

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 564—2016

代替 NY/T 564—2002

猪巴氏杆菌病诊断技术

Diagnostic techniques for swine pasteurellosis

2016-10-26 发布

2017-04-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 NY/T 564—2002《猪巴氏杆菌病诊断技术》。与 NY/T 564—2002 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- “范围”部分增述了多杀性巴氏杆菌定种的 PCR 鉴定方法和荚膜定型的多重 PCR 鉴定方法的适用性(见 1);
- “临床诊断”及“病理剖检”部分参照《兽医传染病学》(陈溥言主编)中相关描述进行了修改(见 2 和 3);
- “病原分离”部分删除了不适宜多杀性巴氏杆菌生长的麦康凯琼脂培养基,并将改良马丁琼脂培养基和马丁肉汤培养基改为更适宜多杀性巴氏杆菌生长的胰蛋白大豆琼脂培养基和胰蛋白大豆肉汤培养基(见 4.1.1.1);
- 新增了定种 PCR 鉴定方法(见 4.4);
- “荚膜血清型鉴定”部分在原有的间接血凝试验(Carter 氏荚膜定型法)的基础上又新增了另一种选择——多重 PCR 荚膜定型法,并对多杀性巴氏杆菌间接血凝试验程序表也进行了完善(见 4.5.1.3 和 4.5.2);
- “附录 A”部分增添了胰蛋白大豆琼脂培养基(TSA)和胰蛋白大豆肉汤培养基(TSB)的制备方法(见附录 A.6 和 A.7)。

本标准由农业部兽医局提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国兽医药品监察所。

本标准起草人:蒋玉文、张媛、李建、李伟杰、魏财文。

本标准的历次版本发布情况为:

- NY/T 564—2002。

猪巴氏杆菌病诊断技术

1 范围

本标准规定了猪巴氏杆菌病诊断的技术要求。

本标准所规定的临床诊断、病理剖检和病原分离鉴定,适用于猪巴氏杆菌病的诊断。定种 PCR 适用于多杀性巴氏杆菌种的鉴定;间接血凝试验、荚膜定型多重 PCR 适用于多杀性巴氏杆菌荚膜血清型的鉴定;琼脂扩散沉淀试验适用于多杀性巴氏杆菌菌体血清型的鉴定。

2 临床诊断

潜伏期 1 d~5 d。临诊上,一般分为最急性型、急性型和慢性型 3 种形式。

2.1 最急性型

2.1.1 突然发病,迅速死亡。

2.1.2 体温升高($41^{\circ}\text{C}\sim 42^{\circ}\text{C}$),食欲废绝,全身衰弱,卧地不起,焦躁不安,呼吸困难,心跳加快。

2.1.3 颈下咽喉部发热、红肿、坚硬,严重者向上延至耳根,向后可达胸前。呼吸极度困难,常做犬坐姿势,伸长头颈呼吸,有时发出喘鸣声,口、鼻流出泡沫。

2.1.4 可视黏膜发绀,腹侧、耳根和四肢内侧皮肤出现红斑。

2.1.5 病程 1 d~2 d。

2.2 急性型

2.2.1 体温升高($40^{\circ}\text{C}\sim 41^{\circ}\text{C}$),咳嗽,呼吸困难,鼻流黏稠液混有血液,触诊胸部有剧烈的疼痛,听诊有啰音和摩擦音,张口吐舌,犬坐姿势。

2.2.2 皮肤有瘀血和小出血点,可视黏膜蓝紫,常有黏脓性结膜炎。

2.2.3 初便秘,后腹泻。

2.2.4 心脏衰竭,心跳加快。

2.2.5 病程 5 d~8 d。

2.3 慢性型

2.3.1 持续性咳嗽,呼吸困难,鼻流少许黏脓性分泌物。

2.3.2 出现痂样湿疹。

2.3.3 关节肿胀。

2.3.4 食欲不振,进行性营养不良,泻痢,极度消瘦。

3 病理剖检

3.1 最急性型

3.1.1 皮肤有红斑;切开颈部皮肤时,可见大量胶冻样蛋黄或灰青色纤维素性黏液;咽喉部及其周围结缔组织出血性浆液浸润;全身黏膜、浆膜和皮下组织有大量出血点;水肿可自颈部蔓延至前肢。

