

团体标准

T/ NAIA×××-××××

规模化羊场产气荚膜梭菌病诊断与 防治技术规程

Technical regulations for diagnosis, prevention and treatment of
pathogenic *Clostridium perfringens* disease in large-scale sheep
farms

(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、宁夏回族自治区动物疾病预防控制中心、宁夏大学、宁夏回族自治区兽药饲料监察所、宁夏回族自治区畜牧工作站。

本标准主要起草人：王建东、郭亚男、于有利、李知新、王晓亮、马青、王锦、康晓冬、高海慧、李继东、黎玉琼、梁小军、刘占发、田进阳、赵娜、刘维华、施安、周海宁、张久盘。

规模化羊场产气荚膜梭菌病诊断与防治技术规程

1 范围

本文件规定了规模化羊场产气荚膜梭菌病诊断与防治技术规程的术语和定义、诊断、预防和治疗。

本文件适用于规模化羊场产气荚膜梭菌病的防治。其他羊场参照执行。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 39915 动物饲养场防疫准则

SN/T 2025 动物检疫实验室生物安全操作规范

SN/T 2984 检验检疫动物病原微生物实验活动生物安全要求细则

NY/T 3073-2017 家畜魏氏梭菌病诊断技术

NY/T 5151 无公害食品 肉羊饲养管理准则

NY/T 3052-2016 舍饲肉羊饲养管理技术规范

NY/T 388 畜禽场环境质量标准

NY/T 1167 畜禽场环境质量及卫生控制规范

NY/T 3075-2017 畜禽养殖场消毒技术

NY/T 5030 无公害农产品 兽药使用准则

NY/T 5151-2002无公害食品 肉羊饲养管理准则

NY5149 无公害食品 肉羊饲养兽医防疫准则

农业部农医发〔2017〕25号 病死及病害动物无害化处理技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens*

又称为产气荚膜芽孢杆菌、魏氏梭菌，革兰氏阳性厌氧耐氧杆菌，根据致死毒素可分为 A-E 五种，是动物气性坏疽和肠毒血症的病原体，引起动物气性坏疽、食物中毒、肠炎、肠毒血症等多种疾病。

3.2 伊红美蓝琼脂培养基 eosin-methylene blue agar, EMB agar

即大肠杆菌鉴别培养基，主要用于大肠杆菌的分离和培养。

3.3 血平板培养基 Blood plate culture medium

主要用于细菌的分离和培养。

3.4 产气荚膜梭菌鉴别培养基 Identification medium for *Clostridium perfringens*

主要用于分离大肠杆菌和梭菌。

4 诊断

4.1 流行病学

产气荚膜梭菌广泛分布于土壤中，该菌进入家畜体内后，通过释放毒素导致腹泻、多器官出血和神经系统紊乱；通常以 2-12 月龄、膘情好的羊为主，经过消化道发生内源性感染。在不同季节之间，羊发病主要集中在夏季，春季和秋季牧草结籽后的一段时间发病较多。绵羊多发，山羊较少，多呈散发性流行。

4.2 临床症状

产气荚膜梭菌导致的症状在临床主要有肠道疾病、痢疾猝狙、羊肠毒血症、犊牛、羔羊痢疾，分别由 A 型、B 和 C 型、D 型和 E 型病原菌引起。A 型导致黄羊病，患病羊以贫血、血红蛋白尿为特征；B 型患病羊运动失调，C 型为出血性肠炎；D 型突然死亡、角弓反张等症状；E 型羊不常见；详见附录 E.2。

4.3 病理变化

A 型产气荚膜梭菌剖检见肝脾肿大充血、苍白等；镜下肺、大、小肠充血和水肿，肾病伴血红蛋白管型等。B 型和 C 型出现弥漫性或多灶性出血性和坏死性肠炎、局灶性或对称性脑软化症。D 型剖检眼观可见血液凝固不良、各个组织脏器出血肿胀；全身淋巴结肿大，切面黑褐色，见附录 A.1。

镜下观察见心内膜、肌纤维、肝脏、脾脏、肾脏肾小球、肠组织上皮细胞、睾丸组织生精小管等脏器组织出现出血、坏死等一系列的病变，见附录A.2。病理变化详见附录E.3。

4.4 实验室诊断

4.4.1 样本采集

采集：无菌采集种公羊的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾、睾丸、肠组织和肠系淋巴结等组织脏器疑似气性坏疽的病料样本。

