

### 产气荚膜梭菌分离与鉴定操作规程

Operating procedures for isolation and identification of sheep  
clostridium perfringens

2024-05-31 发布

2024-07-01 实施



## 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》的规定起草。

本文件由内蒙古畜牧业标准化技术委员会（SAM/TC 19）归口。

本文件起草单位：内蒙古自治区农牧业科学院。

本文件主要起草人：白帆、戴伶俐、赵启南、王娜、张月梅、孟子琪、杨磊、李慧、张帆、宋越、刘威、杨斌、刘敏、罗晓平、李军燕、高娃、达来宝力格、赵世华。



# 产气荚膜梭菌分离与鉴定操作规程

## 1 范围

本文件规定了羊产气荚膜梭菌分离与鉴定操作方法。  
本文件适用于实验室进行产气荚膜梭菌的分离鉴定。

## 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 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求  
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*)

旧称魏氏梭菌 (*C. welchii*)，梭菌科梭菌属微生物，菌体直杆状，两端钝圆，单在或成双，革兰阳性，无鞭毛，有荚膜，一般条件下罕见形成芽孢，芽孢卵圆形，位于菌体中央或近端。依据所产生的主要致死毒素，可将本菌分为A、B、C、D、E、F和G七个毒素型。

## 4 操作步骤

### 4.1 方法概要

检测程序的流程示意图按照附录A要求。

### 4.2 培养基和试剂

- 4.2.1 除另有规定，所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 的超纯水。
- 4.2.2 胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸 (TSC) 琼脂平板：见附录 B 中 B.1。
- 4.2.3 液体硫乙醇酸盐培养基 (FTG)：见附录 B 中 B.2。
- 4.2.4 含铁牛奶培养基：见附录 B 中 B.3。
- 4.2.5 乳糖亚硫酸盐培养基 (LS)：见附录 B 中 B.4。
- 4.2.6 Taq DNA 聚合酶
- 4.2.7 琼脂糖：电泳级
- 4.2.8 溴化乙锭

4.2.9 分子量标记：DL-600、DL-2000

4.2.10 TAE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) , 1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 。

### 4.3 仪器和设备

4.3.1 旋涡振荡器。

4.3.2 天平：称量范围 0 g~500 g，读数精准度 0.01 g 。

4.3.3 核酸电泳仪。

4.3.4 PCR 仪。

4.3.5 凝胶成像系统。

4.3.6 恒温培养箱：37 ℃。

4.3.7 恒温水浴锅：46 ℃。

4.3.8 高压蒸汽灭菌锅。

4.3.9 厌氧培养箱。

4.3.10 光学显微镜。

4.3.11 低温离心机：2 ℃~8 ℃。

4.3.12 冰箱：2 ℃~8 ℃。

### 4.4 方法

#### 4.4.1 样品采集

对活羊可采集直肠内粪便或肛拭子，粪便样品应选新鲜粪便至少10.0 g，使用无菌容器运送，肛拭子样品应取无菌棉拭子插入肛门中，旋转2~3圈，充分刮取直肠黏液或粪便；新近病死或剖杀羊只无菌采集肝脏、肾脏、脾脏、心脏、淋巴结或肠道内容物。样品4 ℃下保存和运输，24 h内送检。

#### 4.4.2 细菌的分离

##### 4.4.2.1 组织样本的分菌

用经火焰灭菌并冷却的接种环蘸取病料内部组织后划线接种于TSC琼脂平板，倒置于厌氧培养箱内，于37 ℃培养20 h~24 h后观察菌落形态。

##### 4.4.2.2 肛拭子、粪便或肠道内容物样本的分菌

将棉拭子样品置于20 mL无菌生理盐水中旋涡混匀30 s，静置1 min；称取1.0 g~5.0 g粪便或肠道内容物样品，置于装有20 mL无菌生理盐水的50 mL离心管中旋涡混匀30 s，静置1 min。吸取50 μL上层液体，均匀涂布在TSC琼脂平板上。倒置于厌氧培养箱内，于37 ℃培养20 h~24 h后观察菌落形态。

#### 4.4.3 细菌鉴定

4.4.3.1 典型的产气荚膜梭菌在 TSC 琼脂平板上为黑色菌落。从单个平板上任选 5 个黑色菌落，分别接种到 FTG 培养基，正置于厌氧培养箱内，37 ℃培养 20 h~24 h。

4.4.3.2 用上述培养液涂片并按 GB/T 4789.28 所述的方法进行革兰染色，镜检观察其纯度。产气荚膜梭菌为革兰氏阳性粗短的杆菌，两端钝圆，单个或成双排列。如果培养液不纯，应在 TSC 琼脂平板上再次划线培养后，挑取单个典型黑色菌落接种到 FTG 培养基，37 ℃厌氧培养 20 h~24 h，用于后续的确证试验。

