

团体标准

T/ NAIA×××-××××

规模化羊场致病性大肠杆菌病诊断与 防治技术规程

Technical regulations for diagnosis, prevention and treatment of
pathogenic Escherichia coli 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、宣小龙、梁小军、李勇、刘占发、田进阳、赵娜、祁燕蓉、刘维华、施安、周海宁、张久盘。

规模化羊场致病性大肠杆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致病性大肠杆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致病性大肠杆菌病的防治。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 4789.6 食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验

GB 4789.38 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌计数

GB 4789.41 食品安全国家标准 食品微生物学检验 肠杆菌科检验

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 致病性大肠杆菌 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, EPEC

是一组不同种类的不仅可正常定殖于畜禽等肠道，而且能侵入血液循环系统引起菌血症，并诱发败血症或局部肠道外感染的大肠杆菌。

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

羊致病性大肠杆菌病主要感染 10 日龄内的羔羊。圈舍卫生状况、气候变化等应激因素可诱发羊大肠杆菌病的发生。

4.2 临床症状

下痢型 多发生于 7 日龄以内的羔羊。病初体温略高（40.5~41℃），粪便呈半液状，带有气泡，具有恶臭，起初呈淡黄色，继之变为淡灰白色，含有乳凝块，严重时混有血液，不及时治疗于 24~36 h 死亡。

败血性：多发生于 2~6 周龄羔羊。病羊体温 41~42℃，精神沉郁，迅速虚脱，有轻微的腹泻或不腹泻，有的带有神经症状，也有的病例出现关节炎，多于病后 4~12 h 死亡。

4.3 病理变化

下痢型：剖检尸体严重脱水，真胃、小肠和大肠内容物呈黄灰色半液状，黏膜充血，肠系膜淋巴结肿胀发红。

败血性：剖检病变可见胸、腹腔和心包大量积液，内有纤维素；某些关节，尤其是肘和腕关节肿大，滑液浑浊，内含纤维素型脓性絮片。

4.4 样本采集

采集：无菌操作采集肝脏、肺脏、脾脏、淋巴结、脑等肠外组织，或关节积液、心包积液。

保存与运输：病料样品采集后不能及时送检的，可保存于饱和氯化钠溶液或 30% 甘油缓冲盐水中，保存时间不超过 72 h。样品均需采取低温（0℃~4℃）保存和运输。

4.5 分离培养

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

将无菌采集的羔羊脏器组织、肠组织和肠系膜淋巴结的表面进行火焰灭菌，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、血平板和产气荚膜梭菌鉴别培养基中，每份病料样品各接种 2 份。平板于 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 24 h 后，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 B.1（1）；血平板上有中等大小、具有溶血圈的灰色圆形单一菌落，见附录 B.1（2）；产气荚膜梭菌鉴别培养基中无菌落生长。

4.6 显微镜观察

挑取伊红美蓝平板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红色革兰氏阴性短杆菌,见附录B.2。

4.7 同源性比较与遗传进化分析

根据GenBank中登录的大肠杆菌基因全序列，合成细菌16S rRNA通用引物，见附录A.4，PCR片段大小（1465 bp），见附录B.3。

4.8 肠外大肠杆菌致病性鉴定

取10只健康状态良好小鼠，分成试验组和对照组，每组5只。将4.6中鉴定均符合的大肠杆菌分离株制成浓度约为0.5麦氏比浊度的菌悬液，分别腹腔注射试验组小鼠，每只0.3 mL。对照组小鼠每只腹腔注射0.3 mL 用于稀释菌液的无菌生理盐水。注射后观察3 d内小鼠精神状况及死亡情况。若对照组小鼠均健活，试验组小鼠出现精神萎靡，不进食，静止抱团不活动，最后死亡的临床症状，并将死亡的小鼠在无菌操作下取其肺脏、肝脏、脾脏组织分别接种于EMB，37℃ 培养24 h，挑取大肠杆菌疑似菌落进行革兰氏染色镜检，结果与接种菌株一致则说明待检大肠杆菌分离株为EPEC。

4.9 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、4.7或4.8的特征判断为确诊病例。

4.10 预防和治疗

4.10.1 预防

妊娠母羊饲养管理：妊娠阶段合理配制日粮，应富含蛋白质、矿物质以及维生素，满足妊娠母羊营养需求，保持良好膘情，促进胎儿发育，同时提升初乳的营养价值。

重视接产管理：接产前做好产房消毒工作，建议使用3%来苏儿溶液喷雾消毒，营造无菌的生产环境。

加强初生羔羊饲养管理：羔羊出生后2 h内应吃上、吃足初乳，以获得充足的免疫抗体。母乳不足时及时人工辅助喂养，避免因吃乳不足导致羔羊体质降低。哺乳前清洗母羊乳头，用0.1%高锰酸钾消毒，防止羔羊吃乳时感染。

4.10.2 治疗

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)

大肠杆菌培养基配制

A.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0.06 5g，溶于1000 mL蒸馏水中，121℃ 高压灭菌15 min，倾入无菌平皿，4℃保存。

A.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。

A.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S1 20 mL和增补剂S2 1 mL，轻轻摇晃均匀，倾入平皿，凝固，4℃保存。

A.4 细菌16SrRNA通用引物

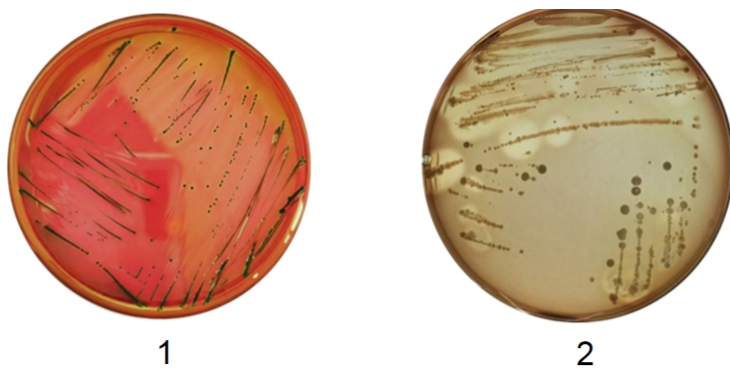
扩增 E.coli 16S rRNA 基因片段的引物序列信息

引物名称	引物序列 (5' - 3')	片段大小 (bp)
Primer name	Primer sequence(5'- 3')	Product length
27F	5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3'	1465
1492R	5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'	

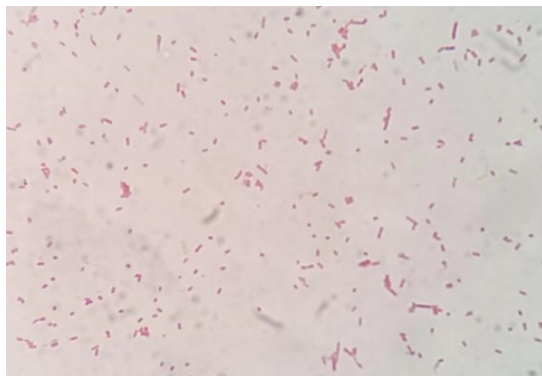
附录 B

(规范性附录)

B.1 大肠杆菌菌落形态



B.2 大肠杆菌显微镜观察菌体形态



B.3 16S PCR 片段

