

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3985—2014

水生动物链球菌感染检疫技术规范

Quarantine protocol for infection with streptococcus in aquatic animals

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

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：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、福建医科大学附属第一医院。

本标准主要起草人：王武军、白泉阳、张吉红、高丽钦、郑腾、张体银、于师宇、张志灯、林素洁。

水生动物链球菌感染检疫技术规范

1 范围

本标准规定了鱼类链球菌的临床诊断、病原分离、生化鉴定和聚合酶链式反应的检测方法。
本标准适用于鱼类链球菌感染的临床诊断、病原鉴定与检疫。

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 4789.28 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

SC/T 7103 水生动物产地检疫采样技术规范

3 概述

鱼类链球菌感染简介参见附录 A。

4 临床诊断

4.1 临床症状

病鱼呈急性嗜神经组织病症,行为异常,如螺旋状或旋转式游泳,在水面作头向上或者尾向上的转圈游动。身体呈 C 形或逗号样弯曲。眼眶周围和眼球内出血,眼球浑浊,眼球突出。鳃盖内侧发红、充血或强烈出血。病鱼腹部体表具点状或斑块出血或溃疡。肛门发红。但在高温季节,病鱼呈急性感染时,有可能未表现临床症状时病鱼已死亡。可根据眼球突出、鳃盖内侧出血和异常神经性运动等典型症状作初步诊断。

4.2 病理变化

病鱼心外膜肥厚。腹腔明显出血,肝脏和腹腔脂肪出血。肝脏、胆囊、脾脏肿大、出血,严重时糜烂。肠炎,肠道内有积水或黄色粘液,肛门突出。

5 实验室诊断

5.1 设备、材料和试剂

5.1.1 主要设备

5.1.1.1 天平:读数精度 0.1 g。

- 5.1.1.2 冰箱。
- 5.1.1.3 培养箱。
- 5.1.1.4 恒温水浴锅。
- 5.1.1.5 生物显微镜。
- 5.1.1.6 II级生物安全柜。
- 5.1.1.7 红外加热器。
- 5.1.1.8 台式冷冻高速离心机。
- 5.1.1.9 PCR 仪。
- 5.1.1.10 电泳仪。
- 5.1.1.11 凝胶成像仪。
- 5.1.1.12 灭菌试管。
- 5.1.1.13 灭菌吸管。
- 5.1.1.14 单道可调微量移液器($2\ \mu\text{L}\sim 20\ \mu\text{L}$, $20\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$, $100\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$)及其配套吸头。

5.1.2 材料和试剂

- 5.1.2.1 水:符合 GB/T 6682 中三级水的规格要求。
- 5.1.2.2 除另有规定,所用试剂均为分析纯。
- 5.1.2.3 普通琼脂绵羊血平板培养基、脑心浸液(BHI)培养基及其琼脂培养基的制备方法见附录 B。
- 5.1.2.4 革兰染色液。
- 5.1.2.5 过氧化氢酶试剂。
- 5.1.2.6 细菌生化鉴定管或商品化生化鉴定试剂盒。
- 5.1.2.7 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 5.1.2.8 商品化 DNA 扩增试剂盒: $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存,不要反复冻融。
- 5.1.2.9 扩增海豚链球菌 16SrRNA 的 297 bp 片断的引物序列如下:
Sin-F: 5'-CTAGAGTACACATGTAAG-3'
Sin-R: 5'-GGATTTTCCACTCCCATTAC-3'
- 5.1.2.10 扩增无乳链球菌 CAMP 因子 cfb 基因的 468 bp 片断的引物序列如下:
Sag-F: 5'-AAGCGTGTATTCCAGATTTCCT-3'
Sag-R: 5'-CAGTAATCAAGCCCAGCAA-3'
- 5.1.2.11 其他试剂:无水乙醇、琼脂糖(电泳纯)、分子量标准($100\ \text{bp}\sim 1\ 000\ \text{bp}$)。
- 5.1.2.12 电泳缓冲液、电泳加样缓冲液、溴化乙锭(EB)染色液,配制方法见附录 B。
- 5.1.2.13 商品化 DNA 纯化回收试剂盒。
- 5.1.2.14 海豚链球菌、无乳链球菌标准菌株,由相关菌种保藏机构提供。

