



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1682—2010
代替 SN/T 1682—2005

蜜蜂欧洲幼虫腐臭病检疫技术规范

Quarantine protocol for European foulbrood of honey bees

2010-11-01 发布

2011-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
蜜蜂欧洲幼虫腐臭病检疫技术规范
SN/T 1682—2010

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100013)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)64275323

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 17 千字
2012 年 10 月第一版 2012 年 10 月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066 • 2-24069 定价 16.00 元

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1682—2005《蜜蜂欧洲幼虫腐臭病诊断方法》。

本标准修改采用了 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2010 版)中 2.2.3.B 中的诊断技术部分内容,涵盖了镜检、培养方法及聚合酶链反应法。

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:中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:王振国、陈世松、刘金华、宋战昀、蔡阳、苏琳、孟庆峰、朱开元、王建、魏春艳、王伟利。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1682—2005。

蜜蜂欧洲幼虫腐臭病检疫技术规范

1 范围

本标准规定了蜜蜂欧洲幼虫腐臭病的诊断方法。
本标准适用于蜜蜂欧洲幼虫腐臭病诊断。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 18088 出入境动物检疫采样

3 诊断原理

蜜蜂欧洲幼虫腐臭病(European foulbrood of honey bees)是由蜂房蜜蜂球菌(*Melissococcus plutonius*)引起蜜蜂幼虫死亡的一种细菌性传染病，在蜂群迅速生长时多发，最常见的明显症状是蜜蜂幼虫在巢房封盖前不久死亡。大多数患病幼虫死前在巢房底部发生卷曲变形，许多患病幼虫很快被护理工蜂发现，清除，留下空巢房。未被工蜂清除的感染幼虫不久死亡变软，由浅黄色逐渐变成褐色，溶化成半液体状团块，然后干枯，形成深色鳞片，很容易从巢房中取出。严重感染的幼虫有一种酸臭味。引起蜜蜂幼虫的死亡也有其他疾病和原因，因此野外依据观察临床症状不能做出可靠诊断。

当依据临床症状疑似为欧洲幼虫腐臭病时，可取患病或死亡幼虫进行涂片染色镜检，做出初步诊断。在普通光学显微镜下，蜂房蜜蜂球菌呈单个或成串或头尾相接成对或成短链状排列的短披针状球菌，大小为 0.5 μm×1.0 μm。确切的诊断需要进行细菌分离培养和染色镜检鉴定，或用半巢式聚合酶链式反应法(polymerase chain reaction, PCR)对分离培养物进行鉴定。也可直接采用半巢式 PCR 检测患病或死亡幼虫来进行确诊。

本标准中采用的半巢式 PCR 法，是根据蜂房蜜蜂球菌 16S rRNA 基因设计一对引物(MP1 和 MP2)，进行第一次 PCR 扩增，扩增片段为 486 bp(参见附录 A)。以该扩增基因为模板设计第三条引物(MP3)，以 MP1 和 MP3 为引物进行第二次 PCR 扩增，扩增片段为 276 bp。

4 设备、材料与试剂

4.1 设备

电泳仪、凝胶成像分析系统、高速台式冷冻离心机(最高转速 12 000 r/min 以上)、PCR 扩增仪、普通光学显微镜、CO₂ 培养箱等。

4.2 材料与试剂

试剂配制方法参见附录 B，所用水为按照 GB/T 6682 规定的一级水。所用试剂主要为 DNA 抽提缓冲液、CTAB 沉淀液、1.2 mol/L 氯化钠溶液、三氯甲烷、异丙醇、70%乙醇、Taq DNA 聚合酶、10×

PCR 缓冲液、dNTPs(含 2.5 mmol/L dATP, 2.5 mmol/L dCTP, 2.5 mmol/L dGTP, 2.5 mmol/L dTTP)、10×氯化镁(25 mmol/L)、10 μg/mL RNaseA、10 mg/mL 溴化乙锭贮存液、相对分子质量标准品(100 bp ~ 1 000 bp)、琼脂糖(电泳纯)、50×TAE 电泳缓冲液、蜂房蜜蜂球菌标准菌株(*Melissococcus pluton*)、引物 MP1 5'-CTTTGAACGCCTTAGAGA-3'、引物 MP2 5'-ATCATCTGTCCCACCTTA-3'、引物 MP3 5'-TTAACCTCGCGGTCTTGCGTCTCTC-3'、分离琼脂培养基平板、分离琼脂培养基斜面等。

