

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4657—2025

动物源伪结核棒状杆菌分离与鉴定
技术规程

Technical code of practice for isolation and identification of
Corynebacterium pseudotuberculosis 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》的规则起草。

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：西北农林科技大学、中国兽医药品监察所。

本文件主要起草人：杨增岐、王娟、王斌、程敏、赵光明、张纯萍、魏宇辰、王晨骁、赵琪、王鹤佳、徐士新、李霆、崔明全。



动物源伪结核棒状杆菌分离与鉴定技术规程

1 范围

本文件确立了伪结核棒状杆菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)分离与鉴定流程,规定了试剂或材料、仪器设备、样品采集与保存运输、分离纯化、筛查与鉴定、菌株保藏、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脓肿样品中伪结核棒状杆菌的分离与鉴定。

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

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 的规定配制或用商品化产品。

4.2 试剂

4.2.1 氯化钠。

4.2.2 过氧化氢(30%)。

4.2.3 聚合酶链式反应预混液(2×PCR Master Mix)。

4.2.4 琼脂糖。

4.2.5 乙醇:色谱纯。

4.2.6 甲酸:色谱纯。

4.2.7 乙腈:色谱纯。

4.2.8 α -氰-4-羟基肉硅酸(HCCA):色谱纯。

4.2.9 甘油。

4.3 溶液制备

4.3.1 3%过氧化氢溶液:取过氧化氢 100 mL、水 900 mL,混匀。

4.3.2 基质溶液:取 HCCA,按说明书配制;或用市售商品。

4.3.3 灭菌甘油:取甘油适量,121 °C 灭菌 20 min。

4.3.4 无菌生理盐水:取氯化钠 8.5 g,溶于 1 000 mL 水中,121 °C 高压灭菌 20 min。

4.3.5 5%蔗糖脱脂乳保护剂:按照附录 A 中 A.1 的规定执行。

4.3.6 75%乙醇:取乙醇 75 mL,加水至 100 mL。

4.3.7 70%甲酸:取甲酸 70 mL,加水至 100 mL。

4.4 培养基制备

4.4.1 绵羊血琼脂(5%~10%):按照 A.2 的规定执行。

4.4.2 脑心浸出液(BHI)培养基:按照 A.3 的规定执行。

4.4.3 小牛血清 BHI 琼脂(5%~10%):按照 A.4 的规定执行。

4.5 标准菌株

伪结核棒状杆菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)[ATCC 19410/CVCC 1186]。

4.6 材料

4.6.1 革兰氏染色剂。

4.6.2 菌种冷冻保存管或磁珠保存管。

4.6.3 细菌 DNA 提取试剂盒。

4.6.4 棒状杆菌鉴定卡(盒)或同类产品。

5 仪器设备

5.1 二级生物安全柜。

5.2 冰箱:2℃~8℃,-20℃及以下。

5.3 恒温培养箱。

5.4 显微镜:10×~1 000×。

5.5 PCR 仪。

5.6 核酸电泳仪。

5.7 电泳凝胶成像分析系统。

5.8 分析天平:感量 0.01 g。

5.9 高速冷冻离心机:离心速度 $\geq 12\ 000$ r/min。

5.10 pH 计。

5.11 麦氏浊度仪或标准麦氏比浊管。

5.12 微生物生化鉴定系统。

5.13 微生物质谱仪(MALDI-TOF MS)。

6 分离与鉴定流程

分离与鉴定流程见图 1。

7 样品采集与保存运输

样品采集按照 NY/T 4141 的规定执行。样品需在 2℃~8℃条件下保存运输,无 BHI 肉汤的样品运输时间不超过 24 h,添加 BHI 肉汤的样品运输时间不超过 48 h。

8 分离纯化

用接种环蘸取脓肿内容物划线接种绵羊血琼脂平板,36℃(± 1 ℃)培养 24 h~48 h。挑取单个乳白色、不透明、有 β -溶血环、边缘整齐、干燥、易刮落的可疑菌落,接种绵羊血琼脂平板,纯化,备用。

