

团体标准

T/ NAIAxxx-xxxx

牛场致病性大肠杆菌病诊断与
防治技术规程

Technical regulations for diagnosis and prevention of pathogenic
Escherichia coli disease in Cattle farms

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx发布

xxxx-xx-xx实施

宁夏化学分析测试协会 发布

Error! No text of specified style in document.

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

本标准主要起草人：郭亚男、邵喜成、王建东、王嘉凡、王学义、摆世林、李昕、慕彦彤、赵玉玺、毛彦妮、于有利。

牛场致病性大肠杆菌病诊断与防治技术规程

1 范围

本文件规定了牛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。

本文件适用于牛场致病性大肠杆菌病的防治。其他牛场参照执行。

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。

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、败血症和局部肠道外感染的大肠杆菌。

4 诊断

4.1 流行病学

牛致病性大肠杆菌病主要感染 10 日龄内的犊牛，败血型大肠杆菌多发 0-60 日龄内的犊牛。圈舍卫生状况、气候变化等应激因素可诱发牛大肠杆菌病的发生。

4.2 临床症状

下痢型：多发生于7日龄以内的犊牛。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。

败血型：多发生于2~6周龄犊牛。病牛体温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。

败血型：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

无菌采集肝脏、肺脏、脾脏、淋巴结、脑、关节积液、心包积液以及肠内容物。

保存与运输：病料样品采集后不能及时送检的，可保存于生理盐水或30%甘油缓冲盐水溶液中，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。

将无菌采集的犊牛脏器组织、肠组织和肠系膜淋巴结的表面进行火焰灭菌，剪取深部1毫米组织，同时挑取少量肠内容物，将不同组织和肠内容物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、具有溶血圆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 PCR 检测和诊断

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

4.8 大肠杆菌致病性鉴定

取10只6-8周龄SPF级雌性小鼠，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°C 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

符合流行病学、临床症状和病理变化的特征判断为疑似病例。

同时符合分离培养、显微镜观察、PCR检测和诊断和大肠杆菌致病性鉴定判断为确诊病例。

4.10 预防和治疗

4.10.1 预防

妊娠母牛饲养管理：妊娠阶段合理配制日粮，应富含蛋白质、矿物质以及维生素，满足妊娠母牛营养需求，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。

加强初生犊牛饲养管理：犊牛出生后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犊牛体质降低。哺乳前清洗母牛乳头，用0.1%高锰酸钾消毒，防止犊牛吃乳时感染。

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。内服土霉素2 g，早中晚各1次，连服3~5日；内服新霉素10 mg/kg，早晚各1次，连服3日；肌注庆大霉素注射液0.1 mL/kg，早晚各1次，连用3~5日；肌注卡那霉素10 mL，早晚各1次，连用3~5日；肌注土霉素注射液0.2 mL/kg，每天1次，连用3日；肌注环丙沙星0.1 mL/kg，每天1次，连用3日；肌注乙酰甲喹注射液0.1 mL/kg，每天1次，连用3日；肌注甲矾霉素20 mg/kg，早晚各1次，连用3~5日；内服磺胺脒1 g，间隔6 h后再

服用0.5 g, 配合服用胃蛋白酶0.2 g效果更佳。上述药物任选其一使用。心衰病牛皮下注射安钠咖1 mL;
异常兴奋病牛灌服水合氯醛0.2 g; 脱水病牛静脉注射5%葡萄糖氯化钠溶液50~100 mL。

附录 A

(资料性附录)

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°C 高压灭菌15 min, 倾入无菌平皿, 4°C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°C高压灭菌15 min, 冷却至50-55°C时无菌操作加入10%无菌脱纤维牛血, 混匀, 倾入无菌平皿, 4°C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°C高压15 min, 冷却至45~50°C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°C保存。

A.4 细菌16SrRNA通用引物

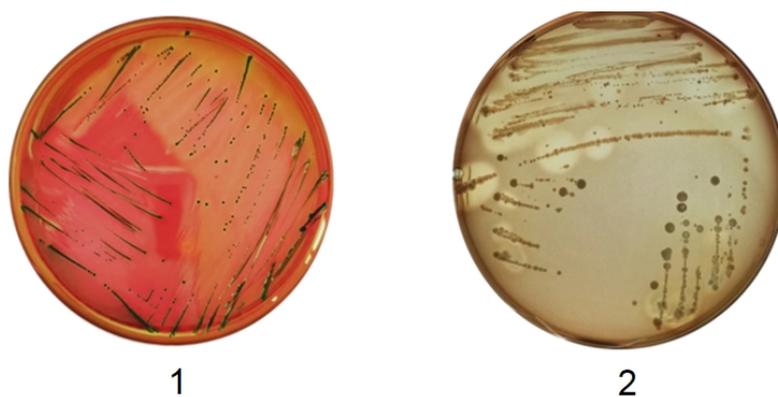
表 1 扩增 *E.coli* 16S rRNA 基因片段的引物序列信息

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

附录 B

(资料性附录)

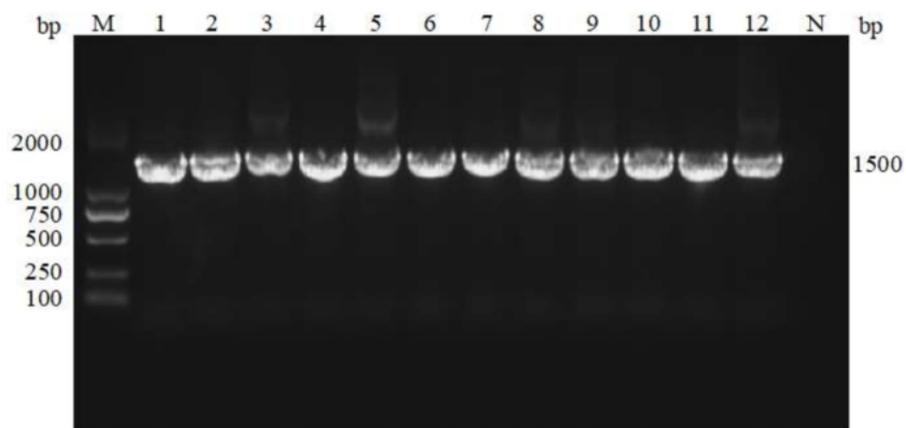
B.1 大肠杆菌菌落形态



B.2 大肠杆菌显微镜观察菌体形态



B.3 16S PCR 片段



DL2000 Marker; 1.阳性对照; 2-12.扩增产物; N.阴性对照