3.1.2 全身淋巴结出血,切面红色。

3.1.3 心外膜和心包膜有小出血点。

3.1.4 肺急性水肿。

3.1.5 脾有出血,但不肿大。

3.1.6 胃肠黏膜有出血性炎症变化。

3.2 急性型

3.2.1 胸腔及心包积液；胸腔淋巴结肿胀，切面发红，多汁；全身黏膜、浆膜实质器官和淋巴结出血性病理变化。

3.2.2 纤维素性肺炎，肺有不同程度的肝变区，周围伴有水肿和气肿，病程长的肝变区内还有坏死灶，肺小叶间浆液浸润，切面呈大理石样纹理；胸膜常有纤维素性附着物，严重的胸膜与病肺粘连。

3.2.3 支气管、气管内含有大量泡沫状黏液，黏膜发炎。

3.3 慢性型

3.3.1 肺肝变区扩大并有黄色或灰色坏死灶，外面有结缔组织包裹，内含干酪样物质，有的形成空洞并与支气管相通。

3.3.2 心包与胸腔积液，胸腔有纤维素性沉着。

3.3.3 肋膜肥厚，与病肺粘连；在肋间肌、支气管周围淋巴结、纵隔淋巴结以及扁桃体、关节和皮下组织可见有坏死灶。

4 病原分离鉴定

4.1 病原分离

4.1.1 材料

4.1.1.1 培养基

胰蛋白大豆琼脂培养基(TSA, 配制见 A. 6)、胰蛋白大豆肉汤培养基(TSB, 配制见 A. 7)。

4.1.1.2 试剂

绵羊脱纤血、绵羊裂解血细胞全血、健康动物血清。

4.1.2 器材

二级生物安全柜、恒温培养箱(37℃)。

4.1.3 操作

猪濒死或死亡后，无菌采取病死猪的心血或肝脏组织，接种含4%健康动物血清的TSB，置35℃~37℃培养16h~24h。取TSB培养物划线接种含0.1%绵羊裂解血细胞全血和4%健康动物血清的TSA平板，置35℃~37℃培养16h~24h。挑取在TSA平板上生长的光滑圆整的单个菌落传代接种含0.1%绵羊裂解血细胞全血和4%健康动物血清的TSA平板，置35℃~37℃培养16h~24h，获得纯培养物。

4.2 病原鉴定

4.2.1 材料

4.2.1.1 待检样品

分离的细菌纯培养物。

4.2.1.2 培养基

培养基质量满足GB/T 4789.28规定的要求，按附录A方法配制改良马丁琼脂(配制方法见A.4)、马丁肉汤(配制方法见A.5)、麦康凯琼脂(配制方法见A.13)、运动性试验培养基(配制方法见A.8)。

4.2.1.3 试剂

葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、甘露醇、鼠李糖、戊醛糖、纤维二糖、棉子糖、菊糖、赤藓糖、戊五醇、M-肌醇、水杨苷糖发酵小管(配制方法见A.10)、吲哚试剂(配制方法见A.11)、氧化酶试剂(配制方法见A.12)、绵羊脱纤血、绵羊裂解血细胞全血、健康动物血清、革兰氏染色液、瑞氏染色液、1%蛋白胨水(制

备方法见 A.9)。

4.2.2 器材

二级生物安全柜、显微镜、恒温培养箱(37℃)。

4.2.3 镜检样品的制备

取病变组织肝或脾的新鲜切面在载玻片上压片或涂抹成薄层;用灭菌剪刀剪开心脏,取血液进行推片,或取凝血块新鲜切面在载玻片上压片或涂抹成薄层;培养纯化的细菌从菌落挑取少量涂片。

4.2.4 病原鉴定

4.2.4.1 培养特性

4.2.4.1.1 多杀性巴氏杆菌为兼性厌氧菌,最适生长温度为 35℃~37℃。在改良马丁琼脂平皿(含有 0.1%绵羊裂解血细胞全血及 4%健康动物血清)上有单个菌落,肉眼观察光滑圆整,直径 2 mm~3 mm,半透明,呈微蓝色。在低倍显微镜 45°折光下观察,有虹彩,可见蓝绿色荧光(Fg 菌落型)或橘红色荧光(Fo 菌落型)。

