ICS 67.120.10

CCSX 22

|  |
| --- |
|  |

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—XXXX

|  |
| --- |
|  |

动物源副猪嗜血杆菌分离与鉴定技术规程

Technical code of practice for isolation and identification of *Haemophilus parasuis* from animals

（征求意见稿）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中华人民共和国农业农村部   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。

请注意本标准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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国兽药残留与耐药性控制专家委员会归口。

本文件起草单位：华中农业大学、中国兽医药品监察所、中国动物卫生流行病学中心、湖北省疾病预防控制中心、吉林大学、山东省滨州畜牧兽医研究院。

本文件起草人：郝海红、张纯萍、徐士新、何启盖、王鹤佳、黄安雄、赵琪、余波、黄玲利、蔡旭旺、徐晓娟、曲志娜、韩文瑜、顾敬敏、苗立中、王娟、张朋、阮紫涵、邹紫莹、张志浩、于学祥、孙琪、田野、杜鹏飞、陈玲、蒋颖。

动物源副猪嗜血杆菌分离与鉴定技术规程

1 范围

本文件确立了副猪嗜血杆菌（*Haemophilus parasuis*）分离与鉴定的程序，规定了样品采集与保存运输、分离纯化、筛查与鉴定、菌种保藏、生物安全要求的操作指示，描述了相应的试验方法。

本文件适用于动物源细菌耐药性监测对猪鼻腔拭子、肺脏、心包液、胸腔积液、腹腔积液、关节液和脑脊液等样品中副猪嗜血杆菌的分离和鉴定。

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于本文件；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