9 筛查与鉴定

9.1 筛查

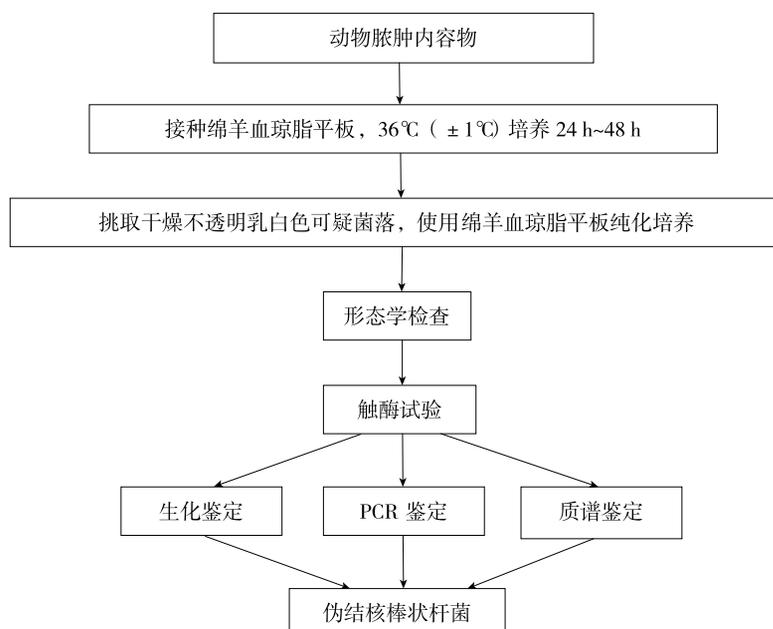


图 1 伪结核棒状杆菌分离与鉴定流程

9.1.1 形态学检查

取纯化菌落,染色,镜检。应为蓝紫色,呈球状、短杆状或棒状,无芽孢,无荚膜。

9.1.2 触酶试验

取纯化菌落,置于载玻片上,加 3%过氧化氢溶液 1 滴,应立即产生气泡(触酶试验阳性)。

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

将触酶试验阳性的菌株,接种绵羊血琼脂平板,36℃(±1℃)培养 24 h~48 h。用麦氏比浊仪或标准麦氏比浊管调整浊度为 0.5 麦氏单位。用微生物生化鉴定系统或棒状杆菌鉴定卡(盒)进行鉴定。伪结核棒状杆菌生化鉴定表见附录 B 中的表 B.1。

9.2.3 PCR 鉴定

9.2.3.1 模板制备

取新鲜纯化菌落,用细菌 DNA 提取试剂盒提取 DNA 作为模板,备用。伪结核棒状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 伪结核棒状杆菌的 PCR 引物序列及扩增片段长度

细菌	引物序列	扩增片段长度, bp
伪结核棒状杆菌	上游引物(16S rRNA-F):5'-AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' 下游引物(16S rRNA-R):5'-AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC-3'	1 356

9.2.3.3 PCR 扩增

PCR 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 $\mu\text{mol/L}$)	1
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1
水(ddH ₂ O)	6
模板	2

9.2.3.4 反应条件

94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min, 4 °C 保存。

9.2.3.5 电泳

取 PCR 扩增产物, 于 1%~2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像分析系统观察。

9.2.3.6 结果判定

扩增条带大小符合 1 356 bp 的为阳性。阳性扩增产物需测序比对鉴定, 相似度不低于 99%。PCR 产物大小和测序结果见 B. 2 和 B. 3。

9.2.4 质谱鉴定

9.2.4.1 菌样制备

取新鲜纯化菌落, 用 75% 乙醇重悬, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 加入 70% 甲酸溶液 50 μL , 混匀。再加乙腈 50 μL , 混匀, 12 000 r/min 离心 2 min。取上清液 1 μL 加入靶板样品孔中, 晾干, 加 HCCA 基质溶液 1 μL , 混匀, 晾干。或按微生物质谱仪推荐方法操作。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。伪结核棒状杆菌标准菌株质谱图见附录 C。

10 菌株保藏

将已鉴定的菌株接种于小牛血清的 BHI 琼脂培养基, 培养至对数生长期。取新鲜菌, 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 5% 蔗糖脱脂乳保护剂, 冻干。-20 °C 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 1989 的要求。

附 录 A
(规范性)
培养基与试剂

A. 1 5%蔗糖脱脂乳保护剂

A. 1.1 成分

脱脂乳	10.0 g
蔗糖	5.0 g
水	100 mL

A. 1.2 制法

将 A. 1.1 中各成分,混合,112 °C 灭菌 20 min,备用。

A. 2 绵羊血琼脂(5%~10%)

A. 2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸出粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL
绵羊抗凝血	50 mL~100 mL

A. 2.2 制法

将 A. 2.1 中固体成分搅拌溶解于水中,调节 pH 至 7.3 ± 0.1 ,121 °C 灭菌 15 min,冷却至 55 °C~65 °C,加入绵羊抗凝血,使其终浓度为 5%~10%,混匀,倾注平板,备用。

A. 3 脑心浸出液(BHI)培养基

A. 3.1 成分

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

A. 3.2 制法

将 A. 3.1 中各成分搅拌溶解于水中,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ,121 °C 灭菌 15 min,备用。

A. 4 小牛血清 BHI 琼脂(5%~10%)

A. 4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
脱水小牛脑浸粉	12.5 g
脱水牛心浸粉	5.0 g

NY/T 4657—2025

氯化钠	5.0 g
葡萄糖	2.0 g
磷酸氢二钠	2.5 g
琼脂	15.0 g
水	1 000 mL
小牛血清	50 mL~100 mL

A.4.2 制法

将 A.4.1 中各固体成分搅拌溶解于水中,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min,冷至 $55\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 65\text{ }^{\circ}\text{C}$,加入 50 mL~100 mL 小牛血清,使其终浓度为 5%~10%,混匀,倾注平板,备用。