4.2.4.1.2 改良马丁琼脂斜面生长純粹的培养物,呈微蓝色菌苔或菌落。

4.2.4.1.3 马丁肉汤培养物呈均匀混浊,不产生菌膜。

4.2.4.1.4 麦康凯琼脂平皿上不生长。

4.2.4.1.5 含 10%绵羊脱纤血的改良马丁琼脂平皿上生长的菌落不出现溶血。

4.2.4.2 显微镜鉴定

4.2.4.2.1 样品的干燥和固定:挑取菌落,涂于载玻片,采用甲醇固定或火焰固定。

4.2.4.2.2 染色及镜检:甲醇固定的镜检样品进行瑞氏或美蓝染色。镜检时,多杀性巴氏杆菌呈两极浓染的菌体,常有荚膜。火焰固定的镜检样品进行革兰氏染色,镜检时多杀性巴氏杆菌为革兰氏阴性球杆菌或短杆菌,菌体大小为(0.2~0.4) μm ×(0.6~2.5) μm ,单个或成对存在。

4.2.4.3 生化鉴定特性

4.2.4.3.1 接种于葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖和甘露醇发酵管产酸而不产气。接种于鼠李糖、戊醛糖、纤维二糖、棉子糖、菊糖、赤藓糖、戊五醇、M-肌醇、水杨苷发酵管不发酵。

4.2.4.3.2 接种于蛋白胨水培养基中,可产生吡啶。

4.2.4.3.3 产生过氧化氢酶、氧化酶,但不能产生尿素酶、 β -半乳糖苷酶。

4.2.4.3.4 维培(VP)试验为阴性。

4.3 毒力测定

4.3.1 材料

4.3.1.1 待检样品

从病料中分离的细菌纯培养物。

4.3.1.2 培养基

马丁肉汤。

4.3.1.3 试验动物

18 g~22 g 小白鼠。

4.3.2 器材

二级生物安全柜、恒温培养箱。

4.3.3 操作

取马丁肉汤 24 h 培养物,用马丁肉汤稀释为 1 000 CFU/mL,皮下注射 18 g~22 g 小鼠 4 只,每只 0.2 mL;另取相同条件小鼠 2 只,每只皮下注射马丁肉汤 0.2 mL 作为阴性对照。

4.3.4 结果判定

观察 3 d~5 d, 阴性对照组小鼠全部健活试验方成立。注射细菌培养物组小鼠全部死亡者为阳性。

4.4 培养物定种 PCR 鉴定

4.4.1 材料

4.4.1.1 待检样品

从病料中分离的细菌纯培养物。

4.4.1.2 试剂的一般要求

除特别说明以外, 本方法中所用试剂均为分析纯级, 水为符合 GB/T 6682 规定的灭菌双蒸水或超纯水。

4.4.1.3 电泳缓冲液(TAE)

50×TAE 储存液和 1×TAE 使用液(配制方法见 A.14)。

4.4.1.4 1.5% 琼脂糖凝胶

将 1.5 g 琼脂糖干粉加到 100 mL TAE 使用液中, 沸水浴或微波炉加热至琼脂糖熔化, 待凝胶稍冷却后加入溴化乙锭替代物, 终浓度为 0.5 μg/mL。

4.4.1.5 PCR 配套试剂

10×PCR Buffer、dNTPs、Taq 酶、DL 2 000 DNA Marker。

4.4.1.6 PCR 引物

根据 *kmt I* 基因序列设计、商业合成, 引物序列见表 B.1。

4.4.1.7 阳性对照

多杀性巴氏杆菌。

4.4.1.8 阴性对照

除多杀性巴氏杆菌外的其他细菌。

4.4.2 器材

二级生物安全柜、制冰机、高速离心机、水浴锅、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪。

4.4.3 样品处理

对分离鉴定和纯培养的细菌液体培养样品, 直接保存于无菌 1.5 mL 塑料离心管中, 密封, 编号, 保存, 送检。

4.4.4 基因组 DNA 的提取

下列方法任择其一, 在提取 DNA 时, 应设立阳性对照样品和阴性对照样品, 按同样的方法提取 DNA。

- 取 1 个~2 个纯培养的单菌落加入 100 μL 无菌超纯水中, 混匀, 沸水浴 10 min, 冰浴 5 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 上清作为基因扩增的模板。
- 取纯培养的单菌落接种含 0.1% 绵羊裂解血细胞全血的马丁肉汤, (37±1)℃ 过夜培养, 取 1.0 mL 菌液加入 1.5 mL 离心管, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 加入 100 μL 无菌超纯水, 反复吹吸重悬, 沸水浴 10 min, 冰浴 5 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 上清作为基因扩增的模板。