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 34750 副猪嗜血杆菌检测方法

NY/T 1948 兽医实验室生物安全要求通则

NY/T 4141 动物源细菌耐药性监测样品采集技术规程

3 术语与定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试剂或材料

4.1要求

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的三级水，培养基按附录A配制或用商品化产品。

4.2 试剂

4.2.1 胎牛血清。

4.2.2 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）。

4.2.3 50×TAE缓冲液。

4.2.4 琼脂糖。

4.2.5 PCR预混液（2×PCR Master Mix）。

4.2.6 荧光定量PCR预混液（2×SYBR Real-Time PCR Master Mix）。

4.2.7 甘油。

4.3 溶液制备

4.3.1 NAD溶液：取NAD 0.1 g，加水适量使溶解并稀释至100 mL，0.22 μm无菌滤膜过滤。

4.3.2 1×TAE缓冲液：取50×TAE缓冲液20 mL，加水至1000 mL。

4.3.3 1.2%琼脂糖凝胶：取琼脂糖1.2 g，于100 mL 1×TAE中加热，充分溶解。

4.3.4 基质溶液：取α-氰-4-羟基肉硅酸（HCCA），按说明书配制，或用市售商品。

4.3.5 灭菌甘油：取甘油适量，121℃高压灭菌20 min。

4.4 培养基制备

4.4.1 Cary-Blair 氏运送培养基：按照附录A中A.1的规定执行。

4.4.2 TSA培养基（含0.1%NAD+胎牛血清）：按照A.2的规定执行。

4.4.3 TSB培养基（含0.1%NAD+胎牛血清）：按照A.3的规定执行。

4.4.4 5%蔗糖脱脂乳保护剂：按照A.4的规定执行。

4.5 标准菌株

副猪嗜血杆菌（*Haemophilus parasuis*）[CVCC 3894 /CVCC 3721/ATCC 19417]。

4.6 材料

4.6.1 生化鉴定试剂盒或鉴定。

4.6.2 细菌DNA提取试剂盒。

4.6.3 卡磁珠保藏管。

4.6.4 脱脂牛奶。

4.6.5 0.22 μm无菌滤膜。

5 仪器设备

5.1 二级生物安全柜。

5.2 冰箱：2℃～8℃，-20℃或以下。

5.3 分析天平：感量0.01 g。

5.4 移液器：0.5 µL～1000 µL。

5.5 恒温培养箱。

5.6 微生物生化鉴定系统。

5.7 PCR仪。

5.8 高速冷冻离心机：离心速度≥12000 r/min。

5.9 核酸电泳仪。

5.10 电泳凝胶成像分析系统。

5.11 荧光定量PCR仪。

5.12 微生物质谱仪（MALDI-TOF MS）。

5.13 显微镜：10×~100×。

6 分离鉴定程序

分离与鉴定程序见图1。

猪鼻腔拭子、肺脏、心包液、胸腔积液、

腹腔积液、关节液、脑脊液等

接种TSA平板，36℃培养24 h～48 h

挑取单个可疑菌落，TSA平板纯化

副猪嗜血杆菌

PCR鉴定

微生物质谱鉴定

形态学检查

荧光定量PCR鉴定

生化鉴定

卫星生长现象试验

图1 副猪嗜血杆菌分离鉴定程序

7 样品采集与保存运输

样品采集与保存运输按照NY/T 4141的规定执行。

8 分离纯化

无菌取鼻腔拭子、肺脏等样品涂布TSA培养基（含0.1%NAD+胎牛血清）1/4范围，用接种环划线，36℃（±1℃）培养24 h～48 h；用接种环蘸取心包液、胸腔积液、腹腔积液、关节液、脑脊液等样品划线接种于TSA培养基（含0.1%NAD+胎牛血清），36℃（±1℃）培养24 h～48 h。

挑取单个圆形、光滑湿润、颜色灰白、边缘整齐、透明或半透明的针尖大小可疑菌落，接种TSA培养基（含0.1%NAD+胎牛血清），36℃（±1℃）培养24 h～48 h，纯化，备用。

9 筛查与鉴定

9.1 筛查

9.1.1 形态学检查

取纯化菌落，按照GB/T 34750规定执行。

9.1.2 卫星生长现象试验

取纯化菌落，按照GB/T 34750规定执行。

9.2 鉴定

9.2.1 通则

生化鉴定、PCR鉴定、荧光定量PCR鉴定和质谱鉴定4种方法任选其一。

9.2.2 生化鉴定

按照GB/T 34750规定执行，也可以使用生化鉴定试剂盒、鉴定卡或微生物生化鉴定系统鉴定。

9.2.3 PCR鉴定

9.2.3.1 模板制备

取新鲜的纯化菌落，加灭菌水0.5 mL，煮沸10 min，冰浴冷却，12000 r/min离心2 min。取上清液，备用。或使用细菌DNA提取试剂盒提取DNA作为模板。副猪嗜血杆菌标准菌株作为阳性对照，水为阴性对照。

9.2.3.2 引物

引物序列及扩增片段长度见表1。

表1 副猪嗜血杆菌的PCR引物序列及扩增片段长度

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **细菌** | **引物序列** | **扩增片段长，bp** |
| 副猪嗜血杆菌 | 上游引物（16S RNA-F）：5’-GTG ATG AGG AAG GGT GGT GT-3’  下游引物（16S RNA-R）：5’-GGC TTC GTC ACC CTC TGT-3’ | 821 |

9.2.3.3 反应体系

反应体系（20 μL）见表2。

表2 PCR反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积，μL** |
| 2×PCR Master Mix | 10 |
| 上游引物（10 μmol/L） | 1 |
| 下游引物（10 μmol/L） | 1 |
| 水（ddH2O） | 7 |
| 模板 | 1 |

9.2.3.4 反应条件

94℃预变性5 min；94℃变性10 s，59℃退火10 s，72℃延伸1 min，30个循环；72℃延伸10 min。

9.2.3.5 电泳

取PCR扩增产物，于1.2%的琼脂糖凝胶中电泳，凝胶成像分析。

9.2.3.6 结果判定

阳性菌扩增条带大小约821 bp。阳性扩增产物需测序比对鉴定，相似度不低于98%。副猪嗜血杆菌标准菌的PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果和正向引物测序结果见附录B中B.1和B.2。

9.2.4 荧光定量PCR鉴定

9.2.4.1 模板制备

按9.2.3.1执行。

9.2.4.2 引物

荧光定量PCR引物序列见表3。

表3 副猪嗜血杆菌的荧光定量PCR引物序列

|  |  |
| --- | --- |
| **细菌** | **引物序列** |
| 副猪嗜血杆菌 | 上游引物（16S RNA-F）：5’-AGT AGC AGC TGA CGA TGG CGT AAT-3’  下游引物（16S RNA-R）：5’-TCT ACA CGC TCT GGG TTT GCT TCT-3’ |