5.2 样品采集

对病鱼,急性病例可无菌采集肝、头肾、脾脏等组织,慢性病例可无菌采集脑、头肾、肝、脾脏、眼等组织,以采集病鱼的脑和头肾为佳。采样数量、包装和运输参照 GB/T 18088 和 SC/T 7103。

5.3 细菌分离、培养和鉴定

5.3.1 细菌分离、培养和初步鉴定

5.3.1.1 送检病料的细菌分离和组织触片检查

凡是涉及生物安全的操作和处理均应符合 GB 19489 的相关规定。用经红外加热器灭菌并冷却的接种环蘸取病料内部组织后划线接种于普通琼脂绵羊血平板(见 B.1),于 $29\ ^\circ\text{C}$ 培养 24 h,如菌落生长

缓慢,可延长至 48 h 后观察,使之形成单个菌落,以供后续鉴定用。同时取病料做组织触片,姬姆萨染色(按 GB/T 4789.28 的方法进行染色)后镜检,如见球菌则表明病料中可能含有链球菌。

5.3.1.2 增菌培养

挑取在普通琼脂绵羊血平板上生长的单个可疑菌落分别接种脑心浸液(BHI)培养液和 BHI 琼脂斜面(见 B.2 和 B.3),29 °C 培养 24 h。

5.3.1.3 初步鉴定

5.3.1.3.1 血琼脂平板培养特性

在 29 °C 培养 24 h 后,海豚链球菌和无乳链球菌均在普通琼脂绵羊血平板上形成圆形、微凸、表面光滑、湿润、边缘整齐、半透明的菌落,直径约 0.3 mm~1.0 mm,海豚链球菌呈 β 溶血,无乳链球菌呈 β 溶血(有时呈 α 溶血或 γ 溶血)。

5.3.1.3.2 革兰染色

取可疑菌落做革兰染色(按 GB/T 4789.28 的方法进行染色),海豚链球菌和无乳链球菌为革兰阳性球菌,菌体直径约 1.0 μm ,固体培养物以双球菌为多,少量呈 3~5 个排列的短链,液体培养物以链状为主,无芽孢,能形成荚膜。

5.3.1.3.3 过氧化氢酶试验

取可疑菌落做过氧化氢酶试验,海豚链球菌和无乳链球菌均为阴性。

5.3.1.3.4 初步判断

菌落生长特征、革兰染色、菌体形态和过氧化氢酶试验与上述描述相符合的菌株,可初步确定为鱼类链球菌。

5.3.2 生化鉴定

经 5.3.1.3 初步确定为鱼类链球菌的菌株,进行如下生化鉴定试验:Lancefield 氏群特异性抗原群鉴定(兰氏分群)、含 6.5%氯化钠肉汤的活力试验、马尿酸钠、七叶苷、甘露醇、山梨醇、乳糖、菊糖、棉实糖、海藻糖、水杨苷试验。或应用商品化的细菌生化鉴定系统进行生化鉴定。海豚链球菌和无乳链球菌上述生化鉴定试验结果见附录 C。

5.4 PCR 检测

5.4.1 DNA 提取

5.4.1.1 DNA 提取可选用等效的商品化试剂盒或等效的提取方法,下面以 TIANGEN¹⁾ 公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)进行 DNA 提取。

5.4.1.2 取分离菌的肉汤培养物 1 mL 于 1.5 mL 灭菌离心管中,11 500 g 离心 1 min,沉淀菌体,吸弃上清液。

5.4.1.3 向菌体沉淀中加入溶菌酶进行破壁处理,具体方法为:加入 180 μL 缓冲液(20 mmol/L Tris, pH 8.0;2 mmol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$;1.2% Triton;终浓度为 20 mg/mL 的溶菌酶),37 °C 处理 30 min。

1) 使用 TIANGEN 公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)只是为了叙述方便,并不代表推荐 TIANGEN 公司的产品,标准的使用者可以使用其他公司的同类产品。

SN/T 3985—2014

5.4.1.4 向管中加入 20 μL Proteinase K 溶液,混匀。

5.4.1.5 加入 220 μL 缓冲液 GB,振荡 15 s,70 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min,溶液应变清亮,简短离心以去除管盖内壁的水珠。

5.4.1.6 加 220 μL 无水乙醇,充分振荡混匀 15 s,此时可能会出现絮状沉淀,简短离心以去除管盖内壁的水珠。

5.4.1.7 将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中(吸附柱放入收集管中),13 400 g 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放入收集管中。

