

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2962—2016

奶牛乳房炎乳汁中金黄色葡萄球菌、 凝固酶阴性葡萄球菌、无乳链球菌分 离鉴定方法

Methods for isolation and identification of *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *Staphylococcus* and *Streptococcus agalactiae* in milk from dairy cow with mastitis

2016-10-26 发布

2017-04-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所。

本标准主要起草人:王旭荣、李宏胜、李建喜、杨峰、王学智、张世栋、李新圃、杨志强、王磊、罗金印。

奶牛乳房炎乳汁中金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、 无乳链球菌分离鉴定方法

1 范围

本标准规定了奶牛乳房炎乳汁中病原性金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、无乳链球菌的分离和鉴定方法。

本标准适用于奶牛乳房炎(临床型乳房炎和隐性乳房炎)的病原菌诊断,所分离的病原菌可进一步开展药物敏感性检测,为奶牛乳房炎的治疗措施提供依据。

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 19489 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*

一种血浆凝固酶试验为阳性、革兰氏染色为阳性的葡萄球菌,是引起奶牛乳房炎的主要病原菌之一。

3.2

凝固酶阴性葡萄球菌 *coagulase negative Staphylococcus, CNS*

一类血浆凝固酶试验为阴性、革兰氏染色为阳性的葡萄球菌,是皮肤和黏膜的常居菌,常见的 CNS 主要包括表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、腐生葡萄球菌、路邓葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、产色葡萄球菌、鸡葡萄球菌、沃氏葡萄球菌等 20 多种。

3.3

无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae*

一种 CAMP 试验为阳性、革兰染色为阳性的 B 群链球菌,是引起奶牛乳房炎的主要病原菌之一。

3.4

CAMP 试验 *CAMP test*

CAMP 是 Christie, Atkins, Munch-Peterson 等人名的缩写,因本试验是他们三人所创建。CAMP 试验的原理是原来不溶血或溶血不明显的无乳链球菌,在有金黄色葡萄球菌产物存在时,呈明显的 β 型溶血,可区分无乳链球菌、停乳链球菌和乳房链球菌。在本标准中,用于无乳链球菌的鉴定。

3.5

nuc 基因 *thermonuclease gene*

耐热核酸酶是金黄色葡萄球菌的一种毒力因子,100℃作用 15 min 不失去活性,一般由致病菌产生。nuc 基因是编码耐热核酸酶的基因序列,在本标准中,nuc 基因用于金黄色葡萄球菌的 PCR 鉴定。

3.6

sip 基因 surface immunogenic protein gene

sip 蛋白是无乳链球菌的一种表面免疫相关蛋白,是暴露在菌体表面的一种具有黏附和定植作用的因子。sip 基因是编码 sip 蛋白的基因序列,基因序列保守。在本标准中,sip 基因用于无乳链球菌的 PCR 鉴定。

4 采样前检查

4.1 总则

在采集乳样前,首先对乳房外观和乳汁性状进行观察。

4.2 临床型乳房炎的检查

临床型乳房炎的检查至少包括以下 5 个方面:

- a) 乳房的大小、颜色、对称性和硬度;
- b) 乳房是否有发红、肿胀和发热;触摸时奶牛是否有疼痛反应及有无外伤或瘻管;
- c) 乳汁的气味和颜色;
- d) 乳汁有无絮片、凝块;
- e) 奶产量的变化。

4.3 临床型乳房炎的判定

奶牛乳区出现红、肿、热、痛或乳汁性状改变(乳汁颜色改变,或乳汁呈水样或有絮状或有乳凝块或血乳)等症状,则可判定为临床型乳房炎。

4.4 隐性乳房炎的检查与判定

隐性乳房炎可参照 NY/T 2692 的规定进行检验判定,也可用商品化的隐性乳房炎诊断试剂进行检验判定。

5 奶牛乳房炎病牛乳样的采集

5.1 试剂与材料

乳样采集管:配制方法见 A.1;生物冰袋或冰块。

5.2 操作方法

先用温水清洗乳房,然后依次用 0.2%新洁尔灭浸泡的脱脂棉或纱布、75%酒精棉擦拭消毒乳头。每个乳头弃去初始 2 把~3 把奶,然后按无菌操作规程分别采集每个乳室的乳样约 5 mL。采集的乳样保存于乳样采集管中,立即检验。如需运输送检,在运输过程中加入生物冰袋或冰块使乳样温度保持在 2℃~8℃,并保证在 10 d 以内送到相关实验室。