4.4.5 反应体系及反应条件

4.4.5.1 对 4.4.4 提取的 DNA 进行扩增, 每个样品 50 μL 反应体系, 见表 C.1。

4.4.5.2 样品反应管瞬时离心, 置于 PCR 扩增仪内进行扩增。95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 结束反应。同时设置阳性对照及阴性对照。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 观察扩增产物条带大小。若不立即进行电泳, 可将 PCR 产物置于 -20℃ 冻存。

4.4.6 凝胶电泳

4.4.6.1 在 $1\times$ TAE 缓冲液中进行电泳,将 4.4.5.2 的扩增产物、DL 2 000 DNA Marker 分别加入 1.5%琼脂糖凝胶孔中,每孔加扩增产物 $10\ \mu\text{L}$ 。

4.4.6.2 $80\ \text{V}\sim 100\ \text{V}$ 电压电泳 30 min,在紫外灯或凝胶成像仪下观察结果。

4.4.7 结果判定

4.4.7.1 试验成立的条件

当阳性对照扩增出约 460 bp 的片段,阴性对照未扩增出片段时,试验成立。

4.4.7.2 阳性判定

符合 4.4.6.1 的条件,被检样品扩增出约 460 bp 的片段,则判定被检病原为多杀性巴氏杆菌。

4.4.7.3 阴性判定

符合 4.4.6.1 的条件,被检样品未扩增出约 460 bp 的片段,则判定被检细菌纯培养物不是多杀性巴氏杆菌。

4.5 培养物荚膜血清型鉴定

4.5.1 间接血凝试验(Carter 氏荚膜定型法)

4.5.1.1 材料

4.5.1.1.1 待检样品:从病料中分离的多杀性巴氏杆菌纯培养物。

4.5.1.1.2 多杀性巴氏杆菌荚膜定型血清:A 型、B 型、D 型多杀性巴氏杆菌荚膜定型血清。

4.5.1.1.3 试剂:含 0.3%甲醛溶液生理盐水、新鲜绵羊红细胞(配制见 D.2)、抗原致敏红细胞(配制见 D.3)。

4.5.1.2 器材

二级生物安全柜、恒温培养箱、水浴锅。

4.5.1.3 操作

4.5.1.3.1 将荚膜定型血清于 56°C 水浴 30 min,用含 0.3%甲醛溶液生理盐水做 5 倍稀释后再进行连续对倍稀释至第 8 管,每个稀释度取 0.2 mL 加到小试管。每种血清单独稀释成一排。

4.5.1.3.2 每支小试管加入抗原致敏红细胞 0.2 mL。

4.5.1.3.3 设对照组。

血清对照:血清(5 倍稀释)0.2 mL+新鲜红细胞 0.2 mL;

新鲜红细胞对照:新鲜红细胞 0.2 mL+含 0.3%甲醛溶液生理盐水 0.2 mL;

抗原对照:致敏红细胞 0.2 mL+含 0.3%甲醛溶液生理盐水 0.2 mL。

间接血凝试验程序,见表 1。

表 1 多杀性巴氏杆菌间接血凝试验程序

单位为毫升

反应物	1	2	3	4	5	6	7	8	抗原 对照	红细胞 对照	血清 对照
血清稀释倍数	5	10	20	40	80	160	320	640			5
含 0.3%甲醛 溶液生理盐水		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
血清	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2			0.2
1%致敏红细胞	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		
1%新鲜红细胞										0.2	0.2

4.5.1.3.4 充分振荡小试管后,置室温 1 h~2 h 判定结果。

4.5.1.4 结果判定

4.5.1.4.1 判定标准:每个试管按其管底红细胞的凝集现象分别记为“#”、“+++”、“++”、“+”及“—”。

“#”:红细胞凝集形成坚实的凝块,边缘不整齐。

“+++”:凝集的红细胞平铺管底,但有卷边或缺口。

“++”:凝集的红细胞平铺管底。

“+”:红血球凝集面积较小,有狭窄的增厚边缘或中心的红细胞凝集。

“—”:红细胞形成小的光滑圆盘。

4.5.1.4.2 试验成立的条件:当血清对照、新鲜红细胞对照、抗原对照均不出现凝集,且被检菌株抗原致敏红细胞仅与一种定型血清出现“++”或以上凝集时,试验成立。