9.2.4.3 反应体系

荧光定量PCR反应体系（25 μL）见表4。避光条件下配置。

表4 PCR反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积，μL** |
| 2×SYBR Real-Time PCR Master Mix | 12.5 |
| 上游引物（10 μmol/L） | 0.5 |
| 下游引物（10 μmol/L） | 0.5 |
| 水（ddH2O） | 10.5 |
| 模板 | 1.0 |

9.2.4.4 反应条件

95℃预变性3 min；95℃变性15 s，58℃退火20 s，72℃延伸15 s，40个循环，每个循环结束时收集荧光。

9.2.4.5 质控要求

质控应符合：

——阳性对照Ct值≤29.0，且有特定扩增曲线；

——阴性对照Ct值＞32.0或无，且无特定扩增曲线；

荧光定量PCR扩增曲线见附录C。

9.2.4.6 结果判定

9.2.4.6.1 阳性

Ct值≤29.0，有特定扩增曲线。

9.2.4.6.2 阴性

Ct值＞32.0或无，无特定扩增曲线。

9.2.4.6.3 可疑

29.0＜Ct值≤32.0，有特定扩增曲线需复核，按复核结果判定。

9.2.5 质谱鉴定

9.2.5.1 菌样制备

挑取单个新鲜纯化菌落，均匀涂布于靶板样品孔中，室温干燥。吸取1 µL基质溶液滴于样品上，混匀，室温干燥。标准菌株的新鲜菌落同法操作。

9.2.5.2 仪器校准

检测样品前，应对微生物质谱仪进行校准。

9.2.5.3 测定

取制备好的样品靶板，置质谱仪靶板槽中。编辑样品信息后，进行谱图的数据采集。

9.2.5.4 结果判定

微生物质谱仪自动完成谱图的比对和鉴定。以不同分值显示结果，鉴定分值达到种水平可信即可。副猪嗜血杆菌质谱图谱见附录D。

10 菌株保藏

取新鲜纯化菌，加无菌生理盐水制成菌悬液，与灭菌甘油溶液混合，使甘油终浓度为20%~40%；或加入磁珠保藏管；或加入5%蔗糖脱脂乳保护剂，冻干。-20℃或以下保藏。

11 生物安全要求

实验室设施设备、人员防护及实验的安全操作、实验废弃物和菌种的处理应符合GB 19489和NY/T 1948的要求。

附 录 A

（规范性）

培养基

A.1 Cary-Blair 氏运送培养基

A.1.1 成分

|  |  |
| --- | --- |
| 硫乙醇酸钠 | 1.5 g |
| 磷酸氢二钠 | 1.1 g |
| 氯化钠 | 5.0 g |
| 琼脂 | 5.0 g |
| 氯化钙 | 0.09 g |
| 水 | 1000 mL |

A.1.2 制法

将A.1.1中各成分加入水中，混匀，加热煮沸至完全溶解，调节pH至8.4±0.2，121℃高压灭菌15 min，备用。

A.2 TSA培养基（含0.1%NAD+胎牛血清）

A.2.1 基础液

|  |  |
| --- | --- |
| 胰蛋白胨 | 15.0 g |
| 大豆胨 | 5.0 g |
| 氯化钠 | 5.0 g |
| 琼脂 | 15 .0 g |
| 水 | 1000 mL |

将A.2.1中各成分加入水中，混匀，调节pH值至7.3±0.2，121℃高压灭菌15 min。冷却至55℃~65℃，备用。

A.2.2 制法

|  |  |
| --- | --- |
| 基础液 | 1000 mL |
| 胎牛血清 | 50 mL |
| NAD溶液 | 10 mL |

将各成分混匀，倾注平板，备用。

A.3 TSB培养基（含0.1%NAD+胎牛血清）

A.3.1 基础液

|  |  |
| --- | --- |
| 胰蛋白胨 | 17.0 g |
| 大豆蛋白胨 | 3.0 g |
| 氯化钠 | 5.0 g |
| 磷酸氢二钾 | 2.5 g |
| 葡萄糖 | 2.5 g |
| 水 | 1000 mL |