5.3 样品记录

样品记录至少应包括以下 4 项内容:

- a) 送检人的姓名和奶牛场的名称或地址;
- b) 牛号和乳室;
- c) 采样日期;
- d) 送检日期。

5.4 乳样中的细菌分离鉴定流程

奶牛乳房炎乳样中金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、无乳链球菌分离鉴定流程图见附录 B。

6 乳样接种和增菌

6.1 器材和设备

恒温培养箱(37℃)、冰箱(4℃)、洁净工作台、pH计、接种环、天平(精度为0.01 g)。

6.2 试剂与材料

血琼脂平板、改良营养肉汤(配制方法见A.2)。

6.3 操作方法

将待检乳样摇匀,无菌操作,用接种环取2环~3环待检乳样,间断划线接种于血琼脂平板上,置37℃恒温培养箱中培养18 h~24 h,观察细菌生长情况。对培养18 h~24 h无细菌生长的血琼脂平板,培养时间延长至48 h。若血琼脂平板上仍无菌落生长,则取该乳样50 μL,接种到改良营养肉汤中进行增菌培养,培养18 h~24 h。然后,将增菌培养物间断划线接种于新的血琼脂平板上,培养24 h~48 h,再观察细菌生长情况。

6.4 结果判定

乳样在血琼脂平板上接种培养18 h~48 h,如肉眼观察到菌落,则判定乳样中有细菌,然后对血平板上生长的菌落按照第7章的规定进行初步鉴定。

增菌培养物在血琼脂平板上接种培养24 h~48 h,如肉眼观察到菌落,则判定乳样中有细菌,然后对血琼脂平板上生长的菌落按照第7章的规定进行初步鉴定;如培养至48 h仍无细菌生长,则判定乳样中无细菌。

7 初步鉴定

7.1 器材和设备

光学显微镜、恒温培养箱(37℃)、洁净工作台、冰箱(4℃)、pH计、接种环、天平(精度为0.01 g)。

7.2 试剂与材料

革兰氏染色液、血琼脂平板。

7.3 菌落观察

肉眼观察血琼脂平板上的菌落。

7.4 菌落观察结果判定

7.4.1 当菌落为圆形、光滑凸起、湿润、边缘整齐,颜色呈金黄色、灰白色、乳白色或柠檬色,直径0.5 mm~1.5 mm的大菌落,溶血或不溶血,可初步判定为葡萄球菌属。

7.4.2 当菌落为圆形、光滑凸起、湿润、边缘整齐,颜色为灰白色或毛玻璃色,透明或半透明的小菌落或针尖大小的菌落,α溶血、β溶血或不溶血,可初步判定为链球菌属。

7.5 革兰氏染色镜检

分别挑取步骤7.4中疑似菌落进行革兰氏染色,将染色菌样置于显微镜油镜下观察。

7.6 革兰氏染色镜检结果判定

如果镜检观察到菌体为革兰氏阳性(G^+),形态为圆形或椭圆形,成对状、丛状、葡萄串状或链状排列的细菌,初步定为 G^+ 球菌。

7.7 纯化培养

挑取步骤7.6中初步判定为 G^+ 球菌的单个菌落,间断划线接种于新的血琼脂平板上,置37℃恒温培养箱中进行纯化培养18 h~24 h后,再次按7.4、7.5进行判定和革兰氏染色镜检。

如果镜检为纯净的 G^+ 球菌,则可进行接触酶试验。纯净的葡萄球菌属细菌镜检观察到菌体为革兰氏阳性(G^+),形态为圆形,成对状、丛状或葡萄串状;纯净的链球菌属细菌镜检观察到菌体为革兰氏阳性(G^+),形态为圆形或椭圆形,成对状或链状排列。如果不纯净,重复本步骤,直至镜检菌落纯净。

