

鸭和鹅致病性大肠杆菌病诊断技术规范

Diagnostic technical protocol for pathogenical colibacillosis of duck and goose

地方标准信息服务平台

2016 - 04 - 06 发布

2016 - 07 - 06 实施

前 言

本标准是根据GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第一部份：标准的结构和编写》给出的规则起草。
本标准由福建出入境检验检疫局提出并归口。

本标准起草单位：福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心、福建省农业科学院畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人：郑腾，程龙飞，张体银，黄瑜，李宋钰，傅光华，唐寰宇，施少华，王武军，陈红梅，白泉阳，万春和，傅秋玲，张志灯。

地方标准信息服务平台

鸭和鹅致病性大肠杆菌病诊断技术规范

1 范围

本标准规定了鸭和鹅致病性大肠杆菌病的临床诊断和实验室诊断技术。
本标准适用于鸭和鹅致病性大肠杆菌病的诊断。

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。

GB/T 6682-2008 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

3 疾病概述

3.1 病原

鸭和鹅的致病性大肠杆菌病是由致病性大肠杆菌引起的全身或局部感染的一种细菌性传染病，该病的病原为埃希氏大肠杆菌（*Escherichia coli*），是肠杆菌科（Enterobacteriaceae）埃希氏菌属（*Escherichia*）的代表种，俗称大肠杆菌。大肠杆菌为革兰氏阴性无芽胞杆菌，根据O（耐热菌体抗原）、H（不耐热鞭毛蛋白）、K（菌体表面的热不稳定抗原）、F（菌毛抗原）四种抗原来进行血清分型，其中O血清型是对大肠杆菌进行分类的主要依据之一，而O78血清型为鸭鹅致病性大肠杆菌的主要血清型。

3.2 流行病学

大肠杆菌病呈全球性分布，各种血清型大肠杆菌是正常动物肠道内的定居菌群，其中有部分属于潜在致病菌。自然条件下，鸭和鹅从胚胎到成年均可感染发病，但以中小日龄感染引起的死亡比较常见。该病一年四季均有发生，但以低温、阴雨潮湿的季节较为多见。潜伏期的长短与菌株的毒力、感染途径及应激等因素有关。急性发病在几天内大量死亡，慢性病例可拖延十余天甚至更长时间。

4 临床诊断

4.1 临床症状

4.1.1 消瘦，腹部膨胀，排黄白色稀粪，表现神经症状（如共济失调或头颈震颤）。

4.1.2 关节肿胀、跛行。

4.1.3 受精卵孵化过程中出现大量胚胎死亡。

4.1.4 雏禽出壳后精神不振，脐部膨胀，局部充血。

4.1.5 产蛋率下降。

4.2 病理变化

4.2.1 心包积液，心包膜增厚，表面覆盖一层灰白色渗出物，心包与胸骨粘连。

4.2.2 肝脏表面覆盖一层淡黄色或灰白色假膜。

4.2.3 气囊表面有淡黄色干酪样物沉积。

4.2.4 整个腹腔被渗出物粘连。

4.2.5 十二指肠、盲肠、回肠、肝脏和肠系膜等处出现大小不等、灰黄色肿瘤样结节。

4.2.6 脑膜及实质有小出血点。

4.2.7 关节囊内有黄白色粘性或脓性或干酪样分泌物。

4.2.8 脐部肿大，卵黄吸收不良或附着炎性分泌物，味恶臭。

4.2.9 产蛋期输卵管膨胀，管壁变薄，管壁内附有单个或大量干酪样渗出物，渗出物呈叠层状，其中心为带有卵壳或卵壳膜的蛋，并伴有恶臭，卵泡粘连，腹腔内积聚渗出物，初期呈液体状，粘稠，后期渗出物变干，类似于卵黄将内脏粘连。