4.5.1.4.3 阳性判定:符合 4.5.1.4.2 的条件,被检菌株抗原致敏红细胞与哪种定型血清出现“++”或以上凝集,即可判定被检菌株为该荚膜血清型。

4.5.1.4.4 阴性判定:符合 4.5.1.4.2 的条件,被检菌株抗原致敏红细胞与任一定型血清均未出现“++”或以上凝集,即可判定被检菌株为荚膜 A 型、荚膜 B 型和荚膜 D 型以外的其他荚膜血清型或不能定荚膜型的多杀性巴氏杆菌。

4.5.2 多重 PCR 荚膜定型法

4.5.2.1 材料

4.5.2.1.1 待检样品:从病料中分离的多杀性巴氏杆菌纯培养物。

4.5.2.1.2 通用试剂:4.4.1.2~4.4.1.5 的试剂适用于本方法。

4.5.2.1.3 阳性对照:荚膜 A 型、荚膜 B 型或荚膜 D 型多杀性巴氏杆菌。

4.5.2.1.4 阴性对照:荚膜 E 型或荚膜 F 型多杀性巴氏杆菌或除多杀性巴氏杆菌以外的其他细菌。

4.5.2.1.5 引物:根据编码多杀性巴氏杆菌 A 型、B 型和 D 型不同的基因设计引物,商业合成,序列见表 B.2。

4.5.2.2 器材

二级生物安全柜、PCR 仪、电泳仪和凝胶成像仪。

4.5.2.3 基因组 DNA 的提取

细菌基因组的提取同 4.4.4。

4.5.2.4 荚膜多重 PCR 反应体系及反应条件

4.5.2.4.1 每个样品建立 50 μ L 反应体系,见表 C.2。

4.5.2.4.2 反应管加入反应液后,瞬时离心,置于 PCR 扩增仪内进行扩增。95℃预变性 10 min,95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环,72℃延伸 10 min 结束反应。同时设置阳性对照及阴性对照。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,观察扩增产物条带大小。若不立即进行电泳,可将 PCR 产物置于 -20℃ 中冻存。

4.5.2.5 琼脂糖凝胶电泳

按 4.4.6 的方法进行。

4.5.2.6 结果判定

4.5.2.6.1 试验成立的条件:当荚膜 A 型阳性对照扩增出约 1 044 bp 的片段,荚膜 B 型阳性对照扩增出约 760 bp 的片段,荚膜 D 型阳性对照扩增出约 657 bp 的片段,阴性对照未扩增出片段时,试验成立。

4.5.2.6.2 阳性判定:符合 4.5.2.6.1 的条件,被检样品扩增出约 1 044 bp 的片段,判定为荚膜 A 型;扩增出约 760 bp 的片段,判定为荚膜 B 型;扩增出约 657 bp 的片段,判定为荚膜 D 型。

4.5.2.6.3 阴性判定:符合 4.5.2.6.1 的条件,被检样品若未扩增出 4.5.2.6.2 所描述的各片段,判定

为荚膜 A 型、荚膜 B 型和荚膜 D 型以外的其他荚膜血清型或不能定荚膜型的多杀性巴氏杆菌。

4.6 菌体血清型鉴定琼脂扩散沉淀试验(Heddleston 氏菌体定型法)

4.6.1 材料

4.6.1.1 待检样品

从病料中分离的多杀性巴氏杆菌纯培养物。

4.6.1.2 多杀性巴氏杆菌菌体定型血清

4.6.1.3 试剂

生理盐水、8.5%氯化钠溶液、优级琼脂(DIFCO)粉、1%硫柳汞溶液。

4.6.2 抗原制备

取一支改良马丁琼脂中管斜面 24 h 培养物,用 3 mL 生理盐水洗一下,置于 100℃ 水浴 1 h,4 000 r/min 离心 30 min,上清液即为琼脂凝胶免疫扩散试验抗原。

4.6.3 菌体血清型鉴定

取琼脂 1.0 g 加 8.5%氯化钠溶液 100 mL,加热溶化。溶化后再加 1 mL 1%硫柳汞,混合凉至 60℃ 左右,倒入平皿内,琼脂厚度 2.5 mm~3 mm,琼脂凝固后用 7 孔梅花形打孔器打孔。孔径 4 mm,孔与孔中心距离为 6 mm,中心孔加入被检抗原,外周 1 孔~5 孔加入定型血清,第 6 孔加入生理盐水为阴性对照。置于(37±1)℃ 孵育 24 h~48 h 判定结果。

