

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4656—2025

动物源产气荚膜梭菌分离与 鉴定技术规程

Technical code of practice for isolation and identification of
Clostridium perfringens from animals

2025-01-09 发布

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：中国农业大学、中国兽医药品监察所。

本文件起草人：王少林、赵琪、吴聪明、张纯萍、张仕泓、王鹤佳、周宇晴、徐士新、陈安杰、崔明全、李霆、程敏。



动物源产气荚膜梭菌分离与鉴定技术规程

1 范围

本文件确立了动物源产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)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动物直肠/泄殖腔拭子、新鲜粪便、肠道内容物等样品中产气荚膜梭菌的分离和鉴定。

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 4789.13 食品安全标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验

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 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 术语和定义

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 灭菌液体石蜡。

4.2.2 PCR 预混液(2×PCR Master Mix)。

4.2.3 50×TAE 缓冲液。

4.2.4 琼脂糖。

4.2.5 DNA Marker(2 000 bp)。

4.2.6 α-氰-4-羟基肉硅酸(HCCA)。

4.2.7 甘油。

4.3 溶液制备

4.3.1 1×TAE 缓冲液:取 50×TAE 缓冲液 20 mL,加水至 1 000 mL。

4.3.2 1%琼脂糖凝胶:取琼脂糖 1.0 g,于 100 mL 1×TAE 中加热,充分溶解。

4.3.3 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。

4.3.4 灭菌甘油:取甘油适量,121 °C 高压灭菌 20 min。

4.4 培养基制备

4.4.1 Amies 运送培养基:按照附录 A 中 A.1 的规定执行。

4.4.2 液体硫乙醇酸盐培养基(FTG):按照 A.2 的规定执行。

4.4.3 胰胨-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基(TSC):按照 A.3 的规定执行。

4.4.4 5%绵羊血琼脂培养基:按照 A.4 的规定执行。

4.4.5 5%蔗糖脱脂乳保护剂:按照 A.5 的规定执行。

4.5 标准菌株

产气荚膜梭菌 毒素 C 型(*Clostridium perfringens*, Type C)[CVCC 60101]。

4.6 材料

4.6.1 无菌脱纤维绵羊血。

4.6.2 生化鉴定试剂盒或鉴定卡。

4.6.3 细菌 DNA 提取试剂盒。

4.6.4 磁珠保藏管。

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 精密天平:感量 0.001 g。

5.5 移液器:0.5 μL~1 000 μL。

5.6 恒温培养箱。

5.7 厌氧培养装置。

5.8 微生物生化鉴定系统。

5.9 PCR 仪。

5.10 高速冷冻离心机:离心速度≥12 000 r/min。

5.11 核酸电泳仪。

5.12 电泳凝胶成像分析系统。

5.13 微生物质谱仪(MALDI-TOF MS)。

6 分离鉴定程序

分离与鉴定流程见图 1。

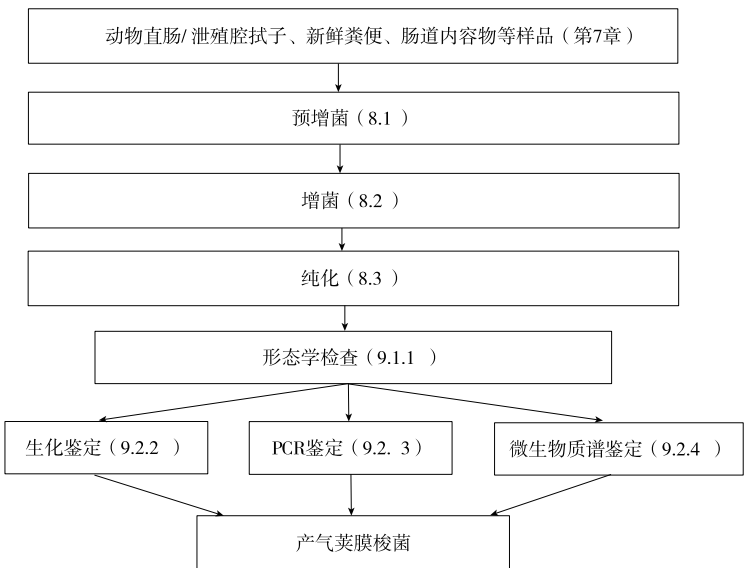


图 1 产气荚膜梭菌分离与鉴定流程

7 样品采集与保存运输

按照 NY/T 4141 的规定执行。

8 分离纯化

8.1 预增菌

8.1.1 动物直肠/泄殖腔拭子

取样品液 200 μ L,置于 FTG 培养基 2 mL 中,混匀,液体石蜡封固,36 $^{\circ}$ C($\pm$ 1 $^{\circ}$ C)厌氧培养 20 h~24 h。

8.1.2 新鲜粪便、肠道内容物

取样品适量,置于 FTG 培养基 2 mL 中,混匀,液体石蜡封固,36 $^{\circ}$ C($\pm$ 1 $^{\circ}$ C)厌氧培养 20 h~24 h。