将A.3.1中各成分加入水中，混匀，调节pH值至7.3±0.2，121℃高压灭菌15 min，备用。

A.3.2 制法

|  |  |
| --- | --- |
| 基础液 | 1000 mL |
| 胎牛血清 | 50 mL |
| NAD溶液 | 10 mL |

将各成分混匀，备用。

A.4 5%蔗糖脱脂乳保护剂

A.4.1 成分

|  |  |
| --- | --- |
| 脱脂乳 | 10.0 g |
| 蔗糖 | 5.0 g |
| 水 | 100 mL |

A.4.2 制法

将A.4.1中各成分混匀，112℃高压灭菌20 min，备用。

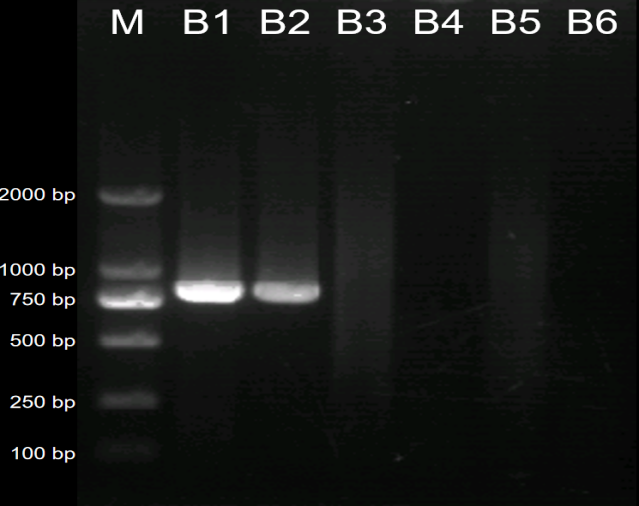
附 录 B

（资料性）

副猪嗜血杆菌PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果和测序结果

B.1 PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果

见图B.1。



标引序号说明：

M--2000 bp DNA Marker；

B1--阳性对照（副猪嗜血杆菌CVCC 3894）；

B2--副猪嗜血杆菌分离株；

B3--胸膜肺炎放线杆菌（ATCC 27090）；

B4--巴氏杆菌（CVCC 2083）；

B5--肺炎链球菌（ATCC 49619）；

B6--为空白对照（水）。

图B.1 副猪嗜血杆菌PCR产物电泳图

B.2 目标片段测序结果

见如下。

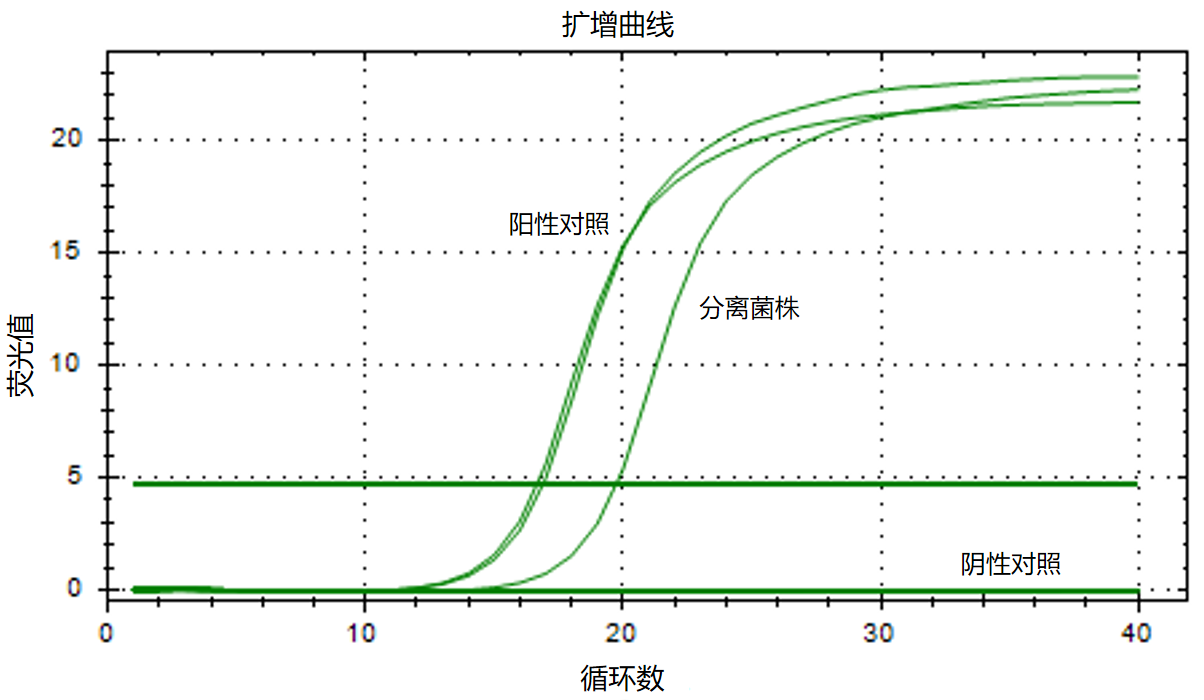
CACTTACTTGACGTTAGTCACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCACGCAGGCGGTGACTTAAGTGAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTTCATACTGGGTTGCTAGAGTATTTTAGGGAGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAGCCCCTTGGGAAAATACTGACGCTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGCTGTCGATTTGGGGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGCCCGTAGCTAACGTGATAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCTAAGAAGAACTCAGAGATGAGTTTGTGCCTTCGGGAACTTAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACATGGTCTACAGGGGGGGGGGGGGGCCACAAACCCAACAAGCCGGGGGGGGGAGCCGGGGGCCCCAGAGGCCCCGGAGGGGGCAAAACCCCACCATGGGGAGTTTTTTTTTGGGGAGGGCAAGGGGAGGGTAGGGGTCTTTCGGGGTGGAACGGAATTAAAACCCCATGGCTCCCCCGGGCTGGGGGGGGGCCCCCGTCAATTCATTTGGAGTTTTAACCTTGGGGGGCGGACTCCCCCAGGGGGGCGGATTTATCACGGTAGGCTACCGGG

