



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4827—2017

蛙脑膜炎败血金黄杆菌病检疫技术规范

Quarantine protocol for *Chryseobacterium meningosepticum* of frog

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：徐淑菲、孔繁德、谢明星、唐泰山、王凯民、姜焱。

蛙脑膜炎败血金黄杆菌病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了用于蛙脑膜炎败血金黄杆菌病的临床症状及细菌学、PCR 等实验室诊断、检测方法。本标准适用于蛙脑膜炎败血金黄杆菌病的流行病学调查、监测、诊断和出入境检验检疫。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 18088 出入境动物检疫采样

3 试剂和培养基

除另有规定外,以下所用生化试剂均为分析纯。正文中试剂配制方法见附录 A。

- 3.1 营养肉汤。
- 3.2 胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)。
- 3.3 硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂(TCBS)。
- 3.4 营养琼脂。
- 3.5 生化鉴定试剂盒。
- 3.6 革兰氏染色液。
- 3.7 DNA 提取试剂:蛋白酶 K、SDS、酚-氯仿抽提法所需要的相关试剂;商品化的 DNA 提取试剂盒。
- 3.8 PCR 试剂:10×浓缩缓冲液、dNTP、氯化镁、6×电泳上样缓冲液、琼脂糖、5×电泳缓冲液(TBE)等,均为商品化试剂盒中成分。
- 3.9 引物:
 - a) 特异性引物:
 - P1:5'-GATTCGTCGGATTATATTG-3';
 - P2:5'-CCACTTCAACCTTACTCAAGACTAAC-3'。
 浓度为 10 μmol/L,扩增产物大小为 475 bp~479 bp。
 - b) 通用引物:
 - P3:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3';
 - P4:5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'。
 浓度为 10 μmol/L,扩增产物大小为 1 488 bp。
- 3.10 阴性和阳性对照:由国家质检总局指定实验室提供。
- 3.11 DNA DL2000 Marker:适合检测分子量大小 100 bp~2 000 bp 间的 DNA 片段,-20 °C 保存。

4 疾病概述

蛙脑膜炎败血金黄杆菌病,是由脑膜炎败血伊丽莎白菌(*Elizabethkingia meningoseptica*)引起

蛙、鳖等多种水生动物的一种传染病。脑膜炎败血伊丽莎白菌也称脑膜脓毒性金黄杆菌、脑膜炎败血黄杆菌或脑膜炎败血金黄杆菌。该菌可感染牛蛙、美国青蛙、虎纹蛙、中华鳖和沙鳖等各种养殖蛙类和鳖类,蛙是主要宿主,也可感染猫、犬、鼠和人。5月~10月为主要的发病季节;室内恒温养殖情况下,发病季节不明显。

病蛙出现运动机能失调、头部歪斜、身体失去平衡或浮于水面打转等,眼部因感染出现白色坏死(白内障)症状,同时伴有皮肤溃疡、肝坏死等症状。

取濒死发病蛙内脏或脑部组织,涂片,镜检,可观察到革兰氏阴性、细长、末端略圆突状的杆菌。

5 设备和材料

- 5.1 天平。
- 5.2 离心机。
- 5.3 微量移液器。
- 5.4 凝胶成像仪或紫外透射仪。
- 5.5 PCR 仪。
- 5.6 恒温培养箱。
- 5.7 冰箱。
- 5.8 显微镜。

6 检测方法

6.1 细菌学检测方法

6.1.1 取样

按照 GB/T 18088 的规定采样。取发病蛙眼、脑、肝脏等组织作为样品。

6.1.2 操作步骤

6.1.2.1 增菌

无菌取待检样品 25 g,加入营养肉汤 225 mL,用均质器以 8 000 r/min~10 000 r/min 均质 1 min~2 min;或置于盛有 225 mL 营养肉汤的无菌均质袋中,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,于 28℃±1℃培养 18 h~24 h。

6.1.2.2 分离培养

将上述经过增菌的培养物,用无菌接种环分别划线接种到 TSA、TCBS、营养琼脂等平板上,于 28℃±1℃培养 18 h~24 h。典型菌落特征:在 TSA 上,菌落直径 1 mm~2 mm,圆形突起,有光泽,呈白色、微黄或亮黄色;在 TCBS 上,菌落呈绿色;在营养琼脂平板上,菌落呈微黄或亮黄色。

脑膜炎败血伊丽莎白菌可在 37℃生长,但无明显色素形成。

挑取典型菌落,接种营养肉汤或其他培养基作为纯培养物,用于后续试验。

6.1.2.3 革兰氏染色镜检

取一干净的载玻片,用接种环挑取少量菌体,涂在载玻片上,使其薄而均匀;晾干载玻片;按照说明书用革兰氏染色试剂(见 A.1、A.2)进行染色。显微镜下观察,脑膜炎败血伊丽莎白菌为革兰氏阴性、细长、末端略圆突的杆菌,大小(0.4 μm~0.5 μm)×(0.8 μm~1.0 μm)。单个分散排列,无鞭毛、无芽孢、