保存与运输：样本收集于密封的无菌容器中，并记录样品的组织、部位等信息，放置采样箱中运送到实验室进行处理。

4.4.2 分离培养

将无菌采集的羔羊脏器组织在无菌操作条件下接种至伊红美蓝琼脂、血平板和产气荚膜梭菌鉴别培养基中，操作过程见附录B.4；可观察到伊红美蓝琼脂上形成有金属光泽的黑色单一菌落，见附录C.1（1）；血平板上有中等大小、具有溶血圆的灰色圆形单一菌落，见附录C.1（2）；产气荚膜梭菌鉴别培养基中无菌落生长。

伊红美蓝琼脂培养基配制见附录B.1，血平板培养基配制见附录B.2，产气荚膜梭菌鉴别培养基配制见附录B.3。

4.5 显微镜观察

挑取产气荚膜梭菌显色培养基（CHROMagar 公司）和血平板上的单一菌落进行革兰氏染色，光学显微镜下观察可见两端钝圆的蓝色革兰氏阳性短粗杆菌。见附录C.2。

4.6 病原菌同源性比较及遗传进化分析

根据GenBank中登录的产气荚膜梭菌基因全序列，合成细菌16SrRNA通用引物，见附录D.1，PCR片段大小（1465 bp），见附录D.2。

4.7 结果判定

符合4.1、4.2和4.3的特征判断为疑似病例。

同时符合4.4、4.5、4.6的特征判断为确诊病例。

5 预防

5.1 科学饲养管理

改变传统的养殖管理模式，做到科学分群，科学养殖。农区、牧区春夏之际少抢青、抢茬；秋季避免吃过量结籽饲草；发病时搬圈至高燥地区。避免采食过量多汁饲料、结籽饲草和精料。冬季节要做好保暖，避免采食霜冻牧草。饲养管理要求按照GB/T 39915、NY/T 5151和NY/T 3052-2016规定执行，环境控制应符合NY/T 388和NY/T 1167的规定。

5.2 消毒灭菌

防范该病的发生流行，应改善养殖条件，清理有利于致病原繁殖生长的污染物。另外，还应制定严格的清洗消毒制度，定期对圈舍用具和环境进行严格卫生消毒，及时更换消毒药品，避免致病原产生耐药性。消毒灭菌要求按照农业部农医发〔2017〕25号和NY/T 3075-2017规定执行。

5.3 免疫预防

该病常发地区，每半年注射次羊黑疫疫苗和羊梭菌三联四防疫苗或五联疫苗。对于妊娠母羊可以在怀孕105d和120d时分别接种1次羊梭菌三联四防疫苗预防新生羔羊发生梭菌病。如羔羊常发生该病，最好的防控措施就是对母羊进行免疫。种母羊应在繁育前一年，用D型类毒素免疫2次，产羔前4~6周进行1次强化免疫，以后每年免疫1次。防疫应符合NY5149的规定。

5.4 药物预防

可使用抗生素、磺胺药、镇静剂和强心剂治疗，对羊使用石灰水进行灌服。有羔羊痢疾病史的羊场，羔羊出生后12 h内，灌服土霉素0.15g -0.2g/只，1次/d，连续灌服3 d。

6 治疗

使用国家批准的针对本病的中西药物，具体治疗方法见附录 E，药物的选用应符合 NY/T 5030 和 NY/T 5151-2002 的规定。配合药敏试验结果进行抗生素治疗，使用剂量参照说明书。

附录 A

(规范性附录)

