



中华人民共和国农业行业标准

NY/T 908—2004

羊干酪样淋巴结炎诊断技术

Diagnostic technique for caseous lymphadenitis in sheep and goat

2005-01-04 发布

2005-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：西北农林科技大学。

本标准主要起草人：张彦明、邢福珊。

羊干酪样淋巴结炎诊断技术

1 范围

本标准规定了羊干酪样淋巴结炎(caseous lymphadenitis in sheep and goat,简称CLA)病原菌分离与鉴定和酶联免疫吸附试验2种检疫方法。

本标准规定的病原菌分离与鉴定适用于羊干酪样淋巴结炎的诊断,酶联免疫吸附试验适用于羊干酪样淋巴结炎的诊断、检疫及流行病学调查。

2 病原菌分离与鉴定

2.1 发病特征和病理变化

发病羊的淋巴结肿大,呈脓性干酪性坏死,病羊消瘦,生产性能下降,孕羊产出死胎,严重者死亡。在发病羊的肺、肝、脾和子宫角发生大小不等的结节,内含淡黄色干酪样物质。

2.2 培养基

鲜血琼脂,血清琼脂,葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、甘露糖、淀粉、蕈糖发酵培养基,含0.2%吐温-80的马丁肉汤,成分和制备方法见附录A。

2.3 病料的采取

按无菌操作方法用18号以上的针头和注射器采取淋巴结中干酪样脓汁,作为病原菌分离与鉴定的病料。

2.4 分离培养

2.4.1 将采取的脓汁接种于鲜血平板或血清平板,37℃培养24 h,观察菌落生长情况。

2.4.2 若在血液琼脂平板上出现黄白色、不透明、凸起、表面无光泽的菌落,初分离时菌落周围有狭窄溶血环,则判为可疑菌落。

2.4.3 若在血清琼脂平板上出现细小的颗粒样、半透明、边缘不整齐、干燥、松脆的菌落,则为可疑菌落。

2.4.4 将上述可疑菌落涂片,用革兰氏染色法染色、镜检。若见有革兰氏阳性、呈球形或细丝状、一端或两端膨大呈棒状的细菌,排列不规则,常呈丛状或栅栏状,则为可疑伪结核棒状杆菌,需进一步做生化试验。

2.5 生化试验

将可疑菌落纯培养后,接种于2.2中的各种糖发酵培养基试管中,37℃培养24 h,若葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖发酵产酸不产气,而淀粉、蕈糖不发酵,则判定为伪结核棒状杆菌。

3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

3.1 抗原制备

见附录B.1。

3.2 各种液体的配制

见附录B.2~B.6。

3.3 酶标抗体和血清

3.3.1 酶标兔抗羊IgG

购买酶标兔抗羊IgG,用时以稀释缓冲液作1:4 000稀释。

3.3.2 阴性血清、阳性血清和待检血清的制备

3.3.2.1 血清的分离方法

用无菌操作法从羊的颈静脉采取 5 mL 血液于洁净的灭菌小瓶内,盖上瓶塞,倾斜静置,待析出血清后,用灭菌巴氏管将血清吸至另一洁净的灭菌小瓶内,置 -20℃ 冰箱保存,保存期 6 个月,用时融解并作 1:40 稀释。

3.3.2.2 阴性血清的制备

将临床上健康、伪结核棒状杆菌菌体凝集抑制试验检测结果为阴性的临产前山羊当作未受伪结核棒状杆菌感染的羊只,剖腹产后,采其胎羔心脏血液分离的血清作为阴性血清。

3.3.2.3 阳性血清的制备

将伪结核棒状杆菌参考菌株(ATCC 19410 株)人工感染羊,感染羊临床上出现症状,30 d 后,从肿大的淋巴结中可分离到与感染菌相同的病原菌,采其血液分离的血清作为阳性血清。

3.3.2.4 待检血清的制备

从随机抽样的待检羊所采血液分离的血清作为待检血清。

3.4 操作方法

3.4.1 在酶标板内加抗原 50 μ L/孔(设立 2 孔空白对照,不加抗原),在 4℃ 冰箱中过夜。

3.4.2 取出酶标板,甩出孔内液体,每孔用洗涤液(本方法中用稀释缓冲液作为洗涤液)200 μ L,甩出孔内液体,反复 5 次,最后一次甩出孔内液体后在吸水纸上将孔内水分拍干。

3.4.3 加了抗原的孔加 1% BSA 50 μ L/孔(封闭),置 37℃ 温箱 1 h。洗涤酶标板(方法同 3.4.2)。

3.4.4 在加了抗原的孔中加血清 50 μ L/孔(2 孔阳性血清和 2 孔阴性血清作对照,其他孔加待检血清各 2 孔),置 37℃ 温箱 1 h。洗涤酶标板(方法同 3.4.2)。

3.4.5 加酶标兔抗羊 IgG 50 μ L/孔,置 37℃ 温箱 1 h。洗涤酶标板(方法同 3.4.2)。

3.4.6 加底物溶液 50 μ L/孔,置 37℃ 温箱显色 15 min,取出,每孔加终止液 50 μ L,混匀后用酶标仪测 OD₄₉₂值。

3.5 判定方法

用 P/N 值进行判定。P(Positive)即阳性血清或待检血清平均 OD 值,N(Negative)即阴性血清平均 OD 值。若 $P/N > 2$,则判为阳性;若 $P/N \leq 2$,则判为阴性。阳性对照孔 P/N 值必须大于 2,否则试验无效。