无荚膜、不运动。

6.1.2.4 生化试验

6.1.2.4.1 氧化酶试验

用无菌接种环或其他无菌工具挑取纯培养物,滴加氧化酶试剂或涂布于氧化酶试纸表面进行氧化酶试验。如果氧化酶试剂或试纸在规定的范围内变为紫色或深紫色,则为氧化酶阳性。

脑膜炎败血伊丽莎白菌氧化酶试验为阳性。

6.1.2.4.2 其他生化试验

可选择商品化的生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统进行生化试验。

脑膜炎败血伊丽莎白菌生化鉴定结果参见附录 B。

6.2 PCR 方法

6.2.1 取样

同 5.2.1。为提高检出率,样本可保存于 95% 的乙醇中,或于冰上冷藏并于 24 h 内送检。或—80℃低温冰箱长期保存。试验必须设立阴性、阳性和空白对照。

可疑菌接种营养肉汤,提取细菌核酸 DNA 以待检测。

6.2.2 DNA 的提取

取 15 mg~30 mg 上述样品加到 1.5 mL 离心管中,若是菌液 5 000 r/min 离心 5 min,去除上清液;若是组织器官用研磨棒充分研磨。加 20 μ L 蛋白酶 K(见 A.3),再加 SDS(见 A.4)至终浓度为 1%,上下颠倒混匀;混合液置于 55℃水浴,水浴 2.5 h;接着向匀浆液中按 1:1 比例加酚/氯仿/异戊醇混合液(25:24:1)(见 A.5),轻轻震荡混匀 5 min,12 000 g 离心 5 min;吸上层水相 800 μ L 于一灭菌塑料离心管中,再加入等体积酚/氯仿/异戊醇混合液,轻轻震荡混匀 5 min,12 000 g 离心 5 min;吸上层水相 500 μ L 于一塑料离心管中,加入两倍体积的无水乙醇,—20℃放置 2 h 或液氮中放置 5 min;12 000 g 离心 5 min,沉淀 DNA,吸弃上清液;于沉淀中加入 75%乙醇溶液 500 μ L,轻轻混匀后 12 000 g 离心 5 min,吸弃上清液,室温挥干;向 DNA 沉淀中加 200 μ L TE(见 A.6)缓冲液,—20℃保存备用。或者采用等效的商业化的 DNA 提取试剂盒,按照说明书进行操作。

6.2.3 第一次 PCR 检测

6.2.3.1 反应体系

PCR 总体积 50 μ L,10 \times 浓缩缓冲液 5 μ L,氯化镁(25 mmol/L)4 μ L,dNTP(10 mmol/L)2 μ L,Taq 酶(5 U)1 μ L,P1、P2 各 2 μ L,33 μ L 灭菌双蒸水,然后加入 1 μ L 待测样品 DNA 作为模板。

6.2.3.2 设立对照

在样品处理过程中必须设立阳性样品对照(标准阳性菌株或其他标准的阳性质控作对照)、阴性样品对照(用核酸裂解液代替模板作为阴性对照)、空白对照(取等体积的水代替模板作为空白对照)。

6.2.3.3 反应条件

将反应混合液混匀后稍离心,按以下反应程序进行扩增:95℃ 5 min,1 个循环;然后 95℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 1 min,25 个循环;再 72℃ 5 min。

6.2.3.4 琼脂糖电泳

用 $0.5\times$ TBE(见 A.7)电泳缓冲液配制 1% 的琼脂糖(含 $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ EB,即溴化乙锭,见 A.8)均匀铺板,厚度为 $3\text{ mm}\sim 5\text{ mm}$ 。将平板放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将 $10\text{ }\mu\text{L}$ 样品和 $2\text{ }\mu\text{L}$ $6\times$ 电泳上样缓冲液(见 A.9)混匀后加入样品孔。在电泳时选择合适的 DNA 相对分子质量标准作对照, 5 V/cm 电泳约 30 min ,当溴酚蓝到达底部时停止,在紫外灯下观察核酸条带。

6.2.4 第二次 PCR 检测

反应体系按照 6.2.3.1 加入除引物外的各反应组分,P3、P4 引物各 $2\text{ }\mu\text{L}$ 。设立阳性对照、阴性对照和空白对照。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min ,1 个循环;然后 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min ,30 个循环;再 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 。