5.4.1.8 向吸附柱 CB3 中加入 500 μL 缓冲液 GD,13 400 g 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱 CB3 放入收集管中。

5.4.1.9 向吸附柱 CB3 中加入 600 μL 漂洗液 PW,13 400 g 离心 30 s,倒掉废液,吸附柱 CB3 放入收集管中。

5.4.1.10 重复操作步骤 5.4.1.9。

5.4.1.11 将吸附柱 CB3 放回收集管中,13 400 g 离心 2 min,倒掉废液。将吸附柱 CB3 置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

5.4.1.12 将吸附柱 CB3 转入一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 μL 洗脱缓冲液 TE,室温放置 2 min~5 min,13 400 g 离心 2 min,将溶液收集到离心管中。可重复洗脱一次。

5.4.1.13 将 DNA 提取液进行 PCR 检测,或于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

5.4.2 PCR 扩增 DNA

5.4.2.1 反应体系

扩增 DNA 按照 TIANGEN²⁾ 公司的 DNA 扩增试剂盒(2 \times Taq PCR MasterMix)进行。25 μL 反应体系内含 2 \times Taq PCR MasterMix 反应液 12.5 μL (含 Taq 酶 1.25 U),10 $\mu\text{mol/L}$ Sin-F、Sin-R 引物对各 1.0 μL (或 10 $\mu\text{mol/L}$ Sag-F、Sag-R 引物对各 1.0 μL),灭菌双蒸水 8.5 μL ,样品或对照模板 DNA 2 μL 。

同时设立阳性对照、阴性对照和空白对照。以阳性标准菌株提取的 DNA 或人工合成的含目的片段的质粒为阳性对照、以培养基为阴性对照、以灭菌双蒸水作为空白对照。

5.4.2.2 反应条件

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

5.4.3 琼脂糖凝胶电泳

用 TBE 电泳缓冲液(配制方法见 B.4)配制 1.5% 的琼脂糖,加热完全溶解后,制成凝胶平板。待冷却后,将凝胶平板放入水平电泳槽,加入电泳缓冲液至充分没过凝胶面,取下梳子。将 8 μL PCR 产物和 2 μL 电泳加样缓冲液(配制方法见 B.5)混匀后加入凝胶孔中进行电泳。在电泳时设立 DNA 标准分子量 Marker 作对照。5 V/cm 电泳约 40 min,当溴酚蓝到达凝胶块底部时停止电泳。

5.4.4 凝胶成像分析和测序

将电泳完毕的凝胶放入含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EB(配制方法见 B.6)溶液中染色 10 min~30 min 后,在水中漂洗凝胶,用凝胶成像仪观察,拍照。

2) 使用 TIANGEN 公司的 2 \times Taq PCR MasterMix DNA 扩增试剂盒进行描述只是为了叙述方便,并不代表推荐 TIANGEN 公司的产品,标准的使用者可以使用其他公司的同类产品。

被检样品如在 297 bp 处或 468 bp 处有特异性扩增条带的,应切胶回收 DNA 片段进行测序,参考序列参见附录 D。

5.4.5 结果判定

阴性对照和空白对照无条带,阳性对照分别在 297 bp 处(海豚链球菌)或 468 bp 处(无乳链球菌)有特异性扩增条带时,实验成立。

被检样品在 297 bp 处有特异性扩增条带并经测序验证者,为海豚链球菌阳性。被检样品在 468 bp 处有特异性扩增条带并经测序验证者,为无乳链球菌阳性。

被检样品无条带或条带的大小不是 297 bp 或 468 bp 的,为海豚链球菌阴性或无乳链球菌阴性。

6 综合判断

6.1 符合以下特性者应判为鱼类海豚链球菌感染

临床症状和病理变化符合第 4 章中的描述;革兰染色为阳性球菌,单个、成对或成链存在;过氧化氢酶试验阴性;呈 β 溶血;主要生化特性符合 5.3.2 中的描述;海豚链球菌 PCR 检测结果为阳性。

6.2 符合以下特性者应判为鱼类无乳链球菌感染

临床症状和病理变化符合第 4 章中的描述;革兰染色为阳性球菌,单个、成对或成链存在;过氧化氢酶试验阴性;呈 β 溶血(有时呈 α 溶血或 γ 溶血);主要生化特性符合 5.3.2 中的描述;无乳链球菌 PCR 检测结果为阳性。

