ICS 11.220

CCS B 41

**21**

辽 宁 省 地 方 标 准

禽克雷伯菌病诊断技术规范

 Technical specification for diagnosis of Klebsiella disease for poultry

辽宁省市场监督管理局 发 布

DB21/T 3625—2022

前 言

本文件按照 GB/T1.1—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。

请注意，本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：锦州医科大学、营口市动物疫病预防控制中心、鞍山市动物疫病预防控制中心、大石桥市动物疫病预防控制中心、锦州市检验检测认证中心、锦州市农业农村综合服务中心、瓦房店市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：董筱萍、刘海月、刘英姿、李冰、高慎阳、王辉暖、刘丽颖、李春宵、谷建、刘畅、赵岩、甄志刚、刘广旭。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈， 我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862。

文件起草单位通讯地址：锦州医科大学（辽宁省锦州市古塔区人民街5段48号），联系电话：0416-4672050。

DB21/T 3625-2022

禽克雷伯菌病诊断技术规范

1. **范围**

本文件规定了禽克雷伯菌病诊断的技术方法和诊断结果判定依据。

本文件适用于禽克雷伯菌病的诊断、检疫和流行病学调查。

1. **规范性引用文件**

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。但是，鼓励根据本标准达成协议的各方研究使用这些文件的最新版本。

GB/T 6682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

NY/T 541-2016 兽医诊断样品采集

保存与运输技术规范、NY/T 1948-2010 兽医实验室生物安全要求通则。

1. **符号和缩略语**

下列符号和缩略语适用于本文件。

**符号缩略语**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **中文全称** | **英文缩写** | **中文全称** |
| NA | 营养琼脂 | 16SrRNA | 16S核糖体RNA基因 |
| MAC | 麦康凯琼脂 | DNA | 脱氧核糖核酸 |
| SS | 沙门志贺菌属琼脂 | PCR | 聚合酶链式反应 |
| MR | 甲基红 | Taq Mix | 扩增预混液 |
| VP | 乙酰甲基甲醇试验 | ddH2O | 双重去离子水 |
| TSI | 三糖铁琼脂 | khe | 肺炎克雷伯氏菌特异性基因 |
| H2S | 硫化氢 | C | 枸橼酸盐 |

1. **诊断**

依据流行病学特点、临床症状及剖检变化等做出初步诊断，确诊需做病原学鉴定。

4.1 流行病学

4.1.1在发病前有接触感染禽克雷伯菌的病禽或带菌禽；

DB21/T 3625-2022

4.1.2主要为20日龄以内的幼禽发病。幼年禽发病率和死亡率较高，成年禽类少见发病；

4.1.3发病前有季节交替、环境温度突变、长途运输等应激因素。

4.2 临床症状及剖检变化

4.2.1 临床症状

表现为精神沉郁，体温升高，呼吸困难。

4.2.2 剖检变化

剖检以纤维素性肺炎变化为主。患病幼雏皮下出血，气管黏膜出血，心外膜增厚，肺淤血、水肿、坏死、切面有红色泡沫样液体流出，胸腔有渗出液混有胶冻样物，肝脏坏死、肝包膜增厚、严重的表面覆有一层纤维素性伪膜，脾脏肿大充血，肾脏肿大有出血斑点，肠道充血出血明显，盲肠积粪，脑实质出血。

4.3 病原学检测

4.3.1 细菌分离培养和涂片镜检

4.3.1.1 操作

无菌采集血液、肝脏、肺脏、脾脏等发病器官病料（病料采集，具体NY/T541要求执行），无菌接种环沾取采集到的病料，划线接种于NA培养基中，37℃培养18h~24h后观察有无菌落生长。挑选单个优质菌落接种于MAC培养基中，选取粉红色、质地粘稠、中等大小的典型单个菌落进行革兰氏染色、镜检，观察细菌的形态。

注：具体NA，MAC培养基配制方法见附录A1,A2。

4.3.1.2 培养形态

在营养琼脂平板上，菌落呈灰白色圆形隆起、边缘整齐、湿润黏稠；在45°斜射光下可见明亮荧光，见附录A3图1；在血琼脂平板上形成浓厚、灰白色、圆凸闪光的菌落，不溶血；在麦康凯琼脂上形成粉红色粘稠菌落，表面湿润，具有扩散性，菌苔密集处菌落呈黄色，见附录A3图2；在SS琼脂上，37℃培养24h后形成粉红色菌落，培养基变为粉红色，培养48h后，菌落及培养基变为黄色。