6.2.5 PCR 结果判定

特异性引物 P1、P2 扩增的产物电泳后阳性对照出现一条 $475\text{ bp}\sim 479\text{ bp}$ 的 DNA 片段,而阴性对照和空白对照没有该核酸带,说明实验方法成立。此时待测样品电泳后也在 $475\text{ bp}\sim 479\text{ bp}$ DNA 的位置上有核酸条带,将其 PCR 扩增产物进行测序,并用 BALST 进行生物序列的相似性搜索和分析。如果其序列与 GenBank 中的参考序列同源性在 98% 以上,则可判定该待测样品为脑膜炎败血伊丽莎白菌阳性(参见附录 C);而无条带或条带的大小不是 $475\text{ bp}\sim 479\text{ bp}$,采用通用引物 P3、P4 进行第二次 PCR 检测。

通用引物 P3、P4 扩增的产物电泳后阳性对照出现一条 $1\text{ }488\text{ bp}$ 的 DNA 片段,而阴性对照和空白对照没有该核酸带,说明实验方法成立。此时待测样品电泳后也在 $1\text{ }488\text{ bp}$ DNA 的位置上有核酸条带,将其 PCR 扩增产物进行测序,并用 BALST 进行生物序列的相似性搜索和分析。如果与脑膜炎败血伊丽莎白菌的同源性在 98% 以上,则可判定该待测样品为脑膜炎败血伊丽莎白菌阳性;而无条带或条带的大小不是 $1\text{ }488\text{ bp}$,则判定为脑膜炎败血伊丽莎白菌阴性。

6.3 综合判定

6.3.1 如果临床症状相符,分离到可疑菌株,且主要生化反应符合脑膜炎败血伊丽莎白菌的主要生化特征者,判定为脑膜炎败血伊丽莎白菌阳性。

6.3.2 如果临床症状相符,分离到可疑菌株,但主要生化反应不完全相符者,判定为可疑,进一步进行 PCR 鉴定。若 PCR 结果为阳性,判定为脑膜炎败血伊丽莎白菌阳性;若 PCR 结果为阴性,判定为脑膜炎败血伊丽莎白菌阴性。

6.3.3 如果未分离到可疑菌株,判定为脑膜炎败血伊丽莎白菌阴性。

附 录 A
(规范性附录)
试剂配制

A.1 革兰氏染色液

革兰氏碘液	
碘	1 g
碘化钾	2 g
加蒸馏水至	300 mL

将碘与碘化钾先行混合,加入蒸馏水少许充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.2 草酸铵结晶紫染液

A 液:结晶紫(crystal violet)	1 g
95%酒精	20 mL
B 液:草酸铵(ammonium oxalate)	0.8 g
加蒸馏水至	80 mL

混合 A、B 二液,静置 48 h 后使用。

A.3 蛋白酶 K

蛋白酶 K	200 mg
蒸馏水	9.5 mL

配制方法:将 200 mg 蛋白酶 K 溶于 9.5 mL 蒸馏水中。为减少变性,切记只能将蛋白酶 K 加入溶液中而不能将溶液加入到蛋白质中。将加塞试管轻轻摇晃至蛋白质完全溶解。不能涡旋搅拌(这样会起泡沫,提示蛋白质已变性)。调节体积至 10 mL,等份分装,−20 ℃贮存。一般来说,此溶液不需除菌。

A.4 10%SDS(十二烷基硫酸钠)

SDS	10 g
蒸馏水	80 mL
溶解后将体积调至	1 000 mL

可高压除菌,室温可永久保存。

A.5 酚/氯仿/异戊醇混合液

饱和酚	25 份
氯仿	24 份
异戊醇	1 份

三种试剂按比例混合均匀后加入等体积的 0.01 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)中,移入棕色玻璃瓶中 4 ℃保存。也可购买现成的试剂。

A.6 TE 缓冲液(pH 8.0)

1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)	10 mL
500 mmol/L EDTA(pH 8.0)	2 mL

加入约 800 mL 的双蒸馏水,均匀混合。溶液定容至 1 000 mL。高温高压灭菌后,4 ℃保存。

A.7 5×TBE 电泳缓冲液

Tris 碱	54 g
硼酸	27 g
EDTA	2.922 5 g
加蒸馏水至	1 000 mL
用 5 mol/L 的盐酸调到 pH 8.0	

使用液为 0.5×TBE 电泳缓冲液或 1×TBE 电泳缓冲液。用前采用蒸馏水 5 或 10 倍稀释即可。

A.8 EB(溴化乙锭,核酸染色剂)