7.8 属别鉴定

7.8.1 总则

对7.7中镜检观察为 G^+ 球菌的纯净菌落进行接触酶试验。

7.8.2 试验试剂

3% H₂O₂ 溶液;配制方法见 A. 3。

7.8.3 接触酶试验操作方法

取 3% H₂O₂ 溶液 1 滴~2 滴置于干净载玻片上,然后加一接种环被检细菌菌落,与 H₂O₂ 滴液混合,立即产生气泡者为阳性,不产生气泡者为阴性。

7.8.4 结果判定

G⁺ 球菌,且接触酶试验阳性(+),初步判定为葡萄球菌属;

G⁺ 球菌,且接触酶试验阴性(-),初步判定为链球菌属。

8 定性鉴定

8.1 凝固酶阴性葡萄球菌的定性鉴定

8.1.1 总则

将步骤 7.8.4 中鉴定为葡萄球菌属的细菌进行兔血浆凝固酶试验。

8.1.2 器材和设备

恒温培养箱(37℃)、洁净工作台、冰箱(4℃)。

8.1.3 试剂与材料

8.1.3.1 兔血浆

配制方法见 A. 4。兔血浆也可用商品化的试剂,按说明书操作。

8.1.3.2 阳性对照菌株

兔血浆凝固酶阳性葡萄球菌菌株。

8.1.3.3 阴性对照

空白兔血浆。

8.1.4 兔血浆凝固酶试验操作方法

取新鲜配置的兔血浆 0.5 mL,放入无菌小试管中,再加入待检细菌肉汤培养物 0.1 mL,总体积为 0.6 mL,震荡摇匀,置 37℃ 恒温培养箱中培养,同时设立阳性对照和阴性对照。每 0.5 h 观察一次,观察 6 h,如呈现凝固(即将试管倾斜或倒置时,出现凝块)或凝固体积大于总体积(0.6 mL)的一半,则判定为阳性结果。

8.1.5 结果判定

葡萄球菌属的细菌,且符合兔血浆凝固酶试验阴性(-),则判定为凝固酶阴性葡萄球菌;

葡萄球菌属的细菌,且符合兔血浆凝固酶试验阳性(+),则判定为凝固酶阳性葡萄球菌。

8.2 金黄色葡萄球菌的定性鉴定

8.2.1 Baird-Parker 琼脂平板筛选

8.2.1.1 总则

将步骤 8.1.5 中判定为凝固酶阳性葡萄球菌的细菌进行 Baird-Parker 琼脂平板筛选。

8.2.1.2 器材和设备

恒温培养箱(37℃)、洁净工作台、冰箱(4℃)。

8.2.1.3 试剂与材料

Baird-Parker 琼脂平板;配制方法见 A. 5。

8.2.1.4 Baird-Parker 琼脂平板筛选操作方法

将待检细菌划线接种到 Baird-Parker 琼脂平板上,置 37℃ 恒温培养箱中培养 18 h~24 h 后观察菌落形态。

8.2.1.5 Baird-Parker 琼脂平板筛选结果判定

如果菌落直径为 2 mm~3 mm,颜色呈灰色到黑色,边缘为淡色,周围为一混浊带,在其外层有一透明圈,某些菌落混浊带和透明圈不明显,则初步判定为金黄色葡萄球菌。

8.2.2 金黄色葡萄球菌的聚合酶链式反应(PCR)检测

8.2.2.1 总则

将 8.2.1.5 中初步判定为金黄色葡萄球菌的细菌进行 PCR 检测,预期扩增片段 279 bp,PCR 扩增的核苷酸序列参照附录 C。

8.2.2.2 器材和设备

PCR 仪及 PCR 管、核酸电泳仪、核酸电泳槽及配套的制胶板与制胶梳、紫外凝胶成像系统或其他核酸电泳凝胶成像系统(与对应的核酸染料相适用)、冰箱(4℃)、恒温水浴锅(30℃~70℃)、微量移液器及吸头(量程为 0.1 μL~10.0 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL)、涡旋仪、天平(精度为 0.01 g)、医用乳胶手套和 PE 手套、接种环。