附 录 A

(规范性附录)

病原菌分离与鉴定培养基的成分和制备方法

A.1 血液琼脂

A.1.1 成分

普通琼脂	100 mL
无菌抗凝血或脱纤血	5 mL

A.1.2 制备方法

A.1.2.1 无菌采取健康绵羊颈静脉血液,置于盛有玻璃珠的灭菌三角瓶或加入灭菌的抗凝剂(5.0 g/L 柠檬酸钠:血液=1:9 或 0.1 g/L 肝素:血液=1:99),按常规方法制成脱纤血或抗凝血。

A.1.2.2 将普通琼脂温度降至 50℃ 左右,按 5%~10% 的量加入血液,混匀后分装于容器(平皿、试管等),制成血液琼脂培养基,无菌检验合格后使用。

A.2 血清琼脂

将血液琼脂中的血液成分换作血清即制成血清琼脂。

A.3 0.2%吐温-80 马丁肉汤

A.3.1 成分

猪胃消化液	500 mL
牛肉浸液	500 mL
葡萄糖	10 g
吐温-80	2 mL
冰醋酸	1 mL
醋酸钠	6 g

A.3.2 制备方法

A.3.2.1 猪胃消化液的制备:将新鲜猪胃洗净,去脂绞碎,称取 350 g,加 50℃ 水 1 000 mL,充分摇匀,再加入盐酸(比重 1:19)10 mL,充分混合后,置 56℃ 水浴箱中消化 24 h(在消化过程中每小时搅拌一次)。24 h 后,可见瓶底只留下很少的组织。消化完毕后,80℃~85℃ 加热 10 min,静置并冷却到 25℃~30℃ 后,虹吸上清液于具塞瓶中,加入 1% 氯仿充分振荡,然后,置冰箱 2℃~8℃ 保存备用。用时虹吸出上清液,过滤。

A.3.2.2 牛肉浸出液的制备:称取切除脂肪、筋腱、肌膜后的牛肉 1 000 g,用绞肉机绞碎或用刀剁碎后,放入玻璃容器内,加入蒸馏水 1 500 mL,搅拌均匀,置冰箱内 2℃~8℃ 浸泡 20 h~24 h,取出后逐渐加热煮沸 1 h,不断搅拌。最后补足水分,过滤,分装于玻璃瓶内,121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min,待冷却后,置 2℃~8℃ 冰箱保存,备用。

A.3.2.3 将猪胃消化液和牛肉浸液混合,加热至 80℃ 时,加冰醋酸 1 mL,摇匀,煮沸 3 min~5 min,加 15% NaOH 溶液约 20 mL,调 pH 至 7.2~7.4,继续煮沸 3 min~5 min,加醋酸钠 6 g,再调 pH 至 7.2~7.4,继续煮沸 5 min~10 min,用滤纸过滤,过滤后补足水至 1 000 mL,再加入葡萄糖 10 g、吐温-80 2 mL,摇匀,分装,121℃ 高压蒸汽灭菌 20 min,备用。

A.4 糖培养基

A.4.1 成分

蛋白胨	10 g
NaCl	5 g
糖 *	10 g
琼脂	5 g
1.6%溴甲酚紫酒精溶液	1 mL
蒸馏水或去离子水	1 000 mL
pH 调至 7.4	

注：* 糖指分析纯或化学纯葡萄糖、半乳糖、甘露糖等。

A.4.2 制备方法

将上述试剂称量好后，加水搅拌，加热溶解，用 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液将 pH 调至 7.4，加入指示剂，分装于试管中，115℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 即成。

附 录 B

(规范性附录)

酶联免疫吸附试验抗原和试剂的制备方法

B.1 抗原制备

将参考菌株(ATCC 19410 株)接种于含 0.2%吐温-80 的马丁肉汤中,37℃ 振荡培养 3 d,2 000 r/min 离心 15 min,上清液用除菌滤器过滤,滤液即为抗原,用时稀释 20 倍。

B.2 包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液,pH 9.6)

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	1.293 g
蒸馏水或去离子水	加至 1 000 mL

该液现用现配,临用时以 0.5 mol/L NaOH 将 pH 调至 9.6。

B.3 稀释缓冲液(0.01 mol/L PBST,pH 7.4,也可用作洗涤液)

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.90 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
吐温-20	0.50 mL
蒸馏水或去离子水	加至 1 000 mL

pH 调至 7.4。

B.4 封闭液

牛血清白蛋白(BSA):在生物制品公司购买,临用时作 1:100 稀释。

B.5 底物溶液

A 液:柠檬酸 4.2 g 溶于 200 mL 水中(0.1 mol/L)。

B 液:Na₂HPO₄·12H₂O 14.325 g 溶于 200 mL 水中(0.2 mol/L)。

取 A 液 97.2 mL、B 液 102.8 mL 混匀后,加水至 400 mL,加入邻苯二胺(OPD)0.160 g,在暗处操作,溶解后分装入小瓶(6 mL/瓶),-20℃ 避光保存。临用前取出 1 小瓶,融解后加 3% H₂O₂ 30 μL,即是底物溶液。

B.6 终止液

将 69.5 mL 浓硫酸(比重 1.84)缓慢加入 930.5 mL 水中,混匀,即是 1.25 mol/L H₂SO₄ 终止液。