4.6.4 结果判定

将琼脂板置于日光灯或侧强光下观察,抗原与生理盐水孔之间不出现沉淀线,则试验成立。抗原与标准定型血清之间出现明显的沉淀线,即判定该血清型为待检多杀性巴氏杆菌的菌体血清型。

5 诊断判定

5.1 疑似

符合第 2 章中咳嗽、呼吸困难等临床表征,且符合第 3 章中肺脏水肿、肝变或坏死等病理变化者,可判定为猪巴氏杆菌病疑似病例。

5.2 确诊

同时满足以下 3 个条件者,可确诊猪巴氏杆菌病病例:

- a) 符合 5.1 疑似病例的判定;
- b) 经 4.1、4.2 确定病原为多杀性巴氏杆菌;或 4.2 结果部分不符合,但 4.4 结果阳性;
- c) 4.3 结果阳性。

5.3 荚膜血清型鉴定

按 4.5.1.4 或 4.5.2.6 判定被检病原的荚膜血清型。

5.4 菌体血清型鉴定

按 4.6.4 判定被检病原的菌体血清型。

附 录 A
(规范性附录)
培养基的制备

A.1 牛肉汤的配制

将牛肉除去脂肪、筋膜,用绞肉机绞碎。肉和水按质量体积比 1:2 比例混合,搅拌均匀。用不锈钢或耐酸陶瓷双层锅加温至 65℃~75℃,保持 15 min,继续加热至沸腾,保持 1 h,全部过程均应不断搅拌。煮沸完成后,捞出肉渣,沉淀 30 min,抽上清液,经绒布滤过,将滤过的肉汤与从肉渣中压榨出的肉汤混合即成。制成的肉汤,即可与猪胃消化液(配制见 A.3)混合配制成马丁肉汤;或分装经 121℃灭菌 30 min~40 min,储存备用。制备少量肉汤时,也可采用将绞碎的牛肉在 2 倍体积的 4℃~8℃水中浸泡 12 h~24 h,再煮沸 30 min,过滤,分装灭菌后备用。

A.2 改良猪胃消化液

将猪胃除去脂肪,用绞肉机绞碎。碎猪胃 350 g 加 65℃左右温水 1 000 mL,并加盐酸 8.5 mL,放置于 51℃~55℃中消化 18 h~22 h。前 12 h 至少搅拌 6 次~10 次。待胃组织溶解,液体澄清,即表示消化良好;否则,可酌情延长消化时间。取出后全部倒入中性容器,并加氢氧化钠溶液,调成弱酸性,然后煮沸 10 min,使其停止消化。以粗布过滤后,即成。

A.3 猪胃消化液

将猪胃 300 g 除去脂肪,用绞肉机绞碎。加入 65℃左右 1 000 mL 温水混合均匀,再加入盐酸 10 mL,使 pH 为 1.6~2.0,保持消化液 51℃~55℃,消化 18 h~24 h。在消化过程的前 12 h 至少搅拌 6 次~10 次,然后静置。至胃组织溶解、液体澄清,表示消化完全。如消化不完全,可酌情延长消化时间。除去脂肪和浮物,抽清液煮沸 10 min~20 min,放缸内静置沉淀 48 h 或冷却到 80℃~90℃,加氢氧化钠使成弱酸性,经灭菌储存备用。

A.4 改良马丁琼脂

A.4.1 配方

牛肉汤(配制见 A.1)	500 mL
改良猪胃消化液(配制见 A.2)	500 mL
氯化钠	2.5 g
琼脂粉	12 g

A.4.2 制备方法

将牛肉汤、改良猪胃消化液、氯化钠和琼脂粉混合,加热溶解。待琼脂完全溶化后,以氢氧化钠溶液调整 pH 为 7.4~7.6。以卵白澄清或凝固沉淀法沉淀。分装于试管或中性玻璃瓶中,以 121℃灭菌 30 min~40 min。

A.5 马丁肉汤

A.5.1 配方

牛肉汤(配制见 A.1)	500 mL
--------------	--------

猪胃消化液(配制见 A. 3)	500 mL
氯化钠	2.5 g

A. 5.2 制备方法

将 A. 5.1 材料混合后,以氢氧化钠溶液调 pH 7.6~7.8,煮沸 20 min~40 min,补足失去的水分。冷却沉淀,抽取上清,经滤纸或绒布滤过,滤液应为澄清、淡黄色。按需要分装,经 121℃ 灭菌 30 min~40 min。pH 应为 7.2~7.6。