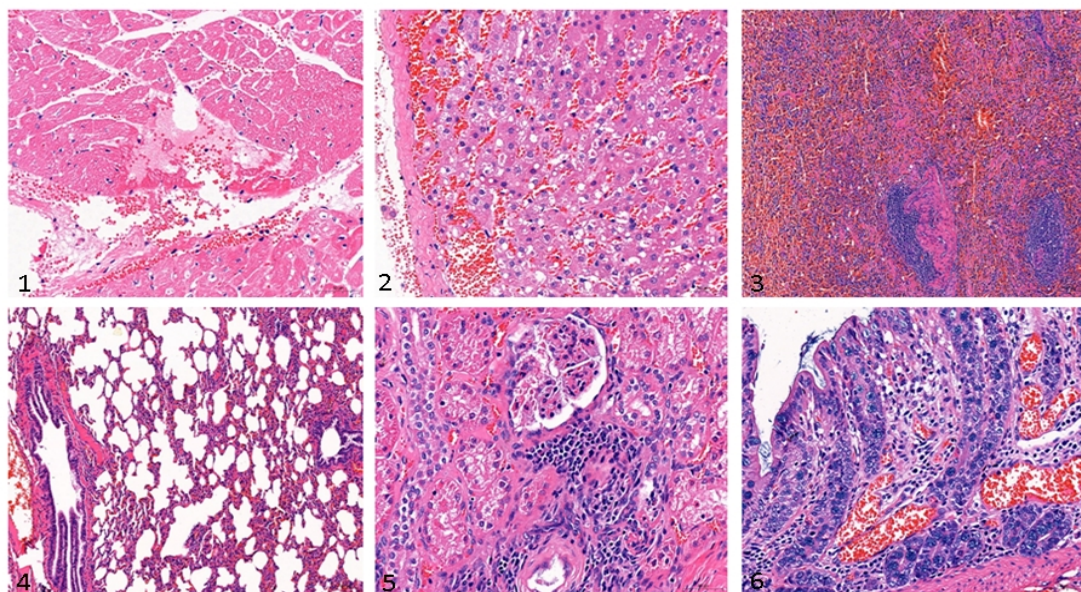
A.1 羊肠毒血症组织剖检图

眼观可见血液凝固不良、呈酱油色；肾脏、心脏软化如泥；肠道鼓胀、粘膜充血与出血；肝脏被膜见有出血斑，胆囊肿大，脾脏淤血，脑膜出血。全身淋巴结肿大，切面黑褐色。



A.2 羊肠毒血症组织剖检图

镜下观察见心内膜出血（图1），肌纤维变性坏死；肝脏组织被膜出血，肝窦扩张淤血（图2）；脾脏组织白髓萎缩，淋巴细胞减少（图3）；肾脏肾小球坏死，间质炎性细胞浸润和纤维组织增生（图6）；肠组织上皮细胞脱落，炎性细胞浸润和血管淤血；睾丸组织生精小管萎缩、细胞坏死，浆液性物质渗出等病理变化。



附录 B

(规范性附录)

产气荚膜梭菌培养基配制及接种过程

B.1 伊红美蓝琼脂培养基

蛋白胨10.0 g, 乳糖10.0 g, 磷酸氢二钾2.0 g, 琼脂15.0 g, 伊红0.4 g, 美蓝0.065 g, 溶于1000 mL蒸馏水中, 121℃ 高压灭菌15 min, 倾入无菌平皿, 4℃保存。

B.2 血平板培养基

血平板培养基: 牛心浸粉15.0 g, 氯化钠5.0 g, 豌豆浸粉3.0 g, 琼脂15.0 g溶于1000 mL蒸馏水中, 121℃高压灭菌15 min, 冷却至50-55℃时无菌操作加入10%无菌脱纤维羊血, 混匀, 倾入无菌平皿, 4℃保存。

B.3 产气荚膜梭菌显色培养基

琼脂15.0 g, 蛋白胨和酵母粉25.0 g, 盐类6.0 g, 色素1.4 g, 生长因子3.5 g溶于1000 mL蒸馏水中, 121℃高压15 min, 冷却至45-50℃加入增补剂S120 mL和增补剂S21 mL, 轻轻摇晃均匀, 倾入平皿, 凝固, 4℃保存。

B.4 细菌接种操作过程

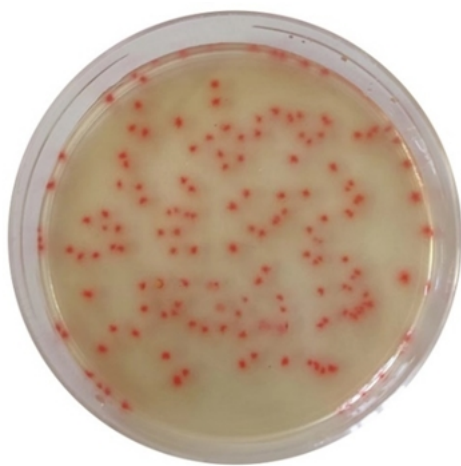
将无菌采集的病死羊的脏器组织、肠组织和肠系膜淋巴结等 12 份样本表明火焰灭菌, 剪取一定量的深部组织, 在无菌操作条件下接种至伊红美蓝琼脂 (Hopebiol, Qingdao China)、血平板 (Hyclcome) 和产气荚膜梭菌显色培养基 (CHROMagar, Paris France) 中, 每份病料样品各接种 2 份。产气荚膜梭菌显色培养基加入厌氧包放置在厌氧袋中, 37℃恒温箱中倒置培养 24 h 后, 观察菌落生长特性、形态等, 挑取单个菌落进行革兰氏染色并镜检。