8.2 增菌

取预增菌液 1 mL、约 50 $^{\circ}$ C 的 TSC 琼脂培养基 9 mL,倾注平皿,缓慢旋转混匀,室温凝固。再加入约 50 $^{\circ}$ C 的 TSC 琼脂培养基 10 mL,室温凝固,正置,36 $^{\circ}$ C($\pm$ 1 $^{\circ}$ C)厌氧培养 20h~24 h。

8.3 纯化

挑取圆形黑色单菌落,接种 5%绵羊血琼脂培养基,36 $^{\circ}$ C($\pm$ 1 $^{\circ}$ C)倒置厌氧培养 20 h~24 h。挑取有溶血环、表面光滑菌落,接种 5%绵羊血琼脂培养基,36 $^{\circ}$ C($\pm$ 1 $^{\circ}$ C)倒置厌氧培养 20 h~24 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 4789.13 的规定执行。

9.2 鉴定

9.2.1 通则

生化鉴定、PCR 鉴定和质谱鉴定 3 种方法任选其一。

9.2.2 生化鉴定

按照 GB 4789.13 的规定执行,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 1 mL,煮沸 10 min,冰浴冷却,12 000 r/min 离心 3 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。产气荚膜梭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 产气荚膜梭菌的 PCR 引物序列及扩增片段长度

细菌	引物序列	扩增片段长度, bp
产气荚膜梭菌	上游引物(<i>cpa</i> -F): 5'-GCTAATGTTACTGCCGTTGA-3' 下游引物(<i>cpa</i> -R): 5'-CCTCTGATACATCGTGTAAAG-3'	324

9.2.3.3 反应体系

反应体系(30 μ L)见表 2。

表 2 PCR 反应体系

试剂	体积, μL
2×PCR Master Mix	15
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
水(ddH ₂ O)	12
模板	1

9.2.3.4 反应条件

94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环;72℃延伸 10 min。

9.2.3.5 电泳

取 PCR 扩增产物,于 1%的琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像分析。

9.2.3.6 结果判定

扩增条带大小符合 324 bp 的为阳性。阳性扩增产物必要时测序比对鉴定,相似度不低于 99%。产气荚膜梭菌 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果和测序结果见附录 B 中 B.1 和 B.2。

9.2.4 质谱鉴定

9.2.4.1 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。

9.2.4.2 仪器校准

检测样品前,应对微生物质谱仪进行校准。

9.2.4.3 测定

取制备好的样品靶板,置于质谱仪靶板槽中。编辑样品信息后,进行谱图的数据采集。

9.2.4.4 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。产气荚膜梭菌毒素 C 型标准菌株质谱鉴定谱图见附录 C。

10 菌株保藏

取新鲜纯化菌,加入含有 5%无菌脱纤维羊血的 FTG 培养基制成菌悬液,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 Amies 运送培养基

A.1.1 成分

氯化钠	3.0 g
磷酸二氢钾	0.2 g
磷酸氢二钠	1.15 g
氯化钾	0.2 g
氯化镁	0.1 g
硫代乙醇酸钠	1.0 g
氯化钙	0.1 g
琼脂	7.5 g
水	1 000 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 7.3 ± 0.1 ,121 ℃ 高压灭菌 15 min,备用。

A.2 液体硫乙醇酸盐培养基(FTG)

A.2.1 基础液

胰蛋白胨	15.0 g
L-胱氨酸	0.5 g
酵母粉	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
氯化钠	2.5 g
硫乙醇酸钠	0.5 g
刃天青	0.001 g
琼脂	0.75 g
水	1 000 mL

将 A.2.1 中各成分加入水中,混匀,调节 pH 至 7.1 ± 0.2 ,121 ℃ 高压灭菌 15 min,备用。

A.2.2 制法

基础液	1 000 mL
D-环丝氨酸	80 mL

将各成分混匀,备用。

A.3 胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基(TSC)

A.3.1 基础液

胰酪	15.0 g
大豆胨	5.0 g
酵母粉	5.0 g

焦亚硫酸钠	1.0 g
柠檬酸铁铵	1.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

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

A.3.2 制法

基础液	1 000 mL
D-环丝氨酸	80 mL

将各成分混匀,备用。

A.4 5%绵羊血琼脂培养基

A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛脑浸粉	12.5 g
葡萄糖	2.0 g
牛心浸粉	5.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL

将 A. 4.1 中各成分加入水中,混匀,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ,121 ℃ 高压灭菌 15 min。冷却至约 50 ℃,备用。

A.4.2 制法

基础液	1 000 mL
无菌脱纤维绵羊血	200 mL

将各成分混匀,倾注平板,备用。

A.5 5%蔗糖脱脂乳保护剂

A.5.1 成分

脱脂乳	10.0 g
蔗糖	5.0 g
水	100 mL

A.5.2 制法

将 A. 5.1 中各成分混匀,112 ℃ 高压灭菌 20 min,备用。

附 录 B
(资料性)