4.3 初步诊断

当鸭和鹅出现以上临床症状和病理变化时，应进行实验室诊断。

5 实验室诊断

5.1 设备、材料和试剂

5.1.1 设备

5.1.1.1 培养箱（37℃±1℃）。

5.1.1.2 高速冷冻离心机。

5.1.1.3 独立送风隔离笼具(IVC)。

5.1.1.4 振荡摇床（37℃±1℃）。

5.1.1.5 水浴锅。

5.1.1.6 微量可调移液器。

5.1.1.7 PCR仪。

5.1.1.8 电泳仪。

5.1.1.9 紫外凝胶成像系统。

5.1.2 材料和试剂

- 5.1.2.1 麦康凯琼脂平板，配制方法见附录 A.1。
- 5.1.2.2 伊红美蓝琼脂平板，配制方法见附录 A.2。
- 5.1.2.3 三糖铁琼脂斜面，配制方法见附录 A.3。
- 5.1.2.4 结晶紫染色液，配制方法见附录 A.4。
- 5.1.2.5 革兰氏碘液，配制方法见附录 A.5。
- 5.1.2.6 沙黄复染液，配制方法见附录 A.6。
- 5.1.2.7 生化反应管（乳糖、山梨醇、蔗糖、硫化氢、尿素、吲哚、甲基红、VP、枸橼酸盐）。
- 5.1.2.8 生理盐水。
- 5.1.2.9 大肠杆菌抗 O 单因子和多因子血清。
- 5.1.2.10 LB 培养基，配制方法见附录 A.7。
- 5.1.2.11 水：应符合 GB/T 6682-2008 所规定的一级水要求。
- 5.1.2.12 消化缓冲液，配制方法见附录 A.8。
- 5.1.2.13 蛋白酶 K。
- 5.1.2.14 酚/三氯甲烷/异戊醇混合液，配制方法见附录 A.9。
- 5.1.2.15 三氯甲烷/异戊醇混合液，配制方法见附录 A.10。
- 5.1.2.16 无水乙醇。
- 5.1.2.17 Taq DNA 聚合酶。
- 5.1.2.18 脱氧核苷酸三磷酸 dNTPs（含 dCTP、dGTP、dATP、dTTP）。
- 5.1.2.19 引物（Primer）：10 μmol/L。根据大肠杆菌 gapA 基因序列设计，扩增长度为 707 bp。保存在 18℃~20℃条件下
- 上游引物 ECTF 5'-GTCGCTGAAGCAACTGGT-3'
- 下游引物 ECTR 5'-TGAGCGATCAGGTCCAGA-3'
- 5.1.2.20 琼脂糖（电泳纯）。
- 5.1.2.21 溴化乙锭（10 mg/mL），配制方法见附录 A.13
- 5.1.2.22 TAE 电泳缓冲液，配制方法见附录 A.9。
- 5.1.2.23 上样缓冲液，配制方法见附录 A.10。
- 5.1.2.24 DNA 相对分子质量标准物 Marker，推荐使用 DL2000。
- 5.1.2.25 DNA 纯化回收试剂盒。
- 5.1.2.26 大肠杆菌标准菌株 ATCC25922。

5.1.2.27 金黄色葡萄球菌标准菌株 ATCC26111。

5.2 细菌的分离和初步鉴定

5.2.1 样品采集

濒死或死亡后不久的鸭或鹅，无菌剖检采集肝脏，用烧红的刀片烧烙肝组织表面，再用无菌棉拭子或接种环通过烧烙表面插入肝组织内取样。

5.2.2 细菌分离

划线接种麦康凯琼脂平板（5.1.2.1），37℃±1℃下培养16 h~24 h。若菌落圆形、表面光滑、稍突起于培养基、呈亮红色，判定为可疑菌落。若无可疑菌落，判定为病原分离阴性。

挑取可疑的单菌落，一部分划线接种在伊红美蓝琼脂平板（5.1.2.2），一部分划线接种在三糖铁琼脂斜面（5.1.2.3），37℃±1℃下培养16 h~24 h。疑似菌落在伊红美蓝琼脂平板上呈圆形、表面光滑、稍突起于培养基、黑色带金属光泽；同时三糖铁琼脂斜面呈黄色或红色，底层黄色，产气或不产气，不产生硫化氢。疑似菌落需进一步进行鉴定。若无疑似菌落，判定为病原分离阴性。

