



中华人民共和国国家标准

GB/T 19915.2—2005

猪链球菌 2 型分离鉴定操作规程

Methods for detection of *Streptococcus suis* type 2

2005-09-27 发布

2005-11-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

猪链球菌 2 型是链球菌属的成员,其致病菌株可致猪链球菌病,引起猪败血症、脑膜炎等。人可通过伤口感染该菌,并导致发病和死亡。建立准确、可靠的检测方法是诊断、控制和预防该菌引致的猪链球菌病的迫切要求。本标准是采用经典的细菌学鉴定方法并结合现代分子生物学技术制定的。

本标准的附录 A 为资料性附录,附录 B 为规范性附录。

本标准由国家标准化管理委员会提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准由南京农业大学、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局和中国检验检疫科学院负责起草。

本标准主要起草人:陆承平、姚火春、陈国强、张敬友、张常印、唐泰山、姜焱、王凯民、林祥梅、韩雪清、吴绍强、刘建、贾广乐、梅琳。

本标准为首次发布。

猪链球菌 2 型分离鉴定操作规程

1 范围

本标准规定了猪链球菌 2 型分离鉴定的操作方法。

本标准适用于猪及其产品中猪链球菌 2 型的分离鉴定,也可用于送检菌株的鉴定。

2 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,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.28 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19915.3 猪链球菌 2 型 PCR 定型检测技术

GB/T 19915.4 猪链球菌 2 型三重 PCR 检测方法

GB/T 19915.5 猪链球菌 2 型多重 PCR 检测方法

GB/T 19915.7 猪链球菌 2 型荧光 PCR 检测方法

GB/T 19915.8 猪链球菌 2 型毒力因子荧光 PCR 检测方法

GB/T 19915.9 猪链球菌 2 型溶血素基因 PCR 检测方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

猪链球菌 2 型 *Streptococcus suis* type 2

猪链球菌是属于链球菌属的一种细菌,根据其荚膜多糖抗原的差异,可分为 1~34 及 1/2 共 35 个血清型。猪链球菌 2 型是猪链球菌的一个血清型,不仅对猪致病性很强,而且可以感染特定的人群,是一种重要的人畜共患病原菌。

4 操作规程

4.1 方法概要

检验程序的流程示意图见附录 A(资料性附录)。

4.2 试剂和材料

除另有规定,所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682—1992 的蒸馏水。

各种培养基的制备方法见附录 B(规范性附录)。

4.3 仪器和设备

4.3.1 匀质器和匀质杯。

4.3.2 天平:称量范围 0 g~1 000 g,读数精度 0.1 g。

4.3.3 培养箱:36℃±1℃。

4.3.4 恒温水浴锅。

4.4 步骤

4.4.1 样品采集

对病猪,最急性和急性病例可无菌采集死亡猪的心、肝、肺、肾、脾脏、淋巴结等组织,慢性病例如关节炎型一般采取关节液及周围组织;对活猪可采取扁桃体拭子、鼻腔拭子。

4.4.2 分离培养

4.4.2.1 送检菌株的分离

划线接种于普通琼脂绵羊血平板, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, 如菌落生长缓慢, 可延长至 $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, 使之形成单个菌落, 以供鉴定用。

4.4.2.2 病料的分离和触片检查

用经火焰灭菌并冷却的接种环蘸取病料内部组织后划线接种于普通琼脂绵羊血平板, 于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, 如菌落生长缓慢, 可延长至 $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ 后观察。同时取病料做组织触片, 姬姆萨染色(按 GB/T 4789.28 的方法进行染色)后镜检, 如见球菌则表明病料中可能含有链球菌。

4.4.2.3 扁桃体和鼻腔拭子的分离

扁桃体和鼻腔拭子样品加入到含有 5 mL 灭菌的选择性 THB 增菌液(见第 B.4 章)的试管中, 于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ 后, 划线接种于选择性普通琼脂绵羊血平板(见第 B.2 章)。

4.4.2.4 动物产品的均质、增菌和分离

以无菌操作取检样 25 g, 加入装有 225 mL 灭菌选择性 THB 增菌液(见第 B.4 章)的广口瓶内, 均质, 于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ 后, 划线接种于选择性普通琼脂绵羊血平板(见第 B.2 章)。