4.3.1.3 镜检形态

挑取单个菌落涂片、革氏染色、镜检，观察细菌的形态，应为革兰氏阴性粗短杆菌，单在或成对排列、有荚膜、无芽胞。见附录A3图3。

4.3.2 生化试验

4.3.2.1操作步骤

将纯培养菌分别接种于葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖、C、尿素、MR、VP、硫化氢、吲哚、明胶、三糖铁等微量发酵管中，37℃培养18h~24h后观察结果。

4.3.2.2 生化结果

见表格。

DB21/T 3625-2022

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 生化试验项目 | 反应结果 | 生化试验项目 | 反应结果 |
| 葡萄糖 | ⊕ | 枸橼酸盐 | （＋） |
| 乳糖 | ⊕ | 尿素 | （＋） |
| 麦芽糖 | ⊕ | MR试验 | （-） |
| 甘露醇 | ⊕ | VP试验 | （＋） |
| 蔗糖 | ⊕ | 硫化氢生成试验 | （-） |
| 阿拉伯糖 | ⊕ | 吲哚试验 | （-） |
| 鼠李糖 | ＋ | 明胶 | （-） |
| 木糖 | ＋ | 三糖铁(TSI)反应 | ⊕不产生H2S |

注：⊕表示产酸产气，＋表示产酸不产气，（-）表示阴性，（＋）表示阳性

4.3.3 致病性检验及动物回归试验

4.3.3.1 操作步骤

取20只小鼠和20只20日龄雏禽各随机分为2组，即小鼠、雏禽试验组和对照组，每组各10只。对照组，隔离饲养，不做攻菌处理；实验组无菌吸取上述经生化鉴定的分离菌的血清肉汤纯培养物腹腔注射实验组小白鼠和雏禽，每只注射0.3 mL（4.05×1011 CFU/mL）。注射后小鼠和雏禽隔离饲养，观察发病及死亡情况，并对死亡小鼠和雏禽的心血、脑、肝脏、脾脏进行细菌分离鉴定。

4.3.3.2 结果

观察到试验组小鼠和雏禽注射24h后应表现出不同程度的精神萎靡，毛皮粗糙竖起，呼吸急促、采食减少等现象；对照组小鼠和雏禽无此现象。攻菌小鼠各组发病率达90%以上，死亡率80%以上；攻菌雏禽各组发病率均达到100%，死亡率90%以上。将死亡小鼠和雏禽剖检，小鼠和雏禽各个器官出血、充血、坏死，将心血、脑、肝脏、脾脏同4.3.1方法分离培养，应得到细菌的培养特性、细菌形态、生化特性应均与接种细菌一致，表明分离菌为禽克雷伯菌。

注：病原学检测有关试验使用蒸馏水按国家标准《GB/T6682分析实验室用水规格和试验方法》要求准备。

4.3.4 16SrRNA基因鉴定

4.3.4.1 引物序列

合成用于扩增细菌16SrRNA基因序列的通用引物：

27f: 5ˊ-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3ˊ；

1492r: 5ˊ- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3ˊ。目的基因1450bp。

4.3.4.2 模板制备

提取待检病料所分离培养的细菌基因组DNA。

4.3.4.3 反应体系

加入提取的DNA（3μL）、上下游引物（各1μL）、Taq Mix（15μL）、ddH2O（10μL）等试剂，终体系为30μL。

DB21/T 3625-2022

4.3.4.4 反应条件

应用PCR扩增仪按相应反应条件进行扩增。 PCR反应条件：94℃预变5min；94℃变性30s，55℃退火30s；72℃延伸30s，35个循环；72℃延伸10min；4℃终止反应。对PCR扩增产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，得到目的片段后，按照《琼脂糖凝胶胶回收试剂盒》（OMEGA）的说明及步骤对PCR扩增产物进行回收和纯化，回收产物作为测序模板进行测序。