8.2.2.3 试剂与材料

8.2.2.3.1 金黄色葡萄球菌 PCR 鉴定的引物:商业合成。

上游引物 nuc1 序列:5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3';

下游引物 nuc2 序列:5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'。

8.2.2.3.2 营养肉汤。

8.2.2.3.3 革兰氏阳性细菌 DNA 提取试剂盒。

8.2.2.3.4 Premix Taq 或者其他商品化的 PCR 反应预混液。

8.2.2.3.5 超纯水。

8.2.2.3.6 DNA Ladder;DL 1 000 Ladder 或者 150 bp Ladder。

8.2.2.3.7 1×TAE 电泳缓冲液;配制方法见 A.6。

8.2.2.3.8 10 mg/mL 溴化乙锭;与紫外凝胶成像系统相适应,配制方法见 A.7。或者使用与其他核酸电泳凝胶成像系统相适应的商品化核酸染料。

8.2.2.3.9 琼脂糖;电泳级。

8.2.2.3.10 阳性对照菌株;金黄色葡萄球菌标准菌株或者经鉴定确认的金黄色葡萄球菌地方分离菌株。

8.2.2.3.11 阴性对照;设置超纯水为阴性对照。

8.2.2.4 操作步骤

8.2.2.4.1 细菌基因组 DNA 的提取

将 8.2.1.5 中初步判定为金黄色葡萄球菌的待检细菌、阳性对照菌株分别在营养肉汤中增菌培养 18 h~24 h 达到对数生长期,取对数生长期的细菌增殖菌液 1.5 mL,按照革兰氏阳性细菌 DNA 提取试剂盒的说明书的方法和步骤,分别提取待检细菌、阳性对照菌株的细菌总 DNA。

8.2.2.4.2 反应体系

以 8.2.2.4.1 中提取的细菌总 DNA 为模板 DNA,分别进行金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因 PCR 扩增鉴定。每个样品 50.0 μL 反应体系,组成如下:

Premix Taq (或者其他商品化的 PCR 反应预混液)	25.0 μL
超纯水	19.0 μL
上游引物 nuc1(100 mmol/L)	1.0 μL
下游引物 nuc2(100 mmol/L)	1.0 μL

模板 DNA	4.0 μ L(DNA 总量为 50 ng~120 ng)
总体积	50.0 μ L

8.2.2.4.3 PCR 扩增

按照 8.2.2.4.2 中的加样顺序全部加完后,充分混匀,瞬时离心,使液体都沉降到 PCR 管底。在每个 PCR 管中加入一滴液体石蜡油(约 20 μ L)。

阳性对照、阴性对照随样品同步进行 DNA 提取及 PCR 扩增。

8.2.2.4.4 金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因的扩增条件

第一阶段,95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;第二阶段,94 $^{\circ}$ C 50 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;第三阶段,72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min;然后将扩增产物按下述进行电泳分析和结果判定或置 4 $^{\circ}$ C 保存。

8.2.2.4.5 琼脂糖凝胶的制备

nuc 基因的 PCR 扩增产物需要在浓度为 15.0 g/L 的琼脂糖凝胶上进行核酸电泳,按 A.8 的方法制备琼脂糖凝胶。

8.2.2.4.6 电泳

PCR 扩增结束后,取 *nuc* 基因的 PCR 产物 10.0 μ L 在浓度为 15.0 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳,在与核酸染料相适应的核酸电泳凝胶成像系统上观察电泳结果。

8.2.2.4.7 电泳结果判定

在核酸电泳凝胶成像系统下观察,金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因的扩增片段为 279 bp,且阳性对照、阴性对照均成立,则判定 *nuc* 基因扩增阳性(+).

8.2.3 结果判定

如果待鉴定的凝固酶阳性葡萄球菌符合下列 2 项指标,则判定为金黄色葡萄球菌。

- Baird-Parker 平板上菌落直径为 2 mm~3 mm,颜色呈灰色到黑色,边缘为淡色,周围为一混浊带,在其外层有一透明圈,某些菌落混浊带和透明圈不明显;
- 金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因 PCR 扩增阳性(+).