5.2.3 细菌的鉴定

5.2.3.1 镜检

挑取少量疑似菌落，涂片，自然干燥或火焰固定后，滴加结晶紫染色液（5.1.2.4），染色1 min后水洗。滴加革兰氏碘液（5.1.2.5），作用1 min后水洗。滴加95%乙醇脱色约30 s（或将乙醇滴满整个涂片后立即倾去，再用乙醇滴满整个涂片，脱色10 s）后水洗，滴加沙黄复染液（5.1.2.6），复染1 min后，水洗待干后镜检。大肠杆菌为革兰氏阴性菌，两端钝圆，无芽胞，散在或成对存在，多数有鞭毛，通常无荚膜。

5.2.3.2 生化特性

大肠杆菌能发酵多种碳水化合物并产酸产气。大多数菌株能迅速发酵乳糖和山梨醇，仅极少数迟发酵或不发酵。约半数菌株不分解蔗糖。几乎不产生硫化氢，不分解尿素。吲哚和甲基红试验均为阳性，VP试验和枸橼酸盐利用试验均为阴性。

5.2.3.3 血清学鉴定

取10 mL生理盐水洗下伊红美蓝琼脂平板上的纯培养物，8000 g离心5 min，弃上清，加入10 mL生理盐水重悬，8000 g离心5 min，弃上清，加入5 mL生理盐水重悬，121℃高压灭菌2 h，自然冷却后即成为O抗原。先用大肠杆菌抗O多因子血清对O抗原进行平板凝集试验，即各取10 μL于干净的玻片上混匀，在0.5 min内出现明显凝集者为阳性反应。同时各取10 μL的O抗原和生理盐水在玻片上混匀作对照，观察有无自凝集现象。发现阳性者，再用该多因子血清对应的单因子血清对O抗原进行平板凝集试验，确定分离菌株的O血清型。

如果待检O抗原能与多种抗O单因子血清发生交叉凝集，则进行试管凝集试验。先将抗O单因子血清做1:10稀释，然后倍比稀释后加入等量由含菌量约为 1×10^9 CFU/mL的菌液制备的待检O抗原，混匀后放入培养箱中于37℃±1℃下静置18 h~20 h再观察，按下述判定标准做出判定：以“++”作为待检O抗原的效价终点，该效价如果大等于抗O单因子血清效价的一半，即可确定待检O抗原的O血清型。液体完全透明，且管底覆盖明显的伞状凝集沉淀物，判为“++++”；液体略显混浊，且管底伞状凝集沉

淀物明显, 判为“+++”; 液体呈中等程度混浊, 且管底有中等量伞状凝集沉淀物, 判为“++”; 液体不透明或透明度不明显, 且有不太显著的伞状凝集沉淀物, 判为“+”; 液体混浊, 无任何凝集沉淀物, 细菌沉于管底, 呈光滑圆盘状, 振荡呈均匀混浊, 判为阴性。

5.3 致病性试验

5.3.1 致病性试验的生物安全

应符合 GB 19489 的有关要求。

5.3.2 菌液准备

将经纯化后的菌株接种于LB培养基(5.1.2.10), 37℃±1℃振荡培养12 h, 取少量菌液, 采用十倍连续稀释法进行活菌计数, 其余菌液存放于2℃~8℃的条件下保存不超过48 h。根据活菌计数结果, 用灭菌生理盐水配成含菌量为 1.0×10^9 CFU/mL的菌悬液。

5.3.3 动物接种

选择10羽1日龄体重约50 g~60 g的健康樱桃谷鸭, 每羽皮下注射 1.0×10^9 CFU/mL的菌悬液各1 mL, 另设空白对照组5羽, 在IVC中隔离饲养。

5.3.4 观察

观察至72 h, 记录死亡鸭数并从肝脏分离细菌。观察期结束后, 扑杀仍存活的鸭, 检查病变, 观察有无心包炎、肝炎、气囊炎等病理变化, 并从肝脏分离细菌。分离细菌时可以使用麦康凯琼脂平板或伊红美蓝琼脂平板, 应出现大肠杆菌的典型菌落。

5.3.5 结果判定

试验鸭出现死亡, 或试验鸭未出现死亡, 但存活鸭扑杀后剖检时见心包炎、肝周炎或气囊炎病变, 将大肠杆菌分离株定为致病性菌株。

5.4 聚合酶链式反应(PCR)