EB	1 g
加蒸馏水至	100 mL

配制成 10 mg/mL 的浓缩液。用时每 10 mL 电泳液或琼脂中加 1 μL。用铝箔或黑纸包裹容器,储于室温即可。

A.9 6×电泳上样缓冲液

溴酚蓝	0.25 g
蔗糖	40 g
加蒸馏水至	100 mL

A.10 TCBS

A.10.1 成分

酵母膏	5 g
蛋白胨	10 g
蔗糖	10 g
硫代硫酸钠	10 g
柠檬酸钠	10 g
牛胆酸钠	3 g
牛胆汁粉	5 g
氯化钠	10 g
柠檬酸铁	1 g

溴麝香草酚蓝(2%溶液)	20 mL
草酚蓝(1%溶液)	4 mL
琼脂	15 g

A.10.2 制法

将上述成分加蒸馏水至 1 000 mL,溶解,校正至 pH=8.6,加热煮沸,倾注平板。

A.11 营养肉汤

A.11.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
加蒸馏水至	1 000 mL

A.11.2 制法

按上述成分混合,溶解后校正至 pH=7.4,分装烧瓶,每瓶 225 mL,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.12 胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)

A.12.1 成分

胰蛋白胨	15 g
植物蛋白胨	5 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g
加蒸馏水至	1 000 mL

A.12.2 制法

按上述成分混合,加热搅拌溶解,校正至 pH=(7.3±0.2),分装三角瓶,121 ℃ 高压灭菌 15 min 备用。

A.13 营养琼脂

A.13.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g~20 g
加蒸馏水至	1 000 mL

A.13.2 制法

按上述成分混合,校正至 pH=(7.2~7.4),加热搅拌溶解,使琼脂溶化,分装,122 ℃ 高压灭菌 15 min。

附 录 B
(资料性附录)

脑膜炎败血金黄杆菌生化鉴定表

脑膜炎败血金黄杆菌生化鉴定表见表 B.1。

表 B.1 脑膜炎败血金黄杆菌生化鉴定表

氧化酶 a	触酶	葡萄糖 a	麦芽糖 a	乳糖 a	木糖	蔗糖 a	阿拉伯糖	鼠李糖	果糖	甘露醇	硝酸盐还原试验 a	ONPG水解	DNA酶	乙酰胺	七叶苷	靛基质	明胶液化试验	尿素酶试验	吲哚 a	柠檬酸盐	硫化氢	酪素水解试验	精氨酸双水解酶	赖氨酸脱羧酶	鸟氨酸脱羧酶
+	+	产酸不产气 b	产酸不产气	产酸不产气	—	—	—	—	V	V	—	+	+	+	+	+	+	—	+	V	V	—	—	—	—
注：“+”表示阳性；“—”表示阴性；“V”表示可变；“a”为主要生化反应特征指标(伯杰氏细菌鉴定手册第九版)； “b”为氧化型或弱发酵型(要 2 d~7 d 产酸)。																									

附 录 C
(资料性附录)

脑膜炎败血金黄杆菌菌基因序列

GeneBank 中的登陆号为 AY468477 的脑膜炎败血伊丽莎白菌 16S rRNA 的部分基因序列(479 bp):

GATTCGGCATCGGATTATATTGAAAACTACGGTGGATAAAGATGGGACACGCGCAAGATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTG
ATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATA
TTGGACAATGGGTGAAAGCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTAGGAAGACGGCCCTATGGGT
TGTAAACTACTTTTATCTGGGGATAAACCTACTTACGTGTAAGTAGCTGAAGGTACCAGA
TGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGGAGGGTGCAAGCGTT
ATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGACTGATAAGTCAGTGGTGAAATCC
GACAGCTTAACTGTCGAACTGCCATTGATACT**GTTAGTCTTGAGTAAGGTTGAAGTGG**

注:加粗带下划线的序列分别为上下游引物结合序列。

参 考 文 献

[1] 中国科学院微生物研究所.伯杰氏细菌鉴定手册(第九版)[M].北京:科学出版社,1994,354-386.

[2] 陈爱平,江育林,钱东,等.蛙脑膜炎败血金黄杆菌病.中国水产,2012,5:51-52.

[3] 周永灿,朱传华,陈国华,等.虎纹蛙白内障病原的分离鉴定及其免疫防治.上海水产大学学报,2001,10(1):16-21.

[4] Zhen-Yu Xie,Zhou-Yong Can,Shi-Feng Wang,*et al*.First First isolation and identification of Elizabethkingia meningoseptica from cultured tiger frog,Rana tigerina rugulosa.Veterinary Microbiology,2009,138:140-144.

[5] Yi-Cheng Chang,Hsueh-Hsia Lo,Hsiu-Ying Hsieh,*et al*.Identification and epidemiological relatedness of clinical Elizabethkingia meningoseptica isolates from central Taiwan[J].Journal of Microbiology,Immunology and Infection,2014,47,318-323.