8.3 无乳链球菌的鉴定

8.3.1 CAMP 试验

8.3.1.1 总则

将步骤 7.8.4 中鉴定为链球菌属的细菌进行 CAMP 试验。

8.3.1.2 器材和设备

恒温培养箱(37 $^{\circ}$ C)、洁净工作台、冰箱(4 $^{\circ}$ C)。

8.3.1.3 试剂与材料

血琼脂平板。

8.3.1.4 CAMP 试验操作方法

在血琼脂平板上用 β 溶血性金黄色葡萄球菌培养物划一条直线(竖线),然后用待检细菌培养物分别划一横线,与 β 溶血性金黄色葡萄球菌线垂直,但不要与之接触,37 $^{\circ}$ C 培养 20 h~24 h 判定。在 β 溶血性金黄色葡萄球菌线于被检菌线形成的直角处,呈现半圆形或三角形的 β 溶血区,似一个箭头,即为 CAMP 阳性(+)结果,不溶血者为 CAMP 阴性(-)结果。

8.3.1.5 CAMP 试验结果判定

链球菌属的细菌,且 CAMP 试验阳性(+),则判定疑似无乳链球菌。

8.3.2 无乳链球菌的 PCR 鉴定

8.3.2.1 总则

将步骤 8.3.1.5 中鉴定疑似无乳链球菌的细菌进行无乳链球菌的 PCR 鉴定,预期扩增片段 1 305

bp, PCR 扩增的核苷酸序列参照附录 D。

8.3.2.2 器材和设备

同 8.2.2.2。

8.3.2.3 试验材料

8.3.2.3.1 无乳链球菌 PCR 鉴定的引物序列为:商业合成。

上游引物 sip1:5'-ATGAAAATGAATAAAAAGGTAC-3';

下游引物 sip2:5'-TTATTTGTTAAATGATACGTG-3。

8.3.2.3.2 THB 肉汤:配制方法见 A.9。

8.3.2.3.3 革兰氏阳性细菌 DNA 提取试剂盒。

8.3.2.3.4 Premix Taq 或者其他商品化的 PCR 反应预混液。

8.3.2.3.5 超纯水。

8.3.2.3.6 DNA Ladder;DL 2 000 Ladder。

8.3.2.3.7 琼脂糖:电泳级。

8.3.2.3.8 1×TAE 电泳缓冲液:配制方法见 A.7。

8.3.2.3.9 10 mg/mL 溴化乙锭:与紫外凝胶成像系统相适应,配制方法见 A.8。或者使用与其他核酸电泳凝胶成像系统相适应的商品化核酸染料。

8.3.2.3.10 阳性对照菌株:无乳链球菌标准菌株或者鉴定准确的无乳链球菌地方分离菌株。

8.3.2.3.11 阴性对照:阴性对照是超纯水。

8.3.2.4 操作步骤

8.3.2.4.1 细菌基因组 DNA 的提取

将 8.3.1.5 中疑似无乳链球菌的细菌、阳性对照菌株分别接种于 THB 肉汤中增菌培养 18 h~24 h 达到对数生长期,取对数生长期的细菌增殖菌液 1.5 mL,根据革兰氏阳性细菌 DNA 提取试剂盒说明书分别提取待检细菌、阳性对照菌株的细菌总 DNA。

8.3.2.4.2 反应体系

以 8.3.2.4.1 中提取的细菌总 DNA 为模板 DNA,分别进行无乳链球菌的 sip 基因 PCR 扩增鉴定。每个样品的 50.0 μ L 反应体系,组成如下:

Premix Taq (或者其他商品化的 PCR 反应预混液)	25.0 μ L
超纯水	19.0 μ L
上游引物 sip1(100 mmol/L)	1.0 μ L
下游引物 sip2(100 mmol/L)	1.0 μ L
模板 DNA	4.0 μ L(DNA 总量为 50 ng~120 ng)
总体积	50.0 μ L

