

团体标准

T/ NAIA×××-××××

牛羊巴氏杆菌病分型诊断技术规程

Technical specification for classification and diagnosis of
pasteurellosis in cattle and sheep

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农林科学院动物科学研究所、宁夏大学、宁夏回族自治区畜牧工作站、宁夏回族自治区动物疾病预防控制中心、宁夏回族自治区兽药饲料监察所、平罗县高庄畜牧兽医工作站。

本标准主要起草人：郭亚男、刘凡、王秀琴、王建东、冯彤、李知新、梁小军、李昕、杨萌萌、闫背背、曹晓真、邵倩、白涛涛、李勇、祁燕蓉、张慧宁、谢建亮、毛磊、施安、周海宁、陈秀红、康晓冬、高海慧、张久盘、封元、蒋秋斐、历龙。

本文件为首次发布。

牛羊巴氏杆菌病分型诊断技术规程

1 范围

本文件规定了规模化牛场羊场牛羊巴氏杆菌病分型诊断与防治技术的术语和定义、流行病学、病理变化、分型诊断的技术规程。

本文件适用于规模化牛场羊场牛羊巴氏杆菌病分型 TaqMan qPCR 鉴别诊断的检测。

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

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

NY/T 564 猪巴氏杆菌病诊断技术

NY/T 5030 无公害农产品 兽药使用准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 多杀性巴氏杆菌 *Pasteurella multocida*, *P. multocida*

是指主要存在于动物口腔、鼻咽和上呼吸道，可引起多种家畜、野生动物及人类的感染的一种重要的人畜共患疾病病原体。

4 仪器

4.1 革兰氏染液；

4.2 PCR 预混液；

4.3 DL-500 DNA Maker；

4.4 pMD18-TVVector；

4.5 Taq-HS Probe qPCR Premix；

- 4.6 二氧化碳培养箱；
- 4.7 恒温震荡摇床（QYC-200）；
- 4.8 CFX96Real-timePCR 仪；

5 诊断

5.1 流行病学

多杀性巴氏杆菌病通常无明显季节性，主要呈散发或地方流行性特征。封闭潮湿的气候条件下，应激和动物的整体健康不良情况本病更易发生，寒冷季节呈散发。诱发因素是病毒混合感染、断奶应激、管理不善、饮食改变、天气变化和运输等。

5.2 临床症状

感染特征是急性呼吸道疾病，伴有高热、流鼻涕、大量流涎，随后迅速出现呼吸窘迫、脓毒性休克，伴有出血，短时间内死亡。潜伏期一般为 2-5 天，幼畜抵抗力较弱，较为易感。由于急性脓毒症发病较快，常迅速死亡，发病后死亡率接近 100 %。

5.3 病理变化

气管、肺、小肠和肝脏的极度充血。

5.4 细菌分离及培养

巴氏杆菌培养基配制见附录A.1，实验用水应符合GB/T 6682规定。

牛羊动物采样选取精棉迅速擦去其鼻口周围的污物，选用一次性无菌棉签，插入牛羊鼻腔内 5～10 cm 深度，轻轻旋转后抽出棉签，并置于装有 2mL 生理盐水的无菌管中，按照 NY/T 541 规定贮存样品。后将采样物接种于 5%脱纤维羊血固体培养基的样品在 37 °C恒温培养箱中培养 24 h 后，培养基上可观察到淡灰白色、边缘整齐、表面光滑、粘稠、湿润的露珠状小菌落，无溶血现象。菌落形态参见 B.1。

5.5 革兰氏染色及镜检

用无菌接种环取一环无菌生理盐水在洁净载玻片上涂布呈直径 1 cm 大小的水膜。挑取单个菌落均匀涂布在水膜后火焰固定。进行革兰氏染色。首先结晶紫染色液，染色 1 min~2 min，流水缓慢冲洗，干燥；继续滴加革兰氏碘液，染色 1 min~2 min，流水缓慢冲洗，干燥；然后滴加 95%的乙醇，脱色 10 s~30 s，流水缓慢冲洗，干燥；最后滴加复染液，复染 1 min，流水缓慢冲洗，自然干燥。