产气荚膜梭菌 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。

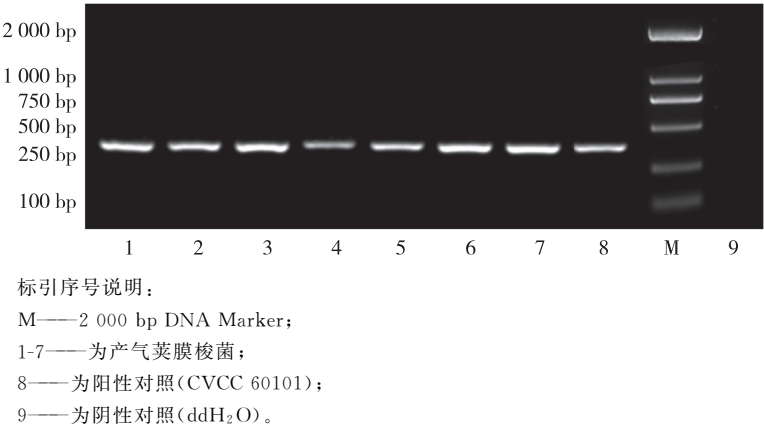


图 B.1 产气荚膜梭菌 PCR 产物电泳图

B.2 目标片段测序结果

GCTAATGTTACTGCCGTTGACCGCGCAGGACATGTTAAGTTTGAGACTTTTGCAGAGGA
AAGAAAAGAACAGTATAAAATAAACACAGCAGGTTGCAAACTAATGAGGATTTTTATGCT
GATATCTTAAAAAACAAAGATTTTAATGCATGGTCAAAAGAATATGCAAGAGGTTTTGCTA
AAACAGGAAAATCAATATACTATAGTCATGCTAGCATGAGTCATAGTTGGGATGATTGGGA
TTATGCAGCAAAGGTAACCTTTAGCTAACTCTCAAAAAGGAACAGCAGGATATATTTATAGA
TTCTTACACGAGTATCAGAGG

附 录 C
(资料性)

产气荚膜梭菌标准菌株质谱鉴定谱图

质谱鉴定谱图见图 C.1。

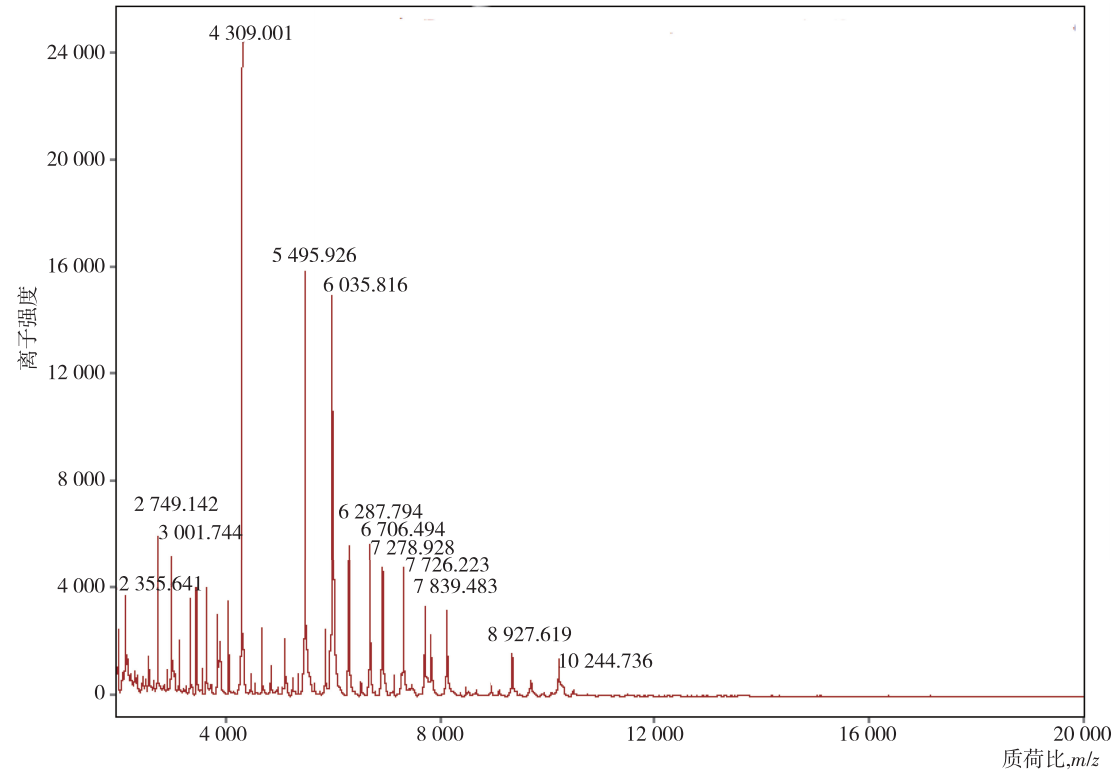


图 C.1 产气荚膜梭菌标准 C 型菌株质谱鉴定谱图