8.3.2.4.3 PCR 扩增

按照 8.3.2.4.2 加样顺序全部加完后,充分混匀,瞬时离心,使液体都沉降到 PCR 管底。在每个 PCR 管中加入一滴液体石蜡油(约 20 μ L)。

阳性对照、阴性对照随样品同步进行 DNA 提取及 PCR 扩增。

8.3.2.4.4 无乳链球菌 sip 基因的循环条件

第一阶段,95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;第二阶段,94 $^{\circ}$ C 60 s,45 $^{\circ}$ C 90 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环;第三阶段,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,然后将扩增产物按下述进行电泳分析和结果判定或置 4 $^{\circ}$ C 保存。

8.3.2.4.5 琼脂糖凝胶的制备

sip 基因的 PCR 扩增产物需要在浓度为 10.0 g/L 的琼脂糖凝胶上进行核酸电泳。按 A.9 的方法制备琼脂糖凝胶。

8.3.2.4.6 电泳

PCR 扩增结束后,取 *sip* 基因的 PCR 产物 10.0 μ L 在 10.0 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳,在与核酸染料相适应的核酸电泳凝胶成像系统上观察电泳结果。

8.3.2.4.7 电泳结果判定

在核酸电泳凝胶成像系统下观察,无乳链球菌 *sip* 基因扩增片段为 1 305 bp,且阳性对照、阴性对照均成立,则判定 *sip* 基因扩增阳性(+).

8.3.3 结果判定

如果待鉴定的疑是无乳链球菌的细菌,且无乳链球菌 *sip* 基因 PCR 扩增阳性(+),则判定为无乳链球菌。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 乳样采集管**A.1.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g~20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将 A.1.1 试剂放入烧杯中,搅拌加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.2~7.4。也可用商品化的营养琼脂,按照说明书操作。

分装入 10 mL 螺口平底塑料试管中,每管 4 mL,旋上盖子,但不能拧紧,121℃ 高压灭菌 20 min。灭菌完成后拧紧盖子制成斜面培养基,琼脂凝固即可使用。

注:确保乳样采集管无菌。

A.2 改良营养肉汤**A.2.1 成分**

牛肉膏	10.0 g
胰蛋白胨	20.0 g
酵母浸出物	3.0 g
氯化钠	3.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将 A.2.1 试剂放入烧杯中,搅拌加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.2~7.4,分装入玻璃试管,每管 2 mL。121℃ 高压灭菌 15 min,冷却后 4℃ 保存备用。使用前,每管加入 50% 葡萄糖 40 μL、犊牛血清 40 μL。

A.3 3% H₂O₂ 溶液**A.3.1 制法**

吸取 1 mL 30% H₂O₂ 溶液,溶于 9 mL 蒸馏水中,摇匀,即可使用。

A.4 兔血浆

制法:取柠檬酸钠 3.8 g,加蒸馏水 100 mL,溶解后过滤,瓶装,121℃ 高压灭菌 15 min。

无菌取 3.8% 柠檬酸钠溶液 1 份,加健康兔全血 4 份,轻轻摇匀,静置或 3 000 r/min 离心 30 min,使血细胞沉降,即可得到血浆。经细菌培养检验为阴性,即可使用。也可用商品化的兔血浆,按照说明书操作。

A.5 Baird-Parker 琼脂平板

A.5.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
酵母膏	1.0 g
丙酮酸钠	10.0 g
甘氨酸	12.0 g
氯化锂	5.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	950 mL

A.5.2 增菌剂的配法

30%卵黄盐水 50 mL 与经过过滤除菌的 1%亚硝酸钾 10 mL 混合,保存于冰箱(2℃~8℃)内。

A.5.3 制法

将各成分加入到蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.0 ± 0.2 。分装每瓶 95 mL,121℃ 高压灭菌 15 min。临时用加热融化琼脂,冷至 47℃~50℃,每 95 mL Baird-Parker 琼脂基础培养基加入预热至 47℃~50℃的卵黄亚硝酸钾增菌剂 5 mL,摇匀后倾注平板。培养基应是紧致不透明的。使用前,在冰箱储存不得超过 48 h。也可用商品化的 Baird-Parker 琼脂基础培养基,按照说明书操作。