5 样品采集

按 GB/T 18088 规定的方法采样,或直接采集疑似感染的蜜蜂幼虫或蜂巢的病变区域。

6 实验室诊断

6.1 直接镜检法

6.1.1 涂片

刚死去的幼虫最适合于诊断。将刚死去的完整幼虫,置载玻片上直接抹成涂片,或用两把镊子夹住虫体中心部位的表皮并拉开,把中肠内容物暴露在载玻片上。挑取少量中肠内容物,加少量灭菌生理盐水制成悬液。取一接种环中肠内容物悬液,置干净载玻片上涂匀,自然风干或置火焰上慢慢干燥。

6.1.2 染色

进行革兰氏或石炭酸复红等染色。

6.1.3 镜检

在普通光学显微镜下进行检查,如发现 0.5 μm×1.0 μm 大小的单个或成串或头尾相接成对或成短链状排列的短披针状球菌,可以初步诊断为欧洲幼虫腐臭病,确切诊断需要进行细菌分离培养或进行半巢式 PCR 法鉴定。镜检时视野内也可见到末端呈方形的细长杆状菌(参见附录 C)。如果用整只幼虫或腐烂分解幼虫制成的悬液进行检查时,可见到杂乱无章排列的细菌,这样就很难区别蜂房蜜蜂球菌。

6.2 分离培养法

6.2.1 分离培养

经镜检或根据临床症状疑为欧洲幼虫腐臭病时,按无菌操作取发病幼虫少许,最好是发病幼虫中肠内容物,加少量无菌生理盐水制成稀释悬液。用接种环取此悬液划线接种于分离琼脂培养基平板(参见附录 B)。可疑样品应与标准参考菌株同步培养,以进行质量控制,确保试验结果准确。接种后的培养基置于含 5%~10% CO₂ 的厌氧培养箱中,(35±1)℃ 进行厌氧培养(此厌氧条件是必须的),通常 4 d 内形成可见的白色不透明小菌落。

挑取单个可疑菌落,接种分离琼脂培养基斜面,置于含 5%~10% CO₂ 的厌氧培养箱中,(35±1)℃ 厌氧培养,当有细菌明显生长时,将培养管密封,置 4℃ 冰箱可保存 6 个月。同时挑取菌落进行染色镜检及进行下述的鉴别检测。

6.2.2 鉴定

其他许多细菌常与蜂房蜜蜂球菌并存,而造成混淆。腐败细菌在感染蜂房蜜蜂球菌的幼虫体内大

量存在,为单个或链状细长平端杆菌。在特定的培养基中生长时,近似于链球菌,可与蜂房蜜蜂球菌混淆,但在蜂房蜜蜂球菌的必须培养条件下,生长较差,呈细杆状形态。

粪链球菌在形态上与蜂房蜜蜂球菌极为相似,易混淆。体外培养时,粪链球菌在适宜于蜂房蜜蜂球菌生长条件下生长良好,通过有氧条件下的生长能力可以鉴别,粪链球菌在有氧条件下 24 h 内可形成透明小菌落。在蜜蜂幼虫体内,粪链球菌的数量很少有超过蜂房蜜蜂球菌的,而且在没有蜂房蜜蜂球菌的蜜蜂幼虫体内,粪链球菌不能繁殖,因此可推断,当有大量粪链球菌在幼虫体内存在时,表明存在欧洲幼虫腐臭病。

在欧洲幼虫腐臭病感染的蜂群中,蜂房芽孢杆菌比粪链球菌更加普遍,其芽孢常常超过其他所有细菌,能产生一种特征性的恶臭。在体外蜂房蜜蜂球菌生长的必要条件下,蜂房芽孢杆菌生长不良,产生一种扩散性生长菌落透明物,以弧形运动覆盖琼脂表面,通过镜检可与蜂房芽孢杆菌区别。

对于上述分离培养物,也可直接采用下述半巢式 PCR 法进行鉴定。

6.2.3 结果判定

当发现大小为 $0.5\ \mu\text{m}\times 1.0\ \mu\text{m}$,单个或成串或头尾相接成对或成短链状排列的短披针状球菌,并能与蜂房芽孢杆菌、粪链球菌和腐败细菌相区别时,可诊断为蜜蜂欧洲幼虫腐臭病。