5.6 镜检

牛羊多杀巴氏杆菌为革兰氏染色阴性、短小杆菌或球杆菌。

5.7 巴氏杆菌分型

根据荚膜（A，B，D，E 和 F）的组成为不同的血清型，根据表达的 LPS 抗原可进一步分为 16 种血清型。

5.8 分离菌株多重 TaqMan qPCR 鉴别诊断

5.8.1 细菌基因组 DNA 模板制备：按照 NY/T 564 中 4.4.4 的规定制备或选取市场售卖试剂盒进行 DNA 模板提取。

5.8.2 引物：根据巴氏杆菌牛羊不同分型的基因序列（见附录 B），设计 5 对引物，商业合成，引物序列参见附录 B.1。

5.8.3 PCR 反应体系为 20 μ L 体系，反应体系见附录 C.2。

5.8.4 PCR 反应程序：95 $^{\circ}$ C 5 min；95 $^{\circ}$ C 10 s；59 $^{\circ}$ C 30 s 收集荧光信号，39 Cycles。

6 结果判定

反应结果应同时符合条件a，条件b，和条件c中的一项，否则实验结果无效。

a) 符合5.1、5.2的特征判断为疑似病例。

b) 符合5.4、5.6和5.7的特征判断为确诊病例。

c) 5.8 中出现大小为 99 bp 的 *hyaC-hyaD* 扩增带的为 A 型牛羊巴氏杆菌；出现大小为 114 bp 的 *bcbD* 扩增带为 B 型牛羊巴氏杆菌；出现大小为 325 bp 的 *Cpa* 毒素扩增带和大小为 236 bp 的 *Cpb* 扩增带的为 C 型牛羊巴氏杆菌；出现大小为 107 bp 的 *dcbF* 扩增带的为 D 型牛羊巴氏杆菌；出现大小为 121 bp 的 *ecbJ* 扩增带的为 E 型产牛羊巴氏杆菌；出现大小为 123 bp 的 *fcbD* 扩增带的为 F 型牛羊巴氏杆菌。

7 防控技术

7.1 疫苗免疫

接种方法：用多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗进行预防，体重 100 kg 以上牛皮下或肌肉注射 6 mL，低于 100kg 牛注射 4mL，羊注射 2mL。完成初免后 1 个月进行加强免疫，基础免疫完成后每间隔 9 个月进行加强免疫，高发地区每 6 个月免疫一次。

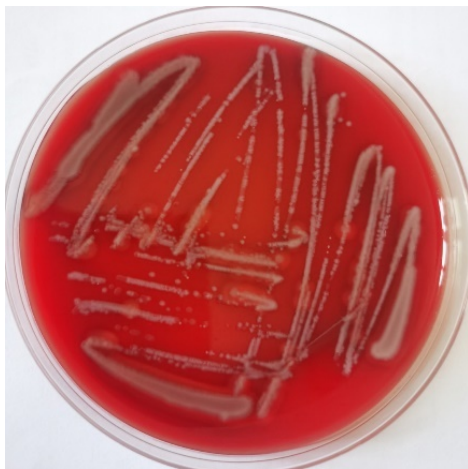
7.2 药物治疗

推荐使用药物：泰拉霉素、加米霉素、可那霉素、长效土霉素、氟苯尼考。采用几种康生物交替使用，避免出现耐药性。药物使用符合 NY/T5030 规定。

附录 A

巴氏杆菌形态特征

B.1 巴氏杆菌菌落形态



附录 B

C.1 分型不同基因特异性引物和探针序列列表

表 1 分型不同基因特异性引物和探针序列列表

目的基因	引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度 (bp)
hyaC-hyaD	hyaC-hyaD-F	GGGCATCACAAGGTATGTTTATG	99
	hyaC-hyaD-R	TCAATTGACTGGCAGGATGT	
	hyaC-hyaD-P	TAATCGTCAGAAGCTCATGCGCTAGC	
bcbD	bcbD-F	CTGAGTGTGGATGCGTTACT	114
	bcbD-R	GGCAGCTGCAACATTCTTC	
	bcbD-P	ATAACGACTCTGCTGGTTTACCGTGG	
dcbF	dcbF-F	GGTATCCTGCTGACTACATAAA	107
	dcbF-R	CTTGTTGACTCTACTTGGAATA	
	dcbF-P	AGCAGCAATTGGATTACATGGTGTT	
ecbJ	ecbJ-F	GCTATGCCAATGGTAGCTTAT	121
	ecbJ-R	TCAGCTTTGCCAACCATATC	
	ecbJ-P	ACAAC TATTTAGCGGATATGGCTCTGCC	
fcbD	fcbD-F	GGGTACGCATCATGTCTAAA	123
	fcbD-R	CTGCATCAGGCTCAAGATAA	
	fcbD-P	TGGCGGAATAGCCTCAGCATCAAATG	

C.2 不同分型 PCR 反应体系

五重qPCR反应体系为20 μL : Taq-HS Probe qPCR Premix 10 μL , hyaC-hyaD、fcbD上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各0.4 μL , bcbD、dcbF、ecbJ上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各0.6 μL 。

hyaC-hyaD探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.45 μL , bcbD、ecbJ、fcbD探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.6 μL , dcbF探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.55 μL , 模板各0.4 μL 。