5.4.1 样品的采集

无菌采集濒死或死后不久的鸭鹅肝组织, 或从麦康凯琼脂平板、伊红美蓝琼脂平板或三糖铁琼脂斜面上挑取经纯培养的可疑菌落。

5.4.2 DNA的提取

肝组织经匀浆后, 取25 mg~50 mg, 加入500 μL消化缓冲液(5.1.2.12), 37℃±1℃水浴1 h后待检; 可疑菌落挑取3至6个, 加入500 μL消化缓冲液, 吹打混匀, 37℃±1℃水浴1 h后待检。在以上待检液中加入蛋白酶K(5.1.2.13)至终浓度100 μg/mL, 上下颠倒混匀, 置56℃±1℃水浴中1 h~3 h。向混合液中按1:1比例加入酚/三氯甲烷/异戊醇混合液(5.1.2.14), 上下颠倒混匀, 12 000 g离心5 min。取上层水相, 加入等体积的三氯甲烷/异戊醇混合液(5.1.2.15), 上下颠倒混匀, 12 000 g离心5 min。取上层水相, 加入2倍体积的无水乙醇, -20℃±1℃放置30 min以上。14 000 g离心15 min, 沉淀DNA, 倾去上清液。在沉淀中加入75%乙醇溶液500 μL, 轻轻混匀后14 000 g离心15 min, 倾去上清液, 室温晾干。用30 μL无菌水溶解DNA沉淀, 冰上保存备用。若需长期保存应放置在-20℃±1℃下。DNA的提取也可采用等效的DNA提取试剂盒。

5.4.3 PCR 扩增

扩增反应体系为：10×PCR缓冲液5 μL、5 U/μL *Taq* DNA聚合酶1 μL、20 μmol/L的引物ECTF和ECTR各1 μL、10 mmol/L dNTPs 1 μL、模板DNA 5 μL，补充无菌水至50 μL。94 °C预变性5 min；之后94 °C变性30 s，54 °C退火30 s，72 °C延伸50 s，共30个循环；72°C补充延伸10 min，4 °C保温。以大肠杆菌标准菌株ATCC25922作为阳性对照，以金黄色葡萄球菌ATCC26111作为阴性对照，以水作为空白对照。

5.4.4 琼脂糖凝胶电泳

用TAE电泳缓冲液配制1%~2%的琼脂糖凝胶（含1 μg/mL溴化乙锭）。将凝胶放入水平电泳槽，使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将6 μL样品和上样缓冲液按比例混匀后加入样品孔。在电泳时使用DNA相对分子质量标准物Marker为对照。5 V/cm电泳约0.5 h，当指示剂到达底部时停止。

5.4.5 测序

使用凝胶成像分析系统观察核酸条带并判断结果，经核酸扩增电泳后如出现一条大小约707 bp的DNA片段，应对其切胶回收后进行测序，参考序列参见附录B.1。

5.4.6 结果判定

经核酸扩增电泳后阳性对照会出现一条大小约707 bp的核酸条带，而阴性对照和空白对照没有该核酸条带。待检样品经核酸扩增电泳后，如果出现一条大小约707 bp的核酸条带并经测序验证者为阳性。无条带或条带的大小不是707 bp的为阴性。

6 综合判定

结合发病症状和病理变化，初判为致病性大肠杆菌病的鸭鹅需采样进行细菌分离、镜检和血清学鉴定。经细菌分离、镜检和血清学鉴定初步判断后，只有经动物接种试验致死试验动物并成功分离出对应大肠杆菌时，或经聚合酶链式反应扩增出一条大小约707 bp的核酸条带并经测序验证为阳性，方可确诊发生了致病性大肠杆菌病。致病性试验可以对大肠杆菌菌株的毒力做出判断。

附 录 A
(规范性附录)
试剂配制

A.1 麦康凯琼脂平板的配制

称取麦康凯粉5.50g, 加入100 mL水中, 煮沸溶解, 15磅高压30 min, 待其自然冷却至60 °C左右时, 分装制成平板, 保存于2 °C~8 °C。