附 录 C

（资料性）

副猪嗜血杆菌荧光定量PCR扩增曲线

荧光定量PCR扩增曲线见图C.1。



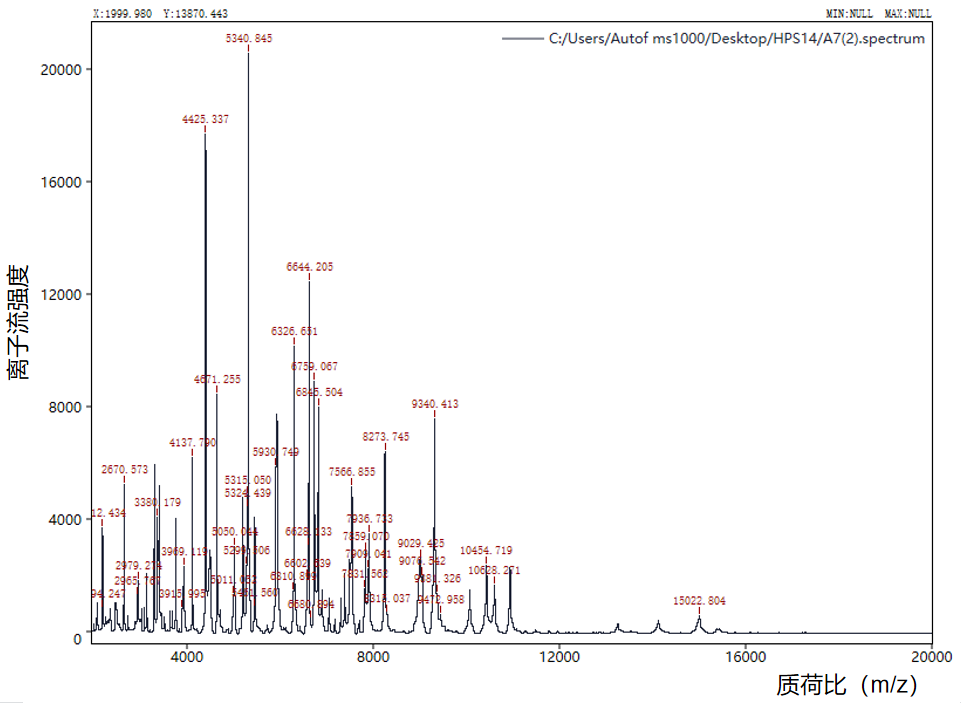
图C.1 副猪嗜血杆菌荧光定量PCR扩增曲线

附 录 D

（资料性）

副猪嗜血杆菌标准菌株质谱鉴定谱图

质谱鉴定谱图见图D.1。



图D.1 副猪嗜血杆菌标准菌株质谱鉴定谱图