附录 B
(资料性)

伪结核棒状杆菌生化鉴定结果、PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果和测序结果

B.1 生化鉴定结果

见表 B.1。

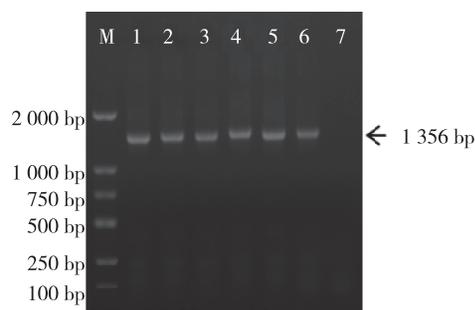
表 B.1 伪结核棒状杆菌生化鉴定结果表

项目	结果	项目	结果
葡萄糖(GLU)	+	木糖(XYL)	+/-
麦芽糖(MAL)	+	糊精(DEL)	+/-
半乳糖(GAL)	+	阿拉伯糖(ARA)	+/-
甘露糖(MNE)	+	甘露醇(MAN)	+/-
触酶试验(CAT)	+	甘油(GLY)	+/-
海藻糖(TRE)	-	淀粉(STA)	+/-
乳糖(LAC)	+/-	硝酸盐还原(NIT)	+/-
蔗糖(SAC)	+/-	硝酸盐还原(NIT)	+/-

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性；“/”表示或者。

B.2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

见图 B.1。



标引序号说明：
M——2 000 bp DNA Marker；
1——阳性对照(ATCC 19410)；
2~6——伪结核棒状杆菌分离株；
7——阴性对照(水)。

图 B.1 伪结核棒状杆菌 16s rRNA 基因 PCR 产物电泳图

B.3 目标片段测序结果

AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGG
AAAGGCCCTTCGGGGGTGCTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCTCG
TACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACTGGATAGGACCGCACTTTAGTGTGTG
TGGTGGAAAGTTTTTCGGTACGAGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAT
GGCCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGACGGCCACATTGGGACTGAGA
TACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGA

TGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGACAGGGACGAA
GCTTTTTGTGACGGTACCTGTATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAA
TACGTAGGGTTCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTCTG
CGTCGTCTGTGAAATTCGGGGCTTAACTCCGGGCGTGCAGGCGATACGGGCATAACTTGAG
TGCTGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAAC
ACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGC
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGGTGGGCGCTAGGTGTGAGGGTCT
TCCACGACTTTCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
CTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTTCGAT
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATATACAAGATCGGCGTAGAGATACGTTTTCC
CTTGTGGTTTGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGGACTCATGA
GAGACTGCCGGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATG
TCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGTCGGTACAACGCGTTGCGAGCCTGTGAGGGTGAGCG
AATCGCTGAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGT
CGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT

附录 C

(资料性)

伪结核棒状杆菌标准菌株质谱鉴定谱图

伪结核棒状杆菌标准菌株质谱鉴定谱图见图 C.1。

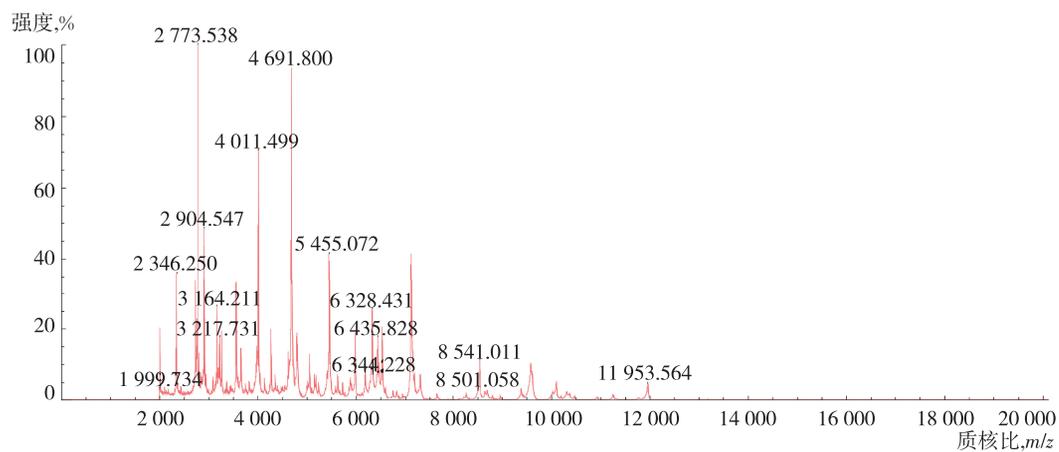


图 C.1 伪结核棒状杆菌标准菌株质谱鉴定谱图