A.2 伊红美蓝琼脂平板的配制

称取伊红美蓝琼脂粉3.750 g, 加入100 mL水中, 煮沸溶解, 15磅高压15 min, 待其自然冷却至60 °C左右时, 分装制成平板, 保存于2 °C~8 °C。

A.3 三糖铁琼脂斜面的配制

称取胰蛋白胨10.0 g、酵母粉5.0 g、NaCl 5.0 g, 加水800 mL, 摇匀溶解, 用1 mol/L NaOH调pH值为7.6, 补足水至1000 mL, 15磅高压30 min, 待其自然冷却后分装, 保存于2 °C~8 °C。

A.4 结晶紫染色液的配制

将1.0 g结晶紫溶解于20 mL的95%乙醇中, 然后与80 mL的1%草酸铵水溶液混合。

A.5 革兰氏碘液的配制

将1.0 g碘与2.0 g碘化钾先进行混合, 加入水少许, 充分振摇, 待完全溶解后, 加水至300 mL。

A.6 沙黄复染液的配制

将0.250 g沙黄溶解于10 mL的95%乙醇中, 然后加水至100 mL。

A.7 LB培养基的配制

称取胰蛋白胨10.0 g、酵母粉5.0g、NaCl 5.0 g, 加水800 mL, 摇匀溶解, 用1.0 mol/L NaOH调pH值为7.6, 补足水至1000 mL, 15磅高压30 min, 待其自然冷却后分装, 保存于2 °C~8 °C。

A.8 消化缓冲液

100.0 mmol/L NaCl, 10.0 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 0.10 mol/L EDTA (pH8.0), 0.5% (质量浓度)的SDS。2 °C~8 °C保存。

A.9 酚/三氯甲烷/异戊醇混合液

用1.0 mol/L Tris饱和酚 (pH7.9±0.2)、三氯甲烷和异戊醇按25:24:1的比例混合, 密闭避光保存。

A.10 三氯甲烷/异戊醇混合液

将三氯甲烷和异戊醇按24:1的比例混合, 密闭避光保存。

A.11 TAE电泳缓冲液 (50倍浓缩液)

在242.0 g的Tris和37.20 g的 $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 中, 加800 mL水充分搅拌溶解后, 加入57.1 mL的醋酸, 加蒸馏水定容至1000 mL, 室温保存。使用时用蒸馏水稀释50倍即可。

A.12 上样缓冲液

每100 mL溶液中含有溴酚蓝0.250 g和蔗糖40.0 g。

A.13 溴化乙锭 (Ethidium Bromide, EB)

用水配制成10.0 mg/mL的浓缩液。用时每100 mL琼脂中加10 μL 的浓缩液。

地方标准信息服务平台

附 录 B
(资料性附录)
参考序列

B.1 PCR扩增的大肠杆菌gapA基因序列片段(707 bp)

gtcgc tgaagcaactggctctgttcctgactgacgaaactgctcgtaaacacatcaccgctggtgcgaagaaagtggttatgactg
gtccgtctaaagacaacactccgatgttcgttaaaggcctaacttcgacaaatagctggccaggacatcgtttccaacgcttcctgc
accaccaactgcctggctccgctggctaaagtatcaacgataacttcggcatcatcgaaggtctgatgaccaccgttcacgctactac
cgtactcagaaaaccgttgatggcccgtctcaciaaagactggcgcggcgccgcgcttcccagaacatcatcccgctcctctaccg
gtgctgctaaagctgtaggtaaagtactgccagaactgaatggcaactgactggtatggcgttccgcttccgaccccgaacgtatct
gtagttgacctgaccgttcgtctggaaaaagctgcaacttacgagcagatcaaagctgccgttaaagctgctgctgaaggcgaaatgaa
aggcgttctggctacaccgaagatgacgtagtatctaccgattcaacggcgaagtttgacttccgtgttcgatgctaaagctggta
tcgctctgaacgacaacttcgtgaaactggtatcctggtacgacaacgaaaccggttactccaacaagttctggacctgatcgctca

地方标准信息服务平台

福建省地方标准
鸭和鹅致病性大肠杆菌病
诊断技术规范
DB35/T 1554—2016

*

2016年10月第一版 2016年10月第一次印刷