A.6 1×TAE 电泳缓冲液

A.6.1 50×TAE 电泳缓冲液成分

Tris	242.0 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2 g
醋酸	57.1 mL

A.6.2 制法

分别称取上述成分,在 800 mL 去离子水,充分搅拌溶解。加入 57.1 mL 的醋酸,充分搅拌,然后加去离子水将溶液定容至 1 000 mL,室温保存备用。将 50×TAE 电泳缓冲液进行 50 倍稀释则为制备琼脂糖凝胶和核酸电泳的 1×TAE 电泳缓冲液。

A.7 溴化乙锭(10 mg/mL)

制法:称取 0.1 g 溴化乙锭,加入到洁净的 15 mL 塑料螺口离心管中,加入 10 mL 灭菌的去离子水,充分搅拌使溴化乙锭完全溶解,将溶液室温避光保存。

溴化乙锭的工作浓度为 0.5 μg/mL。

注:溴化乙锭是一种强烈的诱变剂并具有中毒毒性,要小心操作,带医用乳胶手套或 PE 手套。

A.8 琼脂糖凝胶

制法:

- 根据样品数量的多少和电泳槽选择制胶板的大小,并决定琼脂糖凝胶的需用量。
- 将配套的制胶梳安置到制胶板上。
- 然后称取需用量的琼脂糖,加入到三角瓶中,加入相应量的电泳缓冲液(见 A.7),在微波炉中加热融化。
- 冷却至 60℃,加入溴化乙锭至终浓度(见 A.8)。或者使用其他商品化的核酸染料,按其说明书使用。

e) 将加入核酸染料的琼脂糖凝胶倒入安置好的制胶板,冷却凝固后,将制胶梳拔出准备电泳。

注:琼脂糖溶液若在微波炉里加热过长时间,溶液将过热并暴沸。

A.9 THB 培养基

A.9.1 成分

牛肉粉	10.0 g
胰蛋白胨	20.0 g
葡萄糖	2.0 g
碳酸氢钠	2.0 g
氯化钠	2.0 g
磷酸氢二钠	0.4 g

A.9.2 制法

称取上述成分,溶解于1 000 mL蒸馏水中,121℃高压灭菌15 min。冷却至47℃~50℃时,加入多黏菌素 E 10 mg 和萘啶酮酸 15 mg,混匀。分装到无菌小试管,每管 2 mL。

附录 B
(规范性附录)
本标准的细菌分离鉴定流程图

本标准的细菌分离鉴定流程图见图 B.1。

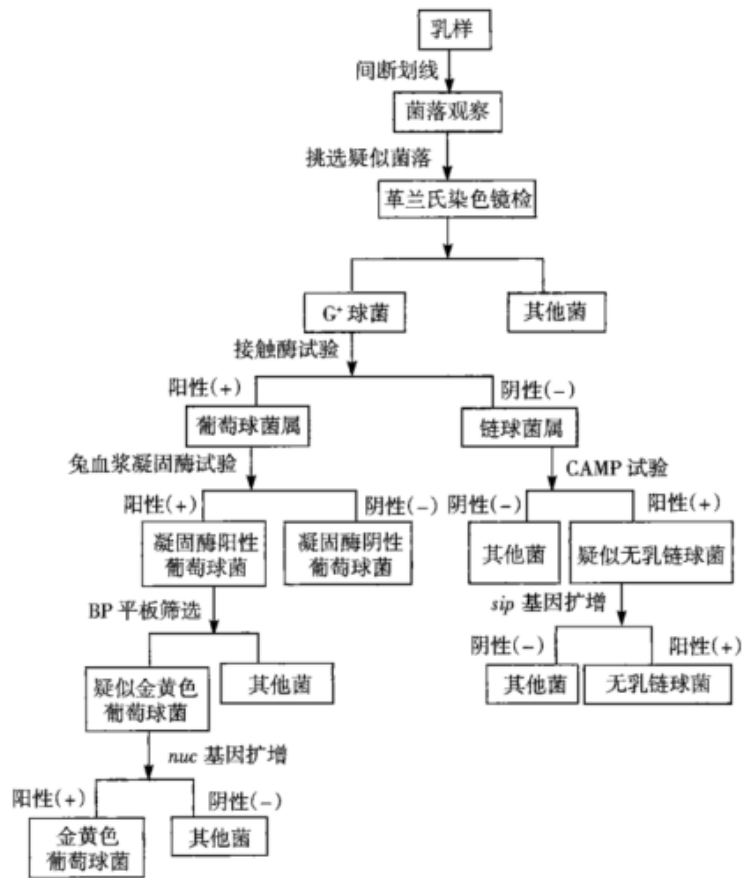


图 B.1 本标准的细菌分离鉴定流程图

附 录 C

(资料性附录)