4.4.3.3 取1 mL上述FTG培养液接种于含铁牛奶培养基中，在46 °C水浴中培养2 h后，持续观察酪蛋白是否凝固并大量产气，呈“暴烈发酵”现象。5 h内不发酵者为阴性。

4.4.3.4 取1 mL上述FTG培养液转接到LS培养基中，水浴中46 °C需氧培养18 h~24 h后，检查LS培养基中的倒管是否产气且呈黑色(为亚硫酸铁沉淀)，LS培养基变黑且产气超过1/4小倒管的可确认为阳性；若LS培养基变黑但产气不足1/4小倒管的，立即从中转接5滴至另一管LS培养基，于水浴中46 °C培养18 h~24 h后；同上判断是否阳性。

#### 4.4.4 PCR 扩增

##### 4.4.4.1 产气荚膜梭菌 16S rRNA 扩增检测

取1 mL上述FTG培养液至1.5 mL离心管中，12000 r/min离心后弃上清液，加入100 μL灭菌水重悬沉淀后反复冻融3次，12000 r/min离心10 min，取上清液作为DNA模板，引物序列参见附录C，混匀，进行PCR扩增，同时设置阳性对照和阴性对照。扩增条件为95 °C预变性3 min；95 °C变性20 s，55 °C退火30 s，72 °C延伸40 s，32个循环；72 °C延伸10 min，4 °C保存。

##### 4.4.4.2 产气荚膜梭菌特异性序列扩增检测

DNA模板提取方法同4.4.4.1，引物序列参见附录D，混匀，进行PCR扩增，同时设置阳性对照和阴性对照。扩增条件为94 °C预变性5 min；94 °C变性45 s，53 °C退火45 s，72 °C延伸45 s，35个循环；72 °C终延伸10 min，4 °C保存。

##### 4.4.4.3 琼脂糖凝胶电泳

在电泳缓冲液中加入1%琼脂糖，加热融化后加入溴化乙锭制备凝胶，凝固后进行电泳。8 μL PCR产物加入2 μL上样缓冲液，混匀后加入上样孔，80 V恒压电泳25 min，放入凝胶成像系统紫外线透射检验。

##### 4.4.4.4 电泳结果

16S rRNA PCR产物凝胶电泳成像结果显示扩增条带在1400 bp处，无杂带，且阴性对照未出现特异性条带，可将PCR产物测序，测序结果与标准序列进行比对。

特异性引物PCR产物凝胶电泳成像结果显示扩增条带在475 bp处，无杂带，且阴性对照未出现特异性条带。

## 5 结果判定

同时符合或以下特性者应判为产气荚膜梭菌：

- 革兰氏阳性粗大的短杆菌，两端钝圆，呈短链状，无鞭毛，有荚膜，可形成芽孢；
- 在含铁牛奶培养基中呈现“暴烈发酵”现象，产生大量气体使凝固的牛乳呈蜂窝状；
- LS培养基变黑且产气超过1/4小倒管；
- 16S rRNA序列比对与产气荚膜梭菌为同一进化分支；
- PCR扩增结果出现475 bp电泳带。