6.3 半巢式 PCR 法

6.3.1 样品核酸提取及纯化

取发病幼虫虫体或虫体中肠内容物悬液少许,或挑取可疑蜂房蜜蜂球菌菌落,加入 1.5 mL DNA 抽提缓冲液并涡旋震荡 30 s,65 °C 水浴 30 min。室温 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 800 μL ,加入 5 μL RNaseA(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 °C 保温 30 min。加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24/1,体积比),颠倒混匀 1 min,室温 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 600 μL ,加入 2 倍体积的 CTAB 沉淀液,混匀,室温放置 30 min。室温 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。加入 800 μL 氯化钠溶液(1.2 mol/L)溶解沉淀,待沉淀溶解后室温放置 5 min,加入等体积三氯甲烷/异戊醇(24/1,体积比),颠倒混匀。室温 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 600 μL ,移入 1.5 mL 的离心管中,加入 0.6 倍体积的异丙醇,混匀,室温放置 30 min。4 °C,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。用 70%冷乙醇 200 μL 洗涤沉淀两次,自然干燥后加入 50 μL TE 缓冲液(pH8.0)或去离子水溶解核酸沉淀,-20 °C 保存。

也可选用相应的商品化试剂盒提取和纯化样品核酸,按使用说明书进行操作。

6.3.2 标准菌株对照样品核酸提取及纯化

把蜂房蜜蜂球菌标准菌株接种分离琼脂培养基斜面,置于 5%~10% CO_2 条件下,(35 \pm 1)°C 厌氧培养,有明显细菌生长时,取菌落进行核酸提取。

取蜂房蜜蜂球菌菌落,加入 1.5 mL DNA 抽提缓冲液,按 6.3.1 方法提取纯化核酸,作为阳性对照模板。

6.3.3 PCR 检测

6.3.3.1 PCR 反应体系的建立

用蜂房蜜蜂球菌核酸作为阳性对照模板、蜜蜂健康虫体核酸作为阴性对照模板、等体积双蒸水代替模板核酸作为空白对照,检测蜂房蜜蜂球菌 16S rRNA 基因。按照表 1 所示,加入样品核酸、蜂房蜜蜂球菌核酸、阴性对照样品核酸及其他成分,配制第一轮扩增体系。按照表 1 所示,加入第一轮扩增产物、蜂房蜜蜂球菌核酸、阴性对照样品核酸及其他成分,配制第二轮扩增体系。

表 1 蜂房蜜蜂球菌 16S rRNA 基因的巢式 PCR 反应体系

成 分	第一轮扩增	第二轮扩增
10×PCR 缓冲液	5 μL	5 μL
dNTP(各 2.5 mmol/L)	5 μL	5 μL
10×氯化镁(25 mmol/L)	6 μL	3 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)	0.2 μL	0.2 μL
MP1(20 pmol/μL)	2 μL	2 μL
MP2(20 pmol/μL)	2 μL	—
MP3(20 pmol/μL)	—	2 μL
样品 DNA	2 μL	—
第一轮 PCR 扩增产物	—	1 μL
双蒸水	至 50 μL	至 50 μL

6.3.3.2 PCR 反应条件及扩增

PCR 反应循环参数见表 2,按照表中规定设置循环参数,进行第一轮和第二轮扩增。

表 2 PCR 反应参数

扩增轮数	引物	扩增片段长度	PCR 反应条件			
			预变性	扩增	循环数	最终延伸
第一轮	MP1,MP2	486 bp	95℃,2 min	95℃,30 s 61℃,15 s 72℃,60 s	40	72℃, 5 min
第二轮	MP1,MP3	276 bp	95℃,2 min	95℃,30 s 55℃,15 s 72℃,60 s	40	72℃, 5 min

6.3.4 PCR 扩增产物电泳检测

配制 2%琼脂糖凝胶,加入溴化乙锭溶液至终浓度为 0.5 μg/mL。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。将 5 μL~8 μL 第一轮和第二轮 PCR 扩增产物分别与适量加样缓冲液混匀,点样。3 V/cm~5 V/cm 恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部。紫外检测仪下观察电泳结果并记录。

6.3.5 结果判定

对扩增产物进行电泳分析,观察是否出现预期大小的扩增产物条带(第一轮 PCR 扩增产物长度为 486 bp),并观察阳性对照、阴性对照及空白对照是否成立。以第一轮扩增产物为模板进行第二轮扩增,第二轮扩增目的产物长度为 276 bp。

对第二轮扩增产物进行电泳分析,如果阳性对照、阴性对照和空白对照成立,测试样品出现预期大小的目的扩增产物条带,则可诊断为蜜蜂欧洲幼虫腐臭病;如果所有具有代表性的样品均未出现预期大小的扩增产物条带,则可诊断为非蜜蜂欧洲幼虫腐臭病。如需进一步确证,可进行测序分析,相关序列信息参见附录 A。