7 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 的规定执行。

附 录 A
(资料性附录)
鱼类链球菌感染简介

链球菌属(*Streptococcus*)是一个具有庞大种群的属,该属已发现至少有 60 多个菌种和亚种,在水生动物中致病性链球菌属病原菌种群种类并不多,从养殖鱼类上已经分离到的链球菌有海豚链球菌(*S.iniae*)、无乳链球菌(*S.agalactiae*)、难辨链球菌(*S.diffucilis*)、米氏链球菌(*S.milleri*)、副乳房链球菌(*S.parauberis*)、停乳链球菌(*S.dysgalactiae*),但已报道的致病性链球菌主要是海豚链球菌和无乳链球菌,海豚链球菌和无乳链球菌均为革兰染色阳性球菌,呈对或链状,可引起虹鳟、罗非鱼、牙鲆、黄颡鱼、尖吻鲈、花鲈、真鲷、银鲑、石斑鱼、斑点叉尾鲟、美国红鱼等多种海、淡水鱼类发病,并且对于不同养殖鱼类存在一定的选择性。迄今为止,已有淡水养殖鱼类 29 种、广盐性鱼类和海水鱼类 50 余种易感海豚链球菌或无乳链球菌。

鱼类链球菌感染在世界各主要鱼类养殖国家均有发生,对温带和热带、亚热带地区养殖鱼类危害尤为严重,已有 6 大洲的美国、以色列、日本、科威特、泰国、中国、越南、巴西等 23 个国家报道了鱼类链球菌感染。目前,鱼类链球菌感染已经成为一种呈世界性分布的疾病,每年给世界水产养殖业造成巨大的经济损失。我国南部沿海各地主要罗非鱼养殖区,近年均不同程度的暴发鱼类链球菌感染。对该病的防治重点在于对病原菌快速准确的分离和鉴定,及后续处理和预防。

鱼类链球菌感染通常发生于春、夏、秋季,在水温长期过高、缺氧或养殖密度过大等情况下暴发,以 7 月至 9 月为流行高峰期。流行水温 25℃~37℃,尤其水温高于 30℃时易导致疾病急性暴发,该病传染性强,发病率一般达到 20%~30%,病鱼的死亡率达 80%以上,发病和死亡高峰可持续 2 周~3 周;低水温季节则往往呈慢性病程,死亡率也较低,但是持续时间可达几周甚至几个月。从稚鱼到成鱼均可感染,亲鱼和较大规格的鱼则更易感染。

受到链球菌感染的鱼类,出现明显症状的部位首先是头部,致病菌能迅速破坏鱼体的脑神经,继而通过血液循环破坏肝、肾、心、脾等器官引发全身性病变。具体表现为眼球突出、眼眶周围和眼球内出血,部分鱼眼结膜混浊发白,甚至眼球脱落;下颌和鳃盖下缘呈弥散性出血,腹部体表具点状或斑块出血及溃疡,肛门突出红肿。解剖通常可见肝脏、胆囊、脾脏肿大、出血,其中胆囊肿大最为明显,部分病鱼的肝脏表面可见白斑状结节。急性感染时可见内脏各器官(包括肝、胆、脾、肠等)广泛出血,严重时,内脏各器官与周围体壁发生广泛性粘连、腹腔中有大量纤维性渗出物,引起腹膜炎。

鱼类链球菌感染可根据眼球突出和鳃盖内侧出血,以及神经性运动等典型临床症状做初步诊断。确诊需从病灶组织分离细菌,进行细菌培养特性、革兰染色、生化试验、对 16SrRNA 等特异性目的基因进行 PCR 扩增、测序、序列比对等进一步鉴定。

附 录 B
(规范性附录)
培养基及试剂配制方法

B.1 普通琼脂绵羊血平板

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠(NaCl)	5.0 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL
脱纤维无菌绵羊血	50 mL

除无菌绵羊血外,其他各成分混匀,加热溶解,调至 pH 7.6 后分装入锥形瓶,115 ℃ 灭菌 15 min,冷却至 45 ℃ 时,加入 5% 无菌脱纤维绵羊血,混匀后倾注灭菌平板或一次性使用平板。4 ℃ 保存备用。

