 用途

为沙门菌选择性增菌培养基。

A.2 四硫磺酸钠煌绿增菌培养基**A.2.1 成分**

胨蛋白胨或多价蛋白胨	5.0 g
胆盐	1.0 g
CaCO ₃	10.0 g
Na ₂ S ₂ O ₃	30.0 g
0.1%煌绿溶液	10.0 mL
碘溶液	20.0 mL
去离子水	加至 1 000 mL

A.2.2 制法

A.2.2.1 除碘溶液和煌绿溶液外,其他成分混合于水中,加热溶解,分装于中号试管或玻璃瓶,试管每支 10 mL,玻璃瓶每瓶 100 mL。分装时振摇,使 CaCO₃ 均匀地分装于试管或玻璃瓶。121℃ 高压灭菌 15 min,备用。

A.2.2.2 临用时,每 10 mL 或 100 mL 上述混合溶液中,加入碘溶液 0.2 mL 或 2.0 mL 和 0.1%煌绿溶液 0.1 mL 或 1.0 mL(碘溶液由碘片 6.0 g、KI 5.0 g,加 20.0 mL 灭菌的蒸馏水配制而成)。

A.2.3 用途

供沙门菌增菌培养用。

A.3 SS 琼脂

A.3.1 成分

牛肉浸粉	5.0 g
豚蛋白胨	5.0 g
胆盐	2.5 g
蛋白胨	10.0 g
乳糖	10.0 g
Na ₂ S ₂ O ₃	8.5 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	8.5 g
FeC ₆ H ₅ O ₇	1.0 g
1%中性红溶液	2.5 mL
0.01%煌绿溶液	3.3 mL
琼脂粉	12.0 g
去离子水	加至 1 000 mL

A.3.2 制法

A.3.2.1 将 A.3.1 中的成分(除中性红和煌绿溶液外)混合,加热溶解。

A.3.2.2 待琼脂完全溶化后,调整 pH 至 7.1~7.2。

A.3.2.3 将中性红和煌绿溶液加入,混合均匀后,分装。

A.3.2.4 116℃灭菌 20 min~30 min。

A.3.3 用途

供鉴定沙门菌用。

A.4 麦康凯琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	20.0 g
乳糖	10.0 g
NaCl	5.0 g
胆盐	5.0 g
1%中性红水溶液	7.5 mL
琼脂粉	12.0 g
去离子水	加至 1 000 mL

A.4.2 制法

A.4.2.1 将 A.4.1 中的成分除中性红水溶液外,其他成分混合,加热溶解。

A.4.2.2 待琼脂完全溶化后,调整 pH 至 7.4。

A.4.2.3 加入中性红水溶液,混合均匀后,分装于容器中。

A.4.2.4 以 116℃灭菌 20 min~30 min。

A.4.3 用途

供分离培养沙门菌和大肠杆菌等肠道菌用。

附录 B
(资料性附录)
鸡沙门菌和雏沙门菌鉴别 PCR 结果判定

B.1 鸡沙门菌和雏沙门菌鉴别 PCR 电泳图

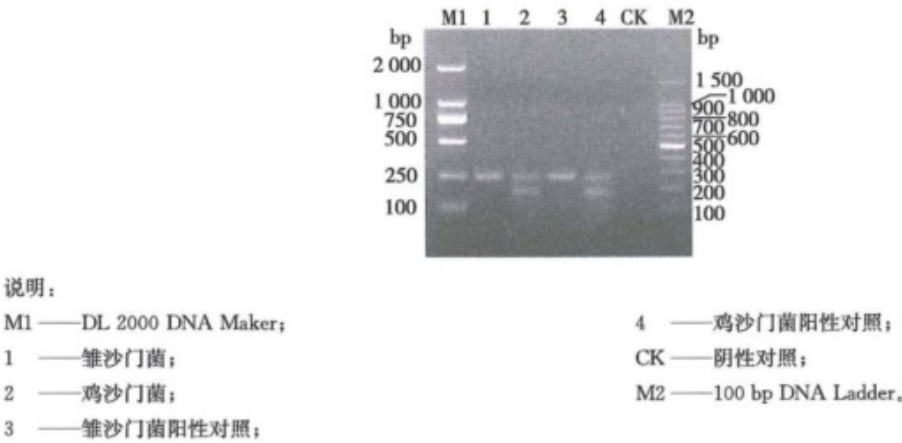


图 B.1 PCR 电泳图

B.2 PCR 扩增产物序列

B.2.1 *glgC* 序列

GATCTGCTGCCAGCTCAACAGCGTATGAAGGGCGAAAACCTGGTATCGCGGCACGGCAGACGCGGT
GACCCAGAACCTGGATATTATTCGTCGCTATAAAGCGGAATATGTCGTCATCCTGGCAGGCGATCAT
ATCTACAAGCAGGACTACTCGCGTATGTTTTGAAAAGGGCGC

B.2.2 *speC* 序列

CGGTGTATCGCCCACTATCGGCATCAATACCTGGCGTGGTCAGTAACAGTTTACAGGGGTTCGACAA
AATACTGGTCATCCGCATAGCCCTCAAAGCCATGCCATTTGCCCCGGGTTCAAACTGAAGAAAC
GACGATTGCTGGCAATGGTCTCCGTCGGATATGCCTGCCACGGCTTGCCGTCAACCACCACTGGGA
TAAAGGGCTGAAGCAGTTTGCAACGGGCGAGAATGGCTTTGCGTCAATGCCAG