附 录 A

(资料性附录)

第一轮 PCR 扩增产物序列

CTTTGAACGCCTTAGAGATAAGGTTTCTCCTTCGGGAGCAAAGAGACAGGTGGTGCATGG
CTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTA
TTGTTAATTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGGAAGTACAGAGAGACGCAAGACCGCGAGGTAAAGCAAATCTCATAAAGCTTCTC
TCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCG
GATNNGCACGCCGCGGTGAATACGTTCNNGGGCCTTGTAACACCGCCCGTCACACCAC
GAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTAGGGAGCCAGCCGCCTAAGGTG
GGACAGATGAT

附 录 B
(资料性附录)
试剂的配制

B.1 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0):

称取 121.1 g 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris),溶于 800 mL 水中,搅拌,加入浓盐酸 42 mL,冷却至室温,用稀盐酸准确调节 pH 至 8.0,加水定容至 1 L,分装后高压灭菌备用。

B.2 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0):

称取 186.1 g 乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),加入 800 mL 水,用磁力搅拌器剧烈搅拌,用氢氧化钠调节溶液 pH 值至 8.0(约需 20 g 氢氧化钠颗粒),然后加水定容至 1 L,分装后高压灭菌备用。

B.3 DNA 抽提缓冲液:

1 mol/L Tris-HCl	100 mL
0.5 mol/L EDTA	50 mL
十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)	20.0 g
氯化钠	81.8 g
聚乙烯吡咯酮-40(PVP-40)	20.0 g

加水定容至 1 L,分装后高压灭菌备用。

B.4 CTAB 沉淀液:

CTAB	5.0 g
氯化钠	2.3 g

加水溶解定容至 1 L,分装后高压灭菌备用。

B.5 1.2 mol/L 氯化钠溶液:

氯化钠	70.1 g
-----	--------

加水溶解定容至 1 L,分装后高压灭菌备用。

B.6 TE 缓冲液(Tris-HCl、EDTA 缓冲液):

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

加水定容至 1 L,分装后高压灭菌备用。

B.7 50×TAE 电泳缓冲液:

Tris	484.0 g
冰醋酸	114.2 mL
0.5 mol/L EDTA	200 mL

溶于水后,定容至 2 L,分装后高压灭菌备用。

B.8 分离琼脂培养基:

酵母浸出物	10 g
半胱氨酸或胱氨酸	0.2 g~2.0 g
葡萄糖或果糖	10 g
可溶性淀粉	10 g
磷酸二氢钾	13.7 g
琼脂	20 g

加水定容到 1 L,pH 6.6,分装成 100 mL 每瓶,116 °C 高压灭菌 20 min。倾注平板或斜面,备用。

附录 C
(资料性附录)
三种细菌的形态区别

蜂房蜜蜂球菌(*Melissococcus plutonius*):以单个、长链或成丛存在,形态上常与继发感染的粪链球菌相似。见图 C. 1。

蜂房芽孢杆菌(*Bacillus dlvei*):其繁殖菌体为 $(2.0\ \mu\text{m}\sim 7.0\ \mu\text{m})\times(0.8\ \mu\text{m}\sim 1.2\ \mu\text{m})$,有鞭毛,一端出芽,繁殖体和芽孢都比幼虫芽孢杆菌大。见图 C. 2。

腐败细菌(*Bacterium eurydice*):在体内呈细长、末端方形的杆状菌,而在体外某种培养基上则为链状球菌。见图 C. 3。



图 C. 1



图 C. 2

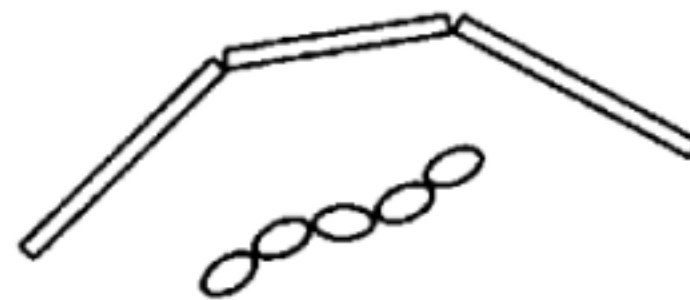


图 C. 3



SN/T 1682-2010

书号:155066 · 2-24069

定价: 16.00 元