B.2 脑心浸液(BHI)培养基

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
蒸馏水	1 000 mL

将以上各成分混匀,加热煮沸至完全溶解,冷却至室温,调至 pH 7.4 后分装试管,115 ℃ 灭菌 15 min,冷却至室温,4 ℃ 保存备用。

B.3 脑心浸液(BHI)琼脂培养基

在 B.2 脑心浸液(BHI)培养基中加入 15.0 g 琼脂,各成分混匀,加热煮沸至完全溶解,冷却至室温,调至 pH 7.4 后分装试管,115 ℃ 灭菌 15 min,冷却制成试管斜面,4 ℃ 保存备用。

B.4 TBE 电泳缓冲液(5 倍浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
蒸馏水	1 000.0 mL

用 5.0 mol/L 的盐酸调 pH 到 8.0,室温储存。使用时,用蒸馏水 10 倍稀释至工作浓度。

B.5 6×电泳加样缓冲液

称取溴酚蓝 200 mg,加水 10 mL,室温下过夜溶解;再称取蔗糖 50.0 g,加水溶解后与溴酚蓝溶液混合均匀;加水定容至 100 mL,再加入 1 mol/L NaOH 1~2 滴,调至蓝色。

B.6 EB 染色液

戴手套小心称量 200 mg EB,转移到棕色广口瓶中,加入 20 mL 水或者 TE,搅拌至完全溶解,配制成 10 mg/mL 的浓缩液,于 4 ℃ 储存。使用时每 20 mL 水或者 TE 溶液中加入 1 μL 浓缩液,配制成 0.5 μg/mL 的 EB 染色液。

附 录 C
(规范性附录)

海豚链球菌、无乳链球菌和停乳链球菌主要生理生化反应特性

表 C.1 海豚链球菌、无乳链球菌和停乳链球菌主要生理生化反应特性

项 目	海豚链球菌(<i>S.iniae</i>)	无乳链球菌(<i>S.agalactiae</i>)	停乳链球菌(<i>S.dysgalactiae</i>)
兰氏分群	—	B	C
6.5%氯化钠肉汤的活力试验	—	—	—
马尿酸钠	—	+	—
七叶苷	+	—	—
甘露醇	?	—	—
山梨醇	—	—	—
乳糖	—	+	+
菊糖	—	—	—
棉实糖	?	—	—
海藻糖	+	—	+
水杨苷	+	(+)	—
注 1: +, 阳性反应; —, 阴性反应; (+), 反应缓慢; ?, 不确定。			
注 2: 此表中增列停乳链球菌的主要生理生化反应特性, 以便于同海豚链球菌和无乳链球菌鉴别。			

附录 D
(资料性附录)
扩增产物的参考序列

D.1 海豚链球菌扩增产物的参考序列[16SrRNA 的 297 bp 片段序列(177 bp~473 bp)]

```
ctagagtaca catgtactta atttaaaagg agcaattgct tcactatgag atggacctgc
gttgatttag ctagtgggtg aggttaacggc tcaccaaggc gacgatacat agccgacctg
agagggtgat cggccacact gggactgaga cagggcccag actectacgg gaggcagcag
tagggaatct tcggcaatgg acggaagctc gaccgagcaa cgccgcgtga gtgaagaagg
tttccggatc gtaaagctct gttgttagag aagaacg gta atgggagtgg aaaatcc
```

D.2 无乳链球菌扩增产物的参考序列[*cfb* 基因的 468 bp 片段序列(132 bp~599 bp)]

```
taatcaagcc cagcaa atgg ctcaaagct tgatcaagat agcattcagt tgagaaatat
caaagataat gttcaggga cagattatga aaaaacgggt aatgaggcta ttactagtgt
tgaaaaatta aagacttcat tgcgtgcaa ccctgagaca gtttatgatt tgaattctat
tggtagtcgt gtagaagcct taacagatgt gattgaagca atcactttt caactcaaca
tttagcaaat aaggttagtc aagcaaatat tgatatggga ttgggataa ctaagctggt
tattcgcat ttagatccat ttgcttcagt tgattcaatt aaagctcaag ttaacgatgt
aaaggcatta gaacaaaagg ttttaactta tcctgattta aaaccaactg atagagctac
catctataca aaatcaaaac ttgata agga aatctggaat acacgctt
```