A. 6 胰蛋白大豆琼脂培养基(TSA)

A. 6.1 配方

胰蛋白胨	15 g
大豆蛋白胨	5 g
氯化钠	5 g
琼脂粉	15 g
去离子水	1 000 mL

A. 6.2 制备方法

将 A. 6.1 材料混合,加热溶解,调整 pH 7.1~7.5,滤过分装于中性容器中,121℃ 高压灭菌后备用。

A. 7 胰蛋白大豆肉汤培养基(TSB)

A. 7.1 配方

胰蛋白胨	15 g
大豆蛋白胨	5 g
氯化钠	5 g
去离子水	1 000 mL

A. 7.2 制备方法

将 A. 7.1 材料混合,加热溶解,调整 pH 7.1~7.5,滤过分装于中性容器中,121℃ 高压灭菌后备用。

A. 8 运动性试验培养基

将马丁肉汤(配制见 A. 5)1 000 mL、琼脂粉 3.5 g~4 g 混合加热溶解。121℃ 灭菌 40 min,置于室温保存备用。加热溶解琼脂粉,分装到内装有套管的试管中,以 121℃ 灭菌 30 min~40 min。

A. 9 1%蛋白胨水

A. 9.1 配方

蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

A. 9.2 制备方法

将 A. 9.1 材料混合,加热溶解,调整 pH 7.4。煮沸滤过,分装于中性容器中,121℃ 灭菌 20 min。

A. 10 糖发酵培养基

每种糖(或醇)按质量浓度为 1% 比例分别加入到装有 1% 蛋白胨水(配制见 A. 9)的瓶中。加热溶解后,按 0.1% 的比例加入 1.6% 溴甲酚紫指示剂。摇匀后,分装小试管(内装有倒置小管),每支大约 6 mL,流通蒸汽灭菌 3 次,每天 1 次,每次 30 min。

A. 11 靛基质试验用试剂——吲哚试验试剂(欧-波 Ehrlich-Boehme 二氏试剂)

A. 11.1 配方

对二甲氨基苯甲醛	1.0 g
95%乙醇	95 mL
纯浓盐酸	20 mL

A. 11.2 制备方法

将对二甲氨基苯甲醛溶于乙醇中,然后慢慢加进盐酸。此试剂应如量配制,并保存于冰箱内。

A. 12 氧化酶试剂(1%盐酸四甲基对苯二胺溶液)

将 1.0 g 的盐酸四甲基对苯二胺溶于 100 mL 的去离子水中。

A. 13 麦康凯琼脂培养基

A. 13.1 配方

蛋白胨	17 g
胨	3 g
猪胆盐(牛胆盐或羊胆盐)	5 g
氯化钠	5 g
琼脂粉	17 g
蒸馏水(或去离子水)	100 mL
乳糖	10 g
0.01%结晶紫水溶液*	10 mL
0.5%中性红水溶液*	5 mL

A. 13.2 制备方法

将蛋白胨、胨、胆盐和氧化钠溶解于 400 mL 蒸馏水中,校正 pH 为 7.2。将琼脂粉加入 600 mL 蒸馏水中,加热溶解。将两液合并,分装于烧瓶内,121℃ 高压灭菌 15 min,备用。临用时加热融化琼脂,趁热加乳糖,冷至 50℃~55℃时,加入结晶紫和中性红水溶液,摇匀后倾注平板。

A. 14 电泳缓冲液(TAE)

50×TAE 储存液:分别量取 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2 g、冰醋酸 57.1 mL、Tris·Base 242 g,用一定量(约 800 mL)的灭菌双蒸水溶解。充分混匀后,加灭菌双蒸水补齐至 1 000 mL。

1×TAE 缓冲液:取 10 mL 储存液加 490 mL 蒸馏水即可。

* 配好后须高压灭菌。

附 录 B
(规范性附录)

多杀性巴氏杆菌 *kmt* / 基因扩增引物序列及
多杀性巴氏杆菌多重 PCR 荚膜定型基因扩增引物序列

B.1 多杀性巴氏杆菌 *kmt* / 基因扩增引物序列

见表 B.1。

表 B.1 多杀性巴氏杆菌 *kmt* / 基因扩增引物序列

检测目的	引物序列(5'-3')	扩增大小, bp
多杀性巴氏杆菌定种	上游引物:ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG	460
	下游引物:GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC	