使用一次性接种环，挑取可疑单一菌落，在新的平板上采用三字划线法涂板，倒置于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h，待新平板上长出新菌落，再次挑取单一菌落至脑心浸液肉汤液体培养基（Hopebiol, Qingdao China）中扩增，挑取菌落进行革兰氏染色，显微镜下观察其形态。

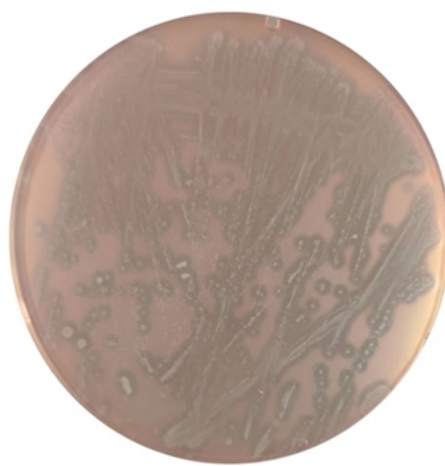
附录 B

（规范性附录）

C.1 产气荚膜梭菌菌落形态

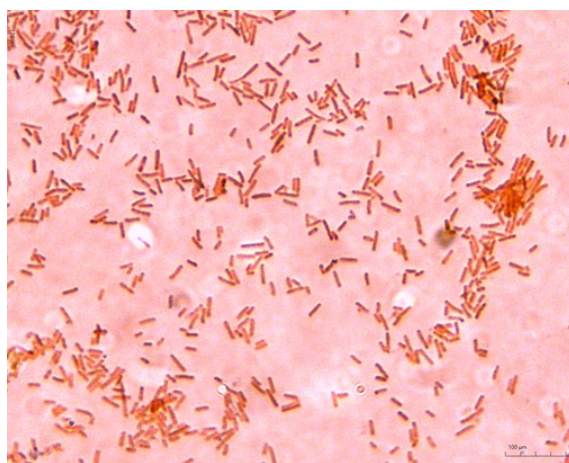


1



2

C.2 产气荚膜梭菌显微镜观察菌体形态



革兰氏染色阳性，镜检呈两端钝圆的蓝色短粗杆菌（1000×）

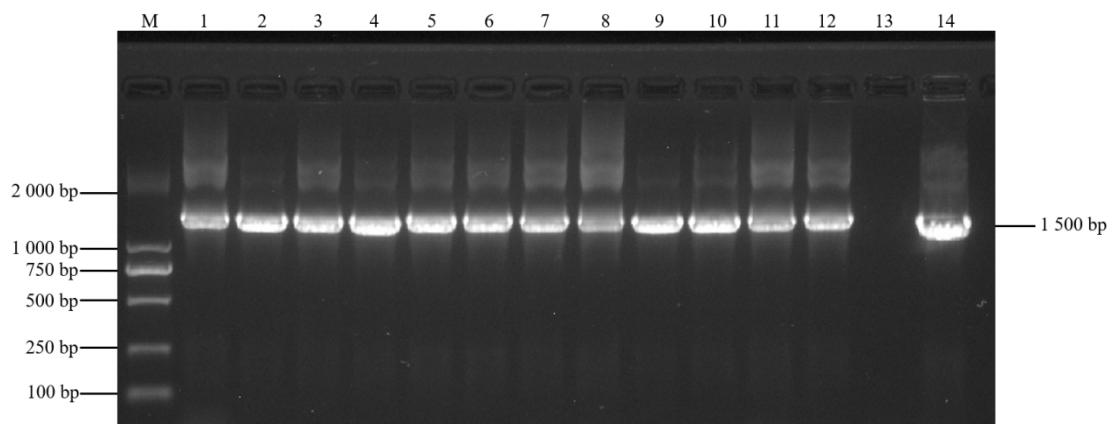
附录 D

(规范性附录)