4.4.3 初步鉴定

猪链球菌 2 型在 37°C 培养 24 h 后, 在普通琼脂绵羊血平板和选择性普通琼脂绵羊血平板上形成圆形、微凸、表面光滑、湿润、边缘整齐、半透明的菌落, 直径约 0.3 mm~1 mm, 大多数菌株呈 α 溶血, 部分菌株产生 β 溶血。

将可疑菌落做革兰氏染色和过氧化氢酶试验。本菌为革兰氏阳性球菌, 菌体直径约 1 μm , 固体培养物以双球菌为多, 少量呈 3 个~5 个排列的短链, 液体培养物以链状为主, 无芽孢, 能形成荚膜(按 GB/T 4789.28 的方法进行染色)。本菌过氧化氢酶试验均为阴性。

菌落生长特征、革兰氏染色、菌体形态和过氧化氢酶试验符合者, 可初步确定为链球菌。

4.4.4 生化鉴定

经初步鉴定后, 做 5% 乳糖、海藻糖、七叶苷、甘露醇、山梨醇、马尿酸钠等糖发酵试验。猪链球菌 2 型发酵 5% 乳糖和海藻糖产酸, 发酵七叶苷, 不发酵甘露醇和山梨醇, 不水解马尿酸钠。

或应用法国生物-梅里埃公司 API20 Strep 生化鉴定系统进行生化鉴定。

4.4.5 玻片凝集试验

将可疑菌落接种 THB 肉汤(见第 B.3 章), 于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, 取 1.5 mL 培养物, 经 10 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 用 100 μL 生理盐水将沉淀悬浮, 取 25 μL 菌体悬浮液分别和等体积的 25 μL 生理盐水、猪链球菌 2 型阳性血清作玻片凝集试验, 其中生理盐水作为稀释液对照并观察待检菌株是否有自凝现象。同时设阳性菌株对照。在生理盐水对照不凝集, 阳性菌株凝集的情况下, 待检菌株出现凝集为阳性反应。

4.4.6 猪链球菌 2 型定型 PCR 检测

见 GB/T 19915.3。

4.4.7 猪链球菌 2 型毒力因子 PCR 检测

必要时进行猪链球菌 2 型毒力因子 PCR 检测。PCR 检测方法见 GB/T 19915.4, GB/T 19915.5, GB/T 19915.7, GB/T 19915.8, GB/T 19915.9。

5 试验结果分析判定

5.1 符合以下特性者应判为猪链球菌 2 型:

- 猪链球菌 2 型在 37℃ 培养 24 h 后,在普通琼脂绵羊血平板和选择性普通琼脂绵羊血平板上形成圆形、微凸、表面光滑、湿润、边缘整齐、半透明的菌落,直径约 0.3 mm~1 mm,大多数菌株呈 α 溶血,部分菌株产生 β 溶血;
- 革兰氏阳性球菌,单个、成对或成链存在;
- 过氧化氢酶试验阴性;
- 发酵 5% 乳糖和海藻糖产酸,发酵七叶苷,不发酵甘露醇和山梨醇,不水解马尿酸钠(本试验项目具有不确定性,鉴定时供参考),或法国生物-梅里埃公司 API20 Strep 生化鉴定系统鉴定为猪链球菌 2 型者;
- 与猪链球菌 2 型阳性血清玻片凝集试验阳性;
- 猪链球菌 2 型定型 PCR 检测阳性。

5.2 符合以下特性者的菌株可判定为致病性猪链球菌 2 型菌株:

- 符合 5.1 的特性;
- 主要毒力基因(*mrp*、*ef*、*orf2*、*sly*)全部或之一 PCR 检测阳性。

6 废弃物处理和防止污染的措施

检测过程中的废弃物,应收集后高压灭菌处理。

附录 A
(资料性附录)
猪链球菌 2 型检验程序

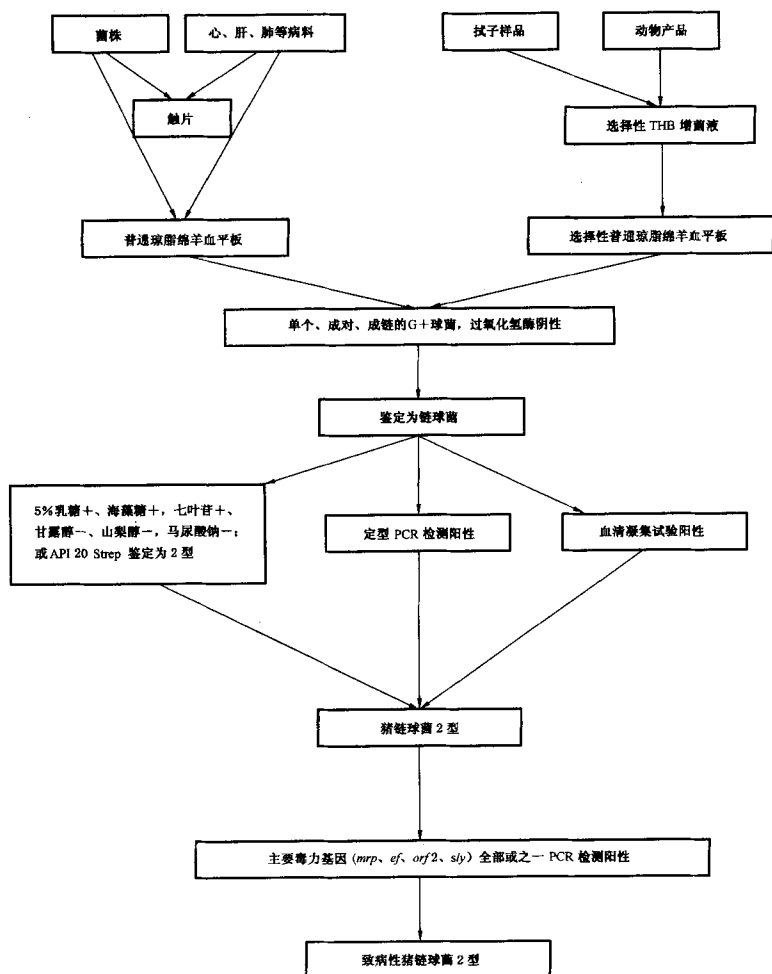


图 A.1 猪链球菌 2 型检验程序

附 录 B
(规范性附录)
各种培养基的配制方法

B.1 普通琼脂绵羊血平板

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
脱纤维无菌绵羊血	50 mL

除无菌绵羊血外,混匀,加热溶解,调 pH 至 7.6 分装,115℃灭菌 15 min,冷却至 45℃加入 5%无菌脱纤维绵羊血倾注灭菌平板。

B.2 选择性普通琼脂绵羊血平板

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
无菌羊血	50 mL
叠氮钠	0.4 g
结晶紫	0.000 4 g
亚硫酸钠	0.2 g

除无菌绵羊血和结晶紫外,混匀,加热溶解,调 pH 至 7.6 分装,加入结晶紫(可配成适当溶液),115℃灭菌 15 min,冷却至 46℃加入 5%无菌脱纤维绵羊血,混匀,倾注灭菌平板。

B.3 Todd-Hewitt 肉汤(简称 THB)

牛肉膏	5.0 g
胰蛋白胨	20.0 g
葡萄糖	2.0 g
碳酸钠	2.5 g
氯化钠(NaCl)	2.0 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	0.4 g;或十二水合磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)1.0 g
蒸馏水	1 000 mL

将以上各成分混合煮沸,完全溶化,冷却至室温后,调 pH,于 115℃灭菌 10 min,最终 pH 为 7.8。

B.4 选择性 Todd-Hewitt 肉汤(简称选择性 THB)

牛肉膏	5.0 g
-----	-------

胰蛋白胨	20.0 g
葡萄糖	2.0 g
碳酸钠	2.5 g
氯化钠(NaCl)	2.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	0.4 g; 或十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)1.0 g
叠氮钠	0.4 g
结晶紫	0.000 4 g
亚硫酸钠	0.2 g
蒸馏水	1 000 mL

将以上各成分(结晶紫除外)混合煮沸,完全溶化,冷却至室温后,调 pH,加入结晶紫(可配成适当溶液),于 115℃灭菌 10 min,最终 pH 为 7.8。