B.2 多杀性巴氏杆菌多重 PCR 荚膜定型基因扩增引物序列

见表 B.2。

表 B.2 多杀性巴氏杆菌多重 PCR 荚膜定型基因扩增引物序列

检测目的	引物序列(5'-3')		扩增大小, bp
荚膜定型	A 型	上游引物:TGC CAA AAT CGC AGT CAG	1 044
		下游引物:TTG CCA TCA TTG TCA GTG	
	B 型	上游引物:CAT TTA TCC AAG CTC CAC C	760
		下游引物:GCC CGA GAG TTT CAA TCC	
	D 型	上游引物:TTA CAA AAG AAA GAC TAG GAG CCC	657
		下游引物:CAT CTA CCC ACT CAA CCA TAT CAG	

附 录 C
(规范性附录)

多杀性巴氏杆菌 *kmt* / 基因扩增反应体系及
多杀性巴氏杆菌多重 PCR 荚膜定型基因扩增反应体系

C.1 多杀性巴氏杆菌 *kmt* / 基因扩增反应体系

见表 C.1。

表 C.1 多杀性巴氏杆菌 *kmt* / 基因扩增反应体系

组 分	体积, μL
超纯水	36.75
10 $\times$ PCR Buffer	5
dNTPs(2.5 mmol/L)	4
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
Taq 酶(5 U/ μL)	0.25
DNA 模板或阴阳性对照	2

C.2 多杀性巴氏杆菌多重 PCR 荚膜定型基因扩增反应体系

见表 C.2。

表 C.2 多杀性巴氏杆菌多重 PCR 荚膜定型基因扩增反应体系

组 分	体积, μL
超纯水	24.5 ¹⁾
10 $\times$ PCR Buffer	5
dNTP(2.5 mmol/L)	4
荚膜 A 型上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	4
荚膜 A 型下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	4
荚膜 B 型上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	2
荚膜 B 型下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	2
荚膜 D 型上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	2
荚膜 D 型下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	2
Taq 酶(5 U/ μL)	0.5
DNA 模板或阴阳性对照	菌落 ²⁾
1) 模板为菌落时,体系中超纯水的体积为 24.5 μL ;模板为质粒时,体系中超纯水的体积为 23.5 μL 。	
2) 模板为菌落时,用 10 μL Tip 头蘸取少许细菌,沿 PCR 管壁搅拌;模板为质粒时,体系中模板的体积为 1 μL 。	

附录 D

(规范性附录)

多杀性巴氏杆菌荚膜定型抗原及致敏红细胞的制备方法

D.1 多杀性巴氏杆菌荚膜抗原的制备

D.1.1 材料

D.1.1.1 改良马丁琼脂。

D.1.1.2 生理盐水、pH 6.0 磷酸盐缓冲盐水。

D.1.1.3 透明质酸酶。

D.1.2 方法

D.1.2.1 1支改良马丁琼脂斜面中管(30 mm×230 mm)的7 h~16 h生长的培养物,用3 mL灭菌生理盐水洗下,置于56℃水浴中加热30 min,8 000 r/min离心15 min,取上清液,即为荚膜抗原。

D.1.2.2 对黏液型菌株,应采用透明质酸酶进行预处理。

制备方法:1支改良马丁琼脂斜面中管7 h~16 h的培养物,用3 mL pH 6.0 磷酸盐缓冲盐水洗下,加入1 mL(含15 IU)的透明质酸酶溶液(透明质酸酶用pH 6.0的磷酸盐缓冲盐水稀释)。混匀后,置于(37±1)℃水浴中3 h~4 h,再用8 000 r/min离心15 min,上清液即为荚膜抗原。

D.2 新鲜红细胞的制备

D.2.1 材料

绵羊脱纤血。

D.2.2 方法

新鲜绵羊脱纤血用6倍~8倍体积的生理盐水洗3次,每次2 000 r/min离心15 min,最后一次收集的红细胞,恢复到原血量的一半。置于2℃~8℃保存,2 d内使用。

D.3 致敏红细胞的制备

D.3.1 材料

D.3.1.1 荚膜抗原(配制见D.1)。

D.3.1.2 新鲜红细胞(配制见D.2)。

D.3.1.3 生理盐水。

D.3.2 方法

取荚膜抗原3 mL,加入0.2 mL洗净的红细胞,混合均匀后置于(37±1)℃中作用2 h,离心弃上清,再用10 mL生理盐水洗1次,最后悬浮于20 mL生理盐水中,配制成1%的致敏红细胞悬液。