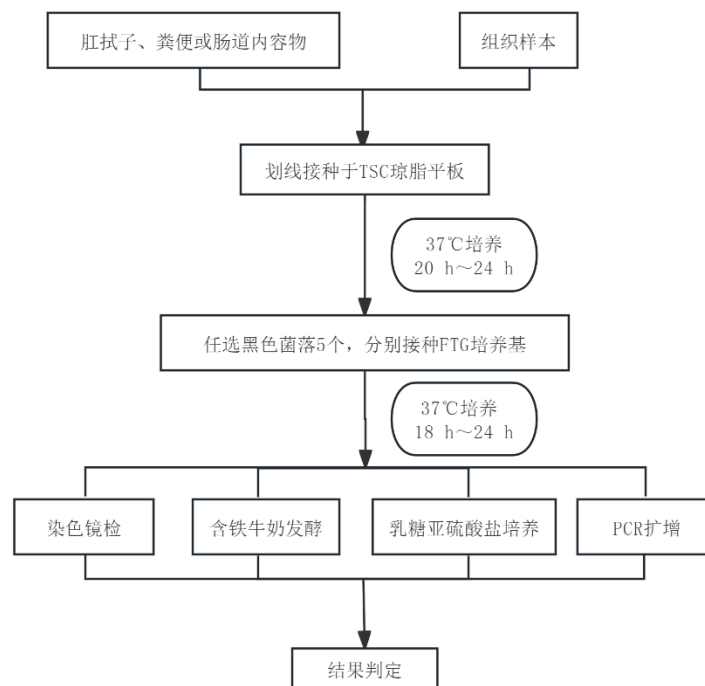
## 6 废弃物处理和防止污染的措施

依据《病死及病害动物无害化处理技术规范》及《病原微生物实验室生物安全管理条例》对废弃物进行无害化处理。



附录 A  
(规范性)  
羊产气荚膜梭菌检测

羊产气荚膜梭菌检测流程见图A.1。



图A.1 羊产气荚膜梭菌检测流程图

**附录 B**  
(资料性)  
**培养基和试剂**

**B.1 胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸 (TSC) 琼脂平板****B.1.1 基础成分**

基础成分见表 B.1。

**表B.1 基础成分**

胰酪蛋白胨	15.0 g
大豆胨	5.0 g
酵母粉	5.0 g
焦亚硫酸钠	1.0 g
柠檬酸铁铵	1.0 g
琼脂	15.0 g
超纯水	1000.0 mL

**B.1.2 D-环丝氨酸**

称取1 g D-环丝氨酸，溶解于200 mL超纯水中，0.22 μm滤膜过滤除菌，2℃~8℃保存备用。

**B.1.3 制法**

将基础成分完全溶解并调整pH值为7.6±0.2，配制成基础溶液，121℃高压蒸汽灭菌15 min，于50℃±1℃保温备用。倾注平板前，向每250 mL基础溶液中无菌操作加入20 mL D-环丝氨酸溶液，混匀，倾注平皿。制备好的培养基平皿在2℃~8℃保存。

**B.2 液体硫乙醇酸盐培养基 (FTG)****B.2.1 成分**

成分见表B.2。

**表B.2 成分**

胰酪蛋白胨	15.0 g
L-胱氨酸	0.5 g
酵母粉	5.0 g
葡萄糖	5.0 g
氯化钠	2.5 g
硫乙醇酸钠	0.5 g
刃天青	0.001 g
琼脂	0.75 g
超纯水	1000.0 mL

### B.2.2 制法

将以上成分溶解于1000 mL超纯水并调整pH值为 $7.1 \pm 0.2$ ，121 °C高压蒸汽灭菌15 min。制备好的培养基在2 °C~8 °C保存。

### B.3 含铁牛奶培养基

#### B.3.1 成分

成分见表B.3。

表B.3 成分

全脂奶粉	100.0 g
硫酸亚铁 ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.0 g
超纯水	1000.0 mL

#### B.3.2 制法

将以上成分溶解于1000 mL超纯水，116 °C高压灭菌10 min。本培养基必须新鲜配制。

### B.4 乳糖亚硫酸盐培养基(LS)

#### B.4.1 基础成分

基础成分见表B.4。

表B.4 基础成分

胰酪蛋白胨	5.0 g
酵母粉	2.5 g
乳糖	10.0 g
氯化钠	2.5 g
L-半胱氨酸盐酸盐	0.3 g
超纯水	1000.0 mL

#### B.4.2 焦亚硫酸钠

称取无水焦亚硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) 1.2 g溶解于100 mL超纯水，0.22 μm滤膜过滤除菌，2 °C~8 °C保存备用。

#### B.4.3 柠檬酸铁铵

称取柠檬酸铁铵1 g混合溶解于100 mL超纯水，0.22 μm滤膜过滤除菌，2 °C~8 °C保存备用。

#### B.4.4 制法

使用当天，将基础成分完全溶解并调整pH值为 $7.1 \pm 0.2$ ，配制成基础溶液，121 °C高压蒸汽灭菌15 min，备用。将焦亚硫酸钠溶液和柠檬酸铁铵溶液各0.5 mL加至8 mL的基础溶液中，制成乳糖亚硫酸盐完全培养基。

附录 C  
(资料性)

羊产气荚膜梭菌 16S rRNA 序列的扩增

羊产气荚膜梭菌 16S rRNA 序列的扩增引物见表 C.1。

表 C.1 用于 16S rRNA 序列扩增的引物

引物	序列
27-F	5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492-R	5'-TACCTTGTTACGACTT-3'

## 附 录 D

(资料性)

## 羊产气荚膜梭菌序列的扩增

羊产气荚膜梭菌序列的扩增引物见表D.1。

表D.1 用于羊产气荚膜梭菌序列扩增的引物

引物	序列
上游引物-F	5'-TTACTGCCGTTGATAGCG-3'
下游引物-R	5'-TCATTCCTGGGTTGTCC-3'

### 参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国农业部. 病死及病害动物无害化处理技术规范. 2017年.
  - [2] 中华人民共和国国务院. 病原微生物实验室生物安全管理条例. 2018年.
-