金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因 PCR 扩增核苷酸序列

GCGATTGATGGTGATACGGTTAAATTAATGTACAAAGGTCAACCAATGACATTCAGACTATTATTGGTTGATACACC
TGAAACAAAGCATCCTAAAAAGGTGTAGAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCAATTTACGAAAAAATGGTAGAAA
ATGCAAAGAAAATTGAAGTCGAGTTGACAAAGGTCAAAGAAGCTGATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATTTAT
GCTGATGGAAAAATGGTAAACGAAGCTTTAGTTCGTCAAGGCTTGGCT

附 录 D

(资料性附录)

无乳链球菌 *sip* 基因 PCR 扩增核苷酸序列

ATGAAAATGAATAAAAAGGTACTATTGACATCGACAATGGCAGCTTCGCTATTATCAGTCGCAAGTGTTC AAGCACA
AGAAACAGATACGACGTGGACAGCACGTACTGTTTCAGAGGTAAAGGCTGATTTGGTAAAGCAAGACAATAAATCAT
CATATACTGTGAAATATGGTGATACACTAAGCGTTATTTTCAGAAGCAATGTCAATTGATATGAATGTCTTAGCAAAA
ATTAATAACATTGCAGATATCAATCTTATTTATCCTGAGACAACACTGACAGTAACTTACGATCAGAAGAGTCATAC
TGCCACTTCAATGAAAATAGAAAACACCAGCAACAAATGCTGCTGGTCAAACAACAGCTACTGTGGATTTGAAAACCA
ATCAAGTTTCTGTTGCAGACCAAAAAGTTTCTCTCAATACAATTTTCGGAAGGTATGACACCAGAAGCAGCAACAACG
ATTGTTTCGCCAATGAAGACATATTCTTCTGCGCCAGCTTTGAAATCAAAAAGAAGTATTAGCACAAGAGCAAGCTGT
TAGTCAAGCAGCAGCCAA TGAACAGGTATCACCAGCTCCTGTGAAGTCGATTACTTCAGAAGTCCAGCAGCTAAAG
AGGAAGTTAAACCAACTCAGACGTCAGTCAGTCAGTCAACAACAGTATCACCAGCTTCTGTTGCTGCTGAAACACCA
GCTCCAGTAGCTAAAGTATCACCGGTAAGAACTGTAGCAGCCCCTAGAGTGGCAAGTGCTAAAGTAGTCACTCCTAA
AGTAGAAACTGGTGCATCACCAGAGCATGTATCAGCTCCAGCAGTTCCTGTGACTACGACTTCAACAGCTACAGACA
GTAAGTTACAAGCGACTGAAGTTAAGAGCGTCCGGTAGCACAAAAGCTCCAACAGCAACACCGGTAGCACAAACCA
GTTTCAACAACAAATGCAGTAGCTGCACATCCTGAAAATGCAGGGCTACAACCTCATGTTGCGGCTTATAAAGAAAA
AGTAGCGTCAACTTATGGAGTTAATGAA TTCAGTACATACCGTGCGGGTGATCCAGGTGATCATGGTAAAGGTTTAG
CAGTTGACTTTATTTGTAGGTACCAA TCGAGCACTTGGTAA TGAAGTTGCACAGTACTCTACACAAAATATGGCGGCA
AATAACATTTTCATATGTTATCTGGCAACAAAAGTTTACTCAAATACAAATAGTATTTATGGACCTGCTAATACTTG
GAATGCAATGCCAGATCGTGGTGGCGTTACTGCCAACCACTATGACCACGTTACGTATCATTAAACAAATAA