表 D.1 产气荚膜梭菌基因片段的引物序列信息

引物名称	引物序列 (5' - 3')	片段大小
16S rRNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	1465 bp ^[25]
Cpa	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	325 bp ^[26]
Cpb	ACTATACAGACAGATCATTCAACC TTAGGAGCAGTTAGAACTACAG	236 bp ^[26]
Etx	AGTATCTAATGAAATGTCCA TTCCACTTACTTGTCTAC	585 bp ^[26]
Itx	ACTACTCTCAGACAAGACAG CTTTCCTTCTATTACTATACG	445 bp ^[26]
Cpe	GGAGATGGTTGGATATTAGG GGACCAGCAGTTGTAGATA	233 bp ^[27]

D.2 16S rRNA PCR 片段



M. DNA 标准 DL 2000; 1-12. 心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、睾丸、肠系膜淋巴结、盲肠、结肠外回、结肠末端、回肠、直肠分离菌扩增扩增产物; 13. 阴性对照; 14. 阳性对照

附录 E

(规范性附录)

产气荚膜梭菌病治疗方案

E.1 治疗方法

该病由于病程短促，往往来不及治疗。病程稍长者，可用青霉素肌注，1次80-160万单位，1日2次，或口服磺胺嘧啶，1日2次，1次5-6克，连服3-4次；或将10%安钠咖10毫升加于葡萄糖溶液500-1000毫升中静脉滴注；也可口服10%-20%石灰乳，1次50-100毫升，连服1-2次。

治疗羊产气荚膜梭菌病应选择使用头孢类药物，患病羊肌肉注射头孢噻唑钠注射液，使用剂量为2.2 mg/kg体重，2次/d，连续使用3 d为1个疗程。缓解中毒症状，静脉注射5%的碳酸氢钠注射液，每头羊静脉注射50 mL。同时在整个羊群的饲料中添加98%的阿莫西林可溶性粉剂，每千克饲料添加10 g，连续使用1周。

E.2 临床症状

肠道疾病：A型产气荚膜梭菌导致黄羊病，是一种较为罕见的羊产气荚膜梭菌病，以患病羊精神抑郁、贫血、黄疸和血红蛋白尿为临床特征。

痢疾猝狙：B型产气荚膜梭菌可引起羔羊痢疾，C型引起羊猝狙。B型通常发生于14 d内的羔羊身上，特征为精神抑郁，不哺乳以及运动失调。C型以出血性肠炎为特征，与瘤胃粘膜损伤有关。在绵羊中，B型和C型会产生类似的临床表现，其特征为猝死或伴有出血性腹泻和急性神经系统症状。

羊肠毒血症：D型产气荚膜梭菌引起急性、亚急性和慢性神经系统疾病，其特征是突然死亡或出现神经和呼吸系统症状，双目失明、角弓反张、抽搐、口吐白沫，临死前可出现划船样运动，濒死期挣扎，迅速死亡等，也可见腹泻症状。

犊牛、羔羊痢疾：E型产气荚膜梭菌所致，引起小牛、羔羊出血性肠炎和猝死，在临床上不常见。

E.3 病理变化

肠道疾病：羊A型产气荚膜梭菌剖检肉眼可见全身性黄疸和肝脾肿大充血、苍白和易碎，膀胱尿液发红；镜下肺、大肠和小肠充血和水肿，肾病伴血红蛋白管型，肝腺泡周围坏死。

痢疾猝狙：绵羊感染B型和C型产气荚膜梭菌可导致类似的肠道病变，包括弥漫性或多灶性出血性和坏死性肠炎，主要发生在回肠，可以观察到肠腔中充满血液和纤维蛋白。镜下观察到腹腔内有許多带血浆液。在B型产气荚膜梭菌引起的出血性肠炎存活的成年动物可出现局灶性或对称性脑软化症。山羊B型和C型产气荚膜梭菌感染的病理变化的记录较少。

羊肠毒血症：D型菌株导致，剖检眼观可见血液凝固不良、各个组织脏器出血肿胀；全身淋巴结肿大，切面黑褐色。镜下观察见心内膜、肌纤维、肝脏、脾脏、肾脏肾小球、肠组织上皮细胞、睾丸组织生精小管等脏器组织出现出血、坏死等一系列的病变。