4.3.4.5 扩增产物电泳

见附录A4图4

4.3.4.6 结果判定

对所测出的基因序列进行同源性比对分析，即登陆NCBI网站（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）的Blastn在线软件，粘贴测序所得的16S rRNA基因序列，获取与该基因同源高的序列和相应的细菌名称，若同源性大于97%，可以确定为同种细菌。

4.3.5 病原菌khe特异性基因鉴定

4.3.5.1 引物序列

应用肺炎克雷伯菌独有的体外溶血酵素基因（khe）作为PCR鉴定的靶序列，合成用于扩增细菌khe基因序列的引物：

khe-F: 5ˊ-TGATTGCATTCGCCACTGG-3ˊ；

khe-R:5ˊ-GGTCAACCCAACGATCCTG-3ˊ。目的基因428bp。

4.3.5.2 模板制备

按照通用型柱式基因组提取试剂盒说明书提取待检病料所分离培养的细菌基因组DNA。

4.3.5.3 反应体系

在PCR反应管中按相应反应体系加入提取的DNA（3μL）、上下游引物（各1μL）、Taq Mix（15μL）、ddH2O（10μL）等试剂，终体系为30μL。

4.3.5.4 反应条件

应用PCR扩增仪同16SrRNA反应条件进行扩增。

4.3.5.5 扩增产物电泳图

见附录A4图5。

4.3.5.6结果判定

 对PCR扩增产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳检测，得到目的片段后，按照《琼脂糖凝胶胶回收试剂盒》（OMEGA）的说明及步骤对PCR扩增产物进行回收和纯化，回收产物作为测序模板进行测序，测序要求测通。对所测出的基因序列进行同源性比对分析，即登陆NCBI网站（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）的Blastn在线软件，粘贴测序所得的khe基因序列比对。

1. **综合诊断结果判定**

5.1 初步诊断

根据流行病学特征和临床症状，结合剖检变化，可作出初步诊断。

5.2 依据病原学检测结果，做出确诊。

符合5.1，且按4.3.1、4.3.2、4.3.3规定的进行细菌的分离培养，用4.3.4或4.3.5中的任一方法检测，结果为阳性者，确诊为禽克雷伯菌病。

DB21/T 3625-2022

1.

**A1、NA（营养琼脂）培养基的配制：**

 营养琼脂培养基NA用于细菌总数测定、保存菌种基纯培养，也可以用于消毒效果测定（GB/T4789.28-2003中，GB/T4789.28-2003，GB15979-2002和GB15981-1995,ISO标准）。

营养琼脂培养基配方（每升）：

蛋白胨 10g

牛肉膏粉 3g

氯化钠 5g

琼脂 15g

最终pH7.3±0.2

培养基使用方法：

称取营养琼脂培养基NA33g，加入蒸馏水或去离子水1L，搅拌加热煮沸至完全溶解，分装三角瓶，121℃高压灭菌15min，备用。

**A2、MAC（麦康凯琼脂）培养基配制方法：**

麦康凯培养基供分离发酵乳糖的革兰氏阴性肠道杆菌。（《中华人民共和国药典》2010年版）。

麦康凯营养琼脂的配方（每升）：

胨 20.0g

牛胆盐 5.0g

氯化钠 5.0g

琼脂 14.0g

乳糖 10.0g

中性红 0.03g

最终pH7.2±0.2

培养基使用方法：

称取麦康凯培养基54.0g，加入蒸馏水或去离子水1L，搅拌加热煮沸至完全溶解，分装三角瓶，121℃高压灭菌15min，备用。

DB21/T 3625-2022

**A3、细菌在培养基中的生长状态**

  

图1 分离菌在营养琼脂培养基生长状态 图2 分离菌在麦康凯琼脂培养基生长状态

 

图3 镜检下分离菌形态，革兰氏阴性

**A4、鉴定菌株及khe基因PCR电泳图**

 

图4 鉴定菌株16SrRNA PCR电泳图 图5 khe基因PCR鉴定结果

1. M．DL2000 DNAMarker; 1.阴性对照； 注： M．DL2000 DNAMa rker;

2-5.阳性扩增产物； 1.阴性对照；2-5.阳性扩增产物；